中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 3127(2016) 04 - 0277 - 06

·论著·

纳米氧化铝暴露对小鼠神经行为学的持续影响及其机制探讨

鹿奎奎[1,2]，陆润泽[3]，孙浩[3]，夏蓉[1]，张浩[1]，卞倩[1,2]
(1. 南京医科大学公共卫生学院，江苏 南京 211166; 2. 江苏省疾病预防控制中心毒理与功能评价所; 3. 东南大学公共卫生学院)

【摘要】 目的 探讨纳米氧化铝吸入暴露染毒对小鼠神经行为学的持续影响及其可能存在的机制。方法 将 40 只健康 ICR 小鼠随机分成 4 组，每组 10 只，1 组为对照组，3 组为纳米氧化铝暴露染毒。应用动式吸入染毒柜，同时给予各暴露染毒组小鼠纳米氧化铝动态吸入染毒，染毒浓度 1 mg/m^3，每天暴露 8 h，连续染毒 14 d，于染毒开始前 1 d(对照组) ，染毒结束后 1 d(暴露后 1 d 组) 、60 d(暴露后 60 d 组) 、90 d(暴露后 90 d 组) ，采用旷场试验和 Morris 水迷宫试验检测小鼠的空间学习和记忆能力，取大脑皮层组织作苏木素 - 伊红(HE) 染色和淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein，APP) 免疫组化染色，qRT-PCR 检测 APP mRNA 的表达水平，并用试剂盒法检测脑组织中腺嘌呤核苷三磷酸(ATP) 、丙二醛(MDA) 、活性氧(ROS) 含量。结果 旷场试验中，与对照组相比，除暴露后 1 d 组小鼠在进入中心区频率差异无统计学意义，其余各组小鼠各项指标均降低且差异有统计学意义($P < 0.05$) ; 水迷宫试验中，各暴露染毒组小鼠平台象限停留时间均降低，差异均有统计学意义($P < 0.05$) ; 穿越平台区频率均降低，仅暴露后 90 d 组小鼠差异有统计学意义($P < 0.05$) 。大脑皮层的 HE 染色均未见明显的病理改变，APP 免疫组化染色显示暴露后 90 d 组 APP 阳性细胞明显增加; qRT-PCR 检测显示，APP mRNA 的表达水平随暴露后天数增加而升高，且差异均有统计学意义($P < 0.05$) ; 脑组织中 ATP 水平与对照组相比均降低，暴露后 60 和 90 d 组小鼠 ATP 水平差异有统计学意义($P < 0.05$) ，MDA 含量和 ROS 含量均升高且差异均有统计学意义($P < 0.05$) 。结论 经纳米氧化铝暴露染毒，脱离暴露环境后，仍然会提高小鼠脑组织氧化应激水平并改变其神经行为学。APP 的过度表达以及脑组织氧化应激反应可能是纳米氧化铝导致小鼠神经行为学改变的重要机制之一。

【关键词】 纳米氧化铝; 水迷宫; 旷场试验; 神经行为学; 氧化应激
DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2016.04.007

The effects of aluminum oxide nanoparticles exposure on the neurobehavioral of mice and its mechanism

LU Kui-kui, LU Run-ze, SUN Hao, XIA Rong, ZHANG Hao, BIAN Qian
(*School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu* 211166, China)

【Abstract】 **Objective** To study continuous effects and potential mechanisms of neurobehavioral changes upon aluminum oxide nanoparticle inhalation exposure. **Methods** A total of 40 ICR mice were randomly divided into control group and 3 test groups which were subjected to 8 h dynamic inhalation exposure of 1 mg/m^3 aluminum oxide nanoparticle for 14 consecutive days. Mice in control group were sacrificed 1 d before exposure; mice in exposure groups were sacrificed 1 d after exposure (1 d group) , 60 d after exposure(60 d group) and 90 d after exposure (90 d group) , respectively. Open field test and Morris water maze test were employed to detect spatial learning and memory capacity; cerebral cortex tissue HE staining and amyloid precursor protein (amyloid precursor protein, APP) immunohistochemical staining were performed; APP mRNA expression was detected by qRT-PCR. The concentrations of adenine nucleoside three phosphoric acid (ATP) , malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in brain tissue were detected by corresponding analysis kits. **Results** Compared with control group, mice except for those in 1 d group had comparable frequency to enter central zone, all indices of other test groups were lower, all differences were significantly statistical ($P < 0.05$) . In water maze test, all mice in test groups had shorter platform

基金项目: 2014 年现代毒理学教育部重点实验室(南京医科大学) 开放课题; 2015 年度江苏省第四期“333”工程科研资助项目(BRA2015490) ; 江苏省自然科学基金(BK20161585)

作者简介: 鹿奎奎，初级实验师，研究方向: 吸入毒理学。
通讯作者: 卞倩，副主任医师，研究方向: 毒理学。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

quadrant residence time than control group, all with statistical difference ($P<0.05$); the cross platform area frequency decreased for all test groups, only 90 d group had statistical significance ($P<0.05$). No obvious pathological changes were observed by HE staining in cerebral cortex tissue. Immunohistochemistry staining showed APP positive cells in 90 d group increased significantly; qRT-PCR showed APP mRNA expression increased upon incensement of days after exposure, with significant statistically difference ($P<0.05$). ATP levels in brain tissues of test groups were lower than control group; statistical significant difference was observed between 60 d and 90 d groups. MDA and ROS concentration both increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** The aluminum oxide nanoparticle exposure had continuous effect on improving oxidative stress and inducing neurobehavioral changes of mice brain after the exposure. APP over expression and oxidative stress response in brain tissues may serve as an important mechanism for mice neurobehavioral changes upon aluminum oxide nanoparticle exposure.

【Key words】 Aluminum oxide nanoparticles; Oxidative stress; Neurobehavior; Amyloid precursor protein

随着纳米技术的飞速发展，纳米材料在医药健康领域得到了广泛应用，人们在工作生活场所中接触各种纳米颗粒和纳米材料的机会和频率也日益增加。由于纳米颗粒粒径小，比表面积大，可携带的有害物质更多，因此纳米材料在生产和应用过程中的职业暴露风险也越来越受到重视，对纳米材料的毒性研究已经成为当今环境毒理学一个非常重要的领域。纳米氧化铝是一种新型纳米材料，具有晶相稳定、硬度高、尺寸稳定性好等优点，广泛应用于各种橡胶、塑料、陶瓷、耐火材料等产品的补强增韧、荧光材料、催化载体、复合材料和树脂材料等[1]。目前国内外对于纳米氧化铝的研究尚处于起步阶段，其毒性机制还需要进一步研究和探讨。吉俊伟等[2]研究表明纳米氧化铝可导致 ICR 小鼠脑氧化应激水平的改变；葛翠翠等[3]研究表明纳米氧化铝颗粒能够引起神经细胞的凋亡，且随着纳米氧化铝粒径的减小，细胞凋亡率逐渐增加；Chen 等[4]研究发现，自噬可能是纳米氧化铝介导细胞毒性的主要机制之一。纳米氧化铝颗粒还可以引起细胞的 DNA 损伤和氧化应激反应[5]。但在纳米氧化铝暴露后的时间效应研究方面还缺少一定的实验资料。本研究采用动式吸入染毒装置，对 ICR 小鼠进行全身暴露染毒，模拟职业暴露方式，研究 ICR 小鼠经纳米氧化铝暴露，脱离暴露环境后神经行为学的变化以及脑组织氧化应激水平的改变。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　Ethovision XT 行为学分析系统（Noduls，荷兰），动式吸入染毒系统（北京慧荣和科技有限公司，型号 HRH-WBE3386），粉尘气发生器（北京慧荣和科技有限公司，型号 HRH-DAG768），粉尘质量浓度监测仪（美国 CASELLA，型号 CLE-712 Microdust Pro），生化分析仪（荷兰 Vital，Junior），切片机（德国莱卡），实时荧光定量 PCR 仪。纳米氧化铝（德国 Plasmachem GmbH，纯度 > 99.8%，粒径 30nm），Trizol 试剂盒、M-MuLV 反转录试剂盒、ATP 检测试剂盒、丙二醛（MDA）检测试剂盒、活性氧（ROS）检测试剂盒（碧云天生物技术研究所）。

1.2　动物分组及染毒　SPF 级健康 ICR 小鼠 40 只，雌雄各半，体重范围 18 ~ 22 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，生产许可证号：SCXK（京）2012-0001。饲养环境维持室温（22 ± 2）℃，湿度在 40% ~ 70%，12 h 明/暗交替，实验期间小鼠自由摄食和饮水。采用随机数字法，将小鼠分为 4 组，每组 10 只，1 组为对照组，3 组为纳米氧化铝暴露染毒。应用动式吸入染毒柜，同时给予各暴露染毒组小鼠纳米氧化铝动态吸入染毒，染毒浓度 1 mg/m^3，每天暴露 8 h，连续染毒 14 d，于染毒开始前 1 d（对照组），染毒结束后 1 d（暴露后 1 d 组）、60 d（暴露后 60 d 组）、90 d（暴露后 90 d 组），采用旷场试验和 Morris 水迷宫试验检测小鼠的空间学习和记忆能力，取大脑皮层组织作苏木素 - 伊红（HE）染色和淀粉样蛋白前体（amyloid precursor protein，APP）免疫组化染色，qRT-PCR 检测 APP mRNA 的表达水平，并检测脑组织中腺嘌呤核苷三磷酸（ATP）、丙二醛（MDA）、活性氧（ROS）含量。

1.3　旷场实验　将小鼠置于 40 cm × 40 cm 的箱体中，箱体上方有摄像机，箱体置于隔音箱中，避免外界声音干扰。令小鼠自由活动 3 min，记录其运动轨迹，并分析其静止状态（速率 < 1.75 cm/s）、运动状态（速率 > 1.75 cm/s）、进入中心区域的次数以及在中心区域的停留时间。

1.4　水迷宫实验　实验所用水迷宫为直径 90cm 的水池。将水池假想等分为 4 个象限，在第四象限正中放置直径 9 cm 平台，淹没于水面下 0.5 cm。水温控制在 22 ~ 24 ℃。隐蔽平台实验中小鼠入水点为 1 ~ 3 象限边缘中点，记录大鼠在 90 s 内找到平台的时间，如超过 90 s 未找到，则时间记为 90 s。实验连续进行 5 d。空间探索试验中，取出平台，小鼠入水点为原平台象限对侧象限，记录 90 s 内小鼠的运动轨迹、跨越

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net