论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2434-03

环鸟苷酸依赖性蛋白激酶拮抗酒精性中枢神经细胞毒性机制研究

戴 德 (广东医学院附属医院耳鼻咽喉科,湛江 524001)

提 要:目的 探讨环鸟苷酸依赖性蛋白激酶对酒精致鼠小脑颗粒细胞(cerebellar granule cells, CGC)毒性作用的影响机制。**方法** 通过光学显微镜观察一氧化氮(NO)释放剂,环鸟苷酸及环鸟苷酸依赖性蛋白激酶抑制剂对鼠小脑颗粒细胞存活的影响。**结果** NO释放剂,环鸟苷酸在无酒精组中促进细胞的生存,并能对CGC产生保护作用,减少酒精对细胞的杀死。环鸟苷酸依赖性蛋白激酶抑制剂可抑制二者对细胞的作用。**结论** 环鸟苷酸依赖性蛋白激酶在NO释放剂和环鸟苷酸促鼠小脑颗粒细胞的存活和抵抗酒精性神经毒性过程中具有重要的作用。

关键词:小脑颗粒细胞;环鸟苷酸依赖性蛋白激酶;神经营养;神经保护

中图法分类号:R345.7;R741.02;R749.62 **文献标识码**:A

Role of cGMP-dependent protein kinase against ethanol neurotoxicity of cerebellar granule cells

DAI De (Department of Otolaryngology, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To analyze the function of cGMP-dependent protein kinase (PKG) in the survival of cultured rat cerebellar granule cells (CGC). **Methods** CGC culture was incubated for 24 h before addition of ethanol and different reagents, such as Deta-NONOate (a NO donor), Br-cGMP and Rp-8-pCPT-cGMPS (a cGMP-dependent protein kinase inhibitor). After the treatment, samples were incubated for another 24 h, then the cells were collected and counted by using hemocytometer. **Results** Deta-NONOate and Br-cGMP enhanced the cell survival in the absence of ethanol, indicating their neurotrophic effects. They showed neuroprotective effect on the cultured CGC since they could reduce the ethanol-induced cell death. Inhibiting PKG with Rp-8-pCPT-cGMPS could eliminate both neurotrophic and neuroprotective effects mediated by Deta-NONOate and Br-cGMP. **Conclusion** cGMP-dependent protein kinase plays a key role in the cultured CGC survival and protects the cells against ethanol neurotoxicity.

Key words: cerebellar granule cell; cGMP-dependent protein kinase; neurotrophy; neuroprotective effect

酗酒对妊娠期妇女可造成双重损害:不仅影响成人,而且妨害胎儿中枢神经系统发育,尤其是导致胎儿酒精综合征(fetal alcohol syndrome, FAS),但其毒性机制尚未明确。研究表明一氧化氮(NO)对中枢神经细胞的损伤起调控作用[1],由于NO能激活小脑颗粒细胞上的可溶性鸟苷酰环化酶,产生环鸟苷酸(cGMP),后者可通过环鸟苷酸依赖性蛋白激酶(cGMP-dependent protein kinase, PKG)发挥作用。本研究对环鸟苷酸依赖性蛋白激酶与酒精致鼠小脑颗粒细胞毒性作用的影响进行了研讨。

1 材料与方法

1.1 细胞模型及分组

选用广东医学院实验动物中心的15 d龄健康Sprague-Dawley小白鼠32只,雌雄不拘,体质量12~15 g,小脑颗粒细胞的提取和培养物的设置按照Bonthius等[2]的方法。细胞被置于96孔型培养皿中,每孔加入0.3 ml培养液,含有细胞4.6×10^5/ml,为避免血清中所含物质对实验结果的潜在影响,选择非血清性培养液。实验分为2个部分,首先为检测酒精、Deta-NONOate和PKG抑制剂(Rp-8-pCPT-cGMPS)的作用,设置2组(无酒精组和酒精组),每组又分为4小组(空白对照组、Deta-NONOate组、Rp-8-pCPT-cGMPS组和Deta-NONOate + Rp-8-pCPT-cGMPS组)。

其次,为了检测酒精、Br-cGMP和PKG抑制剂的作用,设置

基金项目:湛江市科学技术局科研基金资助项目(2006C01021)
Supported by the Research Foundation of Scientific Administration of Zhanjiang (2006C01021)

作者简介:戴 德(1965-),男,湖南省常德市人,硕士,副教授,主要从事耳神经病理学方面的研究。电话:(0759)2387024, E-mail:daide@126.com

收稿日期:2005-10-21;**修回日期**:2006-05-29

2 组(无酒精组和酒精组),每组又分为 4 小组(空白对照组、Br-cGMP 组、Rp-8-pCPT-cGMPS 组和 Br-cGMP + Rp-8-pCPT-cGMPS 组)。

1.2　药物和仪器

细胞培养物被放置于 37 ℃ CO_2 恒温箱内 24 h 后,向酒精组中加入酒精,使之浓度达到 400 mg/L。将浓度为 3 400 μmol/L 的 NO 释放剂 2′, 2′-(hydroxynitrosohydrazono) bis-ethanamine(Deta-NONOate,购自 Cayman Chemical) 溶液 10 μl,浓度均为 340 μmol/L 的 Br-cGMP (购自 Sigma)、环鸟苷酸依赖性蛋白激酶抑制剂 Guanosine 3′,5′-cyclic Monophosphorothioate, 8-(4-Chlorophenylthio)-, Rp-Isomer, triethylammonium salt (Rp-8-pCPT-cGMPS,购自 Calbiochem Inc.)各 10 μl 同时加入相应实验组,空白对照组中仅加入等量培养液。随后,将所有细胞培养物存放于密封容器中,再留置于 37 ℃ CO_2 恒温箱内 24 h 后进行 CGC 收集和计数。

1.3　细胞收集和计数

经过共 48 h 的细胞培养,采用文献[2]的方法收集 CGC,细胞用台盼蓝(trypan blue)染色法处理后,采用红细胞计数器统计存活数。

1.4　统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS/STATMixed 统计软件行多因素方差分析和组间 Bonferroni 检验。

2　结果

在无酒精组中,无论是 100 μmol/L Deta-NONOate,或是 10 μmol/L Br-cGMP,均能使细胞的数量明显高于空白对照组,且都具有神经营养作用。浓度为 10 μmol/L 的 Rp-8-pCPT-cGMPS 虽不能对 CGC 数量产生影响,却能抑制 Deta-NONOate 或 Br-cGMP 的作用。

在各酒精组中,24 h 的酒精作用可不同程度地减少各空白对照组中的细胞数,较相应无酒精空白对照组减少 26.7% ~ 27.1%,见表 1、2。

表 2 则显示 Br-cGMP 能有助 CGC 对抗酒精的损害作用,使细胞损失降低至仅占相对应的无酒精组细胞数的 14.1%,明显低于空白对照组 26.7% 的细胞损失率($P<0.01$)。

表 1　Deta-NONOate、Rp-8-pCPT-cGMPS 和酒精对鼠小脑颗粒细胞存活的影响($n=7$, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞计数($\times 10^4$)	酒精致细胞损失率(%)(与各对应无酒精组比较)
无酒精组		
空白对照	22.3 ± 1.2	
Deta-NONOate	26.9 ± 0.7[a]	
PKG 抑制剂	22.7 ± 0.8	
Deta-NONOate + PKG 抑制剂	22.5 ± 1.3	
酒精组		
空白对照	16.2 ± 0.9	27.1 ± 1.7
Deta-NONOate	23.5 ± 1.2[b]	13.6 ± 0.8[b]
PKG 抑制剂	16.7 ± 1.4	26.5 ± 1.2
Deta-NONOate + PKG 抑制剂	16.8 ± 0.5	25.4 ± 1.1

a: $P<0.01$, 与无酒精空白对照组比较; b: $P<0.01$, 与酒精空白对照组比较

表 2　Br-cGMP、Rp-8-pCPT-cGMPS 和酒精对鼠小脑颗粒细胞存活的影响($n=7$, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞计数($\times 10^4$)	酒精致细胞损失率(%)(与各对应无酒精组比较)
无酒精组		
空白对照	21.4 ± 1.1	
Br-cGMP	24.6 ± 0.8[a]	
PKG 抑制剂	21.2 ± 0.5	
Br-cGMP + PKG 抑制剂	21.9 ± 0.7	
酒精组		
空白对照	15.8 ± 0.9	26.7 ± 1.2
Br-cGMP	21.5 ± 0.6	14.1 ± 1.3[b]
PKG 抑制剂	16.0 ± 1.2	25.3 ± 0.8
Br-cGMP + PKG 抑制剂	15.9 ± 1.4	27.5 ± 1.0

a: $P<0.01$, 与无酒精空白对照组比较; b: $P<0.01$, 与酒精空白对照组比较

3　讨论

NO 作为生物体内一种结构简单的多功能生物信号分子,在人体正常功能调节和许多疾病的病理生理过程中起着十分重要的作用。例如,NO 是内皮松弛因子,能使血管平滑肌松弛;巨噬细胞等在吞噬和刺激时活化释放 NO 作为杀伤肿瘤细胞和外来入侵物的毒性分子,而在缺血再灌注等病理过程中却可损伤正常细胞。NO 的这种多样性和所产生的不同结果被认为可能与其作用浓度或与细胞的内外环境因素相关[3],或与细胞的种类及成熟程度的不同而有差异表现。

NO 能缓解因去除 PC12 细胞培养液中的神经营养物质后所引起的 PC12 细胞凋亡,并且可溶性鸟苷酰环化酶抑制剂能消除 NO 对 PC12 细胞的这种营养作用[4]。通过对实验中无酒精组标本的观察,我们发现在细胞培养过程中 CGC 并不增殖,而在培养了仅 24 h的 CGC 中发现有细胞凋亡的现象。因此,我们认为 Deta-NONOate 和 Br-cGMP 在无酒精状态下的神经营养作用很可能是经小脑颗粒细胞中存在的 NO-环鸟苷酸依赖性蛋白激酶(NO-PKG)通路,即可溶性鸟苷酰环化酶受 NO 激活,产生环鸟苷酸,后者则激活环鸟苷酸依赖性蛋白激酶而最终抑制了 CGC 的凋亡过程。同样地,通过 Rp-8-pCPT-cGMPS 对 PKG 的抑制而拮抗了 Deta-NONOate 和 Br-cGMP 的神经营养作用,亦支持了此一推断。

酒精的中枢神经细胞毒性作用机制未明,近来的研究认为酒精可能抑制了神经元上的 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体活性并阻碍了 NMDA 对其营养作用,导致了细胞的凋亡[5]。但在本实验中通过对 CGC 核的荧光标记检验结果却显示酒精并不能增加

凋亡细胞的比例。相反,在酒精组标本内所观察到的细胞形态学的改变均提示酒精是造成细胞坏死(而非凋亡)的主要原因。同时,实验所用的培养液为非血清性,其中不含谷氨酸和天冬氨酸,而两者均为 NMDA 受体的激活物,从而排除了以下的可能性:酒精的毒性作用是因阻碍了细胞培养液中的 NMDA 受体与受体激活物的结合所产生的。

实验中酒精对空白对照组细胞造成约 27% 的损失,提示酒精对 CGC 具有神经毒性作用。然而单独加入环鸟苷酸依赖性蛋白激酶抑制剂 Rp-8-pCPT-cGMPS 并未加重酒精造成的细胞损失。所以,酒精的神经细胞毒性作用并非源于对 PKG 的抑制。Deta-NONOate 和 Br-cGMP 能显著减轻酒精对 CGC 的损害作用,将细胞的损失率降低至约 14%,表明 Deta-NONOate 及 Br-cGMP 均具有神经保护作用。然而,此神经细胞保护作用却被 PKG 抑制剂 Rp-8-pCPT-cGMPS 所拮抗,表明 Deta-NONOate 和 Br-cGMP 的神经保护作用可能是由于通过 NO-PKG 通路而对抗了酒精导致的细胞坏死过程。较早的活体动物实验已表明 NO 能对抗酒精导致的鼠大脑神经元退行性变而具有神经保护作用,而近期亦有研究报道了 NO 和环鸟苷酸通过 PKG 而保护 PC12 细胞免于凋亡[6]。

环鸟苷酸蛋白激酶被 cGMP 激活后可促使蛋白质磷酸化[7],其结果可能是影响神经细胞上的 γ-氨基丁酸(GABA)受体活性,或作用于细胞内线粒体 ATP 酶调控离子浓度的变化[8],亦可作用于促有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK kinase)[9],参与 Ras-MAPK 激酶级联途径,干预细胞凋亡信号的传导等。然而,其细胞作用机制尚有待进一步的探讨。

综上,环鸟苷酸蛋白激酶在促进鼠小脑颗粒细胞的生存和抵抗酒精的神经毒性过程中发挥重要的作用。

参考文献:

[1] 苏志达,李 瑜,张留宝. 一氧化氮与中枢神经系统损伤[J]. 南京军医学院学报,2000,22(3):173-175.

[2] BONTHIUS D J, KARACAY B, DAI D, *et al*. FGF-2, NGF and IGF-1, but not BDNF, utilize a nitric oxide pathway to signal neurotrophic and neuroprotective effects against alcohol toxicity in cerebellar granule cell cultures[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 140(1): 15-28.

[3] BRUNE B, VON-KNETHEN A, SANDAU K B. Nitric oxide and its role in apoptosis[J]. Eur J Pharmacol, 1998, 351(3): 261-272.

[4] FARINELLI SE, PARK D S, GREENE L A. Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism[J]. J Neurosci, 1996, 16(7): 2325-2334.

[5] BHAVE S V, SNELL L D, TABAKOFF B, *et al*. Chronic ethanol exposure attenuates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons[J]. J Neurochem, 2000, 75(3): 1035-1044.

[6] HA K S, KIM K M, KWON Y G, *et al*. Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation[J]. FASEB J, 2003, 17(9): 1036-1047.

[7] WANG X, ROBINSON P J. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system[J]. J Neurochem, 1997, 68(2): 443-456.

[8] XU Z, JI X, BOYSEN P G. Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(4): H1433-H1440.

[9] TEJEDO J R, CAHUANA G M, RAMIREZ R, *et al*. Nitric oxide triggers the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway in insulin-producing RINm5F cells by arousing Src to activate insulin receptor substrate-1[J]. Endocrinology, 2004, 145(5): 2319-2327.

(编辑 龙 亮)

(上接 2433 页)

2.2.3 体位 全麻后取半卧位,利于伤口引流。

2.2.4 观察生命体征 严密观察血压、脉搏、呼吸、体温等变化,作好心电及血氧饱和度监测,术后 24 h 内如有出血,可静卧休息,并予以冰球冰敷鼻根部。

2.2.5 心理护理 术后患者对手术的期望值过高,误以为手术结束后立即有视力恢复,要作好心理疏导,告诉其视力恢复时间会较长,以免产生悲观情绪,工作人员进入病房要作好"4 轻",保持病房安静,减少患者不适。

2.2.6 防止颅内感染 注意患者有无高热、头痛、呕吐、抽搐等症状,以免引起颅内感染,如有呕吐及时把头偏向一侧,清除口鼻内分泌物,保持呼吸道通畅。

2.2.7 注意观察伤眼视力恢复情况 术后第 1 天起,每天检查伤眼视力恢复情况,先检查有无光感,眼前手动情况及让患者数指情况,根据患者看到的视标距离计算患者的视力。并定期检查眼部:观察视盘光泽、大小、边界等,以及黄斑中心凹情况,视网膜有无水肿,渗出并同时作好护理记录。

2.2.8 高压氧治疗期间的观察 术后除应用激素、抗生素、扩血管药等治疗外,3 d 后取出纱条应及时行高压氧治疗,术后高压氧治疗对恢复有很好的作用,但对于明显鼻出血、头痛患者应禁用或慎用。

关键词:内窥镜;视神经管减压术;围手术期;护理
中图法分类号:R473.76 文献标识码:B

参考文献:

[1] 张学湘,袁 伟,王 一,等. 鼻内镜下视神经管减压术治疗视神经外伤 10 例[J]. 第三军医大学学报,2005,27(18):1883-1884.

[2] 赵玉林,朱洪梅,姜卫华,等. 鼻内窥镜手术 142 例临床分析[J]. 郑州大学学报:医学版,2004,39(1):136-137.

(编辑 栗 嘉)