

氨磷汀对氧糖剥夺引起的 PC12 细胞缺血再灌注损伤的保护作用研究 *

张 蕾¹ 刘爱秀² 王 强¹ 李 新¹ 贾 济¹ 王世全¹ 王百忍¹ 熊利泽^{1△}

(1 第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032 2 西安市第一医院麻醉科 陕西 西安 710002)

摘要 目的 研究氨磷汀对体外培养的神经元样细胞的缺血再灌注损伤的保护作用,为其最终用于临床脑缺血的治疗打下基础。**方法** 体外培养的 PC12 细胞氧糖剥夺 4h 后复氧复糖,给予不同浓度的氨磷汀处理,20h 后镜下观察细胞形态学变化,用 MTT 和 LDH 检测细胞活力和损伤情况,免疫荧光染色观察凋亡细胞,流式细胞仪计数凋亡细胞的比例。**结果** 高浓度氨磷汀对正常 PC12 细胞活力有抑制作用($P<0.05$),而低浓度则无。氨磷汀可以提高缺血再灌注损伤 PC12 细胞活力($P<0.05$),减少 LDH 释放($P<0.05$),保护细胞正常形态,抑制细胞凋亡($P<0.05$)。**结论** 氨磷汀对氧糖剥夺引起的神经元样细胞的缺血再灌注损伤具有保护作用。**关键词** 氨磷汀 脑缺血再灌注损伤 PC12 细胞 氧糖剥夺 凋亡
中图分类号 R 743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1110-04

Protection of Amifostine on Oxygen-glucose Deprivation-induced Ischemia Reperfusion Injury in PC12 Cells*

ZHANG Lei¹, LIU Ai-xiu², WANG Qiang¹, LI Xin¹, JIA Ji¹, WANG Shi-quan¹, WANG Bai-ren¹, XIONG Li-ze^{1△}

(1 Department of Anesthesiology, Xijing hospital, The Fourth Military Medical University, Xian 710032, China;

2 Department of Anesthesiology, Xi'an NO.1 Hospital, Xian 710002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of amifostine on the ischemia-reperfusion injury in neuron-like PC12 cells. **Methods:** PC12 cells were exposed to oxygen-glucose deprivation (OGD) for 4h followed by 20h reoxygenation. Various doses of amifostine were added into the medium. Cell morphological changes were observed under microscopy and cell viability and integrity were detected by MTT and LDH techniques. Cell apoptosis was detected by Tunel staining and flow cytometry. **Results:** High concentration of amifostine could inhibit PC12 cell viability ($P<0.05$). Amifostine attenuated the cell viability loss ($P<0.05$) and LDH leakage ($P<0.05$) induced by OGD, protected PC12 cell morphology and decreased cell apoptosis ($P<0.05$). **Conclusion:** The amifostine had a protective effect on the OGD-induced ischemia reperfusion in neuronal cells.

Key words: Cerebral ischemia reperfusion injury; PC12 cell; OGD; Amifostine; Apoptosis

Chinese Library Classification: R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1110-04

前言

每年全球有一千六百万人初发中风,其中五百七十万病人死亡^[1]。中风已经成为继肿瘤、心血管疾病后第三大致死性疾病^[2]。中风又可分为缺血性、出血性及混合性三类,其中缺血性脑病最为常见。目前,临床上对于中风的治疗主张在急性期给予溶栓治疗,但血液复流引起的脑缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury)成为了中风治疗的又一大难题。脑缺血再灌注损伤是缺血脑组织恢复血液灌注后,脑组织损伤反而加重的现象,表现为其神经损害体征和形态学改变会较单纯缺血更加明显,目前尚无有效的治疗药物^[3]。因此,对于治疗脑缺血再灌注损伤的方法以及药物的研究迫在眉睫。

氨磷汀(Amifostine),又名阿米福汀。是冷战期间由美国陆军 Walter Reed 研究所从四千多种化合物中筛选出的期望用于核战争抗辐射作用的细胞保护剂。1996 年氨磷汀由美国 FDA 批准正式上市应用于多种肿瘤化疗不良反应的预防,

是首个泛细胞保护剂^[4]。但其对神经细胞是否具有保护作用尚不清楚。PC12 细胞系来源于大鼠嗜铬细胞瘤细胞,其形态与功能与神经元相似。因此 PC12 细胞已被广泛运用于模拟神经系统疾病的体外研究^[5]。本实验通过体外培养 PC12 细胞氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD) 4h 后复氧复糖 20h 模拟神经细胞缺血再灌注损伤^[6],观察了氨磷汀是否有保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

大鼠嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞(购于中科院上海细胞所),氨磷汀(湖北葛店人福药业),Tunel 试剂盒(Roche 公司),LDH 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),DAPI 抗体(Abcam 公司),DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco 公司),0.25%胰蛋白酶链霉素混合液(HyClon 公司),四甲基偶氮唑盐 MTT 和二甲基亚砜(Sigma 公司);倒置相差显微镜(Olympus,日本)培养箱(Heraeus,德国)酶联免疫检测仪(Tecan,瑞士)。

* 基金项目 国家自然科学基金(30873326)和国家重点基金(30725039)资助项目

作者简介 张蕾(1984),女,陕西蒲城人,硕士研究生。研究方向 脑保护。电话:15029909019,Email:Jenlay12090@163.com

△通讯作者 熊利泽,教授,博士生导师,Email: LXiong@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-01-07 接受日期 2011-01-31)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 PC12 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清、100u/mL 青霉素和 100ug/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于恒温 37℃ 含 95% 空气、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。培养两天后选取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 氧糖剥夺模型的制备 为了使细胞模拟无氧无糖的环境,细胞培养液更换为无糖无血清的人工脑脊液 (ACSF),其成分为 (mmol/L) NaCl 143, KCl 5.4, MgSO₄ 1.0, NaH₂PO₄ 1.0, CaCl₂ 1.8, HEPES 2.4^[7]。然后将细胞置于密闭盒中冲以含 95%N₂、5% CO₂ 的混合气体,监测流出气体 O₂ 含量下降到 5% 以下时开始计时并将密闭盒置于 37℃ 培养 4h。

1.2.3 实验分组与药物治疗 (1) 不同浓度氨磷汀作用于正常 PC12 细胞 根据药物浓度分为对照组、0.25mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L、2mmol/L、5mmol/L 五组,用正常培养基将氨磷汀稀释并更换加入药物的细胞培养液培养 24h 后进行 MTT 检测。(2) 氨磷汀对氧糖剥夺 PC12 细胞的保护作用 实验分为 3 组①正常对照组 (Control 组):不进行氧糖剥夺,而是更换至无血清 DMEM 中正常培养 24h。②氧糖剥夺模型组 (OGD 组) 氧糖剥夺组细胞氧糖剥夺 4h 后更换至无血清 DMEM 中于正常培养箱培养 20h。③氨磷汀治疗组 (Amifostine 组)。氨磷汀治疗组细胞氧糖剥夺 4h 后更换至含 0.02mmol/L、0.2mmol/L、2mmol/L 氨磷汀的无血清 DMEM 中复氧复糖 20h。

1.2.4 噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力 将细胞接种于 96 孔板中,待各种处理后使用 PBS 清洗各孔后分别加入含 0.5mg/ml MTT 的细胞培养液 37℃ 反应,3h 后吸取上清每孔再加入 150ul DMSO,震荡使孔内甲瓞结晶完全溶解,测定各孔 490nm 波长的吸光度。细胞活力以各组相对正常组细胞的百分比表示。

1.2.5 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放 收集细胞培养液,按照试剂使用说明书检测。由上述两项试验得到氨磷汀使用的最佳浓度用于后续实验。

1.2.6 细胞形态学观察 使用相差显微镜观察并拍摄细胞形态。

1.2.7 免疫组化染色 TUNEL 与 DAPI 染色按照说明书使用。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 OGD 复氧复糖 24h 后,胰酶消化细胞制成单细胞悬液,使细胞密度达到 1×10^6 。依次加入 10ul Annexin V-FITC 和 5ul PI,充分混匀后 4℃ 避光反应 30min,使用流式细胞仪检测。

1.2.9 统计学方法 所有数据均以均数 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ S.E.M) 表示。组间计量资料的比较均采用单因素方差分析和 LSD 法进行两两比较。使用 SPSS 14.0 进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的氨磷汀对正常 PC12 细胞活力的影响

高浓度的氨磷汀 (5mmol/L) 对正常细胞活力有抑制作用 ($*P < 0.05$,与对照组相比),而低浓度 (≤ 2 mmol/L) 时则无副作用 (图 1),因此随后的保护研究中使用了较低浓度的氨磷汀。

2.2 氨磷汀对 PC12 细胞缺血再灌注损伤的保护作用

2.2.1 MTT 法检测细胞活力 PC12 细胞缺血再灌注损伤后其

细胞活力与对照组相比下降至 $(71.21 \pm 3.91) \%$,而给予氨磷汀治疗后的 PC12 细胞活力则明显提高 ($*P < 0.05$,与对照组相比; $\#P < 0.05$,与 OGD 组相比)。且当药物浓度为 0.2mmol/L 时对细胞的保护效果最好,细胞活力升高为 $(87.63 \pm 1.33) \%$ (图 2A)。

2.2.2 LDH 释放 未给氨磷汀治疗的 PC12 细胞,其 LDH 释放量为对照组的 $(635.61 \pm 113.68) \%$,而给予氨磷汀治疗的细胞 LDH 释放则比未给药组明显减少 ($*P < 0.05$,与对照组相比; $\#P < 0.05$,与 OGD 组相比)。当药物浓度为 0.2mmol/L 时降低最为明显 $(306.49 \pm 52.38) \%$ (图 2B),此结果与 MTT 检测所得结果相符。因此,后期的实验中我们所使用的氨磷汀治疗浓度统一为 0.2mmol/L。

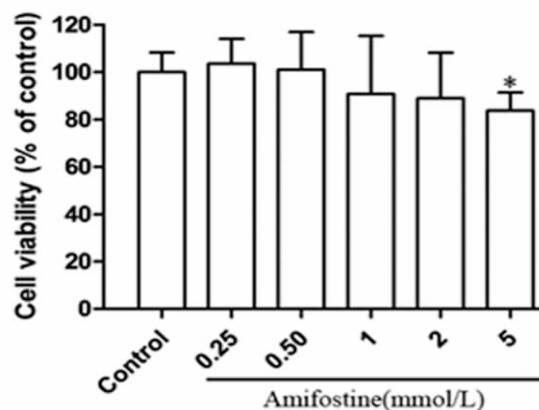


图 1 不同浓度氨磷汀对正常 PC12 细胞活力的影响 ($*P < 0.05$,与对照组相比)

Fig.1 The effect of different concentrations of amifostine on the normal PC12 cells viability ($*P < 0.05$ vs. Control)

2.2.3 细胞形态学观察 正常 PC12 细胞形态正常,大多数细胞呈梭形和多角形,胞浆伸展,可见粗大的突起,细胞折光性好,可见胞核。缺血再灌注 24h 后的 PC12 细胞细胞数目明显减少,细胞突起回缩变圆并可见核固缩。而给予氨磷汀治疗后的细胞数目减少,但形态较未给药组正常,仍可见梭形细胞及伸展的胞浆 (图 3)。

2.2.4 氨磷汀对 PC12 细胞凋亡的影响 TUNEL 染色显示凋亡细胞,DAPI 显示视野中所有的细胞核。如图 4 所示,缺血再灌注损伤后的 PC12 细胞凋亡明显增加,而给予氨磷汀治疗组凋亡细胞数目有所减少。

如图 5 所示,流式细胞仪计数凋亡细胞数目可以看出 PC12 细胞缺血再灌注损伤后 TUNEL 阳性细胞百分比 $(33.06 \pm 4.12\%)$ 较正常组 $(0.98 \pm 0.53) \%$ 明显增多,而给予氨磷汀后阳性细胞百分比则显著减少 $(14.40 \pm 2.41) \%$ ($*P < 0.05$,与对照组相比; $\#P < 0.05$,与 OGD 组相比)。

3 讨论

缺血后神经细胞的死亡主要有以下三种形式:坏死、凋亡及自噬。坏死主要发生在早期缺血核心区,而缺血再灌注引起的细胞损伤则以缺血半暗带神经细胞的凋亡为主^[8,9]。因此如何抑制再灌后神经细胞的凋亡成为脑缺血再灌注损伤治疗的关键所在。近几年关于缺血再灌注损伤治疗的各种方法与药物也将研究焦点集中在对于细胞凋亡的抑制方面^[10-12]。

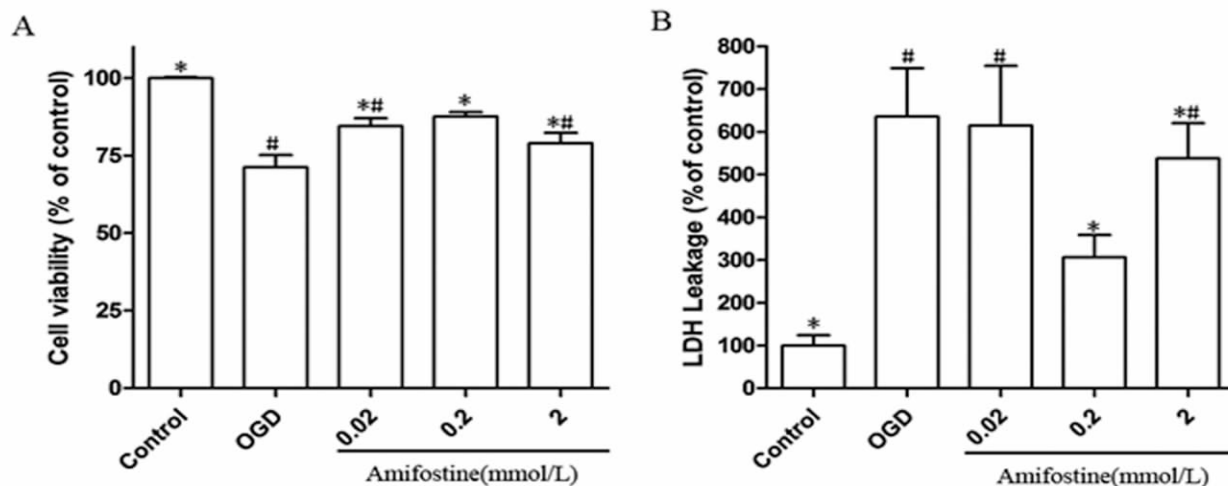


图2 氨磷汀对PC12细胞缺血再灌注损伤的保护作用(* $P < 0.05$,与对照组相比 # $P < 0.05$,与 OGD 组相比)

Fig.2 Protective effects of amifostine on the ischemia reperfusion injured PC12 cells(* $P < 0.05$,vs. Control # $P < 0.05$,vs.ODG)

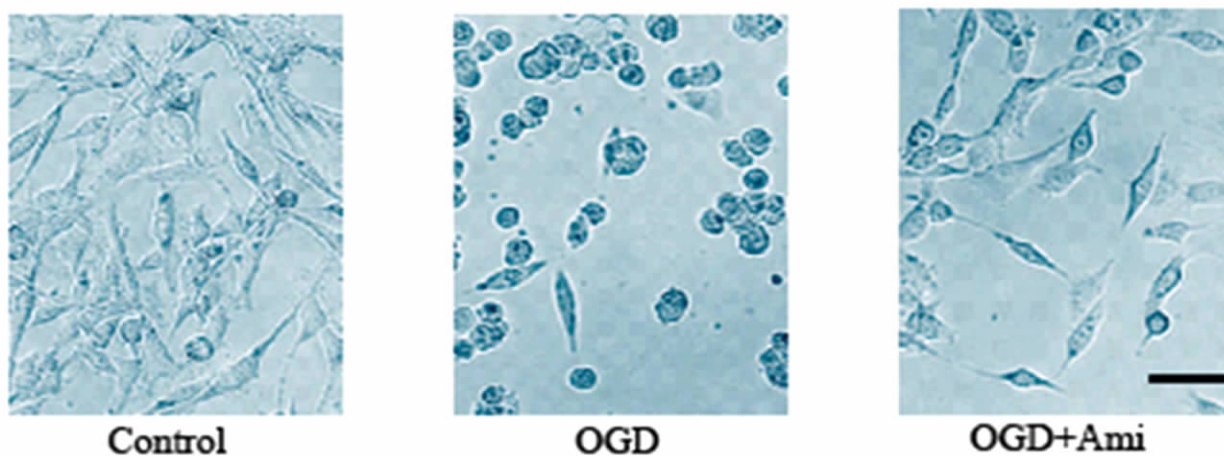


图3 氨磷汀对缺血再灌注损伤的PC12细胞形态的影响(比例尺=40μ M)

Fig3 The morphological change of the ischemia reperfusion injured PC12 cells with or without amifostine (Scale bar=40μ M)

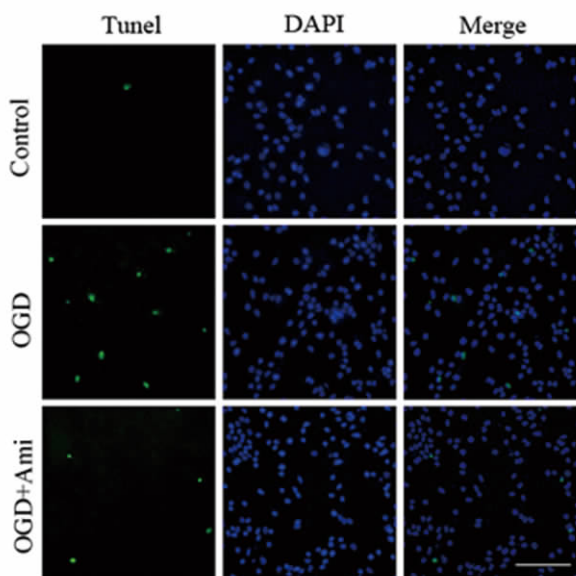


图4 免疫荧光染色显示细胞凋亡(比例尺=100μ M)

Fig4 The morphological features of apoptosis were monitored by fluorescence microscopy (Scale bar=100μ M)

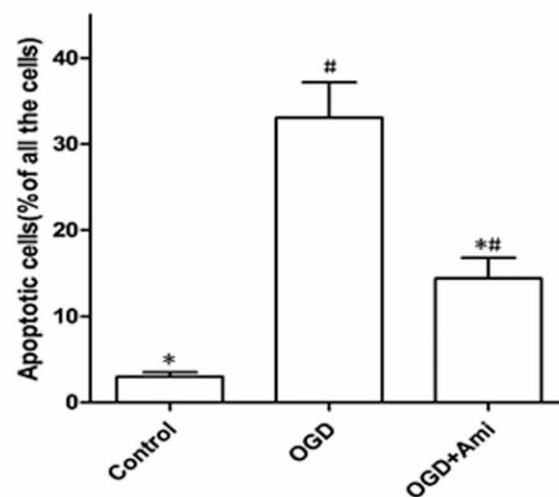


图5 流式细胞仪检测细胞凋亡(* $P < 0.05$,与对照组相比 # $P < 0.05$,与 OGD 组相比)

Fig5 Flow cytometry analysis of cell apoptosis in ischemia reperfusion injured PC12 cells (* $P < 0.05$,vs. Control # $P < 0.05$,vs.ODG)

氨磷汀通过静脉给药进入体内由碱性磷酸酶水解脱磷酸化生成具有自由巯基的活性分子 WR1065 及 WR33278。WR1065 主要分布于正常组织细胞并对其在肿瘤患者放化疗时起到选择性保护作用。氨磷汀保护作用的机制主要有 (1) 与化疗药及化疗药物的代谢产物结合减轻对正常细胞的损害作用 ; (2) 清除自由基保护正常细胞 DNA ; (3) 从基因水平抑制细胞凋亡等^[13-15]。近几年研究发现, 细胞内低浓度的 WR1065 在减轻抗病毒药物导致的细胞突变作用的同时其本身也具有广谱的抗病毒作用, 因此氨磷汀有望用于 AIDS 及流感的治疗^[16-18]。在缺血再灌注损伤领域的研究, 已有证实氨磷汀对心肌、肾的缺血再灌注损伤具有保护作用, 其机制主要有清除自由基、促进 DNA 修复、抑制细胞凋亡等^[19,20]。但该药在脑缺血再灌注损伤的研究领域仍属空白。本研究首次从细胞水平证实了该药可以在缺血再灌注后抑制细胞凋亡对脑缺血再灌注损伤起到保护作用, 为今后的动物实验及临床治疗奠定了基础。

致谢 感谢第四军医大学药理教研室梅炳炳教授对本实验给予的大力支持与帮助。

参考文献 (reference)

- [1] Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing strokes: saving lives around the world [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6, 182-187
- [2] Di Carlo A. Human and economic burden of stroke [J]. *Age Ageing*, 2007, 38, 4-5
- [3] Green AR. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly [J]. *Br. J. Pharmacol*, 2008, 153: S325-S338
- [4] Dorr RT. Radioprotectants: pharmacology and clinical applications of amifostine[J]. *Semin Radiat Oncol*, 1998, 10-3
- [5] Westerink RH, Ewing AG. The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008, 192(2):273-85
- [6] Zhu JR, Tao YF, Lou S, et al. Protective effects of ginsenoside Rb3 on oxygen and glucose deprivation-induced ischemic injury in PC12 cells [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2010, 31: 273-280
- [7] Lin YH, Liu AH, Pan Y, et al. Reduction in the in vitro expression of Brain-Pancreas Relative Protein by oxygen and glucose-deprivation [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007, 295: 199-204
- [8] Mattson MP, Duan W, Pedersen WA. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases[J]. *Apoptosis*, 2001, 6:69-81
- [9] Lopez NF, Toledo AH, Toledo PLH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*, 2005, 18(6):335-50
- [10] Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, Raghubir R. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities [J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 37(1):7-38
- [11] Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion [J]. *J Invest Surg*. 2007, 20(3):195-203
- [12] Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury [J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2005, 5(3):269-87
- [13] Segreto HRC, et al. Phosphorylation and cytoplasmic localization of MAPK p38 during apoptosis signaling in bone marrow granulocytes of mice irradiated in vivo and the role of amifostine in reducing these effects[J]. *Acta Histochem*, 2010, doi:10.1016/j.acthis.2009.12.002
- [14] Wozniak K, Gloc E, Morawiec Z, et al. Amifostine can differentially modulate DNA double-strand breaks and apoptosis induced by idarubicin in normal and cancer cells[J]. *Exp Oncol*, 2008, 30(1):22-8
- [15] Saavedra MM, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, et al. Amifostine modulates radio-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in head and neck cancer patients[J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2010, 51(5):603-7
- [16] Kalebic T, Schein PS. Organic thiophosphate WR-151327 suppresses expression of HIV in chronically infected cells [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10(6):727-33
- [17] Miriam CP, Ofelia AO, Andrew WH, et al. Antiretroviral activity of the aminothiol WR1065 against Human Immunodeficiency virus (HIV-1) in vitro and Simian Immunodeficiency virus (SIV) ex vivo [J]. *AIDS Research and Therapy*, 2009, 6:24
- [18] Walker DM, Kajon AE, Torres SM, et al. WR1065 mitigates AZT-ddI-induced mutagenesis and inhibits viral replication [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2009, 50(6):460-72
- [19] Mohammed KC, Marc C, Abdelhamid A, et al. Renoprotective potency of amifostine in rat renal ischemia-reperfusion[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25: 3845-3851
- [20] Pissarek M, Jänichen F, Blasig IE, et al. Cardioprotective potency of the radical scavenger S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid in the post-ischaemic rat heart [J]. *Mol Cell Biochem*, 1995, 145(2):121-9