

锰的神经毒性机制与基因调控

黄国香(综述), 宋世震(审校)

(武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430065)

摘要: 长期高剂量的锰暴露, 可出现类似帕金森综合征的锥体外系神经损害。大量研究证明, 锰可选择性的使多巴胺能神经细胞凋亡, 而细胞凋亡过程需要多种基因的调控, 本文将近年来从基因调控水平上探讨锰神经毒性机制的研究综述如下。

关键词: 锰; 神经毒性; 基因调控

中图分类号: O614.711 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2007)02-0113-03

Study on neurotoxic mechanism of manganese and the gene regulations

HUANG Guo-xiang, SONG Shi-zhen

(School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

Abstract: The long term and high level exposure to manganese might induce Parkinson's disease-like extracortical tract damage in nervous system. Many studies have demonstrated that manganese could selectively make dopamine-energy neuron cell apoptosed which is such a process needed a lot of gene regulations. This article will summarize the papers concerned the neurotoxic mechanism of manganese on the level of gene regulation and control in recent years.

Key words: Manganese; Neurotoxic mechanism; Gene regulation

近年来的研究表明, 锰可选择性的使多巴胺能神经细胞凋亡, 而神经细胞凋亡过程涉及到多种基因的调控。本文就锰致神经细胞凋亡与 *p53* 和 *MDM2*、*NF- κ B*、*Caspase*、*p35* 基因及其蛋白表达之间关系的研究作一综述。

1 *p53* 和 *MDM2* 基因及其蛋白

p53 是一种抑癌基因, 位于人类 17 号染色体短臂上, 其生物学效应主要是调控细胞周期和诱导细胞凋亡^[1,2]。野生型 *p53* (*wtp53*) 基因是细胞生长的负调节因子, 通过调控细胞生长和凋亡而起抑癌作用, 其产生的蛋白是一类四源四聚体, 在正常细胞内含量很低, 并且半衰期非常短, 只有 6~12min, 一般用免疫组织化学的方法难以检测到。*wtp53* 基因发生突变或缺失引起的突变型 *p53* (*mtp53*) 则对细胞增长和转化起促进作用, 并因为其产生蛋白的半衰期延长, 稳定性高, 能在细胞核内积聚, 可运用免疫组化技术测定其含量作为 *p53* 基因突变的证据³⁻⁶。

p53 蛋白作用于线粒体, 引起各种损伤。研究表明, 神经细胞缺氧 5~6 h, 用免疫荧光法可在线粒体内检测到内源 *p53* 蛋白。线粒体 *p53* 蛋白主要存在于其表面, 只有少数出现在细胞质中。经实验证明, 定位于线粒体上 *p53* 足以引起线粒体水平上的 *p53* 依赖的细胞凋亡。多年的观察表明, 在一些细胞中 *p53* 诱导的凋亡也可发生在非转录或蛋白质不合成阶段^[7], 如 Marchenko 发现线粒体内 *p53* 的促凋亡作用不依赖于转录, 因为其突变体 *L-p53R175H* 作为转录因子在完全处于静止状态时, 它作为线粒体蛋白也有凋亡作用^[8]。其凋亡过程的发生需要

多种相关基因如 *caspase-3*、*caspase-8*、*caspase-9* 的参与^[9]。

目前认为, *p53* 基因突变是 *p53* 失活最重要最常见的机制, 而 *MDM2* 作为负性调节野生型 *p53* 基因功能的癌基因, 两种蛋白质的相对含量和比例对 *p53* 基因的功能和稳定性有重要的影响^[9], 并在细胞生长过程中发挥重要的作用。

MDM2 是一种进化保守基因^[10], 定位于人 12 号染色体长臂 13-14 区 (12q13-14), *MDM2* 表达多种蛋白, 但起生物学作用的蛋白主要是 *p90*。其产物与抑癌基因产物 *p53* 蛋白结合并抑制其介导的转录活性。将 *p53* 蛋白转运到细胞质中降解, 同时稳定 *mtp53* 蛋白, 从而阻断 *p53* 的细胞生长抑制作用。正常情况下, *MDM2* 的产生是由 *wtp53* 诱导的, 产生的 *MDM2* 反过来又促进 *wtp53* 的降解, 二者形成负反馈环, 维持两者的平衡^[11-14]。*MDM2* 的高表达常见于食管癌、高级别星形细胞瘤和神经母细胞瘤^[15]。近年来有研究者用 NO 作为神经母细胞瘤的放疗增敏剂, 其作用机制是通过异步转移模式 (asynchronous transfer mode, ATM) 相关激酶使 *p53*、*MDM2* 的磷酸化状态发生改变, 促使神经细胞经 *p53* 途径凋亡^[16]。

Chen 等证实锰可引起神经细胞凋亡。而且易积存于线粒体中^[17]。而越来越多的研究表明, 细胞凋亡的发生与线粒体的病理改变有着密切的关系^[18], 线粒体与凋亡有关的变化包括跨膜电位的下降, 反应活性氧的聚积, 膜通透性的改变及释放凋亡因子^[19]。所以锰导致的 PD 神经毒性作用很可能是通过对线粒体结构和功能的损伤, 从而引起细胞凋亡^[20]。

王悦等通过腹腔注射及颅内单侧注射 *MnCl₂* 方法观察染毒大鼠单胺类神经递质、生化指标及凋亡基因 *p53*、*bcl-2* 的改变, 发现 *p53* 蛋白表达增强, *bcl-2* 表达下降, 说明锰能诱导 DA 能神经细胞的凋亡^[21], 因为 *bcl-2* 表达下调及野生型 *p53*

蛋白升高是细胞凋亡的重要指标^[22]。所以锰的神经毒性与 *p53*、*MDM2* 基因及其蛋白的调控有着密切的关系,但是基因调控过程是相当复杂的,其具体而精确的相关性尚需进一步的研究。

2 *NF-κB* 基因及其蛋白

NF-κB 是一个异源二聚体,包括 50kDa 亚基和 65kDa 转录活性亚单位的 DNA。p50 和 p65 是异源二聚体以无活性的形式存在于细胞质中,受束缚于其抑制因子 *IκB* 中。当细胞受 LPS、IL-1 刺激时, *IκB* 被磷酸化并被蛋白体降解,释放有活性的 *NF-κB* 进入胞核导致基因表达。*NF-κB* 基因表达的蛋白是一个可识别的转录因子,在 B 细胞中产生 γ 射线的 *cahain* 基因。

Rala Rathoumi 等应用 C6 细胞发现,过量的锰暴露使突变体 *IκBα* (S32/36A) 的过表达,促使诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达增加,使具有神经毒性的 NO 生成增加^[23]。而 NO 本身能通过刺激核内 p21^{ras} 转换而激活 *NF-κB*^[24]。许多研究表明,锰可降低线粒体的膜电位,提高基质 Ca^{2+} 浓度,增加胞内 ROS。当降低锰浓度时,ROS 生成减少, *IκB* 的磷酸化减少, iNOS 表达降低,说明锰导致的线粒体功能异常与 *NF-κB* 的激活有一定关系。实验证明, *NF-κB* 负调节突变体 *NiK* 的过表达,可以阻滞锰诱导的 *IκBα* 磷酸化,进一步说明锰作用于 C6 细胞时,增加线粒体内 ROS 的生成,并激活了 *NF-κB*。

近来研究发现,线粒体 ROS 是激活 *NF-κB* 的一个重要调节因子^[25],认为锰激活 *NF-κB* 抑制线粒体钙的外流,导致基质钙的增多和 ROS 生成增多,最终引起神经细胞的毒性作用。

3 *Caspase* 家族及其蛋白

Caspase 家族是一种半胱氨酸蛋白酶家族,在细胞凋亡过程的分子机制中作为重要的效应分子执行凋亡。现已发现人有 11 种 *caspase* 家族成员,通过破坏、激活某些酶或破坏细胞骨架等方式导致一系列凋亡相关反应及细胞形态学改变^[26]。

在锰导致的神经细胞凋亡中, *caspases* 也起着关键作用,参与一些神经变性疾病的发生。研究表明,神经细胞凋亡在锰的多巴胺能神经毒性中起着重要作用^[27]。*Caspase* 是已知在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶,是细胞凋亡的重要介导者^[28]。许多细胞凋亡时,多种 *caspases* 被激活,而当用特异性抑制剂抑制 *caspase* 后,细胞凋亡也被抑制。曾季平等用 *caspase* 具有膜通透性的广谱多肽抑制剂 Z-VAD-FMK 预处理后的 PC12 细胞来监测它对 $MnCl_2$ 诱导的 PC12 细胞的凋亡作用,发现 Z-VAD-FMK 能使 $MnCl_2$ 诱导的 PC12 细胞存活率明显上升,从而证明 *caspase* 参与了 $MnCl_2$ 诱导的 PC12 细胞的凋亡^[31]。Chun 等证实锰使黑质多巴胺能神经细胞 SN4741 凋亡是内质网应激异常,多种 *caspases* 效应分子如 *caspase-1*、*caspase-8*、*caspase-9* 参与的结果^[29]。

4 *p53* 基因

p53 基因是 1991 年由 Clem 等在苜蓿银纹夜蛾多粒包埋核型多角体病毒 (autographa californica MNPV, A-MNPV) 中分离并鉴定出的凋亡抑制基因, *p53* 基因位于 EcoR I 片断 (86.8 ~ 87.8mU 图谱单位),下游是增强子 *h5*,上游是 *p94* 基因,其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 由 897 个碱基对组

成,基因表达产物相对分子质量为 35kD。正常细胞都含有 *p53* 基因,一旦细胞出现缺陷或受到损伤, *p53* 基因就会启动细胞内部机制,进行修复或者自我毁灭。*p53* 基因表达的蛋白是 Mpe 的一种脂质相关膜蛋白 (LAMP), Ferris 和 Neyrolles 等^[30] 发现 p35 氨基末端有一信号肽,信号肽上带有一酰基位点, *p53* 基因编码产生一约 35.3kD 的蛋白,广泛分布在细胞膜表面,通过 N-末端酰基部分锚定在细胞脂质双分子层。p35 是 Mpe 的主要表面抗原,但到目前为止,尚未见 p35 蛋白相关功能的研究报道。曾季平等研究发现 *p53* 基因在 PC12 细胞中的稳定表达可以有效的抑制 $MnCl_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡,说明 *p53* 基因的表达对锰引起的细胞凋亡过程起保护作用,但其具体机制尚需进一步研究证明^[31]。

细胞凋亡是一个多基因调控的主动过程,细胞表面死亡受体的激活、DNA 的损伤、生存因子的去除及代谢和细胞周期紊乱等多种途径都可以通过各自的信号传导途径启动细胞凋亡程序,诱导细胞发生凋亡,而所有这些过程都需要基因的转录、蛋白质的合成及其磷酸化。近年来随着无铅汽油的广泛应用,环境锰暴露增加的潜在危害作用日益引起人们的重视,随着分子生物学及细胞培养技术的发展,从基因、蛋白水平探讨锰的神经毒性机制与基因调控关系已成为当代研究的热点。

参考文献:

- [1] Bagonetti J, Manfredi J J. Multiple role of the tumor suppressor p53 [J]. *Curr Opin Oncol*, 2002, 14 (1): 86-91.
- [2] Vogelstein B, Kinzler K W. p53 function and dysfunction [J]. *Cell*, 1992, 70: 523-526.
- [3] Wang L P, Liang K, Shen Y, et al. Neutron-induced apoptosis of HR8348 cells in vitro [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7: 435-439.
- [4] Gui J, Yang D H, Qun H R. Mutation and clinical significance of c-fms oncogene in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 9: 392-395.
- [5] Roberts L R, LaRusso N F. Potential roles of tumor suppressor genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinogenesis in Southern African blacks [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 37-41.
- [6] Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, et al. Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene [J]. *Br J Cancer*, 1993, 68: 653-661.
- [7] Cao C. p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer [J]. *J Cancer Res*, 1999, 90: 180-187.
- [8] Marchenko N D. p53 dependent but fails to correlate with modulation of p53 expression [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 29586-29591.
- [9] Ding H F. Caspases: key players in programmed cell death [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 38905-38911.
- [10] Kenberg H, Mathay K, Schmitt B, et al. p53 mutation and mdm2 amplification are rare even in human papilloma virus-negative cervical carcinoma [J]. *Cancer*, 1995, 76 (1): 57-66.
- [11] Li J, Yang X K, Yu X X, et al. Overexpression of P²⁷KIP1 induced cell cycle arrest in G1 phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 513-521.

(下转第 132 页)

清楚。肺灌洗治疗不但可以清除滞留在呼吸道内的粉尘颗粒,还可以去除肺泡及肺间质内的吞尘巨噬细胞及致纤维化炎症性细胞因子,从而在本质上减少尘粒对巨噬细胞、淋巴细胞等的破坏作用,细胞免疫功能得到改善。本组数据分析表明,经过肺灌洗术后煤工尘肺患者外周血中 CD₃、CD₄ 水平及 CD₄/CD₈ 比值升高, CD₈ 水平降低,矽肺患者 CD₄ 水平及 CD₄/CD₈ 比值升高, CD₈ 水平降低,从而推测全肺灌洗术治疗从一定程度上可以增加尘肺病患者的细胞免疫功能,提高尘肺病患者抵抗疾病的能力,这与临床观察尘肺患者经过肺灌洗术后发生肺感染、肺结核等感染性疾病的机会大大降低相一致。

许多学者用检测血清免疫球蛋白及补体浓度的方法来反映人体的体液免疫功能。国外学者发现尘肺病患者血清中 IgG、IgM、IgA、IgE 呈现多克隆升高,抗核抗体、风湿因子、循环免疫复合物异常增加^[7-9]。国内学者亦发现煤工尘肺及矽肺患者的血清 IgG、IgM 及补体 C₃ 升高, IgA 升高或降低,不同期别尘肺患者 IgG、IgA 无明显差异,从而提示煤工尘肺及矽肺患者体液免疫功能亢进^[10-12]。尘肺患者体液免疫功能亢进,其原因可能与辅助性 T 淋巴细胞功能抑制有关, Th1 细胞功能受到抑制, Th2 细胞功能活跃,促进抗体生成增加。本研究表明,全肺灌洗术治疗后煤工尘肺患者 IgA、IgM 有降低趋势, IgG 明显降低,矽肺患者 IgA、IgG、IgM 有降低趋势, C₃ 明显升高,由此推测肺灌洗治疗对改善尘肺患者的体液免疫功能可能起着积极的作用。

参考文献:

(上接第 114 页)

[12] Riordan S M, Williams R. Transplantation of primary and reversibly immortalized human liver cells and other gene therapy in acute liver failure and decompensated chronic liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 636-642.

[13] Wang X J, Yuan S L, Li C P, et al. Infrequent p53 gene mutation and expression of the cardia adenocarcinomas from a high incidence area of Southwest China [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 750-753.

[14] Prives C. Signaling to p53: breaking the mdm2-p53 circuit [J]. *Cell*, 1998, 95 (1): 5-8.

[15] 孙艳花, 钟雪云, 陈运贤, 等. 星形细胞瘤中 mdm2、p53 的表达及调控机制探讨 [J]. *肿瘤防治研究*, 2004, 31 (8): 477-479.

[16] Wang X, Zalstein A, Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10 (4): 468-476.

[17] Chen J Y, Tsao G C, Zhao Q Q, et al. Differential cytotoxicity of Mn³⁺ and Mn²⁺: Special reference to mitochondrial [FeS] Containing enzymes [J]. *Toxicol Applied Pharmacol*, 2001, 175: 160-168.

[18] Halestrap A P, Doran E, Gillespie J P, et al. Mitochondria and cell death [J]. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28 (2): 170-177.

[19] Kruman I, Guo Q, Mattson M P. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells [J]. *Neurosci Res*, 1998, 51 (3): 293-308.

[20] Malecki E A. Manganese toxicity is associated with primary striatal neurons [J]. *Brain Res Bull*, 2001, 55 (2): 225-228.

[21] 王悦, 段春礼, 张海燕, 等. 锰对多巴胺能神经毒性的研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 2004, 17 (4): 57-61.

[1] 陈志远, 张志浩, 车审言, 等. 大容量全肺灌洗治疗尘肺十二年回顾 [J]. *中国疗养医学*, 2003, 12 (1): 28-32.

[2] 张映铭, 谈光新, 秦佩宁, 等. 全肺灌洗治疗矽(尘)肺远期疗效的初步探讨 [J]. *铁道劳动安全卫生与环保*, 1997, 24 (4): 241-243.

[3] 陈志远, 张志浩, 车审言, 等. 大容量全肺灌洗术医疗护理常规及操作规程 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2004: 4-9.

[4] 孙曙舫, 胡颖颖, 徐成伟. 矽肺病人外周血 T 淋巴细胞亚群变化 [J]. *中国工业医学杂志*, 2000, 13 (5): 303-304.

[5] 朱玉华, 田月秋, 祝国英. 矽肺患者血清可溶性白细胞介素-2 受体和 T 淋巴细胞亚群水平 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2004, 22 (1): 6.

[6] 高锦伍, 任熙, 滕曼, 等. 用 ANAE 和 McFAB 法研究矽肺患者的细胞免疫水平 [J]. *铁道劳动安全卫生与环保*, 1991, 2: 6-8.

[7] Nagoka T, Tahata M, Kobayashi K, et al. Studies on production of anti-collagen antibodies in silicosis [J]. *Environ Res*, 1993, 60: 12-29.

[8] Cojocaru M, Niculescu T, Spataru E, et al. Study of lung antibodies in patients with silicosis [J]. *Rom J Intern Med*, 1995, 33 (3-4): 243-247.

[9] Zhestkov A V. Immunological changes in dust-induced lung diseases [J]. *Gig Sanit*, 2000, 6: 30-33.

[10] 张麒, 邓雄良, 姜杰, 等. 煤工尘肺机体免疫水平分析 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1996, 14 (2): 96-97.

[11] 陈月香. 矽肺患者免疫球蛋白水平的观察 [J]. *海峡预防医学杂志*, 1998, 4 (4): 26.

[12] 齐鲜玲, 王海燕. 尘肺病人生化、免疫指标及微量元素的测定 [J]. *中华监督与健康杂志*, 2003, 2 (5): 73-74.

[22] Levine A J, Momand J, Finlay C A. The p53 tumor suppressor gene [J]. *Nature*, 1991, 351 (6326): 453-456.

[23] Rola Barhouni, Jennifer Fasko, LIU Xuhong, et al. Manganese potentiates lipopolysaccharide-induced expression of NOS₂ in C6 glioma cell through mitochondrial-dependent activation of nuclear factor kappa B [J]. *Molecular Brain Research*, 2004, 122: 167-179.

[24] Lander H M, Ogiste J S, Pearce S F, et al. Nitric oxide stimulated guanine nucleotide exchange on p21^{ras} [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 7017-7020.

[25] Wemer E, Werb Z. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases [J]. *J Cell Biol*, 2002, 158: 357-368.

[26] 张伟. 人类 caspase 家族蛋白酶与凋亡 [J]. *国外医学遗传学分册*, 1999, 22 (6): 290-293.

[27] Wang R G, Zhu X Z. Subtoxic concentration of manganese synergistically potentiates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Brain Res*, 2003, 961 (1): 131-140.

[28] Keane R W, Srinivasan A, Foster L M, et al. Activation of CPP32 during apoptosis of neurons and astrocytes [J]. *J Neurosci Res*, 1997, 48 (4): 168-171.

[29] Chun H S, Lee H, Son J H. Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells SN4741 [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 316 (1): 5-8.

[30] Neyrolles O, Eliane J P, Ferris S, et al. Antigenic characterization and cyto-localization of p35 the major mycoplasma penetrans antigen [J]. *Microbiol-ogy*, 1999, 145: 1343-1355.

[31] 曾季平, 王立祥, 胡晓燕, 等. p53 基因对 MnCl₂ 诱导 PC12 细胞凋亡的作用 [J]. *山东大学学报*, 2004, 42 (6): 625-638.