

丁基苯酞对大鼠局部脑缺血再灌注损伤皮层 钙调磷酸酶和钙蛋白酶活性的影响

董高翔, 冯亦璞*

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

关键词: 丁基苯酞; 脑缺血; 神经细胞凋亡; 钙调磷酸酶; 钙蛋白酶

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)10-0790-03

近年大量文献报道蛋白水解酶在缺血性脑损伤中起重要作用。目前有人报道蛋白水解酶钙调磷酸酶(calcineurin)和钙蛋白酶(calpain)的激活可导致脑缺血神经细胞凋亡而且其抑制剂对缺血性损伤起保护作用^[1-3]。丁基苯酞(DL-3-*n*-butylphthalide, NBP)是我所近年开发的一个新型抗脑缺血药物,有良好的抗脑缺血作用。研究表明 NBP 对低氧低糖及大脑中动脉阻断(MCAO)诱导的大鼠皮层神经细胞凋亡有明显的抑制作用^[4],这可能是 NBP 缩小 MCAO 后脑梗塞体积的原因。本文旨在研究 NBP 对凋亡抑制作用的机制是否与大鼠脑皮层 calcineurin 和 calpain 的活性改变有关,以期为该药用于临床提供有力的理论依据。

材 料 和 方 法

动物 体重 260~280 g, ♂ Wistar 大鼠,由中国医学科学院动物繁殖中心提供。

试剂与药品 *O*-phospho DL-tyrosine, 孔雀绿, 酪蛋白(钠盐), lysocephalin, 钙调素(CaM)及 3-*N*-吗啡啉丙磺酸(MOPS)均为 Sigma 产品; DTT, Tween-20, β -巯基乙醇为 Serva 产品; HEPES, EGTA 等为国产分析纯。

大鼠 MCAO 模型 体重 284 ± 19 g, ♂ Wistar 大鼠,以水和氯醛(400 mg·kg⁻¹, ip)麻醉,用大脑中动脉栓塞法造成局部性脑缺血 2 h 后,动物重新麻

醉,尼龙线自颈外动脉抽出,恢复颈总动脉血流再灌注 24 h^[5]。

实验分组 给药方式和组织匀浆制备 动物分 7 组,每组 5 只:假手术组、缺血对照组、DL-NBP 5, 10 及 20 mg·kg⁻¹及 *D*-和 *L*-NBP 20 mg·kg⁻¹ 各组。于缺血前 10 min ip NBP。大鼠于局部脑缺血 2 h,再灌注 24 h 后迅速断头取脑,在冰浴上分离出缺血侧皮层和对侧皮层并各分成两份,制成 10% 的组织匀浆。以测定 calcineurin 和 calpain 的活性。

Calcineurin 活性测定^[6-8] 取缺血侧和对侧皮层,按 1:9 的比例加入 MOPS 缓冲液(mmol·L⁻¹: MOPS 25, CaCl₂ 0.3, CaM 0.025)制成组织匀浆。1 000 × g 离心 10 min(4℃),取上清液 130 μL,加 6.6 mmol·L⁻¹的 *O*-phospho DL-tyrosine 23 μL。30℃ 孵育 40 min 后,以孔雀绿显色反应检测被水解的磷含量。于 660 nm 波长测吸光度。以磷酸二氢钾为标准品制备标准曲线(线性范围为 2~16 nmol)。Lowry 法定量蛋白含量。

Calpain 活性测定^[9,10] 取皮层组织加入 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(mmol·L⁻¹: β -mercaptoethanol 5; EDTA 0.1; DTT 10; lysocephalin 5)在冰浴上用玻璃匀浆器将其制成组织匀浆,1 000 × g 离心 10 min(4℃),取上清液置 4℃ 冰箱待测 calpain 活性。每个样品分成两管,总体积为 200 μL,一管为无 Ca²⁺ 体系,内含酪蛋白 0.4 mg, 12 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EGTA, 及上清液 40 μL; 另一管除用 1 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 代替 EGTA 外,余内容物均相同。25℃ 反应 30 min 后依此向各管加入蒸馏水 3.0 mL,考马斯亮蓝 G250 染液(考马斯亮蓝 G250 0.05%, 乙醇 23.5%, 磷酸 42.5%) 0.8 mL,充分混合 10 min 后

收稿日期: 1999-11-30

基金项目: 国家科委 1035 工程重大项目基金(94-ZD-01)和国家自然科学基金重大项目基金资助(29790122)

作者简介: 冯亦璞,女,教授,博士生导师。

* 联系人 Tel: (010) 631 651 73, Fax: (010) 6301 7757,

E-mail: fengpy@public.gb.com.cn

于 595 nm 测吸光度。最后每个样品的 calpain 酶活性用各相应的无钙管吸光度(A)减去有钙管所得差值来计算。各管 calpain 活性以 $\Delta A/h \cdot mg^{-1}$ (protein) 表示。蛋白定量采用 Lowry 法。

数据统计 两酶活性以均数 \pm 标准差表示, 组间比较用 *t* 检验。

结 果

1 丁基苯酞对脑缺血再灌损伤缺血侧和对侧皮层 calcineurin 活性的影响

结果见表 1。非缺血侧各组间 calcineurin 活性均无显著性差异。假手术组手术侧皮层组织 calcineurin 活性为 $(101.7 \pm 5.9) \mu mol Pi/h \cdot g^{-1}$ (protein), MCAO 后其活性升高达 141.3 ± 18.1 , 与假手术组比较有显著差异, DL-NBP 10, 20 $mg \cdot kg^{-1}$ 和 D-NBP 20 $mg \cdot kg^{-1}$ 均能显著降低 calcineurin 活性, DL-NBP 5 $mg \cdot kg^{-1}$ 和 L-NBP 20 $mg \cdot kg^{-1}$ 组其活性有降低倾向, 但无统计学意义。结果表明: 脑缺血再灌能使大鼠皮层 calcineurin 活性增加, 而应用 NBP 后该酶活性能不同程度地降低。提示 NBP 抗脑缺血的作用可能与其降低 calcineurin 活性有关。

Tab 1 Changes in calcineurin activities in ipsilateral and contralateral cortex. NBP was administrated ip 10 min before tMCAO in rats ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

| Group | C/ $mg \cdot kg^{-1}$ | Contralateral | Ipsilateral |
|---------|-----------------------|---------------|----------------------------|
| Sham | | 105 \pm 8 | 102 \pm 6 |
| Vehicle | | 112 \pm 6 | 141 \pm 18 [#] |
| DL-NBP | 5 | 106 \pm 8 | 134 \pm 11 |
| | 10 | 107 \pm 8 | 122 \pm 8 [*] |
| | 20 | 106 \pm 9 | 108 \pm 10 ^{**} |
| D-NBP | 20 | 106 \pm 12 | 111 \pm 10 ^{**} |
| L-NBP | 20 | 107 \pm 7 | 128 \pm 14 |

Calcineurin activities were expressed as $\mu mol Pi/h \cdot g^{-1}$ (protein). * $P < 0.05$, ** ($\#\#$) $P < 0.01$ compared with vehicle (sham) group

2 丁基苯酞对脑缺血再灌损伤缺血侧和对侧皮层 calpain 活性的影响

Calpain 活性测定结果见表 2。非缺血侧各组间 Calpain 活性均无显著性差异。缺血侧假手术组皮层组织 Calpain 活性为 $(1.65 \pm 0.2) \Delta A/h \cdot mg^{-1}$ (protein), 而缺血再灌后其活性显著升高为 $2.73 \pm$

0.41 ($P < 0.01$)。DL-NBP 20 $mg \cdot kg^{-1}$ 和 D-NBP 20 $mg \cdot kg^{-1}$ 其活性降低明显, 分别为 1.74 ± 0.25 和 $(1.95 \pm 0.28) \Delta A/h \cdot mg^{-1}$ (protein)。而 DL-NBP 5, 10 $mg \cdot kg^{-1}$, L-NBP 20 $mg \cdot kg^{-1}$ 其活性有降低趋势, 但无统计学意义。表明 D-NBP 和 L-NBP 作用强度可能有一定的差异。

Tab 2 Changes in Calpain activities in ipsilateral and contralateral cortex. NBP was administrated ip 10 min before tMCAO in rats ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

| Group | C/ $mg \cdot kg^{-1}$ | Contralateral | Ipsilateral |
|---------|-----------------------|-----------------|-------------------------------|
| Sham | | 1.72 \pm 0.25 | 1.65 \pm 0.21 |
| Vehicle | | 1.83 \pm 0.21 | 2.7 \pm 0.4 [#] |
| DL-NBP | 5 | 1.81 \pm 0.29 | 2.4 \pm 0.4 |
| | 10 | 1.8 \pm 0.4 | 2.2 \pm 0.4 |
| | 20 | 1.80 \pm 0.29 | 1.74 \pm 0.25 ^{**} |
| D-NBP | 20 | 1.79 \pm 0.26 | 1.95 \pm 0.28 ^{**} |
| L-NBP | 20 | 1.71 \pm 0.18 | 2.4 \pm 0.4 |

Calpain activities were expressed as $\Delta A/h \cdot mg^{-1}$ (protein). ** ($\#\#$) $P < 0.01$ compared with vehicle (sham) group

讨 论

脑缺血造成细胞内能量耗竭, 引起细胞膜的去极化, 谷氨酸释放增加, EAA 受体激活, 从而引发胞外 Ca^{2+} 的大量内流和胞内 Ca^{2+} 库的大量释放, 造成细胞内钙超载, 使胞内多种酶活性改变。特别对一些蛋白水解酶的激活, 如 calcineurin 和 calpain 这两种酶的激活是依赖钙离子的存在, 当它们激活后可改变染色体的结构, 激活核酸内切酶, 引起 DNA 片段化, 导致缺血后神经细胞凋亡^[1,2]。而 Calpain 抑制剂 MFL28170 能改善低氧后的神经元损伤^[3] calcineurin 抑制剂 FK506 能减轻缺血后脑组织损伤。由此可见, calcineurin 和 Calpain 在脑缺血损伤中起着重要作用。

本实验结果表明局部脑缺血后皮层 calpain 和 calcineurin 的活性升高, 这一结果与文献^[11]报道一致。但也有作者报道脑缺血 36 h 后 calcineurin 活性降低并丧失^[12]。本文并未检测再灌不同时间点这两酶的活性。本文所使用的动物模型与作者以前研究 NBP 对脑缺血神经细胞凋亡的作用的模型完全相同, 即均为 t-MCAO 模型(缺血 2 h, 再灌 24 h), 目的是试图探讨 NBP 对脑缺血神经细胞凋亡的抑制作用与 calpain 和 calcineurin 的相关性, 以期比较系统深入地研究该作用的机制。

NBP 能降低脑缺血侧皮层 calcineurin 和 Calpain 的活性,从而阻止神经细胞凋亡的启动,减轻脑缺血损伤。NBP 对脑缺血神经细胞凋亡的抑制作用可能与其降低这两酶的活性有关。我们推测 NBP 降低 calcineurin 和 Calpain 活性的主要原因可能与 NBP 降低细胞内钙^[13], 增加 bcl-2 表达和减少细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆中有关(待发表资料)。其原因是:(1) 这两种酶的激活是依赖钙的存在;(2) 细胞色素 C 从线粒体的丢失,可激活这两种蛋白磷酸酶;(3) Bcl-2 可抑制细胞色素 C 丢失。至于要探讨 NBP 对这两种酶的直接作用,则尚待进一步的实验研究。

REFERENCES:

- [1] Yamashita T, Saido TC, Takita M, *et al.* Transient brain ischemia provokes Ca^{2+} , PIP2 and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys[J]. *Eur J Neurosci*, 1996, **8**(9):1932 - 1944.
- [2] McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways to apoptosis[J]. *Stem Cells*, 1996, **14**(6):619 - 631
- [3] Chen ZF, Schottler F, Lee KS. Neuronal recovery after moderate hypoxia is improved by the calpain inhibitor MDL28170[J]. *Brain Res*, 1997, **769**(1):188 - 192.
- [4] Dong GX, Feng YP. Hypoxia/hypoglycemia induced apoptosis of rat cortical neurons is prevented by DL-3-n-butylphthalide. *Acta Pharm Sin*(in Chinese), 1999, **34**(3):176 - 180.
- [5] Dong GX, Feng YP. Effect of DL-3-n-butylphthalide on cortical neuronal apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (in Chinese), 2000, **14**:in press.
- [6] Enan E, Matsumura F. Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides[J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, **43**(8):1777 - 1784.
- [7] Martin B, Pallen CJ, Wang JH, *et al.* Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphatase activity of calcineurin[J]. *J Biol Chem*, 1985, **260**(28):14932 - 14937.
- [8] Hess HH, Derr JE. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1 ~ 5 nanomole range[J]. *Anal Biochem*, 1975, **63**(2):607 - 613.
- [9] Buroker Kilgore M, Wang KK. A coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases[J]. *Anal Biochem*, 1993, **208**(2):387 - 392.
- [10] Iversen P, Ertbjerg P, Larsen LM, *et al.* An FPLC method for determination of calpains and calpastatin in porcine m longissimus dorsi[J]. *Biochimie*, 1993, **75**(10):869 - 872.
- [11] Blomgren K, McRae A, Bona E. The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic-ischemia[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, **825**:104 - 119.
- [12] Nagahiro S, Uno M, Sato k, *et al.* Pathophysiology and treatment of cerebral ischemia[J]. *J Med Invest*, 1998, **45**(1-4):51 - 70
- [13] Xiong J, Feng YP. Effects of 3-n-butylphthalide on the increase of intracellular calcium in neurons subjected to hypoxia and hypoglycemia and its mechanisms[J]. *Acta Pharm Sin*(in Chinese), 1999, **34**(12):893 - 897.

EFFECTS OF 3-N BUTYLPHTHALIDE ON CORTICAL CALCINEURIN AND CALPAIN ACTIVITIES IN FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA RATS

DONG Gaoxiang, FENG Yipu

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: AIM To explore if the inhibitory effect of 3-n-butylphthalide (NBP) on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats is relevant to cortical calcineurin and calpain activities. **METHODS** The model of cerebral ischemia-reperfusion was used. The activities of the two enzymes were measured by using biochemical methods. **RESULTS** DL-NBP and D-NBP $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were found to significantly reduce ischemia ipsilateral cortical calcineurin and calpain activities. However, L-NBP $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ showed no obvious effect. **CONCLUSION** The anti-apoptotic effect of NBP may be relevant to its inhibition of calcineurin and calpain activities in focal cerebral ischemia rats.

KEY WORDS: 3-n-butylphthalide; transient focal cerebral ischemia; neuronal apoptosis; calcineurin; calpain