

蝙蝠葛苏林碱对缺血性损伤细胞的保护作用

王 震 朱兴族¹ 刘国卿 封新影(中国药科大学药理学教研室, 南京 210009 ¹中国科学院上海药物所药理室, 上海 200032)

摘 要 采用培养 PC 12 细胞为材料, 观察了蝙蝠葛苏林碱 (Daurisoline, Dau) 对六种脑缺血样损伤模型中的细胞保护作用及其作用机制进行了分析。实验结果表明: Dau 100 μ mol/L 对细胞损伤有明显的保护作用, 其保护作用又以对一氧化氮毒性损伤较为敏感。

关键词 PC 12 细胞; 蝙蝠葛苏林碱; 脑缺血

对脑缺血的病理研究表明, 脑损伤涉及多种因素, 如兴奋性氨基酸 (excitatory amino acid, EAA) 的兴奋性毒性、自由基损伤、细胞死亡的最后通路钙超载 (Calcium overloading) 以及最新发现的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 毒性损伤等, 对于这些因素的了解, 有助于研制用于治疗脑缺血-缺氧的新型药物。应用组织培养技术在体外测试药物的活性有节省用量且简便易行, 易于分析药物的作用机制等优点。蝙蝠葛苏林碱 (Daurisoline, Dau) 是从防己科植物蝙蝠葛 (*Menispermum dauricum* DG.) 根茎中提纯的双苄基异喹啉类 (BBISQs) 生物碱。我室以前的研究表明 Dau 能对抗缺血性脑损伤, 其作用机制可能和钙拮抗有关^[1]。我们用六种培养细胞的神经元变性模型初步分析了 Dau 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

DM EM 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium) 购自 GIBCO 公司; MTT [溴化-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑] 购自 Fluka 公司; 硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP)、NM DA (N-methyl-D-aspartate)、HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine N-2-ethanesulfonic acid) 和葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase) 购自 Sigma 公司; 小牛血清、胰蛋白酶 (Difco 进口分装) 等购自上海实生生物制品公司, Dau 由本校新药研究中心华维一教授提供。

1.2 方法

1.2.1 PC 12 细胞培养 PC 12 (Pheochromocytoma) 细胞是来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株。PC 12 细胞冻存在液氮中, 用时进行复苏。培养液为高糖 DM EM 培养液, 含 10% 小牛血清, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL, 酚红 5 mg/L, pH 用 NaHCO₃ 调至 7.2 左右, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 待细胞长满培养板, 即可用于实验。

1.2.2 实验模型

1.2.2.1 缺氧/复氧损伤实验模型 参照 Salvaterra 和 Goldman^[2] 方法, 在 DM EM 培养液中加入终浓度为 5 mmol/L 的连二亚硫酸钠 (Na₂S₂O₄) 干粉充分搅拌, 用 NaHCO₃ 调 pH 为 7.2 即为缺氧溶液, 此溶液需要现用现配。为了消除连二亚硫酸钠在水中的分解产物的影响, 除设空白对照组外, 另设一非低氧溶液对照组, 非低氧溶液的制备是由预先配制 100 mmol/L 的缺氧 Na₂S₂O₄ 贮备液, 用时将贮备液 (3 d 以上) 稀释至 5 mmol/L, 即为 5 mmol/L Na₂S₂O₄ 常氧溶液。缺氧损伤 1 h 后, 换去缺氧培养液为正常的含血清的 DM EM 培养液继续培养 1 h, 形成缺氧/复氧损伤模型。

1.2.2.2 缺糖损伤实验模型 由于神经细胞的能量来源主要来自糖代谢, 缺血过程中, 由于糖供应不足, 能量代谢耗竭, 是促进细胞死亡的一个环节。参照 Pedata 等^[3] 方法将正常培养液换成无糖培养液, 5 min 后, 再换成正常培养液, 造成细胞缺糖性

损伤

1 2 2 3 氧自由基损伤实验模型 参照 Pan 和 Perez-Polo^[4]方法,用葡萄糖(25 mmol/L)葡萄糖氧化酶(12.5 mU/mL)系统用来产生 OH^\cdot 。将正常培养液换成含葡萄糖 葡萄糖氧化酶的无血清的 DM EM 培养液 3 h 后,再将培养液换成含正常血清的正常培养液 1 h,造成氧自由基损伤

1 2 2 4 咖啡因(Caffeine Caf)损伤实验模型 Caf可引起细胞内贮存钙的释放,并且 Caf敏感的贮存钙释放可能在细胞内钙($[\text{Ca}^{2+}]_i$)变化过程中起重要的作用(Friel和 Tsien, 1992) Zaccetti 等(1991)和 Fasolato 等(1991)证明 PC12 细胞内至少有三种钙贮存池,其中一种是 Caf和 IP_3 敏感的, Caf可在无外钙条件下引起 PC12 细胞内钙释放。高浓度的 Caf可引起细胞内钙的过度释放,破坏细胞内的钙稳态,造成细胞损伤^[5]。在 DM EM 培养液中换成含有终浓度为 10 mmol/L Caf 的培养液,作用 45 min 后,换成正常培养液继续培养 1 h,造成 Caf 损伤实验模型

1 2 2 5 NO 神经毒性实验模型 参照 Maiese 等^[6]方法,将 SNP 溶解在培养液中产生 NO,进行 NO 毒性实验,使 SNP 在 DM EM 培养液的终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$,作用 5 min 后,再换成正常培养液继续培养,形成 NO 毒性模型

1 2 2 6 NM DA 神经毒性损伤实验模型 NM-DA 刺激细胞膜 NM DA 受体依赖性钙通道,引起外钙内流从而导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上升。Kurozumi 等(1990)报道 100 $\mu\text{mol/L}$ NM DA 可刺激 PC12 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 从基础值上升接近 1 倍,表明 PC12 细胞膜存在 NM DA 受体依赖的钙通道 NM DA 又是脑缺血损伤过程中 EAA 损伤的重要环节^[7]。将正常的 DM EM 培养液换成含有 100 $\mu\text{mol/L}$ NM DA 的培养液继续培养 100 min 后,换成正常的 DM EM 培养液继续培养 8 h,形成 NM DA 毒性损伤模型

所有的模型均有 1~24 h 的损伤后细胞恢复过程,并且根据具体实验设立对照组。

1 2 3 细胞形态学观察和 MTT 法测定活细胞数 倒置相差显微镜下观察细胞生长情况和细胞形态,并用照相机拍照

MTT(黄色)为线粒体脱氢酶的作用底物,活细胞内线粒体脱氢酶能将其还原为不溶于水的深紫色

甲瓞结晶(Formazan),此结晶被溶剂溶解后呈紫色,在 570 nm 处有最大吸收峰 参照 Scudiero 等(1988)方法,将 MTT 贮存液(5 mg/mL)加入 DM EM 培养液中使终浓度为 0.5 mg/mL 置细胞于 37°C 中继续培养 4 h 后,吸去上清液(要注意避免吸走甲瓞结晶),加二甲亚砜轻轻振荡,溶解甲瓞结晶,用酶联免疫检测仪在 570 nm 处测光密度值(OD)。

1 2 4 药物的保护作用 先将 Dau 贮备液加入正常的 DM EM 培养液中,使成含不同浓度 Dau 的 DM EM 培养液,用此培养液培养细胞 1 h 使达到平衡后,再进行损伤实验,观察给药组和对照组以及模型组之间的区别。细胞毒性测定采用 MTT 法测得的 OD 值为指标,待测化合物对细胞毒性的抑制率用下式计算:

$$\text{细胞毒性抑制率} = \frac{\text{OD}_{\text{加药组}} - \text{OD}_{\text{模型组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{模型组}}} \times 100\%$$

1 2 5 数据处理 所有实验数据均经统计学处理,数据以均数±标准误表示,数据进行 t 检验

2 结果

2 1 培养细胞的形态学观察

采用倒置相差显微镜观察:PC12 细胞贴壁快,生长速率快,镜检形态边缘清晰,贴壁后大多为梭形,少数为三角形。缺血性损伤模型对原代皮层神经细胞有明显的损伤作用。倒置显微镜下观察细胞,先是胞体肿胀,突起逐渐消失,细胞变圆,最后漂浮起来,并出现细胞碎片,最后细胞死亡(见图 1)。

2 2 MTT 法测定

倒置相差显微镜下可见 MTT 被还原后生成的蓝色甲瓞结晶:开始胞体内可见蓝色小点,后颜色逐渐加深,最后形成结晶,MTT 法测定 OD 值和活细胞数成正比关系,采用成比例稀释的活 PC12 细胞进行 MTT 法测定。MTT 的 OD 值与细胞密度之间有良好的线性关系。缺氧/复氧损伤、缺氧损伤、氧自由基损伤、Caf 毒性损伤、NM DA 兴奋性毒性损伤和 NO 毒性损伤模型都能引起细胞广泛性损伤,MTT 方法可明显区分模型组和对照组

100 $\mu\text{mol/L}$ Dau 能对抗缺血性脑损伤模型造成的细胞损伤,对于缺氧/复氧损伤、氧自由基损伤、Caf 毒性损伤、NM DA 兴奋性损伤和 NO 毒性损伤,Dau 对抗这些损伤的抑制率见表 1

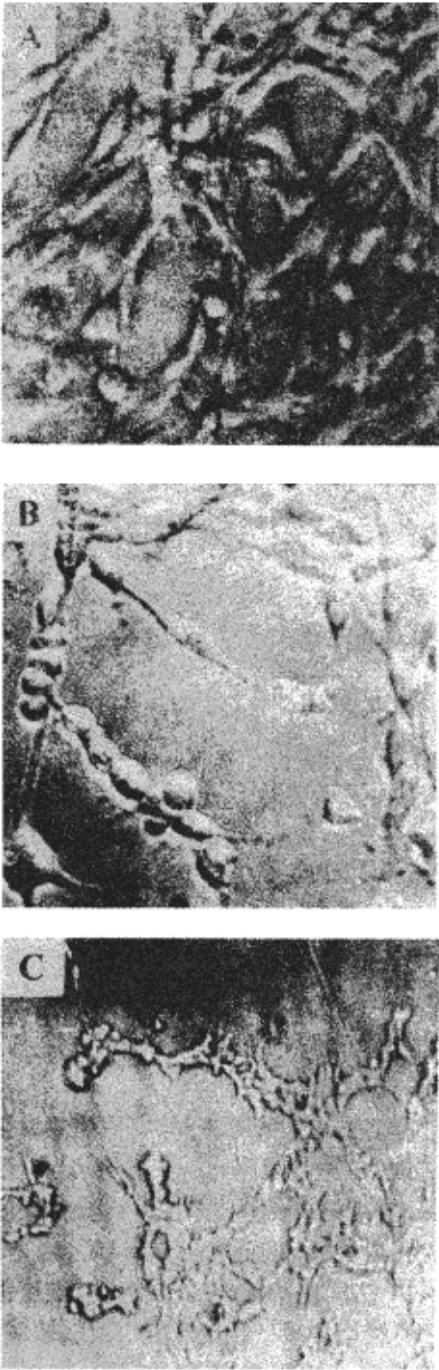


Fig 1 Phase-contrast photomicrographs of the ischemia-like injury on them orphology of cultured PC 12 cells

A: control group($\times 100$ m agnification), B initial change of cell injury($\times 100$ m agnification), C: cell death with detachm ent and distorted plas m embrans($\times 40$ m agnification)

3 讨 论

目前认为脑缺血损伤中至少包括以下几个过

Tab 1 Protection of Dau on isdemia injury on prim ary cultured cortex neurons($n= 6\sim 12, \bar{x}\pm s$)

Model	Protection of 100 μ mol/L Dau(%)
Control	3.1 \pm 0.8
Hypoxia	35.6 \pm 7.6*
Hypoglycose	41.2 \pm 8.7*
Oxidant injury	35.1 \pm 12.8*
NO toxicity	65.4 \pm 16.4*
Caffeine toxicity	29.7 \pm 9.5*
NMDA toxicity	18.7 \pm 6.9*

* * $P < 0.01$, compared with control group

程: 酸中毒、能量耗竭、钙稳态紊乱、自由基损伤 (包括 NO 损伤)、EAA 毒性、蛋白质合成错误和生物膜破坏, 及缺血后恢复期的迟发性神经元死亡 (Delayed Neuronal Death, DND)。缺血损伤过程中, 细胞缺氧, 导致胞外钙内流, 同时还使得受损伤的细胞器将其贮存的内 Ca^{2+} 释放出来, 使 $[Ca^{2+}]_i$ 上升, 出现 $[Ca^{2+}]_i$ 超载导致细胞死亡, 还产生氧自由基损伤和神经元释放 EAA 的损伤。在缺氧的情况下, NMDA 又能刺激一氧化氮合成酶 (NOS) 产生 NO 加强细胞毒性作用。缺氧和缺糖实验模型可以模拟缺血损伤的最初过程, 可以用此来初步检测化合物的抗缺血损伤的活性。自由基、NO、NMDA 损伤模型模拟缺血损伤中的具体过程, 高浓度 Caf 能引起细胞内钙释放, 进而引起细胞内钙稳态紊乱导致细胞死亡。这六个模型反映了整体缺血损伤的不同方面, 提供了药物作用机制的方法。同时 PC 12 细胞是瘤细胞便于培养, 其本身又具有神经细胞的特点。依此模型, 我们对 Dau 的抗脑缺血的作用机制进行了分析。

缺糖导致细胞能量供应停止, 使细胞出现能量耗竭, 从而最终使 $[Ca^{2+}]_i$ 超载导致细胞死亡。Dau 对这一过程有抑制作用, 由于 Dau 能抑制经电压和受体依赖的钙通道的 Ca^{2+} 进入细胞的 Caf 敏感的内钙释放, 对内钙释放有抑制作用^[8], 表明 Dau 可能是在维持细胞稳态过程中起作用。

我们采用氧自由基损伤模型发现 Dau 能抑制这一损伤过程。由于缺血过程中产生的 NO 也是通过自由基这一途径损伤神经细胞, 进一步我们用 SNP 产生 NO 毒性模型, 发现 Dau 也能抑制 SNP 产生的毒性作用, 结果表明 Dau 能抑制自由基的损伤。曾维忠 (1993) 报道 Tet 能抑制由自由基引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 上升。由于 Dau 有较好的钙拮抗作用, 因此 Dau 对自由基损伤的保护作用可能和其维持

细胞内钙稳态功能有关。且 Dau 的衍生物二乙酰基蝙蝠葛苏林碱有较强的 SOD 活性增强功能。由此推测, Dau 的抗氧自由基损伤可能和其增加 SOD 活性有关。

NM DA 受体激活刺激 Ca^{2+} 经 NM DA 受体依赖性钙通道内流,加重胞内钙负荷,同时也激活诱导型一氧化氮合酶 (inducible NOS, NOS)产生 NO,从而进一步损伤细胞。由于 Dau 能抑制 NM DA 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 上升^[9],提示 Dau 对 NM DA 引起的毒性损伤的保护作用,作用机理之一是抑制了 NM DA 受体依赖性的钙通道。文献报道内皮细胞完整的大鼠动脉标本上, Dau 能抑制乙酰胆碱 (ACh)引起的大鼠主动脉环的舒张,并能抑制 cGMP 的形成 (Lu 和 Liu 1990),提示 Dau 可能作用于 NO 途径,并且其作用位点可能不是在腺苷酸环化酶。用 SNP 产生 NO 直接作用于平滑肌从而舒张血管, Dau 对 SNP 引起的舒张作用无影响,表明 Dau 的作用位点是在 NO 的合成上,提示 Dau 可能是通过抑制 NOS 从而减少产生的 NO。联系 Dau 能抑制缺氧复氧和 NM DA 引起的培养神经元损伤的现象,提示: Dau 还通过抑制缺氧复氧损伤过程中, NM DA 刺激引起的 NOS 活性上升产生 NO 这一过程,来保护细胞。

由于存在于脑和血管内皮细胞中的 NOS 的活性都依赖钙调素 (Calmodulin, CaM) 的活性存在,所以抑制 CaM 可能也就会影响 NOS 的活性。胡卓逸等人报道 (1990) BBISQs 普遍具有抗钙调素的作用,其中 Dau 衍生物的抗 CaM 的活性较高。Kondo 等 (1993)^[3]进一步证实直接刺激巨噬细胞产生 NO,包括 Tet 在内的 5 个 BBISQs 化合物均可抑制 NO 产生,提示这些 BBISQs 可能是抑制了 NOS 的活性。我们也同时观察了其他几种 BBISQs 的作用,发现所研究的 BBISQs 都能抑制胸主动脉环内皮依赖性舒张,只是抑制强度有差异^[10],而对 SNP 引起的去内皮动脉环的舒张无影响,说明 BBISQs 抑制内皮依赖性舒张的作用可能是这类化合物的共性。对诱导型 NOS (iNOS)同

源性的研究表明,不同动物及细胞内的 NOS 都是只有一种 NOS (Sherman 等 1993)。联系 Dau 能抑制缺氧复氧和 NM DA 引起的培养神经元损伤的现象,提示 Dau 还通过抑制缺氧复氧损伤过程中, NM DA 刺激引起的 NOS 活性上升产生 NO 这一过程,来保护细胞。

致谢 王仁刚,孙继红同志在实验过程给予帮助。

参考文献

- 1 Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al. Nitric oxide mediate glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 6368
- 2 Duncan CJ, Shamsadeen N. Ultrastructural changes in mitochondria during rapid damage triggered by calcium. In Duncan ed. *Calcium, Oxygen Radicals and Cellular Damage*. Cambridge University Press, 1991
- 3 Kondo Y, Takano E, Hojo H. Inhibitory effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem Pharmacol*, 1993, **46**: 1887
- 4 Maiese K, Bonicelli I, Denno D, et al. Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity. *J Neurosci*, 1993, **13**: 3034
- 5 Lu YM, Liu GQ. The effects of daurisorline on Ca^{2+} influx in presynaptic nerve terminals. *Br J Pharmacol*, 1990, **12**: 73
- 6 Pan Z, Perez-Polo R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J Neurochem*, 1993, **61**: 1713
- 7 Pedata F, Latini S, Pugliese AM, et al. Investigations into the adenosine outflow from hippocampal slices evoked by ischemia-like conditions. *J Neurochem*, 1993, **61**: 284
- 8 Salvaterra CG, Goldman WF. Direct effect of hypoxia on apparent intracellular calcium levels in cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am Rev Respir Dis*, 1991, **143**: A373
- 9 Wang T, Liu CQ, Feng XY, et al. Daurisorline protects caffeine-induced neurotoxicity by inhibiting intracellular calcium release in culture. *Acta Pharmacol Sinica*, 1996, **16**: 90
- 10 王 霆, 刘国卿, 叶小英等. 几种双苄基异喹啉类化合物对内皮依赖舒张的抑制作用. 第五次全国生化药理学术会议论文集 (天津), 1995: 5
- 11 Wang T, Liu CQ, Feng XY, et al. The protective effect of daurisorline against NM DA-induced neurotoxicity by inhibiting calcium channel in culture. *Chin J Neurosci*, 1995, Suppl C 24

Protective Effect of Daurisoline against Ischemic Injury in Culture

Wang Ting, Zhu Xingzu¹, Liu Guoqing, Feng Xinying

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

¹Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032

Abstract Six cerebral ischemia models including hypoxia, hypoglycose, oxidant injury, calcium overload, nitric oxide(NO) neurotoxicity and excitatory amino acid(EAA) injury were used to assay the anti-ischemic roles of the drug by using cultured PC12 cells. Neurotoxicity was determined by the MTT assay. Daurisoline(Dau), a bisbenzylisoquinoline alkaloid(BBISQA) which had anti-ischemic effect *in vivo*, was tested in the models. The results showed that about 50%~70% of the cells were damaged in these models. 100 μ mol/L Dau protected cells from all the injury models and was more sensitive to NO induced neurotoxicity.

Key words PC12 cell; Ischemia; Daurisoline

【文摘 006】葛根总黄酮对血液粘度、血栓形成及血小板功能的影响 禹志领, 张广钦, 赵红旗. 中药材, 1997, 20(9): 468~469

葛根总黄酮 500或 1000mg/kg 连续 po 7 d 能显著降低大鼠全血粘度、血小板粘附率, 抑制血栓形成及 ADP 诱导的血小板聚集; 还能明显抑制 ADP 诱导的小鼠体内血小板血栓形成。

【文摘 007】关附甲素对豚鼠乳头肌动作电位最大除极速度的频率依赖性抑制作用 (英文) 季慧芳, 张陆勇, 王秋娟, 刘静涵. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11(4): 241~245

应用标准微电极技术, 研究了关附甲素对豚鼠右心室乳头肌动作电位最大除极速率 (V_{max}) 的频率依赖性抑制作用 (RDB), 并与美西律、奎尼丁、劳卡尼进行了比较。在相同刺激间隔 (300ms), 产生 50% 左右 RDB 的药物浓度下, 美西律的 RDB 开始最快, 其第 2 个 V_{max} 所产生的抑制已占 RDB 的 64%, 奎尼丁、劳卡尼和关附甲素的 RDB 开始速率常数分别为每个动作电位 0.165、0.076 和 0.136。美西律、奎尼丁、劳卡尼和关附甲素产生 RDB 的恢复时间常数分别为 1.49、0.18、2 和 44.0 s, 而且它们的恢复时间常数是不依赖于药物浓度而变化的, 结果提示, 关附甲素是一个慢动力学钠通道阻滞剂。

【文摘 008】地黄煎剂消退 L-甲状腺素诱发的大鼠心肌肥厚并抑制其升高的心、脑线粒体 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活力

陈丁丁, 戴德哉, 章涛. 中药药理与临床, 1997, 13(4): 27

L-甲状腺素 4mg/kg \cdot d 连续 po 7 d 诱发大鼠心肌肥厚和心、脑线粒体 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活力显著升高。经地黄 4g/kg \cdot d po 治疗 3 d 后, 心肌肥厚及其心、脑升高的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活力显著降低, 但未恢复至正常。结论: 地黄消退 L-甲状腺素诱发的大鼠缺血性心肌肥厚并抑制升高的心、脑线粒体 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活力, 保护心脑血管组织避免 ATP 耗竭和缺血损伤。

【文摘 009】噻氯匹定对鹌鹑实验性动脉粥样硬化的抑制作用及其机理 朱东亚, 邓德峰, 易宏伟, 华维一. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11(4): 263~266

用食饵性动脉粥样硬化 (AS) 模型, 研究噻氯匹定的抗 AS 作用。噻氯匹定 20 和 60mg \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 连续 8wk, pq 能显著抑制鹌鹑动脉内膜 AS 斑块形成。每 2wk 测定血清血脂, 该药对甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平无明显影响, 但使高密度脂蛋白胆固醇略有升高。于 AS 造型 2 和 4wk 血清 NO 水平下降; 在 AS 造型 6wk NO 水平升高, 噻氯匹定可逆转 AS 造型引起的 NO 水平变化。用放免法分析该药对前列环素合成的影响, 结果噻氯匹定 3.3、10 和 30mg \cdot kg $^{-1}$, 24h 内 ig 3 次, 均显著提高大鼠动脉壁 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 含量。结果表明噻氯匹定可抑制鹌鹑实验性 AS 斑块形成, 除抑制血小板功能外, 保护内皮功能可能也是该药抑制 AS 病变形成的重要机理。