

• 基础研究 •

二苯乙烯苷对谷氨酸致原代培养大鼠海马神经元损伤的保护作用

李雅莉 赵玲 徐艳玲 李林*

[摘要] 目的 观察二苯乙烯苷对谷氨酸(Glu)致原代培养大鼠海马神经元损伤的保护作用。方法 原代培养大鼠海马神经细胞与不同浓度的二苯乙烯苷(5—100 $\mu\text{mol/L}$)共同孵育 24 h,加入工具药 Glu(终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$)孵育。四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞存活率;乳酸脱氢酶(LDH)漏出率法测定细胞膜损伤;使用荧光指示剂 Fluor-3/AM 负载后,在激光共聚焦显微镜下观察不同细胞内 Ca^{2+} 的荧光强度。结果 不同浓度的二苯乙烯苷与细胞孵育 24 h 后可明显拮抗 Glu 介导的神经毒性作用,细胞存活率明显增加,LDH 漏出减少,细胞死亡率降低,并呈明显剂量依赖关系;细胞内的 Ca^{2+} 荧光强度降低。结论 二苯乙烯苷拮抗 Glu 诱导的神经毒作用的机制可能为选择性抑制大剂量 Glu 引起的 Ca^{2+} 浓度异常升高。

[关键词] 二苯乙烯苷;谷氨酸(Glu);海马神经元;激光共聚焦显微镜

Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside on hippocampal neurons damage induced by glutamate in rats LI Ya-li, ZHAO Ling, XU Yan-ling, et al. Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

[Abstract] **Objective** To observe the protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside (TSG) on rats' hippocampal neuronal damage induced by glutamate (Glu) in the culture. **Methods** Hippocampus was isolated from newborn SD rats and dispersedly cultured in the medium for 9 days. Neurons were incubated with TSG (5—100 $\mu\text{mol/L}$) for 24h, the cells were washed twice with Lock's solution without Mg^{2+} , then Glu 500 $\mu\text{mol/L}$ was added. Thirty min later, the reaction was terminated by washing the monolayer cells twice with the Lock's solution and then cultures were kept at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Cell viability was measured by MTT method and cell membrane damage was determined by LDH leakage; with Fluor-3/AM as an intracellular calcium indicator and added into the bathing medium, fluorescent intensity of intracellular free calcium were observed through laser scanning confocal microscopy (LSCM). **Results** After the treatment with 5—100 $\mu\text{mol/L}$ TSG for 24 h, the decrease of cell viability and the increase of LDH leakage caused by Glu was obviously resisted dose-dependently. TSG inhibited increase of Ca^{2+} in cytoplasm, compared with model group. **Conclusion** TSG can significantly promote the cell viability and reduce the cell membrane damage in Glu treating hippocampal neurons. The neuroprotective activities of TSG is mediated by inhibiting Ca^{2+} overload in cytoplasm.

[Key words] tetrahydroxystilbene glucoside; glutamate (Glu); hippocampal neuron; laser scanning confocal microscopy

中图分类号:R965 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2004)12-0751-03

[本文著录格式] 李雅莉,赵玲,徐艳玲,等.二苯乙烯苷对谷氨酸致原代培养大鼠海马神经元损伤的保护作用[J].中国康复理论与实践,2004,10(12):751—753.

谷氨酸(glutamate, Glu)是人和哺乳动物脑内含量最高的兴奋性氨基酸,参与中枢神经系统的信息传递,但其过度释放可产生严重的神经兴奋毒性,引起神经元损伤或死亡。中药何首乌具有抗衰老、调节机体免疫、降低血脂、防治动脉硬化、促进肾上腺皮质功能及保肝作用。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, TSG)是蓼科蓼属植物何首乌

的主要成分之一,是一种多羟基酚类化合物。我室曾报道 TSG 在叠氮钠和 H_2O_2 所致 SK-N-SH 神经细胞损伤模型中具有较好的抗氧化保护作用^[1]。本研究利用原代培养的海马神经元,观察 TSG 对 Glu 所致神经细胞损伤的保护作用,旨在从细胞水平探讨 TSG 对脑组织损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新生 SD 大鼠由首都医科大学实验动物中心提供,许可证号:京动许(1999)市管会第 013 号。

1.2 试剂与仪器 主要试剂:TSG(本室自制,从何首乌中提取分离,纯度为 72%);尼莫同(nimodipine,德国拜耳公司生产,进口药品注册证号:BH20020394);Fluor-3/AM 购自北京岳泰公司;多聚赖氨酸、胰蛋白酶、阿糖胞苷、转铁蛋白、胰岛素、皮质酮、黄体酮、亚硒酸钠、腐胺、三碘甲腺原氨酸、乳酸钠、黄递酶、Oxam-

基金项目:1.首都二四八重大创新工程项目(No. H01021013011);
2.北京市自然科学基金(No. 7032013);3.国家重点基础研究发展规划(973)项目(No. G2000057010);4.北京市中医药重点学科项目(No. 2001)。

作者单位:1. 100053 北京市,首都医科大学宣武医院药理研究室;
2. 100053 北京市,北京老年病医疗研究中心。作者简介:李雅莉(1970-),女,回族,北京市人,技师,主要研究方向:神经药理,*通讯作者:李林,药理学研究员。

ate JNT、NAD⁺ 均为 Sigma 公司产品;血清及 DMEM 培养基均为 Gibco 公司产品。96 孔培养板及 35 mm 培养皿为美国 Corning 公司产品。主要仪器:激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM, Bio Rad MRC1024, 美国)、倒置显微镜(Nikon eclipse TE300, 日本)、全自动酶标仪(巴斯德 LP400, 法国)、CO₂ 培养箱(美国 SHELL/ JB, Tc2323 型)。

1.3 神经元细胞培养^[2] 取出生 1 d 的 SD 幼鼠, 无菌条件下分离海马, 置于解剖液中, 剔除血管和脑膜, 剪成 1 × 1 × 1 mm 的小块, 用 0.25 % 的胰蛋白酶 37 °C 消化 20 min, 用接种液(10 % 胎牛血清, 10 % 马血清、80 % DMEM) 终止酶的消化, 用吸管反复吹打, 经 200 目尼龙网过滤, 使细胞充分分散成单个, 台盼蓝染色计数, 在活细胞 > 95 % 的条件下调整细胞密度, 将悬液接种于 96 孔板及 35 mm 培养皿中, 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后换成无血清培养基继续培养。5 d 加入 10 μM 的阿糖胞苷以抑制胶质细胞的生长。以后每周换液 2 次。

1.4 分组 培养 7—9 d 的海马神经元随机分成: ①正常组: 吸除原有的培养基, 单纯更换无酚红 DMEM 培养基; ②Glu 损伤组: 吸除原有的培养基, 用 PBS 洗 2 次, 细胞与不含 Mg²⁺ 的 Lock 氏液^[3] 孵育 30 min, 该液成分为 NaCl 154 mmol/L, KCl 5.6 mmol/L, CaCl₂ 2.3 mmol/L, NaHCO₃ 3.6 mmol/L, N-2-羟乙基哌嗪 N'-2-乙磺酸(HEPES) 5.0 mmol/L, PH 7.4; 加入 500 μmol/L Glu 孵育 30 min, 之后用 Lock 氏液洗 2 次, 细胞于 CO₂ 培养箱内孵育 24 h; ③给药组: 细胞培养液中加入 TSG, 剂量分别为 5、10、25、50、100 μmol/L; 与细胞孵育 24 h 后吸除原有培养基, 加入含 500 μmol/L 的 Glu 处理; ④阳性对照药组: 处理与给药组相同, 尼莫同剂量为 10 μmol/L。

1.5 细胞存活率测定 采用四甲基偶氮唑盐法(methyl thiazole tetrazolium, MTT), 参见 Li 的方法^[4]。各实验组处理后, 弃去培养基, PBS 洗 1 次, 加入 MTT 100 μl/孔(终浓度为 0.4 g/L)。37 °C, 5 % CO₂ 培养箱内孵育 4—6 h, 加入 10 % SDS-50 % 异丙醇 100 μl/孔助溶。37 °C 过夜后于全自动酶标仪 550 nm 波长处测定 OD 值。只有活细胞能将 MTT 摄入胞内, 经线立体琥珀酸脱氢酶催化形成兰色的甲臢颗粒, 且形成量与活细胞数和功能状态呈正相关。

1.6 酶学方法 参见 Li 的方法^[4]。在酶标板内加入 40 μl/孔的乳酸盐及 INT 混合液, 之后加入 70 μl/孔的培养上清液, 再加入黄递酶混合液(NAD⁺ 3 mg/ml、BSA 0.3 mg/ml、蔗糖 12 mg/ml、黄递酶 1 U/ml) 20 μl/孔, 空白对照加入 20 μl PBS 避光反应 30 min; 加入 oxamate 20 μl/孔终止反应, 采用全自动酶标仪读取

492 nm 处的光密度值, 结果为细胞外的 LDH 含量。将培养板内培养液全部弃去, 加入 0.1 % triton X100 溶液 70 μl/孔, 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱内孵育 30 min 打破细胞膜。重复上述实验步骤, 结果为细胞内的 LDH 含量。

1.7 神经元细胞内 Ca²⁺ 测定^[5,6] 在 35 mm 培养皿中培养 8 d 的神经元随机分组给药后孵育 24 h, 弃去上清, 用无血清的培养液洗 2 次, 再加入 800 μl 的无血清培养基及 3 μl(1 μg/μl) 荧光探针 Fluor 3/AM 于 CO₂ 培养箱内负载 1 h, 之后用无血清培养液洗 2 次, 再加入 1 ml 的无血清 DMEM 培养基。每皿随机选取 20 个神经元细胞以 488 nm 氩离子激光激发, 于 515 nm 测荧光发射。倒置显微镜 20 × 物镜动态观察单个细胞胞浆内 Ca²⁺ 的浓度变化。在 timecourse 程序下开始预扫描, 调节扫描参数, 以取得最大电信号, 最小光漂白度和最好信噪比。参数确定后动态扫描, 采集数据的间隔时间为 2 s, 60 s 后加入 500 μM 的 Glu 继续观察采集图像, 持续观察时间为 5 min, 高速微机逐幅观察储存动态荧光图像, 并绘制胞内 Ca²⁺ 荧光强度变化曲线。图像存为 512 × 512 像素类型, 扫描激光值选择 3 %, Factor 为 1, Kalman 滤波, Iris = 2.0, Gain = 1000, Blev = -2。物镜为 Plan-fluor 20 ×, 数值孔径 0.45。

1.8 统计学处理 实验数据均以($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 新生大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长分化 新生大鼠海马神经元细胞接种后 6—12 h, 大部分细胞可贴壁, 呈圆形, 其中少数细胞开始伸出 1—2 个突起。培养 24 h 后, 伸出突起的神经元细胞逐渐增多。培养 3 d 后, 神经元细胞突起进一步增多并延长, 形成稀疏的网络状。培养的海马神经元细胞以锥体细胞多见, 胞体丰满, 折光性极好, 立体感强。随培养时间的延长, 神经元胞体逐渐增大, 突起明显增粗并延长, 形成稠密的网络。

2.2 TSG 对 Glu 介导神经毒性的保护作用 将培养的海马神经元细胞暴露于 Glu 后, 相差显微镜下可见细胞的折光性下降, 颗粒增多; 生化检测发现培养液中的 LDH 漏出率明显增加, 表明在该浓度下, Glu 对培养的神经元细胞造成了较强的神经毒性。不同浓度 TSG 干预后表现出较强的对神经元细胞的保护作用, 细胞内 LDH 的漏出受到明显抑制, 细胞存活率明显升高(见表 1)。

2.3 TSG 对 Glu 刺激后神经细胞内 Ca²⁺ 的影响 Glu 刺激后, 神经元细胞内的 Ca²⁺ 浓度急剧升高, 而 TSG 各剂量组及阳性对照药组的细胞内 Ca²⁺ 浓度明显低于模型组(见表 2), 表明 TSG 可抑制 Glu 所致的钙超

载。

表 1 TSG 对 Glu 致原代培养大鼠海马神经元损伤的保护作用 (n=7)

分组	TSG 剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	LDH 漏出率 (%)	MTT 光密度值 (OD)
正常对照组		7.03 \pm 1.64 ^a	0.541 \pm 0.054
Glu 组		57.06 \pm 12.05	0.307 \pm 0.011
Glu + TSG 组	5	48.90 \pm 7.45	0.316 \pm 0.055
TSG 组	10	46.17 \pm 10.16	0.316 \pm 0.023
TSG 组	25	39.75 \pm 14.67 ^a	0.336 \pm 0.080
TSG 组	50	30.90 \pm 6.84 ^a	0.357 \pm 0.030 ^a
TSG 组	100	28.23 \pm 5.20 ^a	0.433 \pm 0.030 ^a
尼莫同组	10	24.61 \pm 6.17 ^a	0.436 \pm 0.015 ^a

注:a:与 Glu 组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 TSG 对 Glu 刺激后神经细胞内 Ca^{2+} 的影响

分组	TSG 剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	n	Ca^{2+} 浓度增加 (%)
Glu 组		4	2.12 \pm 0.48
Glu + TSG 组	25	4	1.72 \pm 0.44 ^a
TSG 组	50	4	1.15 \pm 0.31 ^a
TSG 组	100	4	0.93 \pm 0.19 ^a
尼莫同组	10	4	0.89 \pm 0.35 ^a

注:a:与 Glu 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

研究显示, Glu 的神经毒性作用主要是由于过多的 Ca^{2+} 内流,引起神经细胞内钙超载所致,许多中枢神经系统疾病如老年性痴呆、血管性痴呆等均存在 Glu 含量过高现象^[7]。

细胞内 Ca^{2+} 是重要的第二信使,在受体后过程中起中介作用。神经系统的钙信使体系使神经细胞出现迅速而短暂的反应,若神经细胞受损,不能维持 Ca^{2+} 稳态平衡,将导致细胞死亡^[8]。体外实验也发现,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,可导致类似于神经纤维缠结的病理变化。LSCM 可实现对单个细胞的实时监测。Fluo-3/AM 是 Ca^{2+} 荧光指示剂,进入细胞内与 Ca^{2+} 结合,产生绿色荧光。LSCM 记录的荧光强度可反映细胞内游离 Ca^{2+} 的水平。

神经细胞膜上的 Ca^{2+} 通道主要为电压依赖性钙通道和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体耦合的钙通道。Glu 可与 NMDA 受体结合,造成与 NMDA 受体耦合的钙通道持续开放,引起细胞外 Ca^{2+} 大量内流,胞浆内 Ca^{2+} 浓度上升;同时, Glu 还可与细胞膜上的 Glu 受体结合,激活鸟苷酸环化酶,促进 1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)生成,IP3 可与细胞内钙库上的 IP3 受体结合,使钙库释放 Ca^{2+} 入胞浆,同样可造成胞浆内 Ca^{2+} 浓度上升,使细胞内钙超载,

导致细胞损伤^[9,10]。因此, TSG 抑制 Glu 诱导胞浆内 Ca^{2+} 浓度上升的作用环节可能有 3 个:①阻断 Glu 与 NMDA 受体结合,阻止与 NMDA 受体耦合的钙通道开放;②阻断 Glu 与其受体结合,抑制 IP3 的生成;③阻断 IP3 与钙库上的受体结合,阻止钙的释放。TSG 究竟在哪个环节起作用将是我们进一步研究的方向。

综上所述,本实验结果表明, Glu 可使海马神经元细胞的 MTT 代谢率降低, LDH 漏出率增加,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,说明 Glu 对神经细胞存在毒性作用。而 TSG 可使上述指标有所恢复,表明 TSG 对 Glu 引起的神经毒性作用有抑制效应。因此, TSG 对胞浆内钙超载及氧化应激诱导的神经系统疾病可能具有较好的应用前景。

[参考文献]

[1] 张兰,李林,李雅莉.何首乌有效成分二苯乙烯甙对神经细胞保护作用的机制[J].中国临床康复,2004,8(1):118—120.

[2] 丁爱石,王福庄.新生大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长特性[J].细胞生物学杂志,1993,15(2):88—91.

[3] Xiao XQ, Liu GQ. L-pyrogutamic acid protects rat cortical neurons against sodium glutamate-induced injury[J].中国药理学报,1999,20:733—736.

[4] Li L, Lau BH. A simplified in vitro model of oxidant injury using vascular endothelial cells[J].In Vitro Cell Dev Biol,1993,29A(7):531—536.

[5] Trollinge DR, Cascio WE, Lemasters JJ. Mitochondrial calcium transients in adult rabbit cardiac myocytes: inhibition by ruthenium red and artifacts caused by lysosomal loading of Ca^{2+} -indicating fluorophores[J].Biophys J,2000,79:39—50.

[6] Zhang T, Cao EH, Li JF. A laser scanning confocal microscopy method. Simultaneous detection of intracellular Ca^{2+} and apoptosis using Fluo-3 and Hoechst 33342[J].Anal Quant Cytol Histol,2000,22:93—97.

[7] Siesjo BK. Calcium, excitotoxins and neuronal calcium homeostasis in the aging nervous system[J].Life Sci,1989,568:234—251.

[8] Ouanounou A, Zhang L, Charlton MP, et al. Differential modulation of synaptic transmission by calcium chelators in young and aged hippocampal neurons: evidence for altered calcium homeostasis in aging[J].J Neurosci,1999,19:906—911.

[9] Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function[J].Science,1987,235:46—62.

[10] Mattson MP. Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons[J].Mol Chem Neuropathol,1997,15:117—142.

(收稿日期:2004-06-09)