

文章编号:1001-6880(2017)8-1296-06

对羟基苯甲醛对神经元缺氧所致钙超载的抑制作用

周晓楠,宋雪兰,柳弯,解宇环,宋波,何芳雁*

云南中医学院基础医学院,昆明 650500

摘要:通过复制大鼠原代皮层神经元缺糖缺氧/复糖复氧(OGD/Rep)损伤模型,采用MTT法检测细胞存活率、硝酸还原酶法检测NO释放量、流式细胞仪检测胞内钙离子浓度、Western Blot法及RT-PCR法检测神经元L型钙通道、NMDA型钙通道、TRPM7通道蛋白和基因的表达,评价天麻成分对羟基苯甲醛对OGD/Rep损伤致大鼠原代皮层神经元钙通道过度开放的影响,探讨天麻成分对羟基苯甲醛的神经保护作用是否通过抑制钙通道的过度开放减轻钙超载,结果表明天麻成分对羟基苯甲醛可提高大鼠原代皮层神经元OGD/Rep损伤的存活率、减少NO的释放、降低胞内钙离子浓度、降低L型钙通道蛋白的表达。

关键词:对羟基苯甲醛;OGD/Rep;原代皮层神经元;钙通道

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.006

Inhibition Effect of 4-Hydroxybenzaldehydeon Calcium Channels in Neurons

ZHOU Xiao-nan, SONG Xue-lan, LIU Wan, XIE Yu-huan, SONG Bo, HE Fang-yan*

Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: The rat primary cortical neurons oxygen-glucose deprivation/reintroduction (OGD/Rep) injury model was duplicated and was used to study the inhibitory effect of 4-hydroxybenzaldehyde on calcium channel. The cell viability was tested by MTT assay. The NO release was tested by nitric acid reductase assay. Intracellular calcium concentration was tested by flow cytometry and the protein and mRNA expressions of L-type calcium channel, NMDA receptor-type calcium channel and TRPM7 channel were tested by Western Blot and RT-PCR. The results indicated 4-hydroxybenzaldehydec can elevate survival rate of the primary cortical neuron which were affected by OGD/Rep injury, decrease NO release, reduce intracellular calcium iron concentration of the primary cortical neurons, as well as lower L channel protein expression.

Key words: 4-hydroxybenzaldehyde; OGD/Rep; primary cortical neurons; calcium channel

缺血性脑血管病(Ischemic cerebrovascular diseases, ICVD)是威胁人类健康的重大疾病,在临幊上病死率和致残率高,现今已是世界上导致人类死亡的第二大疾病^[1]。课题组前期的研究表明,天麻的酚性成分对ICVD的重要病理过程—脑缺血/再灌注损伤具有显著的对抗作用^[2],并证明机制与改善神经突触可塑性有关^[3]。对羟基苯甲醛(4-Hydroxybenzaldehyde, 4-HBd, 图1)是天麻所含酚性成分之一^[4],有显著的血管平滑肌松弛作用^[5],对缺血性脑损伤大鼠有显著的脑保护作用,但具体作用机制尚不清楚。本研究采用离体培养的大鼠原代皮层神经元复制缺糖缺氧/复糖复氧(OGD/Rep)损

伤模型,通过检测细胞存活率、NO释放量、胞内钙离子浓度、L型钙通道、NMDA型钙通道、TRPM7钙通道的蛋白和基因表达水平,探讨天麻酚性成分4-HBd的脑保护作用是否与抑制钙通道的过度开放,减轻钙超载有关。

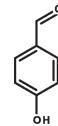


图1 天麻酚性成分对羟基苯甲醛(4-HBd)的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of 4-hydroxybenzaldehyde(4-HBd)

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,雌雄各半,体重 180 ± 220 g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,合格证号SCK(川)2013-24。

收稿日期:2017-01-16 接受日期:2017-06-16

基金项目:国家自然科学基金(81560664,81660677);云南省应用基础研究项目(2015FB205(-027))

*通信作者 E-mail:735137511@qq.com

1.2 实验试剂

Neurobasal medium(NBM), 美国 Gibco 公司, 批号: 1677145; 2-APB, 美国 Sigma 公司, 批号: D9754-1G; 一氧化氮试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所, 批号: 20131119; L-type Ca⁺⁺ CP α 1C 抗体, 美国 SantaCruz 公司, 批号: sc-16230; NR1 抗体, 美国 SantaCruz 公司, 批号: sc-1467; TRPC7 抗体, 美国 SantaCruz 公司, 批号: sc-31381; 辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgG(H+L), 碧云天生物技术研究所, 批号: A0216; 辣根过氧化物酶标记驴抗山羊 IgG(H+L), 碧云天生物技术研究所, 批号: A0181; 化学发光液(EZ-ECL), proteintech 公司, 批号: B500022; GoScript Reverse Transcription System, 美国 Promega 公司, 批号: A5000; GoTaqqPCR Master Mix, 美国 Promega 公司, 批号: A6001。

1.3 实验仪器

CO₂ 细胞培养箱(3111), 美国 Thermo scientific 公司生产; 酶标仪(Infinite M200 PRO), 瑞士 Tecan 公司生产; 垂直电泳系统(mini VE), 英国 Amersham Biosciences 公司; 半干转膜装置(TE-70), 英国 Amersham Biosciences 公司; UV-PAGE 凝胶成像分析系统(Bio Spectrum), 美国 Spectrum 公司。

2 实验方法

2.1 原代皮层神经元培养及鉴定

取妊娠 19 日大鼠的胚胎, 分离、纯化并培养原代大鼠皮层神经元, 用 NSE 和 MAP-2 免疫荧光法鉴定原代大鼠皮层神经元及其纯度。

2.2 细胞的分组及给药方法

将原代皮层神经元细胞培养至第 7 d 后, 进行分组, 设为正常对照(Control)组、模型(OGD/Rep)组、天麻成分对羟基苯甲醛给药(OGD/Rep + 4-HBd)组, 于造模前 1 h 给药, Control 和 OGD/Rep 组加入完全培养基, 给药组加入含不同梯度浓度(0.82、0.41、0.20 μmol/mL)的天麻酚性成分 4-HBd 的培养基。

2.3 复制原代皮层神经元 OGD/Rep 损伤模型

参照文献方法^[6,7], 取培养 7 d 的原代皮层神经元细胞, 给予浓度为 32 mmol/L Na₂S₂O₄ 无糖 Earle's 液置于 37 ℃、5% CO₂、95% 空气及饱和湿度条件的培养箱中孵育 1 h 进行缺糖缺氧处理, 然后替换为神经元培养基继续培养 1 h 做复糖复氧处理。

2.4 天麻成分 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤原代皮层神经元存活率的影响

造模结束后, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL, 孵育 4 h, 弃上清液, 各孔加入 DMSO, 置于摇床震荡 10 min, 酶标仪测定各孔吸光度(以 OD 表示), 计算细胞相对存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{正常组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%.$$

2.5 天麻成分 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤原代皮层神经元细胞 NO 释放量、钙离子浓度的影响

造模结束后, 收集培养液, 按照一氧化氮试剂盒(硝酸还原酶法)说明书操作测定吸光度, 计算上清液中 NO 的含量。收集培养液后每孔加入 Hanks 液清洗细胞 2 次, 避光条件下加入 Fluo-3/AM, 终浓度为 5 μM, 37 ℃ 避光孵育 30~60 min, 用 Hanks 液洗涤 2 次, 加入 300 μL Hanks 液制备细胞悬液, 用流式细胞仪检测荧光强度。

2.6 天麻成分 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤原代皮层神经元钙通道蛋白和基因表达的影响

2.6.1 Western Blot 检测原代皮层神经元钙通道相关蛋白的表达

造模结束后, 弃上清液, 加入适量细胞裂解液收集细胞, 冰浴裂解 5 min, 收集细胞裂解液, 4 ℃ 下 14000 rpm 离心 5 min, 取上清液, BSA 方法测定蛋白浓度, 于沸水中煮 5~10 min 使蛋白变性后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将分离的蛋白质用半干转法转移到硝酸纤维素膜, 将膜用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭液封闭 1 h 后, 一抗(L-type、NR1、TRPM7、β-actin)室温孵育 2 h, 辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgG(H+L)的二抗及辣根过氧化物酶标记驴抗山羊 IgG(H+L)二抗室温孵育 1 h, ECL 显色, 用 UV-PAGE 凝胶成像系统成像, 利用 Image J 进行图像灰度值处理。

2.6.2 RT-PCR 法检测皮层神经元钙通道相关基因的表达

造模结束后, 弃上清液, PBS 洗涤 3 次后加入 1 mL Trizol / 10⁶ 个细胞, 吹打使细胞脱壁后收集细胞悬液, 加入 200 μL 氯仿/mL Trizol 混合均匀, 室温静置 5 min, 4 ℃ 下 12000 rpm 离心 15 min。收集上层水相, 加入 0.5 mL 异丙醇/mL Trizol 混合均匀, 室温静置 10 min, 4 ℃ 下 12000 rpm 离心 10 min。弃上清液, 加入 1 mL 体积分数为 0.75 的乙醇/mL Trizol, 充分混合, 4 ℃ 下 7500 rpm 离心 5 min, 弃去上

清液,室温干燥3 min,加20 μ L DEPC水溶解总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度,按GoScript Reverse Transcription System试剂盒说明进行RNA的变性及逆转录,GoTaqqPCR Master Mix试剂盒测定PCR。

2.7 数据处理

采用GraphPad prism5.0软件进行统计,实验数据均以 $X \pm SEM$ 表示,组间比较采用单因素方差分

析法处理,方差齐者采用LSD法检验,方差不齐者采用Tamhane's法检验。

3 实验结果

3.1 原代皮层神经元形态观察及鉴定

经NSE和MAP-2免疫荧光法染色,原代皮层神经元的纯度达到90%以上,可用于实验研究,结果见图2。

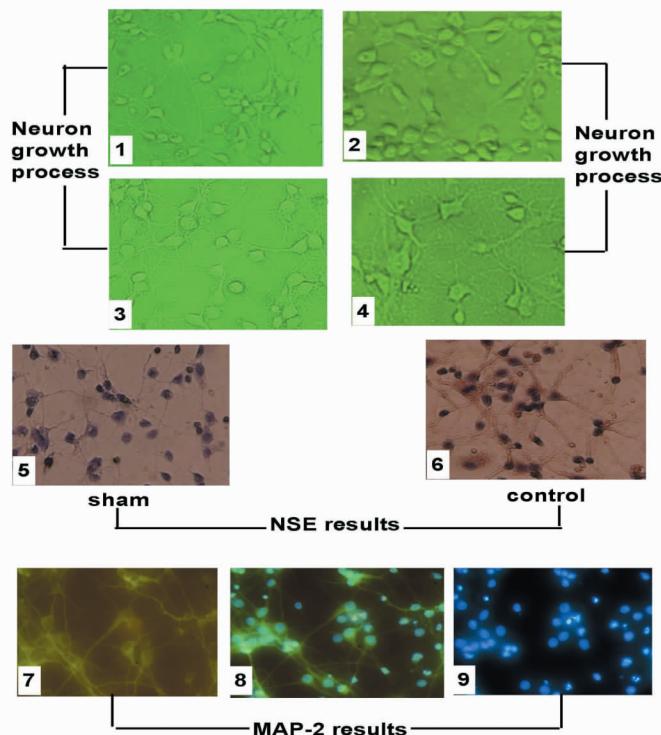


图2 原代皮层神经元形态学观察及鉴定

Fig. 2 Morphology observation and identification of rat primary cortical neurons

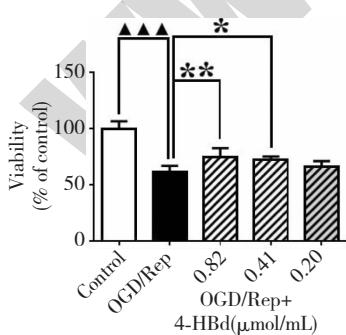


图3 4-HBd对OGD/Rep损伤的原代皮层神经元存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 The effect of 4-HBd on survival rate of primary cortex neuron with OGD/Rep injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$

Note: compared with control group, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$

3.2 天麻成分4-HBd对OGD/Rep损伤原代皮层神经元存活率的影响

与模型(OGD/Rep)组比较,天麻成分4-HBd(0.82、0.41) μ mol/mL组可提高OGD/Rep损伤的原代皮层神经元存活率,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),结果见图3。

3.3 天麻成分4-HBd对OGD/Rep损伤原代皮层神经元NO释放量、钙离子的浓度的影响

与模型组(OGD/Rep)比较,天麻成分4-HBd 0.41 μ mol/mL组可减少OGD/Rep损伤原代皮层神经元NO的释放,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见图4A;同时天麻成分4-HBd 0.82 μ mol/mL组可降低OGD/Rep损伤原代皮层神经元胞内钙离子

浓度,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见图4B。

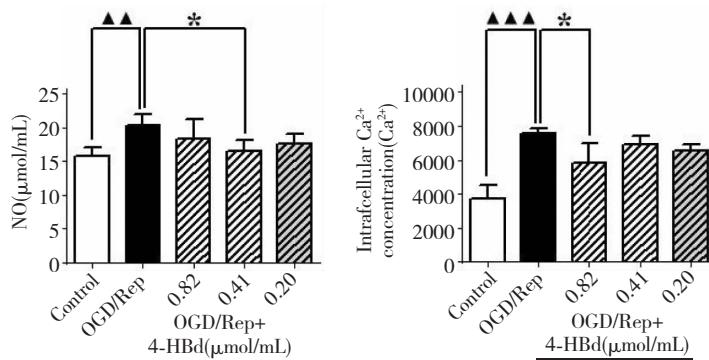


图4 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤后皮层神经元细胞 NO 释放量(A) 及钙离子浓度(B) 的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 The effect of 4-HBd on the release of NO (A) and calcium ions (B) in cortical neurons with OGD/Rep injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 天麻成分 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤原代皮层神经元钙通道基因和蛋白表达的影响

与模型组(OGD/Rep)比较,天麻成分 4-HBd (0.82、0.41、0.20) μmol/mL 组对 NMDA 型钙通道 NR1 蛋白和基因表达均无明显影响,结果见图5;对

TRPM7 型钙通道 TRPM7 蛋白和基因表达均无明显影响,结果见图6;天麻成分 4-HBd 0.82 μmol/mL 组能下调 L 钙通道 L-type 蛋白的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见图7。

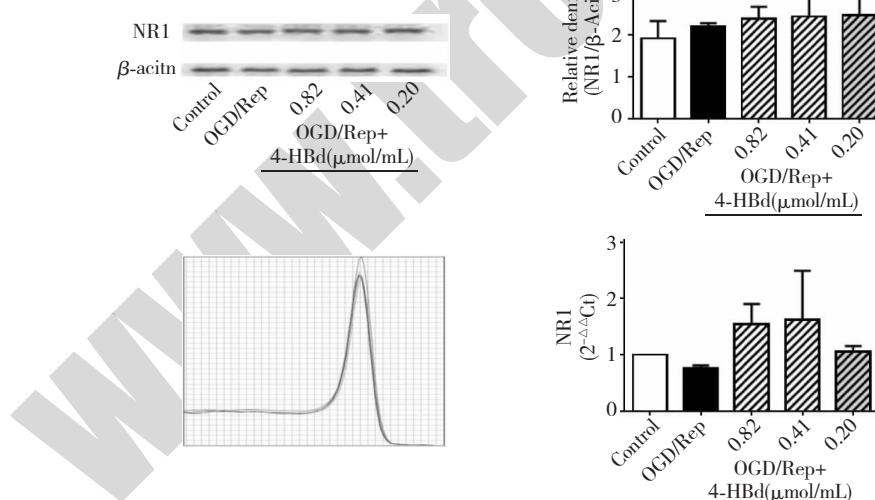


图5 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤后皮层神经元细胞 NMDA 型通道蛋白及基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 The effect of 4-HBd on the protein and gene expression of NMDA channel in the cortical neurons with OGD/Rep injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

脑缺血/再灌注损伤主要与自由基过度形成、兴

奋性氨基酸毒性作用、炎性反应、细胞内钙超载及细胞凋亡等密切相关,其中钙超载及其触发的一系列有害代谢反应是导致脑缺血/再灌注时神经元损伤

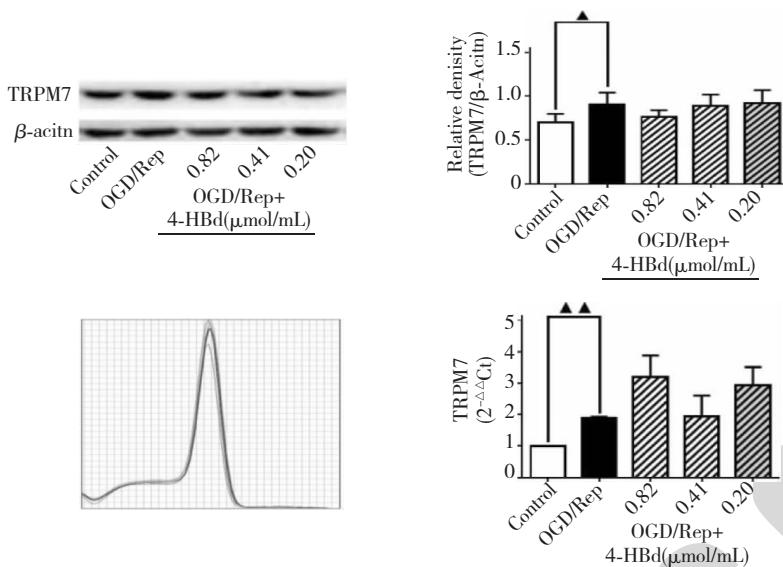


图 6 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤后皮层神经元细胞 TRPM7 通道蛋白及基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 The effect of 4-HBd on the protein and gene expression of TRPM7 channel in the cortical neurons with OGD/Rep injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

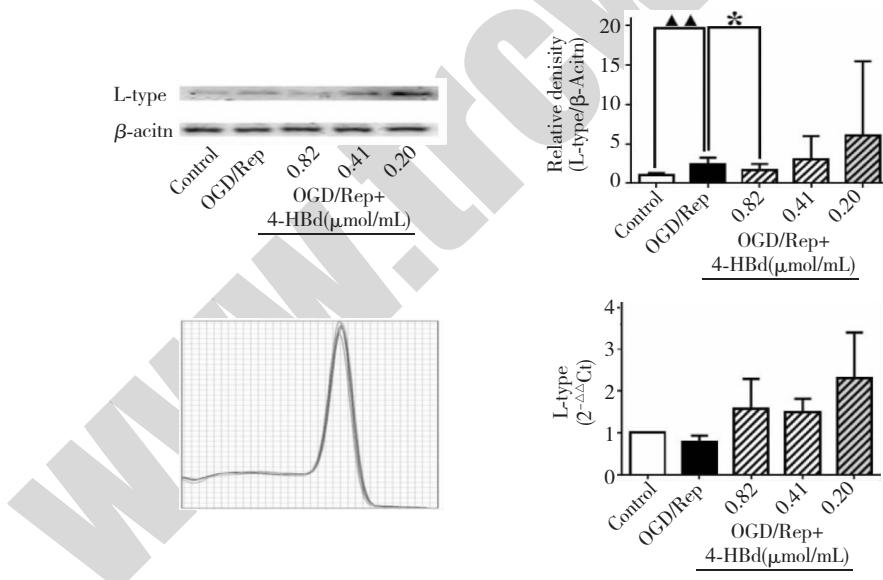


图 7 4-HBd 对 OGD/Rep 损伤后皮层神经元细胞 L 型钙通道蛋白及基因表达影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 The effect of 4-HBd on the protein and gene expression of L calcium channel in the cortical neurons with OGD/Rep injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

和死亡的关键因素^[8]。

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是缺血性脑血管病分子研究的关键物质, 是细胞内和细胞间的信息传递分子^[9], 由精氨酸通过一氧化氮合酶催化生成,

一氧化氮合酶参与缺氧或缺血所引起的一氧化氮的过量所致的脑损伤^[10]。本实验在建立 OGD/Rep 损伤的神经元模型基础上, 对神经元的存活率、NO 的释放量以及胞内钙离子浓度进行检测。结果表明,

天麻酚性成分 4-HBd 能提高 OGD/Rep 损伤的原代皮层神经元的细胞存活率,提示其有神经保护作用,并且能降低 NO 的释放量和细胞内钙离子的浓度,故推测其神经保护作用的机制可能与抑制钙离子内流引发的钙超载有关。

脑缺血后,细胞外 Ca^{2+} 可通过钙通道进入细胞内,细胞内 Ca^{2+} 水平过高进而导致蛋白酶、磷脂酶、内切酶、酯酶和核酶等失活^[11],生成氧自由基和 NO 等致使神经元细胞发生坏死、凋亡^[12-14],最终导致神经元损伤。神经元细胞膜钙离子通道包括:电压依赖式钙通道(主要是 L 型钙通道,L-type)、受体操控型钙通道(主要是 NMDA 型钙通道,NR1 为其基本的功能亚单位)及瞬时受体电位通道(主要是 TRPM7 钙通道)^[15,16]。前期研究表明,天麻酚性成分阻滞钙离子通道的开放,是天麻发挥抗脑缺血再灌注损伤的作用途径之一,但天麻酚性成分究竟作用于哪种类型的钙通道并不清楚。因此,本实验以天麻酚性成分 4-HBd 为研究对象,对 L-type、NR1、TRPM7 三种钙通道,从蛋白和基因的表达角度,对 4-HBd 的作用进行了考察,结果表明,天麻酚性成分 4-HBd 能降低 OGD/Rep 损伤的原代皮层神经元 L 型钙通道蛋白的水平,对 L-type mRNA 表达有降低趋势,而对 TRPM7 型钙通道(TRPM7)、NMDA 型钙通道(NR1)蛋白和基因的表达无明显影响。推测天麻酚性成分 4-HBd 抗神经元损伤机制为抑制 L 型钙通道过度开放减轻钙超载,从而达到神经保护的作用。

参考文献

- Li F(李凤), Li XG(李小刚). Advances in pharmacotherapy of ischemic cerebrovascular disease. *Prac J Clin Med* (实用医院临床杂志), 2013, 10(3):29-31.
- Li XF(李秀芳), Sun YK(孙衍坤), Zhang WM(张维明), et al. Protective effect of esterified phenolic compounds from *Gastrodia elata* Blume. on cerebral ischemia-reperfusion injury. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 842-845.
- Duan XH(段小花), Li GH(李国花), Wu S(吴霜), et al. Effects of ethyl acetate extraction from *Gastrodia elata* on neuroplasticity of rat cerebral ischemia injury model. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19:202-206.
- Duan XH(段小花), Li ZL(李资磊), Yang DS(杨大松), et al. Study on the chemical constituents of *Gastrodia elata*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2013, 36:1608-1611.
- Zhang WM(张维明), Yang L(杨莲), Li XF(李秀芳), et al. Screening of active compounds from *Gastrodia elata* Blume for vascular smooth muscle relaxation. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17:157-160.
- Wang J(王静), Zhang YJ(张艳军), Chang LT(常亮堂). Protection of berberin on cortical neurons of rat injured by $\text{A}\beta_{25-35}$. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 728-733.
- Tang M, Zhao L, Chen Y, et al. Angiotensin II protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced injury *in vitro*. *Biomed Rep*, 2014, 2:112-116.
- Shi YM(石咏梅), Ge JW(葛金文). Research progress of calcium channels in the neuron after cerebral ischemia/reperfusion injury. *Med Recapitul* (医学综述), 2014, 20: 2507-2509.
- Zuo W, Zhang W, Chen NH. Sexual dimorphism in cerebral ischemia injury. *Eur J Pharmaeol*, 2013, 711:73-79.
- Liu HT(刘海婷), Mu DZ(母得志). Inducible nitric oxide synthase and brain hypoxic-ischemic brain damage. *Chin J Contemp Pediatr* (中国当代儿科杂志), 2014, 16:962-967.
- Kumar VS, Gopalakrishnan A, Naziroglu M, et al. Calcium ion—the key player in cerebral ischemia. *Curr Med Chem*, 2014, 21:2065-2075.
- Suberbielle E, Sanchez P, Kravitz V, et al. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons with exacerbation by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 613-621.
- Mendes CS, Levet C, Chatelain G, et al. ER stress protects from retinal degeneration. *EMBO J*, 2009, 28:1296-1307.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function. *Pharmacol Rev*, 2010, 62:405-496.
- Liu X, Hunter C, Weiss HR, et al. Effects of blockade of ionotropic glutamate receptors on blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *Neurol Sci*, 2010, 31:699-703.
- Zhang Y, Zhou L, Zhang X, et al. Ginsenoside-Rd attenuates TRPM7 and ASIC1a but promotes ASIC2a expression in rats after focal cerebral ischemia. *Neurol Sci*, 2012, 33: 1125-1131.