

· 实验研究 ·

地佐辛对 β 淀粉样多肽处理的原代大鼠皮质星形胶质细胞的保护作用

张立民 李睿 孙文波 王琦

【摘要】 目的 探讨地佐辛对接受 β 淀粉样多肽处理的原代大鼠皮质星形胶质细胞的影响以及与超极化激活的环核苷酸门控(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated, HCN)通道的关系。**方法** 出生 24 h 内的 SD 大鼠, 体外培养皮质星形胶质细胞并接种于培养瓶或 35 mm 培养皿, 采用随机数字表法分为七组($n=5$)。ZA 组和 CDA 组预先 24 h 分别向培养基中加入 HCN 通道激动剂 7-CH-cAMP(30 $\mu\text{mol/L}$)和阻断剂 ZD7288(30 $\mu\text{mol/L}$), 随后 DA1、DA2、DA3 和 CDA 组分别向培养基中加入地佐辛 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-6} mmol/L 孵育 24 h, 最后 A、DA1、DA2、DA3、ZA 和 CDA 组分别向培养基中加入 A β 1-42(15 $\mu\text{mol/L}$)孵育 24 h 作为 β 淀粉样多肽处理, 而对照组(C 组)细胞正常培养。按照各组处理收集星形胶质细胞, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染色-流式细胞法测定细胞凋亡率, 乳酸脱氢酶(LDH)法测定细胞损伤率, ELISA 法测定细胞前炎性因子 IL-1 β 浓度, Western blot 法测定细胞内 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 蛋白含量。**结果** 与 C 组比较, A 组星形胶质细胞凋亡率、损伤率和 IL-1 β 浓度明显升高($P<0.05$); 与 A 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞凋亡率、损伤率和 IL-1 β 浓度明显下降, Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 蛋白含量明显升高($P<0.05$); 与 CDA 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞凋亡率、损伤率和 IL-1 β 浓度明显下降, Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 蛋白含量明显升高($P<0.05$)。**结论** 地佐辛抑制 β 淀粉样多肽诱发的原代大鼠皮质星形胶质细胞凋亡的机制可能与 HCN 通道开放被抑制后, 抗氧化应激相关蛋白 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 含量增加相关。

【关键词】 地佐辛; 星形胶质细胞; 氧化应激; 凋亡

Dezocine protects primary rat cortical astrocyte against β amyloid peptide exposure: roles of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels ZHANG Limin, LI Rui, SUN Wenbo, WANG Qi. Department of Anesthesiology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China

Corresponding author: ZHANG Limin, Email: azai2010@126.com

【Abstract】 Objective To investigate hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels inhibited by dezocine when primary rat cortical astrocytes were exposed to β amyloid peptide. **Methods** Cultured primary cortical astrocytes from new-born SD rats (within 24 h) were divided into 7 groups ($n=5$) according to random number table. The astrocytes in groups ZA and CDA were pre-treated with 7-CH-cAMP (30 mmol/L), an agonist of HCN channels and ZD7288 (30 mmol/L), an inhibitor of HCN channels for 24 h, respectively. And then the cells in groups DA1, DA2, DA3 and CDA were treated with dezocine 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-6} mmol/L for 24 h, respectively. Following with the treatments above, the cells in groups A, DA1, DA2, DA3, ZA and CDA were exposed to A β 1-42 (15 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, but the cells in group C were cultured normally. The effects of cell apoptosis, viability and injury were assessed by Annexin V-FITC/PI assay, MTT assay and lactate dehydrogenase (LDH) release assay. IL-1 β was assessed by ELISA assay. The expressions of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD protein were assessed by Western blot assay. **Results** Compared with group C, there were significant increases of cell apoptosis, injury and IL-1 β level in group A ($P<0.05$). Compared with group A, there were significant decreases of cell apoptosis, injury, and IL-1 β level but increase of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD expressions in groups ZA, DA2 and DA3 ($P<0.05$), while the neuroprotection of dezocine was partially restored by 7-CH-cAMP in group CDA ($P<0.05$). **Conclusion** The neuroprotection of dezocine against apoptosis induced by β amyloid peptide could be associated with up-regulation of anti-oxidative stress related Cu/Zn-SOD and Mn-SOD mediated by inhibition of HCN channels.

【Key words】 Dezocine; Astrocyte; Oxidative stress; Apoptosis

DOI:10.12089/jca.2018.02.018

作者单位:061000 河北省沧州市中心医院麻醉科

通信作者:张立民, Email: azai2010@126.com

地佐辛是一种广泛用于临床的阿片受体混合激动-拮抗药,在具有较强镇痛作用的同时,呼吸抑制和药物依赖的不良反应发生率低^[1]。超极化激活的环核苷酸门控(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated, HCN)通道能够介导超极化激活内相电流的离子通道^[2]。这种内相电流称之为 I_h , I_h 具有稳定细胞膜电位,参与神经突触的生长发育与整合,调节神经细胞及胶质细胞内的递质释放等生理功能。神经病理性疼痛的发生发展机制可能与星形胶质细胞膜表面的 HCN 通道密切相关^[3,4]。本研究拟通过建立体外星形胶质细胞氧化应激模型,分析地佐辛对原代大鼠皮质星形胶质细胞的作用及 HCN 通道的影响。

材料与方法

原代大鼠皮质星形胶质细胞培养 SD 新生大鼠(24 h 内),由沧州市中心医院中心实验室提供,将脑组织置于无菌 D-Hank 液中,剥离大脑皮质,并在 D-Hank 液中将皮质剪成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 大小的组织块后,放入 15 ml 离心管(以上操作均在冰板上进行)。加入等量胰酶(0.125%)后,使其终浓度为 0.062 5%。消化结束后,加入等容量接种液(DMEM, 20%FBS, 10%HS)终止胰酶的消化反应。800 r/min 离心 5 min 后弃上清。加入 2~3 ml 接种液,用吸管轻轻吹打 2~3 下,使用 200 目滤网过滤,收集所得细胞悬液,在倒置显微镜下用血计数板计数并算出细胞的密度,用接种液将细胞密度调至 $1 \times 10^5/\text{ml}$,然后接种于预先经多聚赖氨酸处理的细胞培养瓶中,将细胞培养瓶放入 37°C 、 CO_2 浓度为 5% 的培养箱中培养,以后每隔 2~3 天使用神经元专用培养基,半量换液一次,第 7 天将 FBS 浓度降低至 10%。培养至第 21 天的原代大鼠皮质星形胶质细胞通过星形胶质细胞特异表达蛋白 GFAP 免疫荧光染色,进行星形胶质细胞鉴定,其阳性表达率超过 95% 可继续用于实验。

细胞模型分组与处理 采用随机数字表法将细胞分为七组($n=5$):对照组(C 组)、A、DA1、DA2、DA3、ZA 和 CDA 组,其中 CDA 组预先 24 h 向培养基中加入 HCN 通道激动剂 7-CH-cAMP($30\text{ }\mu\text{mol/L}$,批号:16719-36-1),ZA 组预先 24 h 向培养基中加入 HCN 通道阻断剂 ZD7288($30\text{ }\mu\text{mol/L}$,批号:ab120102),DA1、DA2、DA3 和 CDA 组分别向培养基中加入地佐辛(批号:1507150) 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-6} mmol/L 孵育 24 h, A、DA1、

DA2、DA3、ZA 和 CDA 组分别向培养基中加入 A β 1-42($15\text{ }\mu\text{mol/L}$)孵育 24 h 作为 β 淀粉样多肽处理,C 组加入等量的 PBS 缓冲液,置于含有 5% CO_2 的正常培养箱中培养。

星形胶质细胞凋亡率的测定 每组取 5 孔,采用 Annexin V-FITC/PI 双染色法测定星形胶质细胞凋亡程度,实验重复 3 次并取均值。

星形胶质细胞损伤率的测定 每组取 5 孔,采用乳酸脱氢酶(LDH)法测定细胞死亡率,则最终细胞损伤率(%)=上清液中 LDH/(上清液中 LDH+细胞内 LDH) $\times 100\%$,重复 3 次^[5]。

IL-1 β 浓度的测定 每组取 5 瓶,将星形胶质细胞种植于 96 孔板,密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$,待细胞贴壁生长后,将细胞培养液替换为含有 1 mg/ml 胎牛血清的 PBS 缓冲液。根据 IL-1 β 的 ELISA 说明书操作,进行 IL-1 β 浓度的测定。

星形胶质细胞细胞质提取 每组取 5 瓶,0.125%胰酶消化 10 min 后,收集细胞。参照说明书应用细胞质提取试剂盒提取星形胶质细胞的细胞质蛋白。

Western blot 检测 提取到的细胞质蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白质浓度。30 μg 蛋白质上样后 6% SDS-PAGE 中电流恒定进行电泳,电压恒定湿转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, TBS-T 洗膜,加入兔抗鼠 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD(1:1 000)多克隆抗体 4°C 过夜孵育,第 2 天 TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,山羊抗兔二抗(1:2 000) 25°C 下孵育 30 min, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 发光,以 Tubulin(1:2 000)作为内参照。

统计分析 采用 SPSS 11.5 进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

原代大鼠皮质星形胶质细胞鉴定 培养至第 21 天,原代大鼠皮质星形胶质细胞 GFAP 免疫荧光染色阳性表达率超过 95%(图 1)。

原代大鼠皮质星形胶质细胞凋亡率、存活率及损伤率 与 C 组比较, A 组原代星形胶质细胞凋亡率明显升高;与 A 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞凋亡率明显下降;与 CDA 组比较, DA2、

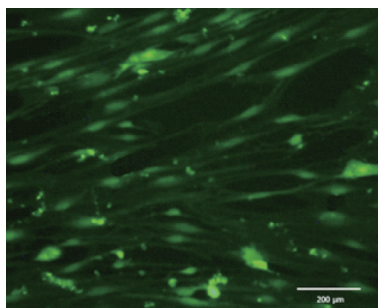
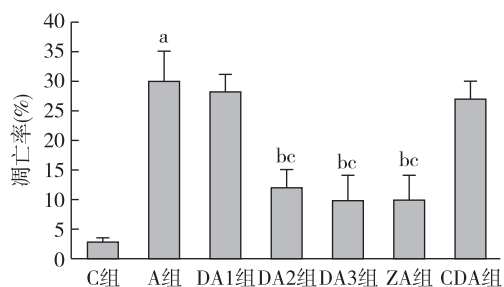


图1 原代大鼠皮质星形胶质细胞 GFAP 免疫荧光染色图 ($\times 200$)

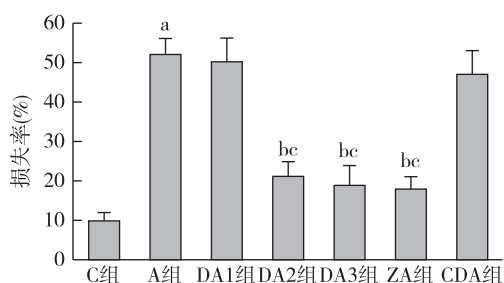
DA3 和 ZA 组星形胶质细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$) (图 2)。



注:与 C 组比较, $^aP < 0.05$;与 A 组比较, $^bP < 0.05$;与 CDA 组比较, $^cP < 0.05$

图2 七组原代大鼠皮质星形胶质细胞凋亡率的比较

与 C 组比较, A 组原代星形胶质细胞损伤率明显升高;与 A 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞损伤率明显下降;与 CDA 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞损伤率明显下降 ($P < 0.05$) (图 3)。

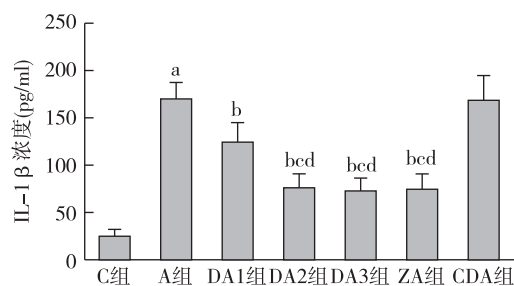


注:与 C 组比较, $^aP < 0.05$;与 A 组比较, $^bP < 0.05$;与 CDA 组比较, $^cP < 0.05$

图3 七组原代大鼠皮质星形胶质细胞损伤率的比较

原代大鼠皮质星形胶质细胞 IL-1 β 浓度 与 C 组比较, A 组原代星形胶质细胞 IL-1 β 浓度明显升高;与 A 组比较, DA1、DA2、DA3 和 ZA 组星形胶

质细胞 IL-1 β 浓度明显下降;与 DA1 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞 IL-1 β 浓度明显下降;与 CDA 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞 IL-1 β 浓度明显下降 ($P < 0.05$) (图 4)。



注:与 C 组比较, $^aP < 0.05$;与 A 组比较, $^bP < 0.05$;与 DA1 组比较, $^cP < 0.05$;与 CDA 组比较, $^dP < 0.05$

图4 七组原代大鼠皮质星形胶质细胞 IL-1 β 浓度的比较

原代大鼠皮质星形胶质细胞 Cu/Zn-SOD 及 Mn-SOD 蛋白含量 与 A 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞 Cu/Zn-SOD 蛋白含量明显升高;与 CDA 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞 Cu/Zn-SOD 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$) (图 5)。



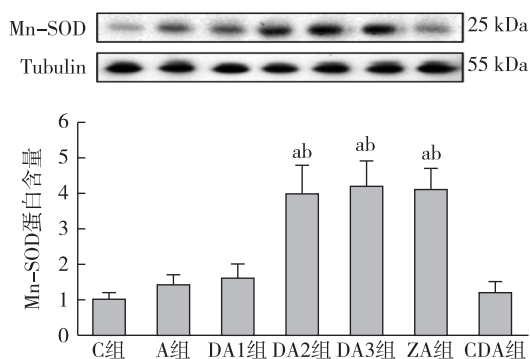
注:与 A 组比较, $^aP < 0.05$;与 CDA 组比较, $^bP < 0.05$

图5 七组原代大鼠皮质星形胶质细胞 Cu/Zn-SOD 蛋白含量的比较

与 A 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞 Mn-SOD 蛋白含量明显升高;与 CDA 组比较, DA2、DA3 和 ZA 组星形胶质细胞 Mn-SOD 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$) (图 6)。

讨 论

本研究结果显示,原代大鼠皮质星形胶质细胞接受 β 淀粉样多肽处理后,凋亡率、损伤率和氧化应激明显增加,而地佐辛 10^{-6} 和 10^{-5} mmol/L 预



注:与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 CDA 组比较, ^b $P < 0.05$

图 6 七组原代大鼠皮质星形胶质细胞 Mn-SOD 蛋白含量的比较

先给药以及 HCN 通道阻断剂 ZD7288 能够减少原代大鼠皮质星形胶质细胞的凋亡、损伤和氧化应激, HCN 通道激动剂 7-CH-cAMP 能够部分逆转地佐辛的抗凋亡损伤以及抗氧化应激的作用。本研究选用原代培养的大鼠皮质星形胶质细胞, 是离体研究神经系统相关理论的良好模型; 所采用的 β 淀粉样多肽处理的方法制备星形胶质细胞氧化模型, 是基础研究中常用的体外氧化应激模型^[6]。

本研究采用 3 种浓度的地佐辛处理接受氧化应激的星形胶质细胞, 结果显示地佐辛 10^{-6} 和 10^{-5} mmol/L 均能够明显增加星形胶质细胞的增殖能力, 减少细胞凋亡和损伤, 而地佐辛 10^{-7} mmol/L 未能发挥其神经保护作用, 可能与地佐辛的作用浓度过低相关。IL-1 β 以及 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 的 Western blot 实验表明, 地佐辛保护细胞的机制可能与增加抗氧化应激, 减少细胞内前炎症因子 IL-1 β 的表达相关。已有相关研究证实, 地佐辛鞘内注射或腹腔内注射能够减轻神经病理性疼痛的大鼠的痛行为, 其机制与脊髓内星形胶质细胞内的信号通路如 CX43 等相关^[7,8]。

ZD7288 是一种特异性的 HCN 通道阻断剂。有研究表明, ZD7288 能够通过抑制 HCN 通道的开放, 缓解背神经离断术后大鼠的慢性疼痛^[3]。神经病理性疼痛与 HCN 通道活性上调后, 细胞的氧化应激水平增加相关^[9,10]。本研究结果显示, 地佐辛和 ZD7288 均能够通过降低细胞前炎症因子 IL-1 β 浓度, 增加抗氧化应激活性蛋白 SOD 的表达, 减少细胞损伤和凋亡, 增加细胞的增殖能力。

环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 能够直接与 HCN 通道蛋白结合并调控该通

道的生物活性, 是一种理想的体外实验 HCN 通道激动剂^[11]。本研究参考文献^[11]选择浓度为 30 μ M/L 的 7-CH-cAMP 处理原代大鼠皮质星形胶质细胞 24 h, 发现即使接受了地佐辛的作用后也不能够有效减少氧化应激后细胞的凋亡和损伤, 而地佐辛增加抗氧化应激的保护作用也被消除。

综上所述, 地佐辛抑制 β 淀粉样多肽诱发的原代大鼠皮质星形胶质细胞凋亡的机制可能与 HCN 通道开放被抑制后, 抗氧化应激相关蛋白 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 表达增加相关。

参 考 文 献

- [1] Shuying L, Ping L, Juan N, et al. Different interventions in preventing opioid-induced cough: a meta-analysis. *J Clin Anesth*, 2016, 34: 440-447.
- [2] Santoro B, Tibbs GR. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 868: 741-764.
- [3] Ding W, You Z, Shen S, et al. Inhibition of HCN channel activity in the thalamus attenuates chronic pain in rats. *Neurosci Lett*, 2016, 631: 97-103.
- [4] Tsantoulas C, Mooney ER, McNaughton PA. HCN2 ion channels: basic science opens up possibilities for therapeutic intervention in neuropathic pain. *Biochem J*, 2016, 473(18): 2717-2736.
- [5] Li QF, Zhu YS, Jiang H. Isoflurane preconditioning activates HIF-1 α , iNOS and Erk1/2 and protects against oxygen-glucose deprivation neuronal injury. *Brain Res*, 2008, 1245: 26-35.
- [6] Xie L, Jiang C, Wang Z, et al. Effect of Huperzine A on A β -induced p65 of astrocyte in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(12): 2334-2337.
- [7] 王慧明, 麻伟青, 黄章翔, 等. 地佐辛腹腔内注射减轻神经病理性疼痛大鼠的痛行为研究. *昆明医科大学学报*, 2013, 8(1): 44-46.
- [8] 韩杰. 鞘内注射地佐辛对急性痛模型大鼠镇痛作用的影响. 兰州大学, 2013.
- [9] O'Donnell NH, Möller BL, Neale AD, et al. Effects of PEG-induced osmotic stress on growth and dhurrin levels of forage sorghum. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 73: 83-92.
- [10] Singh SP, Chhunchha B, Fatma N, et al. Delivery of a protein transduction domain-mediated Prdx6 protein ameliorates oxidative stress-induced injury in human and mouse neuronal cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(1): C1-C16.
- [11] Möller S, Alfieri A, Bertinetti D, et al. Cyclic nucleotide mapping of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(5): 1128-1137.

(收稿日期: 2017-08-03)