

LY367385 对谷氨酸钠及缺糖缺氧引起的培养小鼠 大脑皮层神经元损伤的保护作用

董丽萍 韩明 袁芳

[摘要] 目的 观察 LY367385 对谷氨酸钠(Glu)及缺糖缺氧(OGD)引起的小鼠大脑皮层神经元损伤的保护作用。方法 以细胞乳酸脱氢酶(LDH)漏出、光镜下细胞形态变化为指标,观察培养液中加入 Glu 或因 OGD 引起的神经元损伤,以及 LY367385 的保护作用;用免疫细胞化学和免疫荧光染色法检测神经元代谢型谷氨酸受体 1 α (mGluR1 α)的表达。结果 OGD 1 h 或 0.1 mmol/L 的 Glu 可明显造成神经元损伤,使 LDH 漏出明显增加($P < 0.01$);LY367385(50 μ mol/L)可明显拮抗 OGD 或 Glu 引起的神经元损伤,使 LDH 漏出明显减少($P < 0.01$);免疫组化检测显示体外培养神经元 mGluR1 α 阳性表达。结论 OGD 或 Glu 可能通过激活皮层神经元 mGluR1 α 引起神经元损伤,LY367385 通过拮抗 mGluR1 α 保护神经元。

[关键词] 神经元;谷氨酸;缺糖缺氧;代谢型谷氨酸受体 1 α ;LY367385

The protective effect of LY367385 on impairment of cultured mouse cerebral cortical neurons induced by sodium glutamate or oxygen glucose deprivation DONG Li-ping, HAN Ming, YUAN Fang. Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of LY367385 on impairment of cultured mouse cerebral cortical neurons induced by sodium glutamate (Glu) or oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** Neuron damage induced by Glu or OGD, as well as the action of (S)-(+)- α -aminor-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385) were measured by determining the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from neurons. Immunocytochemistry and immunofluorescent methods were used to detect the expression of anti-mGluR1 α . Morphological observation of primary cortical neurons was performed by phase contrast microscope. **Results** Following the exposure to 0.1 mmol/L Glu for 1 h or OGD for 1 h, LDH leakage from neurons obviously increased ($P < 0.01$). 50 mmol/L LY367385, when cocultured with Glu or OGD, markedly reduced the LDH leakage ($P < 0.01$). The 24-h leakage of LDH was increased from cells exposed to 0.1 mmol/L Glu for 15 min. Pre- and post-treatment with LY367385 (50 mmol/L) decreased the leakage of LDH. The cultured neurons expressed mGluR1 α . **Conclusion** LY367385 has protective effect on neurons damaged by Glu or OGD. It may be related to antagonizing mGluR1 α .

[Key words] neuron; glutamate acid (Glu); oxygen-glucose deprivation; metabotropic glutamate receptors 1 α (mGluR1 α); LY367385

中图分类号:R338.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)12-0975-03

[本文著录格式] 董丽萍,韩明,袁芳. LY367385 对谷氨酸钠及缺糖缺氧引起的培养小鼠大脑皮层神经元损伤的保护作用[J]. 中国康复理论与实践,2005,11(12):975-977.

谷氨酸(glutamic acid, Glu)是哺乳动物中枢神经系统中最重要的内源性兴奋性氨基酸,在脑内含量最高。研究发现, Glu 的兴奋性毒性在脑外伤、中毒和缺血缺氧性脑病等不同病因所致脑水肿的发病过程中起重要作用。以往的相关研究主要集中在离子型 Glu 受体上,随着 20 世纪 80 年代代谢型 Glu 受体(metabotropic glutamate receptors, mGluRs)的发现, mGluRs 在脑损伤中的作用日益受到重视。近年的神经药理学研究显示, mGluRs 是神经元保护剂的潜在靶点。由于阻断 mGluRs 对突触快速传递不会有重大影响,产生的副作用有限^[1],因此该方法有望成为治疗脑损伤的新途径。对选择性亚型激动剂或拮抗剂的研究显示, mGluRs 拮抗剂如 AIDA 或 4C3 HPG 可降低 NM-

DA 引起的培养皮层神经元的毒性。(S)-(+)- α -aminor-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385) 为代谢型 Glu 受体 1 α (mGluR1 α)拮抗剂,本研究观察 LY367385 对缺糖缺氧(oxygen glucose deprivation, OGD)或谷氨酸钠(glutamate, Glu)引起小鼠大脑皮层神经元损伤的拮抗作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及实验动物 实验动物:孕期 13~15 d 昆明小鼠(中国医学科学院动物所提供)。试剂:LY367385 购于英国 Tocris 公司;谷氨酸钠(Glu)由第二军医大学化学试剂研究所提供;兔 mGluR1 α 抗体为美国 Chemicon 公司产品;MEM 固体粉剂为 HyClone 公司产品;聚赖氨酸、尿嘧啶及 5-氟尿嘧啶均为 Sigma 公司产品;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒为北京化工厂临床试剂分厂生产。

1.2 神经元细胞原代培养^[2] 将孕鼠拉颈处死,在无菌操作台中取出胚胎,剪取两侧大脑半球的部分皮层(靠近颞叶),剥去脑膜,剪碎,消化,在 MEM 培养基(含 5%胎牛血清+5%马血清)中制成单细胞悬液,调

基金项目:1. 北京市科技新星计划项目(No. 953813000);2. 北京市自然科学基金项目(No. 7043065)。

作者单位:100050 北京市,北京市神经外科研究所。作者简介:董丽萍(1960-),女,河北张家口市人,研究员,主要研究方向:中枢神经系统损伤机制及修复。

整浓度为 $(0.8 \sim 1.0) \times 10^6$ 个/ ml 后接种于预先铺有 1 % (mg/ ml) 聚赖氨酸的 24 孔培养板(Nunc 公司产品), 每孔 0.5 ml。细胞置于 37℃、5 % CO₂ 条件下培养, 24 h 后加入 10 μmol/ L 尿嘧啶及 10 μmol/ L 5-氟尿嘧啶, 以抑制星形胶质细胞的生长, 48 h 后换为新 MEM 培养基。细胞培养 10 d 后用于实验。

1.3 Glu 损伤

1.3.1 Glu 急性损伤 用 Earle 氏溶液(ES) 将细胞洗 2 遍, 加 ES 37℃ 孵育 15 min 后, 孵育液换成 0.1 mmol/ L Glu、Glu + LY367385 (25 μmol/ L 或 50 μmol/ L)。对照组加 ES 0.5 ml/ 孔, 置 37℃ 培养箱中 1 h。ES 组成 (mmol/ L): NaCl 116.4、KCl 5.4、NaH₂PO₄ 2.6、NaHCO₃ 26.2、CaCl₂ 1.8、MgSO₄ · 7H₂O 0.8、葡萄糖 5.5、HEPES 20.1, pH 7.4。

1.3.2 Glu 延迟性损伤 用 ES 将细胞洗 2 遍, 加 ES 37℃ 孵育 15 min 后, 孵育液换成 0.1 mmol/ L Glu、Glu + LY367385 (25 μmol/ L 或 50 μmol/ L), 对照组加 ES 0.5 ml/ 孔。10 min 后去除上述孵育液, ES 洗 2 遍, 细胞换原孵育 MEM 培养基, 抗 Glu 组加 25 μmol/ L 或 50 μmol/ L LY367385, 置 37℃ 培养箱中 24 h。

1.4 OGD 实验 用 ES 将细胞洗 2 遍, 加 ES 37℃ 孵育 15 min 后, 孵育液换成无糖 ES (OGD 组) 或无糖 ES + LY367385 (50 μmol/ L), 0.5 ml/ 孔。培养板置缺氧罐中缺氧 15 min^[31] 后, 将罐封闭置 37℃ 培养箱中 1 h。对照组加 ES; LY367385 组加 50 μmol/ L LY367385。无糖 ES NaCl 为 122.0 mmol/ L, 去除葡萄糖, 其他成分同 ES。

1.5 LDH 测定 实验终止后取孵育液, 用 LDH 试剂盒测定 LDH 含量, 结果以 LDH 漏出率(%) 表示。

1.6 免疫细胞化学标记 将培养于 24 孔板上的神经元用 4 % 多聚甲醛固定 30 min, 用兔 mGluR1α 抗体标记神经元, 用 PBS 液代替 1 抗作阴性对照。后续试验按 DAKO 公司 EnVision 试剂盒说明操作, DAB 显色。

1.7 免疫荧光染色 将培养于盖玻片上的细胞用 4 % 多聚甲醛固定 30 min, 用兔 mGluR1α 抗体标记神经元, 用 PBS 液代替 1 抗作阴性对照。2 抗为中山公司罗丹明标记山羊抗兔 IgG。

1.8 统计学处理 实验结果以($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 10.0 软件进行单因素 F 检验及独立样本的 t 检验。

2 结果

2.1 LY367385 抗 Glu 引起的损伤作用

2.1.1 抗急性损伤 0.1 mmol/ L Glu 作用神经元 1 h, 细胞 LDH 漏出增加, 由对照组的(19.7 ± 3.0) % 增至(33.6 ± 3.0) % ($P < 0.01$); 50 μmol/ L 的

LY367385 可减少 Glu 引起的 LDH 漏出, 漏出率为(24.7 ± 2.7) % ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 LY367385 对 Glu 引起的神经元急性损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDH 漏出率(%)
对照组	10	19.7 ± 3.0
0.1 mmol/ L Glu 组	14	33.6 ± 3.0 ^a
0.1 mmol/ L Glu + 25 μmol/ L LY367385 组	8	31.3 ± 4.9
0.1 mmol/ L Glu + 50 μmol/ L LY367385 组	15	24.7 ± 2.7 ^b

注 : a : 与对照组比较, $P < 0.01$; b : 与 0.1 mmol/ L Glu 组比较, $P < 0.01$ 。

2.1.2 抗延迟性损伤 0.1 mmol/ L Glu 作用神经元 10 min, 24 h 后细胞 LDH 漏出增加, 由对照组的(35.9 ± 3.4) % 增至(47.4 ± 3.2) % ($P < 0.01$); 50 μmol/ L 的 LY367385 可减少 Glu 引起的 LDH 漏出, 漏出率为(39.8 ± 3.5) % ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 LY367385 对 Glu 引起的神经元延迟性损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDH 漏出率(%)
对照组	15	35.9 ± 3.4
0.1 mmol/ L Glu 组	16	47.4 ± 3.2 ^a
0.1 mmol/ L Glu + 25 μmol/ L LY367385 组	14	41.4 ± 3.6
0.1 mmol/ L Glu + 50 μmol/ L LY367385 组	14	39.8 ± 3.5 ^b

注 : a : 与对照组比较, $P < 0.01$; b : 与 0.1 mmol/ L Glu 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 LY367385 抗 OGD 引起的损伤作用 神经元 OGD 1 h, 细胞 LDH 漏出增加, 由对照组的(22.0 ± 3.4) % 增至(45.7 ± 3.4) % ($P < 0.01$); 50 μmol/ L 的 LY367385 可减少 OGD 引起的 LDH 漏出, 漏出率为(35.3 ± 4.0) % ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 LY367385 对 OGD 引起的神经元损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDH 漏出率(%)
对照组	9	22.0 ± 3.4
OGD 组	12	45.7 ± 3.4 ^a
OGD + 50 μmol/ L LY367385 组	14	35.3 ± 4.0 ^b

注 : a : 与对照组比较, $P < 0.01$; b : 与 OGD 组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 免疫细胞化学和免疫荧光染色 免疫细胞化学检测显示, mGluR1α 抗体标记的神经元胞体呈棕色(见中插 2 图 3.1a、3.1b), 染色较深; 免疫荧光染色阳性的神经元呈红色荧光染色(见中插 2 图 3.2a、3.2b), 表明培养的神经元 mGluR1α 阳性表达。

2.4 倒置相差显微镜观察 神经元细胞培养 10 d 后, 细胞生长旺盛, 突起展开完全, 联结成网状。Glu 处理组可观察到神经元胞体肿胀破裂, 细胞内容物流出, 遮光性明显变差; LY367385 对抗组细胞形态明显好转(见中插 2 图 3.3a ~ 3.3e)。

3 讨论

脑水肿、脑缺血和神经系统退行性疾病为临床常

见病,但发病机理复杂。研究显示,在上述病理情况下,Glu 在细胞外大量堆积。Glu 是脑内主要的兴奋性递质,其受体的过度刺激可使突触后神经元过度兴奋,发生溃变死亡。因此,Glu 的兴奋毒性作用受到关注。缺氧缺血引起的神经元损伤的机理十分复杂,研究显示,最重要的是内源性 Glu 大量释放及回摄取受阻后造成的兴奋性毒性^[4]。离体研究显示,Glu 的神经毒性包括受体过度兴奋所介导的神经细胞急性渗透性肿胀(可在数小时内发生),以 Na^+ 内流为特征;另一过程为神经细胞的延迟性损伤,在数小时至数日内发生,以 Ca^{2+} 内流为特征。在中枢神经系统中,Glu 通过离子型受体或代谢型受体发挥其生理或病理作用。mGluRs 家族根据结构同源性、药理学特性和传导通路分成 3 组 8 个亚型^[5,6],1 组 mGluRs 包括 mGluR1 和 mGluR5,免疫标记实验显示其一般定位于神经元细胞体和树突中。mGluRs 与 Glu 或其他激动剂结合后,通过与 G 蛋白偶联激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC),引起三磷酸肌醇水解,进而激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 并引起胞质内 Ca^{2+} 增加^[5],而胞内 Ca^{2+} 增加和 PKC 的活化可导致神经元死亡^[7]。研究资料显示,在大鼠脑缺血再灌注损伤中,mGluR1 α 蛋白表达上调,且与神经元损伤程度平行^[8],提示 mGluR1 α 参与脑缺血再灌注损伤。

LDH 广泛存在于各种组织细胞中,在病理情况下细胞膜通透性增高时 LDH 漏出增加。细胞学实验中以 LDH 漏出反映细胞的损伤。用毒性浓度的 Glu 作用于培养细胞几分钟,24 h 后观察神经毒性,此为常用的研究 Glu 延迟性神经毒性的实验方法^[9]。

LY367385 为选择性 mGluR1 竞争性拮抗剂。本研究结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ LY367385 对 Glu 引起的神经元急性和延迟性损伤及 OGD 造成的损伤均有保护作用,使 LDH 漏出明显减少 ($P < 0.01$),而且光镜下神经元的形态有明显好转(见图 3),其他实验室的研究资料也证实 LY367385 对 NMDA 引起的神经元损伤及沙土鼠脑缺血有保护作用^[10]。我们在实验中所用的 LY367385 有效浓度与文献报道一致^[11]。免疫组化及免疫荧光实验显示,培养神经元 mGluR1 α 阳性表达(见图 1、图 2)。LY367385 抗 OGD 及 Glu 的兴奋毒性作用可能是阻断 mGluR1 后抑制 Ca^{2+} 内流及抑制 Glu 激活 NMDA。有资料显示,LY367385 可下调 mGluR 激动剂 DHPG 激活大鼠海马锥体神经元 mGluR1 和 mGluR5 后激活的 PLC 和 PKC 传导通路的活性^[12],抑制 DHPG 引起的 Ca^{2+} 内流^[13],对抗 NMDA 引起的小鼠大脑皮层神经元损伤^[10]。

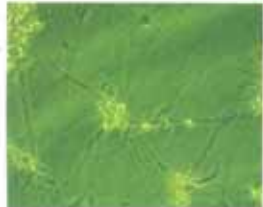
与离子型 Glu 受体相比,mGluRs 具有亚型多、脑

内分布范围广、可更精细调节递质释放、对正常生理功能影响较小等特点。因此,研制以 mGluRs 为作用靶点拮抗 Glu 的药物,可能会成为治疗脑损伤的新途径。

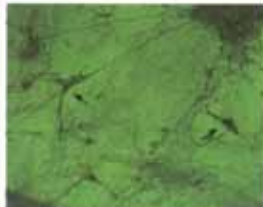
[参考文献]

- [1] Gasparini F, Lingenhoehl K, Stoehr N, et al. 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGluR5 receptor antagonist[J]. *Neuropharmacology*, 1999, 38: 1493—1503.
- [2] Wang TY, Yan J, Liang S, et al. The effects of poly-L-lysine and collagen on the cultured neurons from chick embryo cerebral cortices[J]. *Chin J Cell Biol*, 1988, 10: 30—33.
- [3] 董丽萍,王天佑. 体外培养大鼠星形细胞的缺糖缺氧性损伤及药物的保护[J]. *中国应用生理学杂志*, 1996, 12: 107—110.
- [4] 徐仁四. 兴奋性氨基酸与脑缺血损伤的研究概况[J]. *国外医学神经病学神经外科分册*, 1998, 25: 62—64.
- [5] Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions[J]. *Neuropharmacology*, 1995, 34: 1—26.
- [6] Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors[J]. *Neuropharmacology*, 1999, 38: 1431—1476.
- [7] Chio DW. Excitotoxic cell death[J]. *J Neurobiology*, 1992, 23: 1261—1276.
- [8] 郝玉曼,罗祖明,周东,等. 代谢型谷氨酸受体 1 α 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的基因表达变化[J]. *中华老年心血管病杂志*, 2004, 6: 119—122.
- [9] Choi DW, Koh J, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists[J]. *J Neurosci*, 1988, 8: 185—196.
- [10] Bruno V, Battaglia G, Kingston A, et al. Neuroprotective activity of the potent and selective mGluR1 metabotropic glutamate receptors antagonist, (+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine (LY367385): comparison with LY357366, a broader spectrum antagonist with equal affinity for mGluR1 and mGluR5 receptors[J]. *Neuropharmacology*, 1999, 38: 199—207.
- [11] Meli E, Picca R, Attucci S, et al. Activation of mGluR1 but not mGluR5 metabotropic glutamate receptors contributes to postischemic neuronal injury in vitro and in vivo[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 73: 439—446.
- [12] Ireland DR, Abraham WC. Group I mGluRs increase excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons by a PLC-independent mechanism[J]. *J Neurophysiol*, 2002, 88: 107—116.
- [13] Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, et al. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function[J]. *J Neurosci*, 2001, 21: 5925—5934.

(收稿日期:2005-06-13)



a. 阴性对照



b. 免疫阳性细胞(棕色)

图 3.1 小鼠大脑皮层神经细胞 mGluR1 α 标记免疫细胞化学染色



a. 阴性对照



b. 免疫阳性细胞(红色)

图 3.2 小鼠大脑皮层神经细胞 mGluR1 α 标记免疫荧光染色



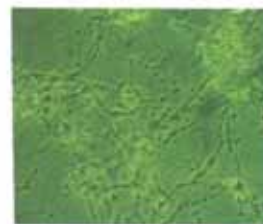
a. 对照组



b. Glu 作用 1 h



c. 50 mmol/L LY367385 抗 Glu 的急性神经毒性作用



d. Glu 的延迟性神经毒性作用



e. 50 mmol/L LY367385 抗 Glu 的延迟性神经毒性作用

图 3.3 倒置相差显微镜观察培养的小鼠大脑皮层神经细胞

图 1.1a—图 1.2c 正文见 P972

图 2.1—图 2.2 正文见 P974

图 3.1—图 3.3 正文见 P976