

糖皮质激素诱导的小鼠记忆功能低下及其作用机理

李卫平*, 张艳, 明亮, 陈敏珠

(安徽医科大学药理教研室, 合肥 230032)

摘要 目的:研究糖皮质激素(GCOR)诱导小鼠记忆功能降低及其作用机理。方法:采用 Fura-2/AM 钙离子荧光指示剂和双波长荧光分光光度计测定细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度;用透射电镜和流式细胞仪分别检测细胞凋亡(PCD)。结果:GCOR可分别诱导成年及老龄小鼠机体免疫功能降低,胸腺及脾脏脏器指数减小,老龄动物记忆功能降低,胸腺、海马细胞内 Ca^{2+} 超载,海马神经细胞 PCD 细胞数增加。体外试验结果亦表明,GCOR可直接诱导 T 淋巴细胞和海马神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 超载,细胞凋亡。结论:糖皮质激素可诱导小鼠记忆功能降低。细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 超载可能是引起小鼠免疫功能降低、智力水平下降、衰老和细胞凋亡的主要原因之一。

关键词 糖皮质激素;细胞内钙离子;钙离子荧光指示剂 Fura-2/AM;免疫功能;记忆功能;细胞凋亡

导致机体衰老引起智力下降的原因很多,其发病机理十分复杂,如何延缓机体衰老,提高老年人的生活质量是人类面临的重大研究课题。60岁以上人群中的早老性痴呆(Alzheimer's disease, AD)发病率高达5%~20%^[1,2]。由于糖皮质激素(glucocorticoids, GCOR)在机体正常衰老过程中对CNS、记忆功能的作用机理尚不清楚,因此本文研究了GCOR在诱导机体免疫功能降低的同时对动物智力水平的影响,揭示GCOR在机体正常衰老过程中的作用,分析其可能的作用原理。

材料与 方法

动物 昆明种小鼠,♀♂兼用,成年6~7月龄,25~30g,老龄22月龄,45~55g,由安徽医科大学动物中心提供(皖实动准01号),Wistar孕大鼠,(16~18)d由中国医学科学院动物中心提供。

药品与试剂 氢化可的松(hydrocortisone, HCOR)为中国上海信谊药厂产品,批号970818;地塞米松磷酸钠(dexamethasone, DXMS)由江苏扬州制药厂,批号970906, Fura-2/AM用二甲亚砜(DMSO)溶解稀释成 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮存液,PRMI1640、DMEM培养基、碘化丙啶(PI)、RNA酶均为Sigma产品,其余试剂均为分析纯。

仪器 被动回避实验装置由中国医学科学院药物研究所生产,日立RF-5000型荧光分光光度计为日本立公司产品,FCAS-420流式细胞仪为美国产品,透射电镜为日本产品。

GCOR诱导成年及老龄小鼠免疫功能低下及智力降低模型的制备^[2,3] 随机将成年和老龄小鼠分为正常对照和GCOR组,每组12动物,♀♂各半。GCOR($4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, sc,共21d),给药后21d,22d分别用避暗法检测动物学习和记忆力水平变化,d22称体重后断头处死动物,分别称取胸腺和脾脏重量,计算脏器指数。

胸腺细胞及神经细胞悬液制备 按文献方法^[4],断头处死小鼠及Wistar孕鼠,摘取胸腺或剖腹及子宫取胎鼠,剥离大脑皮层及海马,将胸腺及神经细胞分别置于冰浴的RPMI1640或DMEM培养基中,剔除血管及脑膜,常规制备胸腺及神经细胞悬液,经200目滤网过滤,用Hanks液将细胞浓度调整为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,台盼蓝排拆实验细胞成活率在90%以上者进入下一步实验。

神经细胞突触体的制备^[4,5] 断头处死小鼠,剥离皮层及海马,每克脑组织加入冰冷的 $0.3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液5mL,充分机械匀浆,匀浆液离心($300 \times g$)10min,取上清液 $12\,000 \times g$ 离心15min,沉淀用 $0.7\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液12mL悬浮,取2mL铺在 $0.8\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液各5mL做成的密度梯度上,水平头下 $150\,000 \times g$,离心30min,取两界面上的悬浮带,置 $0.3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6mL蔗糖液中悬浮。以 $20\,000 \times g$ 离心30min,取沉

淀加人工脑浆液(CSF) 6 mL, 500 × g 离心 30 min, 取沉淀加 CSF 悬浮。用 Lowry 法测定蛋白, 调蛋白的浓度至 1 mg · mL⁻¹, 全部操作过程在 4 °C 条件下进行。

[Ca²⁺]_i的测定 样品管用 Fura-2/AM 负载, 浓度为 5 μmol · L⁻¹, 于 37 °C 恒温振荡水浴负载 45 min, 用 Hanks 液洗 2 次, 最后分别用无 Mg²⁺ Hanks 和 CSF 液悬浮。荧光测定采用日立 RF-5000 型荧光分光光度计, 激发波长为 340 nm 和 380 nm, 发射波长 500 nm, 光栅狭缝均为 5 nm, 转换速度为 4 s, 根据荧光强度变化按下式计算 [Ca²⁺]_i。[Ca²⁺]_i = kd × (R - R_{min}) / (R_{max} - R) × sf2/sb2, 其中 kd 为 224 nmol · L⁻¹; R 为 340/380 nm 的荧光强度比值; R_{max} 为加入 0.1% Triton X100 后 340/380 nm 的荧光强度比值; R_{min} 为加入 EGTA 5 mmol · L⁻¹ 后 340/380 nm 的荧光强度比值; Sf2 和 Sb2 分别为零钙和饱和钙时 380 nm 处的荧光强度。

透射电镜及流式细胞仪观察和检测细胞凋亡方法^[6,7] 取海马组织, 加 2.5% 戊二醛 3 mL, 固定 12 h 以上, 常规制备透射电镜样品, 观察并照相。收集 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 6~12 h 的胸腺细胞, 500 × g, 4 °C 冰箱内固定 12 h 以上, 离心后将细胞重悬于 100 μg · ml⁻¹ PI (PBS 配制) 中, 避光冰浴 1 h, 过 400 目尼龙网, 在 FACS-420 型流式细胞仪上计数 10 000 个细胞, 测定各期 DNA 含量并计数凋亡细胞所占比例。

统计学处理 所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表, 差

异的显著性用 *t* 检验。

结 果

1 HCOR对成年及老龄小鼠胸腺及脾脏指数的影响

按表 1 分组给药, 结果表明, HCOR 可分别使成年及老龄小鼠胸腺和成年小鼠脾脏的脏器指数明显降低, 表明 HCOR 对小鼠机体免疫功能有抑制作用。

Tab 1 Effect of hydrocortisone (HCOR, 4 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 21 d, sc) on index of thymus and spleen in adult and old mice

Group	Index/ mg · 10 g ⁻¹ BW	
	Thymus	Spleen
Adult normal	1.956 ± 0.686	3.519 ± 0.585
Adult + HCOR	1.348 ± 0.524*	2.731 ± 0.7251**
Old normal	1.562 ± 0.234	3.280 ± 0.846
Old + HCOR	0.924 ± 0.251**	2.416 ± 0.252

$\bar{x} \pm s$, *n* = 10. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs normal. BW: body weight.

2 HCOR对老年及老龄小鼠避暗行为的影响

表 2 结果表明, HCOR 可引起老龄小鼠避暗潜伏期显著缩短, 错误次数明显增加, 但对成年小鼠的潜伏期及错误次数没有影响, 提示 GCOR 对老龄小鼠的学习记忆力有降低作用。

Tab 2 Effect of hydrocortisone (HCOR, 4 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ sc, × 21 d) on memory of adult and old mice in step through test

Group	Latency (5 min)		Error number (5 min)	
	Train d 21	Test d 22	Train d 21	Test d 22
Adult + HCOR	26.0 ± 1.5	158.2 ± 78.2	5.8 ± 1.3	1.3 ± 1.0
Adult + HCOR	13.4 ± 3.1	125.9 ± 85.8	6.4 ± 3.5	1.7 ± 1.0
Old normal	117.0 ± 55.2	160.8 ± 31.0	3.2 ± 1.2	1.6 ± 0.6
Old HCOR	109.0 ± 62.0	87.3 ± 40.8**	4.5 ± 1.5	3.5 ± 1.1*

$\bar{x} \pm s$, *n* = 10. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs normal.

3 HCOR对成年及老龄小鼠胸腺细胞及海马细胞 [Ca²⁺]_i的影响

按表 3 分组给药, 结果表明, HCOR 可引起成年及老龄小鼠胸腺和海马神经细胞 [Ca²⁺]_i 升高, 但升高老年小鼠胸腺及海马细胞 [Ca²⁺]_i 作用更加明显, 表明 HCOR 可引起成年及老龄小鼠神经元 [Ca²⁺]_i 超载。

4 HCOR对成年及老龄小鼠海马神经细胞 PCD的影响

常规光镜和透射电镜的检测结果表明, HCOR 可分别诱导成年及老龄小鼠皮层、海马 CA3 区神经细胞体积缩小, 细胞及细胞核固缩, 染色体裂解、破裂并向核膜转移, 形成由完整细胞膜包裹的细胞凋亡小体, 提示 HCOR 可以分别诱导和促进成年及老

龄小鼠海马神经细胞 PCD,但对老龄小鼠的作用较强。

Tab 3 Effect of hydrocortisone(HCOR, 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹ sc, × 21 d) on intracellular free [Ca²⁺]_i of thymocyte and hippocampus in adult and old mice

Group	[Ca ²⁺] _i / nmol·L ⁻¹	
	Thymus	Hippocampus
Adult normal	231.88 ± 37.34	419.71 ± 49.66
Adult + HCOR	267.36 ± 28.61*	506.14 ± 52.69**
Old normal	497.85 ± 84.23 ^{△△}	464.06 ± 78.89
Old HCOR	827.10 ± 76.54*** ^{△△}	751.25 ± 53.15*** ^{△△}

$\bar{x} \pm s, n = 8$. Drug treated as Tab 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs adult normal; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs old normal.

5 DXMS对 Wistar 孕鼠(16 ~ 18 d)胸腺、皮层神经细胞[Ca²⁺]_i及 PCD的作用

表 4 结果表明,DXMS 可直接剂量依赖性诱导皮层神经细胞及胸腺细胞[Ca²⁺]_i超载,DXMS 与胸腺细胞温育 8 h 后,在诱导细胞[Ca²⁺]_i (312.21 ± 70.32 nmol·L⁻¹) 升高的同时还可促进细胞凋亡(53.3%),表明 DXMS 诱导细胞 PCD 可能与其升高[Ca²⁺]_i 有关。

Tab 4 Effect of dexamethasone (DXMS) on [Ca²⁺]_i of thymus and hippocampus of rats(16 ~ 18 d) in vitro

Group	Dose/ μmol·L ⁻¹	[Ca ²⁺] _i / nmol·L ⁻¹	
		Thymus	Hippocampus
Normal		156.2 ± 18.2	123.1 ± 7.7
DXMS	0.01	203.6 ± 22.4*	183.2 ± 15.3**
	0.1	254.6 ± 27.1*	232.7 ± 21.9**
	1	362.4 ± 65.3*	391.0 ± 55.4**

$\bar{x} \pm s, n = 4$. ** $P < 0.01$ vs normal, cultured with DXMS for 30 min.

讨 论

钙离子作为一个重要的信使参与细胞内多种生理、病理功能的调节,钙平衡的紊乱可导致细胞内游离钙[Ca²⁺]_i 浓度持续增高,[Ca²⁺]_i 超载在引起机体免疫功能失调和神经系统损伤的发生发展中起决定作用^[4]。

程序性细胞死亡或细胞凋亡(PCD)是由于细胞内[Ca²⁺]_i 超载,激活核内核酸限制性内切酶,水解 DNA,使其变成 160 ~ 200 BP 的片段,导致细胞

PCD。在淋巴细胞,抗原抗体反应[Ca²⁺]_i 载体等也可引起细胞内持续性的[Ca²⁺]_i 升高,[Ca²⁺]_i 升高可诱导淋巴细胞活化、增殖,但为何不引起细胞 PCD,这可能与抗原抗体反应等在诱导淋巴细胞[Ca²⁺]_i 升高的同时还激活细胞内蛋白激酶(PKC)有关。如果[Ca²⁺]_i 升高,CAMP 含量增加而不伴有 PKC 的激活,即可引起细胞凋亡^[7]。

本实验的结果表明,长期大剂量应用 GCOR 可引起成年与老龄小鼠机体免疫功能降低,同时还可引起 CNS 中皮层和海马 CA3 区神经细胞萎缩,老龄动物的学习和记忆能力下降。体内外 Fumr-2/AM 检测结果表明,GCOR 在体内、外均可直接引起胸腺、皮层和海马神经细胞[Ca²⁺]_i 超载,引起动物体内产生的自由基增加、清除自由基的物质和酶类活性减少(资料待发表),导致胸腺细胞、皮层和海马等神经细胞[Ca²⁺]_i 超载。促进胸腺细胞及神经细胞 PCD,[Ca²⁺]_i 超载,可能是 GCOR 引起机体免疫功能抑制、衰老及智力水平降低的主要原因之一。GCOR 在升高老龄小鼠胸腺及海马神经细胞[Ca²⁺]_i 的作用明显强于成年小鼠,可能是 GCOR 引起老龄小鼠智力水平下降而对成年动物影响不明显的原因。老龄动物与青年、成年动物相比,老龄动物下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进,肾上腺皮质合成和释放 GCOR 及血中 GCOR 浓度远高于青年及成年动物,机体免疫功能失调,胸腺、神经细胞的[Ca²⁺]_i 浓度亦远远高于青年及成年动物,人也有类似的现象^[8],表现为衰老及智力水平下降。但 GCOR 在诱导机体衰老过程中的其他作用仍需进一步研究。

致谢 本实验是在医科院药物所张均田教授、吴俊芳、屈志炜等药理二室的老师们的热情指导下,并得到张庆柱等博士的大力支持下完成。

References

- Lannfelt L, Fockesson R. Alzheimer's disease: molecular genetics and transgenic animal models. *Behav Brain Res*, 1993, **57**: 207
- Luine VN, Spencer RL, McEwen BS. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain Res*, 1993, **616**: 65
- Perrin-Wolff M, Bertoglio J. Structure-activity relationships in glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes. *Biochem Pharmacol*, 1995, **50**: 103
- Jiang XY, Zhang JT, Shi CZ. Mechanism of action of ginsenoside Rb₁ in decreasing intracellular Ca²⁺. *Acta*

- Pharm Sin*, 1996, **31**: 321
- 5 Wu JF, Zhang JT. Effects of nerve growth factor on intracellular free Ca^{2+} in oxygen/lylu dose-deprived cultures from cerebral of fetal rats. *Acta Pharm Sin*, 1998, **33**: 330
- 6 Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980, **284**: 555
- 7 Xiao MS, David DE. Characterization of apoptosis in thymocytes isolated from dexamethasone-treated rats. *Biochem Pharmacol*, 1992, **11**: 2131
- 8 Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Stress dwoor regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the rat brain. *Endocrinology*, 1984, **114**: 287

GLUCOCORTICOID INDUCED DECREASE OF INTELLIGENCE IN MICE AND ITS MECHANISM

Li Weiping(Li WP), Zhang Yan(Zhang Y), Ming Liang(Ming L) and Chen Minzhu(Chen MZ)

(Department of Pharmacology, Anhui Medical University, He fei 230032)

ABSTRACT **AIM:** To study the effect of glucocorticoids(GCOR) on intelligence in mice and its mechanism. **METHODS:** Immunosuppression and decrease in intelligence of adult and old mice were induced by GCOR(sc, 4 mg • kg⁻¹, qd × 28). Calcium fluorescence indicator Fura-2/AM was used to measure free intracellular calcium ([Ca²⁺]_i). Programmed cell death(PCD) and apoptosis were measured by means of electron microscopy and flow cytometry. **RESULTS:** GCOR was shown to be immunosuppress and decrease intelligence as well as caused PCD of hippocampus in mature and old mice *In vivo* and *in vitro*. This increase of GCOR continued in the free intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) of thymocytes and hippocampus and caused PCD of thymocytes. **CONCLUSION:** GCOR was shown to be immunosuppress and decrease in intelligence and PCD in thymocytes and hippocampus resulted in sustaining increase in [Ca²⁺]_i which may be one of the main reasons for the decrease of immunity and intelligence of mice and the process of ageing and apoptosis.

KEY WORDS immunosuppression; intelligence; Fura-2; intracellular free Ca²⁺; apoptosis