

蝙蝠葛苏林碱及其异构体对 PC12 细胞缺血性损伤的保护作用

刘景根* 李 瑞 刘国卿 王金晞**

(中国药科大学药理教研室, 南京 210009; ** 南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210008)

摘要 用细胞培养术,以 NaCN 加缺糖引起 PC12 细胞损伤作为细胞缺血性损伤的模型,观察蝙蝠葛苏林碱(DS)及其 3 个光学异构体对 PC12 细胞缺血性损伤的保护作用;以 Fura-2/AM 为 Ca^{2+} 的荧光探针,用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统观察 DS 及异构体对 NaCN 引起的 Ca^{2+} 内流的抑制作用。结果表明 DS 及 3 个异构体在 $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内对 PC12 细胞损伤有较明显的保护作用,其机制之一与抑制 NaCN 加缺糖诱发的细胞内游离 Ca^{2+} 异常升高有关。

关键词 蝙蝠葛苏林碱;嗜铬细胞癌 PC12 细胞;细胞培养;细胞内游离 Ca^{2+} ;兴奋性氨基酸

蝙蝠葛苏林碱(daurisoline, DS)是从防己科植物蝙蝠葛根茎中提取的生物碱。其天然品为(-)-R·R 构型。为了探索 DS 的构效关系和优化结构改造,我校药化教研室全合成了 DS 的另外 3 个光学异构体:非对映异构体(-)-S·R, (+)-R·S 和对映异构体(+)-S·S。以前的工作表明 DS 及 3 个异构体对高 K^{+} 引起的胞外 Ca^{2+} 内流均有抑制作用,其中以(-)-S·R, (+)-R·S 和(-)-R·R 较强^[1]。DS 还能抑制 NMDA 受体激动剂喹啉酸引起的 Ca^{2+} 内流^[2]。表明 DS 对电压依赖性和受体依赖性 Ca^{2+} 通道均有阻断作用。DS 也能抑制缺血状态下的大鼠海马脑片释放谷氨酸^[3]。最近的研究表明,DS 对小鼠整体缺氧,急性脑缺血和 大鼠局灶性脑缺血均有较好的保护作用^[4]。本文采用体外细胞培养技术,根据文献方法^[5],以缺氧加缺糖模拟缺血状态,观察 DS 及异构体体外对 NaCN 加缺糖引起的 PC12 细胞缺血性损伤的保护作用,和对细胞内游离 Ca^{2+} 升高的影响,旨在从细胞水平探讨 DS 及其异

构体的作用机制。

材 料 和 方 法

药品与试剂 MTT[溴化-(4,5)-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑]为 Fluka 产品;Fura-2/AM, verapamil, 多聚赖氨酸为 Sigma 产品;ketamine 由北京制药厂生产;DMEM 为 Gibco 产品;DS 及异构体由本校药化教研室提供。

仪器 BG-3022 型酶联免疫检测仪(华东电子管厂);AR-CM-MIC 阳离子测定系统及软件(美国 Spex 公司);Diapho-TMD 型荧光倒置显微镜(Nikon 公司); CO_2 孵箱(美国 Shelton 公司)。

PC12 细胞培养 嗜铬细胞癌株 PC12 细胞由上海药物研究所朱兴族教授惠赠。用含 10% 小牛血清 DMEM 培养液(含青霉素钠 $100 \text{ u} \cdot \text{ml}^{-1}$, 链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pH 7.4)将细胞稀释为每毫升悬液含 2×10^5 个细胞,接种于预先用多聚赖氨酸($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)处理过的 24 孔培养板中, 37°C , 5% CO_2 条件下培养 2~3 d, 待细胞长满孔底后即可用于实验。

药物对 NaCN 加缺糖引起的 PC12 细胞损伤的影响 方法参照文献^[6],稍加改进,吸去

本文于 1997 年 4 月 8 日收到。

本研究为国家自然科学基金资助课题,项目编号 No 39470804

* 现址:军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850

细胞培养液,用 D-Hank's 液洗 2 次,加入不含糖的 Earle 液培养 1 h。不含糖 Earle 氏液成分 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为 NaCl 116.4, KCl 5.4, CaCl_2 1.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.6, NaHCO_3 26.2, Mannitol 5.5; pH 7.4。然后加入浓度分别为 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} 和 $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DS 及 3 个异构体,作用 30 min 后加入 NaCN (终浓度 $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。处理 10 min 后,吸去含 NaCN 的培养液。用 D-Hank's 液洗 3 次后加入不含小牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h,再加入 MTT (终浓度为 $0.5 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$),培养 4 h 后吸去培养液,每孔加入二甲亚砜 $200 \mu\text{l}$,待培养板孔内的颗粒完全溶解后,用酶联仪测定孔内溶液在 570 nm 处的吸收度(A)。MTT 可被活细胞吸收,并在线粒体被还原成蓝紫色的颗粒,测定标本蓝紫色颗粒溶解后的 A 值,可定量反映活细胞数量^[7]。按照下式计算药物对 NaCN 加缺糖引起的 PC12 细胞损伤的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{(\text{drug})} - A_{(\text{NaCN})}}{A_{(\text{control})} - A_{(\text{NaCN})}}$$

药物对 NaCN 引起的 PC12 细胞内游离 Ca^{2+} 升高的影响 测钙前 24 h,将培养瓶中的 PC12 细胞按 $10^4 \text{cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度接种于含预先用多聚赖氨酸 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 浸泡过的盖玻片的六孔培养板中,加入含小牛血清的 DMEM 培养液培养 1 d 左右。测钙前,将培养液吸出,用 KRH 缓冲液轻轻冲洗盖玻片二次。加入 1 ml KRH,再加入 Fura-2/AM (终浓度 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 于室温下孵育 35~40 min。KRH 液成分 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 125, KCl 5.0, KH_2PO_4 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, CaCl_2 2.0, Glucose 6.0, HEPES 2.5, pH 7.4)。负载后取出盖玻片,用 KRH 液或无钙 KRH 液 [$(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ NaCl 129, KCl 5, KH_2PO_4 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, Glucose 6, HEPES 2.5, pH 7.4] 室温下浸泡备用。将负载好的细胞放在特制的内盛有 1 ml KRH 或无钙 KRH 溶液的浴槽中,于荧光倒置显微镜下,选择单个 PC12 细胞,在避光的条件下,采用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统和

DM3000 软件,激发波长分别为 340 和 380 nm,发射波长为 505 nm,连续记录单个细胞在给药前后的荧光变化,得到 F_{340}/F_{380} 比值。按文献方法^[8]测得 R_{max} , R_{min} 和 $F_{\text{D}}/F_{\text{S}}$ 。给出上述相应的参数,计算机自动算出 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 值。

测定 DS 及 3 个异构体对 NaCN 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 增高的作用时,在测得静息 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 后,分别加入浓度为 10^{-6} , 10^{-7} 和 $10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DS 及 3 个异构体,在显微镜保温装置中放置 2~3 min 后,再加入 $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCN。而对照组只加 $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCN。按下式计算药物对 NaCN 诱发的 PC12 细胞内钙升高的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left[1 - \frac{\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}(\text{drug})}}{\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}(\text{NaCN})}} \right]$$

结 果

1 DS 及其异构体对 NaCN 加缺糖引起 PC12 细胞损伤的保护作用

PC12 细胞经 $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCN 处理后,对 MTT 的摄取能力下降。酶联仪测得的 A 值明显低于对照组。表明细胞受到了损伤或部分细胞已经死亡。但当有 DS 及 3 个异构体存在时,PC12 细胞对 MTT 摄取的能力明显增强,A 值均高于 NaCN 组,以 10^{-5} , $10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的药物尤为显著(表 1)。表明 PC12 细胞损伤明显减弱,活细胞明显增多。DS 及 3 个异构体在 $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内能剂量依赖地抑制 NaCN 加缺糖引起的细胞毒性。而且 4 个化合物作用存在差别,有明显的立体构效关系,以 (-)-S·R 和 (+)-R·S 异构体作用最强。天然品 (-)-R·R 构型居中, (+)-S·S 异构体作用最弱(图 1)。(-)-S·R, (+)-R·S, (-)-R·R 和 (+)-S·S 的 IC_{50} 分别为 2.4, 5.9, 18.6 和 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Ketamine 在浓度为 $100 \sim 900 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时也可剂量依赖性抑制 NaCN 加缺糖对 PC12 细胞的损伤作用(图 2)。

Tab 1 Effects of (–)-R•R-daurisoline(DS) and its three optical isomers on decrease in absorbance (A) value of cultured PC12 cell treated with 20 mmol•L⁻¹ NaCN

Drug(mol•L ⁻¹)	A value	% Increase of A value
Control	1.89 ± 0.13	
NaCN	0.96 ± 0.30	
NaCN+ S•R 10 ⁻⁵	1.64 ± 0.39**	70.8
10 ⁻⁶	1.49 ± 0.04**	55.2
10 ⁻⁷	1.30 ± 0.20*	35.4
10 ⁻⁸	1.13 ± 0.30*	17.7
NaCN+ R•S 10 ⁻⁵	1.56 ± 0.41**	62.5
10 ⁻⁶	1.41 ± 0.36*	46.9
10 ⁻⁷	1.25 ± 0.27*	30.2
10 ⁻⁸	1.11 ± 0.15	15.6
NaCN+ R•R 10 ⁻⁵	1.51 ± 0.47**	57.2
10 ⁻⁶	1.40 ± 0.19*	45.8
10 ⁻⁷	1.15 ± 0.28*	19.8
10 ⁻⁸	1.07 ± 0.09	11.5
NaCN+ S•S 10 ⁻⁵	1.41 ± 0.26*	46.9
10 ⁻⁶	1.21 ± 0.29	26.0
10 ⁻⁷	1.10 ± 0.14	14.6
10 ⁻⁸	1.01 ± 0.07	5.2

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs NaCN. PC12 cells were exposed to NaCN (20 mmol•L⁻¹) in the absence or presence of drugs for 10 min. The A value was measured using colorimetric MTT assay.

2 DS 及其异构体对 NaCN 引起的 PC12 细胞内游离 Ca²⁺ 升高的抑制作用

在静息状态下,测得的 PC12 细胞的 [Ca²⁺]_i 为 90 ± 7.0 nmol•L⁻¹,与文献^[8]报道的值基本一致。加入 20 mmol•L⁻¹ NaCN 后,细胞内钙升高至 771 ± 111 nmol•L⁻¹ ($n = 20$),为静息值 8~9 倍。但在无细胞外钙(Ca²⁺ free-KRH)条件下,加入 20 mmol•L⁻¹ NaCN 后,PC12 细胞 [Ca²⁺]_i 从静息时 62 ± 20 nmol•L⁻¹ 增加至 91 ± 9 nmol•L⁻¹ ($n = 10$)。

提示 NaCN 主要通过使胞外 Ca²⁺ 内流机制引起 [Ca²⁺]_i 升高。在浓度为 10⁻⁸ ~ 10⁻⁶ mol•L⁻¹ 范围内,DS 及其异构体均能浓度依赖性地抑制 NaCN 引起的 PC12 细胞内 Ca²⁺ 升高(图 2,表 2)。并且存在与抑制 NaCN 加缺糖对 PC12 细胞损伤作用一致的强弱顺序(表 2 和图 2)。(–)-S•R,(+)-R•S,(–)-R•R 和 (+)-S•S 的 IC₅₀ 分别为 0.59, 1.29, 3.55 和 24.3 μmol•L⁻¹。L-型钙通道阻滞剂 verapamil 对 NaCN 引起的 PC12 细胞内 Ca²⁺ 升高抑制作用较弱(表 2)。Ketamine 在浓度为 100 ~ 900 μmol•L⁻¹ 范围内可浓度依赖性抑制 NaCN 引起的 PC12 细胞内 Ca²⁺ 的升高(图 3)。

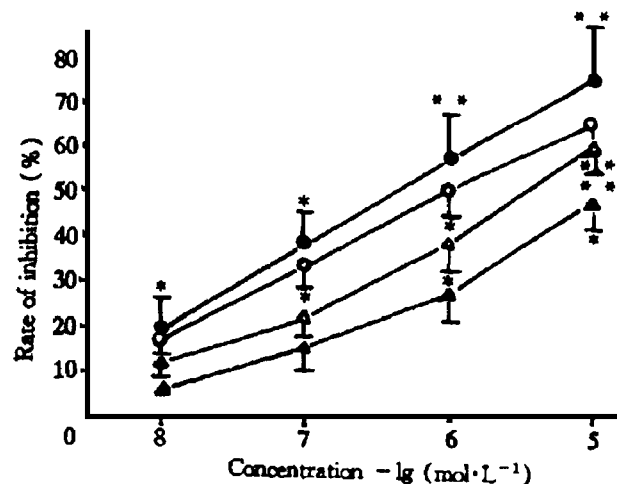


Fig 1 Effects of (–)-R•R-daurisoline(DS) and its three optical isomers on cytotoxicity induced by 20 mmol•L⁻¹ NaCN in cultured PC12 cells. PC12 cells were exposed to NaCN (20 mmol•L⁻¹) in the presence of drugs for 10 min. Cell viability was measured using colorimetric MTT assay. $n = 6$. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs NaCN. ●—●: (–)-S•R; ○—○: (+)-R•S; △—△: (–)-R•R; ▲—▲: (+)-S•S.

Tab 2 Effects of (–)-R•R-daurisoline(DS) and its three optical isomers on attached PC12 cell $[Ca^{2+}]_i$ induced by NaCN ($20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Drug ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$[Ca^{2+}]_i$ ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)			Inhibition(%)
	Basal level	NaCN	$\Delta[Ca^{2+}]_i$	
Control	90 ± 7	771 ± 111	681 ± 117	
S•R	10^{-6}	92 ± 5	$269 \pm 46^{**}$	74.0
	10^{-7}	89 ± 7	$478 \pm 37^*$	42.9
	10^{-8}	96 ± 6	$586 \pm 138^*$	28.1
R•S	10^{-6}	101 ± 12	$352 \pm 63^{**}$	63.2
	10^{-7}	95 ± 8	$541 \pm 59^*$	34.5
	10^{-8}	98 ± 11	656 ± 109	18.1
R•R	10^{-6}	110 ± 13	$427 \pm 78^{**}$	53.5
	10^{-7}	106 ± 9	$577 \pm 82^*$	30.8
	10^{-8}	102 ± 11	$675 \pm 146^*$	15.9
S•S	10^{-6}	99 ± 14	$551 \pm 132^*$	33.6
	10^{-7}	87 ± 9	668 ± 117	14.7
	10^{-8}	105 ± 12	719 ± 146	9.8
Verapamil	10^{-6}	98 ± 13	$565 \pm 33^*$	31.4

$\bar{x} \pm s$, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. $\Delta[Ca^{2+}]_i$ was calculated as difference between basal level and NaCN-treated. Inhibition (%) = $[1 - \Delta[Ca^{2+}]_i(\text{Drug}) / \Delta[Ca^{2+}]_i(\text{control})]$.

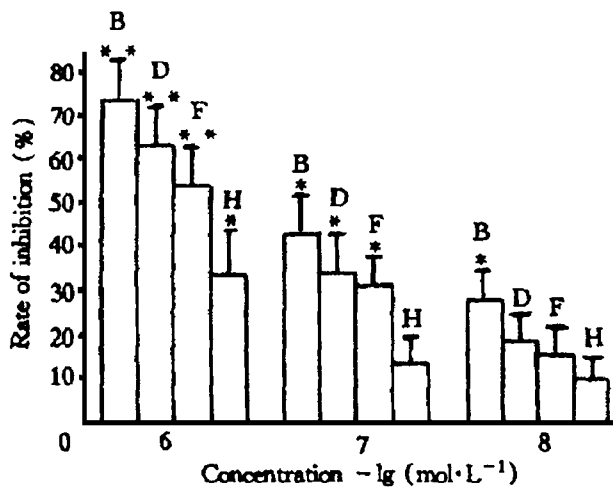


Fig 2 Effects of daurisoline and its three optical isomers on $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCN-induced elevation of intracellular calcium concentration in attached PC12 cells. Each column and bar represents the means $\pm s$ ($n = 8$). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs NaCN group. B: (–)-S•R; D: (+)-R•S; F: (–)-R•R; H: (+)-S•S.

讨 论

PC12 细胞为大鼠髓质嗜铬细胞克隆化的细胞株。分化的 PC12 细胞具有较典型的神经

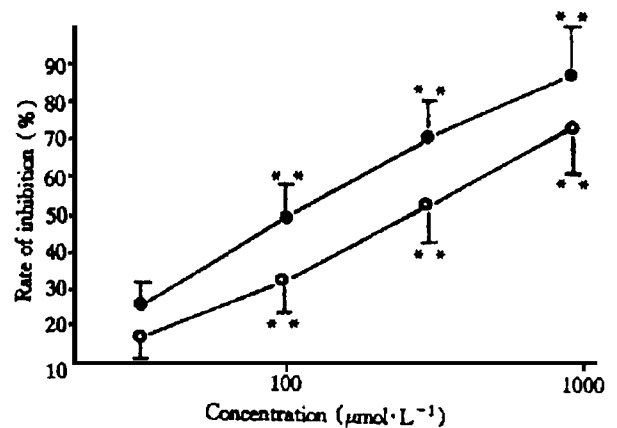


Fig 3 Effects of ketamine on $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCN-induced cytotoxicity and elevation of intracellular calcium concentration in PC12 single cell. (○—○) Effects of ketamine on cytotoxicity induced by NaCN. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. (●—●) Effects of ketamine on increase of intracellular calcium concentration induced by NaCN. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs NaCN group.

内分泌细胞的特征,它广泛用作研究神经细胞分化、离子通道、受体、递质分泌的实验材料,也是研究神经毒性的最常用的细胞株^[9,10]。神经瘤细胞,在缺氧条件下表现很强的巴斯德效

应,可充分利用无氧酵解提供能量,因此,对缺氧有一定的耐受力。但在同时缺糖时,则在短时间内即出现细胞损伤^[11]。因此我们采用 NaCN 加缺糖的损伤模型。缺氧加缺糖引起的神经细胞损伤的方法常被用来体外模拟中枢神经细胞缺血性损伤,是研究缺血性中枢神经元损伤及药物的保护作用的体外模型^[5]。DS 及其异构体能浓度依赖性地抑制 NaCN 加缺糖引起的 PC12 细胞损伤,从体外进一步证明它们对脑缺血可能有一定的保护作用。DS 及其异构体对 NaCN 诱发的 PC12 内钙的异常升高的浓度依赖性抑制作用可能是它们对 PC12 细胞缺血性损伤的保护作用机制之一。DS 及其异构体之间有明显的立体构效关系。无论是抑制 NaCN 引起的细胞损伤,还是拮抗 NaCN 诱发的 Ca^{2+} 内流。作用强弱顺序均为 $(-)-S \cdot R > (+)-R \cdot S > (-)-R \cdot R > (+)-S \cdot S$ 。 $(-)-S \cdot R$ 和 $(+)-R \cdot S$ 异构体中两个手性中心空间构象不同,一个为 S 构型另一个为 R 构型。而 $(-)-R \cdot R$ 和 $(+)-S \cdot S$ 异构体中两个手性中心空间构象一致,或都为 R 型或都为 S 型,两个手性中心取不同的空间构象作用强于取相同的构象。 $(-)-S \cdot R$ 和 $(-)-R \cdot R$ 异构体为左旋体,而 $(+)-R \cdot S$ 和 $(+)-S \cdot S$ 异构体为右旋体,左旋体作用强于右旋体。两个手性中心取不同的空间构象,同时为左旋体时作用最强。最佳的空间构象有利于药物与生物靶(受体,酶等)之间的相互作用。这对 DS 类化合物地研究开发具有指导意义。

氰化物引起的神经元损伤可能与兴奋性氨基酸毒性作用有关^[6,12,13]。NMDA 受体拮抗剂 AP₇, MK-801 等对氰化物引起的神经元损伤有明显的保护作用^[6,14]。我们的实验也表明 NMDA 受体非竞争性拮抗剂 ketamine 对 NaCN 加缺糖引起的 PC12 细胞损伤有明显的保护作用。NaCN 抑制细胞色素氧化酶,使神经细胞缺氧导致释放大量的谷氨酸(Glu),同时由于缺氧引起的能量缺乏减少了 Glu 的摄取,这样必能使 Glu 浓度大量升高。Glu 通过激活细胞膜上的 Glu 受体,使细胞外 Ca^{2+} 大量进入

细胞内导致细胞内钙超载从而引起细胞死亡。由于 DS 及其异构体能抑制 Glu 的释放^[3]和阻断 NaCN 通过 Glu 受体引起的细胞内钙超载,因此,对 PC12 缺血性损伤有较好的保护作用。

电压依赖性钙通道阻断剂 verapamil 对 NaCN 引起的 PC12 细胞内钙升高也有一定的抑制作用,表明 NaCN 除主要通过 Glu 受体引起钙内流还可通过电压依赖性钙通道引起部分钙内流。至于它是通过非 NMDA 受体 (AMPA/KA 受体)激动后的去极化作用部分打开电压依赖性钙通道,还是直接激动电压依赖性钙通道仍需进一步实验来证明。已有文献报道^[15]AMPA 和 KA 受体激动时可通过去极化作用打开电压依赖性钙通道引起 Ca^{2+} 内流, verapamil 能减轻 AMPA 和 kainate 对皮层神经细胞的毒性作用。

综上所述,我们认为 DS 及其异构体对 NaCN 加缺糖引起 PC12 细胞损伤的保护作用可能与它们能抑制 NaCN 通过 NMDA 和非 NMDA 受体通道引起 Ca^{2+} 内流有关。提示 DS 及其异构体可能对兴奋性氨基酸神经毒性有一定的拮抗作用。此外,DS 及其异构体对电压依赖性 Ca^{2+} 通道的阻断作用亦可能与它们保护作用有关。

参 考 文 献

- 1 He L, Liu GQ. Effects of synthetic daurisolone and its three optical isomers on high potassium-and Bayk8644-induced increase in free cytosolic calcium in attached PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, **17**:87
- 2 Lu YM, Liu GQ. Effects of L-daurisolone on quinoline acid-induced Ca^{2+} influx in hippocampus neurons in freely moving rat. *Acta Pharmacol Sin*, 1991, **12**:301
- 3 Lu YM. Accumulation of glutamate is regulated by calcium and protein kinase C in rat hippocampal slices exposed to ischemic states. *Hippocampus*, 1992, **3**:13
- 4 刘景根, 杲聪, 刘国卿, 等. 蝙蝠葛苏林碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用. 中国药理学通报, 1997, 待发表
- 5 王天佑, 阎军, 彭亮, 等. 体外培养的中枢神经细胞的缺血性损害. 中国病理生理杂志, 1989, **5**:

- 293
- 6 Marisha N, George KW, Gary EI. Blockade of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors prevents cyanide-induced neuronal injury in primary hippocampal cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992, **145**:123
 - 7 颜贻谦, 周振华, 季萍, 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
 - 8 Medonough PM, Button DC. Measurement of cytoplasmic calcium concentration in cell suspensions: correction for extracellular Fura-2 through use of Mn^{2+} and probenecid. *Cell Calcium*, 1989, **10**:171
 - 9 Timothy JS, William DA. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology*, 1991, **12**:473
 - 10 Jackson GR, Apffel L, Werrbach-perez K, *et al.* Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. *J Neurosci Res*, 1990, **25**:360
 - 11 Barbara P, Krieglstein J. Neuroblastoma cells for testing neuroprotective effects. *J Pharmacol Methods*, 1991, **23**:63
 - 12 Goldberg MP, Weiss JH, Choi DW, *et al.* *N*-Methyl-*D*-aspartate receptor mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, **243**:784
 - 13 Weiss JH, Goldberg MP, Choi DW. Ketamine protects cultured neocortical neurons from hypoxic injury. *Brain Res*, 1986, **380**:186
 - 14 Dubinsky JM, Rothman SM. Intracellular calcium concentration during chemical hypoxia and excitotoxic neuronal injury. *J Neurosci*, 1991, **11**:2545
 - 15 Frandsen A, Shousboe. Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *J Neurochem*, 1993, **60**:1202

EFFECTS OF DAURISOLINE AND ITS THREE OPTICAL ISOMERS ON ISCHEMIC INJURY IN CULTURED PHEOCHROMOCYTOMA (PC12) CELLS

Liu Jinggen(Liu JG), Li Rui(Li R), Liu Guoqing(Liu GQ) and Wang Jinxi(Wang JX)*

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

* State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210008)

ABSTRACT In this study, the protective effects of (-)-*R*•*R*-daurisoline and its three optical isomers on ischemic injury in cultured PC12 cells induced by treating cells with NaCN in glucose-free medium were investigated. Cell viability was measured using MTT assay. The results indicated that these compounds, especially (-)-*S*•*R* and (+)-*R*•*S* isomers were found substantially to attenuate ischemic injury in PC12 cells in a dose-dependent manner. The IC_{50} values of (-)-*R*•*R*, (-)-*S*•*R*, (+)-*R*•*S* and (+)-*S*•*S* isomers were shown to be 18.6×10^{-6} , 2.4×10^{-6} , 5.9×10^{-6} and $90 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Intracellular free Ca^{2+} concentration in PC12 cells was measured using AR-CM-MIC cation measurement system with Fura-2/AM as Ca^{2+} fluorescent indicator. (-)-*R*•*R*-daurisoline and its three optical isomers: (-)-*S*•*R*, (+)-*R*•*S* and (-)-*S*•*S* were found to markedly inhibit the increase of cytosolic free Ca^{2+} concentration induced by NaCN ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in a dose-dependent manner. Their IC_{50} were found to be 3.55×10^{-6} , 0.59×10^{-6} , 1.29×10^{-6} and $24.3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. It is suggested that the cytoprotective effects of daurisoline and its isomers were mediated by blocking Ca^{2+} influx into cells.

KEY WORDS Daurisoline; Excitatory amino acid; Cell culture; Pheochromocytoma cells (PC12); Intracellular free Ca^{2+}