论著

文章编号:1000-5404(2013)04-0316-04

地塞米松快速升高大鼠脊髓背角星形胶质细胞钙浓度

曾俊伟,肖 智,陈远寿,田 虹,刘晓红 (563000 贵州 遵义,遵义医学院基础医学院生理学教研室)

[摘要] **目的** 观察地塞米松(dexamethasone,Dex)对培养的脊髓背角星形胶质细胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)的影响,并初步探讨其作用机制。**方法** 培养纯化新生 SD 大鼠脊髓背角星形胶质细胞,激光共聚焦显微镜检测星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$ 的变化。**结果** Dex 可导致培养的脊髓背角星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$ 快速升高,且呈现剂量依赖性($P<0.05$);Dex 诱导的星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$ 升高是以外钙内流为主;G 蛋白阻断剂百日咳毒素(100 ng/mL)可阻断 Dex 所致的星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$ 升高效应($P<0.01$),而糖皮质激素细胞质可溶性受体(GR)拮抗剂 RU38486(10 μmol/L)对 Dex 的效应无影响;此外,蛋白合成抑制剂放线菌酮对 Dex 所致的星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$ 升高效应无阻断作用。**结论** Dex 可能通过由糖皮质激素膜受体介导的非基因组作用途径快速升高脊髓背角星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$。

[关键词] 地塞米松;脊髓;星形胶质细胞;钙
[中图法分类号] R322.81;R329.26;R977.1 [文献标志码] A

Rapid elevation of calcium concentration in astrocytes of rat spinal dorsal horn by dexamethasone

Zeng Junwei, Xiao Zhi, Chen Yuanshou, Tian Hong, Liu Xiaohong (Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of dexamethasone (Dex) on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in cultured astrocytes of rat spinal dorsal horn and the relative mechanism. **Methods** Astrocytes obtained from neonatal SD rat spinal cord were cultured and purified. Changes of $[Ca^{2+}]_i$ in cultured dorsal spinal cord astrocytes were detected with confocal laser scanning microscopy using fluo-4/AM as a calcium fluorescent indicator. **Results** Dex induced a rapid elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in the cultured astrocytes within several minutes in a dose-dependent manner ($P<0.05$), and the elevation could be blocked by pertussis toxin (PTX, a blocker of G protein activation, 100 ng/mL) rather than by glucocorticoid receptor antagonist RU38486 (10 μmol/L). In addition, cycloheximide (CHX, protein-synthesis inhibitor, 10 μg/mL) pretreatment could not impair the Dex-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation. **Conclusion** These observations suggest that a non-genomic pathway may be involved in the effect of Dex on $[Ca^{2+}]_i$ elevation in cultured astrocytes of spinal dorsal horn, and the effect may be mediated by G-protein-coupled membrane-bound glucocorticoid receptor (mGCR).

[**Key words**] dexamethasone; spinal cord; astrocyte; calcium

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30960126) and the Project of Science and Technology of Guizhou Province [J(2008)2314].
Corresponding author: Liu Xiaohong, Tel: 86-852-8609442, E-mail: lxh680718@yahoo.com.cn

糖皮质激素(glucocorticoid,GC)对机体内多种组织和细胞发挥着广泛的作用,对神经系统的发育与分化、神经元的损伤与再生以及突触可塑性等均有重要的调节作用。近年研究显示,GC 在伤害性信息的传递及病理性疼痛时中枢痛敏的形成发展中也起着重要的作用[1-4]。GC 参与病理性疼痛调制的机制尚不十分清楚,现有的研究主要集中于脊髓背角感觉神经元,实验发现外周神经损伤时脊髓背角感觉神经元糖皮质激素受体(glucocorticoid reccptor, GR)的活化可影响谷氨酸受体、谷氨酸转运体以及其他一些与疼痛密切相关的神经活性物质受体的表达与功能,从而增强脊髓背角神经元的兴奋性,促成神经病理性痛的发生与维持[1-3,5]。随着研究手段的不断进步,人们发现脊髓背角星形胶质细胞在病理性疼痛的发生与维持中起重要作用,在外周神经损伤、炎性痛以及癌痛模型中,均存在不同程度的脊髓背角星形胶质细胞活化[6-7]。此外,最近的研究显示 GC 参与了星形胶质细胞功能调

[基金项目] 国家自然科学基金(30960126);贵州省科学技术基金[黔科合 J(2008)2314]
[通信作者] 刘晓红,电话:(0852)8609442,E-mail:lxh680718@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121129.1158.007.html(2012-11-29)

节,GC 可通过抑制或增强星形胶质细胞活性而参与不同的生理和病理过程[8-10]。GC 能否通过调节脊髓背角星形胶质细胞功能而影响伤害性信息的传递及中枢痛敏的形成,尚不清楚。

GC 发挥作用的机制包括经典的基因组作用以及近年发现的非基因组作用,非基因组作用的特点是效应发生快(30 min 以内)、不涉及基因表达和蛋白质合成,其分子机制尚不明确。作为胞内信使,Ca^{2+} 对细胞功能具有重要的调节作用,在疼痛的发生、发展中起着关键的作用。GC 能否通过改变脊髓背角星形胶质细胞游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)而调节其功能,作用机制如何,目前尚少见报道。本研究采用激光共聚焦技术观察了地塞米松(dexamethasone,Dex)对培养的大鼠脊髓背角星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,并对其机制进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和器材

1~3 d SD 乳鼠,由第三军医大学实验动物中心提供的成年大鼠[许可证号 SCXK(渝) 2007-0005]所生;DMEM/F12 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶为 HyClone 产品;小鼠源胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillaryacidic protein,GFAP) 抗体、Dex、百日咳毒素(pertussis toxin, PTX)、RU38486、放线菌酮(cycloheximide, CHX)均为美国 Sigma 公司产品;钙离子荧光探针 Fluo-4/AM 为日本 Dojindo 产品;激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica TCS SP2)。

1.2 方法

1.2.1 脊髓背角星形胶质细胞的培养与鉴定 脊髓背角星形质细胞的培养按 Idestrup 等[11]的方法进行。SD 乳鼠(<3 d),乙醚麻醉,75% 乙醇消毒,解剖显微镜下取出脊髓背角组织,1.25 mg/mL 胰蛋白酶 37 ℃消化 30 min,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化,吹打成细胞悬液,接种于 75 mL 培养瓶内,密度约 $2.5\times10^5/cm^2$,放置于 5% CO_2、37 ℃ 培养箱内。培养 10 d 后细胞铺满瓶底,用 0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代,将经过 3 次传代的星形胶质细胞接种在盖玻片上培养 24 h,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,0.01 mol/L PBS 漂洗,加入小鼠源 GFAP 单克隆抗体(1∶100),37 ℃ 1 h,4 ℃过夜后取出,加入山羊抗小鼠 IgG(1∶200),37 ℃ 1 h。显微镜下观察 GFAP 阳性细胞为星形胶质细胞,GFAP 阳性细胞 >98%。

1.2.2 激光共聚焦技术检测星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化 将纯化的星形胶质细胞接种在盖玻片上,实验为 6 组:①对照组;②Dex 组(0.01、0.1、1、10 μmol/L);③无钙液 + Dex 组:用 EGTA 螯合孵育液中 Ca^{2+},给予 Dex(1 μmol/L);④ RU38486 + Dex 组:孵育液含糖皮质激素细胞质可溶性受体拮抗剂(GR 拮抗剂)RU38486 时,给予 1 μmol/L Dex;⑤ PTX + Dex 组:孵育液含 G 蛋白活化抑制剂 PTX 时,给予 1 μmol/L Dex;⑥CHX + Dex 组:孵育液含蛋白合成抑制剂 CHX 时,给予 1 μmol/L Dex。各组细胞以 Fluo-4/AM(5 μmol/L)荧光指示剂负载,于 37 ℃ 培养箱内孵育 30 min,用 DMEM/F12 培养基漂洗 3 遍,再以少许培养基覆盖细胞,避光待测。扫描参数为:激发波长 488 nm,发射波长 515 nm,检测 30 min,得到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胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,两组间差异显著性检验采用两独立样本 t 检验,多组均数间显著性比较用单因素方差分析。

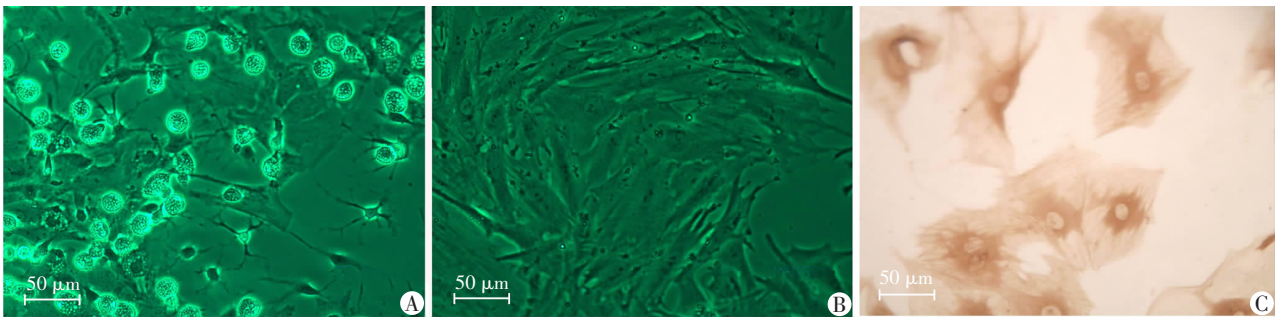
2 结果

2.1 培养星形胶质细胞的纯度鉴定

倒置相差显微镜下观察到原代培养的脊髓背角星形胶质细胞生长在底层,其上层有少突胶质细胞和小胶质细胞生长(图 1A)。经过 3 次传代纯化的脊髓背角星形胶质细胞以原浆型为主,细胞边界清楚,胞体扁平,形态不规则,核浆界限清楚,胞核呈圆或卵圆形,常位于胞体一侧(图 1B)。GFAP 为星形胶质细胞的标志物,用免疫组化方法鉴定培养的细胞中 GFAP 免疫反应阳性率 >98%,表明培养的星形胶质细胞纯度高(图 1C)。

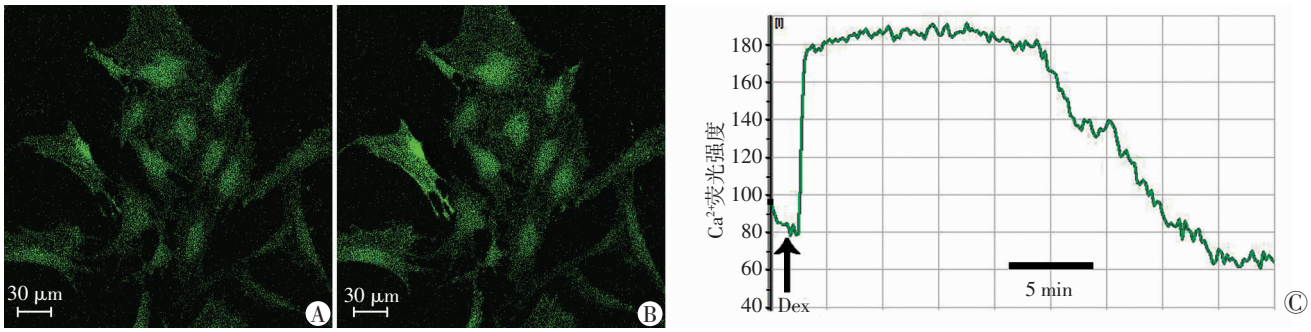
2.2 Dex 对培养的脊髓背角星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

1 μmol/L Dex 孵育数分钟可致星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高(图 2)。Dex 升高星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 作用呈现剂量依赖性,在 0.01 ~ 10 μmol/L 范围内,随着浓度的增高,Dex 升高星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 作用亦增强($P<0.05$,图 3)。用 EGTA 螯合孵育液中 Ca^{2+} 可明显减弱 Dex 所致的星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高($P<0.01$,图 4B、图 5),说明 Dex 诱导的星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高是以外钙内流为主。



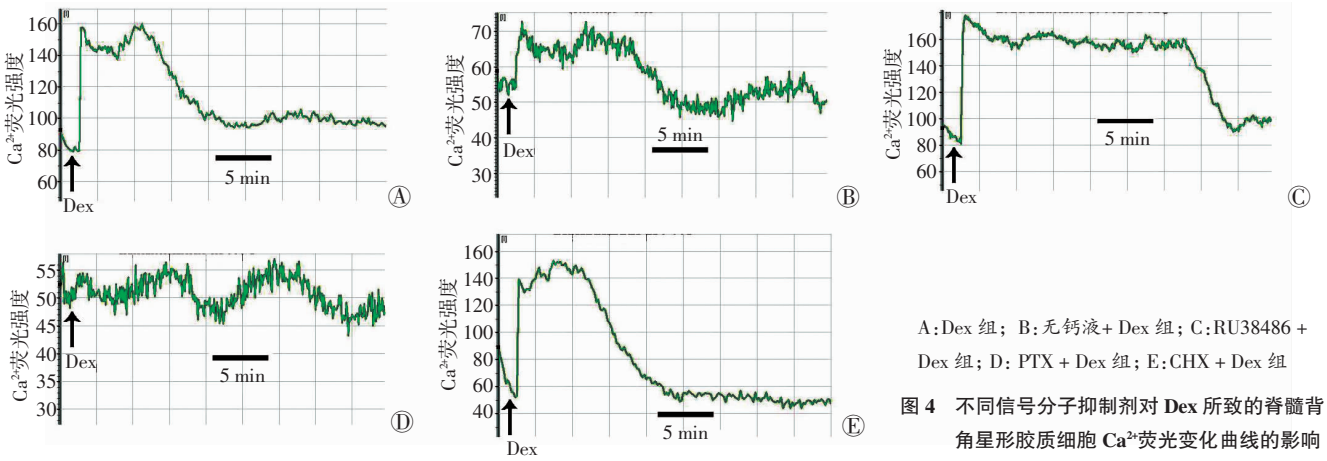
A:原代培养的星形胶质细胞(倒置显微镜);B:传代纯化的星形胶质细胞(倒置显微镜);C:纯化的脊髓背角星形胶质细胞 GFAP 表达(PV 二步法)

图 1 培养脊髓背角星形胶质细胞的形态及纯度鉴定



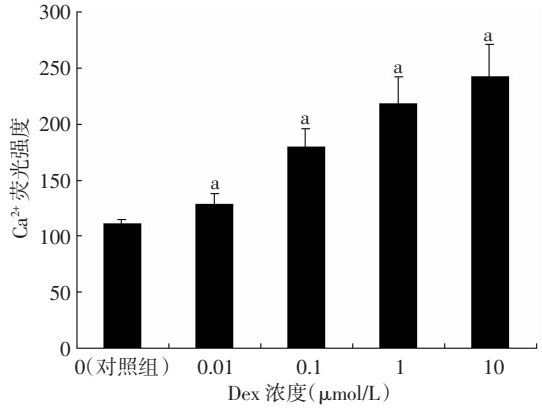
A:星形胶质细胞的基础荧光强度;B:加1 μmol/L Dex后星形胶质细胞的荧光强度明显增强;C:加1 μmol/L Dex后星形胶质细胞的 Ca^{2+} 荧光变化曲线

图2 Dex对脊髓背角星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$的影响



A:Dex组; B:无钙液+Dex组; C:RU38486+Dex组; D:PTX+Dex组; E:CHX+Dex组

图4 不同信号分子抑制剂对Dex所致的脊髓背角星形胶质细胞 Ca^{2+} 荧光变化曲线的影响



a: $P<0.05$, 与对照组比较

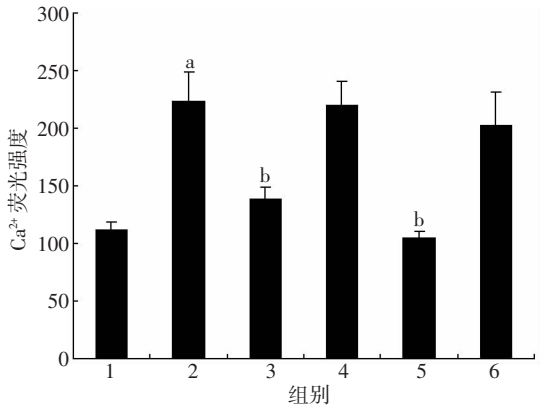
图3 Dex对脊髓背角星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$影响呈剂量依赖性

2.3 百日咳毒素、RU38486对Dex升高星形胶质细胞[Ca^{2+}] i效应的影响

为了检测Dex致星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$升高效应是通过G蛋白偶联的糖皮质激素膜受体(membrane-bound glucocorticoid receptor,mGCR)还是GR起作用,分别用G蛋白活化抑制剂PTX、GR拮抗剂RU38486预孵育星形胶质细胞。结果显示,Dex(1 μmol/L)明显升高星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$(图4A),PTX(100 ng/mL,预孵育24 h)可阻断Dex致星形胶质[Ca^{2+}]$_i$升高效应($P<0.01$,图4D、图5),而GR拮抗剂RU38486(10 μmol/L,预孵育20 min)对Dex的作用无影响(图4C、图5)。

2.4 蛋白合成抑制剂CHX对Dex升高星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$效应的影响

为了进一步证实Dex致星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$升高效应是通过非基因组作用,而不是基因组作用,用蛋白合成抑制剂CHX(10 μg/mL)对星形胶质细胞预孵育12 h,发现CHX不能阻断Dex所致的星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$升高效应(图4E、图5),表明Dex致星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$升高作用属于快速非基因组效应。



1:对照组;2:Dex组;3:无钙液+Dex组;4:RU38486+Dex组;5:PTX+Dex组;6:CHX+Dex组

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

图5 Dex致脊髓背角星形胶质细胞[Ca^{2+}]$_i$升高作用的药理学特征

3 讨论

近年的研究发现脊髓背角星形胶质细胞与疼痛关系密切,多种伤害性刺激可导致脊髓背角星形胶质细胞激活,而激活的胶质细胞可释放大量神经活性物质和前炎性细胞因子,促进病理性疼痛时中枢痛敏的产生与维持[12]。GR参与了痛觉信息的传导,但GC能否调节脊髓背角星形胶质细胞的活性,转而参与脊髓水平痛觉信息的调制尚不清楚。本研究发现Dex可显著升高培养的脊髓背角星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$,Ca^{2+}作为重要的胞内信使,对细胞功能、信号传递及神经递质释放均具有重要的调节作用。已知许多炎性介质如TNF-α、PG、ATP等均可诱导星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$增加,并以Ca^{2+}依赖的方式释放兴奋性神经递质如谷氨酸(Glu)[13-15]。Dex能否通过提高脊髓背角星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$而促进Glu的释放,转而影响脊髓背角神经元的兴奋性尚需进一步探讨。

GC作用机制包括经典的基因组作用和近年发现的非基因组作用,后者的特点是效应发生快、不涉及基因表达和蛋白质合成。本研究中Dex显著提高星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$的效应在数分钟内发生,呈现剂量依赖性;并且,蛋白合成抑制剂CHX对Dex所致的星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$升高效应无阻断作用,这些特点都符合甾体激素的非基因组作用[16]。这说明GC能通过非基因组作用途径快速改变脊髓背角星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$而调节其功能。

GC的非基因组作用机制目前还不十分清楚。有研究表明,GC的非基因组作用是因为一些组织细胞膜上存在一种新型的mGCR,这种膜受体不同于甾体激素受体超家族,可能属于G蛋白偶联受体,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RU38486不能阻断GC的这种快速调节作用[17-18]。而另一些实验结果却显示GC的快速调节作用是由经典的GR介导,因为GR拮抗剂可阻断GC的快速效应[19]。本研究中G蛋白活化抑制剂PTX可完全阻断Dex升高星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$效应,而GR拮抗剂RU38486对Dex的快速效应无阻断作用,说明Dex对脊髓背角星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$作用是由G蛋白偶联的mGCR而非GR介导。但到目前为止,尚不清楚GC的快速作用究竟是通过专门的糖皮质激素膜受体抑或是与其他神经递质共享膜受体。

本研究表明,Dex可能通过由糖皮质激素膜受体介导的非基因组途径快速升高星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$,调节脊髓背角星形胶质细胞的功能。至于GC能否通过升高脊髓背角星形胶质细胞$[Ca^{2+}]_i$进而促进Glu等兴奋性神经递质的释放,尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] Alexander J K, DeVries A C, Kigerl K A, *et al*. Stress exacerbates neuropathic pain *via* glucocorticoid and NMDA receptor activation[J]. Brain Behav Immun, 2009, 23(6): 851-860.
[2] Wang S, Lim G, Zeng Q, *et al*. Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury[J]. J Neurosci, 2005, 25(2): 488-495.
[3] 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.
[4] Wang S, Lim G, Mao J, *et al*. Central glucocorticoid receptors regulate the upregulation of spinal cannabinoid-1 receptors after peripheral nerve injury in rats[J]. Pain, 2007, 131(1/2): 96-105.
[5] Lim G, Wang S, Zeng Q, *et al*. Expression of spinal NMDA receptor and PKCgamma after chronic morphine is regulated by spinal glucocorticoid receptor[J]. J Neurosci, 2005, 25(48): 11145-11154.
[6] Hald A, Nedergaard S, Hansen R R, *et al*. Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain [J]. Eur J Pain, 2009, 13(2): 138-145.
[7] Wang W, Wang W, Wang Y, *et al*. Temporal changes of astrocyte activation and glutamate transporter-1 expression in the spinal cord after spinal nerve ligation-induced neuropathic pain[J]. Anat Rec (Hoboken), 2008, 291(5): 513-518.
[8] Crossin K L, Tai M H, Krushel L A, *et al*. Glucocorticoid receptor pathways are involved in the inhibition of astrocyte proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(6): 2687-2692.
[9] Liu Y, Imai H, Sadamatsu M, *et al*. Cytokines participate in neuronal death induced by trimethyltin in the rat hippocampus *via* type Ⅱ glucocorticoid receptors[J]. Neurosci Res, 2005, 51(3): 319-327.
[10] Revsin Y, Rekers N V, Louwe M C, *et al*. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice[J]. Neuropsychopharmacology, 2009, 34(3): 747-758.
[11] Idestrup C P, Salter M W. P2Y and P2U receptors differentially release intracellular Ca^{2+} *via* the phospholipase c/inositol 1, 4, 5-triphosphate pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord[J]. Neuroscience, 1998, 86(3): 913-923.
[12] Hansson E. Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation? [J]. Acta Physiol (Oxf), 2006, 187(1/2): 321-327.
[13] Vesce S, Rossi D, Brambilla L, *et al*. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation[J]. Int Rev Neurobiol, 2007, (82): 57-71.
[14] Zeng J W, Liu X H, Zhang J H, *et al*. P2Y1 receptor-mediated glutamate release from cultured dorsal spinal cord astrocytes[J]. J Neurochem, 2008, 106(5): 2106-2118.
[15] Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, *et al*. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes[J]. Nature, 1998, 391 (6664): 281-285.
[16] Christ M, Haseroth K, Falkenstein E, *et al*. Nongenomic steroid actions: fact or fantasy[J]. Vitam Horm, 1999, (57): 325-373.
[17] 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.
[18] Liu L, Wang C, Ni X, *et al*. A rapid inhibition of NMDA receptor current by corticosterone in cultured hippocampal neurons[J]. Neurosci Lett, 2007, 420(3):245-250.
[19] 刘晓红, 曾俊伟, 肖智, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31 (14): 1329-1332.

(收稿:2012-09-05;修回:2012-10-18)
(编辑 王小寒)