

## 突变型人胰高血糖素样肽-1 对神经细胞损伤的保护

张蓝<sup>a</sup>, 孙中伟<sup>a</sup>, 黄刚<sup>a</sup>, 黄静<sup>b</sup>, 孟博<sup>a</sup>, 徐敏华<sup>a\*</sup> (华东师范大学, a.脑功能基因组学教育部重点实验室, 上海市脑功能基因组学重点实验室; b.生命科学学院, 上海 200062)

**摘要:** 目的 研究突变型人胰高血糖素样肽-1(mutated human glucagon-like peptide-1, mGLP-1)对谷氨酸诱导的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞损伤的影响。方法 环磷酸腺苷(cAMP)试剂盒检测细胞内 cAMP 含量, 比较 mGLP-1 和天然人胰高血糖素样肽-1 (natural human glucagon-like peptide-1, nGLP-1)与 GLP-1 受体结合的能力; 以谷氨酸诱导 SH-SY5Y 细胞损伤, 同时用 mGLP-1 处理 SH-SY5Y 细胞, 采用 MTT 法检测细胞存活率; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测细胞 LDH 的释放量; DAPI 染色法观察细胞凋亡形态学特征; 钙流法检测胞内钙离子浓度变化; 通过检测丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、总谷胱甘肽(total GS)含量的变化判断细胞氧化损伤程度。结果 mGLP-1 与 nGLP-1 类似, 都能提高细胞内 cAMP 水平; mGLP-1 能缓解谷氨酸诱导的细胞损伤, 增加细胞存活率, 降低 LDH 释放量; mGLP-1 对谷氨酸导致的细胞内钙离子变化没有修复作用; mGLP-1 能抑制氧化损伤指标 MDA 含量升高, 促进抗氧化系统指标 SOD 活性增强和 total GS 含量增加。结论 mGLP-1 可导致细胞内 cAMP 含量增加。mGLP-1 对谷氨酸所致神经细胞损伤具有保护作用, 这可能是 mGLP-1 通过对神经细胞的抗氧化损伤作用实现的, 而不是改善谷氨酸导致的钙稳态失衡。mGLP-1 的保护作用与 nGLP-1 类似, 而 mGLP-1 在体内稳定性更强, 半衰期更长; 提示 mGLP-1 可能对相关神经退行性疾病的治具有更佳潜在价值。

**关键词:** 谷氨酸中毒; 突变型人胰高血糖素样肽-1; 胞内钙离子; 氧化损伤; 神经母细胞瘤细胞

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)03-0185-07

## Mutated Recombinant Human Glucagon-like Peptide-1 Protects SH-SY5Y Cells from Apoptosis Induced by Glutamate

ZHANG Lan<sup>a</sup>, SUN Zhongwei<sup>a</sup>, HUANG Gang<sup>a</sup>, HUANG Jing<sup>b</sup>, MENG Bo<sup>a</sup>, XU Minhua<sup>a\*</sup> (East China Normal University, a.Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics; b.School of Life Science, Shanghai 200062, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effects of mutated recombinant human glucagon-like peptide-1(mGLP-1) on glutamate-induced SH-SY5Y cell apoptosis. **METHODS** A cyclic adenosine monophosphate (cAMP) kit was selected for assaying intracellular cAMP content. MTT assay was applied to detect the viability of SH-SY5Y cells exposed to glutamate or /and mGLP-1. Lactate dehydrogenase (LDH) release was measured to detect glutamate-induced cytotoxicity. Apoptosis morphological identification was evaluated with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear staining. The cytosolic calcium concentration was tested by calcium influx assay. The oxidative damage was estimated by measuring the malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity and total glutathione (total GS) level. **RESULTS** mGLP-1 could induce the increase of intracellular cAMP content. Glutamate cytotoxicity presented that low cell viability, high LDH release and increased cell apoptosis. After treatment with mGLP-1, glutamate-induced toxicity would be partially relieved. It was evident that mGLP-1 could decrease MDA content, increase SOD activity and total GS level, but could not change calcium concentration. **CONCLUSION** These data indicate that mGLP-1 has protective effects on glutamate-induced SH-SY5Y cell apoptosis through rescuing oxidative damage. It is suggested that mGLP-1 may have better potential therapeutic value in the treatment of neurodegenerative diseases since mGLP-1 presents a longer half-life than natural GLP-1.

**KEY WORDS:** glutamate toxicity; mutated recombinant human glucagon-like peptide-1; cytosolic calcium; oxidative damage; SH-SY5Y cells

人胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)是由肠道 L 细胞分泌的一种 31 个氨基酸的

多肽, 其生理功能主要是调节胰岛细胞依赖于葡萄糖的胰岛素分泌及维持体内葡萄糖的稳态<sup>[1]</sup>, 同时

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870790)

作者简介: 张蓝, 女, 硕士生 Tel: (021)62232919  
(021)62232747 E-mail: mhxu@brain.ecnu.edu.cn

E-mail: zhanglan.ala@gmail.com

\*通信作者: 徐敏华, 女, 硕士, 讲师

Tel:

还具有抑制食欲及延缓胃的排空<sup>[2-3]</sup>、舒张血管<sup>[4]</sup>、降压及内皮保护<sup>[5]</sup>等功能,这些作用使 GLP-1 成为治疗 II 型糖尿病的候选药物<sup>[6]</sup>。研究发现, GLP-1 的受体是 G 蛋白偶联受体中分泌型受体家族的一员,能激活 cAMP 第二信使通路。近年来有报道称, GLP-1 受体在人和啮齿类动物的脑中有广泛表达<sup>[7]</sup>,该受体激活后可介导多种神经保护作用,提示 GLP-1 可能在中枢神经系统中也有重要作用。进一步研究发现, GLP-1 与受体结合后能引发一系列信号转导,从而剂量依赖性地缓解 beta 淀粉样蛋白 A $\beta_{1-42}$  和 Fe<sup>2+</sup>诱导的神经细胞死亡<sup>[8-9]</sup>,且 GLP-1 能降低啮齿类动物脑中 A $\beta$  的沉积从而发挥神经细胞保护作用<sup>[10]</sup>。由于 A $\beta$  沉积是导致阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要原因之一,提示 GLP-1 在神经退行性疾病如 AD 的干预过程中具有潜在的作用。

然而,天然 GLP-1(natural GLP-1, nGLP-1)在动物体内的半衰期不足 2 min,其 N 端的第二位丙氨酸容易被二肽酰基肽酶(dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV)催化水解<sup>[11]</sup>,形成 GLP-1(9-36)NH<sub>2</sub>,失去活性并转变成 GLP-1 受体的天然拮抗剂,严重阻碍 GLP-1 的临床应用。为了克服 nGLP-1 易被降解的缺陷,笔者所在课题组曾利用定点突变和基因重组的方法,建立了一个 nGLP-1 突变库,并从中筛选出了突变型人胰高血糖素样肽(mutated human glucagon-like peptide-1, mGLP-1)。该突变型分子的结构式为: GLP-1(7-37)-Xaa38,其中 Xaa38 是 Cys, Ala, Gly, His, Ser 和 Thr 中的任何一个氨基酸。前期研究发现, mGLP-1 能降低血糖,同时可刺激胰岛素连续分泌长达 16 h,表明 mGLP-1 具有比 nGLP-1 更长的半衰期,且活性与 nGLP-1 相当。笔者采用基因工程方法制备获得的 mGLP-1,具有提纯工艺简单、成本低、易于大规模表达等优点<sup>[12]</sup>。本实验选用 SH-SY5Y 细胞谷氨酸损伤模型,旨在研究这种具有较长半衰期的 mGLP-1 对谷氨酸诱导神经细胞损伤的保护作用,并比较其与 nGLP-1 作用效果的异同,为探讨 mGLP-1 是否具有干预神经退行性疾病的作用及可能的分子机制提供实验基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药物与试剂

mGLP-1 由本课题组按前述方法制备<sup>[12]</sup>; nGLP-1 购自杭州中肽生化有限公司; Dulbecco's

Modified Eagle Medium(DMEM)培养基、青霉素、链霉素购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Biological Industries 公司;噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT)购自 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性测定试剂盒购自 Promega 公司;4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)染色液、抗荧光淬灭封片液和总谷胱甘肽(total glutathione, total GS)检测试剂盒购自碧云天公司;环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)免疫测定试剂盒购自 Millipore 公司;Fluo-4 荧光染料、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自日本同仁化学公司。

### 1.2 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱购自 Thermo Life sciences 公司; Flexstation TM 购自 Molecular Device 公司; Genios 多功能酶标仪购自 TECAN 公司; ECLIPSE TE2000-S 荧光显微镜购自 Nikon 公司;紫外分光光度计购自 Biochrom 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞购自 ATCC(USA),常规接种于含 10%胎牛血清、1%青霉素及 1%链霉素的 DMEM 培养基中,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 2.2 细胞内第二信使 cAMP 含量检测

SH-SY5Y 细胞按  $1.5 \times 10^6$  个·mL<sup>-1</sup> 密度接种于 96 孔培养板,每孔 100  $\mu$ L,细胞贴壁后吸净培养液,血清饥饿 2 h 后分组进行药物处理,继续培养 30 min,去除上清,每孔加入 100  $\mu$ L 预冷的裂解液,室温放置 10 min。每孔转移 50  $\mu$ L 样品到抗体板中,参照 cAMP 免疫测定试剂盒,每孔加入 25  $\mu$ L cAMP Alkaline Phosphatase Conjugate Tracer,再加入 50  $\mu$ L 兔抗 cAMP 抗体,密封抗体板,室温摇床上 30 min,去除板中液体, Wash Buffer 清洗 5 次,每孔加入 100  $\mu$ L Alkaline Phosphatase Substrate,密封抗体板,室温摇床上 30 min。酶标仪免疫化学发光法读值,每孔读值时间 1 s。

### 2.3 谷氨酸诱导细胞损伤模型的制备及药物处理

实验组分为①对照组;②谷氨酸组:培养基中加入终浓度为 40 mmol·L<sup>-1</sup> 的谷氨酸;③mGLP-1 组:培养基中加入终浓度为 100  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> 的 mGLP-1;④nGLP-1 组:培养基中加入终浓度为 100  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> 的 nGLP-1;⑤谷氨酸+mGLP-1 组:培养基中加入

终浓度为  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 mGLP-1 和终浓度为  $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的谷氨酸; ⑥谷氨酸+ nGLP-1 组: 培养基中加入终浓度为  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 nGLP-1 和终浓度为  $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的谷氨酸。

## 2.4 细胞存活率和培养上清 LDH 活性测定

将密度为  $1\times 10^5$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  细胞接种于 96 孔培养板, 每孔  $100 \mu\text{L}$ , 按“2.3”项下分别处理 24 h 后, 将 MTT( $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $10 \mu\text{L}$  加入细胞中孵育 4 h, 终止培养后, 吸去孔内培养液, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  DMSO 振荡溶解 5 min, 多功能酶标仪测定  $532 \text{ nm}$  波长处吸光度(A)值。细胞存活率(%)=实验组  $A_{532 \text{ nm}}$ /对照组平均  $A_{532 \text{ nm}}\times 100\%$ 。LDH 活性测定时, 药物处理培养 24 h 后取出培养板,  $4^\circ\text{C}$  离心( $1500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ )4 min, 取上清液  $50 \mu\text{L}$ , 按照 LDH 定量检测试剂盒说明书方法操作, 多功能酶标仪测定  $490 \text{ nm}$  波长处吸光度(A)值。LDH 释放量(%)=实验组  $A_{490 \text{ nm}}$ /对照组平均  $A_{490 \text{ nm}}\times 100\%$ 。

## 2.5 DAPI 荧光染色观察细胞核形态变化

将密度为  $1\times 10^5$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  细胞接种于 24 孔培养板, 每孔  $300 \mu\text{L}$ , 同时放入包被了多聚赖氨酸的盖玻片。48 h 后分组进行药物处理, 孵育 24 h 后取出培养板, 吸尽培养液, 加入甲醇-冰乙酸(3:1)固定液, 固定 10 min, PBS 清洗 2 次, 每次 3 min。加入 DAPI 染色液,  $37^\circ\text{C}$  避光染色 5 min。PBS 清洗 2 次, 每次 3 min。加入抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的爬片, 避免气泡。荧光显微镜下观察细胞核形态, 荧光激发波长  $350 \text{ nm}$ , 发射波长  $460 \text{ nm}$ 。

## 2.6 细胞内钙离子浓度测定

按  $1\times 10^5$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  密度将细胞接种于 96 孔黑板中, 细胞贴壁后分组进行药物处理, 孵育 24 h 后用 Hank's 溶液洗 2 次, 加入 Fluo-4 荧光染料, 终浓度  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 培养 40 min; Hank's 溶液洗 2 次, 继续培养 40 min, 取出培养板。用 Flexstation 的 Endpoint Data 软件检测钙离子荧光值, 激发波长  $485 \text{ nm}$ , 发射波长  $525 \text{ nm}$ 。

## 2.7 MDA 含量和 SOD 活性的测定

细胞按  $5\times 10^4$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  密度接种于 6 孔培养板, 每孔  $1 \text{ mL}$ , 细胞贴壁后分组进行药物处理, 孵育 24 h 后, 分别取细胞上清液, 按照 MDA 含量试剂盒说明书方法操作, 紫外分光光度计测定  $532 \text{ nm}$  波长处吸光度(A)值, MDA 含量(%)=实验组  $A_{532 \text{ nm}}$ /对照组平均  $A_{532 \text{ nm}}\times 100\%$ 。按照 SOD 活

性试剂盒说明书方法操作, 多功能酶标仪测定  $450 \text{ nm}$  波长处吸光度(A)值, SOD 活性(%)=实验组  $A_{450 \text{ nm}}$ /对照组平均  $A_{450 \text{ nm}}\times 100\%$ 。

## 2.8 Total GS 含量的测定

按  $5\times 10^4$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  密度将细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔  $1 \text{ mL}$ , 细胞贴壁后分组进行药物处理, 孵育 24 h 后, 按照谷胱甘肽总量检测试剂盒说明书方法检测胞内 total GS 含量, 于多功能酶标仪测定吸光度(A)值(波长  $412 \text{ nm}$ )。Total GS 含量包括还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)的含量。GS 含量(%)=实验组  $A_{412 \text{ nm}}$ /对照组平均  $A_{412 \text{ nm}}\times 100\%$ 。

## 2.9 统计学处理

上述各实验均重复 3 次。实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用 Sigma Plot 10.0 统计软件(Systat Software Inc.)对数据进行 One-Way ANOVA 分析, Newman-Keuls test 检验,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 mGLP-1 能增加 SH-SY5Y 细胞内 cAMP 的浓度

GLP-1 受体是 B 族 G 蛋白偶联受体, 广泛分布于心、脑、肾及胃肠道等器官。研究发现, GLP-1 与其受体结合后, 能激活 cAMP 通路, 提高细胞内 cAMP 的水平。本实验证明, mGLP-1 作为 GLP-1 的一个突变体也保持了该特性, mGLP-1 同样能够增加细胞内 cAMP 的浓度( $P<0.05$ ), 结果见图 1。提示 mGLP-1 同样能与神经细胞的 GLP-1 受体结合, 激活 cAMP 通路, 使神经细胞内 cAMP 水平提高。

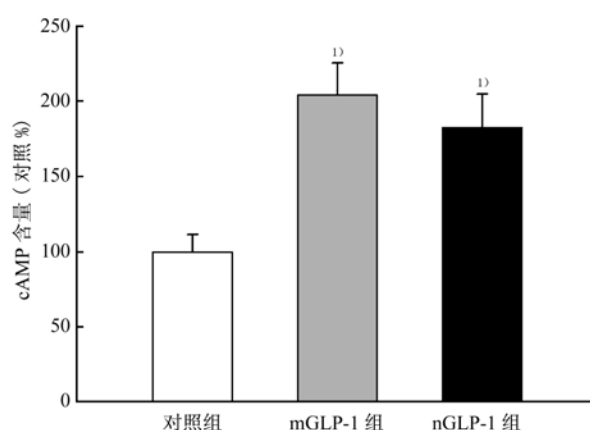


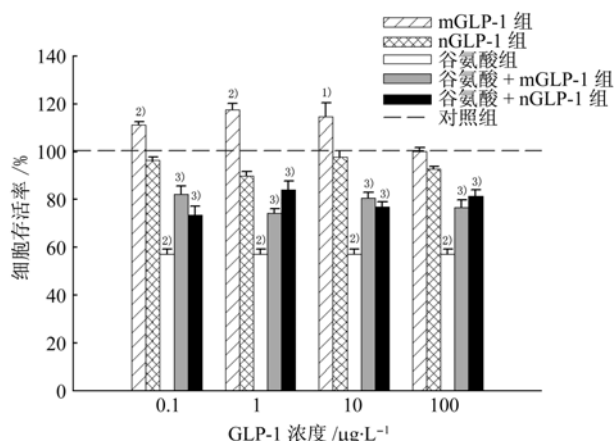
图 1 mGLP-1 和 nGLP-1 提高 SH-SY5Y 细胞内 cAMP 水平与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$

Fig 1 mGLP-1 and nGLP-1 increased cAMP content in SH-SY5Y cells

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$

## 3.2 不同浓度 mGLP-1 对谷氨酸处理前后 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

**3.2.1 MTT 法检测细胞存活率** 笔者前期的实验结果发现<sup>[13]</sup>, 40 mmol·L<sup>-1</sup> 谷氨酸处理 24 h 后能使 SH-SY5Y 细胞存活率显著下降。而本研究中终浓度分别为 0.1, 1, 10, 100 μg·L<sup>-1</sup> 的 mGLP-1 和 nGLP-1 均能显著缓解由谷氨酸引起的 SH-SY5Y 细胞损伤( $P<0.01$ ), 结果见图 2。为了排除在细胞无损伤时 mGLP-1 本身对细胞存活率的影响, 观察终浓度 0.1, 1, 10, 100 μg·L<sup>-1</sup> 的 mGLP-1 和 nGLP-1 单独处理细胞 24 h 后细胞存活率的变化, 发现 100 μg·L<sup>-1</sup> 的 mGLP-1 和全部浓度的 nGLP-1 单独处理, 对细胞存活率无显著影响, 结果见图 2。因此, 后续实验中 mGLP-1 和 nGLP-1 的浓度均选取用单独处理时对细胞存活率无影响的 100 μg·L<sup>-1</sup> 浓度。



**图 2** 谷氨酸处理前后, 不同浓度的 mGLP-1 和 nGLP-1 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与谷氨酸组比较, <sup>3)</sup> $P<0.01$

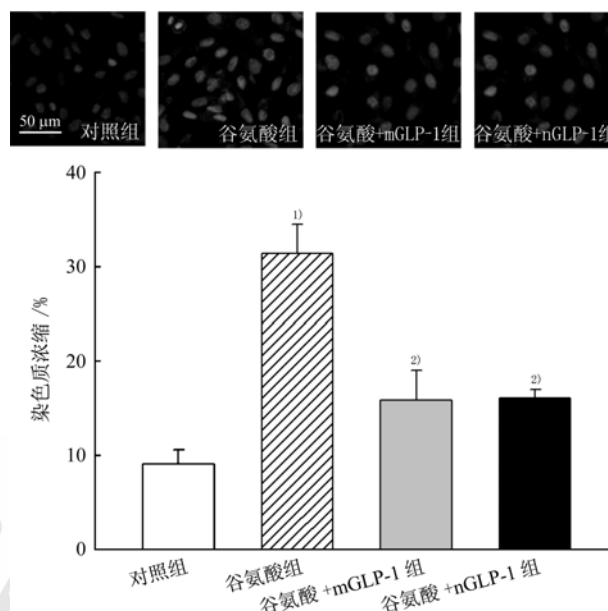
**Fig 2** SH-SY5Y cells treated with mGLP-1 and nGLP-1 at indicated doses for 24 h in the presence/absence of 40 mmol·L<sup>-1</sup> glutamate

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with glutamate group, <sup>3)</sup> $P<0.01$

**3.2.2 mGLP-1 能缓解谷氨酸引起的 SH-SY5Y 细胞 LDH 释放量增加** 100 μg·L<sup>-1</sup> 的 mGLP-1 单独处理 SH-SY5Y 细胞的作用效果与 nGLP-1 相似, 对细胞 LDH 的释放量无显著性影响, 但 mGLP-1 能显著缓解由谷氨酸引起的细胞 LDH 释放量的增加( $P<0.05$ ), 结果见表 1。

**3.2.3 mGLP-1 能改善谷氨酸诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡形态学改变** DAPI 处理 SH-SY5Y 细胞后, 在荧光显微镜下, 可见正常对照组细胞核呈均匀蓝色荧光; 谷氨酸(40 mmol·L<sup>-1</sup>)组出现大量凋亡细胞, 核染色质聚集、核碎裂、胞质浓缩, 出现凋

亡小体; mGLP-1(100 μg·L<sup>-1</sup>)+谷氨酸(40 mmol·L<sup>-1</sup>)组与 nGLP-1(100 μg·L<sup>-1</sup>)+谷氨酸(40 mmol·L<sup>-1</sup>)组, 可见少量凋亡细胞, 而多数细胞呈均匀弥散蓝色荧光, 结果见图 3。由此表明, mGLP-1 和 nGLP-1 均能较好的抑制由谷氨酸诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的形态学改变。



**图 3** 荧光染色法观察 SH-SY5Y 细胞凋亡形态学特征

与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与谷氨酸组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$

**Fig 3** Nuclear morphological assessment of SH-SY5Y cells by fluorescence microscopy.

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with glutamate group, <sup>2)</sup> $P<0.05$

## 3.3 mGLP-1 对谷氨酸导致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

**3.3.1 mGLP-1 未能改善谷氨酸引起的胞内钙离子浓度升高** 经谷氨酸(40 mmol·L<sup>-1</sup>)处理 24 h 后, SH-SY5Y 细胞内的钙离子显著增多, 100 μg·L<sup>-1</sup> 的 mGLP-1/nGLP-1 单独处理 24 h, 细胞内钙离子浓度未发生变化; 100 μg·L<sup>-1</sup> 的 mGLP-1/nGLP-1 与 40 mmol·L<sup>-1</sup> 的谷氨酸共同处理组, 与谷氨酸单独处理组相比, 没有显著性差异。结果表明 mGLP-1 未能缓解由谷氨酸引起的神经细胞内钙离子增多, 结果见表 1。

**3.3.2 mGLP-1 对细胞(抗)氧化损伤系统的影响** SOD 是生物体内有效清除活性氧的内源性抗氧化酶, 可有效地清除超氧阴离子自由基, 从而进一步阻断毒性更强的羟自由基产生。MDA 水平变化可间接反映体内自由基的生成量和物质的代谢情况。SOD 和 MDA 常常用来反映氧自由基生成及

脂质过氧化反应程度的指标。与对照组相比, 谷氨酸处理组细胞培养上清 SOD 活性明显降低( $P<0.01$ ), MDA 含量显著增加( $P<0.01$ )。与谷氨酸处理组相比, mGLP-1( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理组细胞上清 SOD 活性明显升高( $P<0.01$ ), MDA 含量显著降低( $P<0.01$ )。同浓度的 nGLP-1 和 mGLP-1 比较, 对由谷氨酸引起的 SOD 活性的下降无显著性影响, 但对 MDA 含量的升高有显著的抑制作用, 结果见表 1。

表 1 mGLP-1 和 nGLP-1 对谷氨酸致人神经母细胞瘤细胞 LDH 释放量、游离钙离子浓度变化、MDA 含量, SOD 活性和 total GS 含量的影响( $n=4$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 Effects of mGLP-1 and nGLP-1 on LDH release, cytosolic calcium concentration, MDA content, SOD activity and total GS level in SH-SY5Y cells injured by glutamate ( $n=4$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别          | LDH 释放量/%                     | 胞内钙离子浓度/%                      | MDA 含量/%                      | SOD 活性/%                      | total GS 含量/%                 |
|--------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组          | 100.0 $\pm$ 3.5               | 100.0 $\pm$ 35.0               | 100.0 $\pm$ 1.5               | 100.0 $\pm$ 1.1               | 100.0 $\pm$ 2.2               |
| 谷氨酸组         | 147.0 $\pm$ 4.7 <sup>2)</sup> | 381.4 $\pm$ 16.5 <sup>2)</sup> | 110.8 $\pm$ 0.6 <sup>2)</sup> | 89.1 $\pm$ 0.7 <sup>2)</sup>  | 88.3 $\pm$ 1.4 <sup>2)</sup>  |
| mGLP-1 组     | 104.0 $\pm$ 2.8               | 85.2 $\pm$ 14.3                | 94.6 $\pm$ 0.8 <sup>1)</sup>  | 106.0 $\pm$ 0.8 <sup>2)</sup> | 125.2 $\pm$ 1.8 <sup>2)</sup> |
| nGLP-1 组     | 101.8 $\pm$ 3.6               | 72.8 $\pm$ 13.0                | 95.3 $\pm$ 1.2 <sup>1)</sup>  | 92.4 $\pm$ 0.4 <sup>2)</sup>  | 140.5 $\pm$ 1.4 <sup>2)</sup> |
| 谷氨酸+mGLP-1 组 | 125.2 $\pm$ 4.7 <sup>3)</sup> | 341.0 $\pm$ 0.9                | 100.0 $\pm$ 0.6 <sup>4)</sup> | 100.3 $\pm$ 1.1 <sup>4)</sup> | 114.8 $\pm$ 4.4 <sup>4)</sup> |
| 谷氨酸+nGLP-1 组 | 110.9 $\pm$ 5.6 <sup>3)</sup> | 359.3 $\pm$ 9.6                | 107.4 $\pm$ 1.0 <sup>3)</sup> | 91.4 $\pm$ 1.7                | 110.2 $\pm$ 1.7 <sup>4)</sup> |

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与谷氨酸组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with glutamate group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$

#### 4 讨论

谷氨酸是中枢神经系统内最重要的兴奋性神经递质之一, 在兴奋性突触传递和突触可塑性中发挥着关键作用<sup>[14-15]</sup>。在正常情况下, 谷氨酸的释放、摄取和重吸收保持着动态平衡, 而当其过度释放或发生摄取障碍时, 谷氨酸大量积聚, 脑内浓度急剧升高, 过度激活其受体而引起一系列病理反应, 导致神经细胞凋亡或变性坏死。研究证明<sup>[16-18]</sup>, 脑缺血损伤和许多中枢神经系统疾病如老年性痴呆、血管性痴呆等均存在谷氨酸含量过高现象, 因此, 常利用谷氨酸损伤细胞的方法来探讨相关疾病的发病机理或探讨相关药物的药效。

谷氨酸对培养神经细胞的神经毒性作用机制可能包括两方面, 一是作用于细胞膜上的 NMDA 受体, 触发钙离子在细胞膜内外分布的紊乱, 而胞内钙超载的一个重要后果是引起细胞内自由基的增加, 脂质过氧化程度也随之增高, 进而造成细胞损伤<sup>[19-20]</sup>; 二是激活细胞膜上的谷氨酸/胱氨酸转运体, 使其结构或功能发生改变而导致细胞间隙的谷氨酸浓度急剧升高, 抑制谷氨酸/胱氨酸转运体对胱氨酸的摄取, 介导谷胱甘肽耗竭、氧自由基升高、胞内钙升高、线粒体损伤、细胞色素 c 释放等神经细胞毒环节, 最终诱导细胞凋亡<sup>[21-24]</sup>。

还原型谷胱甘肽(GSH)是一种非酶抗氧化物, 可保护细胞免受氧化攻击, 其含量是表明细胞抗氧化能力的一个重要指标。与对照组相比, 谷氨酸处理组 total GS 含量显著降低( $P<0.01$ ); 而与谷氨酸处理组相比, mGLP-1 ( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )与 nGLP-1( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理组, total GS 的含量均显著升高, 结果见表 1。结果显示 mGLP-1 能改善谷氨酸致细胞的氧化损伤, 有一定抗氧化作用。

笔者所在课题组前期工作结果已发现 40, 60, 80  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的谷氨酸分别处理 SH-SY5Y 细胞 16, 24, 32 h 后均可诱导细胞存活率下降。本实验再次证实, 经 40  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  谷氨酸处理后, 细胞存活率、total GS 水平和 SOD 活性降低, LDH 释放量、细胞凋亡率、胞内钙离子浓度和 MDA 含量增加, 推测其引起细胞存活率下降的原因可能是一种兴奋性或氧化性毒性所造成的细胞损伤。已有文献报道, nGLP-1 对细胞具有保护作用<sup>[20]</sup>, 其机制可能是 nGLP-1 通过 G 蛋白偶联受体(GPCR)发挥作用。nGLP-1 与受体结合, 激活 cAMP 通路, 提高 cAMP 水平, 进而激活下游信号通路, 最终起到保护作用<sup>[25-26]</sup>。

本实验中使用的 mGLP-1 是 nGLP-1 的一个突变体, 由 32 个氨基酸组成, 结构分析显示在 mGLP-1 的 C 端有一个 Cys 突变, 前期研究已证明 mGLP-1 能够降低血糖, 同时能够刺激胰岛素连续分泌长达 16 h<sup>[12]</sup>。笔者前期的研究也已证实这种 mGLP-1 通过与 SH-SY5Y 细胞中 nGLP-1 的受体结合, 调节由 Beta 淀粉样蛋白(A $\beta$ <sub>1-42</sub>)引起的凋亡因子 TP53 和 Bax 表达量的改变, 并减缓由于内质网释放钙离子造成的细胞质内钙离子增多<sup>[27]</sup>。本实验首先检测了该 mGLP-1 对细胞内 cAMP 浓度的

影响,结果显示 mGLP-1 和 nGLP-1 均能显著增加细胞质内 cAMP 浓度,且 mGLP-1 比 nGLP-1 能够激活更多的 cAMP(但无显著性差异),证明突变型的 mGLP-1 同样能结合神经细胞的 GLP-1 受体,激活 cAMP 通路。

本研究发现, mGLP-1 可能通过抑制细胞脂质过氧化,减少脂质-DNA 加成物的产生,阻止细胞存活率的降低,最终缓解了谷氨酸对细胞脂质过氧化程度的改变,增强了细胞的防御系统,进而抵抗了谷氨酸对细胞 total GS 总量的改变以及 SOD 活性的改变(已有研究报道 nGLP-1 能够通过减少氧化损伤来保护神经细胞<sup>[8-9]</sup>,具体的机制尚不清楚)。然而, mGLP-1 不能缓解谷氨酸 24 h 内对细胞内钙离子浓度的影响,而笔者之前的研究提示 mGLP-1 可以缓解由 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 诱导神经细胞损伤引起的内质网释放钙离子增多<sup>[27]</sup>,故推测 mGLP-1 对谷氨酸和 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 诱导神经细胞损伤的保护作用的机制不完全相同。

综上所述, mGLP-1 对谷氨酸诱导神经细胞的损伤具有保护作用,且作用效果与 nGLP-1 相类似,该作用可能与其具有抑制或缓解由兴奋性毒性引起的氧化损伤作用有关。本研究为抗氧化性神经毒性的药物研究提供了实验依据,为谷氨酸介导的神经退行性疾病的预防和治疗提供了新的思路。与 nGLP-1 相比,半衰期较长的 mGLP-1 可能具有更好的治疗相关神经退行性疾病的潜在价值。

## REFERENCES

- [1] FEHMANN H C, HABENER J F. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells [J]. *Endocrinology*, 1992, 130(1): 159-166.
- [2] ROTONDO A, AMATO A, LENTINI L, et al. Glucagon-like peptide-1 relaxes gastric antrum through nitric oxide in mice [J]. *Peptides*, 2011, 32(1): 60-64.
- [3] GUTZWILLER J P, GOKE B, DREWE J, et al. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans [J]. *Gut*, 1999, 44(1): 81-86.
- [4] RICHTER G, FEDDERSEN O, WAGNER U, et al. GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery [J]. *Am J Physiol*, 1993, 265(4 Pt 1): L374-381.
- [5] BAN K, NOYAN-ASHRAF M H, HOEFER J, et al. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways [J]. *Circulation*, 2008, 117(18): 2340-2350.
- [6] NAUCK M A, VARDARLI I, DEACON C F, et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(1): 10-18.

- [7] PERRY T, GREIG N H. The glucagon-like peptides: a new genre in therapeutic targets for intervention in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2002, 4(6): 487-496.
- [8] PERRY T, LAHIRI DK, SAMBAMURTI K, et al. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A $\beta$ ) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A $\beta$  and iron [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 72(5): 603-612.
- [9] GILMAN C P, PERRY T, FURUKAWA K, et al. Glucagon-like peptide 1 modulates calcium responses to glutamate and membrane depolarization in hippocampal neurons [J]. *J Neurochem*, 2003, 87(5): 1137-1144.
- [10] HOLSCHER C. The role of GLP-1 in neuronal activity and neurodegeneration [J]. *Vitam Horm*, 2010, (84): 331-354.
- [11] GREEN B D, LIU H K, MCCLUSKEY J T, et al. Function of a long-term, GLP-1-treated, insulin-secreting cell line is improved by preventing DPP IV-mediated degradation of GLP-1 [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2005, 7(5): 563-569.
- [12] HUANG J, XU J, ZUO Y, et al. Expression and bioactivities of recombinant human glucagon-like peptide-1 [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2006, 26(1): 50-55.
- [13] SUN Z W, ZHANG L, ZHU S J, et al. Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage [J]. *Neurosci Bull*, 2010, 26(1): 8-16.
- [14] COLLINGRIDGE G L, LESTER R A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system [J]. *Pharmacol Rev*, 1989, 41(2): 143-210.
- [15] HEADLEY P M, GRILLNER S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1990, 11(5): 205-211.
- [16] DOBLE A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 1999, 81(3): 163-221.
- [17] HYND M R, SCOTT H L, DODD P R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(5): 583-595.
- [18] LU S, LU C, HAN Q, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation [J]. *Toxicology*, 2011, 279(1-3): 189-195.
- [19] CHOI D W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death [J]. *Trends Neurosci*, 1995, 18(2): 58-60.
- [20] LEON R, WU H, JIN Y, et al. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(5): 1185-1194.
- [21] ANKARCORONA M, DYPBUKT J M, BONFOCO E, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function [J]. *Neuron*, 1995, 15(4): 961-973.
- [22] MAWATARI K, YASUI Y, SUGITANI K, et al. Reactive oxygen species involved in the glutamate toxicity of C6 glioma cells via xc antiporter system [J]. *Neuroscience*, 1996, 73(1): 201-208.
- [23] PEREIRA C M, OLIVEIRA C R. Glutamate toxicity on a PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress [J]. *Free Radica Biol Med*, 1997, 23(4): 637-647.
- [24] SCHUBERT D, PIASECKI D. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(19): 7455-7462.
- [25] MACDONALD P E, EL-KHOLY W, RIEDEL M J, et al. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated

insulin secretion [J]. Diabetes, 2002, 51 (Suppl 3): S434-442.

- [26] KIMURA R, OKOUCHI M, FUJIOKA H, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects against methylglyoxal-induced PC12 cell apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR/GCLc/redox signaling pathway [J]. Neuroscience, 2009, 162(4): 1212-1219.

- [27] QIN Z, SUN Z, HUANG J, et al. Mutated recombinant human glucagon-like peptide-1 protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by amyloid-beta peptide (1-42) [J]. Neurosci Lett, 2008, 444(3): 217-221.

收稿日期: 2011-06-15