

Guattegaumerine 的神经细胞保护及细胞内钙调节作用

吕青¹, 祝伟², 徐旭林¹, 郭莲军^{1*}

1. 华中科技大学同济医学院 基础药理学系, 湖北 武汉 430030

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 急诊内科, 湖北 武汉 430030

摘要: 目的 探讨 guattegaumerine (Gua) 对 H₂O₂ 合并血清剥夺诱导的培养大鼠神经细胞的保护作用, 以及对 H₂O₂、KCl 诱导的大鼠皮质神经元内钙超载和缓激肽诱导的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 内钙超载的影响。方法 H₂O₂ 合并血清剥夺诱导培养大鼠皮质神经元损伤, Hoechst33258 染色法检测 Gua 对细胞凋亡的影响; 钙荧光探针 Fura-2/AM 标记细胞, 荧光显微图像分析系统和双荧光波长分光光度计检测 Gua 对细胞内钙浓度的影响。结果 Gua 能显著抑制 H₂O₂ 导致的神经元凋亡、H₂O₂ 和 KCl 引起的培养皮质神经细胞 [Ca²⁺]_i 升高 ($P < 0.05$) 和缓激肽所诱导的培养人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y [Ca²⁺]_i 升高 ($P < 0.01$)。结论 Gua 具有一定的神经细胞保护作用, 该作用可能与其抑制细胞外钙内流及内质网内钙释放有关。

关键词: guattegaumerine; 神经细胞; 钙拮抗; 钙超载; H₂O₂

中图分类号: R282.710.5; R971 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)09-1803-05

Neuroprotection of guattegaumerine and regulation of intracellular calcium

LV Qing¹, ZHU Wei², XU Xu-lin¹, GUO Lian-jun¹

1. Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. Emergency Department, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Key words: guattegaumerine (Gua); nerve cells; calcium antagonist; calcium overload; H₂O₂

Guattegaumerine (Gua) 系首次从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 的根茎中分离的一种单体物质, 属双苄基异喹啉类生物碱, 目前对其药理作用的研究较少。药理实验和临床研究证明从蝙蝠葛中提取的蝙蝠葛碱有良好的抗心律失常和松弛血管平滑肌的作用, 作用机制与其钙拮抗作用有关^[1]。由于 Gua 与蝙蝠葛碱有相似的结构, 推测其也有钙拮抗作用。

黄酮和姜黄素等多酚类化合物具有很强的抗氧化活性, 其结构中的酚羟基是这些化合物抗氧化作用的主要活性基团, 具有很强的清除氧自由基能力。Gua 结构中亦含有酚羟基, 推测其可能也具有抗氧化作用。为探讨 Gua 的抗氧化及钙拮抗作用, 本实验采用 H₂O₂ 合并血清剥夺诱导培养的大鼠皮质神经

元过氧化损伤, 观察 Gua 对神经元的保护作用; 应用 H₂O₂、KCl 和缓激肽诱导培养的神经细胞内钙离子浓度升高, 观察 Gua 对神经细胞内钙浓度的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

Gua, 质量分数 >98%, 由华中科技大学同济医学院临床药理系提供; 尼莫地平注射液, 德国拜耳公司, 批号 00519885M-D, 每瓶 10 mg; DMEM/F12 培养基, 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清, 中美合资兰州民海生物工程有限公司; L-多聚赖氨酸、Fura-2/AM 及缓激肽, 美国 Sigma 公司; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 动物

新生 Wistar 大鼠, 华中科技大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (鄂) 2008-0004。

1.3 仪器

IX70 型倒置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司;

收稿日期: 2011-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001432); 湖北省自然科学基金资助项目 (2007ABA1720)

作者简介: 吕青 (1975—), 女, 湖北人, 博士, 主要研究方向为神经药理。E-mail: lvq21c@yahoo.com.cn

*通讯作者 郭莲军 E-mail: gljy2008@126.com

Tillvision 4.0 软件, T.I.L.L. Photonics GmbH 公司;
850 型双波长荧光分光光度计, 日本日立公司。

2 方法

2.1 细胞培养^[2]

2.1.1 大鼠皮质神经元培养 出生 3 d 内的新生 Wistar 大鼠乳鼠, 常规消毒后无菌条件下断头取脑, 在预冷的 D-Hanks 液中解剖、分离大脑皮层, 去除脑膜和血管, D-Hanks 液洗 2~3 次, 剪成 1 mm³ 左右的小块, 37 °C 下 0.125% 胰蛋白酶消化 20 min, 取出吹打, 并用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止反应。200 目筛网滤过, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 D-Hanks 液洗 1 次, 1 000 r/min 再离心 10 min, 弃上清液, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基调细胞密度为 5×10^5 /mL。将细胞接种于经 0.01% L-多聚赖氨酸包被过夜的培养板中, 放入 37 °C 恒温的 CO₂ 培养箱内 (5% CO₂, 湿度 85%~98%) 培养, 48 h 后全量换液, 72 h 后加入终质量浓度为 5 μg/mL 阿糖胞苷溶液作用 24 h 以抑制胶质细胞的增殖。此后根据培养基颜色变化, 每 2~3 天半量换液 1 次, 取培养 9~10 d 的神经细胞进行实验。

2.1.2 SH-SY5Y 细胞培养 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞由华中科技大学同济医学院临床药理系提供, 用含 7% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基在恒温 CO₂ 培养箱内培养, 每 2~3 天更换培养基 1 次。

2.2 对 H₂O₂ 合并血清剥夺诱导的培养乳鼠皮质神经元凋亡的影响

2.2.1 分组与给药 将培养 9~10 d 的皮质神经细胞分为对照组、模型 (H₂O₂ 合并血清剥夺) 组、Gua 2 个给药组。对照组细胞在含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中继续培养 24 h; 模型组细胞用含 6.25 μmol/L H₂O₂ 的无血清低糖培养基培养 24 h 诱导过氧化损伤。2 个给药组皮质神经元分别与 1.25、2.5 μmol/L Gua 预孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 加入含 6.25 μmol/L H₂O₂ 的无血清低糖培养基和 1.25 (或 2.5) μmol/L Gua, 继续培养 24 h 后, 进行细胞凋亡指标测定, 每组 6 孔, 实验重复 3 次。

2.2.2 Hoechst33258 染色法检测细胞凋亡 各组细胞经过上述处理结束后, 加入荧光素染料 Hoechst33258 (20 mg/mL), 37 °C 孵育 20 min, PBS 液冲洗 3 次, 在倒置荧光显微镜 (×100) 下观察细胞核染色情况, 并于高倍镜 (×200) 下每个培养孔随机取 5 个不同视野, 计算细胞凋亡率。

2.3 对 H₂O₂ 和 KCl 诱导的培养大鼠皮质神经元钙浓度升高的影响

2.3.1 分组与给药 取培养 7 d 的乳鼠皮质神经细胞爬片进行实验, 实验分成对照组和 2 个药物处理组。药物处理组细胞爬片分别用 Gua 1.25、2.5 μmol/L 预孵育 2 h, 对照组细胞在正常条件下继续培养 2 h。每组细胞均用 6.25 μmol/L H₂O₂ 或 10 mmol/L KCl 诱发胞内钙浓度的升高。

2.3.2 倒置荧光显微镜检测皮质神经元内钙离子浓度^[3] 给药组和对照组细胞爬片用外液 (由 NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、葡萄糖、HEPES 组成, 浓度分别为 140、5、1、2、10、10 mmol/L, pH 7.3) 冲洗 3 次后放入培养皿中, 每皿加 1 mL 外液, 37 °C 下用终浓度为 1 μmol/L 的荧光探针 Fura-2 避光孵育 40 min 后取出并清洗 3 次, 去掉未负载的 Fura-2, 将细胞玻片置于含 1 mL 外液的测量皿中, 在倒置荧光显微镜下检测。在无钙细胞外液试验中, 用 100 μmol/L EGTA 代替外液中的 CaCl₂。双波长 (激发波长分别为 340、380 nm) 激发倒置显微镜荧光通路, 用 Tillvision 软件动态记录 F_{340} 与 F_{380} 的荧光比值。H₂O₂ 及 KCl 均用微量移液器加入测量皿内, 记录加入 H₂O₂ 及 KCl 后 F_{340}/F_{380} 值的变化。计算胞内钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$)。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (F_D/F_S) \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$$

R 为 F_{340}/F_{380} 值; K_d 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数, 生理条件下 K_d 值为 224; R_{max} 是 Fura-2 全部为 Ca^{2+} 饱和时的荧光比值 (即加入 Tritonx-100 后的荧光比值); R_{min} 为完全未结合 Ca^{2+} 时的荧光比值 (即加入过量的 EGTA 后的荧光比值); F_D 和 F_S 分别代表无 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 饱和状态下 380 nm 处的荧光强度。可采用 F_{340}/F_{380} 值来间接反应 $[Ca^{2+}]_i$ 。

2.4 对缓激肽诱导 SH-SY5Y 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响

2.4.1 分组与给药 取培养至 80% 融合的 SH-SY5Y 细胞进行实验, 实验分对照组和 3 个给药组。给药组用 2.5、10、100 μmol/L Gua 预孵育细胞 24 h, 对照组细胞在正常条件下培养 24 h, 之后每组细胞均用 1 μmol/L 缓激肽诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。

2.4.2 双波长荧光分光光度计测定 SH-SY5Y 细胞悬液钙离子^[4] 各组细胞在上述处理结束后吸出原培养液, 37 °C 下用 D-Hanks 液洗 2 次, 加培养液用滴管轻轻吹打成单个细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL。细胞悬液用台盼蓝计数检验细胞存活率, 若存活率大于 95%, 可进行钙测定。取 1 mL 细胞悬液, 加入 EP 管中, 37 °C 下用终浓度为 5 μmol/L

的荧光探针 Fura-2 避光孵育 40 min, 1 000 r/min 离心 10 min, D-Hanks 液洗 2 次, 去掉未负载的 Fura-2, 然后用 37 °C、钙离子测定液 3 mL 重悬细胞, 加入比色皿中, 连续测定 340、380 nm 波长处的荧光值。1 $\mu\text{mol/L}$ 缓激肽用微量移液器加入比色皿内, 记录荧光值的变化率, 以对照组细胞加入缓激肽后即时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平为 100%。

2.5 数据统计

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用两样本均数

比较的 t 检验。

3 结果

3.1 对皮质神经元凋亡的影响

Hoechst33258 染色结果显示, 对照组有少量神经元凋亡, 细胞凋亡率为 $(10.43 \pm 4.57)\%$; 模型组神经元凋亡率明显上升, 细胞凋亡率为 $(36.82 \pm 2.13)\%$; Gua 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组显著降低 H_2O_2 合并血清剥夺引起的神经元凋亡, 细胞凋亡率为 $(15.62 \pm 1.25)\%$ 。结果见图 1。

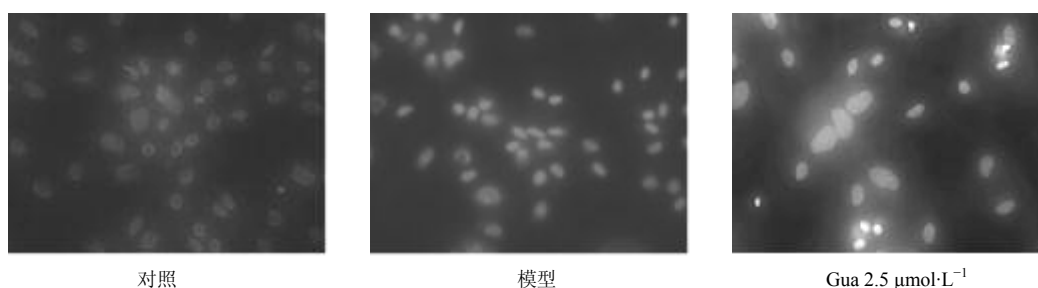


图 1 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡

Fig. 1 Photographs of apoptosis by Hoechst33258 staining

3.2 对神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

3.2.1 对 H_2O_2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响 标准细胞外液在无任何刺激的情况下, F_{340}/F_{380} 值在较长时间内稳定在一定范围; 当加入 H_2O_2 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 后, F_{340}/F_{380} 值迅速升高并长时间稳定在较高水平, 与给 H_2O_2 前相比具有显著差异 ($P < 0.01$) (图 2-A)。Gua 1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 与细胞预孵育后, 能显著抑制 H_2O_2 所致 F_{340}/F_{380} 值升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的尼莫地平也能显著抑制 H_2O_2 所致 F_{340}/F_{380} 值升高 ($P < 0.05$), 作用与 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 Gua 相当。在无钙细胞外液中, H_2O_2 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 亦诱导 F_{340}/F_{380} 值升高 (图 2-B); Gua 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 与细胞预孵育后, 能显著抑制 H_2O_2 诱导的 F_{340}/F_{380} 值升高 ($P < 0.05$), 尼莫地平 1 $\mu\text{mol/L}$ 也有显著作用 ($P < 0.05$), 两者作用强度相当, 但 Gua 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 未表现此作用。结果见图 3。

3.2.2 对 KCl 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响 在无任何刺激情况下, 标准细胞外液 F_{340}/F_{380} 值较长时间内稳定在一定范围; 当加入 10 mmol/L KCl 后, F_{340}/F_{380} 值迅速升高并长时间稳定在高水平, 与给予 KCl 前相比差异显著 ($P < 0.05$)。Gua 1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 分别与细胞预孵育后, 均能显著抑制 KCl 所致 F_{340}/F_{380} 值升高 ($P < 0.01$); 尼莫地平 1 $\mu\text{mol/L}$ 也能显著抑制 KCl 所致 F_{340}/F_{380} 值升高 ($P < 0.01$),

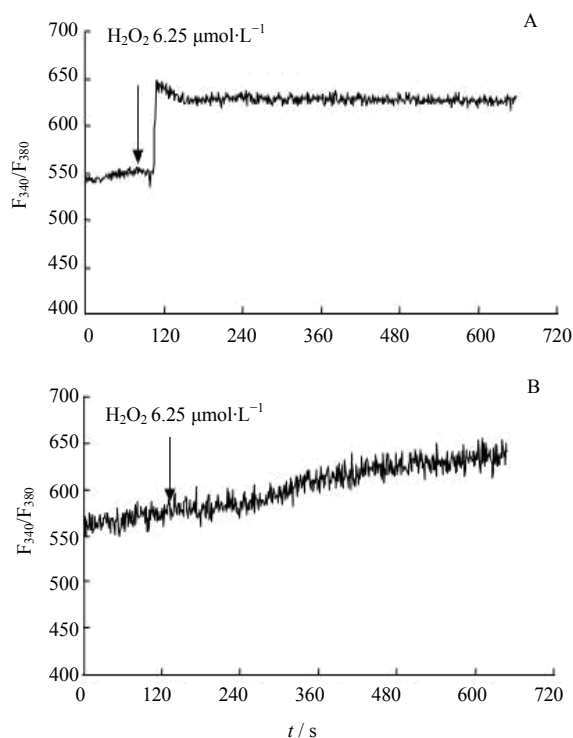
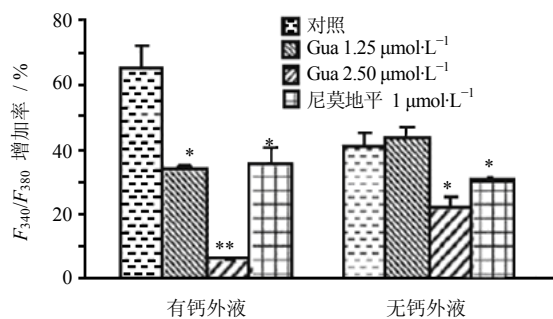
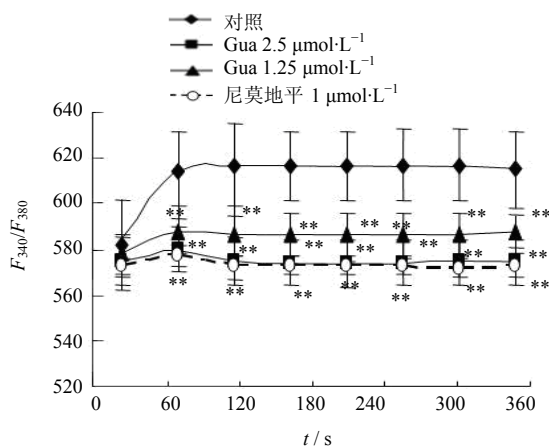


图 2 在有钙外液 (A) 和无钙外液 (B) 中 H_2O_2 对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

Fig. 2 Effects of H_2O_2 on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in extracellular solution with calcium (A) and without calcium (B)

且作用强度与 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Gua 作用相当。结果见图 4。

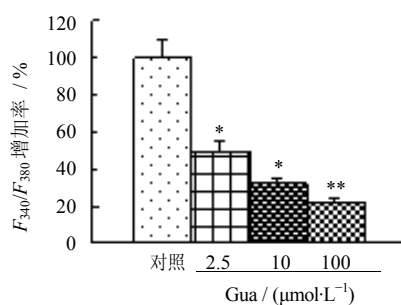
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group图3 Gua对 H_2O_2 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effects of Gua on $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)与对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group图4 Gua在有钙外液中抑制KCl诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高Fig. 4 Inhibition of Gua on $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by KCl in solution with calcium

3.3 对SH-SY5Y细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

静息状态下, 正常SH-SY5Y细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 较长时间内稳定在一定范围内; 加入缓激肽 $1 \mu\text{mol/L}$ 后, $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高, 并在 $10 \sim 20 \text{ s}$ 达峰值, 随后逐步恢复至给药前水平; Gua 2.5 、 10 、 $100 \mu\text{mol/L}$ 处理SH-SY5Y细胞 24 h 后, $[Ca^{2+}]_i$ 未受到影响, 但可明显地抑制缓激肽诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 抑制率分别为 49.85% 、 68.09% 、 78.78% , 与缓激肽组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图5。

4 讨论

氧化应激损伤与神经细胞凋亡密切相关^[5-6]。本实验结果显示, 皮质神经元与 H_2O_2 合并血清孵育

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group图5 Gua对缓激肽诱导的SH-SY5Y细胞内 $[Ca^{2+}]_i$

升高的影响

Fig. 5 Effects of Gua on $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by bradykinin

24 h 后, 细胞凋亡率明显增加; 以Gua $2.5 \mu\text{mol/L}$ 预处理, 明显降低细胞凋亡率, 提示Gua可抑制 H_2O_2 合并血清剥夺所诱导的过氧化损伤。

胞浆 Ca^{2+} 的升高是细胞凋亡中的重要事件, Ca^{2+} 作为第二信使或死亡信号传导分子, 参与某些和细胞凋亡相关的蛋白激酶和核酸酶的活化而介导细胞凋亡^[7]。活性氧(ROS)可通过多种途径使 Ca^{2+} 浓度迅速升高^[8-9]。 H_2O_2 可直接作用于膜结构上的不饱和脂肪酸, 诱发脂质过氧化, 使质膜通透性增加, 外钙内流增多; 并可抑制膜上 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白, 导致胞内 Na^+ 升高, 迫使 Ca^{2+} 通过 Na^+-Ca^{2+} 交换进入胞内; 还可激活膜上受体门控型钙通道使细胞外钙进入胞内, 激活钙库上IP₃敏感型钙通道促进钙释放, 最终导致胞内 Ca^{2+} 浓度升高。胞内 Ca^{2+} 水平的升高, 可协同其他因素(如谷胱甘肽下降)引发线粒体产生大量ROS, 从而进一步促进胞内 Ca^{2+} 浓度持续升高。本实验结果显示, 在有钙及无钙细胞外液中, H_2O_2 均能升高 $[Ca^{2+}]_i$, 提示 H_2O_2 既可通过促进钙内流又可通过促进胞内钙释放两种途径使胞内钙浓度升高。在有钙细胞外液中, Gua能抑制 H_2O_2 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 提示其可能通过阻断膜上电压依赖性钙通道和阻断受体门控型钙通道产生钙拮抗作用; 在无钙细胞外液中, Gua仅在 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 时显著抑制 H_2O_2 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 提示其在高浓度时还可能通过阻断钙库中钙释放而抑制 H_2O_2 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。高钾去极化可激活膜上电压依赖性钙通道^[10], 使钙内流增加, $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 本实验结果显示, Gua抑制KCl所诱导的

[Ca²⁺]_i 升高, 进一步提示其可阻断膜上电压依赖性钙通道而降低 [Ca²⁺]_i。

缓激肽是一种通过 G 蛋白转导引起胞内钙升高的激动剂, 它与 SH-SY5Y 细胞膜上的 B₂ 受体结合后, 通过 G 蛋白激活 PLC 途径, 使胞内 IP₃ 增加, 从而促使储存在内质网的 Ca²⁺ 释放而诱导 [Ca²⁺]_i 升高^[11-12]。本实验结果显示, Gua 可明显抑制缓激肽引起的 SH-SY5Y 细胞 [Ca²⁺]_i 升高, 提示其能直接抑制内质网上钙库 Ca²⁺ 释放, 从而对抗胞内钙超载。

综上所述, Gua 具有钙拮抗作用, 其作用机制与抑制外钙通过电压依赖型及受体门控型钙通道进入胞内, 以及一定程度上抑制内质网上钙库 Ca²⁺ 释放密切相关, 该作用可能是其神经保护作用的基础。Gua 通过多种途径拮抗胞内钙离子浓度升高的特性将为神经系统疾病的防治提供新的研究思路 and 方向。

参考文献

- [1] 管思明. 蝙蝠葛碱对心肌电生理和肌浆网的效应及其与汉防己甲素比较研究 [J]. 中华心律失常杂志, 1999, 3(4): 286-289.
- [2] 郑 敏, 郭莲军, 吕 青, 等. 大鼠皮质及海马神经元体外缺氧缺糖模型建立 [J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(3): 333-335.
- [3] Chu X P, Wemmie J A, Wang W Z, *et al.* Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(40): 8678-8689.
- [4] Wang L, Wang X C, Li H L, *et al.* Dauricine prevents bradykinin-induced alteration of calcium homeostasis and tau hyperphosphorylation in N2a cells [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2005, 32(7): 612-618.
- [5] White B C, Sullivan J M, DeGracia D J, *et al.* Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanisms of neuronal injury [J]. *J Neurol Sci*, 2000, 179(S1/2): 1-33.
- [6] Kelly J, Furkawa K, Mattson M P, *et al.* Amyloid-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(13): 6753-6758.
- [7] Won S J, Kim D Y, Gwag B J. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2002, 35(1): 67-86.
- [8] Shi Z Q, Davison A J, Tibbits G F. Effects of active oxygen generated by DTT/Fe²⁺ on cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange and membrane permeability to Ca²⁺ [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1989, 21(10): 1009-1016.
- [9] Robert V, Ayoub S, Berson G. Effects of hydroxyl radicals on ATPase and protein structure of myofibrils from rat heart [J]. *Am J Physiol*, 1991, 261(2): H1785-H1790.
- [10] Huang Z, Shi G, Gao F, *et al.* Effects of *N-n*-butyl haloperidol iodide on *L*-type calcium channels and intracellular free calcium in rat ventricular myocytes [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(2): 182-188.
- [11] 施广璞, 杜洪震, 刘子文, 等. 过氧化氢对大鼠肝卵圆细胞内游离钙含量的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2002, 24(3): 145-149.
- [12] Miller R J. Bradykinin highlights the role of phospholipids metabolism in the control of nerve excitability [J]. *Trends Neurosci*, 1987, 10(6): 226-228.