

小檗碱诱导大鼠神经元毒性死亡的研究^①

林穗珍¹ 黎明涛² 李晓瑜¹ 颜光美²

(中山医科大学 1 附属第一医院儿科; 广州, 510080 2 药理教研室)

摘要 目的: 研究小檗碱(Ber)对原代培养的大鼠大脑皮质和小脑颗粒神经元的直接作用及 Ber 与间接胆红素的相互作用。方法: 采用二乙酸荧光素(FDA)和 Hoechst 33258 DNA 染色法, 观察神经元的存活率及形态学特征; 用琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪分析 Ber 诱导神经元死亡的生化特征。结果: Ber 呈剂量(0 ~ 20 μ mol/L)依赖性地诱导原代培养的大鼠大脑皮质和小脑颗粒神经元死亡。其死亡的机制呈现坏死的特征: 包括神经元胞体肿大、无明显核染色质浓缩、DNA 随机断裂而在凝胶电泳图上呈弥散样改变、流式细胞仪分析未见凋亡峰。用蛋白质合成抑制剂预处理神经元, 不能阻断 Ber 的神经毒性作用。无毒性剂量下的 Ber(1 μ mol/L)与无毒性剂量下的胆红素相加, 可产生神经元的毒性。结论: Ber 诱导原代培养的大鼠大脑皮质和小脑颗粒神经元坏死, 并增强胆红素的神经毒性作用。

关键词 小檗碱/药理学; 胆红素/药物作用; 神经元/药物作用

中图分类号 R 961.1; 595; 827.1

NEUROTOXICITY INDUCED BY BERBERINE IN CULTURED CORTICAL AND CEREBELLAR GRANULE NEURONS OF RAT

Lin Suizhen¹ Li Mingtao² Li Xiaoyu¹ Yan Guangmei²

(1 Department of Pediatric, First Affiliated Hospital 2 Department of Pharmacology Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: The present study was aimed to examine the effect of berberine, the major ingredient of the Chinese herb huanglian (*Coptis chinensis* Franch), on primary cultured cortical and cerebellar granule neurons of rat and the interaction between berberine and bilirubin on the neurons. **Methods:** Neuronal viability and morphology were tested by fluorescent staining with fluorescein diacetate and Hoechst 33258. The biochemical features of berberine-induced neuronal death were characterized by agarose gel electrophoresis and flowcytometric analysis. **Results:** We found that berberine induces neuronal death in a concentration-dependent fashion at the range of 0 ~ 20 μ mol/L. The neuronal death displayed the characteristics of necrosis, including an enlargement of cell bodies without nuclear condensation, a diffuse agarose gel electrophoresis panel and without apoptosis peak in flow cytometric analysis. In addition, pretreatment of the primary cultures of cortical and cerebellar granule neurons with protein synthesis inhibitors, cycloheximide, did not block neuronal death induced by berberine. Moreover, treatment of the cultures with subtoxic concentrations of berberine (1 mg/L) and bilirubin produces neurotoxicity. **Conclusions:** Taken together, these data suggest that berberine induces neuronal death of primary cultured cortical and cerebellar granule neurons of rat via a necrosis mechanism. Berberine potentiates neurotoxicity induce by bilirubin.

Subject headings berberine/pharmacology; bilirubin/drug effects; neurons/drug effects

小檗碱(berberine, Ber)为黄连(*Coptis chinensis* Franch)等植物中的主要药用有效成分,

化学上属异喹啉类生物碱^[1], 现已发现其具有抗病原微生物、抗肿瘤、抗心律失常、降血糖和降压等作

用^[2],故广泛应用于临床。此外,在农村许多地区,民间一直应用黄连或黄连素于新生儿,以去“胎毒”。最近有报道,Ber对小鼠和大鼠脑缺血、缺氧有保护作用^[3]。然而,也有研究认为,Ber诱导并加重新生儿黄疸,甚至诱发核黄疸^[4]。但有关Ber对中枢神经元的直接作用及其机制的研究,文献未见报道。本研究应用原代培养的大鼠大脑皮质、小脑颗粒神经元,观察Ber对神经元的直接作用并探讨其机制。同时观察Ber与间接胆红素的相互作用。我们发现Ber具有神经毒性,其作用机制可能是诱导原代培养的大鼠大脑皮质、小脑颗粒神经元坏死。

1 材料方法

1.1 材料

Basal Eagles Medium (BME), B27 补充液体, Pauk's saline A 溶液, Neurobasal medium, 购于 GIBCO (USA); Hoechst 33258 购于 Molecular probes (USA); 其它药物购于 Sigma (USA)。Sprague Dawley (SD) 新生大鼠, 8 d, 体质量 10~18 g, 由中山医科大学动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠小脑颗粒神经元的培养 参照文献[5],取第8天新生SD大鼠的小脑,经过0.5 g/L胰酶消化后,加入0.5 g/L胰酶抑制剂和50 mg/L DNase I 以终止消化,离心(1 500 r/min)5 min,弃上清液,将细胞加入含有 $\varphi = 10\%$ 胎牛血清和25 mmol/L KCl的BME中,以细胞 $1.5 \times 10^9/L$ 的密度接种于已经用Poly-L-lysine包备的35 mm和24孔板的培养皿中。细胞生长在含 $\varphi = 5\%$ CO₂、37 °C的培养箱中。接种后24 h加入10 μmol/L Ara-C以抑制胶质细胞的生长,使神经元的纯化率为95%以上。

1.2.2 大鼠大脑皮质神经元的培养 取孕育16~18 d SD大鼠胚胎的大脑皮质,经过0.5 g/L胰酶消化后,加入0.5 g/L胰酶抑制剂和50 mg/L DNase I 以终止消化,离心(1 000 r/min)5 min,弃上清液,细胞在Pauk's Saline A 溶液中,上下吹打20~25次,再离心去上清,将细胞加入含 $\varphi = 10\%$ 胎牛血清的Neuronbasal培养基内,以细胞 $6 \times 10^8/L$ 的密度种植在包备好的24孔板或35 mm的培养皿内。细胞培养在含 $\varphi = 5\%$ CO₂、37 °C的培养箱中。为使神经元纯化,抑制胶质细胞,在种植48~

72 h内,更换含有 $50 \times \varphi = 2\%$ B27和0.5 μmol/L Glutamate的无血清的Neurobasal Medium,使用第7、8天的细胞。培养基中不加任何抗生素。

1.2.3 神经元存活率的测定 参照文献[5]双染色法测神经元存活率。取培养后第8天或给药24 h后的神经元,去掉培养液,加入染活细胞的二乙酸荧光素[fluorescein diacetate (FDA) 10 mg/L, 荧光下呈绿色]和染死细胞的碘化丙啶[propidium iodide (PI) 4 mg/L, 荧光下呈红色]温育5 min,用PBS液清洗细胞2次,然后用倒置荧光显微镜(nikong diaphot)观察细胞的生存与死亡情况。选激发波长450~490 nm,发射波长510 nm的滤光片和520 nm截止滤光片,这种复合滤光片可以同时看见绿色和红色的荧光细胞。在倒置荧光显微镜下,每个样本随机拍照4个低倍视野后,由未知情者分别计活细胞数目,并按下列公式计算神经元的存活率(rate of neuronal survival)。存活率=各组活细胞数÷对照组活细胞数×100%。

1.2.4 流式细胞仪分析细胞周期峰 用细胞消化液(0.5 g/L胰蛋白酶、0.53 mmol/L EDTA)收集 1×10^6 细胞,将细胞悬浮于PBS中,用注射针头抽取2次,使其成单个细胞悬液,用冷却至-20 °C的 $\varphi = 70\%$ 乙醇于4 °C固定细胞,2 000 r/min,5 min离心收集细胞,弃乙醇,细胞悬浮于含有50 mg/L碘化丙啶(promide iodine)、50 mg/L RNase A的染液中,避光于37 °C温育1 h后进行流式细胞仪测定,采用荧光强度值并以仪器所配软件进行数据处理。

1.2.5 形态学方法 Hoechst 33258染色^[5]:小脑颗粒神经元培养在35 mm的培养皿中,第8天,分别给药24 h后移去培养基,用PBS清洗神经元2次,40 g/L多聚甲醛液(4 °C,溶在PBS中)固定10 min,然后用消毒蒸馏水清洗2次,室温下待干。培养皿干后用Hoechst 33258(5 mg/L)染色5 min,用蒸馏水清洗2次,干燥(室温下)。然后在倒置荧光(Ex 360 nm, Em 450 nm)显微镜下观察形态学变化,并随机拍摄照片。

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳法 参照文献[5],将小脑颗粒细胞种植在150 mm×20 mm的培养皿中。第8天,加入各药物12 h后,移去培养基,用PBS清洗2次,将收集的细胞离心(5 000 r/min)5 min,再将细胞团块加入600 μL含有10 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L EDTA和2 g/L Triton X-100(pH 7.5)的缓冲液中15 min,离心(12 000 r/min)10

min. 用酚:氯仿(24:1)混合液抽提上清液。加入 300 mmol/L 的乙酸钠和等体积的异丙醇, 沉淀过夜。离心后, 用 $\varphi=70\%$ 乙醇洗涤 2~3 次, 干燥后加入 TE[Tris 10 mmol/L; EDTA 1.0 mmol/L (pH 7.4)] 和 0.6 g/L 的 RNase A 37 °C 温育 30 min, 样品放在 20 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳 2 h, 溴乙淀染色后在紫外灯下观察拍照。

1.2.7 药物配制法 Berberine chloride 和间接胆红素均使用二甲基亚砜(DMSO)溶解为 1 000× 的浓缩液, 置于 40~56 °C 温浴, 直至完全溶解, 然后储存于 -20 °C 冰箱中。实验对照组也加入同等量的 DMSO 作为溶解剂的对照。用 1/500~1/1 000 的 DMSO 对细胞的生存率没有影响。

1.2.8 统计学分析处理 测量数据 $\bar{x} \pm s$, 显著性检验用 ANOVA 随后 SNK q 检验(SPSS 统计软件包)。

2 结果

2.1 小檗碱对神经元存活率的影响

用培养了 8 d 的大脑皮质和小脑颗粒神经元, 分别加入不同浓度的 Ber(0~20 $\mu\text{mol/L}$), 24 h 后测神经元的存活率。结果处理过的神经元均剂量依赖性地出现细胞肿胀、胞体膨大、神经突触网络逐渐断裂和消失、细胞数减少(图 1、图 2, 前者见插图 2)。这种显微镜下所观察到的变化, 有些类似于谷氨酸的兴奋毒性作用^[7]。给予蛋白质合成抑制剂 Cycloheximide(Cyclo, 1.0 mg/L)预处理神经元 2 h 后, 再给予 Ber, 分别检测神经元的存活率。结果经过 Cyclo. 预处理组与 Ber 组无显著性差异。

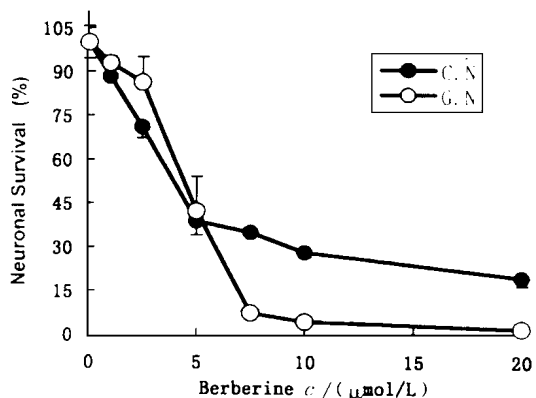


图 2 小檗碱剂量依赖性地诱导神经元坏死

Fig. 2 Dose-response of Ber-induced necrosis of cultured central neurons

C. N., cortical neurons; G. N., granule neurons(cerebellar)

2.2 细胞核形态学分析

为区别 Ber 所致的神经元死亡是坏死还是凋亡, 故将 Ber(10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后的神经元进行 Hoechst 33258 荧光 DNA 染色, 结果对照组和 Ber 组的 DNA 染色体形态上无明显差异, 未观察到明显的 DNA 染色体浓缩、聚集和断裂(图 3)。

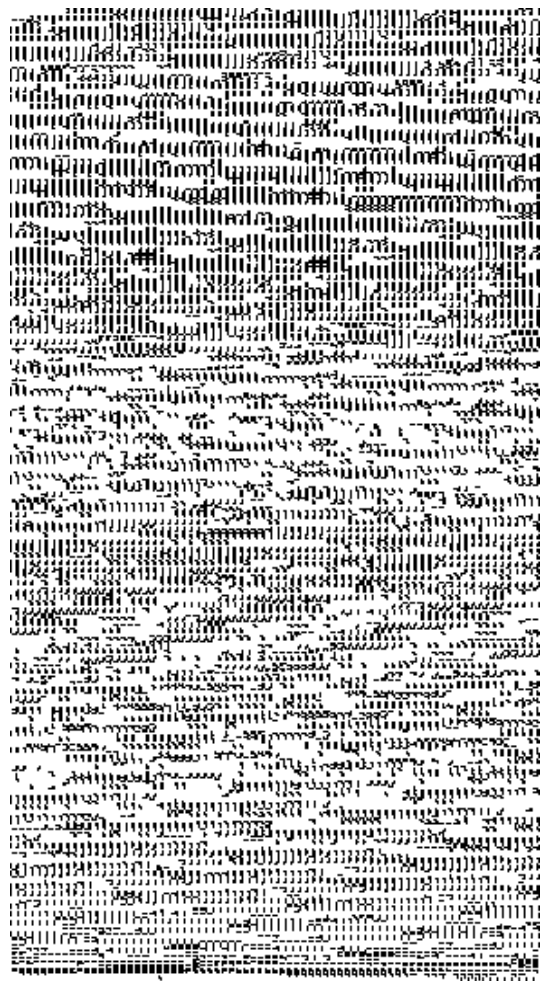


图 3 Hoechst 33258 DNA 染色分析核形态变化

Fig. 3 Morphological change induced by Ber with Hoechst 33258 staining in cerebellar granule neurons (1 000×)

a. control; b. Ber 10 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h; c. positive control. The arrow indicates apoptotic neuron. (Similar results were obtained in cortical neurons)

2.3 凝胶电泳分析 DNA

DNA 呈现“阶梯状”断裂现象是细胞凋亡的一个重要标志。用琼脂糖凝胶电泳法, 对给予 Ber(10 $\mu\text{mol/L}$) 后 6 h 和 12 h, 采集细胞, 离心取 DNA, 进行电泳, 结果发现除了阳性对照组(在 5 mmol/L

KCl 培养下的小脑颗粒神经元^[8]呈明显的 DNA “梯形”样改变外,其它未发现明显的 DNA “梯形”(图 4)。对分别给予蛋白质合成抑制剂 Cyclo. 1.0 mg/L 预处理细胞 2 h,再给予 Ber 12 h 后,采集细胞,离心取 DNA 进行电泳,结果经过 Cyclo. 预处理组与 Ber 组无显著性差异。提示蛋白质合成抑制剂预处理对 Ber 导致的毒性无减弱或阻断作用。



图 4 Ber 诱导小脑颗粒神经元 DNA 变化的电泳分析

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation analysis

Lane 1, DNA sizes marker ladder; Lane 2 positive control; Lane 3 control; Lane 4, Ber 10 $\mu\text{mol/L}$ for 12 h

2.4 流式细胞仪对细胞凋亡峰的定量分析

亚二倍体峰(亚 G1 峰或凋亡峰)的出现是流式细胞仪对细胞定量分析 DNA 断裂的一个重要标志。细胞周期分析结果表明,对照组与 Ber 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组均出现明显的 G1 峰,未观察到亚二倍体峰(图 5)。上述结果说明 Ber 诱导大鼠皮质和小脑颗粒神经元坏死。

2.5 小檗碱和胆红素的协同作用

为观察 Ber 与间接胆红素的相互作用,用 Ber 和胆红素均无毒性作用的剂量下(Ber 1 $\mu\text{mol/L}$, Bilirubin 1 mg/L),先用 Ber 预处理小脑颗粒神经元后再加入胆红素,结果预处理组的神经元出现明显的毒性作用,而单独给药组与对照组无显著性差异。

3 讨论

小檗碱已在临床上广泛使用,但其对中枢神经系统直接的毒性作用尚未被认识。本研究观察到

小檗碱呈浓度依赖性地诱导大鼠大脑皮质和小脑颗粒神经元死亡。经过 Hoechst 33258 DNA 染色、琼脂糖凝胶电泳及流式细胞仪分析,均表明 Ber 诱导的神经元死亡属于坏死而不是凋亡。细胞凋亡是一个需要基因表达的主动过程。因此 RNA 或蛋白质合成抑制剂能够阻断细胞凋亡的发生^[8]。

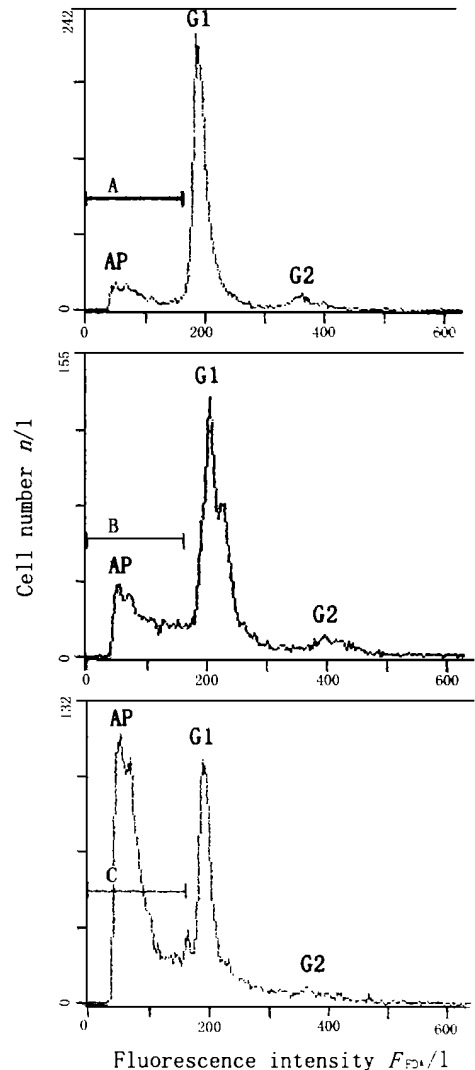


图 5 流式细胞仪分析细胞周期亚 G1 峰(AP, 凋亡峰)

Fig. 5 Flowcytometric analysis of the effect of Ber on cell cycle

A. control; B. Ber 10 $\mu\text{mol/L}$ 24 h; C. positive control; AP. apoptosis' s peak

Ber 诱导神经元毒性的机制尚不清楚,本实验用蛋白质合成抑制剂(Cyclo., 放线菌酮)预处理细胞后,不能减弱或阻断 Ber 的神经毒性作用,这一结果进一步肯定了 Ber 诱导神经元坏死而并非凋亡。Ber 诱导神经元坏死的机理很可能是 Ber 进入脑细胞后,抑制神经元 DNA、RNA 及蛋白质的合

成,或干扰了细胞内黄酶等细胞呼吸链系统而损害细胞^[1]。实验结果显示 Ber 诱导神经元肿胀坏死,证明 Ber 极可能具有破坏神经膜的作用。其机制可能与 Ber 直接破坏细胞膜有关,或 Ber 与神经膜上的某些结构结合触发兴奋性谷氨酸递质的释放,也可能直接作用于细胞膜上谷氨酸递质的受体而触发神经兴奋毒性死亡,本实验室对此正在进行深入的研究。

间接胆红素的神经毒性早已被世界公认,而 Ber 加重新生儿黄疸也有报道^[4],但是 Ber 与胆红素对神经系统的相互影响尚不清楚。我们曾报道^[8]间接胆红素可诱导小脑颗粒神经元凋亡,按照神经元凋亡的机制, Ber 如果作为 DNA、RNA 的合成抑制剂,那么 Ber 是否应当阻断胆红素所诱导的神经元凋亡,本研究结果与预期相反, Ber 反而增强胆红素的神经毒性。结果显示二者有协同作用,但其作用机制可能各不相同。据报道,使用 Ber 后, Ber 通过置换或竞争了血浆中与间接胆红素结合的白蛋白,使游离的胆红素增高;另一方面可能是 Ber 促使红细胞膜破裂,使胆红素的来源增加,从而加重了新生儿黄疸,并增加了核黄疸的危险性^[4]。同理,在培养的神经元中,很可能 Ber 置换或竞争了培养液中的小牛血清白蛋白,使加入的胆红素游离浓度增加,更易通过细胞膜而加重毒性。但二者是否通过竞争神经膜上的某一受体或起共同破坏神经膜的作用尚不清楚。已有口服黄连素片引起急性溶血的报道^[9],说明 Ber 对某些红细胞(尤其是 G6PD 缺陷症患儿的红细胞)具有破膜作用,结果提示 Ber 对神经膜具类似的破膜作用。传统认为,口服 Ber 不易被吸收,但近来报道,口服 Ber 易被吸收且可以通过血脑屏障^[10-11]。新生儿血脑屏障发育不完善, Ber 更易进入脑细胞而引起

中毒。因此,建议对新生儿和妊娠的妇女慎用含 Ber 浓度高的中药制剂。

(本文图 1 见插页 2)

参 考 文 献

- 1 季宇彬. 中药有效成分药理与应用. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 1995. 69~80
- 2 牛奎之, 高维智. 黄连素的药理和临床应用. 中原医刊, 1995, 22(2): 4748
- 3 吴俊芳, 史以菊, 刘天培. 小檗碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 100
- 4 Chan E. Displacement of bilirubin from albumin by berberine. Biol Neonate, 1993, 63(4): 201
- 5 Yan G M, Irwin R P, Lin S Z, *et al.* Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons. J Phamacol Exp Ther, 1995, 274: 983
- 6 Jones K H, Senft J A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. J Histochem, 1985, 33: 77
- 7 Choi D W. Excitotoxic cell death. J Neurobiol, 1992, 23: 1261
- 8 颜光美. 中枢神经元凋亡模型的建立及其信号转导. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 1
- 9 彭华芝. 黄连素片引起急性溶血 2 例报道. 德宏医药, 1986(1): 45
- 10 包丽华, 李宝馨, 杨宝峰, 等. 人口服黄连素的药代动力学研究. 中国药理学通报, 1997, 13(1): 95
- 11 安 昇, 王文彬. ³H-盐酸小檗碱的吸收分布和排泄的初步研究. 北京中医学院学报, 1983, 2: 13

(1998-04-22 收稿 1998-08-04 修回)

简 讯

声 明

本刊已入编《中国学术期刊(光盘版)》,作者稿件一经本刊录用,将同时被《中国学术期刊(光盘版)》收录。作者如不同意须在投稿时向本刊声明,《中国学术期刊(光盘版)》将不予收录,否则本刊将视为同意。

(学 讯)

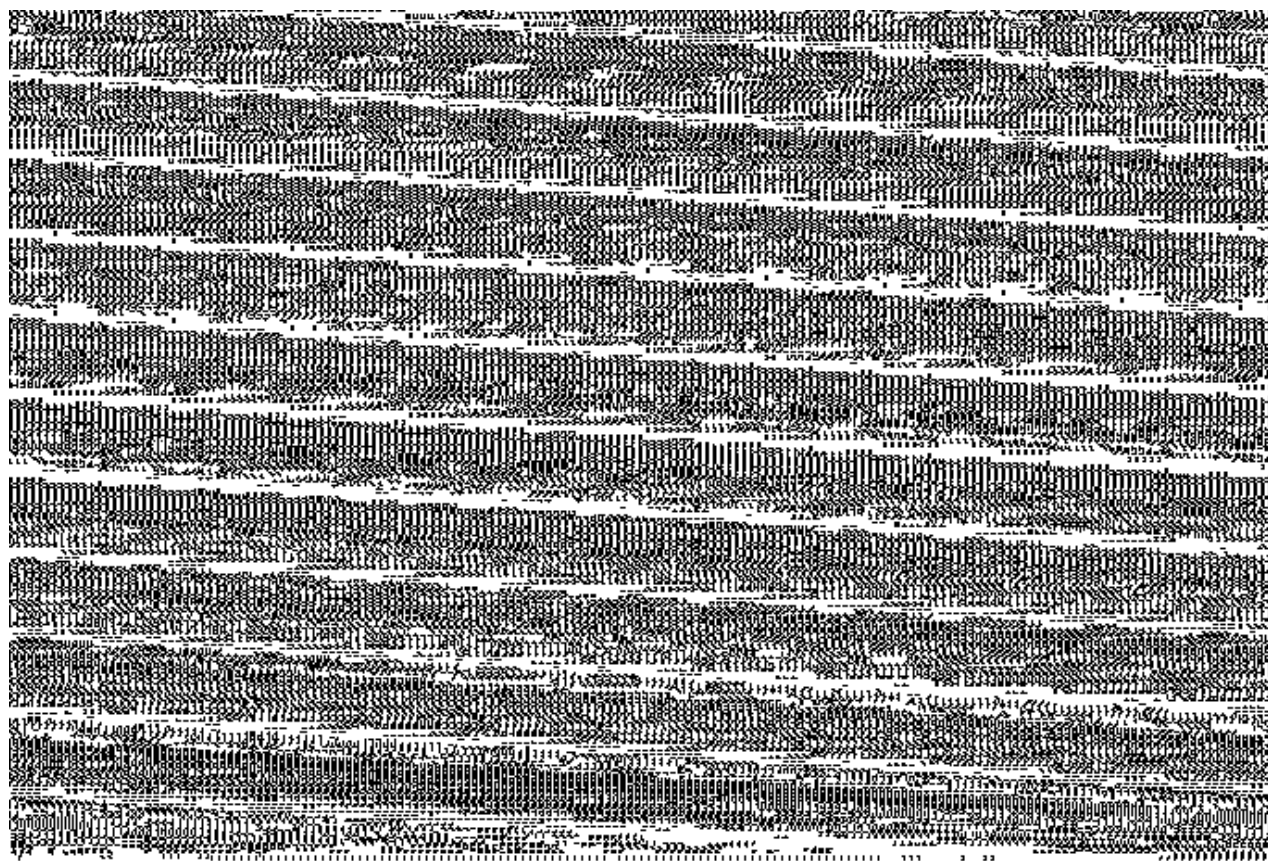


图 1 Ber 诱导小脑颗粒和大脑皮质神经元死亡的形态学观察

Fig. 1 Ber induced cortical and cerebellar granule neurons death

a & d show phase-contrast photo (200 \times) of cerebellar granule neurons; a. control; b. Ber 10 $\mu\text{mol/L}$ for 3 h.

c & d show fluorescence photo (200 \times) of cortical neurons; Green fluorescence indicate living neurons and red fluorescence indicates dead neurons;

c. control; d. Ber 10 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. (Arrow indicates enlarged cell body and nerve net disappear)