文章编号:1000-5404(2009)14-1329-04

论著

地塞米松快速抑制大鼠背根神经节细胞中ATP所致的钙升高

刘晓红[1,2],曾俊伟[1],肖 智[1,2],阮怀珍[1] ([1]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[2]遵义医学院生理学教研室,贵州 遵义 563003)

摘 要:目的 通过观察地塞米松对大鼠背根节神经元中ATP所致的细胞内游离钙离子浓度(intracellular calcium concentration,[Ca^{2+}]i)升高的影响,了解糖皮质激素是否通过非基因组作用影响初级感觉神经元的兴奋性。**方法** 分离、培养大鼠背根神经节细胞,采用激光共聚焦技术观察地塞米松对培养神经元ATP所致的[Ca^{2+}]i升高的影响。**结果** ATP(100 μmol/L)可导致背根节神经元[Ca^{2+}]i升高,是由P2X受体介导细胞外Ca^{2+}内流所致;地塞米松预孵育5 min可剂量依赖性地抑制背根节神经元ATP所致的[Ca^{2+}]i升高,地塞米松的抑制作用可被糖皮质激素受体拮抗剂RU38486(10 μmol/L)、蛋白激酶A抑制剂H-89(10 μmol/L)所阻断。**结论** 地塞米松通过糖皮质激素受体激活细胞内蛋白激酶A信号途径可显著抑制大鼠背根节神经元ATP所致的[Ca^{2+}]i升高。糖皮质激素可通过非基因组作用影响初级感觉神经元的ATP/P2X受体功能而参与痛觉的调制。

关键词: 地塞米松;背根神经节; ATP; 激光共聚焦技术
中图法分类号: R329.27;R338.1;R977.1 **文献标识码:** A

Dexamethasone rapidly inhibits ATP-induced intracellular calcium concentration increase in rat dorsal root ganglion neurons

LIU Xiao-hong[1,2], ZENG Jun-wei[1], XIAO Zhi[1,2], RUAN Huai-zhen[1] ([1]Department of Neurobiology, College of Basic Medical Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China)

Abstract: Objective To explore whether dexamethasone (Dex) has a rapid nongenomic effect on the intracellular calcium concentration ([Ca^{2+}]i) increase after ATP inducement in rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. **Methods** DRG neurons were isolated from SD rats at the age of 2 to 3 weeks and then plated on cover slips. The effects of Dex (1 μmol/L) on ATP-induced [Ca^{2+}]i increase were studied on cultured DRG neurons using single-cell Ca^{2+} microfluorometry, respectively combined with G-protein activation inhibitor GDP-β-S (0.5 mmol/L), glucocorticoid receptor antagonist RU38486 (10 μmol/L), protein kinase A inhibitor H89 (10 μmol/L), or protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride (Che, 10 μmol/L). **Results** ATP (100 μmol/L) caused the increase of [Ca^{2+}]i transients in DRG neurons via activation of P2X receptor. A 5 min incubation with Dex inhibited ATP-induced [Ca^{2+}]i increase in DRG neurons in a concentration-dependent manner. Dex inhibitory effect on ATP-induced [Ca^{2+}]i transients were blocked by RU38486 and H89, but not GDP-β-S and Che. **Conclusion** Dex can inhibit ATP-induced [Ca^{2+}]i increase in DRG neurons. The inhibitory effect of Dex may be mediated by glucocorticoid receptor through activating protein kinase A signal pathway. Our results demonstrate an nongenomic effect of Dex on the excitability of dorsal root ganglion neurons by regulating ATP-induced [Ca^{2+}]i transients, which may be relevant for relieving pain in the stressful event.

Key words: dexamethasone; dorsal root ganglion; ATP; single-cell Ca^{2+} microfluorometry techniques

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)在诸多的生理和病理过程中发挥着重要作用,在疼痛的发生、发展中亦起着重要的作用[1]。GC对大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元调控作用的研究,过去主要集中在慢的基因组调控作用[2]。关于GC对DRG细胞的快速非基因组调控作用少见报道。

P2X受体在伤害性信息的产生、传递中发挥着重要的作用[3]。DRG神经元是感觉传入的第一级神经元,其上分布有多种P2X受体($P2X_{1-6}$)。多种伤害性刺激均可引起细胞内ATP释放,后者激活P2X受体引起阳离子尤其是Ca^{2+}的内流,激活初级传入神经元而

基金项目:国家自然科学基金(30672022)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672022)
作者简介:刘晓红,女,贵州省遵义市人,博士,副教授,主要从事痛觉方面的研究,发表论文5篇。电话:(0852)8609442, E-mail: lxh680718@yahoo.com.cn
通信作者:阮怀珍,电话:(023)68753672, E-mail: hzruan61@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-10-13;修回日期:2008-12-15

引起疼痛。Ca^{2+}在疼痛的发生、发展中起着重要作用。GC 可快速调节 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高,但在不同的组织中其效应并不一致:GC 对耳蜗螺旋神经节细胞 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高起促进作用[4],而对 HT4 细胞 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高起抑制作用[5]。GC 能抑制 DRG 神经元 ATP 诱发电流[6],那么 GC 能否抑制 DRG 神经元 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高,从而影响疼痛的产生、传递?本实验采用激光共聚焦技术观察了地塞米松(一种人工合成的 GC)对大鼠 DRG 神经元 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高的快速调控作用并对这种调节作用的机制进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ATP、Dex、P2X 受体拮抗剂 TNP-ATP、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, CR)拮抗剂 RU38486、G 蛋白活化抑制剂 GDP-β-S、PKA 抑制剂 H-89、PKC 抑制剂 Che、NGF、胶原酶、胰蛋白酶均为 Sigma 公司产品, DMEM/F12 培养基为 Gibco 公司产品,Fluo-4 /AM 为 Dojindo 产品,其余为市售药品。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 2~3 周 SD 大鼠 20 只,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2.2 DRG 神经元的培养 2~3 周 SD 大鼠断头处死,快速取出腰骶部神经节,剪除相连的神经和周围的结缔组织被膜,将神经节剪碎,置于含 0.25% 胶原酶的 DMEM/F12 培养基中消化 60~90 min,然后置于含 0.125% 胰蛋白酶的 Hanks' 平衡盐溶液(不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+})中消化 15 min。用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化,获取的细胞接种于经多聚赖氨酸和层黏连蛋白双重包被的玻片上,加入 2 ml 神经细胞完全培养液,pH 7.4,内含 DMEM/F12 培养基、10% 胎牛血清、青霉素、链霉素、神经生长因子(50 ng/ml)。

1.2.3 激光共聚焦技术观察 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 变化 将 DRG 神经元接种于盖玻片上,随机分为 8 组:① ATP(100 μmol/L);② 孵育液为无钙液时,ATP(100 μmol/L);③ TNP-ATP(10 μmol/L) + ATP(100 μmol/L);④ Dex(0.001、0.01、0.1、1 μmol/L) + ATP(100 μmol/L);⑤ GDP-β-S (0.5 mmol/L) + Dex (1 μmol/L) + ATP(100 μmol/L);⑥ RU38486 (10 μmol/L) + Dex (1 μmol/L) + ATP (100 μmol/L);⑦ H89 (10 μmol/L) + Dex (1 μmol/L) + ATP(100 μmol/L);⑧ Che (10 μmol/L) + Dex (1 μmol/L) + ATP (100 μmol/L);以未加药时 DRG 细胞荧光强度为对照。各组细胞以 Fluo-4/AM (2 μmol/L) 荧光指示剂负载,37 ℃避光孵育 30 min 后用 DMEM/F12 培养基漂洗 3 遍,以少许 DMEM/F12 培养基覆盖细胞,避光待测。扫描技术参数:激发波长 488 nm,发射波长 515 nm,分别加入上述药物,检测 4 min,得到加药后钙荧光图像并存入计算机中,Ca^{2+}荧光强度的动态变化反映[Ca^{2+}]i 的变化。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,2 组间差异显著性检验采用两独立样本的 t 检验,多组均数间显著性比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 ATP 诱发大鼠 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 升高

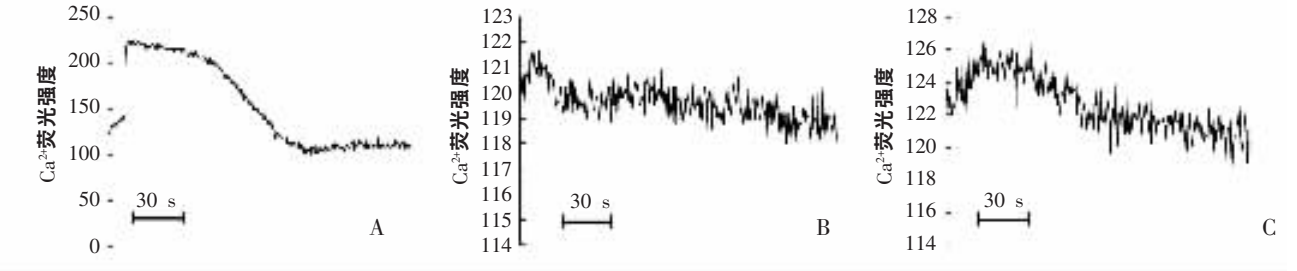
实验以中小神经元为检测对象。当孵育液中含 Ca^{2+} 时,ATP(100 μmol/L)可引起迅速增高而后缓慢下降恢复的短暂[Ca^{2+}]i 升高,ATP(100 μmol/L)产生的 Ca^{2+} 荧光强度为对照组 Ca^{2+} 荧光强度的(272 ± 58)% ($P<0.01$)。而用 EGTA 螯合细胞外 Ca^{2+} 后,ATP(100 μmol/L)产生的 Ca^{2+} 荧光强度为对照组的(106 ± 4)%,不能明显升高 DRG 神经元[Ca^{2+}]i ($P>0.05$)。在孵育液中预先加入 P2X 受体拮抗剂 TNP-ATP(10 μmol/L),ATP(100 μmol/L)引起的 Ca^{2+} 荧光强度 [(116 ± 9)%] 较单独使用 ATP 产生的 Ca^{2+} 荧光强度 [(272 ± 58)%] 明显降低($P<0.01$),而 TNP-ATP 本身并不影响 DRG 神经元[Ca^{2+}]i。见图 1。

2.2 Dex 快速抑制大鼠 DRG 神经元 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高

预加 Dex (1 μmol/L, 5 min) 对 DRG 神经元本身[Ca^{2+}]i 没有影响,却能明显的抑制 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高。Dex 对 ATP 所致[Ca^{2+}]i 升高的抑制作用呈现剂量依赖性。当 Dex 浓度由 0.001 μmol/L 增加到 1 μmol/L 时,抑制作用亦逐渐增强。Dex 浓度为 0.001、0.01、0.1、1 μmol/L 时,ATP(100 μmol/L)产生的 Ca^{2+} 荧光强度分别为单独加 ATP 产生的 Ca^{2+} 荧光强度的(86 ± 8)% ($P<0.05$)、(78 ± 8)% ($P<0.01$)、(58 ± 5)% ($P<0.01$)、(48 ± 3)% ($P<0.01$)。见图 2。

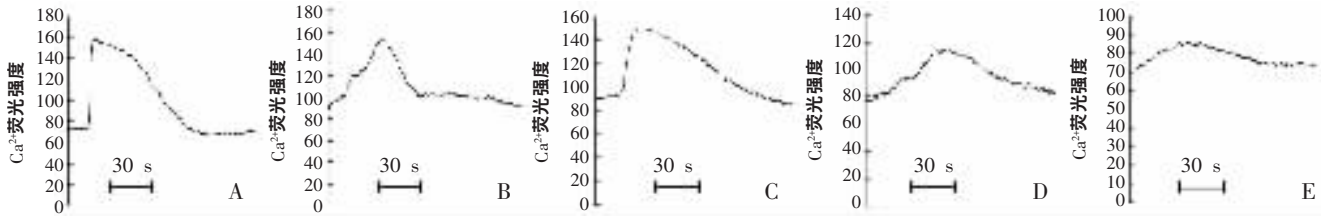
2.3 糖皮质激素受体和蛋白激酶 A 参与 Dex 的抑制作用

为了检验 Dex 对 DRG 神经元 ATP 所致的[Ca^{2+}]i 升高的抑制效应是否通过 G 蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)起作用,我们应用了 G 蛋白活化抑制剂 GDP-β-S,发现



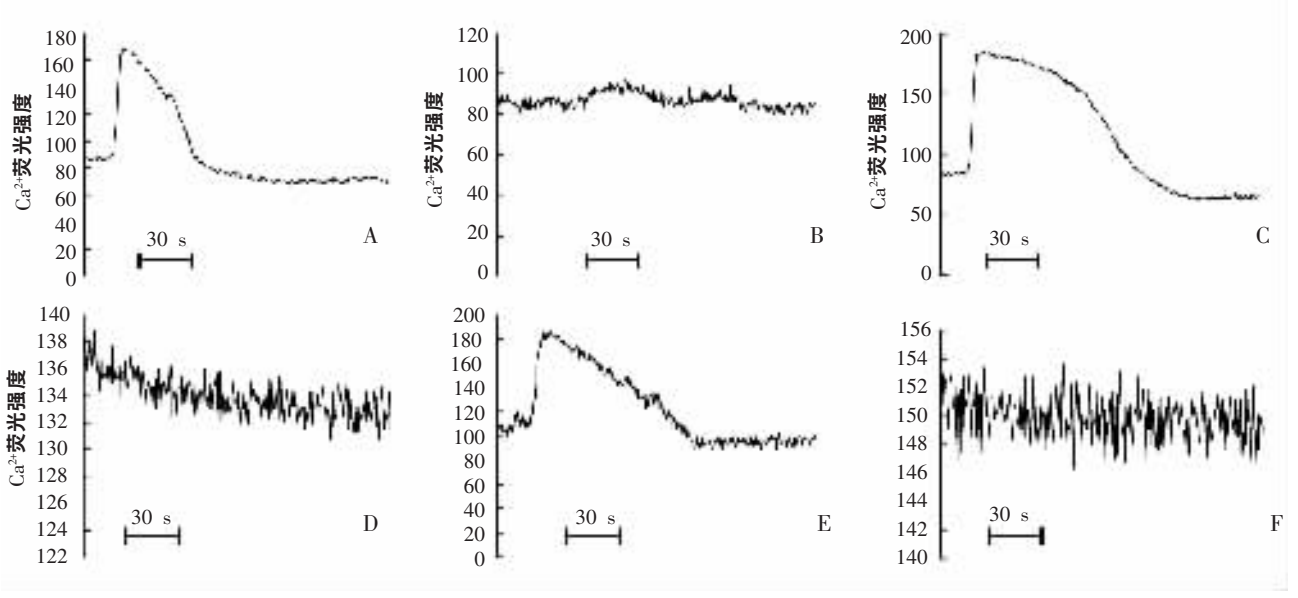
A:ATP 组;B:细胞外无 Ca^{2+} 时加入 ATP 组;C:TNP-ATP + ATP 组

图 1 ATP(100 μmol/L)引起 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 升高



A:ATP 组;B:Dex(0.001 μmol/L) + ATP 组;C:Dex (0.01 μmol/L) + ATP 组;D:Dex(0.1 μmol/L) + ATP 组;E:Dex(1 μmol/L) + ATP 组

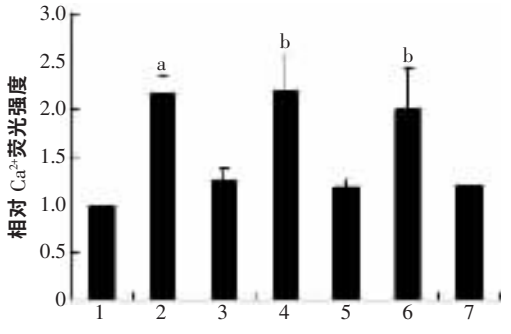
图 2　不同浓度 Dex 对 ATP(100 μmol/L)所致的 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 升高效应的抑制作用



A:ATP 组;B:Dex + ATP 组;C:RU38486 + Dex + ATP 组;D:GDP-β-S + Dex + ATP 组;E:H89 + Dex + ATP 组;F:Che + Dex + ATP 组

图 3　不同抑制剂对 Dex 抑制 ATP 所致的 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 升高作用的影响

GDP-β-S (0.5 mmol/L, 20 min)并不能影响 Dex 的抑制作用($P>0.05$)。而在孵育液中加入糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)拮抗剂 RU38486(10 μmol/L, 20 min)能完全阻断 Dex 的抑制作用($P<0.01$)。为了检验细胞内蛋白激酶 A (protein kinase A,PKA)、蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)信号途径是否参与 Dex 抑制效应,分别在孵育液中加入 PKA 抑制剂 H-89(10 μmol/L, 20 min)、PKC 抑制剂 Che(10 μmol/L, 20 min),结果显示 H-89 能基本阻断 Dex 的抑制作用($P<0.01$),而 Che 不影响 Dex 的抑制效应($P>0.05$)。见图 3、4。



1:对照组; 2:ATP 组; 3:Dex + ATP 组; 4: RU38486 + Dex + ATP 组; 5: GDP-β-S + Dex + ATP 组; 6: H89 + Dex + ATP 组; 7: Che + Dex + ATP 组

a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.01$,与 Dex + ATP 组比较

图 4　Dex 抑制 ATP 所致的 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 升高作用的药理学特性

3　讨论

ATP 参与机体多种生理功能的调节,其中尤其让人们关注的是其作为一种神经递质在伤害性信息的产生和传递中发挥着重要的作用。ATP 作用的受体即 P2 受体分为离子通道型 P2X 受体和代谢型 P2Y 受体。多种伤害性刺激均可引起细胞内 ATP 释放,后者激活感觉神经元 P2X 受体引起一种内向阳离子流,使细胞去极化而引起疼痛。

ATP 作用于 P2 受体可引起[Ca^{2+}]i 升高。其中,P2Y 受体激活引起[Ca^{2+}]i 升高来源于细胞内钙库释放 Ca^{2+},其效应不受细胞外 Ca^{2+} 浓度的影响[7]。本实验 ATP 导致中小直径 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 升高,应用 EGTA 螯合细胞外 Ca^{2+} 后 ATP 所致的 [Ca^{2+}]i 升高效应消失,由此可见,代谢型 P2Y 受体不参与 ATP 所致的 DRG 神经元[Ca^{2+}]i 升高。P2X 受体是非选择性阳离子通道, 主要对 Ca^{2+} 通透, P2X 受体激活可引起细胞外 Ca^{2+} 内流,从而引起[Ca^{2+}]i 升高, P2X 受体所致的[Ca^{2+}]i 升高依赖于细胞外 Ca^{2+} 的存在。本实验孵育液中存在 Ca^{2+} 时,ATP 导致 DRG 神经元

$[Ca^{2+}]i$ 升高,而应用 EGTA 螯合细胞外 Ca^{2+} 后 ATP 不再能引起 DRG 神经元 $[Ca^{2+}]i$ 升高,此外, P2X 受体拮抗剂 TNP-ATP(拮抗 $P2X_{1,2,3,4,7}$受体)能完全阻断 ATP 引起的 $[Ca^{2+}]i$ 升高,说明 ATP 所致的大鼠 DRG 神经元 $[Ca^{2+}]i$ 升高来源于 P2X 受体介导的细胞外 Ca^{2+} 内流。虽然由于缺乏针对性强的 P2X 受体拮抗剂,不能确定到底是哪一类 P2X 受体介导 ATP 所致的 $[Ca^{2+}]i$ 升高,但以往的研究表明 DRG 神经元主要表达 $P2X_1$、$P2X_3$受体,其中 $P2X_3$受体高度选择性表达于与伤害性信息密切相关的中小直径 DRG 神经元[8]。由此可见,ATP 所致的中小直径 DRG 神经元 $[Ca^{2+}]i$ 升高可能主要由 $P2X_3$受体所介导。

本实验 Dex 在 0.001 ~1 μmol/L 范围内均能抑制 ATP 所致的中小直径 DRG 神经元 $[Ca^{2+}]i$ 升高,并且呈剂量依赖性,随着 Dex 的浓度增高,抑制作用亦增强。这说明 Dex 能通过改变初级神经元的兴奋性而参与伤害性信息的调节。Dex 抑制 DRG 神经元 ATP 所致的 $[Ca^{2+}]i$ 升高的效应在 5 min 内发生,并且呈现剂量依赖性,这些特点都符合甾体激素的非基因组作用[9],这表明 Dex 抑制 DRG 神经元 ATP 所致的 $[Ca^{2+}]i$ 升高作用可能属于非基因组作用。

资料[5,10,11]表明 GC 的非基因组作用是因为一些组织细胞膜上存在一种不同于甾体激素受体超家族的新型膜受体,这种膜受体可能属 GPCR,GC 与这种膜受体结合可对胞内多条信号通路施加调节作用,经典的 GR 拮抗剂不能阻断 GC 的这种快速调节作用。而另一些实验[4,12]却显示 GC 的快速调节作用是通过 GR 介导的,因为用 GR 拮抗剂可阻断 GC 的快速调节作用。本研究表明 G 蛋白活化抑制剂 GDP-β-S 不影响 Dex 的抑制效应,而 GR 拮抗剂 RU38486 能完全阻断 Dex 的快速抑制作用,说明 Dex 对 DRG 细胞 ATP 所致的 $[Ca^{2+}]i$ 升高的抑制作用是由 GR 而不是 GPCR 介导的。Hua 等[12]曾经发现氢化可的松与膜受体结合导致豚鼠腹腔神经节细胞超极化并抑制放电,RU38486 能阻断氢化可的松的抑制作用。作者推断在豚鼠腹腔神经节可能存在一种与细胞内 GR 结构相似的膜受体。本实验介导 Dex 抑制作用的 GR 究竟存在细胞膜上还是在细胞内,有待于进一步证实。

文献[13]表明蛋白激酶参与了 GC 的非基因组作用。He 等[11]发现皮质酮(一种机体自然产生的 GC)通过激活 PKC 信号途径可快速抑制大鼠 DRG 神经元电压依赖性钙通道电流。本实验 PKA 抑制剂能基本阻断 Dex 的抑制作用,而 PKC 抑制剂不影响 Dex 的抑制效应,说明 Dex 通过 GR 激活细胞内 PKA 信号途径可抑制大鼠 DRG 神经元 ATP/P2X 受体引起的 $[Ca^{2+}]i$ 升高。与 He 等[11]发现的皮质酮通过 PKC 信号途径起作用的实验结果不一致,可能是因为对于不同的离子通道、受体,GC 可能通过不同的信号转导途径实现其快速调节作用。

ATP 是一种与伤害性信息密切相关的神经递质,ATP/P2X 受体引起的 $[Ca^{2+}]i$ 升高是产生痛觉的重要介质。本实验 Dex 以剂量依赖的方式抑制大鼠 DRG 神经元 ATP/P2X 受体介导的 $[Ca^{2+}]i$ 升高,这表明在伤害性刺激等应急状态下,GC 分泌增加可通过调节 ATP/P2X 受体的功能而降低 DRG 神经元的兴奋性,抑制痛觉的产生、传导,可能有助于应急状态下疼痛的缓解。

参考文献:

[1] Wang S, Lim G, Yang L, *et al*. Downregulation of spinal glutamate transporter EAAC1 following nerve injury is regulated by central glucocorticoid receptors in rats[J]. Pain, 2006, 120(1-2): 78-85.

[2] Nohr D, Schafer M K, Persson S, *et al*. Calcitonin gene-related peptide gene expression in collagen-induced arthritis is differentially regulated in primary afferents and motoneurons: influence of glucocorticoids [J]. Neuroscience, 1999, 93 (2): 759-773.

[3] 刘晓红, 曾俊伟, 张金海, 等. 神经病理性痛大鼠背根神经节 $P2X_3$ 受体表达及电生理学特性的改变[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 288-291.

[4] Yukawa H, Shen J, Harada N, *et al*. Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced Ca^{2+} mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons[J]. Neuroscience, 2005, 130(2): 485-496.

[5] Han J Z, Lin W, Chen Y Z. Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids: involvement of protein kinase A[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(2): 199-204.

[6] 刘晓红, 曾俊伟, 阮怀珍. 地塞米松对大鼠背根神经节细胞 ATP 激活电流的快速抑制作用[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33 (5): 590-592.

[7] Chaban V V, Micevych P E. Estrogen receptor-alpha mediates estradiol attenuation of ATP-induced Ca^{2+} signaling in mouse dorsal root ganglion neurons[J]. J Neurosci Res, 2005, 81(1) : 31-37.

[8] Ruan H Z, Moules E, Burnstock G. Changes in $P2X_3$ purinoceptors in sensory ganglia of the mouse during embryonic and postnatal development[J]. Histochem Cell Biol, 2004, 122(6): 539-551.

[9] Christ M, Haseroth K, Falkenstein E, *et al*. Nongenomic steroid actions: fact or fantasy[J]. Vitam Horm, 1999, 57: 325-373.

[10] Park Y S, Ha-Choi Y, Park C H, *et al*. Nongenomic glucocorticoid effects on activity-dependent potentiation of catecholamine release in chromaffin cells[J]. Endocrinology, 2008, 149(10): 4921-4927.

[11] He L M, Zhang C G, Zhou Z, *et al*. Rapid inhibitory effects of corticosterone on calcium influx in rat dorsal root ganglion neurons[J]. Neuroscience, 2003, 116 (2): 325-333.

[12] Hua S Y, Chen Y Z. Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons[J]. Endocrinology, 1989, 124(2): 687-691.

[13] Chen Y Z, Qiu J. Pleiotropic signaling pathways in rapid, nongenomic action of glucocorticoid[J]. Mol Cell Biol Res Commun, 1999, 2(3): 145-149.

(编辑 王 红)