

一氧化氮损伤神经细胞线粒体并诱导细胞凋亡

卫涛涛 陈 畅 侯京武 赵保路 忻文娟*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101. * 联系人)

摘要 研究了一氧化氮对原代培养的大鼠小脑颗粒神经元的细胞毒性及其作用机理. 实验结果表明, 一氧化氮供体 S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺(SNAP; 500 $\mu\text{mol/L}$)可诱导未成熟小脑颗粒神经元凋亡. 流式细胞分析及 HPLC 分析表明, 神经细胞经 SNAP 处理后线粒体跨膜电位及细胞内 ATP 含量均明显下降. 一氧化氮清除剂血红蛋白可有效保护线粒体, 防止细胞凋亡. 实验结果提示, 一氧化氮通过抑制线粒体呼吸链的活力、降低细胞内 ATP 含量而启动细胞凋亡程序.

关键词 小脑颗粒神经元 细胞凋亡 一氧化氮 线粒体

近年的研究表明一氧化氮是一种重要的生物信使分子, 参与血流调节、信号传导、免疫防御等多种生理及病理过程^[1]. 在哺乳动物中枢神经系统中, 一氧化氮在神经传导、记忆等过程中起重要作用, 但过量的一氧化氮具有神经毒性, 可导致多种类型的神经元凋亡. 在脑缺血损伤以及早老性痴呆(AD)、帕金森氏症(PD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、小脑退行性病变等神经退行性疾病发生发展的过程中, 均伴随特定种类的神经细胞发生过度凋亡^[2, 3], 而一氧化氮引起的神经细胞损伤可能是这些疾病的病原因素之一, 因此研究一氧化氮引发神经细胞凋亡的机理有助于加深对这些神经系统疾病的认识, 具有重要的理论及实际意义. 在一氧化氮造成神经细胞损伤的多种途径中, 一氧化氮与 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA 受体)等兴奋性氨基酸受体之间的关系及相互作用一直倍受关注^[4], 而从一氧化氮引发线粒体功能损伤方面研究, 一氧化氮诱导神经细胞凋亡的机理未见报道.

本工作以原代培养的未成熟大鼠小脑颗粒神经元这一相对较为均一的神经元群体为实验对象, 研究一氧化氮对神经细胞的损伤作用, 并应用流式细胞分析、HPLC 等技术方法研究在神经细胞凋亡过程中线粒体功能的变化, 以阐明一氧化氮导致神经细胞损伤的可能途径.

1 材料与方法

() 材料. Wistar 大鼠(7日龄)购自北京医科大学; 细胞培养板购自 Corning Costar 公司; DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(1:250)、蛋白酶 K, RNase A 购自 LTI 公司; 琼脂糖、S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺(SNAP)、噻唑蓝(Thiazolyl blue, MTT)、聚 L-赖氨酸、血红蛋白(Hb)购自 Sigma 公司; 牛血清白蛋白(BSA), ATP, DNase iv 购自 Boehringer Mannheim 公司; Rhodamine 123 (Rh123) 购自 Molecular Probes 公司; 其余药品均为国产分析纯级.

() 细胞培养及一氧化氮处理. 大鼠小脑颗粒神经元的原代培养参照前述方法^[5]. 细胞接种于涂有聚 L-赖氨酸的 6 孔培养板(2×10^6 细胞/mL, 2 mL/孔)或 24 孔培养板(2.5×10^6 细胞/mL, 0.4 mL/孔)中. 培养基为添加有 19.6 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 10% 热灭活胎牛血清的 DMEM. 细胞在 37℃、相对湿度 100%, 5% CO₂-95% 空气环境下培养. 细胞接种 48 h 后, 在细胞中加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 一氧化氮供体 SNAP, 并继续培养一定时间. 在部分实验中, 细胞先与 5 $\mu\text{mol/L}$ Hb 温育 15 min, 然后再加入 SNAP.

- () 细胞存活率. 通过 MTT 分析测定细胞存活率^[5].
- () 形态学观察. 通过透射电镜(TEM) 观察细胞超微结构^[5].
- () DNA 断裂分析. 通过 DNA 琼脂糖电泳检测细胞凋亡特有的 DNA 梯状条带(“DNA ladder”)^[5].

() 测定线粒体跨膜电位. Rhodamine 123 (Rh 123) 是一种指示线粒体功能的荧光探针, 其荧光强度与线粒体跨膜电位相关^[6]. 细胞经 0.02 % 胰蛋白酶 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase iv 消化后用含有 0.2 % BSA 的无酚红 DMEM 培养基洗 2 遍, 加入 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Rh 123, 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 25 min 后进行流式细胞分析, 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm.

() 测定细胞内 ATP 含量. 采用反相 HPLC 测定细胞内 ATP 含量^[7]. 色谱柱: Zorbax Rx-C18 5 μm ODS 柱, 4.6 mm (i. d.) $\times$ 250 mm; 流动相: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH= 6.0), 含有 3.75% 甲醇; 流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm.

2 结果

2.1 细胞存活率

MTT 分析表明加入 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 一氧化氮供体 SNAP 能够引发时间依赖的小脑颗粒神经元死亡(图 1), 而一氧化氮特异性清除剂 Hb 对细胞有明显的保护作用.

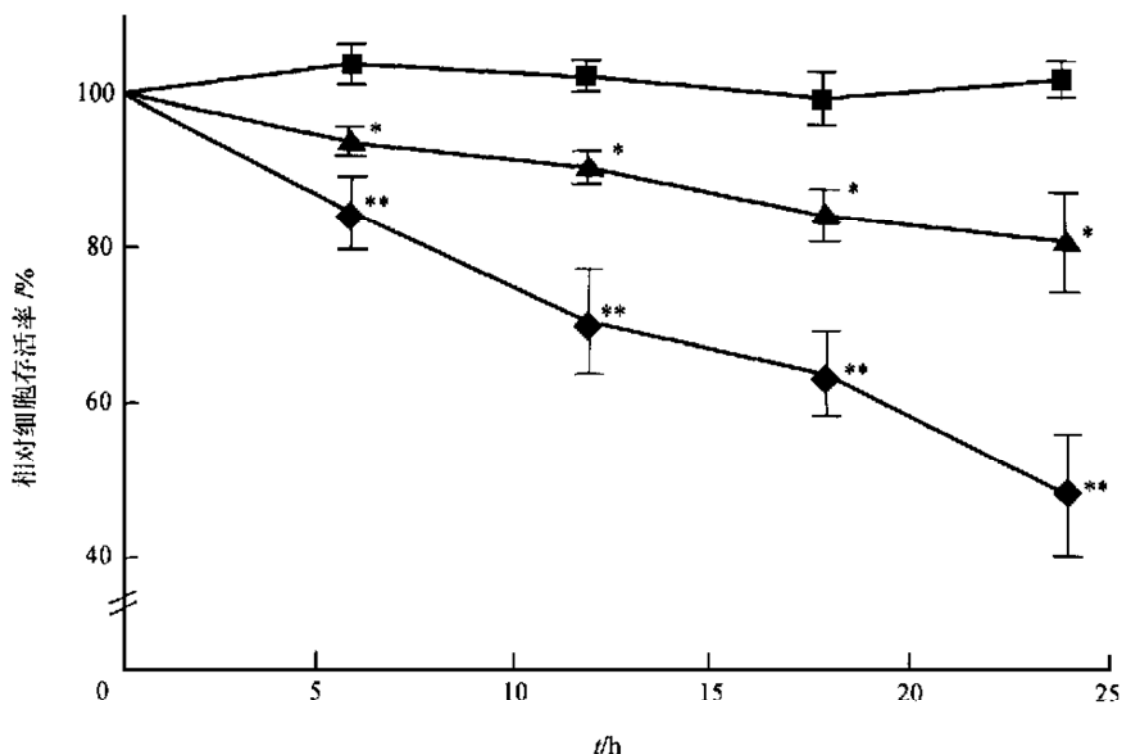


图 1 一氧化氮诱导的小脑颗粒神经元死亡

细胞与 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SNAP 作用不同时间后通过 MTT 分析测定细胞存活率. ■为正常小脑颗粒神经元; ▲为经 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SNAP 处理的小脑颗粒神经元; ◆为经 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Hb + 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SNAP 处理的小脑颗粒神经元. * 为与 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SNAP 处理的细胞相比 $P < 0.01$; ** 为与正常细胞相比 $P < 0.01$. 数据为均值 $\pm$ 标准差, $n = 6$

2.2 细胞凋亡的特征

加入 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 一氧化氮供体 SNAP 后, 体外培养的小脑颗粒神经元逐渐死亡, 主要表现

为细胞突起减少、胞体皱缩, 并有部分细胞脱壁浮起. 透射电子显微镜观察显示经 SNAP 处理

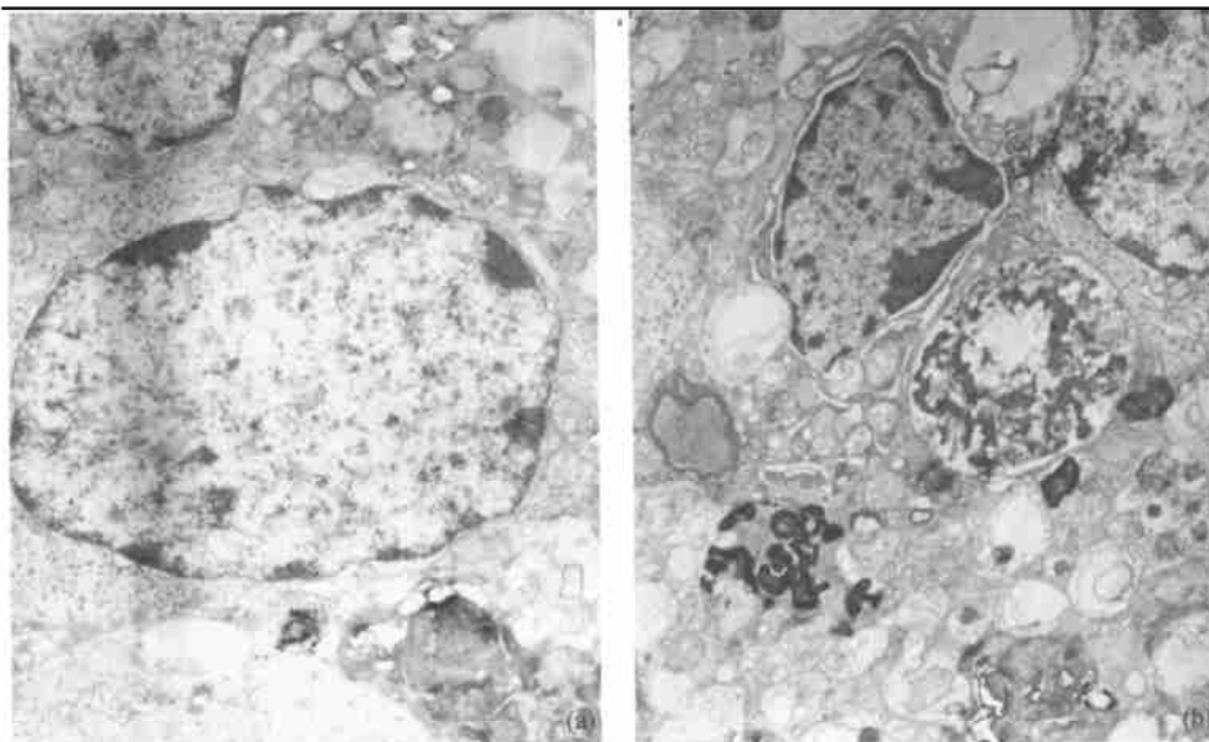


图2 正常((a), $\times 8\,000$)以及经 $500\,\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理 24 h ((b), $\times 2\,400$)的小脑颗粒神经元的细胞核超微结构

24 h 后, 大部分细胞出现染色质浓缩等形态变化, 并有部分细胞核破碎, 形成凋亡小体(图 2(b)).

经 SNAP 处理 24 h 的细胞, 其 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈现 180 bp 梯状条带(图 3), 表明 DNA 链在核小体间发生断裂, 生成寡聚核小体. 以上证据表明在本实验条件下一氧化氮引起的神经细胞死亡属于细胞凋亡. 经 Hb 预处理的细胞基本保持了正常的细胞形态, 其 DNA 链保持完整.

2.3 线粒体损伤

流式细胞分析显示细胞经 $500\,\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理 3 h 导致 Rh 123 荧光强度显著下降, 表明线粒体跨膜电位明显下降. HPLC 分析表明经 $500\,\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理 3 h 的细胞其胞内 ATP 含量明显下降. 以上实验结果提示一氧化氮供体 SNAP 对线粒体造成了损伤. 一氧化氮的特异性清除剂 Hb 对线粒体有明显的保护作用(图 4).

3 讨论

由于一氧化氮活泼的生物学特性, 它在中枢神经系统中就象一把“双刃剑”, 起着生理信使与细胞毒性的双重作用. 最近的研究表明一氧化氮可诱导多种类型的神经细胞凋亡, 但具体的机理仍在探讨之中. 为了排除与兴奋性氨基酸受体



图3 一氧化氮诱导的小脑颗粒神经元 DNA 核小体间断裂

1 为分子量标准(λ DNA/ $EcoR$ iv+ $Hind$ III), 2 为经 $500\,\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理 24 h 的小脑颗粒神经元, 3 为正常小脑颗粒神经元, 4 为经 $5\,\mu\text{mol/L}$ Hb + $500\,\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理 24 h 的小脑颗粒神经元

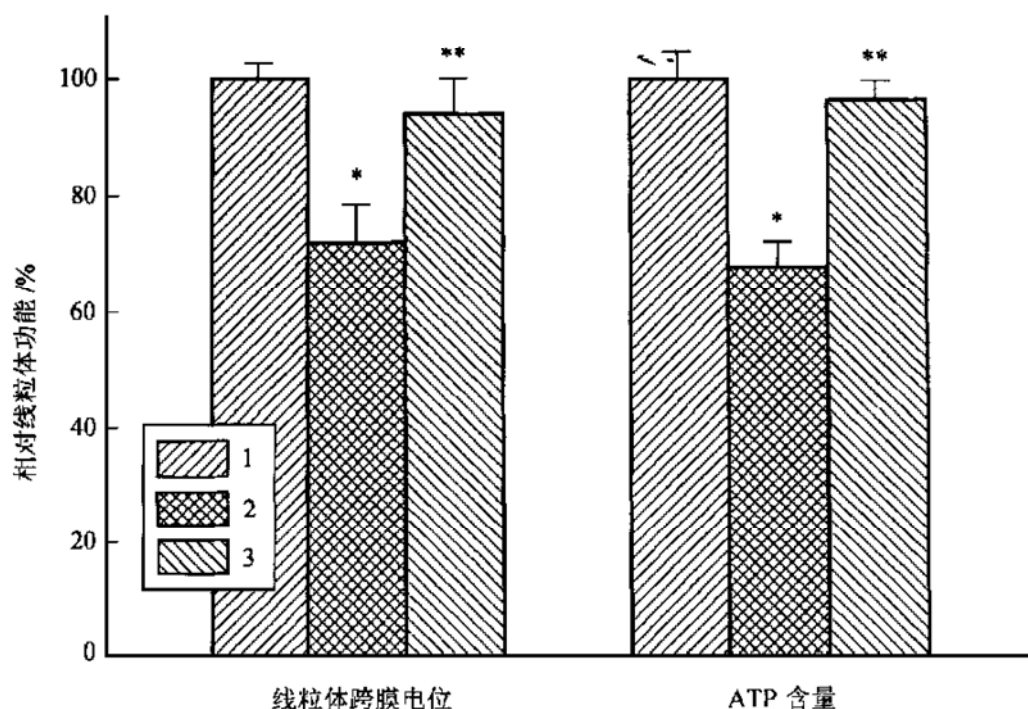


图4 一氧化氮诱导的小脑颗粒神经元线粒体损伤

细胞与 500 $\mu\text{mol/L}$ SNAP 作用 3 h 后测定线粒体跨膜电位及细胞内 ATP 含量. 1 为正常小脑颗粒神经元, 2 为 500 $\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理的小脑颗粒神经元, 3 为经 5 $\mu\text{mol/L}$ Hb + 500 $\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理的小脑颗粒神经元. * 为与正常细胞相比 $P < 0.01$; ** 为与 500 $\mu\text{mol/L}$ SNAP 处理的细胞相比 $P < 0.01$. 数据为均值 $\pm$ 标准差, $n = 6$

有关的因素, 本研究采用了体外培养两天的大鼠未成熟小脑颗粒神经元作为实验模型. 该模型细胞种类较为均一, 90% 以上为颗粒细胞, 且细胞膜上的兴奋性氨基酸受体尚未发育成熟, NMDA 等受体激动剂仅能引发很小的兴奋性神经毒性.

MTT 分析表明加入一氧化氮供体 SNAP 引发小脑颗粒神经元死亡. 经 SNAP 处理 24 h 后的细胞呈现出染色质浓缩、核破碎、形成凋亡小体等凋亡细胞的特征形态, 而 DNA 琼脂糖电泳表明 SNAP 导致 DNA 链在核小体间断裂, 形成“DNA ladder”. 以上证据显示本实验条件下 SNAP 引发的小脑颗粒神经元死亡属于细胞凋亡. 一氧化氮的特异性清除剂血红蛋白对细胞具有保护作用, 表明本实验条件下神经细胞的凋亡归因于一氧化氮的作用.

小脑颗粒神经元经一氧化氮供体 SNAP 处理 3 h 后, 线粒体跨膜电位降低, 同时细胞内 ATP 含量下降, 而一氧化氮的特异性清除剂 Hb 对此具有保护作用, 说明本实验条件下一氧化氮导致线粒体失活. 一氧化氮可以透过细胞膜、线粒体膜等生物膜, 修饰某些蛋白质的巯基、血红素辅基及铁硫中心, 从而显著性地抑制线粒体呼吸链复合体 iv、复合体 ⑦、④及复合体 ⑤的活力^[8,9]. 线粒体呼吸链酶活性的抑制导致线粒体的去能化, 表现为线粒体跨膜电位下降. 线粒体呼吸链酶活性的抑制同时直接导致细胞内 ATP 含量下降, 从而启动细胞凋亡程序^[10]. 此外, 线粒体呼吸链酶的活性受抑制后, 线粒体电子泄漏增加, 致使内源性超氧阴离子自由基的生成大大增加^[11]. 一氧化氮与超氧阴离子自由基发生快速反应 ($k \geq 6.7 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), 生成具有强氧化性的过氧化亚硝基, 对细胞造成不可逆的氧化损伤^[5].

需要特别指出的是, 本文所用的细胞是体外培养 2 d 的未成熟神经元, 采用这种实验模型虽然避免了兴奋性氨基酸受体等因素的干扰, 但这种神经细胞与发育成熟的神经元相比, 在可

兴奋性、离子通道、膜受体等方面都有区别,因此本实验的结果不能直接应用于体外培养的发育成熟的神经元以及在体(*in vivo*)实验模型。在体外培养的发育成熟的神经元以及在体实验模型中,一氧化氮除了可能通过损伤线粒体而引发神经损伤外,还有可能通过促进神经元释放谷氨酸等神经递质、改变离子通透性等途径而引发神经损伤。

在神经细胞中,维持正常的线粒体功能具有极为重要的作用。当线粒体受到损伤时,细胞内能量水平降低,从而导致神经细胞膜去极化,引发包括钙离子内流等在内的一系列信号,导致神经细胞损伤。由于线粒体功能被破坏而引发的神经细胞死亡可能是许多神经系统疾病共同的病原因素^[12]。

本实验的结果表明在体外培养的未成熟小脑颗粒神经元中,一氧化氮损伤神经细胞线粒体,并最终导致细胞凋亡。实验结果有助于加深对一氧化氮、细胞凋亡、神经系统疾病之间关系的认识,从而为预防、治疗这类疾病提供参考依据。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39800035)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Schmidt HHHW, Walter U. NO at work. *Cell*, 1994, 78: 919~ 925
- 2 Charriaut-Marlangue C, Aggour-Zouaoui D, Represa A, et al. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp120 toxicity. *Trends Neurosci*, 1996, 19: 109~ 114
- 3 Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267: 1456~ 1462
- 4 Lipton S A, Choi Y B, Pan Z H, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature*, 1993, 364: 626~ 632
- 5 Wei T T, Chen C, Zhao B L, et al. EPC-K1 attenuates peroxynitrite-induced apoptosis in cerebellar granule cells. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, 46: 89~ 97.
- 6 Mark R J, Keller J N, Kruman I, et al. Basic FGF attenuates amyloid β -peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na^+ , K^+ -ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res*, 1997, 756: 205~ 214
- 7 Meßmer U K, Brüne B. Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD^+ content, and p53 accumulation. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 327: 1~ 10
- 8 Bolaños J P, Heales S J R, Peuchen S, et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21: 995~ 1001
- 9 Clementi E, Brown G C, Feelisch M, et al. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7631~ 7636
- 10 Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, et al. Hypothesis. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett*, 1996, 378: 107~ 110
- 11 Poderoso J J, Carreras M C, Lisdero C, et al. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondria particles. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 328: 85~ 92
- 12 Beal M F. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 1996, 6: 661~ 666

(1998-11-17 收稿, 1999-02-11 收修改稿)