

活性氧参与一氧化氮诱导的神经细胞凋亡*

张春阳¹⁾ 卫涛涛²⁾ 马辉¹⁾** 丁尧¹⁾ 陈颀延¹⁾ 侯京武²⁾ 陈畅²⁾ 忻文娟²⁾

(¹⁾清华大学物理系单原子分子测控教育部重点实验室, 北京 100084; (²⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 采用激光共聚焦成像技术, 用氧化还原敏感的特异性荧光探针 (DCFH-DA 和 DHR123) 直接研究了一氧化氮供体 S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺 (SNAP) 诱导未成熟大鼠小脑颗粒神经元凋亡过程中的细胞胞浆、线粒体中活性氧水平的变化, 发现神经细胞经 0.5 mmol/L SNAP 处理 1 h 后, 细胞胞浆及线粒体中活性氧水平大大增加。一氧化氮清除剂血红蛋白能够有效抑制细胞胞浆、线粒体中活性氧的产生, 防止细胞凋亡。外源性谷胱甘肽对细胞也具有良好的保护作用, 而当细胞中谷胱甘肽的合成被抑制后, 一氧化氮的神经毒性大大增强。实验结果表明一氧化氮通过促进神经细胞产生内源性活性氧而启动细胞凋亡程序, 而谷胱甘肽可能是重要的防止一氧化氮引发神经损伤的内源性抗氧化剂。

关键词 小脑颗粒神经元, 细胞凋亡, 一氧化氮, 活性氧, 激光共聚焦成像, 谷胱甘肽

学科分类号 Q27, Q633

一氧化氮是一种重要的生物信使分子, 在哺乳动物中枢神经系统中参与神经传导、记忆等过程^[1], 并对神经元的体外存活有促进作用^[2], 但过量的一氧化氮具有神经毒性, 能够诱导多种类型的神经细胞凋亡^[3,4], 成为早老性痴呆 (AD)、帕金森氏症 (PD) 等神经退行性疾病的病原因素之一^[5], 因此深入探讨一氧化氮引发神经细胞凋亡的机理具有重要的理论和实际意义。我们研究发现, 一氧化氮能诱导原代培养的未成熟大鼠小脑颗粒神经元凋亡^[6]。抗氧化剂 L-抗坏血酸 2-[3, 4-二氢-2, 5, 7, 8-四甲基-2-(4, 8, 12-三甲基十三烷基)-2H-1-苯并吡喃-6-磷酸酯] 钾盐 (EPC-K1) 对一氧化氮引发的神经细胞损伤具有一定的保护作用^[7], 提示活性氧可能参与了一氧化氮诱导细胞凋亡的过程。目前, 从一氧化氮促进内源性活性氧生成来研究一氧化氮诱导神经细胞凋亡的机理还鲜有报道, 还缺乏活性氧参与一氧化氮诱导神经细胞凋亡的直接证据。本工作应用激光共聚焦成像等方法, 用氧化还原敏感的特异性荧光探针直接研究了在一氧化氮诱导未成熟大鼠小脑颗粒神经元凋亡的过程中细胞胞浆、线粒体中活性氧水平的变化, 并探讨了内源性抗氧化剂谷胱甘肽对防止一氧化氮诱导细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠 (7 日龄) 购自北京医科大学; DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国

LT I 公司; 双氢罗丹明 123 (DHR123)、2, 7-二氯双氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 购自美国 Molecular Probes 公司; L-buthionine- [S, R]-sulfoximine (L-BSO)、S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺 (SNAP)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、聚 L-赖氨酸、血红蛋白 (Hb)、噻唑蓝 (MTT)、吡啶橙 (AO) 购自美国 Sigma 公司; Monochlorobimane 购自瑞士 Fluka 公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、细胞凋亡试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司; 蛋白质浓度测定试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; 其余药品均为国产分析纯级。

1.2 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文献 [6] 方法。细胞接种于涂有聚 L-赖氨酸的 35 mm 培养皿 (2 × 10⁶ 个/ml, 2 ml/皿) 或 24 孔培养板 (2.5 × 10⁶ 个/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 °C、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 0.5 mmol/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 0.1 mmol/L

*清华大学 985 重点项目和国家自然科学基金 (39800035) 资助项目。

**通讯联系人。

Tel: 010-62784531-167, E-mail: Mahui@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2000-01-06, 接受日期: 2000-02-29

L-BSO (-谷氨酰半胱氨酸合成酶抑制剂, 可抑制细胞中 GSH 的合成) 作用 12 h, 换液后再加入 SNAP, 继续培养一定时间. 在测定 Hb、GSH 对细胞的保护作用时, 细胞先与 5 μmol/L Hb 或 1 mmol/L GSH 温育 15 min, 然后再加入 SNAP.

1.3 细胞存活率

通过 MTT 分析测定细胞存活率^[6].

1.4 测定 DNA 断裂

采用 Boehringer Mannheim Cell Death Detection ELISA^{PLUS} 细胞凋亡 ELISA 试剂盒定量测定 DNA 断裂, 以反映细胞胞浆中单核小体、寡聚核小体相对含量的加强系数 (enrichment factor) 为表征 DNA 断裂的参数^[7].

1.5 形态学观察

采用激光共聚焦成像技术观察细胞形态. 将经过 0.5 mmol/L SNAP 处理 4 h 后的小脑颗粒神经元用 PBS 洗 2 遍, 加入 2.5 μmol/L AO, 染色 5 min 后在 Bio-Rad MRC1024MP 多光子激光扫描显微镜下进行单光子共聚焦成像观察.

1.6 测定细胞内活性氧水平

以 DCFH-DA 为指示细胞胞浆内过氧化物 (主要为过氧化氢) 含量的荧光探针^[8,9], 以 DHR123 为指示线粒体内过氧化物 (主要为过氧化亚硝基) 含量的荧光探针^[10], 采用激光共聚焦成像技术定

性测定细胞胞浆内以及线粒体内活性氧的水平. 细胞经 0.5 mmol/L SNAP 处理 1 h 后用含有 0.2 % BSA 的 PBS 洗 2 遍, 加入 10 μmol/L DCFH-DA 或 2 μmol/L DHR123, 37 °C 温育 60 min (DCFH-DA) 或 45 min (DHR123) 后, 在 Bio-Rad MRC1024MP 多光子激光扫描显微镜下进行单光子共聚焦成像观察.

2 结 果

2.1 SNAP 对细胞存活率的影响

MTT 分析表明小脑颗粒神经元经 0.5 mmol/L SNAP 作用 12 h 后, MTT 还原率为正常细胞的 (67.9 ± 6.3) %, 提示 SNAP 引发了神经细胞死亡 (表 1). 当神经细胞中 GSH 的合成被 L-BSO 抑制后, SNAP 的细胞毒性明显增强. 经 0.1 mmol/L L-BSO 作用 12 h 后再被 0.5 mmol/L SNAP 作用 12 h 的细胞, 其 MTT 还原率仅为正常细胞的 (34.7 ± 6.5) %. 单独用 0.1 mmol/L L-BSO 处理细胞不能引发神经细胞死亡, 而经一氧化氮清除剂 Hb 预处理的细胞其 MTT 还原率为正常细胞的 (94.5 ± 1.9) %, 表明在本实验条件下是一氧化氮造成细胞死亡. 用 1 mmol/L 抗氧化剂 GSH 预处理能有效防止一氧化氮引发的细胞死亡, 提示活性氧可能参与了一氧化氮引发神经细胞死亡的过程.

Table 1 Cell death induced by nitric oxide in cerebellar granule cells

t/h	Relative cell viability/ %				
	0	3	6	9	12
Control	100 ± 3.3	101.5 ± 0.9	99.6 ± 3.9	101.6 ± 2.5	102.6 ± 3.8
L-BSO	100 ± 3.7	98.4 ± 2.6	96.7 ± 3.3	94.8 ± 1.9	91.8 ± 4.4
SNAP	100 ± 2.8	91.3 ± 1.8	76.9 ± 2.8 ¹⁾	71.6 ± 5.4 ¹⁾	67.9 ± 6.3 ¹⁾
L-BSO + SNAP	100 ± 2.4	84.5 ± 2.7	61.8 ± 5.4 ¹⁾	40.7 ± 5.1 ¹⁾	34.7 ± 6.5 ¹⁾
Hb + SNAP	100 ± 2.2	98.7 ± 3.5	97.6 ± 2.1 ²⁾	93.4 ± 4.8 ²⁾	94.5 ± 4.6 ²⁾
GSH + SNAP	100 ± 3.6	95.1 ± 0.4	97.3 ± 2.6 ²⁾	93.4 ± 3.6 ²⁾	91.6 ± 1.7 ²⁾

Cerebellar granule cells were treated with different drugs and then the viability of cells was measured by MTT assay. ¹⁾ $P < 0.01$ in comparison with control cells; ²⁾ $P < 0.01$ in comparison with SNAP-treated cells. Data were mean ± SD of 6 samples.

2.2 SNAP 引发神经细胞 DNA 链断裂

小脑颗粒神经元经一氧化氮供体 0.5 mmol/L SNAP 处理 12 h 后, DNA 链逐渐在核小体间发生断裂, 其胞浆中单核小体及寡聚核小体的相对含量 (以加强系数表征) 为 2.03 ± 0.16, 远高于对照细

胞 (1.00 ± 0.12). 用 L-BSO 预处理细胞大大增强了 SNAP 引发的神经细胞 DNA 链断裂, 而经 5 μmol/L Hb 或 1 mmol/L GSH 预处理能有效拮抗 SNAP 引发的神经细胞 DNA 链断裂 (图 1).

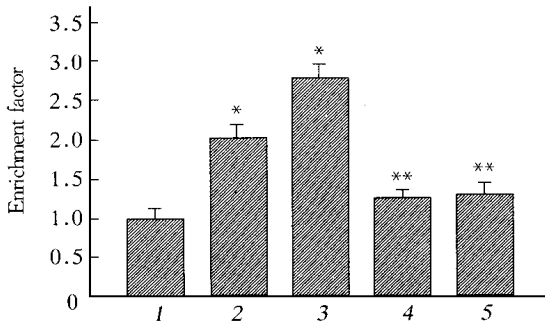


Fig. 1 DNA fragmentation induced by nitric oxide in cerebellar granule cells

Cerebellar granule cells were treated with different drugs for 12 h and then the DNA fragmentation was measured by ELISA. 1: control; 2: cells treated with 0.5 mmol/L SNAP; 3: cells treated with 0.1 mmol/L L-BSO for 12 h and then treated with 0.5 mmol/L SNAP; 4: cells treated with 5 μmol/L Hb + 0.5 mmol/L SNAP; 5: cells treated with 1 mmol/L GSH + 0.5 mmol/L SNAP. * $P < 0.01$ in comparison with control cells; ** $P < 0.05$ in comparison with SNAP-treated cells. Data were mean \pm SD of 3 samples.

2.3 细胞凋亡的形态特征

激光共聚焦成像观察显示经 SNAP 处理 4 h

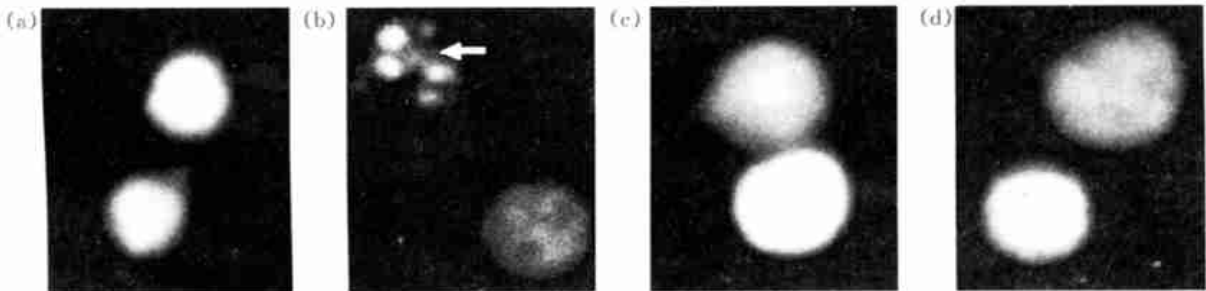


Fig. 2 Nuclear morphology of cerebellar granule cells

Cells were treated with 0.5 mmol/L SNAP for 4 h, stained with AO, and observed under laser confocal scanning microscope. (a) normal cells; (b) cells treated with 0.5 mmol/L SNAP for 4 h, which showed condensed and fragmented nuclei as indicated by the white arrow; (c) cells treated with 5 μmol/L Hb + 0.5 mmol/L SNAP for 4 h; (d) cells treated with 1 mmol/L GSH + 0.5 mmol/L SNAP.

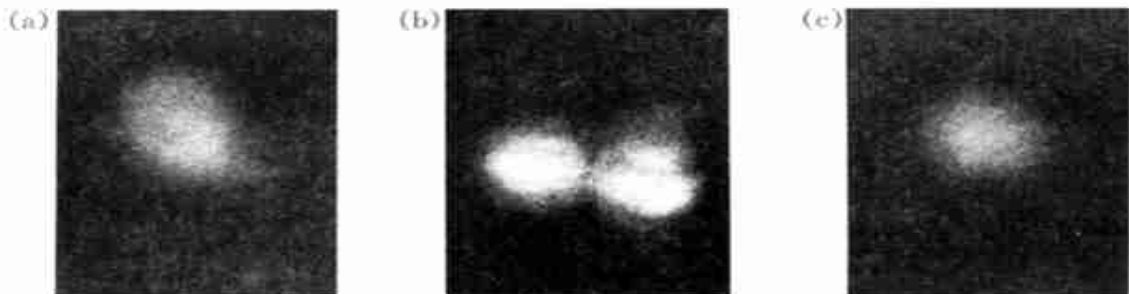


Fig. 3 Fluorescent imaging of reactive oxygen species inside cytoplasm

Cells were treated with 0.5 mmol/L SNAP for 1 h, stained with DCFH-DA for 1 h, and observed under laser confocal scanning microscope. (a) control cells; (b) cells treated with 0.5 mmol/L SNAP for 4 h, which showed much more higher fluorescent intensity; (c) cells treated with 5 μmol/L Hb + 0.5 mmol/L SNAP, which showed normal fluorescent intensity.

DHR123 进入细胞后富集在线粒体中, 并被线粒体内的过氧化物 (主要是过氧化亚硝基) 氧化为具有强荧光的罗丹明 123 (Rh123). Rh123 的量与线粒体内活性氧的量直接相关. 激光共聚焦成像的

后, 部分小脑颗粒神经元出现染色质浓缩等凋亡细胞所特有的形态变化, 并有部分细胞核破碎, 形成凋亡小体 (图 2b), 提示 SNAP 导致的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细胞的形态 (图 2c), GSH 对细胞也具有明显的保护作用 (图 2d).

2.4 SNAP 对细胞胞浆中、线粒体中活性氧水平的影响

DCFH-DA 具有亲脂性, 能够自由扩散进入细胞, 进入细胞后被酯酶水解为亲水性的 DCFH, 从而保留在胞浆中. DCFH 易被细胞胞浆中的过氧化物 (主要是过氧化氢) 氧化为具有荧光的 DCF (2, 7-二氯荧光素), DCF 的量与细胞内过氧化物的量直接相关. 激光共聚焦成像的结果表明小脑颗粒细胞经 0.5 mmol/L SNAP 处理 1 h 后, 细胞的荧光强度明显增强, 提示 SNAP 导致细胞胞浆内内源性过氧化物的产生 (图 3b). Hb 能有效防止细胞内产生过氧化物 (图 3c).

结果表明小脑颗粒细胞经 0.5 mmol/L SNAP 处理 1 h 后, 细胞的荧光强度明显增强, 提示 SNAP 导致神经细胞线粒体产生内源性过氧化物 (图 4b). 经 Hb 预处理的细胞其荧光强度基本与正常细胞相

当 (图 4c).

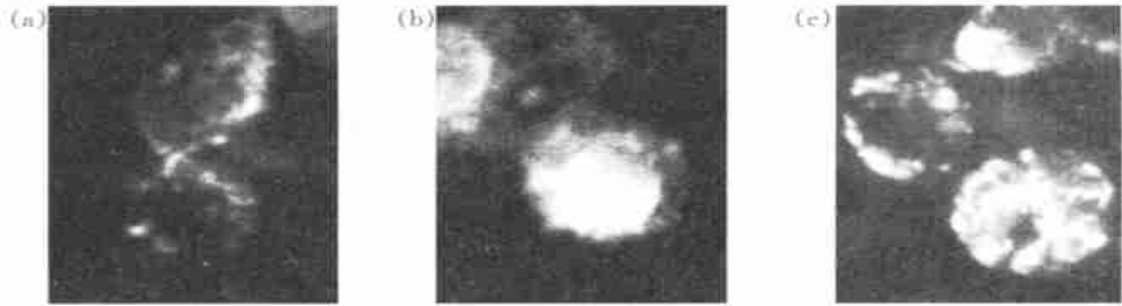


Fig. 4 Fluorescent imaging of reactive oxygen species inside mitochondria

Cells were treated with 0.5 mmol/L SNAP for 1 h, stained with DHR123 for 45 min, and observed under laser confocal scanning microscope. (a) control cells; (b) cells treated with 0.5 mmol/L SNAP for 4 h, which showed much more higher fluorescent intensity; (c) cells treated with 5 μ mol/L Hb + 0.5 mmol/L SNAP, which showed normal fluorescent intensity.

3 讨 论

在生理浓度下,一氧化氮是一种信使分子;在较高浓度下,一氧化氮表现出细胞毒性,可以诱导多种类型的神经细胞凋亡。一氧化氮诱导的神经细胞凋亡是一个十分复杂的过程,除了 NMDA-R 等兴奋性氨基酸受体以及 cGMP、cAMP 等信号分子在这一过程中起重要作用外,活性氧可能也参与了一氧化氮诱导神经细胞凋亡的过程,但这一推测还缺乏直接的实验证据。本研究采用了体外培养 2 d 的未成熟大鼠小脑颗粒神经元作为实验模型,采用激光共聚焦成像技术观察了在一氧化氮诱导神经细胞凋亡的过程中细胞胞浆及线粒体内活性氧水平的变化,首次找出了活性氧参与一氧化氮诱导神经细胞凋亡的直接证据。

MTT 分析、ELISA 分析表明神经细胞中 GSH 的合成被抑制后,一氧化氮供体 SNAP 的神经毒性大大增加,同时外源性 GSH 对 SNAP 引发的神经细胞凋亡具有保护作用,提示 GSH 对于拮抗一氧化氮的神经毒性具有重要的作用。GSH 是一种含有巯基的三肽,是一种重要的内源性抗氧化剂,能够直接清除羟自由基等活性氧,同时它还是重要的抗氧化酶——谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 的底物,作为电子供体酶促还原过氧化氢等过氧化物。已有实验结果表明,SNAP 能导致神经细胞内 GSH 含量下降^[11],EPC-K1、U-83836E 等抗氧化剂能有效拮抗一氧化氮的神经毒性^[6,12],这些结果提示一氧化氮可能通过与活性氧相关的途径诱导神经细胞凋亡。

小脑颗粒神经元经一氧化氮供体 SNAP 作用

1 h,再经 DCFH-DA、DHR123 染色后,其荧光强度明显高于对照细胞,表明一氧化氮处理导致细胞胞浆及线粒体中活性氧的含量明显增加,线粒体中活性氧水平的增加尤为明显。经一氧化氮清除剂 Hb 预处理的细胞其胞浆及线粒体中活性氧的含量基本与正常细胞相当,确证了在本实验条件下是一氧化氮促进内源性活性氧的产生。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多种成分的活性^[13]。线粒体呼吸链酶的活性受抑制后,线粒体电子泄漏增加,致使线粒体内内源性超氧阴离子自由基的生成大大增加^[14]。超氧阴离子自由基能够与一氧化氮发生快速反应 ($k = 6.7 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$),生成具有强氧化性的过氧化亚硝基;同时超氧阴离子自由基质子化后能够扩散出线粒体,进入胞浆甚至邻近细胞。激光共聚焦成像的结果正是一氧化氮促进线粒体产生活性氧的直接证据。内源性的活性氧对线粒体等细胞器造成氧化损伤,并且消耗细胞内内源性抗氧化剂(如 GSH 等)。当细胞的抗氧化防御体系不足以清除这些内源性活性氧时,活性氧就会对细胞造成不可逆的氧化损伤,并最终导致细胞凋亡。细胞中谷胱甘肽的合成被抑制后,SNAP 的神经毒性明显增强,同样说明活性氧可能是一氧化氮诱导神经细胞凋亡的重要介导者之一。由神经细胞线粒体产生的内源性活性氧所引发的氧化损伤可能是许多神经退行性疾病的重要病原因素^[15]。

本实验首次采用激光共聚焦成像技术直接观察到了一氧化氮诱导神经细胞产生的内源性活性氧,确证了活性氧参与一氧化氮诱导神经细胞凋亡的过

程. 与之相应, 一些能够有效防止一氧化氮产生内源性活性氧的药物可能对一氧化氮引发的神经损伤具有保护作用. 实验结果有助于深入了解一氧化氮损伤神经系统的机理, 并可以为预防、治疗与一氧化氮产生过多有关的神经系统疾病提供基础理论指导.

参 考 文 献

- 1 Garthwaite J, Boulton C L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 1995, **57**: 683 ~ 706
- 2 Vidwans A S, Kim S, Coffin D O, *et al.* Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murin mixed cortical cell culture. *J Neurochem*, 1999, **72** (5): 1843 ~ 1852
- 3 Palluy O, Rigaud M. Nitric oxide induces cultured cortical neuron apoptosis. *Neurosci Lett*, 1996, **208** (1): 1 ~ 4
- 4 Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, *et al.* Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem*, 1996, **67** (6): 2484 ~ 2493
- 5 Gross S S, Wolin M S. Nitric oxide: Pathophysiology mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 1995, **57**: 737 ~ 769
- 6 卫涛涛, 陈 畅, 侯京武, 等. 一氧化氮损伤神经细胞线粒体并诱导细胞凋亡. *科学通报*, 2000, **45** (5): 422 ~ 426
Wei T T, Chen C, Hou B L, *et al.* *Chin Sci Bul*, 2000, **45** (5): 422 ~ 426
- 7 Wei T T, Chen C, Hou J W, *et al.* The antioxidant EPC-KI attenuates NO-induced mitochondrial dysfunction, lipid peroxidation and apoptosis in cerebellar granule cells. *Toxicology*, 1999, **134** (2 ~ 3): 117 ~ 126
- 8 Li Y H, Maher P, Schubert D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron*, 1997, **19** (2): 453 ~ 463
- 9 Teixeira H D, Schumacher R I, Meneghini R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (14): 7872 ~ 7875
- 10 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** (1 ~ 2): 205 ~ 214
- 11 Bola os 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** (7): 995 ~ 1001
- 12 Grasbois-Frodl E M, Brundin P. Mesencephalic neuron death by congeners of nitrogen monoxide is prevented by the lazaroid U-83836E. *Exp Brain Res*, 1997, **113** (1): 138 ~ 143
- 13 Bola os J P, Almeida A, Stewart V, *et al.* Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 1997, **68** (6): 2227 ~ 2240
- 14 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** (1): 85 ~ 92
- 15 Beal M F. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 1996, **6** (5): 661 ~ 666

Reactive Oxygen Species are Involved in Nitric Oxide-Induced Apoptosis of Neurons *

ZHANG Chun-Yang¹⁾, WEI Tao-Tao²⁾, MA Hui¹⁾ **, DING Yao¹⁾, CHEN Die-Yan¹⁾,
HOU Jing-Wu²⁾, CHEN Chang²⁾, XIN Wei-Juan²⁾

¹⁾ Molecular and Nano Sciences Laboratory of Education Ministry, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract With redox-sensitive fluorescence probes DCFH-DA and DHR123, the formation of cytosolic and intramitochondrial reactive oxygen species (ROS) inside immature rat cerebellar granule cells during the apoptosis induced by nitric oxide donor S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) was monitored by laser confocal scanning microscopy. The cytosolic and intramitochondrial ROS increase significantly after 0.5 mmol/L SNAP treatment for 1 h. Pre-treatment with the nitric oxide scavenger hemoglobin can effectively inhibit the formation of cytosolic and intramitochondrial ROS and protect neurons from apoptosis. Adding glutathione can also protect neurons from apoptosis, and the cytotoxicity of nitric oxide increases significantly while the synthesis of glutathione is inhibited. The results indicated that ROS might be involved in NO-induced apoptosis in neural cells and glutathione might be the endogenous antioxidant to protect neurons from oxidative injury.

Key words primary rat cerebellar granule cells, apoptosis, nitric oxide, reactive oxygen species, laser confocal scanning microscopy, glutathione

* This work was supported by a grant from Tsinghua University Fund for Basic and National Nature Science Foundation of China (39800035).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62784531-167, E-mail: Mahui@tsinghua.edu.cn

Received: January 16, 2000 Accepted: February 29, 2000