

鱼藤酮对星形胶质细胞谷氨酸摄取功能的影响

刘辉¹, 李云鹏², 陈峻峰², 董兆君²

(1. 白求恩医学院卫勤教研室, 河北 石家庄 050081; 2. 第三军医大学毒理学教研室, 重庆 400038)

摘要: 目的 研究鱼藤酮对原代培养星形胶质细胞谷氨酸转运功能的影响。方法 应用 HPLC 荧光法检测鱼藤酮染毒星形胶质细胞胞外 Glu 浓度, 同位素标记法检测 Glu 摄取能力, 采用 RT-PCR 与 Western blot 技术观察谷氨酸转运体基因及蛋白表达。结果 鱼藤酮染毒星形胶质细胞胞外 Glu 浓度明显升高, Glu 摄取能力显著降低, 谷氨酸/天冬氨酸转运体 (glutamate/aspartate transporter, GLAST) 基因和蛋白表达均明显降低, 而谷氨酸转运体-1 (glutamate transporter-1, GLT-1) 蛋白表达升高。结论 鱼藤酮可显著降低星形胶质细胞谷氨酸摄取功能, 引起胞外 Glu 浓度升高; GLAST 表达下调可能是鱼藤酮诱导胞外谷氨酸含量增加的主要原因之一, 而 GLT-1 上调可能为神经细胞自我保护机制, 以限制谷氨酸的神经毒作用。

关键词: 鱼藤酮; 星形胶质细胞; 谷氨酸/天冬氨酸转运体 (GLAST); 谷氨酸转运体-1 (GLT-1)

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2009)06-0407-03

Effects of rotenone on glutamate uptake in primary cultured astrocytes

LIU Hui, LI Yun-peng, CHEN Jun-feng, DONG Zhao-jun

(1. Department of Health Service, Norman Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081, China; 2. Department of Chemical Defence, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of rotenone on glutamate uptake in primary cultured astrocytes. Methods The extracellular glutamate was detected by high performance liquid chromatography (HPLC), the uptake ability of glutamate was detected with isotope labeling method and the mRNA and protein expression of glutamate transporter were detected using RT-PCR and Western blot respectively. Results It was showed that the extracellular rotenone level was obviously risen, shown the uptake function of astrocyte to glutamate was decreased. Meanwhile, the expression of GLAST (glutamate/aspartate transporter) mRNA and protein also decreased significantly in 1.0 and 2.0 $\mu\text{mol/L}$ rotenone exposed groups, but the expression of glutamate transporter-1 (GLT-1) enhanced obviously. Conclusions It was suggested that rotenone might reduce the uptake ability of astrocyte to glutamate, induce the extracellular level of Glu risen, the down regulation of GLAST may be the main reason of elevated extracellular Glu level induced by rotenone, while the increased expression of GLT-1 might represent a self-protective mechanism by nerve cells for limiting the neurotoxicity by Glu.

Key words: Rotenone; Astrocyte; Glutamate/aspartate transporter (GLAST); Glutamate transporter-1 (GLT-1)

大量研究表明, 长期接触鱼藤酮等线粒体抑制类农药可能是帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 发病的诱因之一^[1]。谷氨酸 (glutamate, Glu) 介导的兴奋毒性已被证实在 PD 的发生和发展过程中发挥了重要作用^[2], 而分布在星形胶质细胞上的谷氨酸/天冬氨酸转运体 (glutamate/aspartate transporter, GLAST) 与谷氨酸转运体-1 (glutamate transporter-1, GLT-1), 对维持脑内 Glu 代谢平衡至关重要^[3]。本研究拟通过观察鱼藤酮对谷氨酸转运体表达及活性的影响, 探讨兴奋性毒性是否参与鱼藤酮所致多巴胺神经元的变性损伤。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

鱼藤酮 (纯度 97.6%), L- [³H] -glutamic acid 购自 Sigma 公司; TriPure 购自 Roche 公司; DMEM/

F12 培养基购自 Gibco 公司; 类标准胎牛血清购自民海生物公司; GLAST 抗体购自博士德公司; GLT-1 抗体购自 Santa Cruz 公司。Mastercycler PCR 仪购自 Eppendorf 公司, 半干转印槽购自 Bio-Rad 公司。

1.2 星形胶质细胞鱼藤酮染毒模型

原代星形胶质细胞的培养、纯化和鉴定参照文献 [4]。培养的星形胶质细胞于对数生长期加入鱼藤酮工作液处理, 使其终浓度分别为 0.0、0.1、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入等体积的无血清培养基。

1.3 HPLC 荧光法检测胞外 Glu 浓度

应用 HPLC 与荧光检测器联用检测样品中 Glu 含量, 具体操作参照文献 [5]。收集正常对照组与各实验组星形胶质细胞培养液 100 μl , 按 3:2 (V/V) 加 1 mol/L HClO₄, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液按 4:3 (V/V) 加入 2 mol/L KHCO₃ 1 ml, 4℃, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液; 取上清液 30 μl 加入等体积邻苯二甲醛衍生物, 充分混匀, 室温反应 2 min 进样。

收稿日期: 2009-03-10 修回日期: 2009-05-25

作者简介: 刘辉 (1974-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 环境毒物神经毒理机制。

1.4 同位素标记法检测星形胶质细胞 Glu 摄取能力

纯化的星形胶质细胞接种于 6 孔培养板, 接种密度为 5×10^4 个, 待细胞长成连续单层之后, 分别给予不同浓度鱼藤酮培养 24 h, 倒去培养液, D-Hanks 液漂洗 3 次, 每孔加入含 $L-[^3H]-glutamic\ acid$ $1 \mu C$ 的孵育液 1 ml, $37^\circ C$ 孵育 15 min 后用预冷的 0.9% NaCl 溶液终止反应并洗涤 3 次, 再用 1 mol/L HCl 裂解细胞; $4^\circ C$, 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液置入闪烁瓶中, 加入适量闪烁液, 过夜, 次日于液闪记数仪上检测。

1.5 RT-PCR 检测 GLAST 和 GLT-1 mRNA 表达

按 TriPure 试剂说明书提取各实验组细胞总 RNA, PCR 引物参考文献 [6] 设计, 由上海英骏生物技术公司合成。设 $\beta-actin$ (211 bp) 与 GAPDH (542 bp) 阳性产物为对照, GLAST 和 GLT-1 扩增片段长度分别为 572 bp 和 328 bp。GLAST 上游引物 5'-GGG TTT TCA TIG GAG GGT TGC-3' 和下游引物 5'-CCA CGG GTT TCT CTG GTT CAT-3'; GLT-1: 上游引物 5'-GGG TCA TCC TGG ATG GAG GT-3' 和下游引物 5'-CGT GTC GTC ATA AAC GGA CTG-3'。

1.6 Western blot 检测 GLAST 和 GLT-1 蛋白表达

提取各实验组细胞膜蛋白, 考马斯亮蓝试剂盒进行蛋白定量。经 11% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 采用半干电转移法转移蛋白至 PVDF 膜; PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭, $4^\circ C$ 过夜; 而后分别加入 1:400 稀释的兔抗 GLAST 抗体和山羊抗 GLT-1 抗体, $37^\circ C$ 孵育 1 h, 再分别与 1:1 500 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 3 h, 同时加入 1:5 000 稀释的内参照 GAPDH, 最后 DAB 溶液显色并用图像分析软件进行分析。

1.7 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 鱼藤酮对星形胶质细胞胞外 Glu 浓度的影响

以浓度为 0.625、1.25、2.5、5.0、10.0 $\mu mol/L$ 谷氨酸标准品作标准曲线, Chromatogram 软件对样品峰面积积分, 结合标准曲线计算各实验组样品浓度。实验结果显示, 随着鱼藤酮染毒剂量的增大, 胞外 Glu 浓度逐渐升高。与正常对照组比较, 1.0 $\mu mol/L$ 和 2.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组细胞胞外 Glu 浓度明显升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 鱼藤酮对星形胶质细胞 Glu 摄取的影响

0.1 $\mu mol/L$ 鱼藤酮染毒的星形胶质细胞 Glu 转

运能力与正常对照组比较略有降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 随着染毒剂量的增大, 鱼藤酮可明显降低大鼠星形胶质细胞 Glu 转运功能, 0.5 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组大鼠纹状体 Glu 转运功能与正常对照组比较显著降低 ($P < 0.05$); 1.0 $\mu mol/L$ 和 2.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组降低更为明显 ($P < 0.01$), 见表 1。

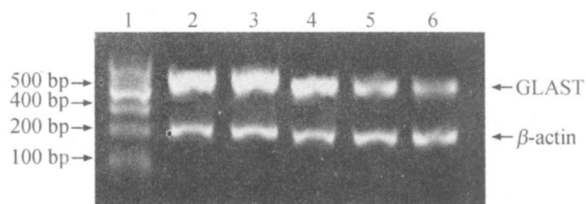
表 1 鱼藤酮对星形胶质细胞胞外 Glu 浓度和摄取功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Glu 浓度 ($\mu mol/L$)	Glu 摄取 ($pmol/(min \cdot min)$)
正常对照组	21.15 ± 2.46	1.847 ± 0.398
0.1 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组	22.38 ± 1.98	1.756 ± 0.451
0.5 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组	24.75 ± 2.06	$1.350 \pm 0.277^*$
1.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组	$27.33 \pm 2.89^*$	$1.075 \pm 0.180^{**}$
2.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组	$28.14 \pm 3.08^*$	$1.049 \pm 0.157^{**}$

与正常对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.3 鱼藤酮对星形胶质细胞 GLAST 和 GLT-1 mRNA 表达的影响

统计结果显示, 与正常对照组比较, 1.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组星形胶质细胞 GLAST 表达显著降低 ($P < 0.05$), 鱼藤酮为 2.0 $\mu mol/L$ 时表达进一步降低 ($P < 0.01$), 见图 1。而鱼藤酮中毒可引起星形胶质细胞 GLT-1 mRNA 表达上调, 1.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组 GLT-1 mRNA 表达增强的最为显著 ($P < 0.01$), 见图 2。



1—Marker; 2—正常对照组; 3—0.1 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组; 4—0.5 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组; 5—1.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组; 6—2.0 $\mu mol/L$ 鱼藤酮组; 图 2 同。

图 1 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞 GLAST mRNA 表达的影响

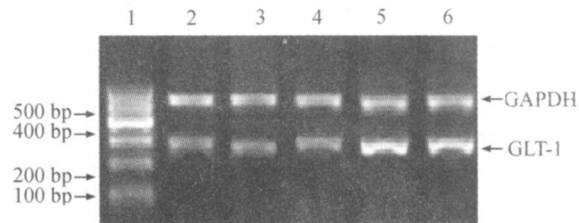
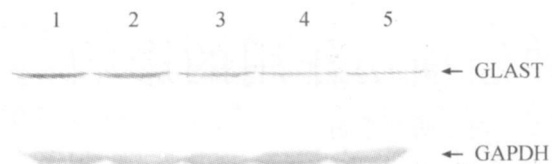


图 2 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞 GLT-1 mRNA 表达的影响

2.4 鱼藤酮对 GLAST 和 GLT-1 蛋白表达的影响

实验组 GLAST 蛋白的表达随着鱼藤酮浓度的增加而降低 (图 3)。鱼藤酮浓度为 1.0 $\mu mol/L$ 和 2.0 $\mu mol/L$ 时, 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。而 GLT-1 蛋白的表达随着鱼藤酮浓度的增加而增强 (图 4), 鱼藤酮浓度为 1.0 $\mu mol/L$ 和 2.0 $\mu mol/L$ 时, 与正常对照组比较差异具有非常显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。



1—正常对照组；2—0.1 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮组；
3—0.5 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮组；4—1.0 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮组；
5—2.0 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮组；表4同。

图3 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞 GLAST 蛋白表达的影响

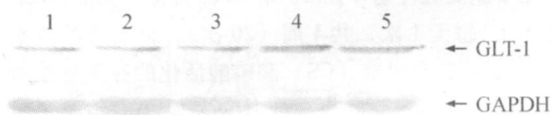


图4 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞 GLT-1 蛋白表达的影响

3 讨论

星形胶质细胞是脑内神经元主要的支持和营养细胞，它不仅提供了神经元正常活动所需要的氧、能量和原料，而且能及时清除神经元释放的神经递质与产生的代谢产物，维持神经元局部微环境的相对稳定，保证神经元的生存和正常的功能活动。研究表明，PD的病理生理过程不仅包括神经元的退变，而且包括神经胶质细胞的退变或增生，功能发生改变的星形胶质细胞可能是神经退变的促进因素^[7]。

近年研究发现，纹状体内 DA 的缺失并不是 PD 的唯一病理基础，脑内其他神经递质也可能参与 PD 的发病过程，其中，兴奋性氨基酸（如 Glu）与 PD 发生、发展的相关性已经成为研究热点之一^[8]。在脑内谷氨酸代谢过程中，星形胶质细胞发挥重要作用。Jeffrey 等研究证实^[9]，分布在星形胶质细胞膜上的 GLAST 和 GLT-1 是脑内最重要的兴奋性氨基酸转运体，大部分胞外 Glu 通过两者的摄取作用进入胞内。因此，只有对这些转运体获得更多的认识，才能更确切地理解 Glu 能突触的正常功能，以及它们在神经系统疾病（如肌萎缩性侧束硬化症、帕金森病、癫痫、脑缺血、外伤性脑损伤等）发病机制中的作用。

本实验结果显示，1.0 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮染毒大鼠星形胶质细胞胞外 Glu 含量显著高于正常对照组，Glu 大量蓄积可能是导致神经元损伤的重要因素之一。同位素标记实验发现，1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮染毒可明显降低谷氨酸摄取能力，从而导致胞外 Glu 浓度迅速升高。孟长虹^[10]和张芸^[2]等通过同位素实验也发现，与鱼藤酮相类似的化合物 6-OHDA 能显著抑制纹状体突触小体和原代星形胶质细胞摄取 Glu 的能力。提示 Glu 摄取能力的降低，可能是鱼藤酮等化合物干

扰了星形胶质细胞谷氨酸转运体的表达，导致转运体功能活性的降低。目前，有关该类化合物对 GLAST 和 GLT-1 等谷氨酸转运体基因和蛋白表达的影响，国内外未见报道。本实验发现，鱼藤酮可诱导大鼠星形胶质细胞 GLAST mRNA 表达下调，蛋白含量显著降低，其原因可能是鱼藤酮引发的神经细胞能量代谢障碍，导致胞膜上转运蛋白合成能力下降。由此推测，鱼藤酮所致 GLAST 表达下调，可能是引起星形胶质细胞摄取能力降低，导致胞外 Glu 含量显著增加的主要原因之一；而分布在星形胶质细胞另一种谷氨酸转运体 GLT-1 基因及蛋白表达均明显增强，则提示谷氨酸转运体各亚型的功能可能受不同机制调控，其具体调控机制有待深入研究。

综上所述，鱼藤酮通过破坏谷氨酸转运体的正常功能，引起星形胶质细胞摄取 Glu 的能力显著降低，再摄取功能障碍无疑加重谷氨酸及其受体介导的兴奋性神经毒作用，导致神经退行性病变的发生与发展。提示能够调节 Glu 摄取的工具药可能具有重要的临床应用价值，其中，谷氨酸转运体将是未来的治疗靶标之一。

参考文献

- [1] He Y, Fan SZ, Dong ZJ, et al. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigrostriatal injury [J]. *J Neurochem* 2003; 86 (6): 1338-1345
- [2] 张芸, 丁建花, 胡刚. mGluR5 拮抗剂 SIB1893 逆转 6-OHDA 抑制星形胶质细胞摄取谷氨酸的作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学* 2004; 9 (1): 25-28
- [3] Alberio C, Lourdes M. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death [J]. *Archives of Medical Research* 2006; 37 (1): 11-18
- [4] 刘辉, 张筱军, 吴强, 等. 鱼藤酮对体外培养星形胶质细胞的毒性作用 [J]. *中国公共卫生* 2007; 23 (4): 411-413
- [5] 吴强恩, 郑力行, 谢芳, 等. 反相高效液相色谱荧光法测定脑组织中氨基酸类神经递质 [J]. *复旦学报 (医学版)* 2005; 32 (3): 355-358
- [6] Thomas R, Michael W. Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST and GS [J]. *Neurochemistry International* 2000; 37 (2-3): 179-189
- [7] Przedborski S, James E, Goldman. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease [J]. *Advances in Molecular and Cell Biology* 2003; 31 (3): 967-982
- [8] Adrian G D, Charles K M, Mitchell B, et al. Astroglial plasticity and glutamate function in a chronic mouse model of Parkinson's disease [J]. *Experimental Neurology* 2004; 190 (1): 145-156
- [9] Jeffrey D R, Margaret D H, Carlos A P. Knockout of glutamate transporters reveals a major role of astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate [J]. *Neuron* 1996; 16 (3): 675-686
- [10] 孟长虹, 丁建花, 何海蓉, 等. 6-羟基多巴的细胞毒性与谷氨酸转运的关系 [J]. *药理学报* 2003; 38 (12): 885-888