论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1028-05

缺氧预适应小鼠脑匀浆去蛋白液中抗缺氧有效成分的初步研究

李 宏[1,2],高钰琪[1] ([1]第三军医大学高原医学系高原生理学与病理生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038;[2]重庆教育学院生命科学与化学系,重庆 400067)

摘 要:**目的** 探讨缺氧预适应小鼠脑匀浆去蛋白液(deproteinized brain tissue extracts of hypoxia-preconditioned mice,DHP)对NGF诱导分化的PC12细胞缺氧耐受性的影响及其与腺苷的关系。**方法** 复制缺氧预适应小鼠模型,高氯酸法制备DHP。HPLC法检测DHP中腺苷含量及正常小鼠脑匀浆去蛋白液(deproteinized brain tissue extracts of normal mice,DN)中腺苷含量。在已分化PC12细胞中加入DHP,以DN作对照,以1.0、10.0、100.0 μmol/L的腺苷为阳性对照,分别于缺氧(2% O_2)培养24、48、72 h后检测MTT值、LDH透出率以及72 h晚期凋亡率。在DHP、10.0 μmol/L腺苷阳性对照组中分别加入腺苷A_1、A_{2A}受体阻断剂DPCPX、SCH 58261(5.0 μmol/L),以DN作对照,缺氧24、48、72 h后分别检测各组MTT值、LDH透出率。**结果** DHP中腺苷含量显著高于DN;缺氧24 h时,DHP组MTT值显著高于DN组,其LDH透出率显著低于DN组。随缺氧时间延长,DHP保护作用逐渐减弱,至72 h时,DHP组MTT值、LDH透出率、晚期凋亡率与DN组均无显著差异;A_{2A}受体阻断剂SCH 58261可阻断DHP的保护作用。**结论** DHP在缺氧初期对分化PC12细胞的保护作用与缺氧预适应中腺苷含量增加有关,保护作用可能通过A_{2A}受体实现。

关键词:缺氧;预适应;小鼠;脑匀浆去蛋白液;分化PC12细胞
中图法分类号:R322.81;R363;R364.4 **文献标识码**:A

Deproteinized brain tissue extracts from hypoxia-preconditioned mice protect differentiated PC12 cells

LI Hong[1,2], GAO Yu-qi[1] ([1]Key Laboratory of High Altitude Medicine of PLA, Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Life Sciences and Chemistry, Chongqing College of Education, Chongqing 400067, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of deproteinized brain tissue extracts from hypoxia-preconditioned mice (DHP) on the tolerance of differentiated PC12 cells (DPC12) to hypoxia and its relationship with adenosine (ADO). Methods The mouse model of acute repetitive hypoxia was reproduced and deproteinized brain tissue extracts were prepared by means of perchloric acid. High performance liquid chromatogram (HPLC) was used to determine ADO contents in the extracts. DHP was added into the culture of 4-day DPC12 cells, and deproteinized brain tissue extracts of normal mice (DN) were used as control. Besides, ADO at final concentrations of 1.0, 10.0, 100.0 mol/L was used as positive controls. Then DPC12 cells were cultured in hypoxia (2% O_2). After 24-, 48-, 72-hour hypoxia exposure, colorimetric method of tetrazolium salt MTT assays (A_{570}) and lactate dehydrogenase (LDH) release assays were conducted. Furthermore, apoptotic percentages at late stage (72-hour hypoxia) were detected with Hoechst 33258 stained fluorescence microscopy; Then, adenosine A_1, A_{2A} receptor antagonists, DPCPX and SCH 58261, were respectively added into DHP groups and 10.0 μmol/L adenosine positive control groups, with DN group as control; MTT, LDH assays were performed after 24-, 48-, 72-hour hypoxia. Results ADO contents in DHP significantly increased; MTT value of DHP group was significantly higher than that of DN group, and LDH release percentage was significantly lower than

基金项目:国家自然科学基金重大项目(30393131)
Supported by the Major Program of the National Natural Science Foundation of China (30393131)
作者简介:李 宏,女,重庆市人,博士研究生,副教授,主要从事缺氧预适应相关方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68752340-8202,E-mail:lihongcqec@163.com
通信作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gyq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-01-21 修回日期:2008-03-19

that of DN group after 24-hour hypoxia. As the period of hypoxia prolonged, DHP gradually lost its protective effect. After 72-hour hypoxia, MTT value, LDH release percentage and apoptotic percentage at late stage of DHP group showed no significant differences from those of DN group. SCH 58261 but not DPCPX blocked the protective effect of DHP. **Conclusion** The protective effects of DHP on DPC12 cells at early stage were related to ADO increase in DHP and the effects might be mediated *via* A_{2A} receptor.

Key words: hypoxia; preconditioning; mouse; deproteinized brain tissue extracts; differentiated PC12 cells

缺氧为常见病理过程,严重时可导致机体代谢机能障碍甚至死亡,寻找可增强机体抗缺氧能力的药物和措施是目前研究的一个热点。研究表明,动物或细胞经非致死量缺氧后,可对随后出现的严重缺氧产生耐受性,从而减轻其对动物或细胞的损害[1,2],即产生缺氧预适应保护作用。小鼠急性重复缺氧能显著提高小鼠本身对缺氧的耐受性,其机制可能与内源性保护机制的激活、抗缺氧活性物质的产生等因素有关。用此模型制备的预适应小鼠脑匀浆提取液既能显著提高正常小鼠对缺氧的耐受性,又能显著提高离体细胞对缺氧的耐受性[3,4]。但其对于分化神经元细胞的作用、其中有效成分的化学定位以及作用的量效关系和时效关系不清楚。研究表明腺苷(adenosine, ADO)对缺血/缺氧大脑及离体培养细胞均有保护作用[5-7],但是预适应小鼠脑匀浆提取液对分化神经元细胞的保护作用是否与腺苷有关少见报道。因此,本研究建立了分化神经元细胞模型,探讨预适应小鼠脑匀浆去蛋白液对分化神经元细胞缺氧耐受性的影响,以确定小鼠脑匀浆去蛋白液中抗缺氧的有效成分是否与腺苷有关以及腺苷的作用规律。

1　材料与方法

1.1　缺氧预适应小鼠脑匀浆去蛋白液的制备

昆明小鼠 10 只,体质量 18 ~ 20 g,雌雄各半(第三军医大学实验动物中心)。按文献[3]复制小鼠缺氧模型,第 1 次缺氧耐受时间为(15.08 ± 2.21) min,经连续 4 次缺氧,第 4 次耐受时间为(139.10 ± 27.05) min (n = 10),缺氧预适应效果极显著(P < 0.001)。将预适应小鼠断头,液氮冻存。冰浴剥离小鼠全脑,称质量。按 100 mg 脑组织加 400 μl PBS 稀释的 1.0 mol/L $HClO_4$ 计算加入 $HClO_4$,匀浆器匀浆,18 000 r/min,4℃,离心20 min,取上清,按 100 mg 脑组织所得上清加约 90 μl 2.5 mol/L Na_2CO_3 计算,加入 Na_2CO_3 调 pH 值至 7.2 ~ 7.4,18 000 r/min,4℃,离心20 min,取上清即为预适应小鼠脑匀浆去蛋白液(deproteinized brain tissue extracts of hypoxia-preconditioned mice, DHP)。同法制备正常小鼠脑匀浆去蛋白液(deproteinized brain tissue extracts of normal mice, DN)(n = 4)。

1.2　DHP、DN 中蛋白检测

分别取制备的 DHP、DN 各样品 5 μl,与上样缓冲液混合后上 SDS-PAGE 凝胶电泳。常规电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色液、脱色液(碧云天公司)染色、脱色、拍照。

1.3　HPLC 检测 DHP、DN 中的腺苷含量

用 HPLC 采用外标法分别定量检测 DHP、DN 中腺苷含量:色谱柱:Waters C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相:甲醇/水(体积分数 = 14∶86);检测波长:260 nm;流速:0.8 ml/min,进样量:20 μl;柱温:室温,理论塔板数按腺苷峰计算不低于 4 000。将 DHP、DN 滤器除菌,-20 ℃保存。

1.4　PC12 细胞的培养及诱导分化

按文献[8]常规培养、诱导分化 PC12 细胞。用分化第 4 天细胞进行各项检测[9]。分化用培养板用多聚赖氨酸包被。

1.5　实验分组

实验分 7 组。在 $A_{1.0}$、$A_{10.0}$、$A_{100.0}$ 组中加入腺苷溶液使其终浓度分别为 1.0、10.0、100.0 μmol/L;DHP 组:加入 DHP(浓度约 8.0 μmol/L);DN 组:加入 DN(浓度约 2.0 μmol/L);HPBS 组:只加等体积的 PBS;以上 6 组均经过缺氧培养;NPBS 组:只加等体积的 PBS 作溶剂对照。

1.6　DHP 对分化 PC12 细胞 MTT 值的影响

接种细胞于 96 孔板(4.0×10^3/孔),按照‘1.4’培养并诱导分化。按照‘1.5’分组并加样。常氧培养 24 h 后,除 NPBS 组外,其余各组缺氧培养 24、48、72 h。NPBS 组继续常氧培养相应时间。培养结束,按文献[8]中 MTT(Sigma 公司)方法,检测吸光度值[D(570)]。各组每个时间点做 3 个复孔,进行 3 次独立实验。

1.7　DHP 对分化 PC12 细胞 LDH 透出率的影响

接种 PC12 细胞于 24 孔板(1.0×10^4/孔),按照‘1.4’培养并诱导分化。按‘1.5’分组并加样。常氧培养 24 h 后,每孔取培养液 50 μl 检测 LDH 活力(LDH_0)。随后缺氧培养 24、48、72 h,NPBS 组继续常氧培养相应时间。处理结束后,每孔取培养液 50 μl 检测缺氧相应时间培养液的 LDH 活力(LDH_1)。每孔加等体积 2% Triton X-100,使其终浓度为 1%,静置 10 min,洗下细胞碎片,4℃,8 000 × g,离心 5 min,取上清检测 LDH 活力(LDH_a)(南京建成 LDH 试剂盒)。根据公式计算 LDH 透出率:LDH 透出率(%) = ($LDH_1 - LDH_0$)/LDH_a × 100 %。各组每个时间点做 3 个复孔,进行 3 次独立实验。

1.8　DHP 对分化 PC12 细胞晚期凋亡率的影响

接种细胞于预置灭菌盖玻片的 24 孔板(2.0×10^4/孔),按照‘1.4’培养并诱导分化。按照‘1.5’分组并加样。常氧培养 24 h 后,除 NPBS 组外其余各组缺氧培养 72 h,NPBS 组继续常氧培养 72 h。按照文献[10]中方法用 Hoechst 33258(Sigma 公

司)染色,荧光显微镜观察。随机计数500个细胞,计算凋亡晚期细胞百分率。

1.9 DHP合并腺苷受体阻断剂对分化PC12细胞MTT和LDH透出率的影响

根据1.6、1.7项的实验结果,以腺苷A_1受体阻断剂DPCPX(Sigma公司)、腺苷A_{2A}受体阻断剂SCH 58261(Sigma公司)合并DHP作用于缺氧、分化PC12细胞。实验分9组:①缺氧PBS组(HPBS组)、②常氧PBS组(NBPS组)、③DHP组、④DHP+DPCPX组、⑤DHP+SCH 58261组、⑥DN组、⑦腺苷10.0 μmol/L组、⑧腺苷10.0 μmol/L+DPCPX组、⑨腺苷10.0 μmol/L+SCH 58261组。按照1.6、1.7中相同方法分别检测缺氧24、48、72 h分化PC12细胞的MTT值和LDH透出率。参照文献[11]设置DPCPX、SCH 58261终浓度分别为5 μmol/L。

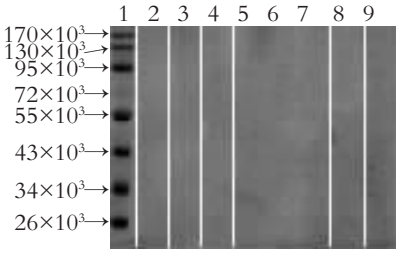
1.10 统计学分析

结果以$\bar{x} \pm s$表示,用SPSS10.0软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 DHP、DN样品中蛋白检测结果

经过SDS-PAGE凝胶电泳、考马斯亮蓝染色后发现,在制备的4个DHP、4个DN样品中均无蛋白条带出现(图1)。



1:标准;2-5:DHP组各样品;6-9:DN组各样品($n=4$)

图1 DHP、DN SDS-PAGE电泳图 (考马斯亮蓝R-250染色)

2.2 DHP、DN中腺苷含量HPLC检测结果

HPLC结果显示:腺苷标准品的出峰时间在6.7~7.0 min之间,在DN色谱图上显示腺苷峰面积较小,而DHP的色谱峰面积较大(图2),经过峰面积计算,DN组中腺苷浓度为:(1.20±0.14) μg/ml,DHP组中腺苷浓度为:(2.84±0.75) μg/ml,2组间有显著差异($P<0.05$)(图2)。

2.3 NGF诱导PC12细胞分化

经过NGF诱导后,PC12细胞形成突起,细胞失去分裂、增殖能力。

2.4 DHP对缺氧、分化PC12细胞的影响

2.4.1 DHP对缺氧、分化PC12细胞MTT值的影响 缺氧24、48、72 h时,HPBS组MTT值均显著低于NPBS组,说明本研究设置的缺氧条件可显著降低分化PC12细胞活力。

缺氧24 h时,腺苷阳性对照组$A_{10.0}$、$A_{100.0}$组MTT值均显著高于HPBS组,且随腺苷浓度增加,MTT值增加,说明腺苷对缺氧、分化PC12细胞有依赖于浓度的保护作用;DHP组MTT值显著高于HPBS组、也显著高于DN组、与腺苷$A_{10.0}$接近。缺氧48 h,$A_{100.0}$组MTT值显著高于HPBS组,DHP组与HPBS组、DN组比较均无显著差异。缺氧72 h,腺苷阳性对照组MTT值与HPBS组比较,均无显著差异;DHP组与HPBS组、与DN组比较均无显著差异(表1)。

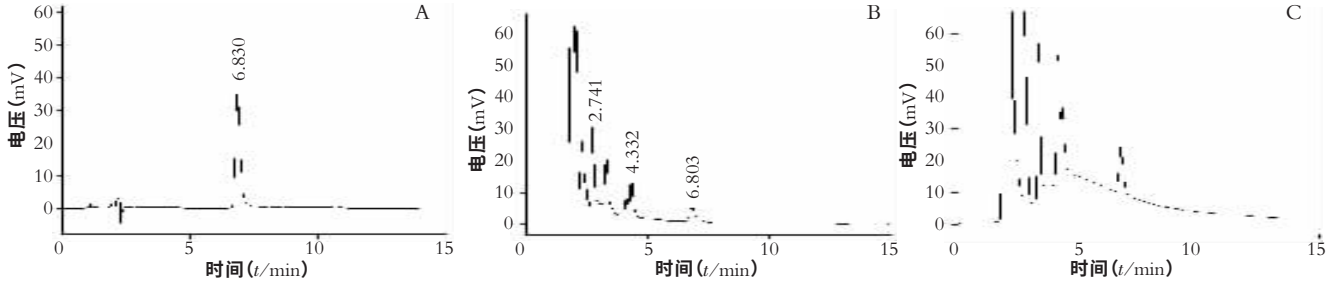
2.4.2 DHP对分化PC12细胞LDH透出率的影响 缺氧培养24、48、72 h时,HPBS组的LDH透出率均显著高于NPBS组,说明本研究设置的缺氧条件对分化PC12细胞有显著损伤作用。

缺氧24 h,腺苷阳性对照组中$A_{10.0}$组、$A_{100.0}$组的LDH透出率显著低于HPBS组;DHP组的LDH透出率均显著低于HPBS组和DN组。缺氧48 h,腺苷$A_{100.0}$组显著低于HPBS组;DHP组与HPBS组、与DN组均无显著差异。缺氧72 h,腺苷阳性对照组与HPBS组无显著差异;DHP组与HPBS组、与DN组也无显著差异(表2)。

表1 DHP对分化PC12细胞MTT值的影响[$D(570)$, $n=3$, $\bar{x} \pm s$]

组别	缺氧24 h	缺氧48 h	缺氧72 h
PBS对照组			
NPBS	2.46±0.21	2.37±0.13	1.97±0.16
HPBS	1.89±0.13[a]	1.65±0.15[a]	1.55±0.10[a]
腺苷阳性对照组			
$A_{1.0}$	1.96±0.19	1.85±0.09	1.83±0.03
$A_{10.0}$	2.21±0.10[b]	1.93±0.16	1.85±0.07
$A_{100.0}$	2.25±0.13[b]	1.97±0.11[b]	1.86±0.10
小鼠脑匀浆去蛋白液组			
DN	1.98±0.07	1.89±0.12	1.69±0.14
DHP	2.17±0.11[bc]	1.93±0.13	1.74±0.13

a:$P<0.05$,与NPBS组比较;b:$P<0.05$,与HPBS组比较;c:$P<0.05$,与DN组比较



A 腺苷(ADO)标准品色谱图(腺苷峰在6.7-7.0 min);B:DN色谱图;C:DHP色谱图

图2 DHP和DN色谱图

表 2　DHP 对分化 PC12 细胞 LDH 透出率的影响($n=3$, %, $\bar{x}\pm s$)

组别	缺氧 24 h	缺氧 48 h	缺氧 72 h
PBS 对照组			
NPBS	11.23 ± 3.41	22.15 ± 5.60	41.36 ± 7.50
HPBS	27.51 ± 4.86[a]	41.56 ± 6.05[a]	66.27 ± 11.16[a]
腺苷阳性对照组			
$A_{1.0}$	25.56 ± 6.19	31.87 ± 3.75	59.70 ± 6.86
$A_{10.0}$	16.99 ± 4.17[b]	28.30 ± 6.09	55.76 ± 5.79
$A_{100.0}$	9.93 ± 3.45[b]	27.49 ± 5.33[b]	51.44 ± 7.52
小鼠脑匀浆去蛋白液组			
DN	19.90 ± 2.51	31.27 ± 5.39	55.99 ± 5.53
DHP	12.07 ± 1.97[bc]	29.90 ± 4.92	53.79 ± 6.43

a:$P<0.05$,与 NPBS 组比较;b:$P<0.05$,与 HPBS 组比较;c:$P<0.05$,与 DN 组比较

2.4.3　DHP 对分化 PC12 细胞晚期凋亡率的影响　缺氧 72 h,NPBS 组、HPBS 组、$A_{1.0}$ 组、$A_{10.0}$ 组、$A_{100.0}$ 组、DN 组、DHP 组的凋亡率分别是:(24.03 ± 7.22)、(46.89 ± 4.87)、(43.30 ± 3.94)、(40.34 ± 5.11)、(36.54 ± 5.40)、(42.16 ± 3.10)、(39.82 ± 3.03)。除 HPBS 组晚期凋亡率显著高于 NBPS 组外;DHP 组晚期凋亡率与 DN 组之间,与 HPBS 组之间均无显著差异。

2.4.4　DHP 合并腺苷 A_1 或 A_{2A} 受体阻断剂对分化 PC12 细胞 MTT 和 LDH 透出率的影响　DHP 合并腺苷 A_1 或 A_{2A} 受体阻断剂的 MTT 值显示:缺氧 24 h,$A_{10.0}$ 组、($A_{10.0}$ + DPCPX)组分别显著高于 HPBS 组;($A_{10.0}$ + SCH 58261)组显著低于 $A_{10.0}$ 组;DHP 组、(DHP + DPCPX)组分别显著高于 HPBS 组,也显著高于 DN 组;(DHP + SCH 58261)组显著低于 DHP 组。缺氧 48、72 h,除 NPBS 组显著高于 HPBS 组外,其余各组间无显著差异(表 3)。

表 3　DHP 合并腺苷受体阻断剂对分化 PC12 细胞 MTT 值的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	缺氧 24 h	缺氧 48 h	缺氧 72 h
PBS 对照组			
NPBS	2.26 ± 0.15	2.15 ± 0.14	1.83 ± 0.09
HPBS	1.70 ± 0.10[a]	1.58 ± 0.17[a]	1.49 ± 0.10[a]
阳性对照组($A_{10.0}$)	2.08 ± 0.14[b]	1.78 ± 0.15	1.67 ± 0.14
阳性对照 + 受体阻断剂组			
($A_{10.0}$ + DPCPX)	1.96 ± 0.12[b]	1.67 ± 0.13	1.66 ± 0.12
($A_{10.0}$ + SCH 58261)	1.73 ± 0.14[d]	1.56 ± 0.18	1.54 ± 0.10
DN 组	1.77 ± 0.11	1.70 ± 0.15	1.58 ± 0.10
DHP 组	2.05 ± 0.11[bc]	1.74 ± 0.14	1.64 ± 0.08
DHP + 受体阻断剂组			
(DHP + DPCPX)	2.08 ± 0.12[bc]	1.73 ± 0.13	1.61 ± 0.07
(DHP + SCH 58261)	1.75 ± 0.14[d]	1.67 ± 0.13	1.50 ± 0.05

a:$P<0.05$,与 NPBS 组比较;b:$P<0.05$,与 HPBS 组比较;c:$P<0.05$,与 DN 组比较;d:$P<0.05$,与 $A_{10.0}$ 组比较

DHP 合并腺苷 A_1 或 A_{2A} 受体阻断剂的 LDH 透出率显示:缺氧 24 h,$A_{10.0}$ 组、($A_{10.0}$ + DPCPX)组、DHP 组、(DHP + DPCPX)组分别显著低于 HPBS 组;DHP 组、(DHP + DPCPX)组分别显著低于 DN 组;($A_{10.0}$ + SCH 58261)组显著高于 $A_{10.0}$ 组;(DHP + SCH 58261)组显著高于 DHP 组。缺氧 48、72 h,仅 NPBS 组显著低于 HPBS 组(表 4)。

表 4　DHP 合并腺苷受体阻断剂对分化 PC12 细胞 LDH 透出率的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	缺氧 24 h	缺氧 48 h	缺氧 72 h
PBS 对照组			
NPBS	13.36 ± 2.60	24.55 ± 6.60	44.15 ± 6.56
HPBS	30.54 ± 4.46[a]	43.50 ± 7.41[a]	70.20 ± 10.50[a]
阳性对照组($A_{10.0}$)	15.76 ± 4.67[b]	28.96 ± 5.97	58.36 ± 5.01
阳性对照 + 受体阻断剂组			
($A_{10.0}$ + DPCPX)	18.48 ± 3.62[b]	29.44 ± 4.86	57.19 ± 6.20
($A_{10.0}$ + SCH 58261)	27.75 ± 1.70[d]	42.24 ± 6.52	62.90 ± 7.08
DN 组	22.94 ± 3.64	34.20 ± 5.63	59.32 ± 5.81
DHP 组	16.89 ± 2.94[bc]	31.83 ± 4.45	57.06 ± 6.73
DHP + 受体阻断剂组			
(DHP + DPCPX)	17.32 ± 1.30[bc]	30.41 ± 3.91	56.33 ± 9.03
(DHP + SCH 58261)	26.65 ± 5.23[d]	39.56 ± 6.07	63.85 ± 9.11

a:$P<0.05$,与 NPBS 组比较;b:$P<0.05$,与 HPBS 组比较;c:$P<0.05$,与 DN 组比较;d:$P<0.05$,与 $A_{10.0}$ 组比较

3　讨论

PC12 细胞经 NGF 诱导后分化、形成突起、失去分裂能力,被广泛用作神经细胞模型[12]。因此研究 DHP 对分化 PC12 细胞的作用有助于了解 DHP 对神经细胞的作用。目前认为腺苷在预缺氧增强细胞对缺氧的耐受性中起重要作用[13],且腺苷为非蛋白成分。DHP 能显著增强细胞对缺氧的耐受性,其中耐缺氧的有效成分值得研究,因此本研究检测了 DHP 中腺苷含量,以腺苷为阳性对照并结合腺苷受体阻断剂检测 DHP 对缺氧、分化 PC12 细胞的作用。

缺氧时,LDH 表达增加,为缺氧标记酶之一[14]。且缺氧时,细胞膜受损,细胞质中大量表达的 LDH 漏出,因此 LDH 透出是缺氧时细胞损伤的特征之一[15]。虽然 PC12 细胞被广泛用作神经细胞模型,但由于它来自于肿瘤细胞,与在体神经细胞不完全等同。因此本研究中在检测 MTT、晚期凋亡率的同时,检测了其 LDH 透出率。

HPLC 结果显示 DHP 中腺苷浓度显著增加,未用腺苷受体阻断剂的 MTT、LDH 透出率及晚期凋亡率结果显示,腺苷对缺氧、分化 PC12 细胞有浓度依赖性保

护作用;同时显示 DHP 保护作用只在缺氧早期(24 h),这与文献[16]报道一致。

研究证明,腺苷有 A_1、A_{2A}、A_{2B}及 A_3特异受体亚型,在缺氧/缺血时的保护作用可通过 A_1、A_{2A}、A_3受体实现[7]。据报道 PC12 细胞表达腺苷 A_{2A}、A_1 受体[17,18]。因此,为进一步验证 DHP 对 PC12 细胞的保护作用是否与腺苷有关,特分别用腺苷 A_1、A_{2A}特异受体阻断剂阻断 DHP、10.0 μmol/L 腺苷阳性对照对缺氧、分化 PC12 细胞的作用。结果显示,缺氧 24h,, DPCPX 均不能阻断 DHP、10.0 μmol/L 腺苷阳性对照的保护作用,而 SCH 58261 均可阻断此保护作用,这提示缺氧早期 DHP 的保护作用与其中腺苷浓度的增加有关,同时提示保护作用可能通过 A_{2A}受体实现。

据报道,缺氧时腺苷对 PC12 细胞的保护机制主要是:腺苷 A_{2A}受体通过蛋白激酶 K(PKA)缓解缺氧诱导的膜的去极化作用[16],从而抑制电压依赖性钙(Ca^{2+})通道的激活,抑制钙(Ca^{2+})内流、抑制细胞内钙(Ca^{2+})超载[19]。但是较长时间(48h 以上)缺氧造成 PKA 表达下调,从而导致腺苷作用减弱,因此腺苷的保护作用维持时间较短[16]。

在小鼠脑中存在腺苷 A_1、A_{2A}、A_3受体[20],并且腺苷对成年动物的脑保护作用主要是通过 A_1受体实现的[6],在新生鼠,腺苷在缺血/缺氧时对发育未成熟大脑的保护作用主要是通过 A_{2A}受体实现的[6],因此,缺氧预适应小鼠脑中增加的腺苷对小鼠本身的保护机制与对缺氧 PC12 细胞的保护机制可能不完全相同,这有待于进一步研究。

综上所述,DHP 中的非蛋白组分有一定的抗缺氧作用。

参考文献:

[1] Gustavsson M, Anderson M F, Mallard C, *et al*. Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats [J]. Pediatr Res, 2005, 57(2): 305 – 309.

[2] Sharp F R, Ran R, Lu A, *et al*. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury [J]. NeuroRx, 2004, 1(1): 26 – 35.

[3] 吕国蔚,史美棠,李 凌,等. 急性重复缺氧对小鼠缺氧耐受性的影响及其机制的初步探讨[J]. 中国病理生理杂志, 1992, 8(4): 425 – 429.

[4] 董苍转,吕国蔚. 缺氧预适应小鼠脑匀浆提取液对 PC12 细胞的影响[J]. 首都医科大学学报, 2001, 22(2): 97 – 99.

[5] Podgorska M, Kocbuch K, Grden M, *et al*. Reduced ability to release adenosine by diabetic rat cardiac fibroblasts due to altered expression of nucleoside transporters [J]. J Physiol, 2006, 576(Pt 1): 179 – 189.

[6] Aden U, Halldner L, Lagercrantz H, *et al*. Aggravated brain damage after hypoxic ischemia in immature adenosine A2A knockout mice [J]. Stroke, 2003, 34(3): 739 – 744.

[7] 刘 艳,罗祖明. 腺苷及其受体对缺血性脑损伤保护作用的研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2004, 11(3): 189 – 191, 146.

[8] 郑立军,沈业寿,季俊虬,等. 桑黄胞外多糖药理活性的初步研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 318 – 321.

[9] Todoroki S, Morooka H, Yamaguchi M, *et al*. Ropivacaine inhibits neurite outgrowth in PC-12 cells [J]. Anesth Analg, 2004, 99(3): 828 – 832.

[10] Wu R C, Wang Z, Liu M J, *et al*. beta2-integrins mediate a novel form of chemoresistance in cycloheximide-induced U937 apoptosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(16): 2071 – 2082.

[11] Trincavelli M L, Marroni M, Tuscano D, *et al*. Regulation of A2B adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor a in human astroglial cells [J]. J Neurochem, 2004, 91(5): 1180 – 1190.

[12] Divinski I, Holtser-Cochav M, Vulih-Schultzman I, *et al*. Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin [J]. J Neurochem, 2006, 98(3): 973 – 984.

[13] Button L, Mireylees S E, Germack R, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK1/2 are not involved in adenosine A1, A2A or A3 receptor-mediated preconditioning in rat ventricle strips [J]. Exp Physiol, 2005, 90(5): 747 – 754.

[14] Sorensen B S, Alsner J, Overgaard J, *et al*. Hypoxia induced expression of endogenous markers *in vitro* is highly influenced by pH [J]. Radiother Oncol, 2007, 83(3): 362 – 366.

[15] Fredsted A, Mikkelsen U R, Gissel H, *et al*. Anoxia induces Ca^{2+} influx and loss of cell membrane integrity in rat extensor digitorum longus muscle [J]. Exp Physiol, 2005, 90(5): 703 – 714.

[16] Kobayashi S, Beitner-Johnson D, Conforti L, *et al*. Chronic hypoxia reduces adenosine A2A receptor-mediated inhibition of calcium current in rat PC12 cells via downregulation of protein kinase A [J]. J Physiol, 1998, 512(Pt 2): 351 – 363.

[17] Lu M K, Cheng J J, Lai W L, *et al*. Adenosine as an active component of Antrodia cinnamomea that prevents rat PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis through the activation of adenosine A (2A) receptors [J]. Life Sci, 2006, 79(3): 252 – 258.

[18] Pingle S C, Jajoo S, Mukherjea D, *et al*. Activation of the adenosine A_1 receptor inhibits HIV-1 tat-induced apoptosis by reducing nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric-oxide synthase [J]. Mol Pharmacol, 2007, 72(4): 856 – 867.

[19] Kobayashi S, Conforti L, Pun R Y, *et al*. Adenosine modulates hypoxia-induced responses in rat PC12 cells via the A2A receptor [J]. J Physiol, 1998, 508(Pt 1): 95 – 107.

[20] Yaar R, Jones M R, Chen J F, *et al*. Animal models for the study of adenosine receptor function [J]. J Cell Physiol, 2005, 202(1): 9 – 20.

(编辑 汪勤俭)