·论 著·

锰对神经元细胞内钙稳态影响的研究

徐斌，徐兆发*，邓宇，黄晓曦

（中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室，辽宁 沈阳 110001）

摘要：目的 研究锰对神经细胞内钙稳态的影响，重点观察神经元细胞钙离子浓度、Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性的改变。方法 选用原代培养神经元为模型，待细胞生长至最佳状态时，予以分组处理：锰处理组为含不同浓度氯化锰（0、25、100、400 μmol/L）的培养液，培养神经细胞 12 h后，通过倒置相差显微镜观察细胞形态的改变，并检测神经元细胞内钙离子浓度、Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性的变化。结果 随着染 Mn剂量的加大，神经元形态出现异常，细胞内钙离子浓度逐渐升高；细胞 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性也逐渐下降。结论 锰通过影响与维持钙稳态相关的酶（Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase）活性，干扰神经元细胞内钙稳态，进而造成神经元细胞损伤。

关键词：锰；细胞内钙稳态；Na^+-K^+-ATP酶；Ca^{2+}-ATP酶

中图分类号：R994.6 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2010)02－0083－03

Study of the effects of manganese on intracellular Ca^{2+} homeostasis in primary cultured neurons

XU Bin, XU Zhao-fa*, DENG Yu, HUANG Xiao-xi

(School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objectives To explore the effect of manganese (Mn) on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), and activities of Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in primary cultured neurons. Methods Primary cultured neurons was cultured with fresh 0, 25, 100, 400 μmol/L manganese chloride media for 12 h respectively, then observed morphological changes by inverted phase contrast microscope and detected $[Ca^{2+}]_i$ and activities of Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in primary cultured neurons. Results The results showed that the neurons were gradually shrinked, meanwhile the neuraxons were shortened, and the networks among neurons were disappeared along with the increase of Mn concentration, $[Ca^{2+}]_i$ was increased. Additionally, the activities of Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase were significantly decreased in a concentration-dependent manner. Conclusions It was suggested that Mn could impair neurons by disturbing intracellular Ca^{2+} homeostasis and inhibiting activity of Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase.

Key words: manganese; intracellular Ca^{2+} homeostasis; Na^+-K^+-ATPase; Ca^{2+}-ATPase

锰（manganese，Mn）作为机体必需的微量元素之一，在体内可以参与构成许多酶的活性基团或辅助因子，同时又是某些酶的激活剂，参与生物化学反应。但是过量的锰进入体内则会引起锰中毒[1]。进入体内的锰可穿透血脑屏障，蓄积在脑组织内，早期主要表现为神经行为功能的改变，长期过量接触锰主要表现为锥体外系损伤，出现类似帕金森氏综合征的症状[2]。在脑组织中，Ca^{2+}作为神经元胞内的重要信使，参与神经递质的合成与释放，神经兴奋性的维持，突触的可塑性及多种酶的活动，细胞内钙稳态的维持对于生命活动至关重要[3]。本实验通过观察不同浓度锰对神经元细胞内钙离子浓度以及与维持钙稳态相关的酶 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性的影响，研究锰对神经细胞内钙稳态的影响，为深入探讨锰的神经毒性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 神经元培养

按吴俊芳等的方法[4]，取新生鼠脑，去脑膜后切碎，加入 1 ml含 0.125%胰蛋白酶的 DMEM，于 37 ℃孵育 10 min。消化后，用移液管轻轻吹打至悬液中无组织块，用含 20%胎牛血清的 DMEM培养液终止反应。将细胞悬液转移到 200目筛网中过滤，2 500 r/min离心 3 min，去上清，以含有 10%马血清的 DMEM培养基稀释细胞悬液至 1×10^6/1.5 ml，接种于经多聚赖氨酸过夜处理的直径为 60 mm的培养皿或板中，置于 37 ℃ CO_2孵箱中培养 24 h后，吸去 DMEM培养基，换成无血清的 Neurobasal＋2% B27＋1%抗生素，继续培养，每 3 d更换 1次培养基，2次/周。从第 4天起，在培养基中加入终浓度为 40

收稿日期：2009－07－07；修回日期：2010－01－10

基金项目：国家自然科学基金资助（编号：30771834）

作者简介：徐斌（1979－），男，讲师，主要从事重金属毒理学研究。

*通讯作者，教授，博士生导师。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mmol/l的阿糖胞苷，以抑制非神经元的增殖和生长。

1.2 神经细胞鉴定

取培养 10 d的神经元，用神经元特异性烯醇化酶（NSE）单克隆抗体进行免疫组化染色，并随机计数 500个细胞，计算 NSE阳性细胞百分率，神经元数目为 90%以上。

1.3 实验分组及处理

待细胞生长状态最佳时加入含锰的培养液，染锰浓度分别为 0、25、100、400 μmol/L，培养 12 h后，测定神经元细胞内钙离子浓度和 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性。

1.4 测定指标及方法

神经元细胞内钙离子浓度的测定采用 Fura-2/AM荧光探针，利用荧光分光光度计检测[5]；ATP酶活性用硫酸亚铁钼磷蓝定磷法测定[6]；用 Lowry法测细胞蛋白含量[7]

1.5 统计分析

实验所得数据以平均值 ±标准差表示，用 SPSS 11.0软件进行单因素方差分析，组间差异的显著性检验，组间比较用 Q检验。

2 结果

2.1 神经元的鉴定

培养 10 d的神经细胞经 NSE染色后，均可见满视野细胞质被染成棕黄色的细胞，阳性率达 90%以上，提示为相对纯的神经细胞培养（见封三图 1）。

2.2 锰对神经元形态的影响

倒置相差显微镜下观察到神经元 24 h内贴壁，并逐渐聚集成集落，96 h左右加入阿糖胞苷抑制胶质细胞的增殖后，神经元集落间突起丰富呈网络状，培养至第 10天神经细胞生长分化完全。神经元表面光滑，胞体大、饱满，呈锥体形、星形、多角形或不规则形，突起清晰，均匀细长，2～5个不等，突起之间相互交织成网，连结紧密；胞核、胞浆之间的轮廓清晰，核浅淡，核仁 1～2个清楚可见（图 1）。不同浓度 Mn作用 12 h后，细胞呈现不同程度的损伤。随着染锰剂量的加大，神经元表面粗糙，胞体变小；突起细小、回缩、断裂，甚至减少、出现裸核；细胞之间网络疏松；胞体与胞浆之间界限逐渐模糊不清；核仁不清晰，细胞的折光性增强（见封三图 1）。

2.3 不同浓度锰对神经元细胞内钙离子浓度及神经元细胞 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性的影响

从表 1可见，分别用不同浓度锰处理神经元 12 h后，随着锰浓度的增加，细胞内钙离子浓度逐渐升高，各染锰组细胞内钙离子浓度均明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。25、100、400 μmol/l染锰组细胞内钙离子浓度分别升高至对照组的 1.66、2.59、4.51倍。

随着染锰浓度的增加，细胞 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性逐渐下降。100和 400 μmol/l染锰组细胞 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性明显低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与对照组比较，100 μmol/l染锰组细胞 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性分别降低 17%和 23%；而 400 μmol/l染锰组细胞 Na^+-K^+-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性分别降低 45%和 66%。

表 1 不同浓度锰对神经元细胞钙离子浓度和ATPase活性的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Ca^{2+}浓度（nmol/L）	Na^+-K^+-ATPase活性[μmol/(h·mg)]	Ca^{2+}-ATPase活性[μmol/(h·mg)]
对照组	94.10±16.10	7.630±1.466	2.870±0.447
25 μmol/L锰处理组	155.90±36.96*	7.033±1.052	2.603±0.429
100 μmol/L锰处理组	243.90±40.36**	6.326±0.999*	2.199±0.489*
400 μmol/L锰处理组	424.80±50.75**	4.179±0.730**	0.984±0.258**

注：与对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

3 讨论

锰是一种神经毒物，过量的锰进入机体可引起广泛的病理损伤，透过血脑屏障沉积于脑部，产生相应的神经系统损伤症状[2]。长期以来，人们对锰的毒性作用进行了多途径、多方面的研究，但对其毒作用机制至今仍不十分清楚。钙稳态在维持细胞进行正常的生理、生化过程中起着极为重要的作用。细胞内游离钙离子浓度的变化是钙离子跨膜转运和细胞内钙池摄取、释放等动态平衡改变的总结果。长时间的胞浆急剧 Ca^{2+}升高，表现为钙离子超载，这几乎是所有细胞损伤和死亡的共同途径[8]。

本研究用不同浓度锰处理神经元后，发现神经元表面粗糙，胞体变小；突起细小、回缩、断裂，甚至减少、出现裸核；细胞之间网络疏松，胞体与胞浆之间界限逐渐模糊不清，核仁不清晰，细胞的折光性增强，并且神经元细胞内钙离子浓度明显升高，这些都表明锰对神经元造成的损伤与其破坏细胞内钙稳态有关。锰通过不同机制干扰 Ca^{2+}的摄入、转运及释放而破坏其动态平衡，导致钙稳态失调。体外研究证实 Mn^{2+}是 Na^+/Ca^{2+}交换的阻断剂，Na^+/Ca^{2+}跨膜转运的前提是 Na^+胞内外的不平衡分布，而这种分布又是依赖于 Na^+-K^+-ATPase的活化，Mn^{2+}高浓度时抑制 Na^+-K^+-ATPase[9]，从而间接抑制 Na^+/Ca^{2+}交

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

换。此外，Mn^{2+}也可抑制 Ca^{2+}-ATPase的活性，此酶可将胞浆内 Ca^{2+}泵出细胞外或泵入内质网，是胞浆 Ca^{2+}流出的主要通道[10]。本研究中细胞 Na^{+}-K^{+}-ATPase和 Ca^{2+}-ATPase活性被锰明显抑制，并呈现剂量效应关系。这也正是导致神经元细胞内钙离子浓度显著升高的原因之一。另外，锰也可破坏钙储存库如线粒体、内质网对钙稳态的平衡作用，Verity认为锰蓄积在线粒体内影响线粒体的钙转运功能，放大锰减少线粒体氧化磷酸化、ATP生成及氧化应激堆积等效应[11]。锰还导致神经元大量释放兴奋性氨基酸，作用于 N甲基-D天门冬氨酸受体 (NMDA)，导致 Ca^{2+}大量内流，Ca^{2+}内流又加重兴奋性氨基酸的释放，形成恶性循环[12]。

综上所述，锰使神经元细胞内 Ca^{2+}超载是造成神经元细胞损伤的主要原因之一。神经元细胞钙稳态调节的机制较多，但锰神经毒性中钙稳态失衡究竟由哪条途径起关键作用尚需做进一步的深入研究。

参考文献：

[1] Fitsanakis V A, Aschner M. The importance of glutamate, glycine and gamma-aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 204(3): 343-354.

[2] Bouchard M, Mergler D, Baldwin M, et al. Neuropsychiatric symptoms and past manganese exposure in a ferro-alloy plant[J]. Neurotoxicology, 2007, 28(2): 290-297.

[3] 羊明智，吴叶，章亚尔，等. 钙离子及其阻滞剂对脊髓灰质 c-fos基因表达的影响[J]. 中华创伤骨科杂志，2005, 7(2): 137-140.

[4] 吴俊芳，刘念. 现代神经科学研究方法[M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2006: 11-12

[5] 高明奇，张天彪，周彬. 铅对小鼠海马[Ca^{2+}]i的影响及 L型钙通道的作用[J]. 卫生毒理学杂志，2004, 18(4): 217-219.

[6] 谢克勤，张磊，高树君，等. 1-烯丙基氯-3对神经细胞胞浆膜和线粒体膜 Ca^{2+}-ATPase，Na^{+}-K^{+}-ATPase活性的影响[J]. 山东医科大学学报，1997, 35(2): 127-131.

[7] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.

[8] Steenbergen C, Murphy E, Watts J A, et al. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP and irreversible ischemic in perfused rat heart[J]. Circ Res, 1990, 66: 135-146.

[9] Liu S H, Wang J H, Kang J J, et al. Alterations in the properties and isoforms of sciatic nerve $Na^{(+)}$, $K^{(+)}$-ATPase in methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl-treated mice[J]. Environ Res, 2000, 82(3): 239-244.

[10] Yazbeck C, Moreau T, Sahuquillo J, et al. Effect of maternal manganese blood levels on erythrocyte calcium-pump activity in newborns[J]. Sci Total Environ, 2006, 354(1): 28-34.

[11] Verity M A. Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis[J]. Neurotoxicology, 1999, 20: 333-340.

[12] 李小刚，朱克，李楠，等. 谷氨酸对神经元钙离子内流和凋亡的影响及谷氨酸受体拮抗剂保护作用的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2001, 3(2): 122-125.

224例酒精性肝损伤并发胆囊病变分析

邵丽珠

(沈阳市中医院电诊科，辽宁 沈阳 110004)

酒精性肝损害包括脂肪肝、酒精性肝炎、肝硬化。现回顾性分析我院近 3年来收治的酒精性肝损伤并发胆囊病变患者的临床资料。

1 临床资料

2006—2009年在我院就医的酒精性肝损害患者 224例，其中男 194例、女 30例，年龄 33～69岁，平均 52岁。根据病史、临床表现、实验室及影像学检查，均符合《内科学》的慢性酒精性肝损害的诊断标准，排除急慢性肝炎、单纯性脂肪肝及胆汁淤积性肝硬化。参照酒精性肝损伤患者的年龄、性别的构成比例，随机选择同期就诊无肝脏疾病的患者为对照组。

2 结果

2.1 224例酒精性肝损伤的病人发生胆结石 64例(28.6%)，对照组发生胆结石 11例(4.9%)，酒精性肝损伤组胆石症发生率明显高于对照组。酒精性肝损伤组 B超检查胆囊增大 (9 cm×3 cm) 55例(24.6%)，对照组胆囊增大 7例(3.1%)；酒精性肝损伤组同时并发胆囊炎 8例(3.6%)，对照组诊断胆囊炎 7例(3.1%)，两组差异无统计学意义($P>0.05$)。肝损伤组 B超检查胆囊壁增厚 (≥3 cm) 194例(86.6%)，对照组 8例(3.6%)，肝损伤组胆囊壁增厚者显著高于对照组($P<0.001$)。

2.2 肝功能代偿期 48例中胆囊壁增厚 35例(72.9%)，肝功失代偿期 176例中胆囊壁增厚 159例(90.3%)，二者比较差异有统计学意义($\chi^2=11.70$ $P<0.01$)；肝功代偿期胆囊平均厚度为 (0.30±0.19) cm，而失代偿期胆囊平均厚度为(0.54±0.15) cm；肝功代偿期并发胆石症 7例(14.6%)，失代偿期并发胆石症 57例(32.4%)，二者差异有统计学意义($P<0.01$ $P<0.05$)；肝功能代偿期与失代偿期并发胆囊增大者分别为 13例(27.1%)和 42例(23.9%)，差异无统计学意义。

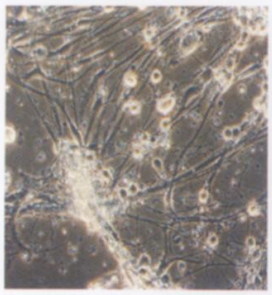
3 讨论

长期或过量饮酒，除损伤肝脏外，胆囊的功能和形态学也随之发生改变。酒精性肝损伤并发胆囊病变以胆囊壁增厚、胆石症、胆囊增大为主，而且胆石症发生率与肝功能损害程度呈正相关，胆囊壁增厚与肝硬化密切相关，其增厚程度依肝功能代偿减退而显著。酒精性肝损伤时，胆囊血流有变化，使胆囊壁水肿、增厚，严重病例出现双边征，同时影响胆囊浓缩功能，使胆汁中无机盐成分增加，容易形成结石。

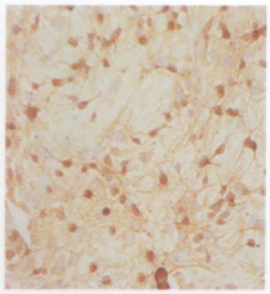
收稿日期：2010—02—28

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

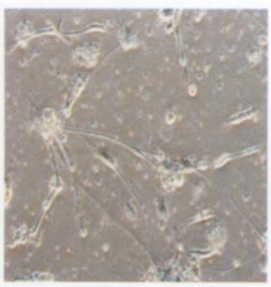
锰对神经元细胞内钙稳态影响的研究(正文见83～85页)



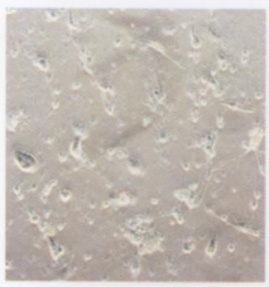
正常神经元 (400 ×)



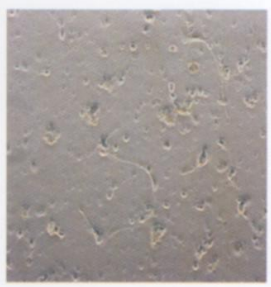
抗NSE染色 (400 ×)



染Mn 25 μmol/L组 (200 ×)



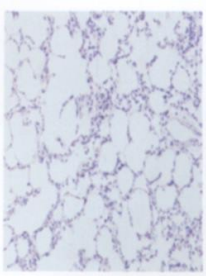
染Mn 100 μmol/L组 (200 ×)



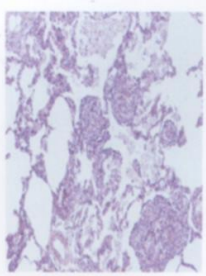
染Mn 400 μmol/L组 (200 ×)

图1 锰对神经元形态的影响

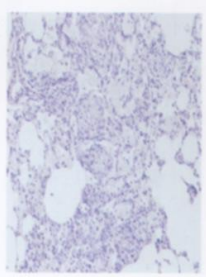
染尘大鼠Ⅰ和Ⅲ型胶原与相关细胞因子含量的变化关系 (正文见89～91页)



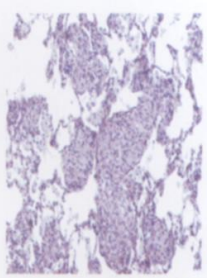
A. 7 d对照组



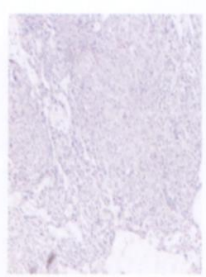
B. 7 d染尘组



C. 14 d染尘组



D. 21 d染尘组



E. 28 d染尘组

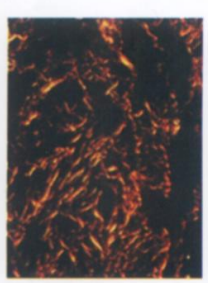
图1 不同时间点肺组织HE染色观察结果 (HE, 100 ×)

A. 1 d染尘组

B. 7 d染尘组

C. 14 d染尘组

D. 21 d染尘组



E. 28 d染尘组

图2 肺组织天狼猩红染色结果 (天狼猩红, 200 ×)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net