

溶血卵磷脂对小鼠及鸡脑突触体内钙离子浓度的升高作用*

李晓华^{1,2} 龙鼎新^{1,2} 侯威远^{1,2} 李薇¹ 伍一军^{1**}

1. 中国科学院动物研究所分子毒理学实验室, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要 鸡是有机磷引起的迟发性神经病(OPIDN)的最常用的动物模型, OPIDN的发生被认为与神经病靶酯酶(NTE)的抑制有关。本研究比较了NTE的生理性底物溶血卵磷脂(LPC)对鸡和小鼠脑突触体内钙离子浓度的影响。LPC能够浓度依赖性地引起小鼠和鸡脑突触体内游离钙浓度升高,且在两种动物来源的突触体上的反应趋势和幅度基本相同。去掉突触体悬液中Ca²⁺后,同样在LPC的作用下,突触体内钙浓度不但没有升高反而明显下降,这在两种来源的突触体上的结果相同。L型钙通道阻断剂维帕米和非特异性钙通道阻断剂氯化镉均对LPC引起的小鼠和鸡脑突触体内钙升高都没有阻断作用。这些结果表明,LPC主要通过其对膜的破坏作用引起小鼠和鸡脑突触体内的游离钙浓度升高,且在小鼠和鸡脑突触体内钙离子浓度升高的幅度和机制方面没有种属差异。本研究的结果表明:鸡和小鼠在OPIDN中的症状差异并非由于LPC介导突触体内钙超载的强度不同所导致[动物学报 53(1):123-129, 2007]。

关键词 鸡 小鼠 突触体 溶血卵磷脂 膜溶解作用

Effect of lysophosphatidylcholine on free calcium level in synaptosomes from mouse and chicken brains*

LI Xiao-Hua^{1,2}, LONG Ding-Xin^{1,2}, HOU Wei-Yuan^{1,2}, LI Wei¹, WU Yi-Jun^{1,**}

1. Laboratory of Molecular Toxicology, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract In the present study, we examined and compared the effect of exogenous lysophosphatidylcholine (LPC), a physiological substrate of neuropathy target esterase in mouse, on intrasynaptosomal Ca²⁺ mobilization in prepared mouse and chicken brain synaptosomes. LPC dose-dependently caused an intrasynaptosomal Ca²⁺ increase with a similar amplitude in mouse and chicken synaptosomes in Ca²⁺-containing medium. Preincubation of the synaptosomes with verapamil, an L-type Ca²⁺ channel blocker or cadmium chloride (CdCl₂), a non-specific Ca²⁺ channel blocker of cell membranes did not affect LPC-induced Ca²⁺ increase. In Ca²⁺-free medium, LPC did not induce intrasynaptosomal Ca²⁺ increase but produce significant decrease. These results indicate that LPC can slightly increase the intrasynaptosomal Ca²⁺ levels by its detergent effect on membrane. No differences were observed in either the amplitude or the mechanism of LPC-induced calcium increase in mouse and chicken synaptosomes. Suggesting that the difference of delayed neurotoxic symptom between mouse and chicken may not be related to the diverse amplitude of intrasynaptosomal Ca²⁺ overload produced by LPC [Acta Zoologica Sinica 53(1):123-129, 2007].

Key words Chicken, Mouse, Synaptosome, Lysophosphatidylcholine (LPC), Membrane detergent action

2006-08-31 收稿, 2006-11-07 接受

* 国家自然科学基金项目(No.30470228)和国家863项目(No.2006AA06Z423)资助 [This research was funded by the grants from the NSFC Project (No.30470228) and the National 863 Program of China (No.2006AA06Z423)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wuyj@ioz.ac.cn

© 2007 动物学报 Acta Zoologica Sinica

有机磷化合物 (Organophosphorus compound, OP) 种类很多, 应用广泛, 由于大多数 OP 的毒性较大, 它们的持续广泛使用已经给生态环境和人类健康造成严重危害, 环保机构和环境毒理学家对此都非常关注。已知接触 OP 可使人及敏感动物产生两种主要的毒性反应: 一种是由于抑制乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 活性引起的急性中毒; 另一种则是迟发性中毒, 即因一次或多次重复接触某些 OP 引发的迟发性神经毒性, 现通称为有机磷酸酯诱发的迟发性神经病 (Organophosphate-induced delayed neuropathy, OPIDN), 其主要特征是在接触 OP 后 7-14 d 或更长时间出现感觉异常、肌肉疼痛、衰弱、无力、麻痹, 甚至瘫痪的症状 (Abou-Donia and Lapadula, 1990; Johnson, 1993)。虽然有关 OPIDN 的研究已有几十年的历史, 但其发病机制仍不明了。有假设认为, 神经病靶酯酶 (Neuropathy target esterase, NTE) 活性的抑制和随后发生的“老化”是 OPIDN 发生的起始步骤 (Johnson, 1969), 但 NTE 被抑制和老化后如何引起 OPIDN 的发生, 中间的很多环节尚不知晓。

最近 NTE 在小鼠体内被证明是一种溶血磷脂酶 (Lysophospholipase, PLA), 其生理底物被认为是溶血卵磷脂 (Lysophosphotidylcholine, LPC)。有实验显示, 给予神经毒性 OP 处理后, 动物脊髓内 LPC 含量明显升高 (Quistad et al., 2003; Quistad and Casida, 2004), 这一发现为我们研究 OPIDN 的发生机制展开了新角度。

LPC 是细胞膜磷脂代谢的重要中间产物, 在膜的磷脂平衡中起重要作用, 同时它也是重要的生物活性分子, 介导多种细胞内信号转导过程 (Wang et al., 1997)。由于有溶血作用, LPC 的生理浓度并不高, 但在很多病理状态下可见其含量升高。在神经组织, 过量 LPC 会导致神经元脱髓鞘和局部轴突变性 (Hall, 1972; Quinn et al., 1988; Jean et al., 2002), 这与 OPIDN 的病理变化很相似 (Cavanagh, 1954; Kostrzewa and Segura-Aguilar, 2003)。又由于 NTE 在小鼠体内是一种 NTE-LysoPLA, 我们推测 OPIDN 的发生可能是 NTE-LysoPLA 活性被 OP 抑制后, 其底物 LPC 含量升高, 进而通过一系列级联反应最终导致神经元脱髓鞘和轴突变性。

以往的研究表明, LPC 能引起多种细胞的细胞内钙离子浓度升高 (Okajima et al., 1998; Yu et al., 1998)。钙离子浓度升高会导致细胞骨架成分

的降解, 这已在一些神经性病变中得到证实 (Schlaepfer and Bunge, 1973; Schlaepfer and Hasler, 1979; Schlaepfer, 1987); 而给实验动物注射钙离子载体 (Ionomycin) 或钙离子本身都会引起神经元脱髓鞘和轴突的变性, 且与 LPC 引起的病理变化相似 (Smith and Hall, 1988; 1994)。在 OPIDN 发生过程中, 可见轴突内游离钙浓度的持续升高和中性蛋白酶 calpain 的活性增加, 而 calpain 则与轴突的细胞骨架成分降解有关 (Berlet, 1987)。另外, OPIDN 中往往也伴随着 Ca/CaM PK 催化的蛋白磷酸化水平的升高, 这可能会导致细胞骨架蛋白的累积与异常磷酸化增加 (El-Fawal et al., 1989, 1990; Wu and Leng, 1997; Choudhary and Gill, 2001)。综合这些实验结果, 我们推测 LPC 在 OPIDN 中的致病作用有可能与其介导细胞内钙超载有关。

OPIDN 有一定的种属易感性, 大多数动物如猴、牛、狗、猫、鸡等是敏感动物, 但经常用于人类疾病发生机理研究的动物模型小鼠却相对不敏感。在小鼠上 OP 诱导的迟发性毒性只出现一定的病理变化却没有典型的迟发性神经毒性症状 (Abou-Donia and Lapadula, 1990), 这种毒性变化在接触 OP 后的 3-4 d 内发生, 而典型的 OPIDN 症状则在 7-14 d 才出现 (Wu and Casida, 2001)。本实验选取对 OPIDN 敏感的成年母鸡和不敏感的成年小鼠为实验动物, 通过对比实验比较 LPC 对这两种动物脑突触体内钙浓度影响的异同, 分析 LPC 介导的钙超载在 OPIDN 中的作用, 探讨小鼠和鸡的 OPIDN 的症状表现不同的原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年昆明白雄性小鼠 (KM 品系), 购自北京大学医学部实验动物中心, 5-6 周龄, 体重 25 g 左右, 购回后每 3 只饲于一笼, 让动物自由摄食、饮水, 饲养室温度保持 25℃ 左右, 自然光照, 适应 3 d 后进行试验。成年白来航鸡, 来自北京农林科学院畜牧兽医研究所, 鸡龄 4 月龄, 取回后单笼饲养, 让其自由采食和饮水, 鸡舍温度控制在 25℃ 左右, 每天光照 12 h, 适应一周后进行试验。每个实验组至少三只动物。

1.2 试剂

Fura-2/AM、溶血卵磷脂 (LPC)、维尔帕米 (Verapamil)、牛血清白蛋白 (BSA)、氯化镉 (CdCl₂) 均为 Sigma 公司产品; 考马斯亮蓝 G-250

为瑞士 Fluka 公司 (Chemia Biochemika) 产品; 其他试剂均为国产分析纯。Fura-2/AM 用 DMSO 配制成 1 mmol/L 的储备液, 于 -20°C 避光保存备用, 维尔帕米、LPC、BSA 及考马斯亮兰均用去离子三蒸纯水配制。

1.3 突触体的制备

分别将试验鸡和小鼠断头和脱颈处死, 迅速取出大脑, 置于冰冷的 0.32 mol/L 蔗糖液 (含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 中, 小心剥离脑膜和血管, 称重, 加入 10 倍体积的 0.32 mol/L 蔗糖液, 玻璃匀浆器手动匀浆, 上下 20 次。匀浆液经 $100 \times \text{g}$, 离心 10 min, 匀浆液中线粒体、小片的髓鞘及自发形成的突触体留在上清液中。上清液再经 $12\,000 \times \text{g}$, 离心 20 min, 线粒体、髓鞘和突触体形成沉淀。将沉淀用 0.32 mol/L 蔗糖液重悬后, 小心铺在 0.8 mol/L 和 1.2 mol/L 蔗糖液形成的蔗糖密度梯度液表面经 $30\,000 \text{ r/min}$ ($100\,000 \times \text{g}$) 超速离心 1 h, 0.8 mol/L 与 1.2 mol/L 蔗糖之间为突触体, 底层沉淀为线粒体。收集 0.8 mol/L 与 1.2 mol/L 界面之间的液体, 悬浮在 0.32 mol/L 蔗糖液中, $15\,000 \times \text{g}$, 离心 20 min, 取沉淀用人工脑脊液 (ACSF, 其成分单位为 mmol/L) (小鼠: NaCl 132, KCl 3, MgSO_4 1, NaH_2PO_4 1.2, D-Glucose 10, CaCl_2 1, Hepes 10, pH 为 7.4, 渗透压为 $(290 \pm 2.0) \text{ mOsm}$; 鸡: NaCl 120, KCl 2.5, MgCl_2 1.2, NaH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 25, D-glucose 10, CaCl_2 1, Hepes 5, pH 为 7.4, 渗透压为 $300 \pm 2.0 \text{ mOsm}$) 悬浮, $5\,500 \times \text{g}$, 离心 10 min, 沉淀重悬在 ACSF 中。整个操作在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下进行, 突触体纯度要高于 85%, 置冰上保存备用, 在分离后 2-3 h 内测定。

1.4 蛋白质浓度测定

用 Bradford (1976) 蛋白质定量法测定所制备的突触体的蛋白浓度, 以牛血清白蛋白 (BSA) 作为定量标准, 用 UV-754 分光光度计 (上海第三分析仪器厂产品) 测定。

1.5 突触体内钙离子浓度测定

取上述突触体悬液, 用 ACSF 将其蛋白含量调为 1.6 mg/ml 左右, 加入适量的 Fura-2 /AM (终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$) 进行负载, 37°C , 孵育 35 min。然后用冰冷的 ACSF 清洗两遍 ($4\,500 \times \text{g}$, 5 min, 4°C), 得到的突触体沉淀用 ACSF 悬浮, 蛋白浓度调至约 0.15 mg/ml, 置冰上保存, 测定前常温下平衡 2 min。

Fura-2 的荧光强度测定用日立 F-4500 型荧光双

波长分光光度计进行。测定条件为: 激发光 340 nm 和 380 nm, 发射光 510 nm, 激发光光栅 5 nm, 发射光光栅 5 nm, 电压 700 V, 测定温度为 25°C 。取一定量负载 Fura-2/AM 的突触体悬液 ($500-800 \mu\text{l}$), 加入荧光杯中, 按以上参数执行双波长测定, 波长变换间隔为 0.7 s。测定一段时间 (根据实验具体要求确定) 后加入破膜剂 Triton X-100 (终浓度为 0.1%), 使 Fura-2 和 Ca^{2+} 结合达饱和, 测得最大荧光比值 R_{max} (F_{340}/F_{380}); 约 50 s 以后再加入高浓度的 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA (终浓度为 5 mmol/L, pH 8.5), 以充分螯合 Ca^{2+} , 使 Fura-2 游离, 测得最小荧光比值 R_{min} 。

根据 Grynkiewicz et al. (1985) 提出的经典公式计算突触体内游离钙离子浓度, Fura-2/AM 检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的计算公式为: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)] (F_{\text{min}}/F_{\text{max}})$, 其中, K_d 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数, 为 224 nmol/L; R 为各测定点 F_{340}/F_{380} 荧光强度比值; R_{max} 、 R_{min} 分别为上述测定的最大和最小荧光比值; F_{min} 、 F_{max} 分别代表 Ca^{2+} 为零及饱和时, 在 380 nm 激发光下测得的 Fura-2 荧光强度 (F_{380})。实际计算由日立 F-4500 钙测定系统钙定量软件自动求出。

1.6 LPC 钙应答效应比较

Fura-2 负载好的小鼠和鸡的突触体用 ACSF 调至相同的蛋白浓度 (0.15 mg/ml), 再测定 LPC 对突触体的钙应答效应。

1.7 数据处理

数据以平均数 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示。采用成对数据分析, 差异显著性检验采用 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度的 LPC 对小鼠和鸡脑突触体内钙离子浓度的影响

从图 1 可以看出, 随着 LPC 浓度升高, 小鼠和鸡脑突触体内游离钙离子浓度也随之升高, 呈现浓度依赖性关系。LPC 浓度在 $10 \mu\text{mol/L}$ 以下时对突触体内钙离子浓度的影响不明显 ($P > 0.05$, 小鼠: $n = 6$; 鸡: $n = 5$), 大于 $10 \mu\text{mol/L}$ 后开始引起突触体内钙离子浓度的轻微升高 ($P < 0.001$, 图 1C), 但 LPC 对两种动物来源的突触体的钙应答效应的趋势和幅度基本一致。

2.2 LPC 引起突触体内钙离子浓度升高的来源

随着突触体外钙离子浓度的降低, LPC 引起的

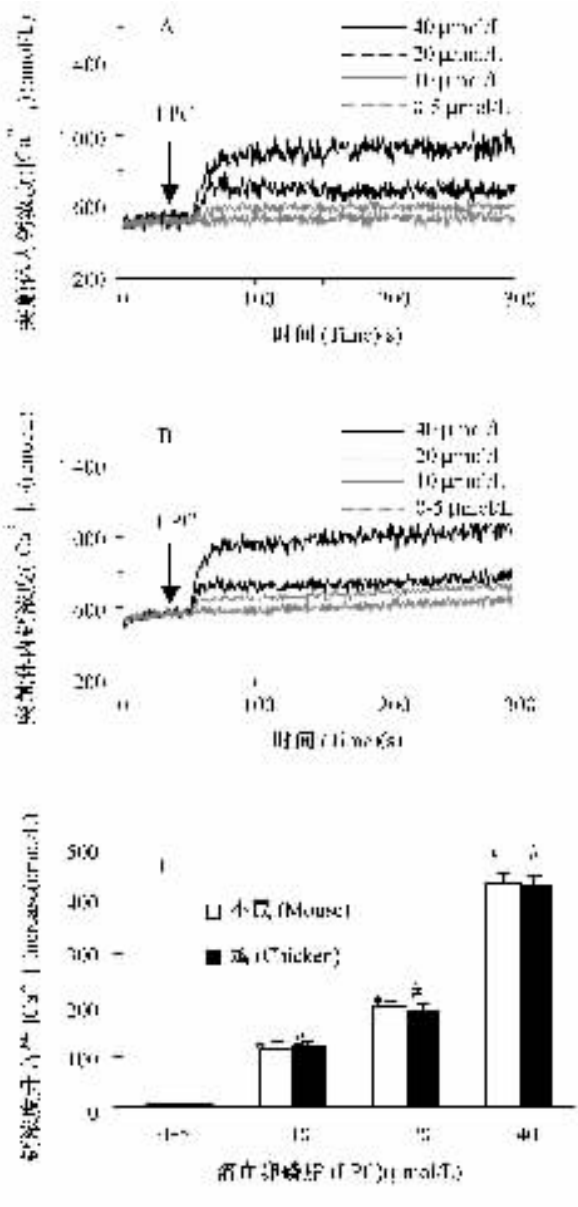


图1 小鼠和鸡脑突触体对不同浓度LPC的钙离子应答效应

Fura-2负载好的小鼠(A)和鸡(B)突触体悬浮于含钙的介质中,箭头所示为LPC加入的时间,LPC通过加样孔加入。不同浓度的LPC(作用2 min)引起小鼠(□)和鸡(■)脑突触体内钙浓度升高的平均值(C)。*和#分别表示LPC处理后小鼠和鸡脑突触体内钙浓度升高值与不加LPC相比差异极显著($P < 0.001$;小鼠: $n = 6$;鸡: $n = 5$)。

Fig.1 Ca^{2+} responses to different concentrations of LPC in mouse and chicken brain synaptosomes

Fura-2 loaded mouse (A) and chicken (B) brain synaptosomes were stimulated by the addition of LPC in Ca^{2+} -containing medium. Arrow indicates the time of LPC addition. Traces are representative of at least 4 experiments. C: Average $[Ca^{2+}]_i$ increase above basal level to different concentrations of LPC as indicated in mouse (□) and chicken (■) synaptosomes. Data are Means \pm SE from at least 4 separate experiments. * and # $P < 0.001$, compared with the corresponding values of $[Ca^{2+}]_i$ increase in the synaptosome of mouse and chicken, respectively, treated with 0 μ mol/L LPC.

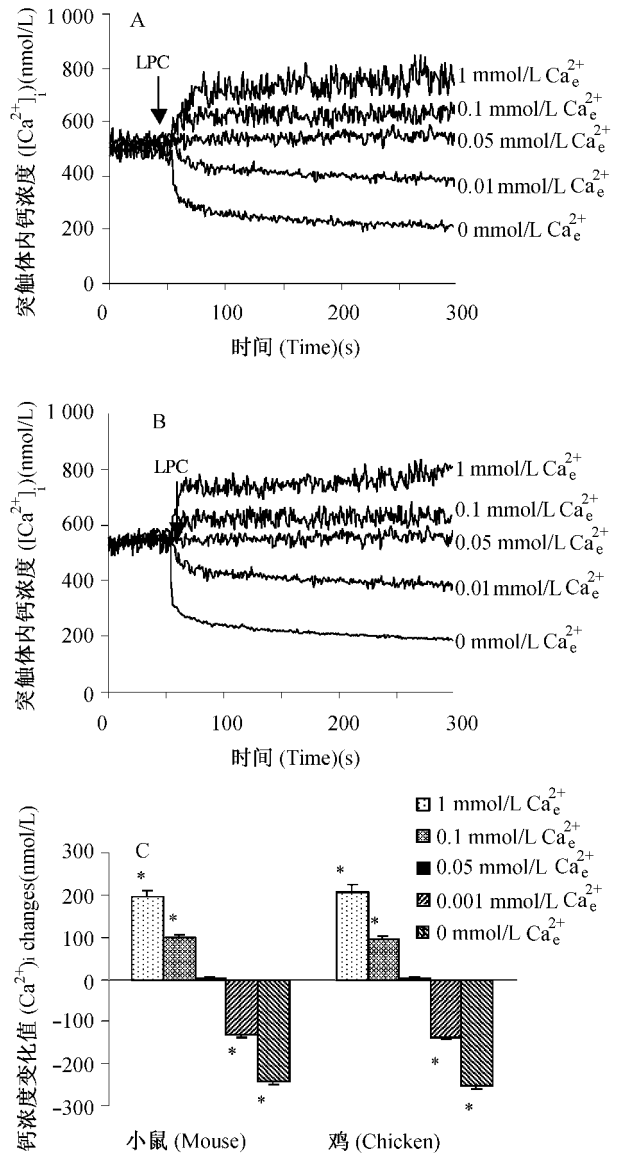


图2 突触体外液中钙离子在LPC引起突触体内钙离子浓度升高中的作用

小鼠(A)和鸡(B)突触体悬液中分别含有不同浓度的 Ca^{2+}_e (如图中所示)时,20 μ mol/L的LPC对突触体内钙浓度的应答曲线;C为突触体悬液中分别含不同浓度的 Ca^{2+}_e 时,LPC引起突触体内钙浓度升高的平均值。*与本组含1 mmol/L外钙的测定值相比, $P < 0.01$ (小鼠: $n = 5$;鸡: $n = 5$)。

Fig.2 Role of external Ca^{2+} in LPC-induced Ca^{2+} responses

Different $[Ca^{2+}]_i$ changes of mouse (A) or chicken (B) brain synaptosomes to 20 μ mol/L LPC in the presence of different concentrations (as indicated) of Ca^{2+}_e in the medium; C: average $[Ca^{2+}]_i$ changes above basal level in the presence of different concentrations (as indicated) of Ca^{2+}_e . Data are Means \pm SE from at least 5 separate experiments. * $P < 0.001$, compared respectively with the values of corresponding group in the presence of 1 mmol/L Ca^{2+}_e in the medium.

突触体内钙升高的幅度逐渐降低，在外钙浓度为 0.5 mmol/L 时，LPC 基本不能引起突触体内的钙浓度升高，而在外钙浓度为 0.01 mmol/L 时，在 LPC 的刺激下，突触体内钙浓度非但没有升高反而明显下降 ($P < 0.001$, 图 2C)，在外钙浓度为零时，这种下降更为明显，下降的幅度甚至大于含 1 mmol/L

外钙时引起的突触体内钙浓度升高的幅度，这在两种动物来源的突触体上所得到的结果完全一致 (图 2A、B)。

2.3 钙通道阻断剂对 LPC 引起的突触体内钙升高没有抑制作用

如图 3 所示，用 L-型电压依赖性钙通道的特异

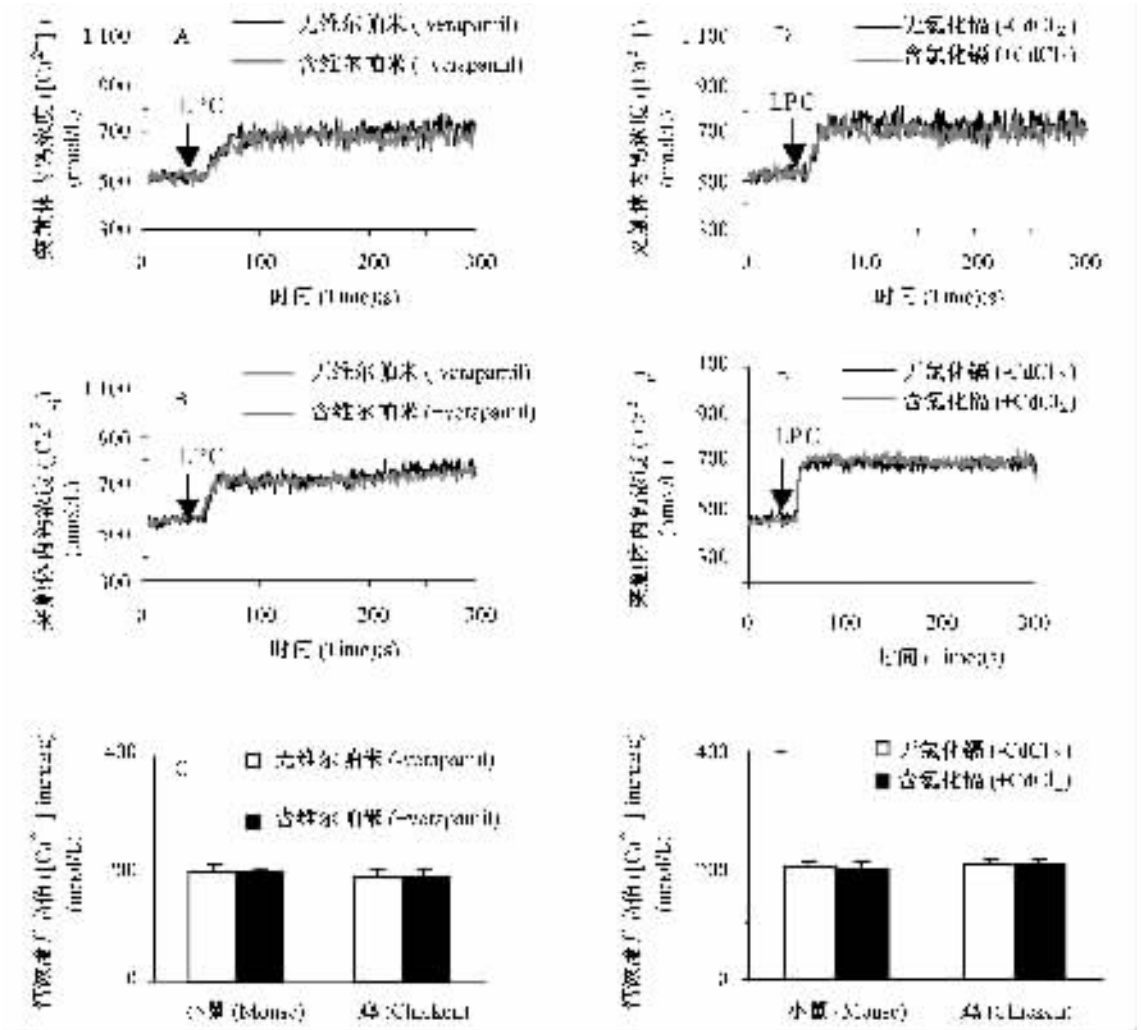


图 3 钙通道阻断剂对 LPC 引起的突触体内钙升高的影响

突触体悬液中分别含 (灰色) 或不含 (黑色) 维尔帕米 (50 $\mu\text{mol/L}$, 15 min) (左栏, A - C) 或氯化镉 (200 $\mu\text{mol/L}$, 5 min) (右栏, D - F) 时 LPC 对小鼠 (A、D) 和鸡 (B、E) 突触体内钙浓度的应答反应。C 和 F: 突触体分别不用 (\square) 和用 (\blacksquare) L 型钙通道特异性阻断剂维尔帕米处理 (C) 或细胞膜非特异性钙通道阻断剂氯化镉处理 (F) 后, LPC 引起突触体内钙浓度升高的平均值。与对照相比, 维尔帕米 (C) 或氯化镉 (F) 处理后突触体内钙升高没有明显变化 ($P > 0.05$; 小鼠: $n = 5$; 鸡: $n = 5$)。

Fig.3 Lack of effects of verapamil or cadmium chloride (CdCl_2) on LPC-induced Ca^{2+} increase

Fura-2 loaded mouse (A, D) or chicken (B, E) brain synaptosomes were pretreated with vehicle (black) or with 50 $\mu\text{mol/L}$ verapamil, an L-type Ca^{2+} channel blocker (grey) (left panel, A - C) or with 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , a non-selective Ca^{2+} channel blocker (grey) (right panel, D - F) for 15 min, then stimulated with 20 $\mu\text{mol/L}$ LPC in Ca^{2+} -containing medium. Traces are representative of at least 4 experiments. C and F: Average $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase above basal level in the absence (\square) or presence (\blacksquare) of verapamil (C) or CdCl_2 (F). Data are Means \pm SE from at least 4 separate experiments. No significant difference of the values of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase between the verapamil-or CdCl_2 -treated synaptosomes and the controls ($P > 0.05$).

性阻断剂维尔帕米处理 (50 $\mu\text{mol/L}$, 15 min) 后, LPC 引起的突触体内钙浓度升高幅度没有发生变化 ($P > 0.05$, 图 3A、B), 这在两种来源的突触体上的表现相同 (图 3C)。此外, 用细胞膜钙通道非特异性阻断剂氯化镉 (CdCl_2) 预处理突触体 (200 $\mu\text{mol/L}$, 5 min), 再用 LPC 刺激, 突触体内钙浓度升高幅度也未见明显变化 ($P > 0.05$, 图 3D、E), 而且, 两种来源的突触体对 CdCl_2 预处理后 LPC 刺激引起的钙浓度升高表现相同 (图 3F)。

3 讨论

突触体是突触前神经末梢断裂后神经质膜自动融合形成的封闭颗粒, 类似于一个活细胞, 保留着正常原位突触的一系列功能特性, 以它为材料的研究具有很好的参考价值。本实验以小鼠和鸡脑突触体为材料, 研究和比较了 LPC 对这两种动物脑突触体内钙浓度的影响。LPC 引起小鼠和鸡脑突触体内游离钙离子浓度的升高, 并呈浓度依赖性关系, 而且, 在小鼠和鸡上的反应趋势和幅度基本一样。由于突触体非常小, 普通光学显微镜下不能分辨, 故不能用简单的染色方法检查 LPC 对突触体膜的损伤情况, 只能根据其对于钙浓度的反应情况, 选择相对浓度较低又能引起相对较强反应的 20 $\mu\text{mol/L}$ 这一浓度研究其钙升高的机制。

随着细胞外液 Ca^{2+} 离子浓度的降低, LPC 引起的突触体内钙升高的幅度逐渐降低, 在外钙浓度为零时, LPC 不仅没有引起突触体内钙浓度的升高反而引起了很明显的下降, 下降的幅度甚至超过在含外钙时引起的细胞内钙浓度升高的水平, 在两种来源的突触体上的结果一样。这一现象提示, LPC 引起的突触体内钙浓度升高很可能是由于其对膜的损伤作用, 使突触体膜的通透性增加, 导致了钙离子的跨膜简单扩散, 在外液含钙时引起了突触体内钙浓度升高, 在外液不含钙时使突触体内钙浓度下降。用 L-VDC 的特异阻断剂维尔帕米预处理突触体并不能改变 LPC 引起突触体钙升高的作用, 说明 LPC 诱导的突触体内钙升高不是通过该通道流入的。细胞膜钙通道非特异性阻断剂 CdCl_2 对 LPC 引起的突触体内钙升高也没有阻断作用, 进一步确定了 LPC 引起的钙升高作用不是通过膜上的钙通道介导的, 很可能是通过通透性膜流入的。并且在两种动物来源的突触体上的实验得到相同的结果。上述数据表明: LPC 能引起突触体内游离钙浓度的微弱升高, 这种升高主要是由于 LPC 对膜的破坏

作用引起, 而且钙升高的幅度和机制在小鼠和鸡上基本没有差异。

LPC 不能诱导突触体内的钙信号转导过程, 这不是由于轴突末梢没有表达钙信号通路蛋白的结果, 而可能是由于突触体的特殊功能决定的。实际上, 在轴突末梢表达有大量的 VDC 和 RyR 以及 IP_3R 等 (Berridge et al., 2000), 突触体是突触前神经末梢质膜融合而成的结构, 在体内的主要作用是释放神经递质传导神经冲动。诱导其释放神经递质的因素是神经轴突传导而来的动作电位, 后者导致轴膜去极化引起突触间隙 Ca^{2+} 离子沿电压依赖性钙通道内流, 由 Ca^{2+} 触发神经递质的释放。轴突前末梢一般对来源于胞体的信号产生反应 (Berridge et al., 2000), 对细胞内其他的生物活性分子可能不敏感, 这也许是 LPC 不能诱发突触体的钙信号转导过程的原因。

成年母鸡是 OPIDN 研究的理想模型, 其对 OP 的敏感性及 OPIDN 的临床症状和发病过程与人非常相似, 而小鼠上诱导的“迟发性毒性”却只出现一定的病理变化, 难以见到典型的 OPIDN 症状。由于 OPIDN 发生过程中可见细胞内钙浓度升高, LPC 处理也导致这一现象出现, 而细胞内钙浓度升高会导致细胞骨架成分的降解; 在体外实验中, 钙离子载体或钙离子本身引起的神经元脱髓鞘和轴突变性, 与 LPC 引起的脱髓鞘反应非常相似。所以我们推测, OPIDN 的发生可能与 LPC 介导细胞内钙超载有关。我们试图用分别对 OPIDN 敏感和不敏感的成年鸡和小鼠作对照, 通过比较 LPC 介导的钙超载的强度和机制, 对这一假设做一验证。

然而, 我们的结果表明, LPC 介导小鼠和鸡脑突触体内钙离子浓度升高的作用及机制在这两种动物间没有差别。这一结果提示, 小鼠和鸡的 OPIDN 症状表现差异可能不是由于 LPC 介导突触体内钙超载的强度及机制不同所致, 同时也提示, 如果 LPC 在 OPIDN 的发生过程中发挥作用, 或许它不是通过影响突触内钙的途径, 而可能通过其他的生理生化过程来实现。另外, OPIDN 的起始生化病理改变也有可能发生在神经胞体, 其病理变化导致了轴突的病变。但由于成年动物的神经网络发达, 体外分离活性高的神经细胞比较困难, 而要进一步确定 LPC 对机体神经系统的作用, 或许分离培养原代神经细胞并将其作为实验模型开展研究才是更好的选择。

参考文献 (References)

- Abou-Donia MB, Lapadula DM, 1990. Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: type I and type II. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30 (1): 405 - 440.
- Berlet HH, 1987. Calcium-dependent neutral protease activity of myelin from bovine spinal cord: evidence for soluble cleavage products of myelin proteins. *Neurosci. Lett.* 73 (3): 266 - 270.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD, 2000. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (1): 11 - 21.
- Cavanagh JB, 1954. The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on the nervous system: an experimental study in hens. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 17: 163 - 172.
- Choudhary S, Gill KD, 2001. Protective effect of nimodipine on dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 62 (9): 1 265 - 1 272.
- El-Fawal HA, Correll L, Gay L, Ehrich M, 1990. Protease activity in brain, nerve, and muscle of hens given neuropathy-inducing organophosphates and a calcium channel blocker. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103 (1): 133 - 142.
- El-Fawal HA, Jortner BS, Ehrich M, 1989. Effect of verapamil on organophosphorus-induced delayed neuropathy in hens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 97 (3): 500 - 511.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY, 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 (6): 3 440 - 3 450.
- Hall SM, 1972. The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J. Cell Sci.* 10 (2): 535 - 546.
- Jean I, Allamargot C, Barthelaix-Pouplard A, Fressinaud C, 2002. Axonal lesions and PDGF-enhanced remyelination in the rat corpus callosum after lysolecithin demyelination. *Neuroreport* 13 (5): 627 - 631.
- Johnson MK, 1969. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochem. J.* 114 (4): 711 - 714.
- Johnson MK, 1993. Symposium introduction: retrospect and prospects for neuropathy target esterase (NTE) and the delayed polyneuropathy (OPIDP) induced by some organophosphorus esters. *Chem. Biol. Interact.* 87 (1 - 3): 339 - 346.
- Kostrzewa RM, Segura-Aguilar J, 2003. Novel mechanisms and approaches in the study of neurodegeneration and neuroprotection: a review. *Neurotox. Res.* 5 (6): 375 - 383.
- Okajima F, Sato K, Tomura H, Kuwabara A, Nochi H, Tamoto K, Kondo Y, Tokumitsu Y, Ui M, 1998. Stimulatory and inhibitory actions of lysophosphatidylcholine: depending on its fatty acid residue, on the phospholipase C/ Ca^{2+} system in HL-60 leukaemia cells. *Biochem. J.* 336 (Pt2): 491 - 500.
- Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D, 1988. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (8): 2 805 - 2 809.
- Quistad GB, Barlow C, Winrow CJ, Sparks SE, Casida JE, 2003. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (13): 7 983 - 7 987.
- Quistad GB, Casida JE, 2004. Lysophospholipase inhibition by organophosphorus toxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196 (3): 319 - 326.
- Schlaepfer WW, 1987. Neurofilaments: structure, metabolism and implication in disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46 (2): 117 - 129.
- Schlaepfer WW, Bunge RP, 1973. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J. Cell Biol.* 59: 456 - 470.
- Schlaepfer WW, Hasler MB, 1979. Characterization of the calcium-induced disruption of neurofilaments in rat peripheral nerve. *Brain Res.* 168 (2): 299 - 309.
- Smith KJ, Hall SM, 1988. Peripheral demyelination and remyelination initiated by the calcium-selective ionophore ionomycin: *in vivo* observations. *J. Neurol. Sci.* 83 (1): 37 - 53.
- Smith KJ, Hall SM, 1994. Central demyelination induced *in vivo* by the calcium ionophore ionomycin. *Brain* 117 (Pt6): 1 351 - 1 356.
- Wang A, Deems RA, Dennis EA, 1997. Cloning, expression, and catalytic mechanism of murine lysophospholipase I. *J. Biol. Chem.* 272 (19): 12 723 - 12 729.
- Wu SY, Casida JE, 1996. Subacute neurotoxicity induced in mice by potent organophosphorus neuropathy target esterase inhibitors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139 (1): 195 - 202.
- Wu YJ, Leng XF, 1997. Comparison of effects of verapamil and quercetin on delayed polyneuropathy induced by Tri-o-cresyl phosphate in hens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (4): 611 - 618.
- Yu L, Neticadan T, Xu YJ, Panagia V, Dhalla NS, 1998. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced increase in intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286 (1): 1 - 8.