

## 褪黑素对大脑皮层细胞一氧化氮含量及其神经毒性作用的影响

张庆柱, 赵明瑞, 张均田\*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 目的:探讨褪黑素(MT)抗衰老作用与神经细胞 NO 释放之间的联系。方法:连续给予老年小鼠 MT,检测大脑皮层神经细胞 NO 含量的变化,并用原代培养的大鼠皮层神经元,去血清培养后,观察 MT 对高钾、谷氨酸(Glu)诱发 NO 释放及硝普钠(SNP)致神经毒性作用的影响。结果:MT 能明显抑制老年小鼠脑内 NO 含量的增高,并拮抗 KCl 与 Glu 诱发的 NO 释放及 SNP 引起的神经毒性,对大脑神经元有保护作用。结论:MT 抑制大脑皮层 NO 含量增高,可能是其抗衰老作用的机制之一。

**关键词** 褪黑素; 一氧化氮; 神经毒性; 神经元; 衰老

褪黑素(melatonin, MT)是松果体分泌的一种神经内分泌激素。许多研究表明,体内连续给药可以延长寿命,推迟衰老及减低老年性疾病的发生<sup>[1]</sup>。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种神经递质,在神经发育及衰老过程中有重要作用。正常情况下,参与多种神经功能,但若合成和释放过多,则会诱发细胞毒作用,导致细胞损伤,加速神经元凋亡或死亡<sup>[2]</sup>。正常培养的皮层神经细胞培养液中 NO 含量低,去血清后,培养液中 NO 含量可增加数 10 倍,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性增加约为正常细胞的 3 倍。与去血清组相比较,观察 MT 能否使 NO 含量降低,以研究细胞损伤与 NO 的关系及 MT 对其影响。本文检测连续用 MT 引起老年小鼠大脑皮层神经元 NO 含量的变化,并观察 MT 对原代培养大鼠皮层神经元高钾、谷氨酸(glutamate, Glu)诱发 NO 释放,以及硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)神经毒性作用的影响,旨在探讨 NO 与神经衰老的关系及 MT 抗衰老作用的机制。

## 材料与 方法

**药品与试剂** MT(本所合成室合成);MTT(溴化-(4,5)-二甲基-2-噻唑基-2,5-二苯基四氮唑),硝普钠(SNP),谷氨酸(Glu),多聚赖氨酸(分子量 15~30 万),二甲基亚砷(DMSO),十二烷基磺酸钠

(SDS),HEPES(*N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2'-乙烷磺酸)(Sigma);乳酸脱氢酶测定试剂盒(北京化工厂临床试剂分厂);DMEM 合成培养基,马血清(Gibco BRL);其它为国产分析纯试剂。

**磷酸缓冲液**(PBS,  $g \cdot L^{-1}$ ) NaCl 8.0, KCl 0.2,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  3.58,  $KH_2PO_4$  0.2; pH 7.4。

**Griess 试剂** 0.1%萘乙二胺溶液与 1%磺胺(5%)磷酸溶液,于用前 12 h 内等体积混合备用。

**仪器** 752Z-U/VIS 紫外可见光栅分光光度计(北京光学仪器厂);二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司);相差显微镜(日本 Olympus 公司);24 孔培养板(美国 Costar 公司)。

**动物** 清洁级昆明种老年小鼠(14 个月),♀ Wistar 大鼠(孕期 16~18 d)由中国医学科学院实验动物繁育场提供。

**NO 标准曲线** 以  $10^{-5} mol \cdot L^{-1}$  亚硝酸钠溶液,配制终浓度分别为 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0  $\mu mol \cdot L^{-1}$  的亚硝酸钠 PBS 液 0.5 ml,加至 2 ml 试剂中,总反应体积 2.5 ml,混匀后静置 20 min,于 550 nm 波长时测定溶液吸光度(A 值)。以亚硝酸钠浓度( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )为横坐标,所测 A 值为纵坐标,作出  $[NO^-] A$  标准曲线,并求出其直线回归方程及相关系数  $r$ 。

**实验分组** 昆明种小鼠分为 4 组,每组 8 只,♀♂各半,于每晚 7~9 点 ip 用药,连续 14 d。(1)成年对照组:3~6 个月,体重 25~35 g, ip 生理盐水 0.01 ml·g<sup>-1</sup>体重(内含溶媒 95%乙醇 0.5%);(2)老年对照组:15~18 个月,体重 45~55 g, ip 生理盐

收稿日期:1998-09-07

\* 联系人 Tel:(010) 631 651 79, Fax:(010) 6301 7757, E-mail:

Zjtian@public.bta.net.cn

水(同上);(3)低剂量治疗组( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重): 15 ~ 18 个月, 体重 45 ~ 55 g, ip 含 0.005% MT (95%乙醇溶解)之生理盐水液  $0.01 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$  体重 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ );(4)高剂量治疗组( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重): 15 ~ 18 个月, 体重 45 ~ 55 g, ip 含 0.02% MT 之生理盐水溶液  $0.1 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$  体重 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。各组实验小鼠均在同样自然光照条件下饲养。

**标本制备及测定** 将小鼠拉颈脱臼处死,剪下头部,分离出两侧大脑皮层,剪碎,置于 PBS 5 ml 中匀浆,  $20\,000 \times g$  离心 30 min,取上清液保存待测。蛋白定量采用考马氏亮蓝法<sup>[3]</sup>。取上清液 0.5 ml,加入 Griess 试剂 2 ml 中,混匀,静置 20 min 后,于 550 nm 处测吸光度(A 值),根据 NO 标准曲线计算 NO 含量(单位为  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein)。

**完全培养基** DMEM(净重)  $13.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,小牛血清 10%,马血清 10%,  $\text{NaHCO}_3$   $3.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , HEPES  $2.382 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,青霉素 G 100 ku,链霉素  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.2。

**无血清培养基** 除不含小牛血清及马血清外,余相同。

**大鼠皮层神经细胞的原代培养**<sup>[4]</sup> 孕期 16 ~ 18 d 的清洁级大鼠,12%水合氯醛  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉,常规消毒后,剖腹取出胎鼠,取出双侧大脑皮层,置于冰冷的完全培养基中,吸管轻轻地吹打分散细胞,悬液经 200 目铜网过滤,用完全培养基调整细胞浓度约为  $3 \times 10^6$  个  $\cdot \text{ml}^{-1}$ ,接种 0.5 ml 至预先用  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  多聚赖氨酸覆盖过的 24 孔培养板上,置 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中。培养 1 d 后换液,以去除悬浮之死亡细胞,4 ~ 5 d,用阿糖胞苷(终浓度  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 24 h,以抑制非神经细胞的生长,然后每 3 ~ 4 d 换一次新鲜的完全培养基(1 ml),细胞培养至 12 ~ 14 d 观察照像并开始以下实验。

**神经元损伤模型**<sup>[5]</sup>及用药 将培养细胞分成 3 组,换以无血清培养基并分别加入实验药物及致损伤物质。(1)无血清对照组:换以无血清培养基继续培养;(2)毒性对照组:加入终浓度分别为  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 500 和  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 KCl,谷氨酸及硝普钠,孵育 30 min 后,再换以无血清培养基;(3)药物处理组:在损伤细胞前先加入终浓度分别为  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MT。以上 3 组细胞均继续培养 24 h。

**形态学观察** 相差显微镜观察以上各组的细胞形态学改变并照相。

**MTT 比色**<sup>[6]</sup> 处理后 20 h,每孔加入 5

$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  MTT 0.1 ml (终浓度  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),继续培养 4 h,加入含有 DMSO (50%) 和 SDS (20%) 的 PBS 混合液体 1 ml,  $37^\circ\text{C}$  放置 18 ~ 20 h,待培养孔内颗粒完全溶解,吹打吸出后,分光光度计于 570 nm 处测定吸光度( $A_{570}$ )。计算 MT 对毒性物质引起神经细胞损伤的抑制率。

**LDH 测定** 按 LDH 试剂盒说明进行标准曲线绘制及标本测定。24 h 后,取细胞外液(培养液)测 LDH 释放,然后  $-20^\circ\text{C}$  冻融细胞 20 h,测总 LDH,以细胞外液 LDH 占总 LDH 的百分比表示。

**NO 释放** Griess 法<sup>[7]</sup>测定培养液中 NO 含量。

## 结 果

### 1 MT 对老年小鼠脑皮层细胞 NO 释放的抑制作用

直线回归方程:  $Y = 0.0078 + 27.51X$  ( $r = 0.9996$ )。

老年小鼠脑组织 NO 含量 ( $0.3894 \pm 0.040 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein) 较成年组 ( $0.3331 \pm 0.071 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein) 有增加趋势,但差别不显著 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ ,  $P > 0.05$  比成年组)。而在老年组中,两用药组老年大鼠脑皮层 NO 含量:低剂量 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组:  $0.2837 \pm 0.040 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein;高剂量 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组:  $0.2727 \pm 0.040 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein 明显降低 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.01$  比老年对照组)。

### 2 MT 对 KCl, Glu 及 SNP 诱发的神经细胞形态学改变的保护作用

正常神经细胞培养至 14 d 时,胞体呈锥形,梭形或三角形,突起多、长、粗大,相互交织成网状,折光性好。去血清后,细胞折光性下降,突起变短,数量减少,胞体增大,但无溶解和脱落等改变。经 KCl, Glu 和 SNP 作用后,细胞出现肿胀,界限不清,突触体萎缩、断裂,甚至脱落和崩解。如同时与 MT 合用,则细胞损伤程度明显减轻,细胞形态基本保持完整,与去血清对照组细胞相比较,形态相似(图 1)。

### 3 MT 对 KCl, Glu 诱发的神经细胞损伤致 NO 释放增多的防护作用

KCl, Glu 为细胞毒性物质,可致神经细胞损伤而使 NO 释放增多。在原代培养的大鼠皮层神经元,MT 可减少 KCl 诱发的 NO 的释放 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ 。去血清对照组:  $0.936 \pm 0.090 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , KCl

毒性对照组:  $1.455 \pm 0.098 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*, MT  $10^{-6}$  + KCl 组:  $1.134 \pm 0.097 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*\* , MT  $10^{-7}$  + KCl 组:  $1.180 \pm 0.070 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*\* , MT  $10^{-8}$  + KCl 组:  $1.230 \pm 0.078 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*\* ; \*  $P < 0.01$  比去血清对照组, \*\*  $P < 0.01$  比 KCl 毒性对照组), 以及抑制谷氨酸诱发的 NO 释放( $\bar{x} \pm s, n = 6$ . 去血清对照组:  $0.936 \pm 0.090 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Glu 毒

性对照组:  $1.317 \pm 0.064 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*, MT  $10^{-6}$  + Glu 组:  $0.877 \pm 0.099 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*\* , MT  $10^{-7}$  + Glu 组:  $0.927 \pm 0.100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*\* , MT  $10^{-8}$  + Glu 组:  $0.987 \pm 0.077 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ \*\* ; \*  $P < 0.01$  对比去血清对照组, \*\*  $P < 0.01$  对比 Glu 毒性对照组), 对神经元具有明显的保护作用。

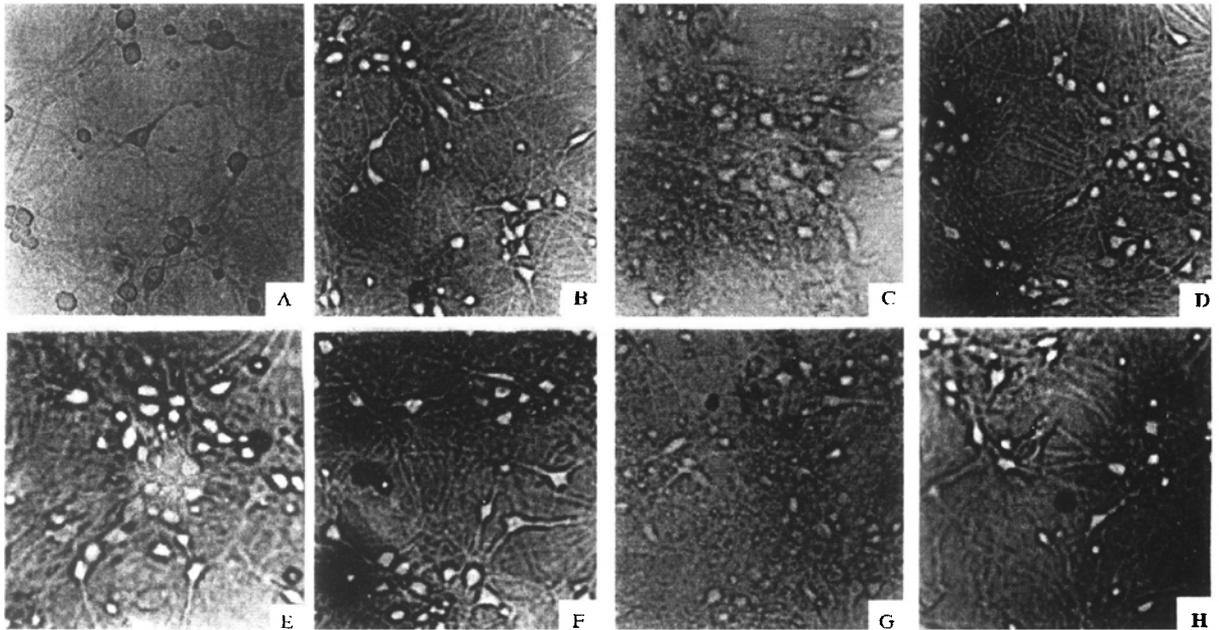


Fig 1 Rat cortical neurons visualized by phase-contrast microscope( $\times 200$ ) . A. Complete medium ; B. Serum-free medium ; C. Glu ; D. MT + Glu ; E. KCl ; F. MT + KCl ; G. SNP ; H. MT + SNP .

4 MT对硝普钠引起神经元损伤的保护作用

大量的 NO 也可引起细胞毒作用。用硝普钠(释放 NO) 造成对细胞的损伤, 观察 MT 对 NO 所致原代培养皮层神经元损伤的作用<sup>[8]</sup>。结果可见, 硝普钠造成 MTT 活性显著降低, LDH 释放明显增加, MT 各剂量组则使 MTT 活性增强, LDH 释放减少, 表明 MT 能明显地抑制硝普钠的神经毒作用, 对神经细胞有保护作用(表 1, 表 2)。

Tab 1 Protective effect of MT ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on sodium nitroprusside(SNP,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )-induced neurotoxicity in cultured rat cortical cells. Cell viability was measured using colorimetric MTT assay

Treatment	A <sub>570</sub> value	% inhibition of MT
Serum-free control	$0.945 \pm 0.013$	
SNP toxicity	$0.717 \pm 0.052^*$	
SNP + MT $10^{-6}$	$0.933 \pm 0.027^{**}$	94.7
$10^{-7}$	$0.914 \pm 0.031^{**}$	86.4
$10^{-8}$	$0.898 \pm 0.032^{**}$	79.4

$\bar{x} \pm s, n = 6$ . \*  $P < 0.01$  vs serum-free control ; \*\*  $P < 0.01$  vs SNP toxicity. MT: Melatonin, SNP: Sodium nitroprusside

Tab 2 Inhibitory effect of MT ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on SNP ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )-induced LDH release in cultured primary cortical neurons in rats.

Group	LDH	Total LDH/ $\mu \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$	LDH release rate/ %
Serum-free control	$231.32 \pm 13.23$	$715.57 \pm 28.28$	$0.323 \pm 0.006$
SNP toxicity	$336.87 \pm 22.95$	$776.91 \pm 49.89$	$0.433 \pm 0.05^*$
SNP + MT $10^{-6}$	$240.61 \pm 12.72$	$737.12 \pm 26.40$	$0.326 \pm 0.008^{**}$
$10^{-7}$	$244.17 \pm 12.22$	$727.03 \pm 30.33$	$0.336 \pm 0.005^{**}$
$10^{-8}$	$251.09 \pm 14.46$	$726.84 \pm 36.82$	$0.345 \pm 0.003^{**}$

$\bar{x} \pm s, n = 6$ . \*  $P < 0.01$  vs serum-free control ; \*\*  $P < 0.01$  vs SNP toxicity.

## 讨 论

NO是中枢神经系统(CNS)中一个重要的信使物质。在CNS中,NO主要通过Glu递质的NMDA受体被激活而生成,引起靶细胞上cGMP升高而产生生理效应<sup>[9]</sup>。NO除介导Glu神经传导外,还介入了Glu神经毒性。一般认为,过量的NO对神经元具有毒性作用。早在1991年Dawson等就发现,培养的脑皮层神经元对NO毒性很敏感。Glu受体的过度刺激和Ca<sup>2+</sup>大量内流可引起Glu神经毒性,内源性NO参与了这一过程<sup>[10]</sup>。NO与衰老之间也有密切关系,即NO的增加导致衰老。脑老化的一个特征是细胞内Ca<sup>2+</sup>超载,Ca<sup>2+</sup>浓度增高,激活cNOS(构成型一氧化氮合酶,constitutive NOS),合成并释放大量的NO<sup>[11]</sup>。

MT是松果体分泌的一种体内激素,随年龄增长而逐渐减少;反之,MT分泌减少可导致机体衰老,以及促使一些老年性疾病的发生<sup>[12]</sup>。近年来许多研究显示,MT是一种天然抗衰老激素,如果切除大鼠松果腺使MT生成减少会促进衰老过程的加快,而外源性使用MT则可显著延长寿命<sup>[13]</sup>。在海马神经元,MT能够阻止兴奋性神经传递以及NO能神经通路功能增强所致的慢性死亡<sup>[14]</sup>。本研究表明,MT降低老年小鼠大脑皮层NO的含量,减少原代培养大鼠脑皮层细胞KCl,Glu诱发的NO释放,以及对抗NO引起的神经毒性作用,提示MT抑制神经细胞内Ca<sup>2+</sup>超载,减少突触体Glu释放以及拮抗Glu兴奋毒作用,进而阻止大脑皮层NO含量增高,可能是其抗衰老作用的系列机制之一。

## 参 考 文 献

- 1 Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc*

- Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 787
- 2 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991, **43**: 109
- 3 Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitative of microgram quantities of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248
- 4 Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 1987, **7**: 357
- 5 Dennis WC, Koh JY, Stephen P. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 1988, **8**: 185
- 6 颜礼谦,周振华,李萍,等. 缺氧对离体鸡胚前脑神经细胞生长的影响. *生理学报*, 1992, **44**: 524
- 7 Green LC, Wagher DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131
- 8 Maiese K, Wagner J, Boccone L. Nitric oxide: a downstream mediator of calcium toxicity in the ischemia cascade. *Neurosci Lett*, 1994, **166**: 43
- 9 Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 9030
- 10 Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, et al. Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 1993, **13**: 2651
- 11 Nowicki JP, Duval D, Poignet H. Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol*, 1991, **204**: 339
- 12 Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol*, 1995, **30**: 199
- 13 Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Melatonin, stress and the immune system. *Pineal Res Rev*, 1989, **7**: 203
- 14 Skaper SD, Ancona B, Facci L, et al. Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *Fed Am Soc Exp Biol J*, 1998, **12**: 725

## EFFECTS OF MELATONIN ON NITRIC OXIDE CONTENT AND ITS NEUROTOXICITY IN CEREBRAL CORTEX

Zhang Qingzhu(Zhang QZ), Zhao Mingrui(Zhao MR) and Zhang Juntian(Zhang JT)

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

**ABSTRACT AIM:** To explore the mechanisms of the antiaging action of melatonin(MT). **METHODS:** The effects of MT on nitric oxide(NO) content, high concentrations of KCl, glutamate(Glu)-induced NO release, and sodium nitroprusside(SNP)-elicited neurotoxicity were studied in old mouse cerebral cortex and rat

primary cortical cultures. **RESULTS:** MT could inhibit the elevation of NO content in old mouse cerebral cortex, reduce the KCl, Glu-induced NO release, antagonize the SNP-induced neurotoxicity in cultured cortical cells of fetal rat. **CONCLUSION:** The inhibitory effects on NO release and its neurotoxicity were probably one of the mechanisms of the MT antiaging action.

**KEY WORDS** melatonin; nitric oxide; neurotoxicity; neurons; aging