

. 实验研究 .

茶多酚对氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后原代培养的小鼠海马神经元内钙离子浓度的影响

严飞平 陈 晨 李志磊 霍国进 冯 毅 白 磊

【摘要】目的 探讨茶多酚对氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后原代培养的小鼠海马神经元内钙离子浓度的影响及机制。**方法** 分离 C57BL/6J 雄性小鼠海马神经元并进行原代培养,然后分为对照组、氧葡萄糖剥夺/再恢复干预(模型)组和茶多酚组。对照组常规进行海马神经元原代培养,模型组利用氧葡萄糖剥夺/再恢复制作模型,茶多酚组在造模后应用 4 mg/ml 的茶多酚处理。利用 Fluo-3AM 钙离子特异性探针标记神经元内游离钙离子,利用流式细胞仪进行检测钙离子浓度;免疫印迹法检测神经元 Cav1.2 蛋白的表达水平;利用全细胞模式膜片钳技术检测神经元 L-型电压依赖型钙离子通道(LTCC)的电流。**结果** 与对照组相比,氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后,神经元内钙离子浓度明显增高($P<0.05$),神经元 Cav1.2 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$)、LTCC 电流明显增大($P<0.05$);茶多酚明显抑制上述作用($P<0.05$),但未恢复到对照组水平($P<0.05$)。**结论** 茶多酚可减少氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后原代培养小鼠海马神经元内钙离子,其作用机制可能与降低 Cav1.2 表达、减弱 LTCC 功能有关。

【关键词】 小鼠海马神经元;原代培养;茶多酚;细胞内钙离子浓度

【文章编号】 1009-153X(2019)10-0608-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.3; Q 786

Effect of tea polyphenol on intracellular calcium concentration of primary hippocampal neurons and its mechanism in mice

YAN Fei-ping, CHEN Chen, LI Zhi-lei, HUO Guo-jin, FENG Yi, BAI Lei. Department of Neurosurgery, Yulin Municipal First Hospital, Yulin 719000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of tea polyphenol on the intracellular calcium concentration of primary hippocampal neurons and its mechanism in the mice. **Methods** The primary hippocampal neurons were isolated from the brain of C57BL/6J male mice and randomly divided into control group, in which the hippocampal neurons were cultured in the conventional incubator, ischemia reperfusion group, in which the hippocampal neurons were cultured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion method simulating ischemia reperfusion injury, and tea polyphenols group, in which the hippocampal neurons were treated with 4 mg/ml tea polyphenol 3 hours after incubation in the hypoxic incubator, and then cultured in the conventional incubator. The intracellular calcium concentration, expression of Cav1.2 and function of L-type calcium channel in the hippocampal neurons were determined in all the groups respectively by flow cytometry, Western blot and Whole-cell model. **Results** The intracellular calcium concentration, level of Cav1.2 expression and function of L-type calcium channel in the hippocampal neurons were significantly lower in the control group than those in tea polyphenol group ($P<0.05$), which were significantly lower than those in the ischemia reperfusion group ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that tea polyphenols may decreases the intracellular calcium concentration of the primary hippocampal neurons probably by inhibiting the level of Cav1.2 expression and the function of L-type calcium channel in the mice with ischemia repekusion injury.

【Key words】 Tea polyphenols; Ischemia reperfusion injury; Mice; Primary hippocampal neurons; intracellular calcium concentration

缺血性脑卒中发病率高、病死率高,严重危害人民健康,给社会带来沉重负担^[1]。脑血管的再通是治疗缺血性脑卒中的关键,但恢复血流后的缺血再灌注损伤会导致脑组织损伤进一步加重^[2]。引起脑缺血再灌注损伤的主流机制有氧化应激损伤、炎症反

应失衡、能量代谢障碍、兴奋性氨基酸毒性和钙超载等,而脑缺血再灌注损伤后钙离子超载是以上多种机制间的共同途径,发挥更为重要的作用^[3-5]。茶多酚能够通过抑制氧化应激损伤、抗炎等机制对脑缺血再灌注损伤发挥保护作用^[6-9]。本文利用茶多酚处理原代培养小鼠海马神经元,而后利用流式细胞仪等手段检测神经元内钙离子浓度,继而探究可能机制,旨在阐明茶多酚对脑缺血再灌注损伤保护作用的新机制,为茶多酚在脑缺血再灌注损伤中的应用提供更多实验依据。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.10.011

作者单位:719000 陕西,榆林市第一医院榆林院区神经外科(严飞平、陈 晨、李志磊、霍国进、冯 毅、白 磊)

通讯作者:白 磊,E-mail:bailei2211@163.com

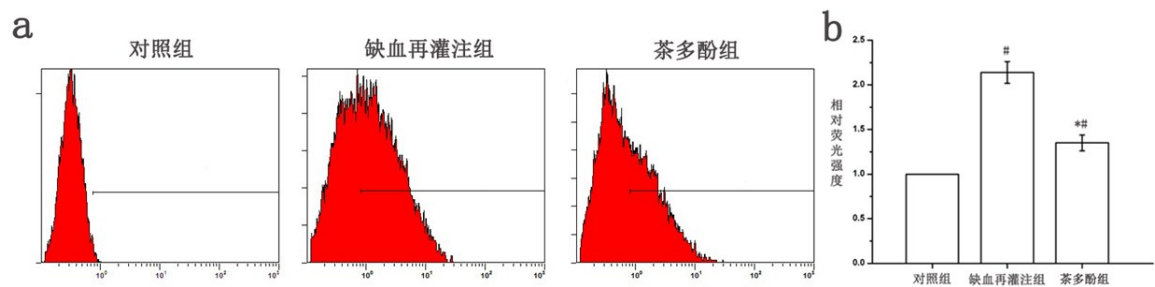


图1 茶多酚对氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后原代培养的小鼠海马神经元内钙离子浓度的影响

a. 流式细胞仪检测原代培养的小鼠海马神经元内钙离子浓度;b. 经过软件分析后得到的神经元荧光强度柱状图,与模型组对比,* $P<0.05$,与对照组对比,# $P<0.05$

1 材料与方法

1.1 小鼠海马神经元的原代培养 C57BL/6J 雄性小鼠 30 只,体重 22~25 g,由榆林市第一医院实验动物中心提供。按照 Yu 等^[10]方法进行 C57BL/6J 雄性小鼠海马神经元原代培养,培养 7 d 左右,待神经元成熟后用于后续实验。经过 0.5、1、2、4、8 mg/ml 这 5 个浓度茶多酚茶多酚(上海源叶生物科技有限公司)的作用,发现 4 mg/ml 的茶多酚对小鼠海马原代培养神经元活性无显著影响,因此采用 4 mg/ml 的茶多酚进行后续实验。

1.2 氧葡萄糖剥夺/再恢复模型的建立 参照 Yu 等^[10]方法建立氧葡萄糖剥夺/再恢复模型。利用成熟的原代培养的小鼠海马神经元,更换为无血清的 DMEM 培养基(Gibco 公司)中培养 3 h 后,再更换培养基为 Neurobasal 正常培养基并继续培养。

1.3 实验分组及干预 分为对照组、模型组和茶多酚组,每组 5 个复孔。对照组常规培养;茶多酚组模型制作后 3 h,更换为含 4 mg/ml 茶多酚的培养基,继续培养^[10]。

1.4 流式细胞仪检测神经元内钙离子浓度 将原代培养的海马神经元制备成细胞悬液,利用 Fluo-3AM 钙离子特异性探针(中国碧云天公司)标记神经元内游离钙离子,调节细胞数量在 10⁵/ml 左右后上机检测。按照 Fluo-3AM 钙离子特异性探针说明设置流式细胞仪(美国 Biorad)参数,利用 EXPO32 对数据进行分析^[11],检测数据为相对荧光强度。

1.5 免疫印迹法检测海马神经元 Cav1.2 含量 制备海马神经元蛋白样本,煮沸后进行电泳,电泳结束后进行转膜操作,随后按照 anti-Cav1.2 抗体(以色列 Alomone 公司)说明书进行抗体的配制和孵育,二抗处理后进行发光检测^[11],检测数据为灰度值。

1.6 全细胞模式膜片钳技术检测海马神经元 L-型电压依赖型钙离子通道(L-type calcium channel,

LTCC)的电活动 制备专用的玻璃微电极,根据海马神经元内液的成分和 LTCC 的特性,配制玻璃微电极内外液体。电极内液配方为:CsCl 150 mM、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 10 mM、Na₂ATP 5 mM、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸 5 mM、葡萄糖 10 mM,利用 CsOH 调整 pH 到 7.2。电极外液配方为:NaCl 120 mM、甘露醇 30 mM、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 30 mM、K₂HPO₄ 3 mM、MgSO₄ 1 mM,利用 NaOH 将 pH 调整至 7.4。高阻封接后保持电阻在 2 GΩ 以上^[11],检测数据为电流密度,单位为 pA/pF。

1.7 统计学分析 利用 SPSS 16.0 软件进行分析;定量

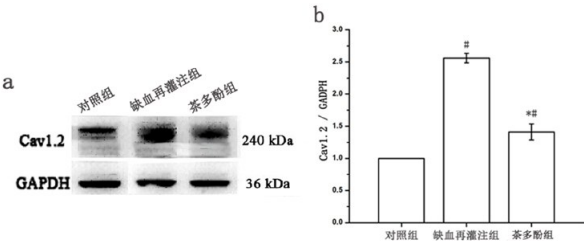


图2 茶多酚对氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后原代培养的小鼠海马神经元 Cav1.2 表达的影响

与模型组相比,* $P<0.05$;与对照组相比,# $P<0.05$

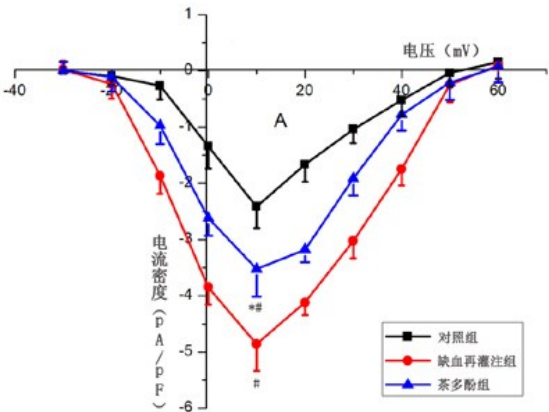


图3 茶多酚对氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后原代培养的小鼠海马神经元 LTCC 功能的影响

与模型组相比,* $P<0.05$;与对照组相比,# $P<0.05$;LTCC. L 型电压依赖型钙离子通道

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用重复测量方差分析和 Bonferoni post hoc 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 茶多酚降低海马神经元内钙离子浓度 与对照组相比,模型组神经元内钙离子浓度明显增高($P < 0.05$)。茶多酚组神经元内钙离子浓度明显低于模型组($P < 0.05$),但未恢复到对照组水平($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 茶多酚下调海马神经元 Cav1.2 的蛋白表达 与对照组相比,模型组神经元 Cav1.2 的蛋白水平明显增高($P < 0.05$)。茶多酚组神经元 Cav1.2 的蛋白水平明显低于模型组($P < 0.05$),但未恢复到对照组水平($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 茶多酚减弱海马神经元内 LTCC 的功能 与对照组相比,模型组神经元内 LTCC 明显增大($P < 0.05$)。茶多酚组神经元 LTCC 电流明显小于模型组($P < 0.05$),但未恢复到对照组水平($P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

神经元内游离钙离子主要有外钙内流和内钙释放两个途径,前者主要指细胞外钙离子通过细胞膜钙离子通道进入神经元内,而 LTCC 是神经元重要的钙离子进入通道;后者主要指神经元内细胞器释放的钙离子进入胞浆,此种途径引起的神经元内钙离子浓度的升高十分迅速,形成钙火花^[12]。实验观察到的缺血再灌注损伤后小鼠原代海马神经元游离钙离子浓度的升高持续维持在较高水平,故本文将 LTCC 作为机制研究的重点。

茶多酚具有强大的清除自由基及抗氧化的能力,还具有改善胰岛素抵抗、抗辐射、抗病毒、抑菌及抗病毒等药理学作用^[13-16]。本文结果表明茶多酚对氧葡萄糖剥夺/再恢复干预后原代培养的小鼠海马神经元内钙超载具有抑制作用,其机制可能与降低 LTCC 的核心蛋白 Cav1.2 的表达水平和抑制 LTCC 的功能有关。

【参考文献】

[1] Bejot Y, Daubail B, Giroud M. Epidemiology of stroke and transient ischemic attacks: current knowledge and perspectives [J]. *Revue Neurolog*, 2016, 172(1): 59-68.
[2] White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, *et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury

[J]. *J Neurol Sci*, 2000, 179(S1-2): 1-33.
[3] Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, *et al.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4): C817-C833.
[4] 李 岩,王凯华. 脑缺血再灌注损伤过氧化相关机制及中医药治疗[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 5(3): 113-116.
[5] 侯 辰,唐 鹏,刘 玥,等. 羽扇豆醇对脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤和炎症反应的调节作用及机制研究[J]. *解放军医药杂志*, 2018, 10(4): 6-10.
[6] 高红莉,曲晓兰,刘昭纯. 马黛茶多酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2013, 1: 75-77.
[7] 张颖佩,吕 青,郭莲军. 茶多酚对小鼠离体脑片氧糖剥夺及谷氨酸损伤的神经保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 13(4): 1077-1082.
[8] 何 冰,陈小夏. 茶多酚清除氧自由基及抑制脑脂质过氧化反应的体外试验[J]. *中国药理学通报*, 1998, 3(6): 1-3.
[9] 杨贤强,吴炳辉,沈生荣. 茶多酚对抗脑缺血再灌注损伤的保护作用机理研究[J]. *浙江农业大学学报*, 1992, S1: 76-78.
[10] Yu Y, Wu XQ, Pu JN, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide protects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1187-1194.
[11] Sun Z, Cao X, Hu Z, *et al.* MiR-103 inhibits osteoblasts proliferation mainly through decreasing expression of Cav 1.2 in simulated microgravity [J]. *Bone*, 2015, 76: 121-128.
[12] Sun Z, Cao X, Zhang Z, *et al.* Simulated microgravity inhibits L-type calcium channel currents partially by the up-regulation of miR-103 in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(3): 8077.
[13] Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols in promotion of human health [J]. *Nutrients*, 2018, 11(39): 1-16.
[14] Mao X, Gu C, Chen D, *et al.* Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 81649-81661.
[15] Afzal M, Safer AM, Menon M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease [J]. *Inflammopharmacology*, 2015, 23(4): 151-161.
[16] Yamazaki M. The pharmacological studies on matrine and oxymatrine [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2000, 120: 1025-1033.

(2019-06-13 收稿, 2019-09-05 修回)