



粉防己碱对硝酸甘油致三叉神经节卫星胶质细胞激活的影响

崔智威¹, 熊新¹, 陈力学^{1*}, 秦光成¹, 陈连连², 周冀英¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院 实验研究中心 重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016;
2. 重庆医科大学 医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] 目的:探讨粉防己碱(Tet)对硝酸甘油(GTN)激活的三叉神经节卫星胶质细胞释放的炎性因子的影响及其机制。方法:体外纯化培养新生大鼠三叉神经节卫星胶质细胞;实验分正常对照组、GTN组和Tet治疗组;GTN组和Tet治疗组利用 $0.55\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GTN诱导卫星胶质细胞激活,Tet治疗组同时给予 $1\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tet进行干预。应用AlamarBlue检测细胞存活情况;利用Fluo-3/AM探针负载后,激光共聚焦显微镜观测各实验组细胞内 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的变化;FQ-PCR检测NF- κ B,IL-1 β mRNA的表达情况;利用双重免疫荧光技术同时对卫星胶质细胞进行鉴定和NF- κ B表达的检测。结果:AlamarBlue实验表明,GTN刺激后细胞活力明显下降($P<0.05$),而不同浓度的Tet对GTN刺激的胶质细胞活力影响不同,最终筛选出最适宜的Tet治疗浓度为 $1\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与GTN组相比,Tet可以抑制GTN诱导的卫星胶质细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高($P<0.05$);FQ-PCR和免疫荧光双标实验发现,Tet可降低胶质细胞内NF- κ B mRNA和蛋白的表达($P<0.05$);同时,Tet治疗后IL-1 β mRNA的表达降低($P<0.05$)。结论:Tet可以通过阻断卫星胶质细胞内钙离子内流调控NF- κ B的表达,从而减少炎症因子IL-1 β 的释放,为Tet用于偏头痛的防治提供了实验依据。

[关键词] 粉防己碱;偏头痛;卫星胶质细胞;钙;核转录因子

偏头痛是全世界最易影响日常生活和工作的疾病之一^[1],其确切发病机制尚不清楚,但目前神经源性炎性发病机制逐渐得到公认,胶质细胞被认为是偏头痛起始和维持的活性参与者^[2-3]。激活的胶质细胞释放各种神经活性物质,可以促进神经传递活动,特别是促炎症反应^[4-5]。核转录因子(nuclear factor- κ B,NF- κ B)在炎症反应中起中心调控作用,调控多种炎性细胞因子的基因表达,研究表明NF- κ B在胶质细胞中主要起损伤作用,应阻断或抑制。粉防己碱(tetrandrine,Tet)是从中药防己科植物粉防己根中提取的双苄基异喹啉类生物碱,是一种天然的钙通道阻滞剂^[6],并具有消炎镇痛的作用^[7-8],已被广泛的应用到中枢神经系统疾病的防治中,但目前Tet用于偏头痛的治疗还未见报道。作

者近期的研究表明,Tet可以降低偏头痛大鼠三叉神经节内NF- κ B的表达。因此,本实验通过体外培养三叉神经节卫星胶质细胞,利用硝酸甘油诱导其激活,研究Tet对三叉神经节内激活的胶质细胞释放炎性因子表达的影响及其作用机制,以期为偏头痛的临床治疗提供实验依据和寻找新的神经保护剂。

1 材料

1.1 药物与试剂 硝酸甘油(山西康宝生物制品股份有限公司);粉防己碱(成都曼思特生物科技有限公司,批号A0065,纯度 $\geq 98\%$);DMEM-F12培养基(Hyclone,美国);胎牛血清(MDgenics,美国);胰蛋白酶(1:25,Hyclone,美国);一次性培养瓶、孔板(Corning,美国);荧光胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)抗体(Cell Signaling,美国),兔抗NF- κ B p65抗体(Bios,中国),Texas Red结合的山羊抗兔IgG(CalBio,美国)。SYBR Premix Ex Taq II(Perfect Real Time)(TAKARA,日本);TRIzol(TIANGEN,中国);AlamarBlue(Invitrogen,美国);Fluo-3/AM,PluronicF-127(Biotium,美国)。

1.2 仪器 酶标仪(Multiskan spectrum 1500,Ther-

[稿件编号] 20110306003

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研项目(2009-2-357);重庆市教委科研项目(KJ100316)

[通信作者] *陈力学,博士,助理研究员,Tel:(023)89012105, E-mail:chenlixue@163.com

[作者简介] 崔智威,硕士生,Tel:(023)89012731, E-mail:65764247@qq.com



mo,美国);LCS-SP2 激光共聚焦显微镜(Leica,德国);荧光定量PCR仪(ABI 7500 Real-time PCR instrument,美国)。

1.3 动物 新生3 d内SD大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(渝)2007-0001。

2 方法

2.1 卫星胶质细胞的培养、模型的建立以及分组 原代三叉神经节卫星胶质细胞培养的方法参照已建立的方法。利用前期已经筛选出的 $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTN刺激卫星胶质细胞,分别作用4,6,12 h,建立胶质细胞炎症模型,筛选出NF- κ B参与炎症因子表达的高峰期,通过实验发现并验证了NF- κ B在GTN刺激4 h时表达最强,于是将该实验分为3组,正常对照组(即CON组):正常培养卫星胶质细胞,未作任何处理;GTN组: $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTN(由 $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTN与无血清DMEM-F12培养基按1:3配制)与卫星胶质细胞共培养4 h;Tet治疗组(即Tet + GTN组): $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tet与 $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTN按1:1比例分别加入卫星胶质细胞内共同培养4 h。

2.2 AlamarBlue法检测Tet对GTN诱导激活的卫星胶质细胞活力的影响 取已经纯化的卫星胶质细胞,用0.25%的胰蛋白酶消化处理并进行细胞计数后加入96孔板,调节细胞数为 1×10^5 个/孔。待细胞贴壁后每孔加入终浓度 $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTN 50 μL ,再加入不同浓度的Tet,分别为 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,使总体积为100 μL 。每一浓度组重复8孔。将96孔板放入5% CO₂的培养箱37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4 h后重新加入DMEM-F12培养基90 μL ,然后每孔加入10 μL AlamarBlue,在5% CO₂的培养箱37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2~3 h,在酶标仪上检测波长570 nm,标化波长600 nm处测量A。

2.3 细胞内游离Ca²⁺浓度的测定 各实验组经过相应处理后,经D-Hanks液洗涤3次,加入D-Hanks液190 μL ,预温至37 $^{\circ}\text{C}$,再加入10 μL Fluo-3/AM(终浓度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),孵育1 h,D-Hanks液洗涤3次,加入不含胎牛血清的DMEM-F12培养基孵育30 min,弃培养基后在激光共聚焦显微镜下观察细胞内游离Ca²⁺浓度。激光共聚焦显微镜以激发光405 nm,接受范围500~520 nm,扫描方式XY,电子

放大200倍,扫描速度400 Hz,平均8次。

2.4 FQ-PCR检测卫星胶质细胞内NF- κ B和IL-1 β mRNA表达 RNA提取方法参照试剂使用说明。根据nucleoid上GAPDH,NF- κ B,IL-1 β cDNA序列,用primer 5.0软件分别设计编码相关基因的引物,引物由上海生工合成,设磷酸甘油脱氢酶(GAPDH)阳性产物作为PCR内参照,相关引物序列如下,RQ-NF- κ B(196 bp) sense 866: 5'-GTGGAGTTTGG-GAAGGATTTG-3', antisense 1061: 5'-TTGTCTTT-GATTTCCGGGCTACT-3'; RQ-IL-1 β (133 bp) sense 270: 5'-GGGATGATGACGACCTGC-3', antisense 402: 5'-GGAGAATACCACTTGTGGCTTA-3'; RQ-GAPDH(140 bp) sense 231: 5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3', antisense 370: 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'。荧光定量PCR反应标准曲线绘制及细胞中mRNA含量测定见说明书。PCR扩增参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,共40个循环,在延伸的过程中搜集荧光信号。融解曲线构建参数为95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。根据各自标准品建立标准曲线,由软件自动计算待测样本中NF- κ B,IL-1 β ,GAPDH含量。同时为消除标本处理、逆转录和PCR扩增效率差异,每一标本以所测NF- κ B,IL-1 β 和GAPDH拷贝数的对数比值代表NF- κ B,IL-1 β mRNA表达水平。

2.5 双重免疫荧光组织化学染色 将各组细胞用4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定,0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS洗3次 \times 5 min,0.1% Triton处理10 min后,0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS洗3次 \times 5 min,用10%的羊血清37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h,加一抗兔抗NF- κ B p65(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS洗3次 \times 5 min,加Texas Red结合的山羊抗兔IgG(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育6~8 h,再用0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS洗3次 \times 5 min,滴加鼠抗GFAP(1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS洗3次 \times 5 min,然后用50%甘油封片,激光共聚焦显微镜摄片保存。

2.6 统计学分析 应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,所得计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0进行单因素方差分析,并进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Tet对GTN诱导激活的卫星胶质细胞活力的

影响 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} mol · L⁻¹ 的 Tet 对正常细胞未产生影响, 但 1×10^{-3} mol · L⁻¹ 的 Tet 对细胞产生抑制作用, 与正常细胞比较, 细胞存活率明显下降 ($P < 0.05$, 表 1)。GTN 刺激卫星胶质细胞后, 细胞活力明显下降 ($P < 0.05$); 加入不同浓度的 Tet 干预后, 细胞活力与 GTN 刺激组比较未见明显的改善, 但通过对细胞形态的观察以及所得数据的分析初步筛选出 1×10^{-7} mol · L⁻¹ Tet 作为治疗浓度 (表 2)。

表 1 Tet 对正常卫星胶质细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tet/mol · L ⁻¹	A ₅₇₀	存活率/%
0	0.636 5 ± 0.084 1	63.65
1×10^{-8}	0.649 5 ± 0.038 4	64.95
1×10^{-7}	0.654 1 ± 0.021 1	65.41
1×10^{-6}	0.614 3 ± 0.039 4	61.43
1×10^{-5}	0.610 8 ± 0.019 9	61.08
1×10^{-4}	0.611 6 ± 0.023 6	61.16
1×10^{-3}	0.492 1 ± 0.023 6	49.21 ¹⁾

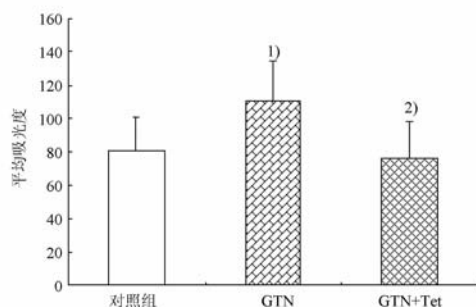
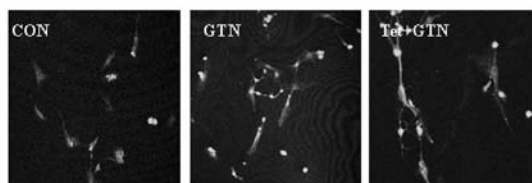
注: 与正常细胞比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 Tet 对 GTN 诱导激活的卫星胶质细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	Tet/mol · L ⁻¹	A ₅₇₀	存活率/%
对照	0	0.636 5 ± 0.084 1	63.65
GTN	0	0.434 7 ± 0.027 7	43.47
GTN + Tet	1×10^{-8}	0.440 2 ± 0.057 1	44.02
	1×10^{-7}	0.484 3 ± 0.089 2	48.43
	1×10^{-6}	0.431 3 ± 0.057 4	43.13
	1×10^{-5}	0.443 3 ± 0.098 7	44.33
	1×10^{-4}	0.424 2 ± 0.056 7	42.42

3.2 卫星胶质细胞内游离 Ca²⁺ 的变化 与正常组对照组相比, 在 GTN 刺激 4 h 后卫星胶质细胞内钙离子浓度增高 ($P < 0.05$); 给予 1×10^{-7} mol · L⁻¹ Tet 干预后, 与 GTN 组相比, Tet 治疗组细胞内钙离子浓度明显降低 ($P < 0.05$, 图 1)。

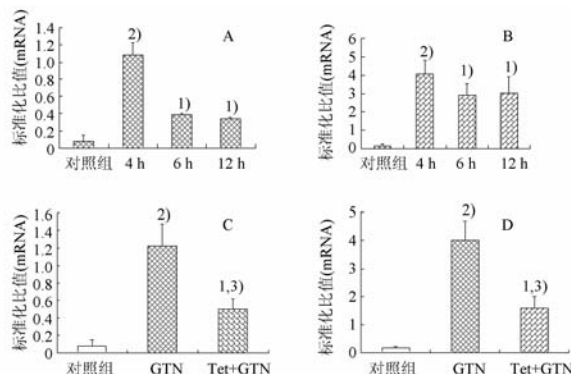
3.3 卫星胶质细胞内 NF-κB, IL-1β mRNA 表达变化 0.55 mmol · L⁻¹ GTN 分别刺激卫星胶质细胞 4, 6, 12 h 后, 与正常对照组比较, 3 个时间点 NF-κB, IL-1β mRNA 的表达均增高 ($P < 0.05$), 其中 4 h 时 NF-κB, IL-1β mRNA 增加最显著 ($P < 0.01$)。然后选择 4 h 这个时间点, 并给予 1×10^{-7} mol · L⁻¹ Tet 进行干预治疗后结果表明, 与正常组比较, GTN 组的 NF-κB, IL-1β mRNA 表达量明显增加; 与 GTN



与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 GTN 组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 3 同)。

图 1 Tet 对各实验组卫星胶质细胞内钙离子的影响

相比, Tet 治疗组中的 NF-κB, IL-1β mRNA 表达量均降低 ($P < 0.05$, 图 2)。



A. GTN 刺激卫星胶质细胞 4, 6, 12 h 后 NF-κB mRNA 的变化; B. GTN 刺激卫星胶质细胞 4, 6, 12 h 后 IL-1β mRNA 的变化; C. Tet 治疗后卫星胶质细胞内 NF-κB mRNA 表达变化; D. Tet 治疗后卫星胶质细胞内 IL-1β mRNA 表达变化; 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 GTN 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

图 2 FQ-PCR 检测 NF-κB, IL-1β mRNA 的表达变化

3.4 卫星胶质细胞内 NF-κB p65 蛋白表达情况 免疫双标结果表明, 各实验组卫星胶质细胞内均有 NF-κB p65 蛋白表达; 正常卫星胶质细胞内 NF-κB p65 蛋白主要在胞浆表达, 胞核内表达很少或不表达。经 GTN 刺激 4 h 后, 发现卫星胶质细胞胞核内 NF-κB p65 蛋白表达增高, 与正常组比较有显著的

差异($P < 0.05$)。给予 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tet 干预后,与 GTN 组相比,Tet 治疗组中细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达则明显降低($P < 0.05$,图3)。

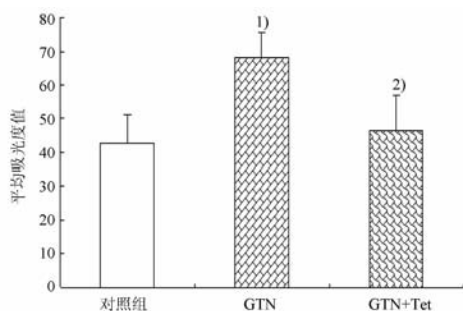


图3 双重免疫荧光检测卫星胶质细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达

4 讨论

目前偏头痛的研究大多集中在神经元的异常放电和神经源性炎症等方面,研究表明,当 GTN 将三叉神经节尾核及硬脑膜神经元的 NF- κ B 转录活性激活时^[9-11],NF- κ B 作为调控基因引起的炎症反应,将参与神经化学物质的释放,并引起级联反应,从而导致偏头痛的发作^[10,12]。但是,最近越来越多的研究证实,三叉神经节神经元周围的卫星胶质细胞被激活时,可以产生和释放大量的炎症因子,对引起偏头痛的发作同样重要。Watkins 等^[13]的研究发现,星形胶质细胞和小胶质细胞激活可以产生和释放出各种神经兴奋物质,包括 NO、兴奋性氨基酸和炎性因子,是偏头痛起始和维持的活性参与者;激活的胶质细胞释放的各种神经活性物质,将促进神经传递活动,特别是促炎性反应,但偏头痛中卫星胶质细胞产生和释放炎症因子的具体机制尚不清楚。本研究结果表明,GTN 可以激活卫星胶质细胞,且激活的卫星胶质细胞内 NF- κ B 和炎症因子 IL-1 β 表达升高;Tet 可抑制细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$,增高,降低胶质细胞内 NF- κ B,IL-1 β 的表达。

钙离子通道参与偏头痛的发病机制已经得到广大学者的认可,研究发现 CaV2.1 通道在大脑结构中均有表达,它可以参与神经递质的释放,其中又以 P/Q 型钙通道起主导作用^[14]。在三叉神经血管系统,P/Q 型钙通道主要负责控制来自脑膜疼痛感受器血管终端的血管神经肽^[15-17],以及来自三叉神经节神经元的谷氨酸盐的释放^[18];也可以调控来自硬

脊膜对三叉神经尾核神经元的紧张性抑制^[19],以及通过降低抑制性或易化性通道来调节三叉和脊髓的疼痛传递^[20-21]。大量的研究已证实钙通道的激活以及钙离子的内流对细胞分泌有调节作用^[22-23],如在 T 淋巴细胞和肥大细胞内 NF- κ B 进行核转录需依赖胞质内 Ca^{2+} 的升高^[24-25]。本研究表明,卫星胶质细胞内有 Ca^{2+} 的内流, Ca^{2+} 浓度增高与 NF- κ B 表达的增高趋势相一致,经预先给予 Tet 治疗后,其含量均下降。

中药粉防己碱(Tet)是一种天然的钙拮抗剂^[8],可以抑制炎症因子的表达和 NF- κ B 的激活^[26-27],已经被广泛应用于神经系统疾病的研究,但用于偏头痛的研究还未见报道。作者首先研究 Tet 对卫星胶质细胞的使用剂量,结果表明,除浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tet 对正常细胞产生抑制作用外,其余浓度的 Tet 均为安全剂量;但在研究 Tet 对 GTN 诱导激活的卫星胶质细胞活力的影响实验中发现,由于 GTN 本身可引起细胞脱壁死亡,而 Tet 对 GTN 所致的死细胞并不能发挥作用,导致不同浓度的 Tet 对改善细胞活力的效果不同;通过预实验发现,Tet 浓度过高或过低均会引起 NF- κ B 的过度降低或下降程度不明显,最终筛选出 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tet 作为最佳治疗浓度。本研究结果显示,卫星胶质细胞经 Tet 预先处理后,其胞内 NF- κ B 的活性和蛋白及 mRNA 表达量均降低,炎症因子 IL-1 β 的表达量下降。其机制可能是因为 Tet 可以阻止 I κ B α 的降解,NF- κ B 的 p65 亚基进行核转录时,需要具有活性的 I κ B α 激酶 α 和 I κ B α 激酶 β ,而 I κ B α 在细胞质内可以抑制 I κ B α 激酶 α 和 I κ B α 激酶 β 的活性,阻断 I κ B α 的降解从而抑制了 NF- κ B 的激活^[28]。作者认为,这可能是由于 Tet 在发挥钙拮抗主要功能时,诱发的次要功能所致。

综上所述,推测当卫星胶质细胞被 GTN 激活时,其细胞表面的钙通道被激活,胞内 Ca^{2+} 离子内流增高,从而引起 NF- κ B 的激活并进行核转录,最终导致炎症因子 IL-1 β 的释放。而 Tet 正是发挥了钙的拮抗作用,降低了卫星胶质细胞内的 Ca^{2+} 离子浓度,从而降低 NF- κ B 的活性和表达,最终减少炎症因子 IL-1 β 的释放,对三叉神经节卫星胶质细胞起到了保护作用,但其详细作用机制有待进一步研究。



[参考文献]

- [1] Lipton R B, Bigal M E. Migraine: epidemiology, impact, and risk factors for progression[J]. *Headache*, 2005, 45(Supp 1): S3.
- [2] Sanchez-Del-Rio M, Reuter U, Moskowitz M A. New insights into migraine pathophysiology[J]. *Curr Opin Neurol*, 2006, 19: 294.
- [3] Waeber C, Moskowitz M A. Migraine as an inflammatory disorder [J]. *Neurology*, 2005, 64:S9.
- [4] Li J, Vause C V, Durham P L. Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxidesynthesis and release from trigeminal ganglion glial cells[J]. *Brain Res*, 2008, 1196:22.
- [5] Srikanthakoti B S, Vinit V, Patil M S, et al. Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology [J]. *Headache*, 2007, 47(7):1008.
- [6] Wang G, Lemos J R. Tetrandrine: a new ligand to block voltage-dependent Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated K^{+} channels[J]. *Life Sci*, 1995, 56(5):295.
- [7] Lai J H. Immunomodulatory effects and mechanisms of plant alkaloid tetrandrine in autoimmune diseases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(12):1093.
- [8] Shen Y C, Chou C J, Chiou W F, et al. Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix *Stephania tetrandra*: comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60:1083.
- [9] Greco R, Tassorelli C. Activation of the transcription factor NF-kappaB in the nucleus trigeminalis caudalis in an animal model of migraine[J]. *Neurotoxicology*, 2005, 26(5):759.
- [10] Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, et al. Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy[J]. *Ann Neurol*, 2002, 51(4):507.
- [11] Yin Z, Fang Y, Ren L, et al. Atorvastatin attenuates NF-kappaB activation in trigeminal nucleus caudalis in a rat model of migraine[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 465(1):61.
- [12] Barnes P J. Nuclear factor-kB[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29:867.
- [13] Watkins L R, Milligan E D, Maier S F. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 521:1.
- [14] Pietrobon D. Insights into migraine mechanisms and CaV2.1 calcium channel function from mouse models of familial hemiplegic migraine[J]. *J Physiol*, 2010, 588(11):1871.
- [15] Hong K W, Kim C D, Rhim B Y, et al. Effect of omega-conotoxin GVIA and omega-agatoxin IVA on the capsaicin-sensitive calcitonin gene-related peptide release and autoregulatory vasodilation in rat pial arteries[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19:53.
- [16] Asakura K, Kanemasa T, Minagawa K, et al. alpha-Eudesmol, a P/Q-type Ca^{2+} channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion[J]. *Brain Res*, 2000, 873:94.
- [17] Akerman S, Williamson D J, Goadsby P J. Voltage-dependent calcium channels are involved in neurogenic dural vasodilatation via a presynaptic transmitter release mechanism[J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140:558.
- [18] Xiao Y, Richter J A, Hurley J H. Release of glutamate and CGRP from trigeminal ganglion neurons: role of calcium channels and 5-HT1 receptor signaling[J]. *Mol Pain*, 2008, 4:12.
- [19] Ebersberger A, Portz S, Meissner W, et al. Effects of N-, P/Q- and L-type calcium channel blockers on nociceptive neurones of the trigeminal nucleus with input from the dura [J]. *Cephalalgia*, 2004, 24:250.
- [20] Knight Y E, Bartsch T, Kaube H, et al. P/Q-type calcium-channel blockade in the periaqueductal grey facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine[J]. *J Neurosci*, 2002, 22:RC213.
- [21] Urban M O, Ren K, Sablad M, et al. Medullary N-type and P/Q-type calcium channels contribute to neuropathy-induced allodynia[J]. *Neuroreport*, 2005, 16:563.
- [22] Chapman E R. Synaptotagmin: a Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3:498.
- [23] Rettig J, Neher E. Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{2+} -triggered exocytosis[J]. *Science*, 2002, 298:781.
- [24] Lewis R S. Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression[J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31:925.
- [25] Vig M, DeHaven W I, Bird G S, et al. Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACMI pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(1):89.
- [26] Wu S J, Ng L T. Tetrandrine inhibits proinflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(1):59.
- [27] Ho L J, Juan T Y, Chao P, et al. Plant alkaloid tetrandrine downregulates IkappaBalpha kinases-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathway in human peripheral blood T cell[J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 143(7):919.
- [28] Lin S T, Wang Y, Xue Y, et al. Tetrandrine suppresses LPS-induced astrocyte activation via modulating IKKs-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 315(1/2):41.

Effect of tetrandrine on nitroglycerin induced activation of satellite cells in trigeminal ganglia

CUI Zhiwei¹, XIONG Xin¹, CHEN Lixue^{1*}, QIN Guangcheng¹, CHEN Lianlian², ZHOU Jiyong¹

(1. *First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing 400016, China;*

2. *Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing 400016, China)*

[**Abstract**] **Objective:** To evaluate the effect of tetrandrine (Tet) on nitroglycerin (GTN)-induced activation of the satellite cells released inflammatory cytokines and to explore its mechanism. **Method:** Neonatal rat satellite cells of trigeminal ganglia were cultured and separated into three groups. Group CON; the cells were normal cultured; Group TGN; the cells were cultured with $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTN; Group Tet; the cells were treated with $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GTN and $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tet respectively. Cell viability after GTN and Tet was detected by AlamarBlue assay. The concentration change of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in single satellite cell loaded with Fluo-3/AM was determined by laser scanning confocal microscopy. NF- κ B and IL-1 β mRNA levels were determined by FQ-PCR. Through double-immunofluorescent staining identifies satellite cells and determines the expression of NF- κ B protein. **Result:** Satellite cells activities decreased with GTN stimulating, but according to the viability and modality of the cells, $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tet was the suitable prophylaxis. Tet can inhibit the elevation of cytosolic free calcium of rat satellite cell and decrease the mRNA and protein levels of NF- κ B and the mRNA levels of IL-1 β . **Conclusion:** Via preventing Ca^{2+} influxion, Tet inhibited NF- κ B activation of satellite cell which decreased IL-1 β expression.

[**Key words**] tetrandrine ; migraine ; satellite cells ; Ca^{2+} ; nuclear factor (NF)- κ B

doi:10.4268/cjcmm20111527

[责任编辑 张宁宁]