

(-)-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

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 用细胞培养方法,在原代培养的大鼠皮质神经细胞上,观察了(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸引起的神经元损伤的保护作用。以 Fura-2/AM 为 Ca^{2+} 的荧光指示剂,用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统观察(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸诱发大鼠脑皮质神经细胞内 Ca^{2+} 升高的影响。结果表明(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱能剂量依赖性地抑制谷氨酸的神经毒作用,对谷氨酸诱发的神经细胞内游离 Ca^{2+} 升高有明显的抑制作用。提示蝙蝠葛苏林碱对缺血性脑损伤有保护作用。

关键词 蝙蝠葛苏林碱; 皮质神经元; 兴奋性氨基酸; 细胞内游离 Ca^{2+} ; 细胞培养

蝙蝠葛苏林碱(daurisoline, Dau)是从防己科植物蝙蝠葛根茎中提取的生物碱。天然品以(-)-R·R 构型存在。(-)-S·R 构型是天然构型的人工合成非对映异构体。(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱的药理活性比(-)-R·R-蝙蝠葛苏林碱强很多^[1,2]。而其本身对细胞内钙的影响较(-)-R·R-蝙蝠葛苏林碱小(待发表资料)。我们已发现蝙蝠葛苏林碱对鼠实验性脑缺血有明显得保护作用^[3]。体外对缺氧加缺糖引起的 PC12 细胞“缺血性”损伤亦有较好的保护作用^[2]。为探讨其对脑缺血的保护作用是否与对抗兴奋性氨基酸毒性有关,在原代培养的大鼠皮质神经细胞上观察了(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸引起神经细胞损伤的保护作用和对谷氨酸诱发的神经细胞内 Ca^{2+} 升高的抑制作用。

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], Fluka 产品;

Fura-2/AM, 多聚赖氨酸, Sigma 公司产品; DMEM, Gibco 产品; 谷氨酸, 上海东风生化试剂公司产品; ketamine, 北京制药厂产品; (-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱由本校药化教研究室合成。其他试剂均为国产分析纯。

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

大鼠皮质神经细胞的原代培养^[4] 取 14~17 d 龄胎鼠大脑皮质, D-Hanks 液洗 2 次后, 剪成糜状, 加入 0.125% 胰酶消化 20 min, 用含小牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 用吸管轻轻吹打, 使细胞分散。静置 3~5 min, 取上层脑细胞悬液, $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。弃上清液, 用 DMEM 培养液(含 10% 小牛血清, 青霉素 $100\text{ u}\cdot\text{ml}^{-1}$, 链霉素 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)重新悬浮细胞。将细胞浓度调整为 $1.5\times 10^6\text{ ml}^{-1}$ 。接种于预先用多聚赖氨酸浸泡过的 24 孔和 6 孔培养板(含盖玻片)中, 接种体积分别为 0.5 和 1 ml。于 37°C 5% CO_2 条件下培养。每周换培养液 2 次, 5~7 d 后, 加入阿糖胞苷(终浓度 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养 48 h, 以抑制非神经细胞

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

* 现在军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

继续增殖。继续培养至 15~17 d 后开始实验。

谷氨酸对培养的神经细胞的损伤^[5] 吸去培养液,用 D-Hanks 液洗 2 次,加入含不同药物浓度的无糖 Earle 氏液培养 30 min,加入谷氨酸(终浓度 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 30 min,吸去含谷氨酸的培养液,用无糖的 Earle 氏液洗 2 次后,加入不含小牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h。

形态学—台盼蓝染色法^[6] 将六孔培养板中的盖玻片取出,室温下用 1.5% 的台盼蓝染色 10 min,以等渗的甲醛溶液在 2~4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定,然后用生理盐水漂洗。在倒置显微镜下计数 500 个细胞,未着色细胞为活细胞。计算未着色细胞的百分比即存活率。按文献方法^[6] 计算保护作用百分率。

MTT 微量自动比色法^[7] 谷氨酸处理后 24 h,在培养液中加入 MTT(终浓度为 0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$),继续培养 4 h,吸去培养液,加入 200 μl /孔二甲亚砷(DMSO),待培养孔内的颗粒完全溶解后,用 BG-3022 型酶联免疫检测仪测定 570 nm 的吸收度(A),计算药物对谷氨酸引起神经细胞损伤的抑制率。

分离的神经细胞内钙浓度的测定 细胞分离参考文献^[8]方法进行。取 1~2 d 龄的新生乳鼠的皮层,置于冰冷的 HEPES-Hanks 液中,仔细剔除软脑膜及血管,冲洗数次后剪成糜状,加入 0.25% 胰酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化 20 min。再用吸管反复吹打以促使细胞分散,用含小牛血清的 DMEM 培养液终止消化。静置 2~3 min 后吸出上层细胞悬液,1500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,共两次,弃上清液,将细胞悬浮于 HEPES 缓冲液中待用。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下,将分离的神经细胞与 Fura-2/AM(终浓度为 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)孵育 45 min 后,细胞悬液以 1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液,用 HEPES-Hanks 液洗涤 2 次后,将细胞再用 HEPES-Hanks 液悬浮。根据文献方法^[9]采用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统检测细胞内 Ca^{2+} 浓度。按下式计算(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸诱发的神经细胞内 Ca^{2+} 升高的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - \Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i(\text{drug})} / \Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i(\text{Glu})}] \cdot 100$$

结 果

1 (-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸引起的神经元损伤的保护作用

台盼蓝染色分析结果表明,(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸引起的神经细胞损伤有明显的保护作用。神经细胞的成活率与药物的浓度呈正相关(表 1)。NMDA 受体非竞争性拮抗剂氯胺酮(ketamine)对谷氨酸的神经毒性也有明显得保护作用,但较(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱弱(表 2)。MTT 法分析的结果与台盼蓝分析结果基本一致,并显示(-)-S·R-蝙蝠葛苏林碱能浓度依赖性地抑制谷氨酸的神经毒作用(图 1),其 IC_{50} 为 3.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Tab 1 Protective effects of (-)-S·R-dauriso-line (Dau) on glutamate (Glu, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons

Treatment ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Viability (%)	Protection (%)
None(control)	88.5 ± 0.8	
Glu	33.5 ± 1.3	
Glu + Dau 10 ⁻⁵	72.1 ± 3.8**	71.8 ± 2.8
Glu + Dau 10 ⁻⁶	59.6 ± 2.7**	47.5 ± 1.6
Glu + Dau 10 ⁻⁷	48.7 ± 4.3**	27.6 ± 0.9
Glu + Dau 10 ⁻⁸	39.8 ± 2.3	11.5 ± 1.6

$\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs Glu Cell viability was estimated using trypan blue staining.

Tab 2 Protective effects of ketamine (Ket) on glutamate (Glu, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons

Treatment ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Viability (%)	Protection (%)
None(control)	89.8 ± 2.3	
Glu	32.6 ± 0.9	
Glu + ket 0.9	72.8 ± 4.2**	70.3 ± 2.6
Glu + ket 0.3	63.5 ± 1.8**	54.0 ± 1.8
Glu + ket 0.1	46.8 ± 0.8**	24.8 ± 0.36

$\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs Glu Cell viability was estimated using trypan blue staining.

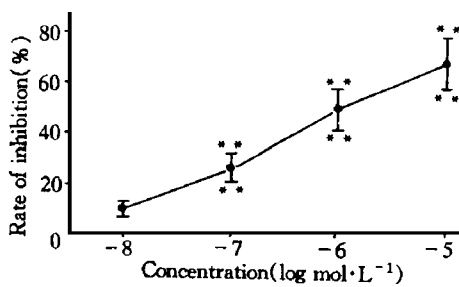


Fig 1 Inhibitory effects of (-)-S•R-daurisoline on neurotoxicity induced by 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glutamate in cultured rat cortical neurons. Cell viability was measured using colorimetric MTT assay. Data are $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). *** $P < 0.01$ vs Glutamate.

2 (-)-S•R-蝙蝠葛苏林碱对谷氨酸诱发神经细胞内 Ca^{2+} 升高的抑制作用

静息状态下, 新生大鼠皮层神经细胞内 Ca^{2+} 浓度为 114.1 ± 6.4 ($n = 40$) 与文献报道值一致^[9]。加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu 刺激后, 细胞内游离 Ca^{2+} 升高至 $266.5 \pm 48 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 20$)。(-)-S•R-蝙蝠葛苏林碱能浓度依赖性地抑制谷氨酸引起的细胞内 Ca^{2+} 升高(表 3)。IC₅₀ 为 $2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。ketamine 和粉防己碱(Tet)对谷氨酸引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 也有明显的抑制作用(表 3)。

Tab 3 Effects of (-)-S•R-daurisoline (Dau) on dissociated newborn rat cortical single neurons $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glutamate(Glu)

Daug	$[\text{Ca}^{2+}]_i(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$			Inhibition (%)
	Resting	Glu	$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$	
Control	114 ± 6.0	267 ± 48	152 ± 46	
Dau 10^{-5}	116 ± 15	166 ± 17	$50.0 \pm 12^{**}$	67.2
10^{-6}	106 ± 10	171 ± 26	$65.0 \pm 19^{**}$	57.3
10^{-7}	110 ± 14	192 ± 30	$81.0 \pm 27^{**}$	46.5
10^{-8}	106 ± 11	225 ± 39	119 ± 26	22.2
Tet 10^{-6}	113 ± 11	193 ± 13	$80.0 \pm 18^{**}$	47.4
Ket 10^{-4}	112 ± 13	177 ± 29	$65.0 \pm 16^{**}$	57.5

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs control. Tet: tetrandrine; Ket: ketamine.

讨 论

缺血性脑损伤是严重危害人类健康的一类疾病。由于其病理机制十分复杂, 目前临床上应用的各类治疗药物的治疗效果均不理想, 寻找疗效高, 毒性小的治疗药物, 是药理学工作者

的紧迫任务。

在缺血性脑损伤的机制研究中, 人们已认识到兴奋性氨基酸(EAA)在缺血性脑损伤病理过程中发挥了重要作用。EAA 受体拮抗剂体内均证明对神经元损伤有明显的保护作用。但目前发现的一些 EAA 受体拮抗剂, 或由于不易通过脑屏障, 或由于不良反应严重, 而无临床实用价值。EAA 的神经毒作用包括两个过程: 一是早期的细胞渗透性损伤, 这一过程是可逆的, 由非 NMDA 受体介导的 Na^+ 内流和随后的 Cl^- 和 H_2O 被动性内流而引起; 二是后期神经元的迟发性损伤, 这一过程不可逆, 主要由 NMDA 受体介导的钙大量内流有关。胞外钙大量内流引起细胞内钙超载是细胞死亡的主要原因。临床上目前使用的钙拮抗剂, 由于它们对 NMDA 受体介导的钙内流无抑制作用或抑制作用较弱, 因此疗效不确切。从理论上讲, 能抑制或减少脑缺血时 EAA 的释放, 抑制或阻断 EAA 突触后作用的药物, 有望成为理想的治疗缺血性脑损伤药物。

研究表明蝙蝠葛苏林碱有多方面与治疗缺血性脑损伤有关的药理活性。它能抑制整体大鼠海马神经元和离体海马片释放谷氨酸^[10,11], 对内源性兴奋性毒素喹啉酸引起海马神经元胞外钙内流也有明显的抑制作用^[12]。此外, 蝙蝠葛苏林碱对电压依赖性钙通道有较强的拮抗作用, 特别是它对神经元的 N-型钙通道有较高的选择性^[13], 因此对包括谷氨酸在内的神经递质释放有抑制作用。我们最近的研究表明蝙蝠葛苏林碱对鼠实验性脑缺血有较明显的保护作用^[3], 体外对细胞“缺血性”损伤也有较明显的保护作用^[2]。本文的研究结果也显示蝙蝠葛苏林碱体外对谷氨酸引起的神经细胞损伤有较好的保护作用, 进一步表明蝙蝠葛苏林碱对缺血性脑损伤有保护作用。需要指出的是蝙蝠葛苏林碱本身对细胞内钙有一定的影响, 这可能与它有一定的毒性作用有关。非对映异构体 (-)-S•R-蝙蝠葛苏林碱对细胞内钙的影响较天然品弱, 但其药理活性明显强于天然品。提示通过对蝙蝠葛苏林碱的构效关系研究, 实现

对其进行结构优化,有望从中找出理想的治疗缺血性脑损伤的药物。

参 考 文 献

- 1 He L, Liu GQ. Effects of synthetic daurisoline 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 刘景根,李瑞,刘国卿,等. 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. *药理学报*, 1998, **33**:165
- 3 刘景根,李瑞,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*, 1998,待发表
- 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: Attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci*, 1988, **8**:185
- 6 Tamura Y, Sato Y, Akaike A, *et al.* Mechanisms of cholecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against *N*-methyl-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res*, 1992, **592**:310
- 7 颜贻谦,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
- 8 Dildy JE, Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells. *Brain Res*, 1989, **499**:383
- 9 张维宁,吴馥梅,张祖暄,等. 应用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统检测单个神经元内游离 Ca^{2+} . *Chin J Appl Physiol*, 1993, **9**:344
- 10 Lu YM, Liu GQ. Accumulation of glutamate is regulated by calcium and protein kinase C in rat hippocampal slices exposed to ischemic states. *Hippocampus*, 1992, **3**:13
- 11 Lu YM, Liu GQ. Effects of antagonists on glutamate release and Ca^{2+} influx in the hippocampus with *in vivo* intracerebral microdialysis. *Br J Pharmacol*, 1991, **104**:222
- 12 Lu YM, Liu GQ. Effects of *L*-daurisoline on quinoline acid-induced Ca^{2+} influx in hippocampus neurons in freely moving rat. *Acta Pharmacol Sin*, 1991, **12**:301
- 13 刘国卿. 神经药理学研究十年回顾. *中国药理学通报*, 1996, **12**:101

PROTECTIVE EFFECTS OF (-)-S • R-DAURISOLINE ON NEURONAL INJURY IN RAT PRIMARY CORTICAL CULTURES

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 The neuroprotective effects of (-)-S • R-daurisoline on glutamate-induced neurotoxicity were studied in rat primary cortical cultures. The inhibitory effects of (-)-S • R-daurisoline on glutamate-elicited free intracellular Ca^{2+} increase were also studied in freshly dissociated single brain cells isolated from new born rat using AR-CM-MIC Cation Measurement System. Our experimental results demonstrated that (-)-S • R-daurisoline could obviously inhibit the neurotoxicity induced by glutamate and significantly increased cell viability in dose-dependent manner. In inhibiting glutamate-induced neurotoxicity, the IC_{50} value of (-)-S • R-daurisoline was found to be $3.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (-)-S • R-daurisoline was also shown to markedly inhibit glutamate-elicited increase of cytosolic free Ca^{2+} concentration in dose-dependent manner with IC_{50} value of $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Our results showed that (-)-S • R-daurisoline has an obvious protective effect on glutamate-induced neurotoxicity in primary cortical cultures. The protective mechanism of (-)-S • R-daurisoline may be relevant to inhibit Ca^{2+} influx into cells via glutamate-mediated ligand-gated ion channels.

KEY WORDS Daurisoline; Cortical neurons; Excitatory amino acid; Free intracellular Ca^{2+} ; Cell culture