

铝的毒性研究 (II) —铝对寿命及与衰老有关酶活性等的影响

徐格晟 黄国伟 天津医学院 (300070)
张万起 任大林
王厚德 王 慧 吕维善 沧州市应用微生物研究所 (061001)

摘要 从兔、小鼠、大鼠研究发现铝在一定剂量范围内,可不同程度地抑制动物中超氧化物歧化酶或谷胱甘肽过氧化物酶的活力,降低血锌水平,由此造成动物体内过氧化脂质和脂褐素含量的升高、或尾腱游离羟脯氨酸减少等变化,并对果蝇还显示有降低寿命作用。从衰老机制中的自由基学说、大分子交联学说等考虑,结合铝所致的组织病理变化,提出应注意铝可能是外环境中促进或致衰老作用的因素之一。

通过铝对兔所产生的某些病理、生化影响,如脑组织病变等研究,^{〔14〕}发现铝对机体毒作用的表现与正常机体衰老过程的退化性变化有不少类似处。同时国外也有研究提出长期高铝摄入可能与早衰、寿命缩短有关。^{〔1〕}因此本课题用兔、大鼠、小鼠、果蝇,以寿命实验及一般认为可反映机体衰老变化的某些酶活性等,进行铝与衰老关系方面的初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1.2 实验用铝试剂及饲料铝含量

分析纯硫酸铝钾 天津化学试剂一厂,批号 890409。不等量地加入各组动物饲料中。

饲料铝含量 (实测)

兔饲料铝含量同,^{〔14〕}其它动物见下表。

表 1 实验动物基本状况

	对与衰老有关指标影响研究			寿命实验	
	小鼠	大鼠	兔	小鼠	果蝇
动物品系	津白 I	Wistar	大白耳	津白 I	野生型 Oregonk
实验起始日 (月) 龄	36 天	10 月	2—3 月	103 天	1—2 天
动物来源	天津医学院	天津医学院	卫生学环境医学研究所	天津医学院	天津师范大学
动物组数	5	4	3	4	5
每组动物	雌雄各 20	雌雄各 16	雄 7	雌雄各 100	雌雄各 100

表 2 各组动物饲料铝含量 mg/Kg

组别	小鼠饲料铝含量		大鼠饲料	果蝇饲料
	对与衰老有关指标影响研究	寿命实验	铝含量	铝含量
I	19.3	16.4	15.5	0.88
II	34.7	26.4	21.4	2.02
III	81.5	80.8	81.5	6.57
IV	114.6	123.6	112.3	57.78
V	986.7			114.68

* 基础饲料配方见参考文献^{〔2〕}

1.3 研究方法

铝对与衰老有关酶活性等影响的研究

大、小鼠及兔均按体重随机分组。大鼠饲养为每笼雄性 2 只、雌性 4 只，小鼠则雄性 1 只、雌性 5 只，雌雄分笼喂养、自由进食。共饲养 3 个月，取血后处死，测血或组织中有关生化指标。饲料摄入量是用倒扣法统计，即在每批饲料快吃完时，称剩余量，总量减剩余量为此阶段大致进食量，再根据此阶段的平均体重，算出大致的日均铝摄入量。兔研究方法见上文。^{〔14〕}

铝对寿命影响的研究

小鼠按体重随机分组，实验中 283 及 403 天时再次称体重，求得平均体重。用倒扣法统计饲料进食量，计算大致的摄入量。每天记录死亡小鼠数，直至全部死亡，由此算出平均寿命，以最后 1 只小鼠生存时间为最高寿命。果蝇饲养于 22 × 110mm 玻璃指管中，每管 25 只，两性分开饲养。培养管水平位置于恒温箱中，温度 25 ± 0.5℃，

相对湿度 70—75%。3 天换 1 次饲料。每天上午八点统计死亡数，以全部果蝇存活总天数的均数为平均寿命，以最后 1 只果蝇生存时间为最高寿命。此果蝇寿命实验共设 4 个重复。

1.4 检测方法

饲料铝含量同上文，^{〔14〕} 石墨炉原子吸收光谱法。

超氧化物歧化酶 小鼠、大鼠肝脏为光还原硝基四氮唑兰法，^{〔3〕} 兔血清为联大茴香胺法，见上文。^{〔14〕}

谷胱甘肽过氧化物酶 二硫二硝基甲苯酸法。^{〔4〕}

过氧化脂质 同上文。^{〔14〕}

脂褐素 硫酸喹宁荧光法。^{〔5〕}

羟脯氨酸 茚三酮显色法。^{〔5〕}

血锌 等离子发射光谱法，回收率 92 ~ 110%。

2 结果与讨论

2.1 铝对与衰老有关酶活性等的影响

表 3 铝对兔、小鼠、大鼠 SOD 活性及兔血锌水平的影响

组别	铝摄入量 mg/Kg 体重			SOD 活性					
				兔		小鼠		大鼠	
	兔	小鼠	大鼠	n	红细胞 μ/g·h	n	肝 μ/mg·hr	n	肝 μ/mg·hr
I	♂ 25.08 ± 5.81	♂ 11.57 ± 0.65	♂ 2.24 ± 0.13	7	5064.9 ± 572.7	32	16.8 ± 1.5	16	9.9 ± 1.3
		♀ 11.75 ± 0.99	♀ 1.71 ± 0.13						
II	♂ 75.79 ± 4.29	♂ 21.32 ± 0.36	♂ 3.08 ± 0.15	7	5287.8 ± 476.2	32	12.8 ± 3.0**	16	9.4 ± 1.1
		♀ 19.33 ± 0.59	♀ 2.38 ± 0.19						
III	♂ 236.18 ± 17.94	♂ 50.05 ± 2.09	♂ 11.82 ± 0.50	7	3780.5 ± 504.3**	32	8.4 ± 0.6**	16	8.4 ± 0.6*
		♀ 47.77 ± 1.73	♀ 9.06 ± 0.42						
IV		♂ 70.28 ± 3.39	♂ 16.17 ± 0.54			32	10.0 ± 1.5**	16	9.3 ± 0.9
		♀ 62.61 ± 2.16	♀ 12.53 ± 0.49						
V		♂ 620.32 ± 34.04				32	12.2 ± 0.6**		
		♀ 570.38 ± 14.21							

* 及 ** 分别表示与对照组比 P<0.05 及 P<0.01

衰老学说有多种，但迄今没有一种学说能圆满地解释其机制。目前在众多学说中

自由基学说较为盛行。超氧化物歧化酶 (SOD) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)

均是清除机体代谢过程中产生的自由基及过氧物的酶,一般随增龄下降。多数人认为可作为反映衰老的生化指标。^{〔6、7〕}本研究结果 SOD 活性在雌、雄、大、小鼠间无显著差别,故合并处理。从表 3 可见铝对兔、大鼠、小鼠中 SOD 活性均有不同程度的抑制作用。铝对 SOD 的抑制作用可能与大量铝摄入干扰锌代谢有关,因为已知锌是 SOD 重要辅基。研究发现兔血清锌水平随铝摄入增加而显著降低,呈负相关关系 ($r = -0.5605$ $P < 0.05$); 血锌与血 SOD 间呈正相关关系 ($r = 0.7043$ $P < 0.01$), 此结果可印证上述的论点。GSH-Px 活性在大、小鼠中无性别差异,故也合并处理。从表 4 可见铝对小鼠 GSH-Px 有抑制作用,对大鼠有抑制趋势,但差别无显著性。

反映机体内脂质过氧化产物的脂褐素 (LF) 及过氧化脂质 (LPO), 一般均随增龄在体内积累, 认为可能与衰老过程中各组织器官广泛的退变有一定关系。^{〔8〕}从表 5 可见兔外周血 LPO 水平随铝摄入增加而升

高, 与血铝间呈正相关关系 ($r = 0.7829$ $P < 0.01$), 并且 LPO 与 SOD 间为负相关关系 ($r = -0.7398$ $P < 0.01$), 反映由于铝对 SOD 活力的抑制而使脂质发生过氧化变性。在大鼠中心肌 LF 含量有随铝摄入增加而上升的趋势, 但只是在 III 组雌性动物中的升高与对照组比较有显著性。小鼠 LF 含量经方差分析未见在各组动物间有显著差别。这可能与 3 个月的观察时间短及小鼠是在幼鼠中进行研究、致使所产生的 LF 不能达到明显堆积程度有关。

表 4 铝对小鼠、大鼠红细胞

GSH-Px 活性 (μ /mgHb) 的影响

组别	n	小鼠	n	大鼠
I	36	10.25 $\pm$ 1.52	16	4.65 $\pm$ 1.47
II	36	6.35 $\pm$ 1.52*	16	3.86 $\pm$ 0.83
III	36	5.10 $\pm$ 0.75*	16	3.47 $\pm$ 0.61
IV	36	7.30 $\pm$ 1.63*	16	4.58 $\pm$ 0.41
V	36	9.25 $\pm$ 1.75		

* 表示与 I 组比 $P < 0.05$

表 5 铝对兔、小鼠、大鼠 LPO 或 LF 含量的影响

组别	血清 LPO (nmol/ml)		心肌 LF (μ g/g)					
			LF					
	n	兔	n	小鼠	n	大	n	鼠
I	5	5.78 $\pm$ 1.53	40	46.75 $\pm$ 2.63	8	28.53 $\pm$ 1.52	8	50.35 $\pm$ 2.14
II	5	7.17 $\pm$ 1.67	40	41.74 $\pm$ 13.53	8	30.85 $\pm$ 1.43	8	53.93 $\pm$ 4.08
III	4	13.23 $\pm$ 6.52*	40	36.50 $\pm$ 2.70	8	33.58 $\pm$ 1.47*	8	54.65 $\pm$ 2.02
IV			40	43.25 $\pm$ 12.14	8	28.88 $\pm$ 2.64	8	50.80 $\pm$ 3.83
V			40	50.50 $\pm$ 18.88				

* 表示与 I 组比较 $P < 0.01$

从衰老的大分子交联学说看, 尾腱中游离羟脯氨酸 (HOP) 含量减少也可作为衰老指标。^{〔9〕}实验结果显示 (表 6) 小鼠尾腱 HOP 含量随铝摄入增加而降低, 反映铝具有致胶原大分子交联的作用。此外在 HOP 与 SOD 及 GSH-Px 活力间呈正相关关系 (r 分别为 0.5727 及 0.7381 均为 $P < 0.01$),

故也不能排除此羟脯氨酸水平下降与自由基、过氧化物等对细胞内羟基化酶的毒作用可能有关。^{〔9〕}

综合以上结果, 基本上反映铝在一定剂量范围内可不同程度地抑制几种动物中 SOD 或 GSH-Px 的活力, 降低与 SOD 有关, 并能维持膜正常结构和功能的锌的水平, 由此

造成动物体中 LPO 或 LF 的升高, 以及游离脯氨酸减少的变化。研究还发现在大、小鼠中, 摄入中等剂量铝时 (小鼠约日均为 50mg/Kg 体重、大鼠 10mg/Kg 体重), 对与衰老可能有关酶活性或代谢物的影响最显著, 呈现一种特殊的“对钩”形的剂量反应关系。据文献报导某些有毒物质, 在低于其毒抑制作用的浓度下, 可因机体的过度调整而出现实质上仍属毒作用的兴奋效应, 并在兴奋效应出现前、在更低剂量时先出现抑制作用,〔10〕其机理目前在毒理学上尚无法解释。因此铝在大、小鼠中对某些酶活性等影响所呈现的特殊剂量反应关系, 有可能是铝具有这种兴奋效应的毒作用的一种表现, 还需增加剂量组数做深入探讨。

表 6 小鼠尾腱 HOP 含量

组别	n	HOP 含量 mg/g
I	36	4.68 ± 0.29
II	36	4.18 ± 0.03*
III	36	3.65 ± 0.08*
IV	36	4.32 ± 0.22*
V	36	5.07 ± 0.09

* 表示与 I 组比 $P < 0.05$

2.2 铝对寿命影响

经方差分析, 雌、雄小鼠在日均铝摄入量 11 ~ 60mg/Kg 体重范围内未见对寿命有显著影响。值得注意的是高剂量铝摄入时, 小鼠平均寿命的个体差异加大。最高寿命以雌性小鼠有随铝摄入增加而降低的趋势。在果蝇中可见铝对其平均寿命有抑制作用; 各实验组无论雌、雄果蝇的平均寿命均显著低于对照组 ($P < 0.01$) 其最高寿命也比对照组低。此两种动物实验结果的不同, 可能反映了不同种属动物对铝毒作用的敏感性有差别, 文献也报导铝的毒作用受动物种属的影响, 在动物中以兔、猫最敏感。〔11〕此外, 小鼠在铝摄入量近似的范围内, 一方面反映铝有致衰老作用, 而另一方面却反映铝对寿命影响不明显, 也即显示衰老与寿命间关系不一致。文献中有关某些衰老指标与寿命间关系的报导也不一致。如有的报告哺乳动物中 SOD 活力与其寿命间呈非常显著相关关系,〔12〕而有的却报导在长寿老人中未能观察到长寿与 SOD 活性的关系。〔13〕

总之根据以上研究结果, 初步可认为铝在一定剂量范围内通过对自由基、大分子交联等作用, 对衰老过程及寿命可能有一定影响, 但这些仅是衰老机制之一。衰老指标的意义, 及衰老与寿命的关系须进一步研究。

表 7 铝对小鼠及果蝇寿命的影响 (天)

组别	小鼠						果蝇			
	日均铝摄入量 mg/Kg 体重		平均寿命		最高寿命		平均寿命		最高寿命	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
I	7.36 ± 0.61	7.66 ± 0.28	516.5 ± 3.0	462.7 ± 11.8	874	768	61.4 ± 0.8	52.7 ± 0.7	107	98
II	11.16 ± 0.86	12.41 ± 0.32	513.3 ± 4.3	461.7 ± 7.6	857	748	58.6 ± 0.8	50.2 ± 0.4	99	90
III	32.87 ± 2.01	37.16 ± 2.25	511.9 ± 8.3	462.2 ± 8.9	842	764	55.3 ± 0.7	49.4 ± 0.5	98	90
IV	51.97 ± 4.48	59.23 ± 4.50	510.4 ± 15.2	459.8 ± 28.8	798	780	57.4 ± 0.5	50.9 ± 0.3	101	89
V							57.8 ± 0.6	51.5 ± 0.2	100	93

参 考 文 献

1 Crapper DR, et al. Brain aluminum in Alzheimer's Disease and Experimental Neurofibrillary Degeneration. Science 1973; 180 (4):511

2 王厚德·老年学实验果蝇饲料研究·老年学杂志 1987;7(2):49

3 刘中申, 等·软枣猕猴桃抗衰老作用的初步研究·老年学杂志 1987;7(4):45 (下接第 25 页)