



铝的神经毒性及其 神经细胞死亡干预

张勤丽 著

牛 侨 审



人民卫生出版社

铝的神经毒性及其 神经细胞死亡干预

李树德 著

李 强 译

北京航空航天大学出版社

铝

的神经毒性及其 神经细胞死亡干预

■ 张勤丽 著

■ 牛 桥 审

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

铝的神经毒性及其神经细胞死亡干预/张勤丽著. —北京: 人民卫生出版社, 2011. 7

ISBN 978-7-117-14187-1

I. ①铝… II. ①张… III. ①中枢神经系统—铝—毒性—研究 IV. ①R595②R741

中国版本图书馆CIP数据核字 (2011) 第101774号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

铝的神经毒性及其神经细胞死亡干预

著 者: 张勤丽

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里19号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 8

字 数: 185千字

版 次: 2011年7月第1版 2011年7月第1版第1次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-14187-1/R·14188

定 价: 21.00元

打击盗版举报电话: 010-59787491 **E-mail:** WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

序

铝是自然界最常见的元素之一，在人们的生活环境中无所不在。铝不是人体的必需元素，迄今为止未发现铝在人体内有任何生理作用，但由于社会的发展，人体摄入铝的来源越来越多。空气污染加剧造成酸雨，导致地壳中的铝盐溶解进入水源，造成饮水中铝含量大幅度增加。铝制炊具和食具广泛应用，增加了人们摄入铝元素的机会。含铝食品添加剂是重要的膨松剂，用于多种食品的加工，例如油条、海蜇、糕点、面包、饼干及粉丝等；目前还没有满意的替代品。用得很广泛的抗胃酸药主要成分是氢氧化铝，是这些患者铝摄入的一个重要来源。婴幼儿配方奶粉中的铝含量已引起国外学者的关注。由于长期接触铝可引起学习记忆功能减退、认知功能障碍等痴呆症状，被认为与阿尔茨海默病（AD）等老年性神经退行性疾病有关。因此，世界卫生组织于1989年正式将铝认定为食品污染物而加以控制。

我国致力于铝神经毒性研究的团队还不多，山西医科大学公共卫生学院牛侨教授的研究团队是成果比较突出的团队之一。近十余年来，他们在国家自然科学基金、教育部博士点基金、山西省自然科学基金的资助下，对铝的神经毒性及其与神经退行性变的关系进行了持之以恒的研究，取得了一些有意义的结果，发表了多篇研究论文，并多次在国际学术会议上交流，在铝暴露与人体健康关系研究方面占有一席之地。张勤丽博士是该研究团队中的佼佼者和重要成员，在牛侨教授的指导下，她从硕士研究生阶段、博士研究生阶段一直到博士后研究生阶段都始终不渝地致力于铝致神经毒性的研究，针对铝导致的神经细胞死亡进行了系统、深入的探讨，不仅得出有意义的结果，而且率先提出了铝可以导致神经细胞“程序性坏死”的新概念，从理论上对铝致健康损害的研究作出了贡献，其博士学位论文获得全国优秀博士论文提名。作为一名青年学者，张勤丽博士这本基于她的研究结果的“习作”或许还很不成熟，难免有这样或那样的不足，但作为青年人持之以恒探索科学的精神是值得鼓励的。相信书中关于铝神经毒性研究方面的成果和信息，能够为有兴趣的同道提供有价值的参考资料，从而促进我国这方面研究工作的不断深入。我很高兴为本书作序，希望张勤丽博士及牛侨教授研究团队在今后的科学研究中更上一层楼，取得更多的研究成果，为我国的卫生事业做出更多的贡献。

中国工程院院士

2010年11月

前言

铝普遍存在于自然界，是地壳中最为丰富的元素之一，约占地壳的8.8%，因此，人们与铝的接触广泛。20世纪70年代以前，铝和铝盐被认为是不能吸收的、无急慢性毒性、很安全，故铝盐和铝广泛地用于食品添加剂、药物、处理水的混凝剂及各种炊具、容器等。但由于近代铝矿的开采、炼铝工业的发展、铝制品的加工和使用等，再加上酸雨的频繁发生，导致土壤中铝盐溶解进入水源，造成环境中铝含量的增加，使人体内铝的含量也逐渐增多。国外学者报道，几乎所有婴儿奶粉配方中铝的含量都高，早产儿营养液中的铝含量高达美国食品药品监督管理局（FDA）认为的摄入安全量的3倍，因此铝对人体的危害引起人们的关注。海湾战争后，在参战的盟军士兵中发生包括神经系统症状的“海湾战争综合征”，至今原因未明；科学界有各种猜测，有科学家认为与参战前注射多种疫苗中的铝佐剂有关。20世纪70年代中期以来，随着分析技术的发展及铝系统毒性报道的增加，人们逐渐加深了铝生物学作用的研究。研究表明，铝可扰乱生物体内的代谢作用，长期缓慢地对人类健康造成危害，其中最为引人注目的是铝对神经系统的毒性作用。

人体中的器官，特别是大脑，最易受铝毒性侵蚀。研究结果认为，大脑中逐渐富集的铝会杀死神经元，使人的记忆力减退。铝对组织器官的损伤作用在临床上和动物实验中都得到了广泛的证实。1972年，Crapper等首先应用原子吸收光谱分析了生物组织中的铝含量；1973年，他们又研究发现阿尔茨海默型老年性痴呆（SDAT）和早老性痴呆患者的神经元纤维变性（NFD）同铝导致哺乳动物神经元纤维变性的病理学改变相似，即产生神经元纤维缠结（NFTs）。正常人的脑铝含量低于 $4\mu\text{g/g}$ 干重，而阿尔茨海默病患者的脑铝含量是正常人的1.5~30倍，在NFTs区域显示脑铝含量明显升高，而且病变区域的铝浓度与NFTs密度呈正相关。从中年后期到老年期，脑铝含量随年龄的增加而增加，且在海马回的铝含量最高。通过分析亚细胞结构中的铝，发现SDAT患者的脑铝蓄积在细胞核内，与神经元的核部分结合，特别是核的异染色质。1982年，Perl等人发现与铝相关的其他慢性脑病，如关岛肌萎缩侧索硬化症（ALS）和帕金森神经功能障碍性痴呆患者的神经元核有铝蓄积，同时发现神经元内有NFTs存在，而且各种慢性脑病患者及正常受试者具有NFTs的神经元内都有较高水平的铝。科学界认为这些发现表明铝与NFTs可能存在一定的关系，但还不能证实是一种病因学的关系。

流行病学研究表明，长期接触铝可引起学习记忆功能减退、认知功能障碍等痴呆症状。目前，铝是公认的慢性蓄积性神经毒素，它在阿尔茨海默病（AD）、透析性脑病（DE）、脊髓侧索硬化症（ALS）等老年性神经退行性疾病中的毒性作用已被许多

学者肯定，铝的神经毒性导致的神经细胞损害以神经退行性改变为突出特征。虽然铝的神经毒性已被许多研究所证实，但至今人们对铝的毒作用机制仍不十分清楚。

现有研究表明，除了其他作用机制以外，铝的神经毒作用与铝能致神经细胞死亡有很密切的关系，铝的慢性毒作用可以诱导神经细胞死亡，造成严重的神经元损失，从而在许多神经退行性疾病的发生发展过程中起着重要的作用。在国家自然科学基金的资助下，我们在细胞和分子水平上对铝致神经细胞死亡的可能机制进行了研究和探讨，不仅从线粒体和内质网通路研究了凋亡机制，而且还探讨了程序性坏死在神经细胞死亡中的调控作用，并在此基础上尝试了对铝诱导的神经细胞死亡干预。本书就是笔者的研究成果总结，只能算作一个青年学者的“习作”，笔者写这本拙著的目的是希望引起人们对铝神经毒性作用的关注，起到抛砖引玉的作用。

由于笔者的学识和科研水平所限，为了进一步提高本书的质量，以供再版时修改，因而诚恳地希望各位读者、专家提出宝贵意见。在研究和写作过程中，得到国家自然科学基金委员会的资助，他们对笔者的科研选题和设计的肯定是笔者科研工作的永远动力，他们的基金支持使笔者的科学研究能够顺利完成和本书得以面世，在此特向国家自然科学基金委员会表示最衷心的感谢！还要特别感谢笔者最尊敬的导师牛侨教授，是他为笔者打开了科研的大门，把笔者从一个科研的门外汉教导成为一名科研工作者。在笔者的研究过程和本书的写作中都得到他的悉心指导，倾注了他辛勤的汗水，特在本书出版之际向恩师牛侨教授表达最诚挚的谢意！还要感谢参与课题研究的研究人员和默默给予笔者帮助支持的老师、同学、朋友和家人，笔者的每一点进步都是大家共同努力的结果，谨以本书表达最深的感谢和祝福！

张勤丽

2010年9月于太原

**本书中的研究内容得到了以下基金项目支持，
谨在此书出版之际特表示衷心的感谢！**

- 坏死性凋亡在铝致神经细胞丢失中的作用及与阿尔茨海默病的关系。国家自然科学基金项目（30740032）
- 程序性坏死在铝致阿尔茨海默病模型动物中的作用及其干预。2009年山西省自然科学基金项目（2009011054-1）
- 应用RNAi技术阻抑铝致神经细胞凋亡的研究。2006年省级研究生教育创新项目（20061039）
- 铝致神经细胞损伤的修复。太原市2006年大学生创新创业专项项目（07010750）
- 程序性坏死在铝致神经细胞死亡中的作用及其机制研究。山西医科大学博士后启动基金（2008—2010）
- 程序性坏死在铝致神经细胞死亡中的作用及其机制研究。2008年度山西医科大学博士启动基金（03200808）
- 铝致神经细胞损伤的修复。2006年山西医科大学学生创新项目（2006.10—2007.10）

目录

第一篇 铝的神经毒性

第一章 铝的神经毒性概述.....	2
第二章 神经细胞凋亡机制总论.....	9
第一节 线粒体在细胞凋亡中的中央调控作用	9
第二节 细胞色素C在凋亡中的作用	10
第三节 caspase在神经元凋亡中的作用	11
第四节 Bcl-2家族在细胞凋亡过程中对线粒体功能的调控	13
第五节 NF κ B和神经元凋亡	14
第三章 铝致神经细胞凋亡的检测.....	17
第一节 一般形态学改变	17
第二节 超微结构改变	23
第三节 流式细胞术定量检测结果	24
第四章 线粒体在铝致神经细胞凋亡中的调控作用.....	30
第一节 线粒体的超微结构变化	30
第二节 线粒体相关酶活性的改变	30
第三节 线粒体相关蛋白表达的调控	31
第五章 内质网在铝致神经细胞凋亡过程中的作用.....	36
第一节 内质网的超微结构变化	36
第二节 内质网相关酶活性的改变	36
第三节 内质网相关蛋白的调控作用	37
第六章 Bcl-2和Bax蛋白及基因的调控作用	40
第一节 Bcl-2和Bax基因的调控作用	40
第二节 Bcl-2和Bax蛋白的调控作用	42
第七章 铝致神经细胞程序性坏死及自噬.....	46
第一节 铝致神经细胞死亡方式检测	48
第二节 程序性坏死在铝致SH-SY5Y细胞死亡中的作用	57

第二篇 铝致神经细胞死亡的干预

第八章 RNA干扰在神经退行性疾病中的研究进展	68
第一节 RNAi的作用特点及其在神经系统领域的发展现状	68
第二节 RNAi在神经退行性疾病中的应用	69
第三节 RNAi在阿尔茨海默病中的应用	74
第四节 RNA干扰应用中存在的问题	77
第五节 RNA干扰的应用前景	79
第九章 <i>Bak</i> 基因干扰在铝致SH-SY5Y细胞凋亡中的作用	80
第一节 <i>Bak</i> 基因siRNA的筛选	81
第二节 <i>Bak</i> 基因siRNA转染效率及抑制效率的检测	83
第三节 <i>Bak</i> 基因siRNA对铝诱导的神经细胞死亡的作用	86
第十章 caspase-3 RNA干扰对铝致神经母细胞瘤细胞死亡的影响	89
第一节 caspase-3基因siRNA的筛选	89
第二节 caspase-3基因siRNA转染效率及抑制效率的检测	92
第十一章 凋亡相关基因RNA干扰与Nec-1的共同作用	
对铝致神经母细胞瘤细胞死亡的影响	98
第一节 caspase-3 siRNA与Nec-1的共同作用对细胞活力的影响	98
第二节 caspase-3 siRNA与Nec-1的共同作用对细胞凋亡率和坏死率的影响	100
第三节 caspase-3 siRNA与Nec-1的共同作用对细胞自噬的影响	101
第十二章 <i>Bax</i> 基因siRNA序列的筛选及其对铝致神经胶质瘤细胞凋亡的影响	105
第一节 <i>Bax</i> 基因siRNA的筛选	105
第二节 <i>Bax</i> 基因siRNA转染效率及抑制效率的检测	107
第三节 <i>Bax</i> 基因siRNA对铝诱导的神经细胞死亡的作用	109
英汉名词对照	113
依托本书研究内容发表的科研论文	115
主要参考文献	117

第一篇

铝

的神经毒性

第一章 铝的神经毒性概述

铝是地壳中含量最丰富的金属元素（8.8%）之一，它多以硅铝酸盐的形式广泛存在于岩石、矿物和土壤中。正常情况下，铝在生物体内的含量很少。但由于近代铝矿的开采、炼铝工业的发展、铝制品的制作加工使用、酸雨的频繁发生溶解硅铝酸盐进入河流和湖泊、食品添加剂的广泛应用等，铝以各种形式通过呼吸道、消化道等多种途径进入人体，铝作业工人以及普通人群的机体内铝负荷越来越高。研究发现，进入机体的铝以 $Al(H_2O)^{3+}$ 的形式与转铁蛋白、清蛋白或枸橼酸离子相结合，随血液分布于脑、肝、肾、骨、肺等组织中。随着体内铝负荷的增加，会产生神经毒性。

一、铝神经毒性作用的表现

最初引起人们关注的铝神经毒性的报道是，当透析液中铝含量高或患者口服铝盐时，透析性脑病的发病率就高；当除去透析液中的铝污染、限制口服铝的摄入，则透析性脑病患者的临床症状得到改善，应用铝的螯合剂去铁胺（DFO）能够改善或治愈透析性脑病。

自20世纪90年代以来，国内外学者研究发现职业性吸入铝尘会导致工人体内铝负荷增高，紧张、忧郁、愤怒、疲劳和困惑等负性情感得分高于对照组，视觉感知能力、短期记忆能力、学习和记忆均受损，充分说明铝对神经行为的影响作用。Hannien等在对37名铝作业工人（平均血铝0.18mol/L）的定量脑电图进行了分析，结果显示血铝水平与前额平均绝对功率呈负相关。同一组作者在对90名铝作业工人进行视觉脑电图检查后，发现轻微的弥散性异常和癫痫样异常，同时进行的神经心理学测试显示复杂注意力、信息处理、分析、记忆、抽象视觉模式回忆发生改变。我们发现铝作业工人脑电图以β波为主波率的占20%；以θ波为主波率的占20%，明显高于对照组；α波占60%，明显低于对照组的90%。波幅比较发现，铝作业工人的低波幅发生率明显高于对照组。从空间分布上看脑波的出现形式，铝作业工人的广泛性异常率、弥散性异常率及局限性异常率均高于对照组。较典型的脑电地形图类似阿尔茨海默病的表现。在脑电图中还发现，在接触者无自觉症状时，已有脑电图的改变。轻微认知功能障碍（mild cognitive impairment, MCI）被认为是痴呆的前期阶段，我们最近的研究表明，退休铝作业工人中MCI检出率高于对照人群（未发表材料）。动物实验表明，铝可以使实验动物的学习记忆能力下降，并且有年龄差异性。

许多资料表明，铝与某些神经系统疾病如阿尔茨海默病（AD）、帕金森病（PD）等神经退行性疾病有相关关系，并且可能是疾病的病因之一或触发、加重因素，而这些疾病又影响到人类生存的寿命和质量。因此，研究铝的神经毒作用机制还有更重要的意义。

二、铝神经毒性动物实验病理改变

慢性染铝大鼠海马的超微结构显示, 大脑顶叶锥体层锥体细胞、海马锥体细胞数和小脑普肯耶细胞数明显减少, 海马神经细胞发生颗粒空泡变性 (GVD), 而且GVD细胞阳性率与铝剂量呈正相关。可见核膜、线粒体膜嵴、突触前后膜等膜结构出现局部甚至大面积溶解破坏。轴突内微丝微管排列紊乱, 甚至出现断裂、溶解、消失。突触结构发生两种异常改变, 一种是突触的透明性变 (clear type), 即突触前后膜的电子密度明显降低, 突触小泡的数量明显减少; 另一种是突触的电子密度显著增高, 突触前后膜甚至融合、粘连, 突触前膜内出现髓鞘样改变, 这是由于线粒体、粗面内质网遭破坏后形成的。核严重变形, 有些染色质固缩, 聚集在核膜周围, 形成细胞凋亡的现象。线粒体肿胀, 嵴消失或紊乱。轴突内微丝微管排列紊乱, 甚至出现断裂、溶解、消失。突触结构发生异常改变, 前膜有脱髓鞘现象。粗面内质网有脱颗粒现象。

三、铝的神经毒性作用机制

对铝的神经毒作用机制研究, 主要集中在以下方面:

1. 干扰中枢胆碱能系统功能 中枢胆碱能神经递质在学习记忆行为中有重要的调节作用。维持其功能正常, 是维持哺乳动物学习记忆正常进行的必要条件。研究发现, 铝可导致兔脑组织ChAT和AChE活性降低。也有学者认为铝对AChE有双相作用, 即低剂量时刺激其活性增强, 而高剂量时抑制其活性。总之, 无论AChE活力增强或减弱, 均使神经递质ACh的神经传递受到影响, 在脑内的动态平衡受到破坏, 使中枢胆碱能系统功能紊乱, 从而引起包括学习记忆能力下降在内的神经功能退行性变。

2. 干扰能量代谢 神经元的核膜、线粒体膜以及突触前后膜等生物膜结构上或有钠钾ATP酶 ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$)、钙ATP酶 ($\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$), 或有神经递质的受体等等, 与神经元的功能发挥具有密不可分的关系。铝导致的上述生物膜破坏, 直接干扰了 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 的活性, 干扰能量代谢。

3. 干扰中枢单胺类系统和氨基酸能系统功能 中枢内单胺类神经递质是又一大类与学习记忆功能相关的物质, 它主要包括儿茶酚胺 (多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素) 和5-羟色胺两大类。提高中枢去甲肾上腺素水平能增强学习记忆能力, 其他递质也大多对维持觉醒和促进睡眠有作用, 而觉醒是保证学习记忆的前提, 因此也在一定意义上可以认为它们有利于记忆的贮存和巩固。铝影响中枢单胺类递质的含量, 如MAO-B、氨基酸类神经递质等, 引起单胺类系统和氨基酸能神经系统的功能紊乱。这方面的研究很多。在铝接触职业人群的调查中发现, 铝作业工人的尿中马香草酸 (HVA) 和香草扁桃酸 (VMA) 含量显著高于对照组工人。而HVA和VMA是单胺类神经递质的两大最终代谢产物。代谢产物的排出量增高说明Al可使体内神经递质含量降低。在AD和PD等神经退行性疾病中, MAO-B活力显著增强。我们发现, 染铝大鼠血、脑MAO-B活力均显著增强, 从而使NE等单胺类递质的降解异常增加, 突触间隙中含量降低, 动物的阳性条件反射的建立受到严重损害, 学习记忆能力出现障碍。催乳素的分泌是由下丘脑的结节漏斗部的多巴胺能系统的活动控制的, 多巴胺对催乳素的分泌起抑制作用; 如某种因素干扰或破坏

了上述神经递质的释放、代谢和循环,就可能影响PRL。Manzo等在一个横断面调查中对一组具有较高接触水平的铝接触工人进行了研究,其血清PRL水平明显升高。Alessio等报道,一组暴露于低于TLV-TWA铝浓度的工人在铝暴露的一开始PRL升高,一年半后开始恢复正常并开始降低。我们的调查发现铝接触工人PRL水平略低于对照组,与报道相符,因为调查的铝接触工人接触时间都在2年以上,提示铝对PRL的长期作用可能是使其降低,这也符合文献中认为的铝可耗竭中枢神经系统的多巴胺能和胆碱能递质的观点。研究认为,这些神经递质系统功能的紊乱与产生这些递质的神经元的缺失有关,其中铝引起的这些神经细胞的缺失有一部分是神经细胞的凋亡。

4. 脂质过氧化 大量研究表明,Al的神经毒性与许多神经退行性病变有关。由于哺乳动物神经系统易遭受氧化攻击,所以近年来氧化应激(oxidative stress)被认为是神经退行性病变过程中最重要的一级事件。随着氧化应激成为AD发病的重要病因假说之一,脑内铝与氧化应激的关系也愈来愈成为铝神经毒作用机制的研究热点之一。研究发现,小鼠饲料高剂量铝暴露10周后,脑中脂质过氧化产物增多;结果显示铝加强了脂质体中的脂质过氧化过程。无论体内或体外实验均提示,铝的神经毒作用可能与脂质过氧化过程有关。我们发现,经腹腔注射染铝后,血清和脑组织中的SOD活力均有所下降。随染毒剂量增加,SOD活力下降;MDA随染铝剂量增加而增加,结果说明铝可能通过降低SOD活性而增强了脑中脂质过氧化反应,而使其代谢产物MDA增多,引起了脑损伤。那么,其具体机制是怎样的呢?国内外大量研究认为有多种方式。铝可能通过:①与负电荷性脂质体成分结合;②改变脂质物理学特性(抑制磷脂运动、增强酰基链聚集、促进脂质体聚集等),有利于脂质过氧化传播,来刺激 Fe^{2+} 介导的脂质过氧化。同时,也可能通过介导活性氧的产生、破坏膜完整性等机制促进脂质过氧化。从本课题组另一篇报道所得结果中的超微结构改变,可见大量生物膜性结构受到严重损害,可能更支持后一机制。

5. 铝对钙代谢及其相关酶的影响 Al^{3+} 可引起神经细胞内 Ca^{2+} 浓度升高而导致细胞功能改变, Ca^{2+} 超载而导致神经细胞死亡;同时,有研究认为 Ca^{2+} 超载与神经细胞凋亡有关。细胞内钙离子的稳态对维持机体许多正常生理功能具有很重要的生理意义。突触后膜内游离钙离子浓度升高是LTP形成的必要条件之一。实验证明,在海马CA1区,与NMDA受体耦联的钙通道开放是LTP产生的触发因素,而LTP的维持则与细胞内钙敏感信使的产生有关。使用电压钳技术在海马CA3区所做的研究表明,电压门控性钙通道的开放是LTP产生的重要条件,将去极化电流通入锥体细胞内,当膜去极化一旦达到足以激活钙通道时,就可产生LTP。动物实验证明钙通道是铝作用的一个靶点,可以通过改变细胞的钙稳态,造成细胞的功能障碍,从而影响学习和记忆。Deleers报道,在生理条件下,20~50mol/L的铝就可以取代细胞膜上几乎所有的二价阳离子,使进入细胞的铝增加,并阻碍二价阳离子进入细胞而使胞内钙离子减少。Matija E等研究证明铝能增强谷氨酸导致的钙超载,尤其损伤线粒体,神经细胞的变性死亡可能与胞内钙超载有关。

6. 导致神经细胞凋亡 近年来,有证据表明细胞凋亡也参与了与铝有关的神经退行性疾病(AD、PD等)的发生和发展。AD的主要病理学特征是神经纤维缠结和老年斑,后者的核心成分是 β 淀粉样蛋白($\text{A}\beta$ 蛋白)。实验证实,铝可以促进 $\text{A}\beta$ 蛋白的过量表达, $\text{A}\beta$ 蛋白又可以诱发神经细胞的凋亡。在PD患者中,多年来一直认为黑质神经元死亡使细胞

坏死,但近年来越来越多的证据提示PD的发病有细胞凋亡的参与。

近年来,学者将注意力集中在神经细胞凋亡和学习记忆的关系上,对于铝引起的神经细胞凋亡成为研究的热点。我们利用生物学技术特异性标记DNA片段,原位检测凋亡细胞。研究结果显示,随着染铝剂量的增高,细胞排列逐渐凌乱,高剂量组可见细胞连接松解、细胞周围出现环状带、细胞核皱缩、染色质边聚、核膜破裂等形态学的变化。大鼠海马神经细胞凋亡数也随之增多,表明铝可导致海马神经细胞的凋亡。在细胞凋亡发展过程中,在显微镜下观察到一系列形态学变化,如胞膜对称性丧失、染色质凝集、细胞皱缩、DNA破碎、线粒体肿胀和凋亡小体形成。但凋亡的共同特征是细胞容积收缩,以细胞核的形态改变尤为突出。光镜下,凋亡细胞体积缩小,染色质致密聚集成斑块状。在组织内,细胞凋亡的典型特征出现于单个细胞,且凋亡细胞周围有环状带。结合其他学者的研究结果,可以认为:铝可以通过影响细胞凋亡相关基因和蛋白,如细胞色素C (Cyt-C)、*Bcl-2*家族、核转录因子 κ B (NF- κ B)和半胱氨酸蛋白酶 (caspase),来促进神经细胞的凋亡。主要机制如下:

(1) 随着染铝剂量的增高,*Bcl-2* mRNA的表达降低,而*Bax* mRNA的表达增高,并且发现染铝大鼠海马神经细胞中*Bcl-2* mRNA的表达与海马神经细胞凋亡指数的分布呈负相关,*Bax* mRNA的表达与海马神经细胞凋亡指数的分布呈正相关,提示在铝所致的神经细胞凋亡过程中,与*Bcl-2*与*Bax*基因的表达相关。动物活体染铝和体外实验,*Bcl-2*和*Bax*蛋白的免疫组化结果也证实了这个结论。

(2) 胞质中Cyt-C增多,凋亡细胞数也增多,并且两者具有相关性。

(3) 铝引起神经细胞凋亡的机制与caspase-3的表达增高有关,铝引起神经细胞凋亡,胞质中caspase-3增多,凋亡细胞数增多,两者呈正相关,说明铝导致神经细胞凋亡的分子机制与caspase-3的表达增多有关,且caspase-3与Cyt-C的表达呈正相关。

(4) 铝引起神经细胞凋亡时,凋亡细胞数增多,胞质中Nf- κ B (P65)增多(即激活的Nf- κ B增多),两者呈正相关,说明铝导致神经细胞凋亡的分子机制与Nf- κ B的表达增多有关。

(5) 在细胞凋亡过程中,自由基作用于细胞膜,使细胞膜受损,导致线粒体膜破裂,能量代谢障碍,甚至死亡,而SOD能清除神经细胞中的自由基,减轻损害。有研究表明,铝能抑制ATP酶、乳酸脱氢酶,能使SOD活力降低,抑制线粒体酶的活性。我们的研究结果显示,随染毒剂量的增高,SOD下降,并与凋亡之间有相关性,提示在铝引起的神经细胞凋亡中,SOD下降,自由基得不到及时清除,可能也是一个重要的作用因素。有关铝与SDH的关系,国内外鲜见。我们还发现,随染毒剂量的增高,SDH下降。有研究报告,体外培养的神经细胞在染铝后,随着细胞染毒剂量的增加,细胞的死亡率升高,线粒体酶活性和膜电位降低,活性氧生成量增多,提示线粒体发生了氧化损伤。细胞受到凋亡因素刺激时,引起线粒体的一系列变化:线粒体膜电位的降低,线粒体生成ATP减少,线粒体内膜心磷脂减少,生成活性氧(ROS)使线粒体内膜的通透性升高,线粒体内的转移及转录活动均减少。铝致神经细胞凋亡过程中,既有线粒体的氧化损伤,也有细胞凋亡,究竟是哪一步发生在前,哪一步发生在后,尚不清楚。但是,无论哪一个发生在前,都会影响另一个的进程。

7. 导致神经细胞非凋亡性程序性死亡 传统理论认为,神经细胞死亡的主要方式有两种:凋亡和坏死。凋亡是由细胞信号通路调控的死亡,是程序化的;而坏死是细胞对环境压力的一种被动死亡方式,是突发性的。在过去的数十年中,虽然研究工作者发现了细胞凋亡的重要机制,但是在实验中,人们也能发现一些奇怪的现象,如非凋亡的程序性死亡。近来,有关带有坏死特征的非凋亡性细胞死亡的研究报道越来越多。但是,研究者们并没有合适的工具来进行有关这些现象的潜在机制研究。袁钧英教授和她的研究小组报道了necroptosis及其特异的阻断剂Nec-1第一次提供另一种类型细胞程序性死亡的有力证据。他们在研究中发现,Nec-1有效阻止了非凋亡性程序性细胞死亡,表明了导致细胞死亡的necroptosis的这一细胞代谢途径确实是存在的。这项发现不仅使人们重新认识了细胞凋亡的过程,也使人们意识到细胞的死亡过程可能是非常复杂的行为,即独立于细胞凋亡和坏死之外还存在第三种类型。necroptosis在我国首次由生物谷网站翻译为坏死性凋亡,除我们发表的论文之外,现在与necroptosis有关的其他中文学术论文还未见发表。我们对necroptosis的相关研究提示,necroptosis是一种由细胞信号通路介导的程序性的细胞坏死,它的发生和发展可能与细胞死亡途径中的多种相关因素有关,因此我们认为将necroptosis译为程序性坏死可能更加符合necroptosis的坏死性的病理变化和程序性的机制特点。我们在国际上发表了该项研究结果,首次报道了程序性坏死作为一种新发现的细胞死亡方式也存在于铝诱导的神经母细胞瘤细胞死亡过程中。用程序性坏死的特异阻断剂Nec-1作用于染铝细胞后,可以显著提高细胞活力,提高线粒体膜电位,降低细胞坏死率,其作用机制可能与caspase家族蛋白酶介导的细胞信号通路有关。

8. 神经元纤维变性和神经元纤维缠结 许多研究资料表明,铝可以引起动物脑组织神经元纤维变性(NFD)及神经元纤维缠结(NFT)等病理改变。NFT的形成与脑内神经元纤维蛋白亚单位的过度磷酸化有关。神经细胞内的铝可阻滞新合成的神经元纤维蛋白亚单位的释放,而导致其在细胞中蓄积并发生磷酸化。NFT是神经元退行性变化的最后阶段,主要由双螺旋细丝(PHF)组成,PHF又主要由与微管相关的不溶性的Tau蛋白组成。当Tau蛋白被异常磷酸化后可抑制Tau蛋白本身促进微管组装的能力,从而引起微管组装缺陷,损害轴浆流,引起神经元退变,Tau蛋白聚集形成PHF。许多研究表明,铝能促进Tau蛋白的异常磷酸化和聚集。但是,铝所导致的NFT与AD患者的NFT并不完全相同,超微结构研究发现,铝诱导的实验动物的NFT是由10nm单股神经元微丝组成,而AD患者的NFT是由10nm的双股呈螺旋状缠绕的神经元微丝组成。化学和免疫学研究证实,铝所致实验动物的NFT是由正常的神经元微丝的多肽组成,而AD患者的NFT是由细胞骨架构成。

铝诱导的动物脑组织神经元纤维变性和NFT形成有许多报道。Muller等用体外培养的鸡胚脑神经细胞研究铝神经毒性时发现,铝在较低浓度即可对神经细胞的分化产生影响,提示铝可能对神经细胞骨架的改变有特殊毒性。体外培养的原代大脑皮层神经细胞暴露于氯化铝48小时后,发现许多神经细胞胞体肿胀,轴突形成串珠,轴突间的网络连接被破坏,提示发生了神经变性。

9. β -APP的过度表达 β -APP的过度表达可能引起动物脑组织中淀粉样沉淀增加和神经纤维退行性变化,导致神经系统功能衰退。新近研究表明,体外实验中铝能引起 β -APP在神经系统的积聚,从而在AD的致病过程中发挥作用。 β -APP的表达增多必导致有神经毒性的 β -AP生成增多, β -AP可引起自由基生成和氧化应激,通过突触体脂质过氧化作用,

产生神经元细胞膜损伤,还可扰乱细胞内环境的稳定性、诱导细胞发生凋亡等。既往研究发现, β -AP可通过其神经毒性导致大脑皮质、海马锥体层细胞等直接参与学习记忆过程的神经元变性死亡来影响动物认知功能。多名学者的研究结果均证实,染铝组大鼠海马各区内 β -APP阳性细胞明显增多, β -APP表达明显增加,铝盐致大鼠学习记忆障碍的病理机制可能与 β -APP在脑内表达的改变有关,提示铝可能通过诱导 β -APP的表达而影响大鼠的学习记忆功能。

10. 导致SS神经元减少 SS是一种环状14肽,广泛分布于脑的各区、功能上与学习记忆密切相关的神经肽。海马内SS神经元属中间神经元,可引起海马锥体细胞去极化及兴奋性增强,有利于记忆的强化,具有抗遗忘作用,是学习记忆的物质基础。人们采用免疫组化的方法检测了SS在大鼠脑内海马区的表达,结果显示染铝组大鼠海马免疫反应性SS神经元数目减少,铝盐致大鼠学习记忆障碍的病理机制可能与SS表达的改变有关。其他学者的研究也得出同样结果,提示铝引起的学习记忆障碍可能与SS神经元的减少有关。

11. 对LTP的直接影响 AlCl_3 能控制大鼠海马CA1区LTP的产生,具体的可能机制是铝对PKC(蛋白激酶C)及Glu(谷氨酸)-NO-cGMP(鸟苷酸环化酶)通路产生了影响。近年来,对LTP产生和维持的机制进行了许多研究,基本上已经清楚。其重点是高频刺激使突触前膜的 Ca^{2+} 大量流入膜内促发了大量Glu递质的释放,同时膜上 Ca^{2+} 浓度受内质网膜上的IP3调控,由于Glu与突触后膜NMDA受体特异性结合,突触后膜去极化,逐出堵塞NMDA受体通路的 Mg^{2+} ,使NMDA受体打开,致使 Ca^{2+} 流入突触后膜内。 Ca^{2+} 作为NMDA受体介导的第二信使可刺激两类信号:一是由非PKC中介的启动过程,触发LTP的产生,但PKC对于维持LTP过程是必需的;二是激活Ca/CaMK II,进一步活化NOS,合成NO,NO作为逆信使回到突触前,作用于鸟苷酸环化酶,使cGMP又刺激突触前区Glu形成一个循环,产生LTP。

(1) 对PKC的影响:有研究表明,铝能与细胞内1,4,5-三磷酸肌醇(InsP3)分子的连位磷酸基结合,抑制InsP3转化为二磷酸肌醇InsP2,使终止 Ca^{2+} 释放的信号减少,因而引起细胞内 Ca^{2+} 的大量释放,刺激蛋白激酶C活性,导致细胞内磷酸化过程异常,使许多其他生理过程发生变化。这说明铝能够与钙调蛋白结合,使该蛋白结构改变,从而影响其发挥生理功能,而当某一神经递质与突触后膜上的靶部位结合后, Ca^{2+} 参与了一系列连锁反应,激活蛋白激酶。已证明极低浓度 Al^{3+} 即可取代反应中的 Ca^{2+} ,而PKC对 Al^{3+} 取代 Ca^{2+} 的作用最为敏感。Qaules等体外实验研究发现,加入微量铝到各种培养系统中就能明显改变细胞功能,激发PKC活性,浓度为 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 Al^{3+} 就能抑制大鼠脑组织PKC活性达90%,这可能是由于铝取代钙后可扰乱对PKC的正常激活,导致PKC的反应敏感性下降,从而限制神经活动的复杂性。铝可通过多种途径影响蛋白激酶,干扰磷酸化过程,破坏细胞功能。

(2) 对Glu-NO-cGMP通路的影响:体内、外实验研究表明,铝可以损伤Glu-NO-cGMP通路。Canales等研究发现,长期铝接触可强烈影响Glu-NO-cGMP通路的功能。铝接触可降低Glu诱导的NOS的活性和NO诱导的cGMP合成酶、鸟苷酸环化酶的活性,并发现NOS和鸟苷酸环化酶的浓度降低,Glu和cGMP形成的能力明显降低。Hermengildo等研究发现,长期铝接触可降低鸟苷酸环化酶的活性,损伤Glu-NO-cGMP通路,铝可使CaM和NOS浓度分别下降34%和25%,使鸟苷酸环化酶的活性下降60%,cGMP浓度下降50%。总之,铝可使Glu-NO-cGMP通路的各个环节受影响,从而影响LTP形成,最终使学习记忆受到影响。