

## ·基础研究·

# 蝙蝠葛苏林碱通过拮抗缓激肽诱导的胞内钙升高发挥神经保护作用

郭华丽<sup>1</sup>, 李祖铭<sup>2</sup>, 余玲<sup>2</sup>, 丁杰<sup>3</sup>, 郭莲军<sup>3</sup>

## 作者单位

1. 湖北省宜昌市夷陵医院内二科

湖北 宜昌 443100

2. 宜昌市夷陵区妇幼保健与计划生育服务中心

湖北 宜昌 443100

3. 华中科技大学同济医学院药理学教研室

武汉 430030

## 收稿日期

2017-10-27

## 通讯作者

郭莲军

gljy2008@126.com

**摘要 目的:**研究蝙蝠葛苏林碱(DS)对缓激肽(BK)诱导神经细胞胞内钙升高的影响,并探讨其神经保护作用。**方法:**原代培养大鼠皮质神经元,应用BK(1 μmol/L)诱导细胞内钙离子浓度升高;将细胞分为对照组, BK组, DS低、中、高剂量组;对照组不做任何处理, BK组给予1 μmol/L的BK处理, DS低、中、高剂量组分别给予相应浓度(1×10<sup>-6</sup> mol/L、1×10<sup>-5</sup> mol/L、1×10<sup>-4</sup> mol/L)的DS预孵育3 min,然后给予1 μmol/L的BK处理。通过细胞内双波长荧光钙成像系统观察胞内游离钙离子的变化,采用MTT染色法检测神经元的损伤程度。**结果:**BK诱导可迅速升高原代培养大鼠皮质细胞内的钙离子水平。DS干预可部分逆转BK对胞内钙离子升高的影响( $P<0.05$ )。MTT结果显示, BK组神经元存活率明显低于对照组( $P<0.05$ ); DS低、中、高剂量组的存活率均高于BK组( $P<0.05$ )。**结论:**DS可拮抗缓激肽诱导的胞内钙升高,对胞内钙紊乱所致的神经细胞损伤具有一定保护作用。

**关键词** 大鼠皮质神经元;缓激肽;蝙蝠葛苏林碱;钙离子

**中图分类号** R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssngcj.2019.04.010

郭华丽, 李祖铭, 余玲, 等. 蝙蝠葛苏林碱通过拮抗缓激肽诱导的胞内钙升高发挥神经保护作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(4): 194-195.

钙离子是细胞内信号传导的重要信使物质之一,神经细胞内钙离子浓度增高可使多种钙依赖性降解酶活性增强;如蛋白酶激活可引起细胞骨架受损,核酸内切酶激活可导致核酸分解。中枢神经系统多种疾病如痴呆、卒中等,均与神经细胞内钙离子的调节紊乱有关<sup>[1-4]</sup>。

蝙蝠葛苏林碱(daurisoline, DS)从防己科植物蝙蝠葛苏林的根茎中提取,属双苄基异喹啉类生物碱,对多种动物实验性心律失常具有拮抗作用<sup>[5,6]</sup>,并对谷氨酸引起的大鼠大脑皮质神经元损伤有保护作用<sup>[7]</sup>。目前尚无关于DS影响神经细胞内钙的研究。本研究采用原代培养的大鼠皮质神经细胞,用缓激肽(bradykinin, BK)处理建立胞内钙失衡,诱导神经细胞损伤模型,观察DS对胞内钙增加的作用,探究其对神经细胞的保护作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

SD乳鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,合格证编号为SCXK(鄂)2014-0007。DS纯度>98%,由华中科技大学同济医学院药理学系提供,用1 mmol/L盐酸溶解,再用2 mol/L NaOH调pH至6.8,配成母液4℃保存。BK、Fura-2/AM、Triton X-100、EGTA、HEPES、DMSO购于Sigma公司,DMEM/F12培养基、胎牛血清、牛血清白蛋白购于Gibco公司;其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠皮质神经元原代培养<sup>[8]</sup> 取1~3 d龄的SD乳鼠8~10只,消毒后断头取全脑,分离大脑皮质,人工脑脊液清洗后置于解剖瓶,加2 mL D-Hank's

液,剪成2×2×2 mm<sup>3</sup>块状物,放于刻度试管内加入0.25%胰酶(1:1),37℃孵育15~20 min后,用吸管吹打混匀,加入少许完全培养基终止消化,用200目筛网过滤后,加入基础培养基至10 mL,1 000 rpm离心10 min 2次;去上清,加入完全培养基,调整细胞密度为5.0×10<sup>5</sup>/mL,分别种植于预先用0.1%多聚赖氨酸包被的96孔板或小盖玻片上,置CO<sub>2</sub>培养箱内(37℃,5% CO<sub>2</sub>)培养。培养至第5天,培养液中加入阿糖胞苷(终浓度为5 μg/mL)抑制非神经细胞的生长。阿糖胞苷作用48 h后,更换新鲜的完全培养基继续培养,每2天半量换液。培养至第10天时,将细胞分别用于胞内钙测定和细胞活性检测。

根据处理方式的不同,将细胞分为对照组, BK(1 μmol/L)组, DS低(1×10<sup>-6</sup> mol/L DS + 1 μmol/L BK)、中(1×10<sup>-5</sup> mol/L DS + 1 μmol/L BK)、高(1×10<sup>-4</sup> mol/L DS + 1 μmol/L BK)剂量组,各8个样本。对照组不做任何处理;BK组给予1 μmol/L的BK处理;DS低、中、高剂量组分别给予相应浓度的DS预孵育3 min,然后给予1 μmol/L的BK处理。

1.2.2 神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>测定 以Fura-2/AM为钙指示剂,用细胞内双波长荧光钙成像系统(TILL,德国)进行[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>测定。细胞培养至第10天时,取出生长于盖玻片上的细胞,加入荧光探针Fura-2/AM(终浓度1 μmol/L),避光孵育45 min。孵育后的细胞洗涤3次,将贴有细胞的盖玻片放入细胞浴槽中,通过TILL测量系统分别用340 nm和380 nm波长的激发光激发细胞内的Fura-2,检测产生的荧光强度,R值(F<sub>340 nm</sub>/F<sub>380 nm</sub>)与[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>正相关,以R值变化表示[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>变化。采样频率为1 Hz。胞内钙的变化率计算:[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>变化率/%=(胞内钙峰值-基础值)/基础

值×100%;基础值为给药前的稳定值,胞内钙峰值为药物处理后的最大值。

DS低、中、高剂量组分别给予相应浓度的DS预孵育3 min后测量基础值。基础值测量完成50 s后,BK组及DS低、中、高剂量组均加入1 μmol/L的BK。对照组不作处理。BK加入后立即观察胞内钙变化,记录峰值,计算[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>变化率。

1.2.3 细胞形态学与细胞活性检测 将培养至第10天的细胞按以上分组处理,细胞加入BK后继续培养12 h,在显微镜下观察细胞形态学变化。

采用MTT法检测细胞活性。在培养细胞的96孔板中加入MTT(200 μL/孔),37 °C孵育4 h,去上清,每孔加入150 μL二甲亚砜,气浴震荡10 min,全自动酶标仪测定各孔在570 nm处的OD值。细胞存活率/%=(实验组OD<sub>570</sub>-空白对照组OD<sub>570</sub>)/(正常对照组OD<sub>570</sub>-空白对照组OD<sub>570</sub>)×100%。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 12.0软件处理数据。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD检验,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DS对BK诱导胞内钙离子浓度升高的影响

加入BK后,培养的细胞胞内钙离子浓度迅速升高,于15~20 s达峰值,随后又逐渐回复至初始水平。DS预处理对BK引起的胞内钙离子浓度升高有明显的抑制作用,且抑制作用呈浓度依赖性,见表1。

表1 DS对BK诱导的胞内钙离子浓度升高的影响(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	胞内[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 变化百分率
对照组	8	---
BK组	8	302.19±47.25
DS低剂量组	8	252.74±51.10 <sup>①</sup>
DS中剂量组	8	215.11±51.28 <sup>①</sup>
DS高剂量组	8	152.36±37.80 <sup>②</sup>

注:与BK组比较,<sup>①</sup>P<0.05,<sup>②</sup>P<0.01

### 2.2 DS对BK诱导胞内钙离子升高所致神经损伤的影响

实验结果显示,BK可诱导培养的大鼠皮质细胞受损。BK处理12 h后,神经元数量明显减少,细胞膜不完整、胞体膨胀甚至破裂、细胞核固缩、折光性差;DS各剂量处理组细胞数量明显增加,见图1。MTT结果显示,对照组神经元存活率为100.00%,BK组为(50.61±5.48)%,明显低于对照组(P<0.05);DS低、中、高剂量组的存活率分别为(67.53±8.41)%、(71.50±7.54)%和(89.08±3.23)%,均高于BK组(P<0.05),见图2。

## 3 讨论

BK是CaMII特异性激动剂,可与细胞膜上的B2受体结合,通过G蛋白介导激活磷脂酶C,经肌醇磷脂代谢途径,使IP<sub>3</sub>二酰甘油增加,促使内钙释放和继发性外钙内流,从而导致胞内钙离子浓度升高<sup>[9,10]</sup>。胞内钙离子超载,可激活钙依赖性的钙调

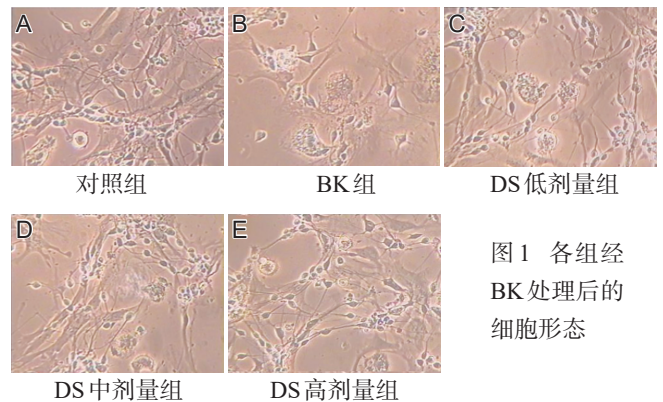


图1 各组经BK处理后的细胞形态

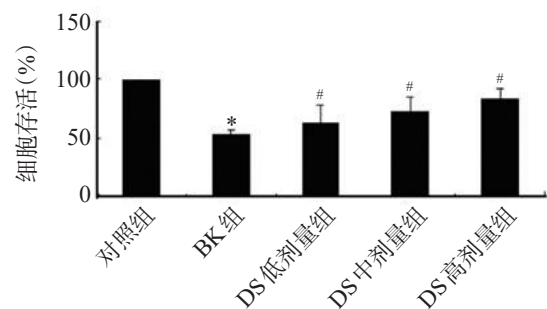


图2 各组细胞存活率柱状图

蛋白,改变细胞的结构和功能,导致细胞损伤。本研究用BK诱导建立胞内钙失衡的细胞模型,采用DS预处理拮抗BK诱导的神经细胞胞内钙离子浓度升高,探讨DS对神经细胞内钙稳态失调的拮抗作用及细胞保护作用。结果显示,DS可浓度依赖性的抑制BK引起的胞内钙离子浓度升高,对BK引起的细胞损伤具有一定的保护作用。但本研究样本量偏少,后续将增加样本量,进一步对其机制进行深入研究。

## 参考文献

- [1] Imamura K, Sahara N, Kanaan NM, et al. Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons [J]. Sci Rep, 2016, 6: 34904.
- [2] Agostini M, Fasolato C. When, where and how? Focus on neuronal calcium dysfunctions in Alzheimer's Disease [J]. Cell Calcium, 2016, 60: 289-298.
- [3] Jalini S, Ye H, Tonkikh AA, et al. Raised Intracellular Calcium Contributes to Ischemia-Induced Depression of Evoked Synaptic Transmission [J]. PLoS One, 2016, 11: e0148110.
- [4] Kim TY, Yoshimoto T, Aoyama Y, et al. Analysis of the protective effects of a neuronal Cav2.1 calcium channel in brain injury [J]. Neuroscience, 2016, 313: 110-21.
- [5] 杜佐华, 曾晚成, 龚培力, 等. 蝙蝠苏林碱抗实验性心律失常作用 [J]. 中药药理与临床, 1996, 12: 21-23.
- [6] 龚培力, 杜佐华, 曾繁典. 蝙蝠葛酚性碱的抗心律失常作用 [J]. 中药新药与临床药理, 1995, 6: 13-16.
- [7] 刘景根, 李瑞, 刘国卿, 等. (-)-S R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸引起的大鼠大脑皮质神经元损伤的保护作用 [J]. 药理学报, 1998, 33: 171-174.
- [8] 张涛, 胡怀强, 王旭辉, 等. 一种高效简便的原代神经元培养方法 [J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 471-472, 475.
- [9] Kanatsu Y, Chen NH, Mitoma J, et al. Gangliosides stimulate bradykinin B2 receptors to promote calmodulin kinase II-mediated neuronal differentiation [J]. J Biochem, 2012, 152: 63-72.
- [10] Sztajn K, Gomez R, Berg KA, et al. Divergence in endothelin-1- and bradykinin-activated store-operated calcium entry in afferent sensory neurons [J]. ASN Neuro, 2015, 7: pii: 1759091415578714.

(本文编辑:唐颖馨)