

铝致大鼠学习记忆损伤中程序性坏死的作用

赵宇卿, 李亚芹, 王珊, 张淑惠, 牛侨

山西医科大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] 近年来研究发现铝与多种神经系统疾病的发生发展密切相关, 铝的神经毒性作用包括影响中枢神经递质的含量, 引起神经细胞死亡, 促进 Tau 蛋白的异常磷酸化和聚集等方面。目前多采用细胞模型来探讨铝致神经细胞程序性坏死的机制。

[目的] 本研究采用大鼠模型, 探讨肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) - 受体相互作用蛋白 1 (RIP1) / 受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 信号通路是否在铝 [麦芽酚铝, $\text{Al}(\text{mal})_3$] 致大鼠学习记忆损伤中发挥作用。

[方法] 40 只健康成年雄性 SD 大鼠, 按体重随机分为手术对照组、溶剂对照组、程序性坏死抑制剂 (Nec-1) 组、Nec-1+ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组和 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组, 每组 8 只。采用侧脑室注射的方式对大鼠进行急性染毒, Nec-1 组给予 1.285 4 mmol/L Nec-1 5 μL , $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组给予 50 mmol/L $\text{Al}(\text{mal})_3$ 5 μL , Nec-1+ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组在给予 50 mmol/L $\text{Al}(\text{mal})_3$ 前 1 h 注射 1.285 4 mmol/L Nec-1 5 μL , 溶剂对照组给予等体积的生理盐水, 手术对照组采用同样侧脑室插管之外不给予任何试剂处理。每 2 d 定时染毒 1 次, 连续染毒 10 d。染毒结束后, 通过 Y 迷宫测定各组大鼠的自发反应交替率, 从而检测大鼠空间学习记忆能力; HE 染色观察海马组织病理形态变化, 电镜观察海马神经元超微结构, Western blot 测定各组大鼠海马组织中 TNFR1、RIP1、RIP3 的蛋白表达水平。

[结果] 手术对照组、溶剂对照组、Nec-1 组和 Nec-1+ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组大鼠的自发反应交替率没有明显差异, 分别为 (35.88±2.44) %、(34.38±3.06) %、(35.65±4.48) % 和 (32.01±6.93) %。与其他 4 组相比, $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组大鼠自发反应交替率下降至 (21.96±2.05) % (均 $P < 0.05$)。光镜下 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组大鼠海马神经元出现不同程度的胞质嗜酸性增强, 胞体缩小, 胞质呈深红色, 细胞排列无序紊乱, 神经元数量减少, 其余 4 组大鼠海马神经细胞结构完整、清晰, 细胞核清晰可见, 核浆比值大, 着色均匀, 核仁明显, 细胞排列整齐有序。电镜下 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组大鼠海马神经元胞膜破裂, 细胞器大量减少, 胞质空泡化, 细胞核固缩, 核周空化, 细胞体积膨胀, 神经元之间的突触几不可见; 其余 4 组大鼠海马神经元结构清晰, 胞膜完整, 胞质饱满, 细胞器清晰可见, 线粒体、内质网、高尔基体等细胞器围绕在核周, 细胞核大而清晰, 核仁明显, 神经元之间的突触完整且清晰可见。手术对照组、溶剂对照组、Nec-1 组和 Nec-1+ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组间的 TNFR1、RIP1 和 RIP3 蛋白表达差异没有统计学意义。与其他 4 组相比, $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组 TNFR1、RIP1 和 RIP3 蛋白的表达均明显升高 (均 $P < 0.05$)。

[结论] 铝可能通过触发 TNFR1-RIP1/RIP3 信号通路引起程序性坏死, 产生神经毒性, 进而损伤学习记忆能力。

关键词: 麦芽酚铝; 神经毒性; 学习记忆损伤; 程序性坏死; 肿瘤坏死因子受体; 受体相互作用蛋白

Role of aluminum-induced necroptosis in learning and memory impairment in rats ZHAO Yu-qing, LI Ya-qin, WANG Shan, ZHANG Shu-hui, NIU Qiao (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] In recent years, studies have found that aluminum is closely related to the occurrence and development of various neurological diseases. The neurotoxic effects of aluminum include affecting the content of central neurotransmitters, causing nerve cell death, and promoting abnormal phosphorylation and aggregation of Tau protein. Current studies use cell models to investigate the mechanism of necroptosis induced by aluminum.

[Objective] This experiment is designed to investigate the role of tumor necrosis factor receptor 1

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19167

基金项目

国家自然科学基金重点项目 (81430078)

作者简介

赵宇卿 (1994—), 男, 硕士生;
E-mail: zhaoyuqing55@163.com

通信作者

牛侨, E-mail: niuqiao55@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-03-21

录用日期 2019-05-23

文章编号 2095-9982(2019)08-0718-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

赵宇卿, 李亚芹, 王珊, 等. 铝致大鼠学习记忆损伤中程序性坏死的作用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (8): 718-724.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19167

Funding

This study was funded.

Correspondence to

NIU Qiao, E-mail: niuqiao55@163.com

Competing interests None declared

Received 2019-03-21

Accepted 2019-05-23

► To cite

ZHAO Yu-qing, LI Ya-qin, WANG Shan, et al. Role of aluminum-induced necroptosis in learning and memory impairment in rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(8): 718-724.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19167

(TNFR1)-receptor interacting protein 1 (RIP1)/receptor interacting protein 3 (RIP3) signaling pathway in aluminum [Al(mal)₃]-induced learning and memory impairment in rats.

[Methods] Forty healthy adult male SD rats were randomly divided into surgical control group, solvent control group, necrostatin-1 (Nec-1) group, Nec-1+Al(mal)₃ group, and Al(mal)₃ group, with eight rats in each group. By intracerebroventricular injection, the Nec-1 group was given 1.2584 mmol/L Nec-1 at 5 μ L, the Al(mal)₃ group was given 50 mmol/L Al(mal)₃ at 5 μ L, the Nec-1+Al(mal)₃ group was injected 5 μ L 1.2584 mmol/L Nec-1 1 hour before being given 5 μ L 50 mmol/L Al(mal)₃, the solvent control group was given an equal volume of normal saline, and the surgical control group was treated with the same lateral ventricle cannula without any reagent treatment. They were treated every two days and continuously for 10 days. The spontaneous learning reaction rate of each group of rats was determined by Y maze to detect spatial learning and memory ability of rats; the pathological changes of hippocampus were observed after HE staining under light microscope; the ultrastructure of hippocampus was observed under electron microscope; the expression levels of TNFR1, RIP1, and RIP3 in hippocampus were measured by Western blot.

[Results] There was no significant difference in the rate of spontaneous reaction alternation among the surgical control group [(35.88 $\pm$ 2.44)%], the solvent control group [(34.38 $\pm$ 3.06)%], the Nec-1 group [(35.65 $\pm$ 4.48)%], and the Nec-1+Al(mal)₃ group [(32.01 $\pm$ 6.93)%]. Compared with the other four groups, the spontaneous reaction alternation rate of rats in the Al(mal)₃ group decreased to (21.96 $\pm$ 2.05)% (P s<0.05). The light microscope observation showed that the hippocampal neurons of the Al(mal)₃ group had different degrees of cytoplasmic acidophilia enhancement, shrunk cell body, dark red cytoplasm, disorderly distributed cells, and reduced neurons; by contrast, the hippocampal neurons of the other four groups had intact and clear structure, clear nuclei, large nucleoplasm ratio, obvious nucleolus, even color, and neatly distributed cells. The electron microscope observation showed that the Al(mal)₃ group had ruptured hippocampal neurons, greatly reduced organelles, vacuolated cytoplasm, pyknotic nucleus, perinuclear cavitation, expanded cell volume, and invisible synapses between neurons; by contrast, the hippocampal neurons in the other four groups had clear structure, intact membrane, full cytoplasm, clear organelles such as perinuclear mitochondria, endoplasmic reticulum, and Golgi bodies, large and clear nucleus, obvious nucleolus, and complete and clearly visible synapses between neurons. There was no significant difference in the expression of TNFR1, RIP1, and RIP3 among the surgical control group, the solvent control group, the Nec-1 group, and the Nec-1+Al(mal)₃ group. Compared with the other four groups, the expression levels of TNFR1, RIP1, and RIP3 of rats in the Al(mal)₃ group decreased significantly (P s<0.05).

[Conclusion] Aluminium may cause necroptosis by triggering TNFR1-RIP1/RIP3 signaling pathway, thereby producing neurotoxicity and impairing learning and memory ability.

Keywords: aluminium maltolate; neurotoxic effect; learning and memory impairment; necroptosis; tumor necrosis factor receptor; receptor interacting protein

传统理论认为细胞坏死不受基因调控,是一种被动的细胞死亡方式。当细胞发生坏死时,胞体膨胀,质膜破裂,细胞内含物会被释放到胞外,导致周围组织发生炎症^[1]。然而,近些年研究发现了能被程序性坏死抑制剂 necrostatin-1 (Nec-1) 抑制的一种新型细胞死亡方式——程序性坏死 (necroptosis), 这种方式表现出既受死亡信号调控, 又呈现坏死样结构特点^[2]。与坏死不同, 程序性坏死受到多种基因的调控。参与程序性坏死过程的分子有细胞因子、肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR)、病原相关模式分子、受体相互作用蛋白 (receptor interacting protein, RIP) 1、RIP3、活性氧、水解酶等。随着程序性坏死作为一种新的细胞死亡方式被发现后, 越来越多的研究开始探讨其中的信号通路机制。程序性坏死是通过多种触发机制启动的, 包括 TNFR1、脂肪酸合成酶配体 (fatty acid synthase ligand, FasL)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)、干扰素 (interferons, IFNs)、Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 和病毒介

导途径^[3]。其中 TNF 受体超家族的成员, 是一组高度保守的胞外结构域同源的质膜受体, 显示出不同数量的富含半胱氨酸的结构域, 称为死亡受体 (death receptor, DR)^[4]。在哺乳动物细胞中, 已经鉴定出 8 种 DRs, 包括 TNFR1、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, Fas)、DR3、DR4、DR5、DR6、神经生长因子受体和外源性纤溶酶受体^[5]。

近年来研究发现铝与多种神经系统疾病的发生发展密切相关, 而且认知功能障碍是职业性铝暴露工人的典型症状。铝可影响中枢神经递质的含量, 引起神经细胞死亡, 促进 Tau 蛋白的异常磷酸化和聚集, 控制大鼠海马 CA1 区长时程增强作用 (long-term potentiation, LTP) 的产生和凝聚染色体。本课题组先前的研究表明, 铝可引起神经细胞死亡, 死亡细胞有些呈凋亡形态, 有些呈坏死形态^[6]。Nec-1 作为抑制剂, 能够特异性阻断由铝诱发 RIP1 介导的程序性坏死^[7]。神经细胞中 TNFR1 诱发的程序性坏死是在外来刺激作用下, 由 RIP1/RIP3 及其下游的某些分子组成坏死小体 (necrosome) 完成的。程序性坏死由一系列

DRs 诱发。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 有 TNFR1 和 TNFR2 两个受体^[8], 但 TNFR2 不具有死亡结构域, 所以具有死亡结构域的 TNFR1 在细胞表面就成为 TNF- α 的主要功能受体, 因此, 由 TNF- α 介导的细胞内活动便由 TNFR1 激活或启动^[9-10]。TNFR1 和 TNFR2 通过形成复合体 I 来触发下游信号。复合体 I 内有含有死亡结构域的蛋白, 包括 TNFR1 相关死亡域蛋白 (TNFR1 associated death domain, TRADD)、RIP1、Fas 相关死亡结构域蛋白 (Fas-associated protein with death domain, FADD)、肿瘤坏死因子受体相关因子 2/5 (tumor necrosis factor receptor associated factors 2/5, TRAF2/5) 等。而在心肌细胞则不同^[11], RIP3 诱导的心脏坏死不需要 RIP1 和 RIP3 的特异性底物蛋白——混合系激酶区域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)。提示在不同组织中, 程序性坏死可以通过不同信号通路执行。不同于以往研究多采用的细胞模型, 本次研究建立侧脑室注射染铝动物模型, 通过给予程序性坏死抑制剂 Nec-1, 探讨 TNFR1-RIP1/RIP3 信号通路在铝致大鼠学习记忆损伤中的作用, 以期探索铝的神经毒性机制提供理论基础和研究线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体级雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 180~200 g, 购自山西医科大学实验动物中心 (实验动物许可证号为 SCXK 晋 2015-0001)。饲养条件: 室温 22℃, 湿度 50%, 自由饮水及进食。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》。

1.2 主要仪器与试剂

麦芽酚、氯化铝 (美国 Sigma), 0.9% 氯化钠注射液 (中国石家庄四药有限公司), Nec-1 (固体粉末, 美国 Selleck), 水合氯醛分析纯 (中国天津市大茂化学试剂厂), 磷酸锌水门汀 (中国常熟尚齿齿科材料有限公司), 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA; 中国北京博奥拓达科技有限公司), 组织蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、组织蛋白酶抑制剂、蛋白示踪上样缓冲液、高灵敏度化学发光检测试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (中国北京康为世纪生物科技有限公司), PVDF 膜 (美国 Millipore), TNFR1 多克隆抗体 (中国 Affinity), RIP1 多克隆抗体 (美国 GeneTex), RIP3 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling), 苏

木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (中国 Solarbio)。

脑立体定位仪、颅骨钻、精密手术器械、Y 迷宫 (中国深圳市瑞沃德生命科技有限公司), 微量进样器 (中国上海高鸽工贸有限公司), 超声波破碎仪 (美国 Sonics & Materials), 高速低温离心机 (德国 Eppendorf), 电泳仪、凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad)。

1.3 动物分组及造模

用随机数字表法将大鼠按体重相近者随机分为手术对照组、溶剂对照组、Nec-1 组、Nec-1+ 麦芽酚铝 $[\text{Al}(\text{mal})_3]$ 组和 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组, 每组 8 只。大鼠经 10% 水合氯醛 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后固定于脑立体定位仪上, 参照 Paxinos & Watson 大鼠脑立体定位图谱, 于前囟后 0.8 mm、矢状线右侧 1.5 mm 处钻直径约 0.8 mm 的小孔, 在孔内埋置套管, 在周围颅骨上植入 3 个直径约 1.8 mm 的不锈钢螺丝, 用牙科水泥固定。手术过程保持无菌操作, 实验动物术后单笼饲养 2 周恢复。

按照 Zhang 等^[12]的研究方法, 将氯化铝溶于 0.9% 生理盐水中, 配制成氯化铝溶液; 将麦芽酚溶于 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液中, 配制成麦芽酚溶液; 将两者等体积混合, 配成终浓度为 50 mmol/L 的 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 溶液; 用 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.4。用 0.22 μm 的抽滤器和 10 mL 注射器抽滤, 溶液现配现用。 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组大鼠注射 5 μL 浓度为 50 mmol/L $\text{Al}(\text{mal})_3$, 10 min 内完成, 注射完成后, 保持 5 min。按照 Yin 等^[13]的方法, 将 Nec-1 溶于含有 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液的 1% DMSO 中, 配成浓度为 1.285 4 mmol/L 的溶液。Nec-1 组大鼠注射 5 μL 体积的 Nec-1; Nec-1+ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 组大鼠首先注射 5 μL Nec-1, 1 h 后注射 5 μL 50 mmol/L $\text{Al}(\text{mal})_3$; 溶剂对照组注射等体积的生理盐水; 手术对照组采用同样侧脑室插管之外不给予任何试剂处理。每 2 d 定时染毒, 连续染毒 10 d。染毒期间, 大鼠给予普通饲料, 自由饮水。染毒结束后, 进行行为学测定。

1.4 Y 迷宫测定空间学习记忆能力

Y 迷宫由 3 个完全相同的臂组成, 每两个臂之间夹角为 120°。迷宫内铺垫木屑垫料, 在迷宫上方 1.5 m 处安置摄像头, 全过程录像。Y 迷宫实验模型用来研究啮齿类动物对空间识别记忆能力, 现常用于学习记忆功能评价。大鼠在 5 min 的实验中, 允许自由地在迷宫中漫游。每次测试结束后, 混匀 Y 迷宫各个臂的木屑, 以防止动物残留气味干扰。交替被定义为连续进入 3 个臂 1 次。自发反应交替率 = [正确交替反应次数 / (进

臂总次数-2)] $\times 100\%$ 。

1.5 HE染色观察海马组织病理形态变化

大鼠脑组织经固定后,常规石蜡包埋,切片成4 μm 。依次在以下溶液中浸泡脱蜡:二甲苯(I) 10min,二甲苯(II) 10min,无水乙醇2min,90%乙醇2min,80%乙醇2min,70%乙醇2min,超纯水3min。然后用苏木素染色5min,自来水冲洗。分化液分化30s,自来水浸泡15min,伊红染色2min,自来水浸泡5min后,脱水,透明及封片。普通光镜下观察。

1.6 电镜观察海马神经元超微结构

大鼠脑组织固定后,立即取材,要求为组织块 $\leq 1\text{mm}^3$,取材时避免机械性损伤。用戊二醛-锇酸固定,用丙酮脱水,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。经浸透、包埋、聚合后,进行修块,半薄定位,制成超薄切片。染色后,进行电镜观察。

1.7 Western blot检测蛋白表达水平

取大鼠海马,按照组织蛋白抽提试剂盒说明书进行蛋白的提取,BCA蛋白定量法测定各组蛋白浓度,将各组蛋白调整到同一浓度,加入蛋白示踪上样缓冲液,充分混匀,沸水浴5min,冷却至室温,12000 $\times g$ 离心3min。取上清进行凝胶电泳。电泳结束后,将分离胶上的蛋白转至PVDF膜,TNFR1用5%BSA室温封闭2h,RIP1和RIP3用5%脱脂奶粉室温封闭2h后,加入一抗(一抗稀释比例分别为:TNFR1,1:800;RIP1,1:800;RIP3,1:1000; β -actin,1:3000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST漂洗8min 5次,加入二抗(二抗稀释比例TNFR1为1:5000,其余皆为1:3000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,TBST漂洗8min 5次。涂抹发光液。用Bio-Rad凝胶成像仪进行成像和拍照,Quantity One 4.6.5软件进行灰

度值的分析。

1.8 统计学分析

用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,经正态性检验和方差齐性分析。方差齐性资料不同组间均数比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD- t 法;方差不齐时采用Games-Howell检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

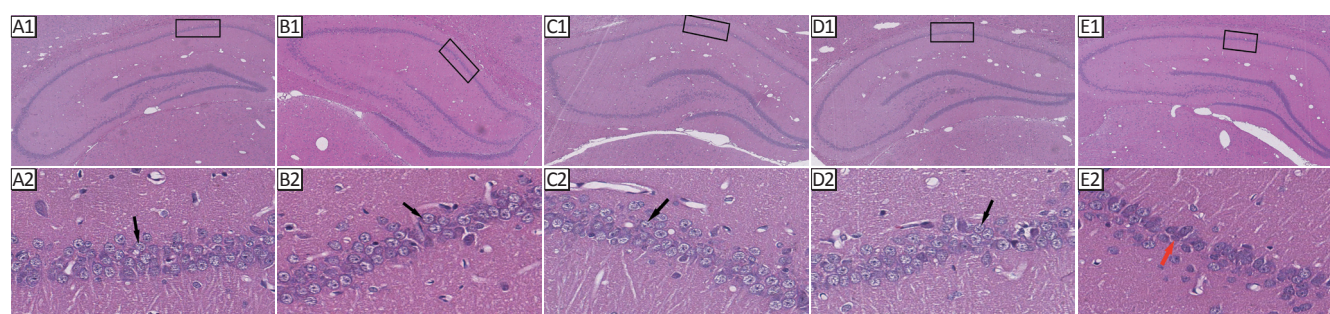
每日对大鼠进行进食、进水、精神状态、行为等基本情况的观察显示,染毒期间Al(mal)₃组大鼠皮毛光泽度变差,毛色有一定程度的发黄,进食减少,反应迟钝,在笼内运动减少,1只大鼠出现烦躁、易惊表现。手术对照组、溶剂对照组和Nec-1组大鼠生长发育状况良好,未观察到异常表现。Nec-1+Al(mal)₃组大鼠毛色轻微发黄,进食进水正常,未观察到烦躁、易惊表现。

2.2 大鼠海马组织病理切片

光镜下可见,手术对照组、溶剂对照组、Nec-1组和Nec-1+Al(mal)₃组大鼠海马神经细胞结构完整、清晰,细胞核清晰可见,核浆比值大,着色均匀,核仁明显,细胞排列整齐有序。而Al(mal)₃组海马神经元出现不同程度的胞质嗜酸性增强,胞体缩小,胞质呈深红色,细胞排列无序紊乱,神经元数量减少。见图1。

2.3 电镜观察结果

电镜下可见,手术对照组、溶剂对照组、Nec-1组和Nec-1+Al(mal)₃组大鼠海马神经元形态结构完



[注] A: 手术对照组; B: 溶剂对照组; C: Nec-1组; D: Nec-1+Al(mal)₃组; E: Al(mal)₃组。1: $\times 40$; 2: $\times 400$ 。黑色方框: 海马CA1区; 黑色箭头: 正常神经细胞; 红色箭头: 异常神经细胞。

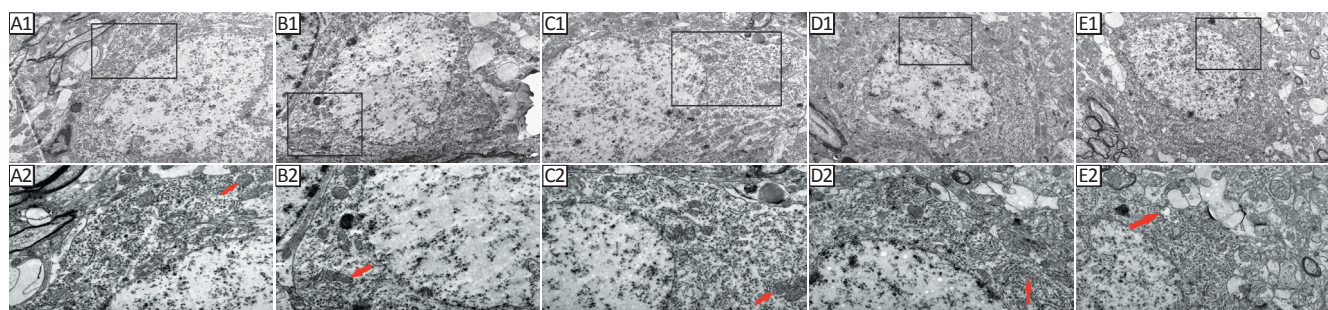
[Note] A: Surgical control group; B: Solvent control group; C: Nec-1 group; D: Nec-1+Al(mal)₃ group; E: Al(mal)₃ group. 1: $\times 40$; 2: $\times 400$. Black box: Hippocampal CA1 area; Black arrow: Normal nerve cell; Red arrow: Abnormal nerve cell.

图1 光镜下各组大鼠海马组织的病理变化

Figure 1 Histopathological changes of hippocampus in rats of each group under light microscopy

整, 线粒体、内质网等细胞器清晰可见。Al(mal)₃组海马神经细胞, 线粒体肿胀, 线粒体嵴数量减少, 严重

者呈空泡化, 细胞器减少, 胞质出现空泡化样崩解破坏。见图2。



[注] A : 手术对照组 ; B : 溶剂对照组 ; C : Nec-1 组 ; D : Nec-1+Al(mal)₃ 组 ; E : Al(mal)₃ 组。1 : ×10000 ; 2 : ×20000。黑色方框 : 观察区域 ; 红色箭头 : 线粒体。E 组线粒体嵴数量减少, 线粒体空泡化。

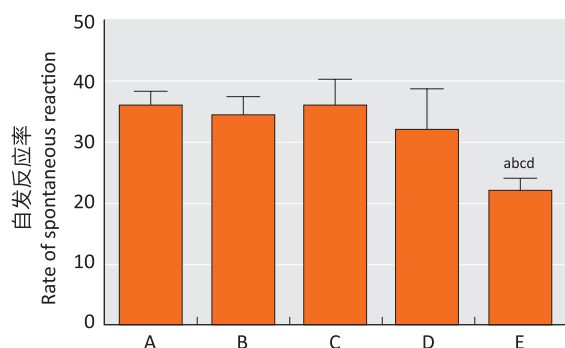
[Note] A : Surgical control group ; B : Solvent control group ; C : Nec-1 group ; D : Nec-1+Al(mal)₃ group ; E : Al(mal)₃ group. 1 : ×10000 ; 2 : ×20000. Black box : Observation area ; Red arrow : Mitochondrion. Decreased number of mitochondrial cristae and mitochondrial vacuolization in group E.

图2 各组大鼠海马神经元超微结构

Figure 2 Ultrastructure of hippocampal neurons in rats of each group

2.4 Y 迷宫实验结果

手术对照组、溶剂对照组、Nec-1 组、Nec-1+Al(mal)₃ 组和 Al(mal)₃ 组大鼠的自发反应交替率分别为 (35.88±2.44) % , (34.38±3.06) % , (35.65±4.48) % , (32.01±6.93) % , (21.96±2.05) % , 见图 3。Al(mal)₃ 组大鼠自发反应交替率低于其余 4 组 (均 $P < 0.05$) , 余各组间无明显差异。



[注] A : 手术对照组 ; B : 溶剂对照组 ; C : Nec-1 组 ; D : Nec-1+Al(mal)₃ 组 ; E : Al(mal)₃ 组。a : 与手术对照组比较, $P < 0.05$; b : 与溶剂对照组比较, $P < 0.05$; c : 与 Nec-1 组比较, $P < 0.05$; d : 与 Nec-1+Al(mal)₃ 组比较, $P < 0.05$ 。

[Note] A : Surgical control group ; B : Solvent control group ; C : Nec-1 group ; D : Nec-1+Al(mal)₃ group ; E : Al(mal)₃ group. a : Compared with the surgical control group, $P < 0.05$; b : Compared with the solvent control group, $P < 0.05$; c : Compared with the Nec-1 group, $P < 0.05$; d : Compared with the Nec-1+Al(mal)₃ group, $P < 0.05$ 。

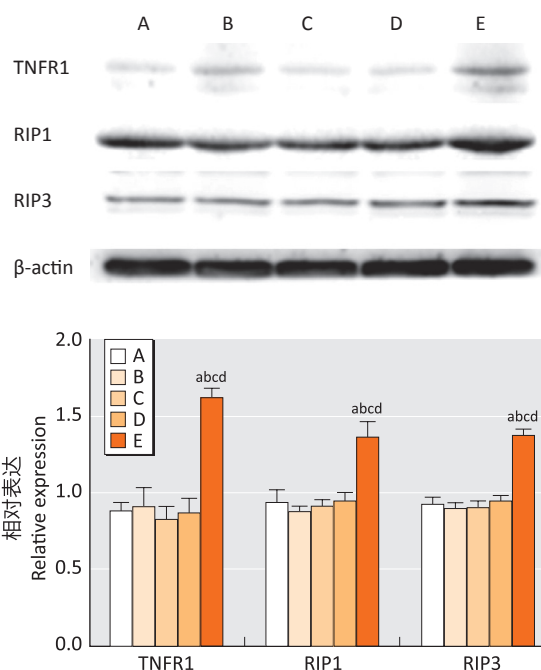
图3 大鼠自发反应交替率

Figure 3 Rate of spontaneous reaction alteration

2.5 海马组织中 TNFR1、RIP1、RIP3 蛋白的表达

与其他 4 组比较, Al(mal)₃ 组大鼠海马组织中

TNFR1、RIP1 及 RIP3 蛋白表达均升高 (均 $P < 0.05$)。其余 4 组间各蛋白表达水平没有明显差异。见图 4。



[注] A : 手术对照组 ; B : 溶剂对照组 ; C : Nec-1 组 ; D : Nec-1+Al(mal)₃ 组 ; E : Al(mal)₃ 组。a : 与手术对照组比较, $P < 0.05$; b : 与溶剂对照组比较, $P < 0.05$; c : 与 Nec-1 组比较, $P < 0.05$; d : 与 Nec-1+Al(mal)₃ 组比较, $P < 0.05$ 。

[Note] A : Surgical control group ; B : Solvent control group ; C : Nec-1 group ; D : Nec-1+Al(mal)₃ group ; E : Al(mal)₃ group. a : Compared with the surgical control group, $P < 0.05$; b : Compared with the solvent control group, $P < 0.05$; c : Compared with the Nec-1 group, $P < 0.05$; d : Compared with the Nec-1+Al(mal)₃ group, $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠海马组织 TNFR1、RIP1 及 RIP3 蛋白表达

Figure 4 Expressions of TNFR1, RIP1, and RIP3 in hippocampus in rats of each group

3 讨论

铝在现代生活中被广泛使用,可以通过环境、饮食或药物进入人体。近些年大量研究表明,铝是一种神经毒性元素,不仅能引起自由基损伤、糖代谢受损,影响蛋白调节,改变神经纤维磷酸化水平,而且还能导致神经元死亡^[14]。本实验病理切片结果中发现,Al(mal)₃组大鼠的海马神经元数量减少,形态变异,表明染铝可引起神经细胞死亡。而Nec-1+Al(mal)₃组大鼠的海马神经元排列整齐,胞体丰满,表明Nec-1作为程序性坏死的特异性抑制剂,能够抑制铝引起的神经细胞死亡,证实了铝可致程序性坏死。电镜结果显示,在Al(mal)₃组大鼠海马神经元的超微结构中,神经细胞胞膜破裂,细胞器大量减少,胞质空泡化,细胞核固缩,细胞体积膨胀,神经元之间的突触几不可见,呈现程序性坏死样特征。本课题组前期研究发现氯化铝能够导致SH-SY5Y细胞发生凋亡和程序性坏死^[15]。而在本次研究中,未观察到细胞的超微结构出现凋亡的典型特征——凋亡小体,推测可能与本次研究采用了大鼠侧脑室注射Al(mal)₃模型有关。

Y迷宫实验模型主要应用于动物的辨别性学习、工作记忆和参考记忆的测试,相对于被动回避等实验的优点在于这种迷宫利用了啮齿类动物对新异环境天然探究的自然习性,不需要动物学习任何规则来趋利避害,能够有效地反映出动物对新异环境的识别记忆能力。在本次实验中,Al(mal)₃组大鼠的自发反应交替率明显低于对照组,而Nec-1+Al(mal)₃组的自发反应交替率与溶剂对照组没有差异,且高于Al(mal)₃组。海马作为大脑的学习记忆能力的关键部位,主要负责储存信息和定位等功能。从本次实验结果可见,Al(mal)₃组的大鼠海马功能受到了一定程度的损伤,Liang等^[16]也发现Al(mal)₃能够损伤大鼠的学习记忆功能。而Nec-1+Al(mal)₃组大鼠的海马学习记忆功能未受影响,表明Nec-1对由铝引起的大鼠学习记忆功能损伤有抑制效果。

程序性坏死由一系列DRs诱发。TNF- α 介导的细胞内活动由TNFR1激活或启动^[9-10]。TNFR1通过形成复合体I来触发下游的信号。复合体I内含包括RIP1在内的多种蛋白。RIP蛋白家族有7个成员,但只有RIP1和RIP3的C末端含有RIP同型相互作用基序(RIP homotypic interaction motif, RHIM)结构域,但RIP3的RHIM结构域中有4个氨基酸易发生突变从而解除RIP3与RIP1的相互作用,表明RIP3蛋白将RIP1的

功能从细胞凋亡途径转换到细胞坏死途径,承担着从凋亡到坏死的重要开关作用^[17-18]。研究发现RIP1普遍表达,而RIP3选择性表达^[19]。但也有研究发现RIP3蛋白的表达是由TNF- α 诱导细胞坏死的必要条件^[20]。在本次研究结果中发现,TNFR1、RIP1、RIP3均呈高表达($P<0.05$),表明在铝导致的程序性坏死中,可通过TNFR1-RIP1/RIP3信号通路发生作用,而Al(mal)₃+Nec-1组的TNFR1、RIP1、RIP3蛋白的表达与对照比较均无差异,进一步证实了这种作用。铝能够引起学习记忆下降的机制复杂,包括细胞凋亡、过氧化损伤、钙离子稳态紊乱等,但具体机制还不明确。本次实验仅从程序性坏死这一个方面进行研究,其他机制有待进一步探索。

综上,铝神经毒性的一个表现是引发细胞的程序性坏死,导致学习记忆损伤。铝能够通过TNFR1-RIP1/RIP3信号通路触发程序性坏死,而Nec-1对由铝导致的学习记忆损伤具有一定的抑制作用。铝致神经细胞的程序性坏死机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] VANDEN BERGHE T, VANLANGENAKKER N, PARTHOENS E, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features [J]. Cell Death Differ, 2010, 17 (6): 922-930.
- [2] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. Cell Death Differ, 2012, 19 (1): 107-120.
- [3] WEGNER KW, SALEH D, DEGTEREV A. Complex pathologic roles of RIPK1 and RIPK3: moving beyond necroptosis [J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38 (3): 202-225.
- [4] KANG K, LEE SR, PIAO X, et al. Post-translational modification of the death receptor complex as a potential therapeutic target in cancer [J]. Arch Pharmacol Res, 2019, 42 (1): 76-87.
- [5] KERSSE K, VERSPURTEN J, VANDEN BERGHE T, et al. The death-fold superfamily of homotypic interaction motifs [J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36 (10): 541-552.
- [6] 张勤丽, 牛侨, 张玲, 等. 程序性坏死参与铝致神经母细胞瘤细胞死亡机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22 (5): 382-390.
- [7] 段春梅. TNFR1-RIP1/RIP3信号通路在麦芽酚铝致PC12细

- 胞程序性坏死中的作用研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2017.
- [8] WU W, LIU P, LI J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012, 82 (3): 249-258.
- [9] LI J, MCQUADE T, SIEMER A B, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis [J]. *Cell*, 2012, 150 (2): 339-350.
- [10] CHRISTOFFERSON D E, YUAN J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22 (2): 263-268.
- [11] ZHANG T, ZHANG Y, CUI M, et al. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22 (2): 175-182.
- [12] ZHANG H, YANG X, QIN X, et al. Caspase-3 is involved in aluminum-induced impairment of long-term potentiation in rats through the Akt/GSK-3 β pathway [J]. *Neurotox Res*, 2016, 29 (4): 484-494.
- [13] YIN B, XU Y, WEI R L, et al. Inhibition of receptor-interacting protein 3 upregulation and nuclear translocation involved in Necrostatin-1 protection against hippocampal neuronal programmed necrosis induced by ischemia/reperfusion injury [J]. *Brain Res*, 2015, 1609: 63-71.
- [14] SHCHERBATYKH I, CARPENTER D O. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2007, 11 (2): 191-205.
- [15] 张勤丽, 吉秀亮, 刘承芸, 等. 氯化铝致神经母细胞瘤细胞不同死亡的方式及意义 [J]. *毒理学杂志*, 2009, 23 (3): 185-189.
- [16] LIANG R F L, LI W Q, WANG X H, et al. Aluminium-maltolate-induced impairment of learning, memory and hippocampal long-term potentiation in rats [J]. *Ind Health*, 2012, 50 (5): 428-436.
- [17] MCQUADE T, CHO Y, CHAN F K M. Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis [J]. *Biochem J*, 2013, 456 (3): 409-415.
- [18] WONG W W, GENTLE I E, NACHBUR U, et al. RIPK1 is not essential for TNFR1-induced activation of NF- κ B [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17 (3): 482-487.
- [19] SHINDO R, KAKEHASHI H, OKUMURA K, et al. Critical contribution of oxidative stress to TNF α -induced necroptosis downstream of RIPK1 activation [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2013, 436 (2): 212-216.
- [20] VANDENABEELE P, DECLERCQ W, VAN HERREWEGHE F, et al. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis [J]. *Sci Signal*, 2010, 3 (115): re4.
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)

· 告知栏 ·

欢迎关注《环境与职业医学》杂志微信公众号

《环境与职业医学》杂志微信公众号已正式上线, 该平台包括“读者”“作者”和“我们”三个主菜单, 主要提供稿件状态查询、当期最新内容及稿件撰写要求等内容, 同时也发布国内外最新研究动态及发展前沿等资讯, 满足读者网络时代碎片化阅读的需求。本平台旨在为编者、作者、读者之间搭建一个分享、学习、互动的平台, 以此推动《环境与职业医学》杂志的健康发展。

请直接扫描右侧二维码或在公众号中搜索“环境与职业医学”(微信号: JEOM), 即可关注本刊微信公众号。



《环境与职业医学》编辑部