

· 药物研究 ·

3-硝基丙酸预处理保护多巴胺神经元机制研究*

梁直厚, 邓学军, 孙圣刚, 曹学兵, 李红戈

(华中科技大学同济医学院附属协和医院神经科, 武汉 430022)

[摘要] 目的 研究 3-硝基丙酸(3-NPA)多次预处理保护多巴胺神经元的作用及其可能机制。方法 使用 MPP⁺ 在分泌多巴胺的人神经纤维瘤细胞 SH-SY5Y 上制作帕金森病细胞模型, 在模型制作前分别 1 或 5 次加入 3-NPA (0.2 mmol · L⁻¹) 进行预处理, 分别应用液闪烁仪检测 [³H] DA 摄取率, 双波长分光光度计检测细胞内游离钙离子 (Ca²⁺) 浓度的改变, 观察 3-NPA 预处理保护多巴胺神经元的作用。结果 MPP⁺ 可降低 [³H] DA 摄取率, 升高细胞内游离钙离子浓度, 3-NPA 预处理可提高 [³H] DA 摄取率, 降低胞内游离钙离子浓度, 3-NPA 多次预处理较 3-NPA 单次预处理的作用更好。结论 3-NPA 预处理对多巴胺神经元有明显的保护作用, 可能与其降低胞内游离钙离子浓度有关。

[关键词] 3-硝基丙酸; 帕金森病; 预处理; 神经保护

[中图分类号] R971; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2007)11-1255-04

Neuroprotection of 3-NPA Preconditioning on Dopaminergic Neuron

LIANG Zhi-hou, DENG Xue-jun, SUN Sheng-gang, CAO Xue-bing, LI Hong-ge (Department of Neurology, Union Hospital Affiliated with the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To investigate the protective effect of 3-NPA repetitive preconditioning on dopaminergic neuron.

Methods The Parkinson's disease model was set up by using MPP⁺ on the neuroblastoma SH-SY5Y which secreting dopamines. Before incubation of MPP⁺, 3-NPA (0.2 mmol · L⁻¹) was added into the cell for once or 5 times. The ratio of uptaking [³H] DA and intracellular free calcium were detected. **Results** The ratio of uptaking [³H] was decreased and the intracellular calcium was increased by MPP⁺. Repetitive preconditioning of 3-NPA showed better effects than that of single preconditioning. **Conclusion** Preconditioning of 3-NPA strongly protects dopaminergic neuron, the mechanism of which may be associated with reducing the intracellular calcium.

KEY WORDS 3-NPA; Parkinson's Disease; Preconditioning; Neuroprotection

帕金森病是以中脑黑质多巴胺神经元变性致纹状体多巴胺含量减少而引起的运动障碍疾病, 其发病的机制与多种因素有关, 如遗传因素, 氧化应激, 兴奋性氨基酸的过度释放、凋亡等, 目前普遍认为该病与线粒体功能障碍后钙超载的关系更为密切。3-硝基丙酸(3-NPA)是线粒体复合体 II 的抑制药, 该药可抑制氧化磷酸化, 减少 ATP 的合成, 大剂量或长时间小剂量使用可引起纹状体变性^[1], 但是, 小剂量、间隔一定时间的应用可提高神经元对缺血缺氧的耐受性^[2]。笔者初步研究也发现 3-NPA 预处理可减轻 MPTP 对多巴胺能神经元的损害, 且多次预处理较单次预处理的保护作用更强。那么 3-NPA 多次预处理保护多巴胺神经

元的作用是否也与减轻钙超载有关? 为此, 笔者使用 1-甲基 4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 制造体外帕金森病模型, 应用 Fura-2 检测胞内自由钙浓度, 液闪测定仪检测 [³H] DA 摄取率, 研究 3-NPA 多次预处理保护多巴胺神经元的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与动物 SH-SY5Y 细胞购自中国协和医科大学细胞典藏中心; 3-NPA, MPP⁺, Fura-2/AM, 二甲基亚砜 (DMSO), 胰蛋白酶 (trypsin), 神经生长因子 (NGF) 为 Sigma 公司产品, DMEM/F12, 胎牛血清为 Gibco 公司产品, [³H] DA 为 Amersham pharmacia biotech 公司产品。

1.2 仪器 双波长荧光分光光度计 (Hitachi 850), 液闪测定仪 (Beckman LS6500)。

1.3 细胞的培养 将 SH-SY5Y 细胞放在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (青霉素 100 U · mL⁻¹, 链霉素 100 U · mL⁻¹) 培养液的培养瓶中, 置于 37 °C, 5% 二氧化碳的培养箱, 稳定传代 1 或 2 次后, 加入 0.25% 胰

[收稿日期] 2007-05-14

[基金项目] * 国家自然科学基金资助项目 (基金编号: 30170334)

[作者简介] 梁直厚 (1975 -), 男, 湖北武汉人, 主治医师, 博士, 研究方向: 帕金森病。电话: 027 - 85726005, E-mail: liangzhihou@gmail.com。

酶,37 °C消化 20 min,并滴管吹打制成细胞悬液,按每孔 5 × 10⁵的浓度分别接种于 96 孔板中,37 °C,5% 二氧化碳培养箱培养待处理。作 [³H]DA 摄取率的细胞加用神经生长因子,促使其转化为神经元细胞,待细胞突触形成后测定。

1.4 药物处理与分组 药物终浓度:MPP⁺ 0.25 mmol · L⁻¹,3-NPA 0.2 mmol · L⁻¹,将细胞分为 7 组,分别进行胞内游离钙浓度测定和 [³H]DA 摄取率测定。空白对照组(8 孔):不加任何处理药物;MPP⁺ 组(8 孔):每孔加入 MPP⁺ 10 μL,药物终浓度为 0.25 mmol · L⁻¹,孵育 30 min;3-NPA 单次预处理 + MPP⁺ 组(8 孔):每孔先加 3-NPA 10 μL,药物终浓度为 0.20 mmol · L⁻¹,30 min 后去除 3-NPA,PBS 冲洗 2 次,换用培养液 30 min 后加入 MPP⁺ 10 μL;3-NPA 多次预处理 + MPP⁺ 组(8 孔):每孔先加 3-NPA 10 μL,30 min 后去除 3-NPA,PBS 冲洗 2 次,换用培养液 30 min 后再加入 3-NPA 10 μL,30 min 后除去 3-NPA,PBS 冲洗 2 次,换用培养液 30 min,再加 3-NPA 10 μL...如此反复 5 次制作 3-NPA 多次预处理模型,最后加入 MPP⁺ 10 μL 孵育 30 min;

1.5 [³H]DA 摄取率测定 各组处理后的细胞经 PBS 冲洗,加入含 20 μCi · mL⁻¹ [³H]DA 的 HBS 液(10 mmol · L⁻¹ HEPES,100 mmol · L⁻¹ 氯化钠溶液,pH 值 = 8.0) 20 μL,([³H]DA 的终浓度为 5 × 10⁴ bq · mL⁻¹),25 °C,30 min,冰 PBS 冲洗 3 次,加入 2 mmol · L⁻¹ NaOH 200 μL 破坏细胞,最后将细胞加入 2.0 mL 闪烁液中,测定 [³H]DA 摄取率(Beckman 液闪测定仪)。[³H]DA 摄取率 = 实验组/空白对照组 × 100%。

1.6 细胞内钙离子(Ca²⁺)浓度的测定 从培养板上吸出处理后的细胞,应用 PBS 吹打,转移至 EP 管中,4 000 g 离心 5 min,弃去上清液;重复离心 1 次,弃去上清液;加入 PBS 使细胞悬浮,加入 Fura-2/AM 4 μL(每孔终浓度为 4 μmol · L⁻¹),37 °C 避光孵育 45 min。3 000 g 离心,弃去上清液,加入 PBS 冲洗;重复离心,冲洗 1 次,制成细胞悬液,在双波长(340,380 nm)分光光度计上测定细胞内游离钙离子(Ca²⁺)浓度:选用 Triton X-100(1%)破坏细胞膜,使细胞内 Fura-2 被 Ca²⁺ 饱和,测定胞内最大 Ca²⁺ 浓度;加入比胞外 Ca²⁺ 浓度高 2~3 倍的 EGTA 络合全部的 Ca²⁺ 而使 Fura-2 游离,测定胞内最小 Ca²⁺ 浓度;Ca²⁺ 浓度用两者的比值 $R(r = F_{340}/F_{380})$ 依下列公式计算:[Ca²⁺] = $Kd \times (R - R_{min}) \div (R_{max} - R) \times Ff_2 \div Fb_2$,其中 $Kd = 224 \text{ nm}$, R, R_{max}, R_{min} 分别为测得的荧光比值,最大荧光比值,最

小荧光比值, Ff_2, Fb_2 分别为无 Ca²⁺ 和 Ca²⁺ 饱和时 380 nm 激发光产生的荧光强度。

1.7 统计学方法 实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS10.0 统计学软件分析,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 q 检验,各组同一指标的比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 3-NP 多次预处理对 [³H]DA 摄取率的影响 通过 [³H]DA 摄取率的检测,可以反映多巴胺能神经元突触前功能的情况,间接反映多巴胺神经元的功能状况。经过 MPP⁺ 处理后,细胞的 [³H]DA 摄取率降至 (50.1 ± 5.9)%,较空白对照组明显降低 ($P < 0.01$),提示多巴胺神经元明显损伤;3-NPA 单次预处理后, [³H]DA 摄取率较 MPP⁺ 组增加 [(65.8 ± 8.3)%] ($P < 0.05$),说明 3-NP 单次预处理可增强多巴胺神经元对 MPP⁺ 毒性的耐受性。而 3-NPA 多次预处理对 [³H]DA 摄取率升高的程度更大 ($P < 0.01$),其 [³H]DA 摄取率为 (80.3 ± 9.3)%,单次 3-NPA 预处理与多次 3-NPA 预处理间差异有显著性 ($P < 0.05$),显示 3-NPA 多次预处理对多巴胺神经元的抗毒性作用较 3-NPA 单次预处理的作用更好。结果见表 1。

2.2 3-NPA 多次预处理对胞内 Ca²⁺ 浓度的影响 本实验中,MPP⁺ 处理后的细胞内游离 Ca²⁺ 浓度明显升高,空白对照组为 (103.34 ± 11.28) nmol · L⁻¹,MPP⁺ 组为 (276.65 ± 45.79) nmol · L⁻¹,两组比较差异有极显著性 ($P < 0.01$);3-NPA 单次预处理可使胞内游离 Ca²⁺ 浓度下降至 (212.44 ± 44.20) nmol · L⁻¹ ($P < 0.05$),而 3-NPA 多次预处理后胞内游离 Ca²⁺ 浓度下降更为明显 [(155.77 ± 43.96) nmol · L⁻¹] ($P < 0.01$),说明 3-NPA 预处理可降低 MPP⁺ 引起的 Ca²⁺ 超载,而且 3-NPA 多次预处理的作用更强。结果见表 1 和图 1~4。

表 1 4 组细胞 [³H]DA 摄取率与胞内钙浓度测定结果 $\bar{x} \pm s, n = 8$

组别	[³ H]DA 摄取率/%	胞内游离 Ca ²⁺ 浓度/(nmol · L ⁻¹)
3-NPA 单次预处理 + MPP ⁺ 组	65.8 ± 8.3	212.44 ± 44.20
3-NPA 多次预处理 + MPP ⁺ 组	80.3 ± 9.3	155.77 ± 43.96
MPP ⁺ 组	50.1 ± 5.9	276.65 ± 45.79
空白对照组	100.0 ± 0.0	103.34 ± 11.28

3 讨论

3.1 3-NPA 预处理对 [³H]DA 摄取率的影响 通过检测 [³H]DA 摄取率,可以反映多巴胺能神经元突触前功能的情况,间接反映多巴胺神经元的功能状况。本实验中笔者发现,经过 MPP⁺ 处理后,细胞的 [³H]DA

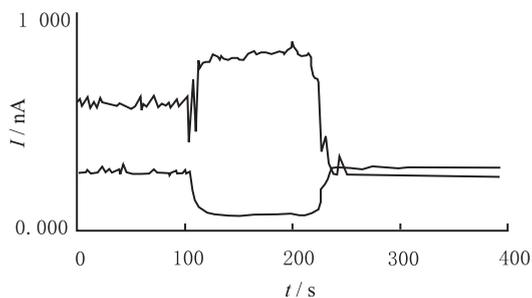


图 1 空白对照组不同时间胞内钙离子电流

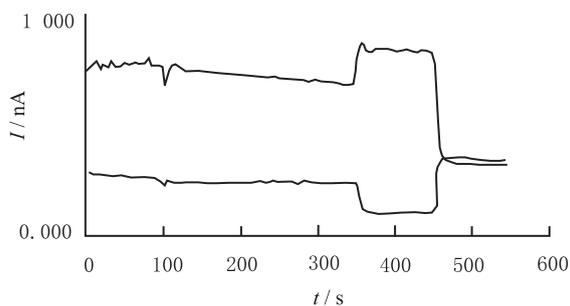


图 2 MPP⁺组不同时间胞内钙离子电流

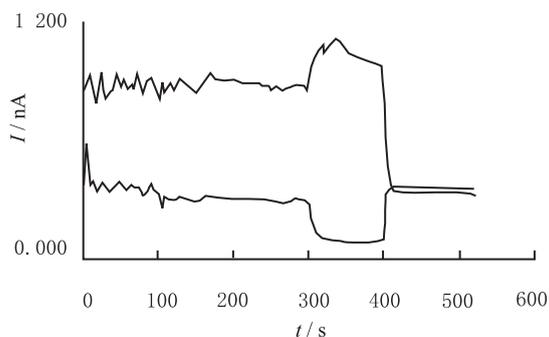


图 3 3-NPA 单次预处理 + MPP⁺组不同时间胞内钙离子电流

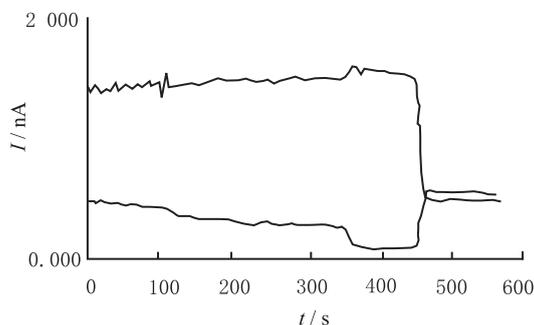


图 4 3-NPA 多次预处理 + MPP⁺组不同时间胞内钙离子电流

摄取率较空白对照组明显降低 ($P < 0.01$), 提示多巴胺能神经元明显损伤; 3-NPA 单次预处理后, [³H]DA 摄取率较 MPP⁺组明显增加 ($P < 0.05$), 说明 3-NPA 单次预处理可增强多巴胺神经元对 MPP⁺毒性的耐受性。而 3-NPA 多次预处理对 [³H]DA 摄取率升高的程度更大 ($P < 0.01$), 单次 3-NPA 预处理与多次 3-NPA 预处理间也差异有显著性 ($P < 0.05$), 提示 3-NPA 多

次预处理对多巴胺神经元的抗毒性作用较 3-NPA 单次预处理的作用更好。3-NPA 预处理保护多巴胺神经元的作用机制尚不清楚, 根据其保护缺血缺氧神经元的机制和之前的研究, 可能包括: ①抑制凋亡。笔者之前的研究发现, 经过 3-NPA 预处理后, 细胞的凋亡率较 MPP⁺组明显下降, 而 3-NPA 多次预处理后, 细胞的凋亡率下降更为明显; 显示阻断 jun 激酶/应激活化蛋白激酶 (JNK/SAPK) 的信号传导通路, 使其下游的 C-jun 表达水平下降, 可以抑制凋亡的发生; 另有报道 3-NPA 预处理抑制凋亡的机制还包括促进 bcl-2mRNA 转录及其蛋白质表达^[3], 中和自由基的毒性, 并与 bax 形成异二聚体阻止线粒体膜转移孔道的开放, 抑制 Caspase9 的激活^[4]; ②减轻 ATP 水平下降的程度^[2]。在 3-NPA 预处理后, ATP 水平虽仍比空白对照组低, 但较 MPTP 组高, 说明 3-NPA 可减缓或减轻 MPTP 对能量代谢的影响^[5]; ③激活腺苷受体。文献报道腺苷受体拮抗药茶碱可逆转 3-NPA 预处理对缺血缺氧神经元去极化的延迟作用, 表明 3-NPA 预处理可能通过激活腺苷受体, 减少突触前兴奋性氨基酸的释放^[6]。

3.2 3-NPA 多次预处理对胞内游离 Ca²⁺ 浓度的影响

MPP⁺ 可引起胞内 Ca²⁺ 浓度的急剧增加^[7,8], 本实验结果显示, 经过 MPP⁺ 处理后 30 min, 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度上升 ($P < 0.01$), 在 3-NPA 单次预处理后其浓度下降 ($P < 0.05$), 而 3-NPA 多次预处理后浓度下降更明显, 3-NPA 多次预处理较 3-NPA 单次预处理效果更明显。说明 3-NPA 预处理可对抗 MPP⁺ 引起的降低胞内游离 Ca²⁺ 浓度的升高程度。MPP⁺ 引起胞内游离 Ca²⁺ 浓度升高的原因与线粒体损害后线粒体产生氧化应激反应有关^[9]。MPP⁺ 为线粒体复合体 I 的抑制药, 由于细胞的氧化磷酸化过程被打断, ATP 产生减少, 引起氧化应激反应。在生理状况下, 细胞内 90% 的 Ca²⁺ 均集中在线粒体上, 仅有 < 10% 以游离形式存在于内质网中, 当线粒体功能发生障碍, 氧化应激增强时, 激发线粒体基质钙外流, 内质网 Ca²⁺ 释放, 同时由于细胞膜 Ca²⁺ 通道的激活, 引起胞外 Ca²⁺ 内流。但当细胞培养液中没有 Ca²⁺ 存在时, 胞内 Ca²⁺ 浓度明显下降, 这证明了 MPP⁺ 可激活细胞膜上的 Ca²⁺ 通道。胞内游离 Ca²⁺ 的异常增多可激活钙蛋白酶 (Calpain), 钙蛋白酶可介导细胞骨架及结构蛋白的过度降解, 溶酶体膜的破裂, 引起细胞死亡; 同时钙蛋白酶还能促进 Caspase-3, bax 的激活, 引起细胞 bax/bcl-2 的比例增高, 促使神经元凋亡^[10]。3-NPA 预处理降低胞内游离 Ca²⁺ 的机制还不清楚, 根据本实验结果和国外文献报道, 笔者认为与其保护线粒体的功能有密切关系。3-

NPA 是一种存在于植物激真菌的毒素,可以不可逆转地抑制琥珀酸脱氢酶(SDH),即线粒体复合体 II 抑制药,它可使氧化磷酸化解耦联,ATP 产生减少。但小剂量的应用进行 3-NPA 预处理可使 ATP 水平的下降变小,变慢,甚至在 3-NPA 预处理后的第 3 天,ATP 水平反而升高^[5],其机制可能为 3-NPA 轻度抑制氧化磷酸化后刺激细胞其他的产能途径。由于能量障碍的消除,细胞和线粒体的氧化应激反应均减少,故胞内游离 Ca²⁺ 浓度较 MPP⁺ 组降低^[11]。

综上所述,3-NPA 预处理可明显减轻 MPTP (MPP⁺) 对中枢黑质多巴胺神经元超微结构和多巴胺神经元突触前膜的损害,减少胞内游离钙浓度,其中 3-NPA 多次预处理较 3-NPA 单次预处理的作用更强。

[参考文献]

[1] LAFONTAINE M A, GEDDES J W, BANKS A, *et al.* 3-nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease[J]. *Brain Res*, 2000, 858: 356 - 362.

[2] RIEPE M W, ESCLAIRE F, KASISCHKE K, *et al.* Increased hypoxic and ischemic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: chemical preconditioning[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17: 257 - 264.

[3] BRAMRINK A M, SCHNEIDER A, NOGA H, *et al.* Tolerance-inducing dose of 3-NPA modulates bcl-2 and bax balance in rat brain: a potential mechanism of chemical preconditioning[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 92: 1425 - 1436.

[4] LASTRES B I, CARTMELL T, MOLINA H F. Endotoxin p-

reconditioning protects neurones from in vitro ischemia: role of endogenous IL-1beta and TNF-alpha [J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 173(1-2): 108 - 116.

[5] JURGENSMIER J M, XIE Z, DEVERZUX Q, *et al.* Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondrial [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 275: 4997 - 5003.

[6] WIEGAND F, LIAO W, BUSCH C, *et al.* Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 87: 1229 - 1237.

[7] AKETA S, NAKASE H, KAMADA Y, *et al.* Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in gerbil hippocampal slices: therapeutic window and the participation of adenosine receptor [J]. *Exp Neurol*, 2005, 246: 385 - 391.

[8] RUTTER G A, RIZZUTO R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 215 - 221.

[9] SHEU S S, SHARMA V K. Rapid report: a novel technique for quantitative measurement of free Ca²⁺ concentration in rat heart mitochondrial [J]. *J Physiol*, 1999, 518: 577 - 584.

[10] JAKE J, MICHAEL R, DUCHEN A. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of permeability transition pore [J]. *J Cell Sci*, 2004, 205: 1175 - 1188.

[11] HYUN J C, SEONG W K, SOYEON L, *et al.* Involvement of apoptosis and calcium mobilization in tetrahydrobiopterin-induced dopaminergic cell death [J]. *Exp Neurol*, 2002, 183 (2): 281 - 290.

红车轴草异黄酮雌激素样作用研究

曾 伶, 曾 劲, 薛存宽, 李 颖

(华中科技大学同济医学院附属梨园医院, 武汉 430077)

[摘要] 目的 探讨红车轴草异黄酮的雌激素样作用。方法 摘除大鼠双侧卵巢, 制作大鼠雌激素水平低下模型, 观察不同剂量红车轴草异黄酮对去势大鼠生殖器官和血清雌二醇(E₂)水平的影响。结果 连续给药 3 个月后, 给予红车轴草总异黄酮剂量分别为 100, 60 和 20 mg · (100 g)⁻¹ · d⁻¹ 的去势大鼠子宫系数分别为 70.21, 66.72 和 51.22 mg · kg⁻¹, 红车轴草总异黄酮剂量为 100 和 60 mg · (100 g)⁻¹ · d⁻¹ 的大鼠阴道上皮细胞角化程度分别较对照组增加 55.0% 和 40.0%; 大鼠生殖器官雌性化程度随红车轴草总异黄酮浓度的增高而增加; E₂ 水平仅红车轴草剂量为 100 mg · (100 g)⁻¹ · d⁻¹ 时差异有显著性。结论 红车轴草总异黄酮具有雌激素样作用, 且具开发价值。

[关键词] 异黄酮; 红车轴草; 雌激素样作用; 子宫系数; 阴道上皮细胞角化

[中图分类号] R286; R161.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)11-1258-03