

吡咯喹啉醌对 NMDA 诱发大鼠海马神经元损伤的影响

熊顺华 冯桂香 李链 王星文

[摘要] 目的 探讨吡咯喹啉醌(PQQ)对 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)诱发海马神经元损伤的影响。方法 体外原代培养新生大鼠海马神经元,毒性剂量的 NMDA 诱致海马神经元损伤,预加 PQQ,镜下观察神经元的形态变化,琼脂糖凝胶电泳观察细胞的死亡情况,激光共聚焦显微镜观察细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。结果 体外培养 8 d 的海马神经用 0.1 mmol/L NMDA 处理后,细胞内 Ca^{2+} 快速增加,细胞以坏死和凋亡两种形式死亡,细胞的存活率降低;预先给予 PQQ 可明显减少细胞内 Ca^{2+} 的增加,减少细胞死亡。结论 PQQ 对 NMDA 诱发的海马神经元损伤具有保护作用。

[关键词] 吡咯喹啉醌(PQQ);海马神经元;N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA);大鼠

Protective effect of pyrroloquinoline quinone on damage of hippocampal neurons induced by NMDA in rats XIONG Shun-hua, FENG Gui xiang, LI Lian, et al. Department of Physiology, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei, China

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on damage of hippocampal neurons induced by NMDA. Methods Hippocampal neurons were cultured in vitro and NMDA was used to induce neurotoxicity 8 d after, while PQQ were used or not before. The metamorphosis of hippocampal neurons was observed under the microscope. Intracellular calcium levels was measured by confocal laser microscopy. Results The intracellular Ca^{2+} level increased rapidly after exposure to 0.1 mmol/L NMDA and resulted in neuronal necrosis and apoptosis. Otherwise, pretreatment of the cultured neurons with PQQ reduced the increase of the intracellular Ca^{2+} level and the neuronal necrosis or apoptosis induced by NMDA. Conclusion PQQ can protect hippocampal neurons from damage induced by NMDA.

[Key words] pyrroloquinoline quinone (PQQ); hippocampal neurons; N-methyl-D-aspartate (NMDA); rat

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)07-0509-03

[本文著录格式] 熊顺华,冯桂香,李链,等.吡咯喹啉醌对 NMDA 诱发大鼠海马神经元损伤的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(7):509-511.

吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)是一种氧化还原酶辅基,作为电子的供体和受体参与氧化还原过程。以 PQQ 及其家族成员为辅基的酶蛋白称为醌蛋白,目前已发现二十多种,人体组织和体液中也存在微量 PQQ^[1-2]。PQQ 具有一些重要的生物活性:如清除自由基^[3],通过氧化 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体,逆转还原剂二巯苏糖醇引起的受体离子通道开放频率的增加^[4]。谷氨酸是哺乳动物脑内、中枢神经系统兴奋性突触传递的主要递质。过量的谷氨酸对神经元有毒性作用,与 NMDA 受体介导的钙离子大量内流有关。本文在新生培养大鼠海马神经元上,以毒性剂量的 NMDA 诱至海马神经元损伤,观察 PQQ 对 NMDA 受体介导的海马神经元损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 PQQ 和 NMDA:Sigma,以 Hanks 溶解;培养液成份:85% DME M/F12:Gibco;5%小牛血清:Gibco;10%胎牛血清:杭州四季清;6 g/L 葡萄糖。出生 1 d 内的 Wistar 大鼠:鄖阳医学院动物中心。DNA 的流式检测试剂盒:COULER DNA-Prep Reagents Kit(试剂一:DNA-Prep T M LPR;试剂二:DNA-Prep T M Stain)。丙二醛(MDA)和活性氧测试盒:南

京建成生物工程技术有限公司。

1.2 海马神经元的分离与培养 新生的 Wistar 大鼠断头后取出两侧海马组织,剪碎,置于 0.125%的胰蛋白酶中消化,分散成单个细胞悬液,离心去上清,加培养液吹打,以 5×10^5 /ml 接种于涂有多聚赖氨酸的培养板和培养瓶中,37℃,5% CO_2 培养箱中培养,每 3 天换培养液 1 次,每次更换一半培养液;于第 4 天加入阿糖胞苷 3 mg/L 以抑制非神经细胞的过度生长,48 h 后全部更换新鲜培养液。培养后 6~7 d,神经元之间突起联成网状,即用以实验。

1.3 实验分组 取培养 8 d 的神经元随机分为:①对照组:培养液 + Hanks;②NMDA 组:培养液 + 不同浓度(0.1、0.01、0.001、0.0001) mmol/L 的 NMDA;③PQQ + NMDA 组:于培养液中先加入不同浓度(0.1、0.01、0.001、0.0001) mmol/L 的 PQQ,30 min 后再加入 0.1 mmol/L 的 NMDA;④单纯 PQQ 组:培养液 + 0.1 mmol/L PQQ。

1.4 形态学检测 细胞分组后再培养 24 h,吸去培养液,用姬姆萨染液染色 5 min,洗去染液,二甲苯透明,显微镜下观察并拍照。

1.5 细胞存活率测定 细胞分组后再培养 24 h,吸去培养液,滴加 0.5%台盼蓝染液染色,每孔在倒置显微镜下随机数 3 个不同视野,连续数 200 个细胞,活细胞体有明显的折光性,突起轮廓分明,细胞膜和细胞质不着色,而死细胞体无折光性,膜不完整,细胞质染成蓝色颗粒。按公式计算:

细胞存活率(%) = 活细胞数 / 200 × 100%

基金项目:湖北省教育厅重点项目(No. 2003A011)。

作者单位:1. 442000 湖北十堰市,鄖阳医学院生理教研室(熊顺华、李链);2. 442000 湖北十堰市,鄖阳医学院机能实验室(冯桂香、王星文)。作者简介:熊顺华(1963-),女,湖北十堰市人,硕士,副教授,主要研究方向:抗衰老及相关研究。

1.6 DNA 提取与电泳分析 取分组后再培养 24 h 的细胞,去培养基,用 0.125 %胰蛋白酶消化,使细胞脱离培养板,收集细胞,用细胞裂解液裂解后,酚、氯仿抽提,紫外分光光度计定量,每孔加 20 μ g 样品在 1 %琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察拍照。

1.7 细胞内钙离子测定 将培养 8 天的细胞置于含 2 μ mol/L Fura-3/AM DMEM/F12 液中,37 $^{\circ}$ C,CO₂ 培养箱孵育 1 h,Hanks 液轻轻洗涤 3 次,置于激光共聚焦显微镜的载物台上,于培养孔中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 NMDA,另一孔于加 NMDA 前 30 min 加入 0.1 mmol/L PQQ,激发波长 488 nm,发射波长 514 nm,检测细胞内游离钙的动态变化过程。

1.8 丙二醛和活性氧测定 取分组后再培养 24 h 的细胞,去培养液,加蒸馏水使细胞破碎并脱离培养板,离心取上清,按试剂盒说明测定丙二醛和活性氧。蛋白质含量按考马斯亮蓝法测定。

1.9 统计学方法 数据以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 神经元的形态变化 对照组神经元呈三极或多极锥形四边体,边缘光滑,光晕轮廓明显,见胞核和核仁,突起粗长,分叉形成网状。NMDA 组:0.01 mmol/L 及以下浓度 NMDA 对海马神经元的毒性较小,存活率达 85 %以上;在 NMDA 浓度达 0.1 mmol/L 时,培养液中悬浮杂质明显增多,存活神经元的数量明显减少,一些神经细胞膜上出现粗大的颗粒,无明显光晕;还有些细胞出现核固缩、凝聚、断裂、形成凋亡小体;另一些细胞胞膜变得不完整,细胞碎裂、突起多处断裂,核碎裂而坏死。PQQ + NMDA 组细胞膜上颗粒明显

减少,坏死和凋亡的细胞明显减少。单纯 PQQ 组神经元形态与对照组无明显差异。见封三图 1.1 ~ 1.3。

2.2 海马神经元存活率 对照组存活率为 91.67 %;0.1 mmol/L NMDA 组为 49.83 %;PQQ + NMDA 组细胞的存活率随 PQQ 剂量的增加分别为 57.58 %、66.83 %、76.13 %、82.50 %。

2.3 DNA 凝胶电泳分析 0.1 mmol/L NMDA 组 DNA 电泳条带呈梯状和模糊的片状;PQQ + NMDA 组随着 PQQ 剂量增加,DNA 梯带和模糊的片状条逐渐减少,至 0.1 mmol/L 时,无显著的 DNA 梯带和模糊的片状条出现。见图 1。

2.4 细胞内钙离子浓度 海马神经元经 0.1 mmol/L NMDA 处理后,荧光像素相对值由(22.17 \pm 5.12)增加为(30.30 \pm 7.26),(*n* = 6, *P* < 0.01);经 0.1 mmol/L PQQ 预处理后,再加 0.1 mmol/L NMDA 荧光像素值无显著升高。见图 2。

2.5 MDA 和活性氧含量 与对照组相比,0.1 mmol/L NMDA 组 MDA 和活性氧显著升高,而 0.1 mmol/L PQQ + NMDA 组丙二醛和活性氧较 0.1 mmol/L NMDA 组降低。见表 1。

表 1 各组海马神经元的丙二醛和活性氧含量

| 组别 | 丙二醛 (nmol/mg pro) | 活性氧 (U/mg pro) |
|--------------|------------------------------|---------------------------------|
| 对照组 | 3.64 \pm 1.11 | 87.39 \pm 10.71 |
| NMDA 组 | 8.63 \pm 1.44 ^a | 112.91 \pm 16.75 ^a |
| PQQ + NMDA 组 | 4.84 \pm 1.44 ^b | 95.34 \pm 9.34 ^c |

注:与对照组比较:a: *P* < 0.01;与 NMDA 组比较,b: *P* < 0.01,c: *P* < 0.05。

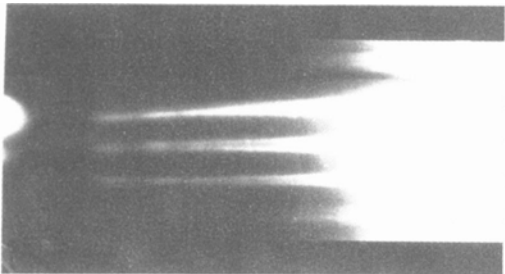


图 1 神经元死亡的 DNA 凝胶电泳分析

A:对照组;B:0.1 mmol/L NMDA 组;C:0.001 mmol/L PQQ 组;D:0.01 mmol/L PQQ 组;E:0.1 mmol/L PQQ 组。

3 讨论

有学者认为,谷氨酸的兴奋性毒性是脑卒中、癫痫、Alzheimer 病等疾病的发病机制,谷氨酸及其化合物所致的神经元损伤主要与其过度刺激 NMDA 受体,激活 NMDA 受体门控的 Ca²⁺ 通道,引起 Ca²⁺ 过度内流,胞浆内 Ca²⁺ 超载导致一系列毒性反应,特别是激活多种 Ca²⁺ 依赖性酶,产生花生四烯酸的代谢产物,过量的自由基形成,线粒体功能障碍,能量耗竭,最终导致细胞死亡。本实验结果表明,高浓度的 NMDA 对海马神经元产生神经毒性作用,导致神经元以凋亡和

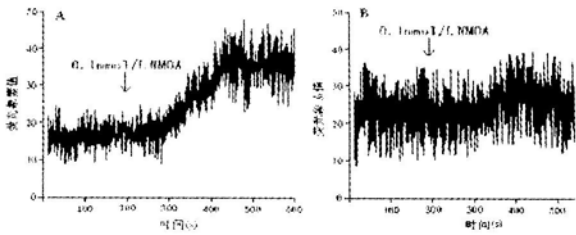


图 2 细胞内钙离子浓度的变化

A:未经 PQQ 预处理;B:经 0.1 mmol/L PQQ 预处理。

坏死两种形式死亡,与文献报道结果一致^[5-6]。预先给予 PQQ 后,NMDA 诱导的坏死和凋亡的细胞明显减少,细胞的存活率明显增加,说明 PQQ 能拮抗或降低 NMDA 对海马神经元的毒性作用,此作用与 PQQ 的剂量相关。

本实验结果还显示,PQQ 的保护作用机制与拮抗由 NMDA 引起的海马神经细胞内 Ca²⁺ 浓度的升高,降低由 NMDA 引起的过量自由基的产生有关。有资料显示,PQQ 具有很强的自由基清除能力,其清除自由基能力比抗坏血酸高 50 ~ 100 倍,还原态的 PQQ 易

还原高价铁肌红蛋白自由基和各种活性氧自由基^[3] ; 在培养的皮层神经元上, PQQ 作用于 NMDA 受体的氧化还原调节位点, 抑制由谷氨酸引起的自由基产生^[7]。与本实验结论一致。

[参考文献]

- [1] Matsushita K, Toyama H, Yamada M, et al. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58:13 - 22.
- [2] Anthony C. Pyrroloquinoline quinone(PQQ) and quinoprotein enzymes[J]. Antioxid Redox signal, 2001, 3:757 - 774.
- [3] 刘建平, 赵永芳. 吡咯喹啉醌及其生理功能[J]. 生理科学进展, 1996, 27:170 - 172.

- [4] Aizenman E, Jensern FE, Gallop PM, et al. Further evidence that pyrroloquinoline Quinone interacts with the N-methyl-D-aspartate receptor redox site in rat cortical neurons in vitro[J]. Neurosci Lett, 1994, 168:189 - 192.
- [5] 郁毅刚, 徐如祥, 姜晓丹, 等. NMDA 损伤及 MK-801 保护作用后原代培养神经元膜 AFM 形貌对比研究[J]. 中华神经医学杂志, 2003, 2:248 - 251.
- [6] 李小刚, 朱克, 李楠, 等. 谷氨酸对神经元钙离子内流和凋亡的影响及谷氨酸受体拮抗剂保护作用的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2001, 3:122 - 125.
- [7] Joelle MS, Elias A, Ian JR. Effect of pyrroloquinoline quinine on glutamate-induced production of reactive oxygen species in neurons[J]. Eur J Pharmacol, 1997, 326:67 - 74.

(收稿日期:2005-02-28)