

◇ 药学研究 ◇

内源性内皮衍生超极化因子对缺氧/再给氧致大鼠海马神经细胞凋亡的抑制作用

余小蒙 吴 剑 陈志武 郭 岩

摘要 目的 研究乙酰胆碱(ACh)诱导内源性内皮衍生超极化因子(EDHF)对缺氧/再给氧大鼠海马神经细胞凋亡的影响。方法 取原代培养的大鼠海马神经细胞制备缺氧/再给氧损伤模型;大鼠大脑中动脉(MCA)血管段用一氧化氮合酶抑制剂N^G-nitro-L-argininemethyl ester(L-NAME)和前列环素抑制剂indomethacin(Indo)预处理,用ACh诱导血管内皮细胞合成释放内源性EDHF;分别用流式细胞仪法和Hoechst荧光法检测海马神经元凋亡。结果 流式细胞仪法和Hoechst荧光法检测均表明假缺氧组海马神经细胞的凋亡率很低,分别为3.1%和2.2%左右,而缺氧/再给氧的模型组细胞凋亡率有显著升高;与缺氧/再给氧模型组相比,内皮完整血管段合用1 μmol/L ACh或合用1 μmol/L ACh、30 μmol/L L-NAME及10 μmol/L Indo均可明显抑制缺氧/再给氧所致的细胞凋亡,而单用ACh或内皮完整的血管或ACh合用去内皮的血管段对细胞凋亡无明显影响。结论 ACh诱导大鼠脑血管内皮细胞释放的内源性EDHF对缺氧/再给氧海马神经细胞凋亡有明显的抑制作用。

关键词 内皮依赖性超极化因子;海马神经细胞;细胞凋亡;缺氧/再复氧

中图分类号 R 743;R 322.81;R 329.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1258-05

内皮依赖性超极化因子(endothelium-dependent hyperpolarizing factor, EDHF)是血管内皮细胞释放的除一氧化氮(nitric oxide, NO)和前列环素(prostacyclin, PGI₂)外的第三种舒血管因子^[1]。许多研究^[2-4]表明乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、腺苷等可通过作用于血管内皮细胞促进EDHF释放,引起血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)上的Ca²⁺依赖性钾通道(K_{Ca})的开放和K⁺的外流,从而引起VSMC超极化,导致Ca²⁺内流的减少和血管舒张。脑血管内皮细胞也能合成释放

EDHF。鉴于神经细胞同VSMC一样,也有细胞膜电位的超极化,设想EDHF也可能作用于神经细胞,使其超极化,从而抑制Ca²⁺超载所致的神经细胞凋亡。因此,该研究采用ACh诱导大鼠大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)释放EDHF,在原代培养海马神经细胞缺氧/再给氧损伤模型上,观察EDHF对海马神经细胞凋亡的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD成年大鼠和乳鼠,普通级,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 试剂 ACh、N^G-nitro-L-argininemethyl ester(L-NAME)、indomethacin(Indo)、L-谷氨酰胺、多聚L-赖氨酸、Hoechst 33258及碘化丙啶(美国Sigma公司);PBS粉末(武汉博士德公司);DMEM/F12培养液、Neurobasal medium、B27 supplement、胰蛋白酶和胎牛血清(美国Gibco公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 MCA血管段的制备 取250~350 g雄性SD大鼠,水合氯醛麻醉,在无菌条件下快速取出大脑,分离两侧大脑的MCA,剪成约3.5 mm的血管段,于37℃ PSS液(mmol/L: NaCl 119、KCl 4.7、CaCl₂ 2.5、NaHCO₃ 24、KH₂PO₄ 1.18、MgSO₄ 1.17、glucose 5.5和EDTA 0.026, pH 7.4)中放置30 min,备用。

1.4 海马神经细胞的培养及缺氧/再给氧损伤模型的建立 取出生24 h内的SD乳鼠,在超净工作台,快速取出大脑,在解剖显微镜下分离出海马组织,转移到含有0.125%胰蛋白酶的PBS平衡液中,把脑组织剪碎成约1 mm³的小块,37℃培养箱消化25 min,然后加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打后,用200目的滤网过滤,900 r/min离心5 min,去上清液,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基轻柔吹打呈混悬液,调整细胞密度为1×10⁹个/L。将细胞接种于事先用多聚赖氨酸处理过的6孔板中,置于5% CO₂、37℃培养箱中培养1 d,然后用Neurobasal完全培养液(含终浓度为2%的B27和0.5 mmol/L L-谷氨酰胺)换液,以后每2 d换液1次,培养6~8 d后进行实验。

2014-02-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173596);安徽省自然科学基金(编号:11040606M196)

作者单位:安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介:余小蒙,女,硕士研究生;

郭岩,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: guoyanxz@126.com

取上述培养 6~8 d 的海马神经细胞,用 Neuro-basal 完全培养液全量换液,置于含 10% CO₂ 和 90% N₂ 的培养箱中缺氧处理 4 h,再正常给氧培养 24 h。实验随机分为 7 组,① 假缺氧组(A 组):海马神经细胞不给予缺氧处理;② 缺氧/再给氧模型组(B 组):海马神经细胞缺氧 4 h,再给氧培养 24 h;③ ACh 组(C 组):缺氧前,在细胞培养液中加入 1 μmol/L ACh;④ 血管组(MCA/ + Endo, D 组):缺氧前,在细胞培养液中加入两段内皮完整的 MCA 血管段;⑤ ACh 合用内皮完整血管组(MCA/ + Endo + ACh, E 组):缺氧前加入两段完整的 MCA 血管段和 1 μmol/L ACh;⑥ ACh 合用去内皮血管组(MCA/ - Endo + ACh, F 组):缺氧前加入两段去内皮的 MCA 血管段和 1 μmol/L ACh;⑦ EDHF 组(MCA/ + Endo + Indo + L-NAME + ACh, G 组):缺氧前,在细胞培养液中加入两段内皮完整的血管段及 30 μmol/L L-NAME、10 μmol/L Indo 和 1 μmol/L ACh。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 参考文献^[5-6]方法,收集各组缺氧/再给氧海马神经细胞,1 500 r/min 离心 5 min,去上清液,将细胞悬浮于冰冷 PBS 中,混匀,1 500 r/min 离心 5 min 后,去上清液,加入 2 ml 冰冷 PBS 使细胞悬浮。向细胞悬液喷入预冷的 95% 乙醇 6 ml(乙醇终浓度为 70%),用 400 目滤网过滤,1 500 r/min 离心 5 min 后去掉固定液,加入 0.3 ml PBS 使细胞悬浮,加入 200 μl RNAase 37 °C 水浴 25 min,加入 500 μl 碘化丙啶染液(终浓度为 50 μg/ml) 4 °C 避光 30~120 min 内上流式细胞仪检测,在激发波长 488 nm 处记录红色荧光。

1.6 Hoechst 33258 测定细胞凋亡 缺氧/再给氧结束后,将荧光染料 Hoechst 33258 依次加入各组细胞中(终浓度为 15 μmol/L) 37 °C 孵育 25 min, PBS 洗 2 次,于荧光显微镜下每组选取 3 个视野,计算凋亡细胞数占总细胞数的细胞凋亡百分率。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 海马神经细胞原代培养 培养 6~8 d 的海马神经细胞在镜下观察可见细胞胞体饱满,突起分支增多,形成致密的网络。见图 1。

2.2 缺氧/再给氧对大鼠海马神经细胞凋亡的影响 在流式细胞仪上,细胞凋亡表现为在 G1 峰左侧检测出亚二倍体细胞群的峰型。A 组海马神经细胞

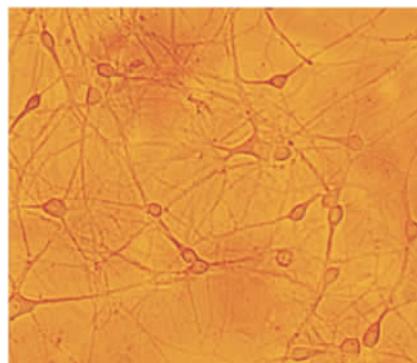


图 1 正常培养 8 d 的海马神经元 ×400

凋亡发生率很低,只有 3.1% 而 B 组细胞凋亡则有明显的增多,高达 33.4% 与 A 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。正常海马神经细胞在 Hoechst 33258 染色后,在荧光显微镜下细胞核呈暗绿色,颜色较深,而凋亡细胞的细胞核呈明亮鲜艳的绿色荧光。A 组中仅有零星分布呈明亮的绿色荧光的凋亡细胞,荧光亮度不明显,而 B 组则有大量的明亮绿色荧光的凋亡细胞分布,与 A 组比较,细胞凋亡发生率从 2.2% 上升至 20.3%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

2.3 ACh 及血管内皮对大鼠海马神经细胞凋亡的影响 流式细胞仪法和 Hoechst 33258 染色法检测结果显示:与 A 组比较,C、D 组的细胞凋亡率均无明显变化($P > 0.05$),但 E 组的大鼠海马神经细胞凋亡有明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),F 组大鼠海马神经细胞凋亡则无明显影响($P > 0.05$)。见图 2、3。

2.4 EDHF 对流式细胞仪法检测的大鼠海马神经细胞凋亡的影响 与 A 组相比,G 组可明显抑制缺氧/再给氧所致的细胞凋亡,细胞凋亡率从 B 组的 33.4% 下降至 24.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.5 EDHF 对 Hoechst 33258 染色法测定的大鼠海马神经细胞凋亡的影响 Hoechst 33258 染色检测也表明 G 组可明显地减少海马神经细胞凋亡的发生,细胞凋亡率从 B 组的 20.34% 下降至 14.18% 左右,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

神经细胞与其他细胞相比,对缺血缺氧较敏感。而海马为神经系统的重要部位,对缺血缺氧最为敏感,多用于脑缺血缺氧损伤方面的研究。本研究使用无血清法培养海马神经元,即用神经细胞营养因

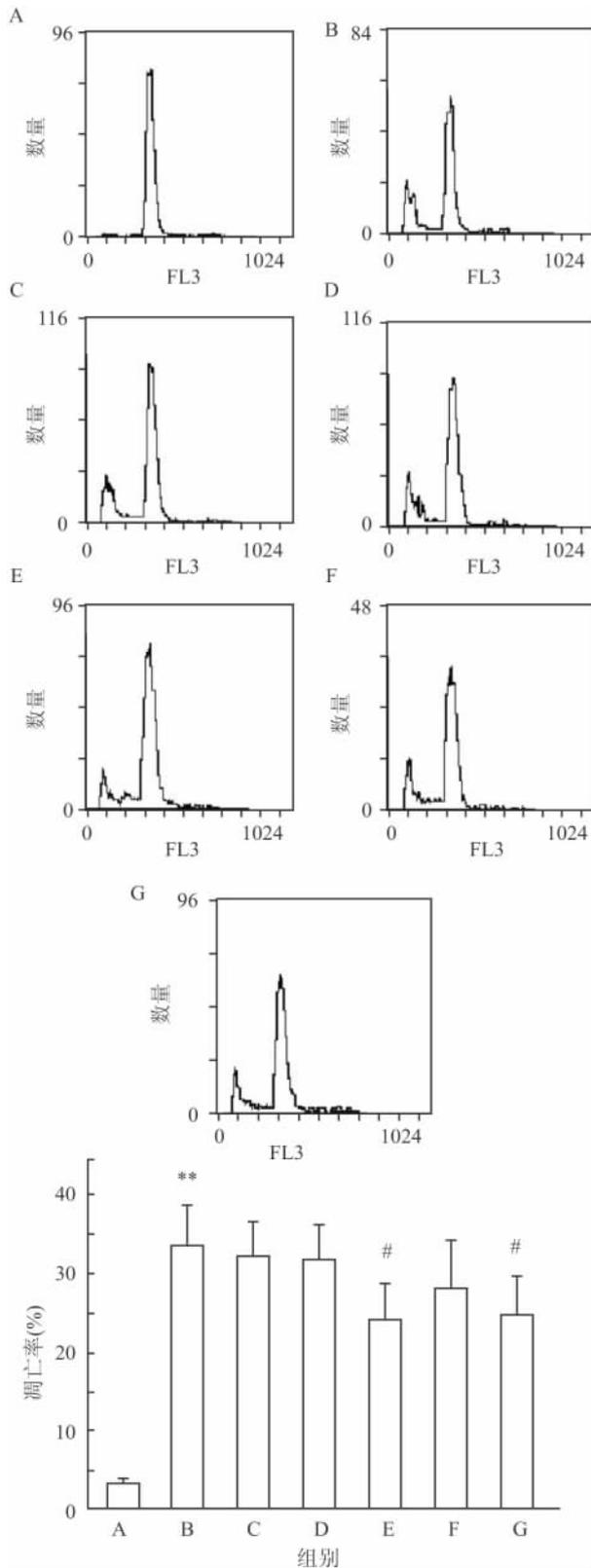


图2 ACh 诱导的 EDHF 对缺氧/再给氧致原代培养海马神经细胞凋亡的影响

A:假缺氧组;B:缺氧/再给氧模型组;C:Ach 组;D:内皮完整血管组;E:ACh 合用内皮完整血管组;F:ACh 合用去内皮血管组;G:EDHF 组;与假缺氧组比较: ** $P < 0.01$;与缺氧/再给氧模型组比较: # $P < 0.05$

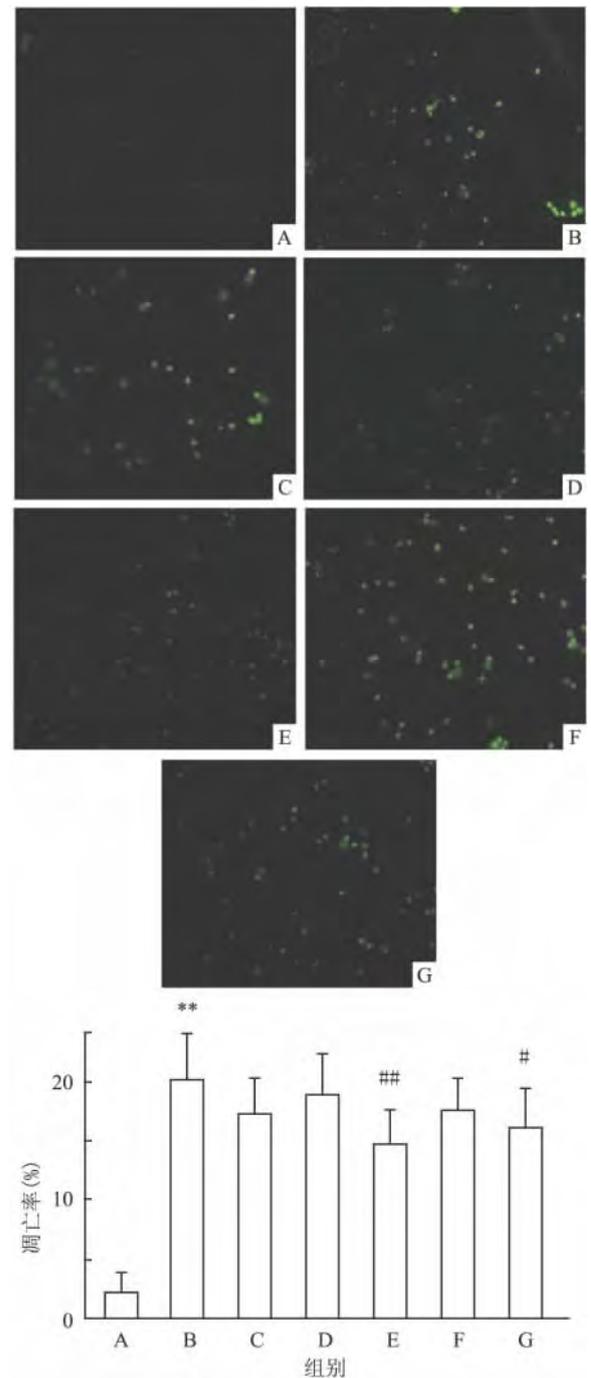


图3 ACh 诱导的 EDHF 对原代培养海马神经细胞凋亡率的影响

A:假缺氧组;B:缺氧/再给氧模型组;C:Ach 组;D:内皮完整血管组;E:ACh 合用内皮完整血管组;F:ACh 合用去内皮血管组;G:EDHF 组;与假缺氧组比较: ** $P < 0.01$;与缺氧/再给氧模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

子 B27 替代血清来培养海马神经细胞,培养出的细胞纯度高,干扰因素少,有利于实验^[7-8]。

细胞凋亡是细胞为保持内环境稳定,由基因掌控的细胞自发的、有序的死亡,在各种组织和器官发育的特定阶段及生长调节中发挥重要作用,也是细

胞损伤重要方式之一^[9]。引起细胞凋亡的主要原因有细胞能量的耗竭、自由基的增加和 Ca^{2+} 超载等因素。脑缺血缺氧引发的神经细胞死亡主要表现为凋亡。研究^[10]显示,脑缺血缺氧引发释放的谷氨酸能激活细胞膜上 NMDA 受体,导致细胞内外 Ca^{2+} 分布的改变,诱发细胞凋亡。本研究对体外培养的海马神经元进行缺氧 4 h 复氧 24 h 以使神经细胞受损,制备凋亡模型。Hoechst 33258 染色法和流式细胞仪法结果均表明,神经细胞缺氧再复氧后凋亡率显著增加,说明本研究制备的凋亡模型可靠。

目前对 EDHF 的研究主要表现在对平滑肌细胞的舒张作用,关于其对神经细胞影响的研究却很少^[11]。现通过研究 EDHF 对缺氧/再给氧致海马神经细胞凋亡的抑制作用来探讨 EDHF 对神经细胞的保护作用。由于不明确 EDHF 为何种物质,只了解 ACh 可诱导血管内皮细胞合成释放 NO、 PGI_2 和 EDHF 等血管舒张因子,对 EDHF 的研究主要是采用合用 NO 合酶抑制剂和 PGI_2 合成抑制剂抑制血管内皮细胞合成 NO 和 PGI_2 后,用缓激肽或 ACh 来促进血管内皮细胞合成释放 EDHF^[1]。本研究中的 EDHF 组,即在 ACh 合用内皮完整血管抑制缺氧/再给氧致海马神经细胞凋亡的研究中加入了 NO 合酶抑制剂 L-NAME 和 PGI_2 合成抑制剂 Indo 以抑制 NO 和 PGI_2 的合成,结果表明可明显抑制缺氧/再给氧所致的海马神经细胞的凋亡,而此抑制作用与 PGI_2 和 NO 无关,应是 ACh 诱导血管内皮合成释放 EDHF 产生的,表明内源性 EDHF 对原代培养海马神经细胞缺氧/再给氧损伤导致的细胞凋亡有明显的抑制作用,这与本课题组以前报道^[5]的 EDHF 可抑制缺氧/再给氧致海马神经细胞 MTT 染色吸光度值降低和上清液 LDH 活性升高是一致的。

综上所述,ACh 诱导血管内皮细胞合成释放的 EDHF 对原代培养海马神经细胞凋亡有明显的抑制作用,表明这可能是 EDHF 对原代培养海马神经细

胞缺氧/再给氧损伤产生保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] Jin X ,Otonashi-Satoh Y ,Sun P ,et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) mediates endothelium-dependent vasodilator effects of aqueous extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves in rat mesenteric resistance arteries [J]. Acta Med Okayama 2008 62(5) :319 - 25.
- [2] 范一菲,孔德虎,陈志武,等. 血管内皮依赖性超极化因子的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(10) :1087 - 91.
- [3] Tang G ,Yang G ,Jiang B ,et al. H_2S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19(14) :1634 - 46.
- [4] Takaki A ,Morikawa K ,Tsutsui M ,et al. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice [J]. J Exp Med 2008 205(9) :2053 - 63.
- [5] 吴剑,陈志武. 乙酰胆碱介导的内皮超极化因子对海马神经元缺氧/再给氧损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(12) :1624 - 9.
- [6] Zhang H F ,Liu Y J ,Zhu Q F ,et al. Protective effects of extract of *Ginkgo biloba* leaves (EGB 761) on apoptosis of cultured hippocampal neurons induced by nitric oxide donor, SNP [J]. Chin JMAP 2003 20(2) :94 - 7.
- [7] 李巷,康慧聪,刘晓艳,等. 腺苷对原代培养的大鼠海马神经元大电导钙激活钾通道的作用 [J]. 华中科技大学学报, 2012, 41(3) :264 - 7.
- [8] Hemstapat K ,Smith M T ,Monteith G R. Measurement of intracellular Ca^{2+} in cultured rat embryonic hippocampal neurons using a fluorescence microplate reader: potential application to biomolecular screening [J]. J Pharmacol Toxicol Methods 2004 49(2) :81 - 7.
- [9] 尹艳艳,朱芬芳,吴国翠,等. 黄芪总苷对大鼠神经元缺氧/复氧损伤的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(11) :1173 - 7.
- [10] Chen M ,Sun H Y ,Hu P ,et al. Activation of BK_{Ca} channels mediates hippocampal neuronal death after reoxygenation and reperfusion [J]. Mol Neurobiol 2013 48(3) :794 - 807.
- [11] 周方杰,陈志武. 硫化氢介导的大鼠大脑中动脉的内皮源性超极化因子反应 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(8) :768 - 71.

The inhibition of endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of hippocampal neurons in rats

Yu Xiaomeng , Wu Jian , Chen Zhiwu , et al

(Dept of Pharmacology , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of acetylcholine (ACh) induced endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) on apoptosis of rat hippocampal neurons. **Methods** Primarily cultured hippocampal neu-

泼尼松和 TACI-Ig 联合用药对 MRL/lpr 小鼠产生自身抗体的作用及机制

邓晓媚*, 严尚学*, 魏 伟

摘要 目的 研究泼尼松和跨膜激活和钙调亲环素配体相互作用因子融合蛋白(TACI-Ig)联合用药对系统性红斑狼疮 MRL/Mpslac-lpr(MRL/lpr)小鼠的治疗作用及部分机制。方法 将 MRL/lpr 小鼠随机分为 6 组,即模型组、醋酸泼尼松(Pre)组(2.5、5.0 mg/kg)、TACI-Ig 组(15.0 mg/kg)、Pre + TACI-Ig [(2.5 + 7.5)、(2.5 + 15.0) mg/kg]联合用药组,另设 BALB/c 小鼠作为正常对照组。各给药组小鼠每日灌胃给予 Pre、TACI-Ig 隔日皮下注射给药,模型组和正常对照组给予生理盐水,共计 13 周。观察联合用药对小鼠一般体征和尿蛋白的影响,HE 染色法检测小鼠脾脏和肾脏病理学变化,ELISA 法检测小鼠血清中自身抗体和 B 细胞活化因子(BAFF)水平的变化,流式细胞术检测脾脏浆细胞亚群比例,免疫组化法检测脾脏 CD138 的变化。结果 Pre 和 TACI-Ig 联合用药可以改善 MRL/lpr 小鼠皮肤损伤,降低尿蛋白,明显减少脾脏生发中心形成和白髓增生,显著减轻小鼠肾脏肾小球系膜细胞增生和肾小球纤维化,改善炎症状态,降低脾

脏浆细胞(CD19⁻CD138⁺)的比例,降低血清 BAFF 和抗核抗体(ANA)水平,但是对抗 ds-DNA 抗体水平无明显影响。

结论 Pre 和 TACI-Ig 联合用药对 MRL/lpr 小鼠具有治疗作用,其机制可能与抑制浆细胞分化、降低自身抗体产生有关。

关键词 系统性红斑狼疮;TACI-Ig;醋酸泼尼松;联合用药;浆细胞;自身抗体

中图分类号 R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1262-07

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多系统、多器官的自身免疫疾病,以 B 淋巴细胞异常活化、自身反应性浆细胞异常增殖以及自身抗体大量产生、免疫复合物沉积导致的组织损伤为主要特征^[1-3]。B 淋巴细胞活化因子(B cell activating factor of the TNF family, BAFF)是 B 细胞存活、成熟、分化、抗体类别转换和分泌所需的重要因子^[4]。在 SLE 患者及狼疮动物模型体内均检测到 BAFF 表达水平的升高^[5],降低 BAFF 水平可明显改善 SLE 症状。跨膜激活和钙调亲环素配体相互作用因子融合蛋白(transmembrane activator and Calcium modulator cyclophilin ligand interactor-immunoglobulin, TACI-Ig)是将 TACI 的胞外部分与人 IgG-Fc 片段结合制成的可溶性新型生物制剂,作为一种诱骗受体,可以竞争性与 BAFF 结合,降低体内游离的 BAFF 水平,抑制 BAFF 的作用^[6]。糖皮

2014-05-09 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A177);国家自然科学基金(编号:81173075、81330081)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,合肥 230032

作者简介:邓晓媚,女,硕士研究生;

魏 伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

rons were insulted by hypoxia/reoxygenation (H/R), and EDHF from rat MCA segment was induced by acetylcholine (ACh) in the presence of N^G-nitro-L-argininemethyl ester (L-NAME) and indomethacin (Indo), the rate of hippocampal neuron apoptosis was detected by Hoechst staining and flow cytometry (FC) methods. **Results** Examinations of FC and Hoechst staining showed that the apoptotic rate of rat hippocampal neurons was very low in the sham group, only about 3.1% and 2.2% respectively, but H/R injury caused an obvious increase of apoptosis of rat hippocampal neurons. Co-administration of endothelium-intact MCA segment with 1 μmol/L ACh or co-administration of endothelium-intact MCA segment with 1 μmol/L ACh + 30 μmol/L L-NAME + 10 μmol/L Indo markedly inhibits H/R-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. However, administration of ACh or MCA segment separately had not effect on H/R-induced apoptosis of rat hippocampal neurons, and neither did co-administration of endothelium-denuded MCA segment with ACh. **Conclusion** Endogenous EDHF released from ACh-induced vascular endothelial cells significantly inhibits H/R-caused apoptosis of rat primarily cultured neurons.

Key words endothelium-derived hyperpolarizing factor; hippocampal neuron; apoptosis; hypoxia/reoxygenation