

· 药理 ·

丹参酮对氯化钾及 N-甲基-D-门冬氨酸诱导 PC12 细胞钙超载损伤的保护作用

何丽娜 何素冰 杨 军(合肥 230061 安徽省医学科学研究所省生物医药重点实验室)

摘要 目的:探讨丹参酮对 PC12 细胞钙超载损伤模型的保护作用及其机制。方法:采用组织培养法,以大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆株 PC12 细胞为材料,制备 KCl 及 NMDA 诱导的钙超载损伤模型。结果:形态学检查发现丹参酮对两种不同类型的钙超载损伤模型中的 PC12 细胞具有明显保护作用,MTT 法活细胞测定提示丹参酮可显著提高损伤模型中细胞存活数,降低细胞释放的 LDH 活性,并显著减少胞内钙离子浓度。结论:丹参酮对钙超载所致 PC12 细胞损伤有显著的保护作用。

关键词 丹参酮;PC12 细胞;钙超载;KCl;NMDA

Effect of tanshinone and its mechanism on calcium overloading injury in cultured PC12 cells

He Lina, HE Su-bing, YANG Jun (Biological & Medicinal Central Laboratory of Anhui, Hefei 230061)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effect and mechanism of tanshinone on calcium overloading injury models. **METHOD:** Two injury models induced by KCl and NMDA were used to assay action of tanshinone in cultured PC12 cells. **RESULTS:** It was found that tanshinone possessed obvious protective effects on PC12 cells in injury models by the way of morphological examination. MTT and LDH measurement in supernate indicated that tanshinone increased number of live cells and reduced the extent of cell injury significantly. Tanshinone also lessened the concentration of calcium ion in cytoplasm. **CONCLUSION:** Tanshinone protected rat PC12 cells from two calcium overloading injuries effectively in vitro. Its actions may deal with antioxidation, inhibition of NO production and blocking of both types of calcium channel. **KEY WORDS** tanshinone, PC12, calcium overloading, KCl, NMDA

神经细胞缺血性损伤与胞内过高的游离钙离子水平密切相关,胞内钙超载最终引起神经细胞死亡。通过抑制钙离子内流,钙通道阻滞剂在治疗缺血性脑血管病中发挥着重要作用。丹参酮具有抗缺血缺氧、改善微循环、抑制血小板聚集和抗血栓形成作用^[1],其主要单体丹酚酸 A 可明显降低小鼠脑组织脂质过氧化反应并减少羟自由基生成^[2]。我们研究发现,丹参酮对多种药物诱导的大鼠皮层神经细胞缺血样损伤显著保护。本实验中,我们通过建立药物诱导的两种不同类型细胞钙超载损伤模型,观察丹参酮对 PC12 细胞损伤的保护作用,并对其作用机理进行初步研究。

1 实验材料

1.1 药品与试剂 丹参酮(tanshinone, Tan),河北兴隆希力药业有限公司产品,批号 990302;氯酯醒(meclofenoxane, Mec),上海淮海制药厂,批号 970702,双蒸水溶解,除菌过滤,4℃冰箱保存。1640 培养基、NMDA(N-methyl-D-aspartate)及 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide),Sigma 公司产品。胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司。十二烷基硫酸钠(SDS)购自上海化学试剂采购供应站;钙离子及乳酸脱氢酶(LDH)测试盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆株 PC12 细胞,引自武汉大学菌种保藏中心,本研究室传代保存。

1.3 细胞培养液 1640 培养液,内含 20% 胎牛血清,100U·mL⁻¹青霉素,100μg·mL⁻¹链霉素,pH 7.2。

2 实验方法

2.1 药物对损伤模型的保护

2.1.1 KCl 损伤模型的建立 加入含 200mmol·L⁻¹KCl 的 1640 培养液于 PC12 细胞上 10min,造成 KCl 损伤模型。

2.1.2 NMDA 神经毒性损伤模型的建立 用含 300μmol·L⁻¹NMDA 的 1640 培养液于 PC12 细胞上作用 90min,造成 NMDA 损伤模型。

2.1.3 药物保护实验 将 1×10⁶·mL⁻¹PC12 细胞接种于 96 孔细胞培养板,37℃,5% CO₂ 温箱孵育 24h 后,进行药物保护实验。于损伤实验前 1h 及损伤过程中均加入不同浓度药液。造型后,换成正常 1640 培养液 37℃,5% CO₂ 温箱继续培养 6h,测定结果。

2.2 观察指标

2.2.1 细胞形态学观察 采用倒置显微镜(XDS-1 型)观察 PC12 细胞生长及病变情况。

2.2.2 MTT 检测 于培养结束前 4h 加入 5mg·mL⁻¹

MTT10 μ l/孔,待形成蓝紫色甲臜颗粒后,加入10%SDS,37C过夜,使细胞彻底裂解,酶联检测仪波长570nm下测定OD值。

2.2.3 LDH测定 细胞死亡释放大LDH,测定上清液LDH可观察培养细胞损伤程度。取培养上清,酶联检测仪波长440nm处测OD值,计算LDH含量。

2.2.4 钙浓度测定 收集实验细胞,-20C反复冻融3次,测定胞内钙离子浓度,酶联检测仪波长630nm处测定OD

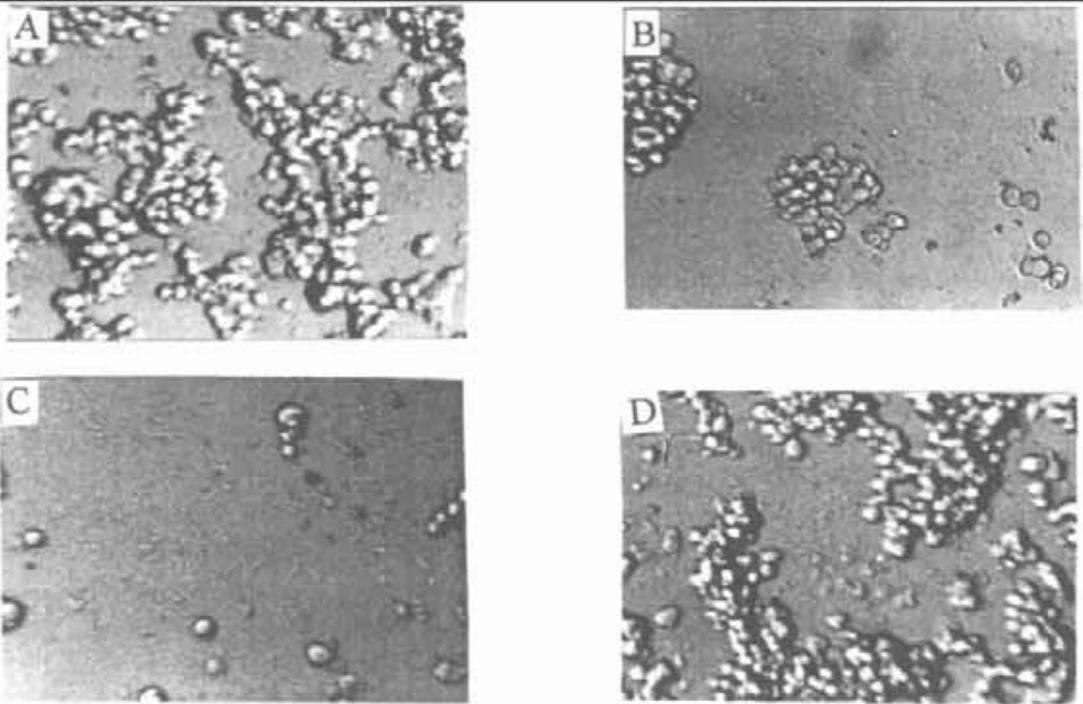
值,计算胞内钙含量。

2.3 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间数据进行t检验。

3 结果

3.1 培养细胞形态学观察

PC12细胞为圆形,类似于淋巴细胞。贴壁快,生长速度快,培养24h细胞分布均匀,3d后细胞呈簇状生长。细胞损伤后,首先肿胀,折光度减弱,随后圆缩脱落。受药物保护的细胞,形态无明显改变,结果见图1。



A: 正常对照组 B: 细胞损伤初期 C: PC12细胞严重损伤及死亡 D: 丹参酮对PC12细胞损伤的保护

图1 PC12细胞钙超载损伤不同阶段形态学变化($\times 200$)

3.2 丹参酮对KCl诱导PC12细胞损伤的保护作用

200mmol \cdot L⁻¹KCl诱导PC12细胞损伤后,细胞存活数显著降低,培养液中LDH增多,胞内钙离子含量增加。丹参

酮在0.78~50 μ g \cdot m⁻¹浓度范围内,均能保护细胞,抵抗KCl引起的细胞钙超载损伤,提高细胞存活数,减低LDH渗漏,降低胞内钙浓度。结果见表1。

表1 丹参酮对KCl诱导PC12细胞钙超载损伤的保护作用($\bar{x}\pm s, n=8$)

Group	Con(μ g/ml)	MTT(OD)	LDH(U \cdot m ⁻¹)	Ca(mmol \cdot L ⁻¹)
Control		0.97 \pm 0.03	215.2 \pm 4.82	1.56 \pm 0.05
Model		0.47 \pm 0.04 ^{▲▲}	333.6 \pm 3.69 ^{▲▲}	2.22 \pm 0.04 ^{▲▲}
TAN	50	0.73 \pm 0.04 ^{**}	238.9 \pm 2.96 ^{**}	1.07 \pm 0.02 ^{**}
TAN	12.5	0.77 \pm 0.05 ^{**}	180.0 \pm 3.35 ^{**}	1.11 \pm 0.03 ^{**}
TAN	3.125	0.93 \pm 0.15 ^{**}	277.8 \pm 5.83 ^{**}	0.95 \pm 0.04 ^{**}
TAN	0.78	1.02 \pm 0.15 ^{**}	82.9 \pm 1.90 ^{**}	0.60 \pm 0.02 ^{**}
MEC	100	0.75 \pm 0.12 ^{**}	177.0 \pm 5.21 ^{**}	0.91 \pm 0.04 ^{**}
MEC	6.25	0.77 \pm 0.06 ^{**}	261.0 \pm 6.60 ^{**}	1.56 \pm 0.05 ^{**}

Compared with control group: ^{▲▲}P<0.01, Compared with model group: ^{**}P<0.01

3.3 丹参酮对NMDA诱导PC12细胞损伤的保护作用

300 μ mol \cdot L⁻¹NMDA作用于PC12细胞后,细胞死亡明显增加。各剂量丹参酮组对NMDA诱导的细胞病变表现出

不同程度的抑制作用,提示其对NMDA诱导的神经细胞损害具有显著保护作用,结果详见表2。

表 2 丹参酮对 NMDA 诱导 PC12 细胞钙超载损伤的保护作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Con ($\mu\text{g}/\text{m l}$)	MTT (OD)	LDH ($\text{U} \cdot \text{m l}^{-1}$)	Ca ($\text{m m o l} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control		0.34 ± 0.02	78.8 ± 4.33	1.45 ± 0.09
Model		0.27 ± 0.03 ^{▲▲}	136.8 ± 2.41 ^{▲▲}	2.54 ± 0.06 ^{▲▲}
TAN	50	0.44 ± 0.04 ^{**}	96.5 ± 1.89 ^{**}	0.53 ± 0.02 ^{**}
TAN	12.5	0.40 ± 0.04 ^{**}	116.5 ± 3.61 ^{**}	0.68 ± 0.03 ^{**}
TAN	3.125	0.40 ± 0.02 ^{**}	119.7 ± 4.77 ^{**}	0.81 ± 0.03 ^{**}
TAN	0.78	0.33 ± 0.04 ^{**}	91.8 ± 2.43 ^{**}	0.75 ± 0.03 ^{**}
MEC	100	0.34 ± 0.09 ^{**}	109.1 ± 2.76 ^{**}	0.38 ± 0.02 ^{**}
MEC	6.25	0.50 ± 0.29 ^{**}	78.7 ± 4.71 ^{**}	0.08 ± 0.02 ^{**}

Compared with control group: ^{▲▲} P < 0.01, Compared with model group: ^{**} P < 0.01

4 讨论

实验所用细胞模型均属药物诱导的钙超载损伤模型。过量 KCl 可使细胞去极化, 开放电压依赖性钙通道 (VDC) 引起细胞内钙超载。NMDA 通过作用于突触后神经元的相应受体, 激活受体门控性钙通道 (RGC) 引起胞内钙超载。胞内钙超载继发性引起线粒体中毒, 细胞能量代谢障碍; 胞膜磷脂酶 A₂ 激活, 大量脂氧化物产生增加; 核酸酶、蛋白酶激活蛋白质及核酸等大分子物质降解; 内源性兴奋性氨基酸 (EAA) 释放, 加重神经毒性, 导致细胞死亡。

PC12 细胞具备神经细胞的功能, 如在神经生长因子的作用下可分化出神经轴突, 同时也具有肿瘤细胞无限传代的特点, 适宜于进行分析药物作用和探寻神经细胞功能等研究。实验发现丹参酮对上述两种胞内钙超载所致 PC12 细胞损伤均有显著保护作用, MTT 法检测存活细胞数量增加, 胞浆内 LDH 渗漏减少。从钙离子浓度来看, 模型组较正常组显著增加, 加药保护后, 胞浆内钙离子浓度明显降低。丹参酮 0.78~50 $\mu\text{g} \cdot \text{m l}^{-1}$ 对 KCl 和 NMDA 型钙超载损伤的保护作用一致, 且药物保护作用与给药剂量间无显著相关性。

我们过去的研究发现丹参酮对缺氧、氧自由基及 NO 所致神经细胞损伤有很好的保护作用^[3]。文献也报道丹参注射液可清除 Fe²⁺ - H₂O₂ 系统产生的 65% 羟自由基和黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统产生的 100% 氧自由基^[4]。在离体兔心灌

流液中加入丹参注射液, 可有效清除心肌缺血再灌注产生的氧自由基^[5]。丹参酮中主要有效成分丹参酮 II A-磺酸钠可抑制钙超载过程中大量 Ca²⁺ 内流^[6]。所以, 丹参酮除通过自身化学结构还原性发挥抗缺血、抗氧自由基损伤及抑制 NO 产生外, 通过对不同类型的钙通道的调控作用, 丹参酮阻断了缺血损伤过程中钙超载的继发环节, 从而维持细胞内外生物膜的完整稳态。

参考文献

- 1 余传隆, 黄泰康, 丁志遵, 等. 中药辞海, 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 1207.
- 2 杜冠华, 张均田. 丹酚酸 A 对小鼠脑缺血再灌注所致学习记忆功能障碍的改善作用及作用机制. 药理学学报, 1995, 30(3): 184.
- 3 何丽娜, 何素冰, 杨军, 等. 丹参酮对原代大鼠神经细胞缺血性损伤的保护作用. 中国药理学通报, 2001, 17(2): 214.
- 4 杨卫东, 朱鸣泉, 赵保路. 丹参的氧自由基清除作用. 中国药理学通报, 1990, 6(2): 118.
- 5 马兰英, 陈伟. 中药抗氧化剂丹参的研究和应用前景. 中草药, 1999, 30(5): 340.
- 6 焦选茂, 周同庆, 刘树森, 等. 丹参酮 II A-磺酸钠对鼠肝线粒体功能的影响. 生物化学杂志, 1995, 11(3): 292.