基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0025-04

慢性镉中毒致大鼠肌萎缩侧索硬化症样改变的研究

谢武桃,贺 进,李庆春,邹 聪,徐 晨
(重庆医科大学基础医学院电镜室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨小剂量慢性镉中毒法建立大鼠肌萎缩侧索硬化症动物模型的可行性。方法:成年大鼠饮水慢性染镉,每天饮用含镉去离子水(150 mg/L),记录每天饮水量,120 d 后取材。采用神经电生理、光镜、电镜技术测定大鼠坐骨神经传导速度、股二头肌形态学变化、脊髓前角运动神经元形态学变化;同时采用原子吸收石墨炉法、生物化学技术测定脊髓内镉含量以及脊髓组织细胞内铜锌超氧化物歧化酶 1 ($CuZn-SOD_1$)活性、丙二醛含量的变化。结果:染镉后 120 d,大鼠运动神经传导速度减慢但股二头肌纤维直径变化不明显;脊髓前角运动神经元胞体平均截面积有变小、神经元胞浆内粗面内质网排列紊乱并出现核糖体脱颗粒现象;染镉后脊髓内镉含量增加、脊髓组织匀浆内 $CuZn-SOD_1$ 酶活性降低,而丙二醛含量升高。结论:镉可以在成年大鼠脊髓内蓄积,导致前角运动神经元形态和功能损伤。提示慢性镉中毒法可用于建立大鼠肌萎缩侧索硬化症的动物模型。

【关键词】镉;脊髓;运动神经元;肌萎缩侧索硬化症
【中国图书分类法分类号】R992;R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-13

The study of amyotrophic lateral sclerosis like changes caused by chronic cadmium poisoning in rats

XIE Wu-tao, et al
(*Department of Electron Microscopy, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the feasibility of making animal model of amyotrophic lateral sclerosis using low dose chronic cadmium poisoning method in rats. *Methods*: Adult SD rats were treated with cadmium chloride (150mg/L) by drinking for 120 days. Motor nerve conduction velocity, the morphologieal changes of musculus biceps femoris and spinal motor neuron were studied with electrophysiolog-ical technique, light and electron microscopy. The content of cadmium in the spinal cord, the active change of $CuZn-SOD_1$ and MDA were measured with the atomic absorption and biochemistry techniques. *Results*: 120 days after the cadmium (Cd) treatment in rats, the motor nerve conduction velocity were slow down in the Cd group. However, no obvious change was found in the muscle fiber diameter between Cd and control group. The mean cross-sectional areas of spinal motorneurons were decreased and the degranulation of ribosomes were found in some motorneurons. The content of Cd in spinal cord increased significantly after Cd exposure. The enzymatic activity of $CuZn-SOD_1$ was weak and the content of MDA increased in Cd group. *Conclusion*: Chronic low dose Cd exposure can deposit in the spinal cord of adult rats. It may cause functional change in spinal motorneurons and motor nerve fibers, which can be the method to make the animal model of amyotrophic lateral sclerosis.

【Key words】Cadmium; Spinal cord; Motorneurons; Amyotrophic lateral sclerosis

肌萎缩侧索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是运动神经元疾病中主要累及脑干和脊髓的运动细胞和锥体束的一种常见类型[1]。ALS 的病因和发病机理尚不明确。病因可能与遗传因素、病毒感染、免疫反应、环境因素等有关。发病机理可能涉及铜/锌超氧化物歧化酶 SOD_1 基因突变、线粒体功能紊乱、氧自由基损伤、营养因子的缺失和异常、兴奋性氨基酸毒性作用、神经微丝蓄积以及钙细胞毒作用等方面。由于 ALS 的病因和发病机制尚不清楚,临床疗效不理想,因此建立能够反映 ALS 临床表现和病理特征的动物模型将有助于明确 ALS 的病因、发病机制、制定合理的防治措施。目前常用的几种动物模型不能满足研究需要。

镉是一种有毒重金属,为常见的环境污染物之一。镉可通过职业接触、饮食等方式进入人体,并在体内蓄积,造成神经、泌尿生殖、循环等多系统损害,其中,镉的神经毒性愈来愈受到人们的关注。流行病学及实验研究显示,镉可能与胎儿神经管缺损、帕金森病等神经系统疾病以及儿童智力发育障碍等疾病有关[2]。研究表明,镉可导致中枢神经系统(Cen-

作者介绍:谢武桃(1973-),男,硕士,
研究方向:运动神经元疾病。
通讯作者:徐 晨,男,教授,E-mail:xuchen.cqmu@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市高等学校优秀人才资助计划项目[渝教人(2009)2 号]。

tral nervous system,CNS)的脑形态、生化及中枢行为活动影响的改变[9],我们的前期研究也表明镉可以在成年大鼠脊髓内蓄积导致脊髓运动神经元损伤。由于镉损伤的作用机理与目前认为的 ALS 的发病机理有很多相似之处,本研究采用成年大鼠为实验对象,探讨小剂量慢性镉中毒对成年大鼠脊髓运动神经元的影响以及用此法建立大鼠 ALS 动物模型的可行性。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型制备

40 只健康成年 SD 大鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄各 20 只,体重 200~250 g,随机分为 2 组,即:对照组、慢性染镉组,每组 20 只(雌雄各 10 只)单笼喂养。对照组大鼠每天饮用去离子水,染镉组每天饮用含镉去离子水(150 mg/L),记录每天饮水量,120 d 后取材。

1.2 神经传导速度及肌电记录

取对照组、慢性染镉组大鼠各 10 只(雌雄各 5 只)行 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,沿坐骨神经切迹处游离出坐骨神经长约 1.0 cm,将刺激电极置于游离的坐骨神经近端处并给予刺激,将记录电极刺于大鼠右后肢股二头肌末端,静息状态下记录肌肉收缩动作电位的潜伏期;然后将刺激电极置于游离的坐骨神经远端处并给予相同强度刺激,而记录电极位置不变,静息状态下记录肌肉收缩动作电位的潜伏期;测出两个刺激点之间的距离,然后除以两个潜伏期之差,计算出这一节段运动神经传导速度,以 m/s 表示。运动神经传导速度(m/s)=刺激点间距离/潜伏期之差。

1.3 股二头肌 HE 染色及神经元细胞尼氏染色

以上对照组、慢性染镉组大鼠测定神经传导速度后,切取股二头肌新鲜组织,多聚甲醛固定后行冰冻切片,HE 染色、脱色透明后中性树胶封固、观察。后经左心室穿刺 4%多聚甲醛灌注固定,取腰 3~4 节段脊髓放入灌流液后固定过夜,切取脊髓左侧经 30%蔗糖溶液 4℃沉降,OCT 包埋组织行冰冻切片,70%乙醇脱脂,0.1%焦油紫染,95%乙醇分色,100%乙醇脱水、二甲苯透明,中性树脂封固。光镜下对大鼠脊髓尼氏染色切片及股二头肌 HE 染色切片恒定放大 200 倍,用 OlympusDP70 图像采集系统,对各组切片的前角运动神经元及肌纤维随机采图各 60 张,采用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统对尼氏染色切片各脊髓前角随机选取 80 个运动神经元胞体作截面积分析以及股二头肌肌纤维平均直径测量。

1.4 电镜样品制备

切取灌流固定后腰 3~4 节段右侧脊髓前角,4%戊二醛、1%锇酸固定后,丙酮和酒精逐级脱水,环氧树脂浸透、定向包埋,超薄切片,H-7500 透射电镜观察并拍照。

1.5 镉含量测定

以上对照组、慢性染镉组大鼠各 10 只脊髓制备完电镜样品后,取所剩脊髓在解剖镜下去除脊神经和脊膜,超纯水反复清洗,滤纸吸干并称重。每个样品加入 2.4ml 混合酸(分析纯,硝酸:高氯酸:硫酸=4:1:1),加热促使其消化完全,待酸尽量挥发后,稀硝酸定容 5ml。用原子吸收分光光度仪测定样品镉含量。

1.6 脊髓组织细胞中酶活性变化的测定

对照组、慢性染镉组大鼠各 10 只麻醉后取新鲜脊髓组织,制备成 1%组织匀浆,按照试剂盒(南京建成科技有限公司)说明的步骤测定脊髓组织细胞内铜锌超氧化物歧化酶 1($CuZn\text{-}SOD_1$)、丙二醛(MDA)含量的变化。

1.7 统计学方法

用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计学分析。所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用 Studend-t 检验进行分析,$P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组与染镉组饮水量记录

记录结果显示染镉组与对照组 120 d 总饮水量及每天平均饮水量之间无明显差异性($P>0.05$,见表 1)。

2.2 神经传导速度及肌电记录

电生理实验结果表明染镉组大鼠坐骨神经传导速度明显慢于对照组($P<0.05$,见表 2)。

2.3 股二头肌纤维平均直径

采用图像分析系统对股二头肌肌纤维平均直径分析表明,股二头肌肌纤维平均直径在慢性染镉组与对照组之间无明显差异性(见表 2)。

2.4 镉对神经元胞体面积的影响

采用图像分析系统对尼氏染色切片脊髓前角运动神经元胞体的测量结果表明,慢性染镉组神经元胞体面积比对照组减小($P<0.05$,见表 2)。

2.5 神经元超微结构变化

正常组脊髓前角运动神经元胞体呈圆形或卵圆形,轴突和树突粗大。核圆形或卵圆形,常染色质丰富,核仁明显。胞浆内含丰富的平行排列的粗面内质网,高尔基复合体发达,线粒体丰富。染镉组大鼠脊髓前角运动神经元胞浆内粗面内质网排列紊乱,并见脱颗粒现象,其它细胞器未见明显改变(见图 1、2)。

表 1 对照组与染镉组饮水量记录

组别	120 d 总饮水量(L)	每天平均饮水量(L)
对照组	36.15 ± 6.24	0.301 2 ± 0.076 2
染镉组	34.65 ± 4.95#	0.288 7 ± 0.058 3#

与对照组比较 #:$P>0.05$

表 2 对照组及染镉组各项检测指标结果

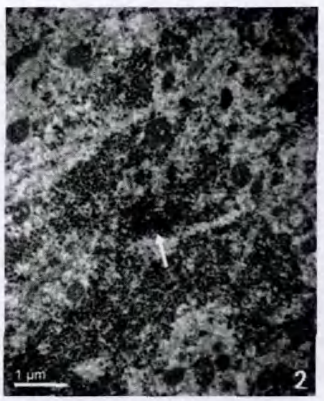
组别	坐骨神经传导速度(m/s)	股二头肌肌纤维平均直径(μm)	神经元胞体平均面积(μm²)	Cd 含量(ng/g)	CuZn-SOD$_1$ 酶含量(U/mgyprot)	MDA 含量(nmol/mgyprot)
对照组	54.54 ± 16.73	366.44 ± 46.98	338.54 ± 56.57	1.236 0 ± 0.115 4	244.27 ± 22.58	3.846 ± 1.304
染镉组	37.50 ± 14.15*	356.24 ± 42.43#	270.36 ± 52.24*	45.724 8 ± 2.667 1***	216.49 ± 21.77*	5.434 ± 1.386**

与对照组比较*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.0001$，#：$P>0.05$



染镉组大鼠脊髓前角运动神经元电子显微镜 × 7000 倍 bar=2 μm

图 1 低倍显示染镉组大鼠脊髓前角运动神经元，核大而圆、核仁明显(N)，常染色质丰富；胞浆内有丰富的粗面内质网(RER)



染镉组大鼠脊髓前角运动神经元电子显微镜 × 15000 倍 bar=1 μm

图 2 高倍显示染镉组大鼠脊髓前角运动神经元局部胞浆，示粗面内质网有核蛋白体脱颗粒现象(箭号)

2.6 脊髓内镉含量及 CuZn-SOD$_1$ 酶活性及 MDA 含量变化的测定

原子吸收法测定显示：染镉组脊髓内镉含量明显增加，与对照组比较有极显著性差异（$P<0.001$，见表 2）；生化测定显示染镉组大鼠脊髓组织匀浆内 CuZn-SOD$_1$ 活性与对照组相比明显降低（$P<0.05$，见表 2），而染镉组脊髓组织细胞内 MDA 含量与对照组比较明显增高（$P<0.05$，见表 2）。

3 讨 论

本研究结果表明，慢性小剂量染镉后可导致成年大鼠脊髓前角运动神经出现蛋白质合成障碍的相关形态和功能改变，同时提示该方法可以作为建立 ALS 疾病动物模型的方法。

镉损伤的作用机理与 ALS 疾病目前认为的发病机理有许多相似之处：①镉可以破坏谷胱甘肽和含巯基的蛋白，使活性氧基团升高，导致生物膜脂质过氧化作用、酶活性丧失以及 DNA 损伤。金属硫蛋白富含巯基，能与镉结合，降低镉的神经毒性[4]。镉破坏细胞的抗氧化机制，改变脑组织抗氧化酶类的活性。有学者认为，PKC 介导的细胞内信号途径能调节许多生理和病理过程，镉进入 CNS 后引起的氧自由基和氧化应激，可能是通过改变 PKC 活性调节其介导的信号转导途径，从而引起脑的病理性损伤。②镉与钙、锌的相互作用：一般认为，镉通过钙离子通道进入细胞；但也有学者认为，镉可能通过与锌相同的运输系统进入脑组织[5]。镉与细胞膜上的受体或蛋白结合后，可改变膜的功能和信号传递，或者镉进入细胞后与细胞内的微管蛋白、钙调蛋白等结合而产生毒性。研究表明，镉能增加细胞内游离钙水平，可能与某些神经递质释放增加和神经元坏死有关[6-8]。

大量的研究表明，镉与中枢性神经系统疾病有关。如职业工人慢性镉接触可引起嗅觉丧失；儿童的血清镉含量增高可导致记忆力受损；孕妇血清镉含量增高可导致胎儿神经管损害等。动物实验也证实，慢性染镉可致小鼠中脑黑质损伤[9]。但是文献报道多为镉对于脑形态、生化及中枢行为活动等的影响。幼年大鼠脑屏障发育不完善，染镉后脊髓内镉含量明显增加。然而，对于成年个体染镉后脊髓是否出现镉蓄积却报道很少。Volchegorskii 等对 40 例非中枢神经系统疾病或损伤死亡人体的脊髓研究中发现，随着年龄的增加，脊髓中镉含量明显增高，其中以腰骶膨大区的含量最高，提示镉能够进入成年个体脊髓并蓄积于腰骶段[10]。

有关镉是否能进入脊髓直接影响运动神经元的形态和功能，并进一步影响运动神经纤维传导速度和肌纤维形态改变，从而引发 ALS，则很少有报道。Vinceti M 等对 20 例患有运动神经元疾病的患者血浆进行了镉、铅、汞、铜、锌、硒等微量元素的检测。结果表明，患有运动神经元疾病的患者血浆内镉含量明显高于正常人，而其它几种微量元素没有明显差别[11]。最近，Huang YH 等采用蛋白质组学研究技术研究了镉对于 CuZn-SOD$_1$ 酶蛋白质结构和功能的影响。结果表明，镉可以改变神经元 CuZn-SOD$_1$ 酶蛋白的二级结构，降低 CuZn-SOD$_1$ 酶活性[12]。以上研究均提示，镉在 CNS 的慢性蓄

积可能是导致 ALS 的原因之一。

我们在前期研究中采用大鼠小剂量反复染镉注射,原子吸收光谱测定及免疫组化等技术,研究了大鼠脊髓镉含量以及雄激素受体在脊髓运动神经元的表达情况。结果表明,染镉后 7~30 d,雄性大鼠出现神经系统行为学改变,脊髓内镉含量随时间推移明显增高;脊髓运动神经元雄激素受体表达下降[13]。本实验采用成年大鼠慢性饮水染镉后 120 d,在脊髓内也能检测到镉含量明显增加,进一步证实了镉能通过血脑屏障到达脊髓,并在脊髓内蓄积。同时,从脊髓组织细胞内检测到丙二醛含量的增加,说明了镉进入机体后能引起组织细胞氧化损伤。而脊髓组织匀浆中 CuZn-SOD_1 酶活性的降低则提示镉可能与含锌酶竞争性结合,降低酶的活性,从而影响运动神经元的信息传递功能。

镉对脊髓运动神经元影响的形态学研究少有报道。本实验连续慢性染镉 120 d 后,尼氏染色下染镉组脊髓运动神经元胞浆尼氏体面积有缩小趋势。电镜下查见运动神经元胞浆内粗面内质网排列紊乱,并见脱颗粒现象,其它细胞器未见明显改变。提示运动神经元蛋白质合成过程受到干扰,可导致神经递质合成障碍。

本实验还从神经电生理方面研究了镉对运动神经的损伤作用。有研究表明,肌萎缩侧索硬化症时,运动神经传导速度将减慢。导致这种改变的主要原因是前角运动神经元的退行性变并累及粗纤维轴索,导致轴索运输功能障碍,电刺激不能诱发受累运动单元的肌纤维的收缩[14]。本实验对坐骨神经传导速度的测定结果表明,染镉组大鼠坐骨神经传导速度与对照组比较有减慢,说明了镉对运动神经传导功能有一定的损伤作用,从而导致肌纤维动作电位传导速度减慢。

虽然本实验从神经电生理方面证明了镉中毒对运动神经传导速度有一定影响,但是镉对运动神经元损伤后导致肌肉萎缩的形态学变化尚不明显。这可能与染镉的时间长短有一定关系。对于延长染镉时间是否会引起肌纤维形态学方面的变化,还需要进一步研究。

综上所述,慢性小剂量饮水染镉后,镉能在成年大鼠脊髓内蓄积,导致脊髓前角运动神经元及有髓神经纤维损伤,使组织细胞内 CuZn-SOD_1 酶的活性改变,进一步导致运动神经传导速度减慢。提示镉中毒可能导致大鼠 ALS 样改变,可作为建立动物模型的方法之一。

参 考 文 献

[1] 李焰生,黄 坚,庄建华. 运动神经元疾病[M]. 第 1 版. 上海:第二军医大学出版社,2002.126-154.

[2] 许 舸,徐 晨,镉对中枢神经系统影响的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册,2005,32(6):19-24.

[3] Mendez-Armenta M.Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone[J]. Toxicology,2001,161(3):189-199.

[4] Mendez-Armenta M.Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone[J]. Toxicol Lett,2003,144(2):151-157.

[5] King M L.Differential zinc transport into testis and brain of cadmium-sensitive and-resistant murine strains[J].J Androl,2000,21(5):656-663.

[6] Yoshida S. Re-evaluation of acute neurotoxic effects of Cd^{2+} on mesencephalic trigeminal neurons of the adult rat[J].Brain Res,2001,892(1):102-110.

[7] Antonic M T,Benito M J,Leret M L.Gestational administration of cadmium alters the neurotransmitter levels in newborn rat brains[J]. J Appl Toxicol,1998,18(2):83-88.

[8] Elsa Y,Gutiérez-Reyes,Arnulfo A,et al.Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein[J].Toxicol,1998,131(2-3):145-154.

[9] 戈 果,王景传,许庭良,等.VE 对慢性镉中毒小鼠黑质神经元的保护作用[J].中国地方病学杂志,2002,21(6):450-452.

[10] Volchegorskii I A. Age-related changes in cadmium content and oxidative modification of proteins in different regions of human spinal cord [J].Bull Exp Biol Med,2004,137(5):440-442.

[11] Vinceti M. Lead,cadmium,and selenium in the blood of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. Ital J Neurol Sci,1997,18:87-92.

[12] Huang Y H. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells[J]. J Cell Biochem,2006,98(3):577-89.

[13] 许 舸,徐 晨,镉对雄性大鼠脊髓下腰段运动神经元的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(5):569-574.

[14] 王春芝,丁卫江,徐丽君. 神经电生理检测对肌萎缩侧索硬化症患者的早期诊断价值[J]. 临床神经电生理学杂志,2004,13(3):137-139.

(责任编辑:冉明会)