

丁基苯酞抑制低氧低糖诱导的大鼠皮质神经细胞凋亡

董高翔, 冯亦璞*

(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:以原代培养的大鼠胎鼠皮质神经元低氧低糖再复氧为模型,研究丁基苯酞对神经细胞凋亡的抑制作用。方法:用流式细胞术检测 DNA 含量及凋亡细胞百分率,透射电镜观察细胞形态学变化,DNA 琼脂糖凝胶电泳和原位末端标记(TUNEL)检测 DNA 断裂。结果:丁基苯酞能减轻细胞核形态的改变,减少 DNA 断裂和阳性细胞数,使低氧低糖诱导的神经细胞凋亡百分率明显下降,凋亡峰显著降低。结论:丁基苯酞对低氧低糖诱导的大鼠皮质神经细胞凋亡有抑制作用。

关键词 丁基苯酞;低氧低糖;神经元;细胞凋亡

急性脑缺血神经元死亡有急性细胞死亡和迟发性细胞死亡两种。近年有人认为迟发性神经元死亡与细胞凋亡关系密切^[1],但也有作者持不同看法。已有大量文献报道,大鼠脑缺血过程中有神经细胞凋亡,且凋亡在缺血性脑损伤中起十分重要的作用。药物可通过干预细胞凋亡过程阻止其进一步发生而发挥对神经元损伤的保护作用^[2]。目前从细胞凋亡角度来研究新药刚起步。

丁基苯酞(*dl*-3-*n*-butylphthalide, NBP)是我组近年来开发的一个新型抗脑缺血药物,以往研究表明 NBP 能缩小大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)后脑梗塞面积,对迟发性神经元损伤有保护作用^[3]。作者近期研究发现 NBP 能抑制 MCAO 大鼠皮质神经细胞凋亡,这可能是 NBP 缩小 MCAO 后脑梗塞面积的原因。本研究旨在观察丁基苯酞对低氧低糖再给氧诱导的原代培养大鼠胎鼠皮质神经细胞凋亡的作用,从而在离体水平研究丁基苯酞对神经元凋亡是否有直接的抑制作用,这将进一步为该药抗脑缺血的作用机制提供新的理论依据。

材 料 和 方 法

试剂 NBP 为我所合成。用 Tween-80 配成乳剂加水稀释成所需的浓度。琼脂糖(Promega), DMEM 培养基(Gibco),阿糖胞苷(Ujohn),蛋白

酶 K(Merck),马、牛血清购自北京军区兽医防治中心,DNA 分子量标准物和 RNA 酶购自原平生物工程公司。

动物 孕期 14~18 d Wistar 大鼠,由中国医学科学院动物中心提供。

神经细胞原代培养和药物处理 参照 Choi 等神经细胞原代培养方法^[4]。无菌条件下取胎鼠皮质,经冲洗、吹打、分散、过滤、调整细胞浓度至 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 接种于培养瓶,置 5% CO_2 孵箱 37℃ 培养至 d 5 加入阿糖胞苷(终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养 24 h 以抑制胶质细胞生长。每隔 3~4 d 换一次液。培养 14 d,换成低氧低糖无血清培养基后不同时间,再复氧时间均为 12 h,在低氧及复氧情况下均同时给予 NBP。

流式细胞仪分析 按照 Darzynkiewicz 等人的方法^[5]。胰酶消化收集 1×10^6 个细胞,将细胞悬浮于 0.5 ml PBS 中,加入预冷至 -20℃ 的 70% 乙醇 4.5 ml 于 4℃ 过夜固定,200 × g 离心 5 min 收集细胞,弃乙醇, RNase A ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 37℃ 消化 30 min,碘化丙啶(PI, $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 染色,避光冰浴 1 h 后,过 400 目尼龙网,用 FACS-420 型流式细胞仪检测。低于 G_1 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。计数 10 000 个细胞测定各期 DNA 含量,计算凋亡细胞百分率和观察凋亡峰。由于细胞固定后膜通透性增加,降解的 DNA 被释放,DNA 组方图将出现低于 G_1 期 DNA 含量的亚 G_1 峰,又称凋亡峰,此峰的大小即代表凋亡细胞的多少^[6]。

电镜形态学观察 细胞经低氧低糖无血清培养及再复氧各 12 h,同时经 NBP 处理后,用细胞刮子

收稿日期:1998-07-02

* 联系人 Tel:(010)63165173, Fax:(010)63017757,

E-mail:feng YP@public.gb.com.cn

收集,低速离心,弃去上清液。细胞沉淀以 2.5%戊二醛固定,系列丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铅及铀酸铅染色, H. 800 型透射电镜拍片观察。

DNA 琼脂糖凝胶电泳 按照 Kamesaki 等人的方法^[7],略加修改。收集细胞每集约 6×10^6 ,溶于 500 μl 细胞裂解液,经酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提,乙醇沉淀,RNA 酶($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)消化 30 min, 1.5%琼脂糖凝胶电泳, $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 溴化乙锭染色,302 nm 紫外灯下观察拍照。

原位末端标记法(TUNEL) 参照 Gavrieli 等人的方法^[8],略加修改。细胞涂片,10%中性缓冲福尔马林固定,蛋白酶 K($20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)每片加 50 μl 消化,0.3%过氧化氢水溶液处理,加入 TdT(末端脱氧核苷酰转移酶)和生物素标记的 dUTP 各 1 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h,样品片加封闭液 50 μl ,室温 10 min, 1:50 的亲素辣根过氧化物酶每片加 50 μl 温育 30 min,PBS 洗后,0.03%过氧化氢- $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 二氨基联苯胺显色 10 min,苏木素复染,常规封片镜检。细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。每张切片数 200 个细胞,计算阳性细胞百分率。

结 果

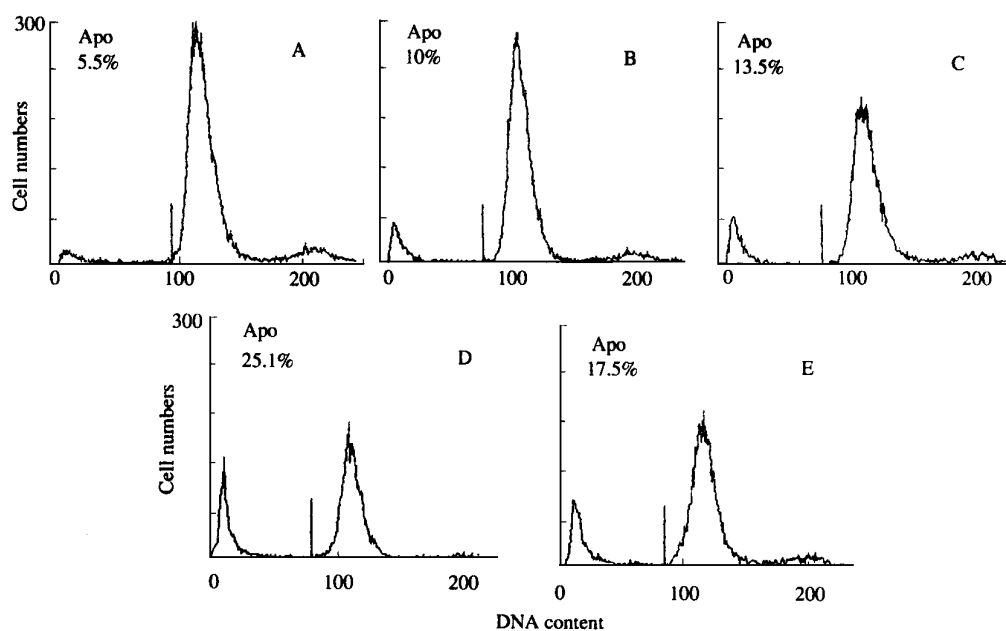


Fig 1 Time course of cortical neuronal apoptosis induced by hypoxia/hypoglycemia and 12 h of reoxygenation (flow cytometer analysis). Primary culture was performed. On the 14 th day, neurons were subjected to hypoxia/hypoglycemia of various durations(A: 0 h; B: 6 h; C: 9 h; D: 12 h; E: 24 h) and 12 h of reoxygenation. Apoptotic percentage was measured using flow cytometer.

1 NBP 对低氧低糖神经细胞凋亡百分率的影响

正常对照组神经元 DNA 大多数处于 G_1 期。凋亡细胞百分率仅为 5.5%左右。低氧低糖处理的细胞随着时间的延长凋亡峰逐渐增高,凋亡百分率增加(6 h: 10.0%; 9 h: 13.5%)。低氧低糖处理 12 h 达高峰(25.1%),24 h 后又下降(图 1),提示低氧低糖对神经元细胞凋亡的诱导表现出时间相关性。NBP 处理后 3 个不同剂量组($0.1, 1, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)均降低凋亡细胞百分率,以 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果最好, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 次之($P < 0.05$)。 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药组与对照组相比尽管凋亡百分率下降,但仍无显著性差异(表 1)。

Tab 1 Effect of NBP on percent of apoptosis of cultured cortical neurons induced by hypoxia/hypoglycemia (12 h) and reoxygenation (12 h) using flow cytometric analysis technique. Each sample analyzed contained 10000 cells

Group / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Percent of apoptosis / %
Control	4.9 ± 1.3
Vehicle	$27.8 \pm 8.0^{##}$
NBP 0.1	23.6 ± 7.8
1	$18.4 \pm 6.3^*$
10	$15.0 \pm 4.1^*$

$n = 4, \bar{x} \pm s. ## P < 0.01$ vs control; * $P < 0.05$ vs vehicle.

2 NBP对低氧低糖神经细胞超微结构的影响

透射电镜见正常细胞染色质均匀分布,胞膜完整。低氧低糖组细胞体积缩小,胞膜基本完整,核染

色质浓缩聚集位于核周边。NBP $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞染色质浓缩程度减轻,核膜及细胞器完整,逆转了细胞凋亡形态学改变(图 2)。

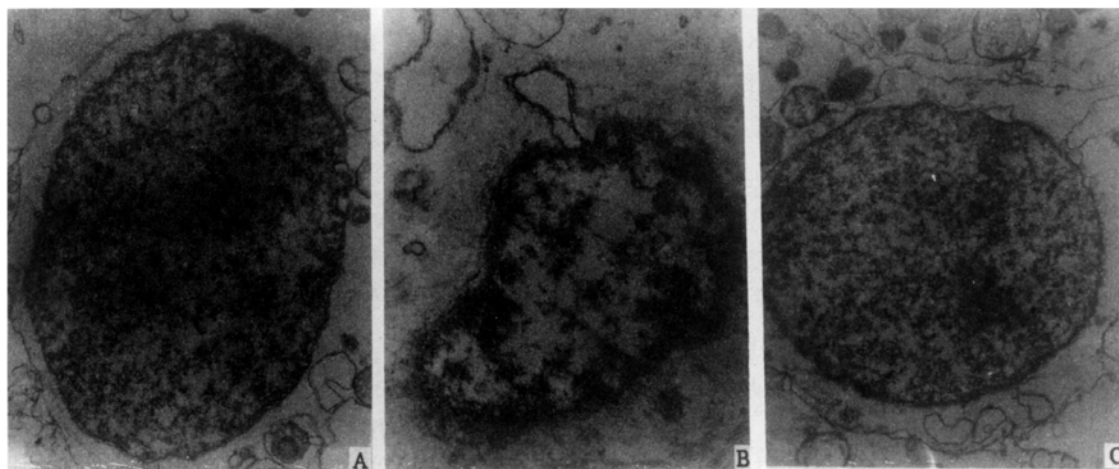


Fig 2 Effect of NBP on ultrastructural features of cortical neuronal apoptosis induced by hypoxia/ hypoglycemia (12 h) and reoxygenation (12 h) . A: Normal neurons , nuclear chromatin was evenly distributed; B: Vehicle , the cells showed chromatin condensation under the nuclear membrane , volume of neurons was smaller; C: NBP $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, chromatin appear less condensed , cellular membrane kept integral (original magnification $\times 9000$) .

3 NBP对低氧低糖神经细胞 DNA片断化的影响

低氧低糖组有不连续的电泳条带,即 DNA 梯形条带(ladder shape),大约相当于 $180 \sim 200 \text{ bp}$ 的整倍数,提示 DNA 在核小体间断裂,细胞发生凋亡。而正常组细胞仅在电泳点样处出现基因组条带。NBP $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能使 DNA 梯形条带基本消失(图 3),说明 *dl*-NBP 可以抑制 DNA 断裂,防止细胞凋亡的发生。

$14.9 \% \pm 3.6 \%$, 有显著性差异 ($P < 0.01$ vs vehicle, $n = 4$)。

4 NBP对低氧低糖神经细胞 DNA原位末端标记的影响

本方法是将细胞中断裂的 DNA 进行末端标记后用免疫组化的手段进行 DNA 片断的定位研究。细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞(图 4)。图中的阳性细胞核中有多个棕色颗粒。正常对照组阳性细胞百分率为 $4.6 \% \pm 1.7 \%$, 低氧低糖组(vehicle)为 $31.3 \% \pm 7.5 \%$ ($P < 0.01$ vs control), 而 NBP $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组阳性细胞百分率明显下降

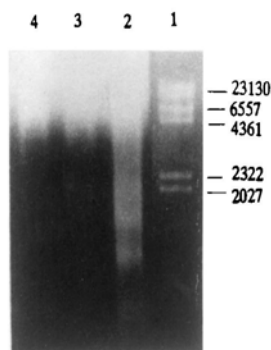


Fig 3 Agarose gel electrophoresis for detecting DNA fragmentation induced by hypoxia/ hypoglycemia (12 h) and reoxygenation (12 h) of cultured cortical neurons. DNA samples were electrophorised on 1.5 % agarose gel and stained with ethidium bromide . 1 . λ DNA/ Hind III marker; 2 . Vehicle; 3 . NBP $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4 . Normal neurons group .

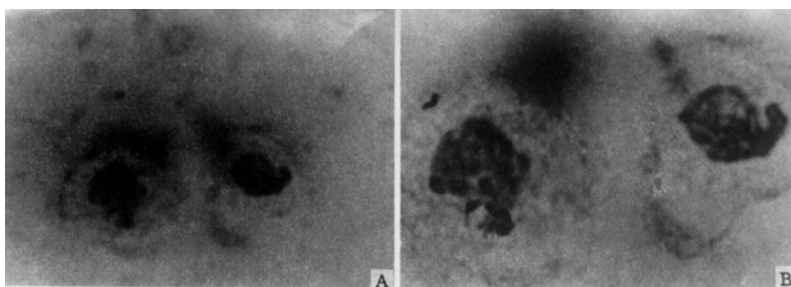


Fig 4 TUNEL staining of cultured cortical neurons after 12 h of hypoxia/hypoglycemia and 12 h of reoxygenation. Negative cells appeared blue and positive cell appeared brown in the nucleus. The TUNEL-positive neurons revealed DNA fragmentation. Photographs were taken with a Nikon light microscope. A: Positive neurons($\times 300$); B: Positive neurons($\times 500$).

讨 论

细胞凋亡是细胞在某些生理或病理情况下,发生的有序的主动性非炎症性死亡。目前国际上大多数学者公认的细胞凋亡诊断指标为:形态学、DNA电泳、流式细胞仪分析技术和原位末端标记技术(TUNEL)。本研究采用了这4大指标,观察到低氧低糖无血清及再复氧能诱导大鼠胎鼠皮质神经细胞凋亡,尤其是应用流式细胞仪分析技术发现随着低氧低糖时间的延长凋亡细胞百分率逐渐增高,12 h达高峰,这一结果与文献报道^[9]一致,但也有文献报道去氧和葡萄糖45~55 min即可诱导皮质神经元凋亡,并且凋亡与坏死并存^[10]。本文以低氧低糖去血清再复氧各12 h作为诱导大鼠胎鼠皮质神经细胞凋亡的模型研究丁基苯酞对这一凋亡的作用。由于形态学、DNA电泳等难以定量研究药物的量效关系,因此本文只选用了丁基苯酞 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 这一剂量进行研究。低氧低糖诱导神经元凋亡的机理与谷氨酸兴奋毒性、细胞内钙离子浓度增加和超氧阴离子自由基损伤有关^[3,8,11,12]。

脑缺血与细胞凋亡的关系研究成为近年科研的前沿领域。已有大量文献报道,脑缺血过程中存在神经元凋亡。通过一些措施(如药物)可使神经细胞凋亡过程减弱或停止,阻止梗塞面积的扩大。以上结果表明丁基苯酞能降低神经细胞凋亡百分率,使凋亡峰下降,抑制细胞凋亡形态学改变,抑制DNA在核小体间的断裂。从而干预细胞凋亡过程,把维持正常功能的神经元从凋亡中拯救出来。作者已研究发现丁基苯酞对MCAO(缺血2 h,再灌注24 h)大鼠大脑皮质神经细胞凋亡有明显抑制作用。本研究进一步从离体水平证实了丁基苯酞对大鼠皮质神

经细胞凋亡的直接抑制作用。这样从整体和细胞水平阐明了丁基苯酞缩小大鼠MCAO后脑梗塞面积和对神经元损伤发挥保护作用的原因。

作者在整体动物实验和离体细胞培养过程中均发现丁基苯酞能抑制大鼠大脑皮质神经细胞凋亡。但其抗凋亡的机制目前正在研究中。

参 考 文 献

- 1 Wiessner C, Vogel P, Neumann Haefelin T, et al. Molecular correlates of delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in the rat. *Acta Neurochir*, 1996, **66**: 1
- 2 Tenneti L, D'Emilia DM, Lipton SA. Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci Lett*, 1997, **236**: 139
- 3 林建峰,冯亦璞.丁基苯酞对局部脑缺血大鼠神经元迟发性损伤及细胞内钙的影响. *药学报*, 1996, **31**: 166
- 4 Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 1987, **7**: 357
- 5 Darzynkiewicz Z, Bino SBG, Gorczyca W. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1992, **13**: 795
- 6 Gong J, Li X, Darzynkiewicz Z. Different patterns of apoptosis of HL-60 cells induced by cycloheximide and camptothecin. *J Cell Physiol*, 1993, **157**: 263
- 7 Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ, et al. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and repair. *Cancer Res*, 1993, **53**: 4251
- 8 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, **119**: 493
- 9 Copin JC, Reola LF, Chan TYY, et al. Oxygen

- deprivation but not a combination of oxygen, glucose, and serum deprivation induces DNA degradation in mouse cortical neurons *in vitro*: Attenuation by transgenic overexpression of CuZn-Superoxide Dismutase. *J Neurotrauma*, 1996, **13**: 245
- 10 Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, *et al.* Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen glucose deprivation *in vitro*. *Neuroscience*, 1995, **68**: 615
- 11 Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*, 1993, **13**: 3510
- 12 Sochocka E, Juurlink BKJ, Code WE, *et al.* Cell death in primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and 'recovery' from hypoxia, substrate deprivation and stimulated ischemia. *Brain Res*, 1994, **638**: 21

HYPOXIA/ HYPOGLYCEMIA-INDUCED APOPTOSIS OF RAT CORTICAL NEURONS IS PREVENTED BY DL-3-BUTYLPHthalIDE

Dong Gaoxiang(Dong GX) and Feng Yipu(Feng YP)

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

ABSTRACT **AIM:** The effect of *dl*-3-*n*-butylphthalide on cerebrocortical neuronal apoptosis induced by hypoxia/hypoglycemia was investigated. **METHODS:** The DNA content and percentage of apoptosis were measured by flow cytometry; Morphological changes were observed with light microscope and electron microscopy; DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis and terminal dUTP nick-end-labeling(TUNEL) method. **RESULTS:** The result showed that hypoxia/hypoglycemia(12 h) and reoxygenation (12 h) medium induced apoptosis in primary cultured cortical neurons. *dl*-3-*n*-Butylphthalide($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was found to decrease the percentage of neuronal apoptosis, prevent DNA fragmentation, ameliorate morphological changes of cortical neurons and reduce the numbers of positive cells. **CONCLUSION:** These findings indicate that *dl*-3-*n*-butylphthalide prevented hypoxia/hypoglycemia-induced apoptosis of rat cortical neurons. These results further revealed the mechanisms of *dl*-NBP in reducing the volume of the cerebral infarct after middle cerebral artery occlusion in rats.

KEY WORDS *dl*-3-*n*-butylphthalide; hypoxia/hypoglycemia; neurons; apoptosis