

【基础研究】

通信作者:李东亮(1950-),男,河南沁阳人,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:脑细胞损伤的机制及靶向干预;E-mail:xydl8@126.com。

four groups, and the culture medium containing 0, 1, 3, 5 mmol · L⁻¹ ATP was added respectively, 100 μL per well. After 15, 30, 60 minutes, the cells were washed with Hank's solution for three times, and stained by Fluo-3/AM and Hoechst 33258. The intracellular fluorescence intensity was observed under fluorescence microscope. The SH-SY5Y cells in logarithmic phase were inoculated in high glucose DMEM containing volume fraction 10% fetal bovine serum, and cultured for 24 hours in incubator containing volume fraction 5% CO₂ at 37 °C. Then the cells were randomly divided into normal control group, ATP group and low, middle and high dose of KN-62 group. The cells in the normal control group were cultured in 100 μL conventional culture medium. The cells in ATP group were cultured in 100 μL culture medium containing 5 mmol · L⁻¹ ATP. The cells in the low, middle and high dose of KN-62 group were cultured for 30 minutes in 100 μL culture medium containing 100, 500 and 1 000 nmol · L⁻¹ KN-62 respectively; and cultured for one hour in 5 mmol · L⁻¹ culture medium 100 μL. Then the cells were washed with Hank's solution for three times, and stained by Fluo-3/AM and Hoechst 33258. The intracellular fluorescence intensity was observed under fluorescence microscope, and recorded by image analysis software. The average fluorescence intensity of Ca²⁺ in cells was measured. In each experiment, 3 parallel wells were set in each group, and the experiment was repeated 3 times. **Results** The number of fluorescent cells was few, and the fluorescence intensity was weak in 0 mmol · L⁻¹ ATP group. With the increase of ATP dose, the number of fluorescent cells and fluorescence intensity increased gradually. Under the same dose of ATP, with the extension of ATP action time, the number of fluorescent cells and the fluorescence intensity increased gradually. The fluorescence intensity in the normal control group, ATP group and low, middle, high dose of KN-62 group was 468.24 ± 45.67, 3 292.35 ± 159.64, 3 013.27 ± 321.42, 2 515.77 ± 320.98 and 2 486.32 ± 318.31, respectively; the fluorescence intensity in ATP group was significantly stronger than that in the normal control group ($P < 0.05$); the fluorescence intensity in low, middle and high KN-62 group were significantly lower than those in ATP group ($P < 0.05$). **Conclusion** The rise of Ca²⁺ concentration induced by ATP in SH-SY5Y cells has a concentration and time-dependent manner. KN-62 can partially block the action of ATP.

Key words: adenosine triphosphate; human neuroblastoma; SH-SY5Y cells; Ca²⁺; P2X₇ receptor

三磷酸腺苷 (adenosine-5'-triphosphate, ATP) 是重要的神经递质^[1-3], 生理浓度的 ATP 可以选择性地作用于 P2X₇ 嘌呤受体形成离子通道, 参与递质调节、突触修饰和神经营养等一系列生理作用。有研究表明, ATP 激活星形胶质细胞的 P2X₇ 受体后 Ca²⁺ 内流增加^[4], 参与细胞内的信号传导。细胞内 Ca²⁺ 水平增高, 又可激活蛋白酶和启动细胞凋亡^[5-7]。细胞外高浓度的 ATP 是细胞“死亡因子”, 而其 P2X₇ 受体是“死亡受体”^[8]。新乡医学院生理学与神经生物学教研室前期研究也证实细胞外高浓度 ATP 能够诱导 SH-SY5Y 细胞自噬和凋亡^[9]。然而, 高浓度 ATP 诱导神经元凋亡的机制却罕有文献报道。已知细胞内“钙超载”是触发细胞凋亡蛋白表达的信号, 故证明 ATP 诱导神经元细胞内 Ca²⁺ 升高的规律, 具有较大的理论意义和潜在的临床应用价值。本研究旨在探讨 ATP 诱导 SH-SY5Y 细胞内 Ca²⁺ 水平变化的特点及 P2X₇ 受体阻断剂的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞 人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y 细胞

株) 购于上海中国科学院典型细胞培养库, 在新乡医学院生理与神经生物学教研室 - 180 °C 液氮中冻存。

1.2 主要试剂和仪器 高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, H-DMEM) (美国 Invitrogen 公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、Hank's 缓冲液 (杭州吉诺生物医药技术有限公司); ATP、异喹啉衍生物 KN-62 (美国 Sigma 公司); 荧光指示剂 Fluo-3/AM (日本同仁公司); Hoechst 33258 (美国 Invitrogen 公司); Axio-Zert. AI 型 Carl Zeiss 显微镜、Axio-Cam 506 相机 (德国 Heraeus 公司); CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo Forma 公司)。

1.3 SH-SY5Y 细胞培养 参照本实验室常规程序^[9]进行培养, 取冻存的细胞, 置于 37 °C 水浴箱中, 快速解冻, 1 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 移入培养瓶中, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的 H-DMEM, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和水汽培养箱中培养, 每隔 48 h 换培养液, 常规培养至对数生长期时分组实验。

1.4 细胞分组及处理

1.4.1 ATP 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 Ca²⁺ 水平变化

取对数生长期密度为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的 SH-SY5Y 细胞悬液接种于含 H-DMEM 培养液的 96 孔板中,每孔 100 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,随机分为 4 组,每组 3 个平行复孔。分组时弃原有培养液,将已经备好的含 0、1、3、5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 的培养液加入相应各组中处理细胞,每孔 100 μL ,各组均分别作用 15、30、60 min,然后 Hank's 溶液洗涤细胞 3 次,完成样品制备。将制备好的样品加入含 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fluo-3/AM 和 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 33342 的无血清、无酚红 H-DMEM 培养液,每孔 100 μL ,各组在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。Flu-3/AM 荧光染料染细胞内 Ca^{2+} ,Hoechst 33258 荧光染料染细胞核。Axio-Zert. AI 型 Carl Zeiss 荧光显微镜、Axio-Cam 506 相机拍照,ZEN2.1 blue edition 图像分析模块分析记录结果,观察细胞内荧光发射强度变化,测每组细胞中 Ca^{2+} 的平均荧光强度。每个实验重复 3 次。

1.4.2 KN-62 干预 ATP 诱导的 SH-SY5Y 细胞内

Ca^{2+} 水平变化 取对数生长期密度为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的 SH-SY5Y 细胞悬液接种于含 H-DMEM 培养液的 96 孔板中,每孔 100 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,随机分为正常对照组、ATP 组及 KN-62 低、中、高剂量组。正常对照组常规培养,每孔 100 μL ;ATP 组在含 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 的培养液中培养,每孔 100 μL ,KN-62 低、中、高剂量组分别先用 100、500、1 000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KN-62 孵育,每孔 100 μL ,30 min 后,再用 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 的培养液处理 1 h,每孔 100 μL ,用 Hank's 溶液洗涤细胞 3 次,完成样品制备。将制备好的样品加入含 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fluo-3/AM 和 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 33258 的无血清、无酚红 H-DMEM 培养液,每孔 100 μL ,各组 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。Fluo-3/AM 荧光染料染色细胞内 Ca^{2+} ,Hoechst 33258 荧光染料染细胞核。Axio-Zert. AI 型 Carl Zeiss 荧光显微镜、Axio-Cam 506 相机拍照,ZEN2.1 blue edition 图像分析模块分析记录结果,观察细胞内荧光发射强度变化,测每组细胞中 Ca^{2+} 的平均荧光强度,实验重复 3 次。

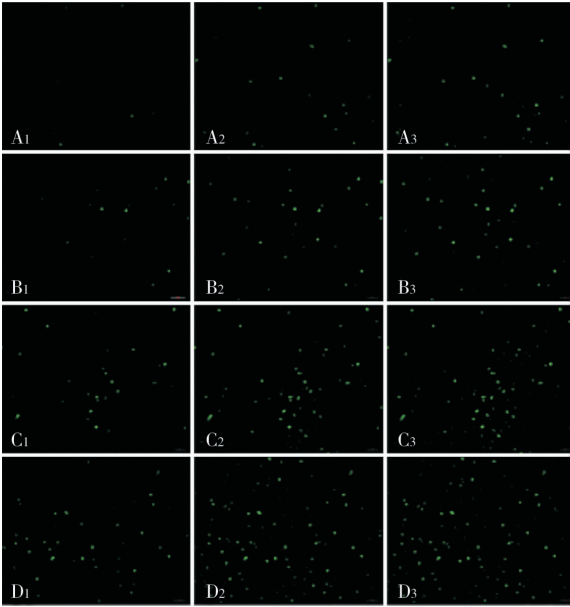
1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间

比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP 对 SH-SY5Y 细胞内 Ca^{2+} 水平影响

0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 组呈现荧光的细胞数量少,荧光强度弱(图 1 A₁ ~ A₃);1、3、5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 组随着 ATP 剂量增加,呈现荧光的细胞数量逐渐增多,荧光强度逐渐增强;若 ATP 剂量相同,则随着 ATP 作用时间的延长,呈现荧光的细胞数量逐渐增多,荧光强度逐渐增强(图 1 B₁ ~ D₃)。



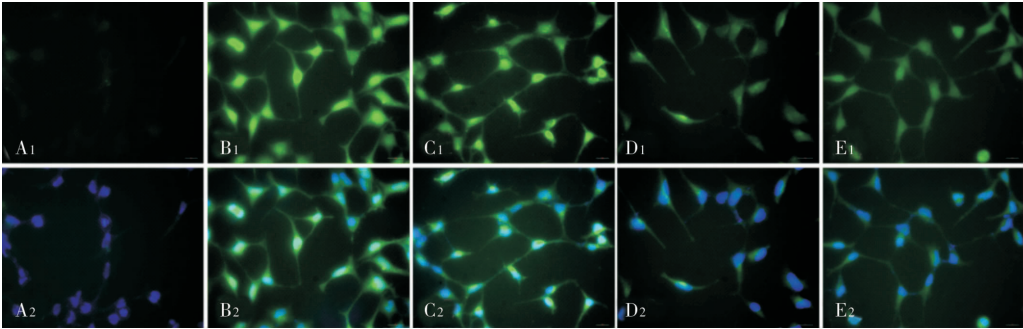
A₁、A₂、A₃:0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 处理 15、30、60 min;B₁、B₂、B₃:1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 处理 15、30 min、60 min;C₁、C₂、C₃:3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 处理 15、30、60 min;D₁、D₂、D₃:5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 处理 15、30、60 min;绿色荧光代表细胞内游离 Ca^{2+} 。

图 1 不同浓度的 ATP 作用不同时间对 SH-SY5Y 细胞内 Ca^{2+} 水平的影响 (Fluo-3/AM 染色, $\times 100$)

Fig.1 Effect of ATP with different concentration and action time on Ca^{2+} concentration in SH-SY5Y cells (Fluo-3/AM staining, $\times 100$)

2.2 KN-62 对 ATP 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 Ca^{2+}

水平变化的影响 正常对照组、ATP 组、KN-62 低、中、高剂量组细胞内荧光强度分别为 468.24 ± 45.67 、 $3\ 292.35 \pm 159.64$ 、 $3\ 013.27 \pm 321.42$ 、 $2\ 515.77 \pm 320.98$ 、 $2\ 486.32 \pm 318.31$,ATP 组平均荧光强度显著强于正常对照组 ($P < 0.05$);KN-62 低、中、高剂量组细胞内平均荧光强度均低于 ATP 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。



A₁、A₂:0 mmol·L⁻¹ ATP 处理 60 min;B₁、B₂:5 mmol·L⁻¹ ATP 处理 60 min;C₁、C₂:100 nmol·L⁻¹ KN-62,5 mmol·L⁻¹ ATP 处理 60 min;D₁、D₂:500 nmol·L⁻¹ KN-62,5 mmol·L⁻¹ ATP 处理 60 min;E₁、E₂:1 000 nmol·L⁻¹ KN-62,5 mmol·L⁻¹ ATP 处理 60 min。A₂、B₂、C₂、D₂、E₂ 为相应的 2 种荧光染色后的合并图,绿色荧光代表细胞内游离 Ca²⁺,蓝色荧光代表细胞核。

图 2 不同浓度的 KN-62 对 ATP 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响 (Fluo-3/AM 和 Hoechst 33258 染色,×400)
Fig.2 Effect of different concentrations of KN-62 on Ca²⁺ concentration induced by ATP in SH-SY5Y cells(Fluo-3/AM and Hoechst 33258 staining, ×400)

3 讨论

钙在调节细胞凋亡机制中起着核心的作用。细胞内 Ca²⁺ 水平是由活性膜通道以及细胞内钙库严密控制的,细胞内 Ca²⁺ 影响细胞周期,调节神经递质、激素和生长因子的释放,介导细胞的凋亡和自噬等^[10-12]。ATP 作为重要的神经递质,生理浓度下介导细胞间信号传导,引起 Na⁺、Ca²⁺ 内流,参与广泛的生理过程,包括神经递质释放、神经兴奋调节、突触修饰和神经营养等作用。

Fluo-3/AM 是一种新型的高度特异性 Ca²⁺ 荧光指示剂,进入细胞后与细胞内游离 Ca²⁺ 结合,通过荧光显微镜观察其荧光强度可以灵敏反映细胞内游离 Ca²⁺ 浓度。Hoechst 33258 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,用于细胞核染色。本实验结果显示,正常 SH-SY5Y 细胞的 Ca²⁺ 含量少且分布稳定,荧光强度不随培养时间的延长而改变。而高浓度 ATP 处理 SH-SY5Y 细胞,细胞内 Ca²⁺ 则发生规律性的变化,随着 ATP 剂量的增加,呈现荧光的细胞数量逐渐增多,荧光强度逐渐增强。结果表明,ATP 诱导的 SH-SY5Y 细胞内的 Ca²⁺ 变化取决于 ATP 的浓度和作用时间,即呈浓度和时间依赖性。

在某些病理情况下,如脑外伤、缺血、炎症、退行性病变等,死亡细胞释放出大量 ATP 及降解产物,在局部形成高浓度,并向邻近区域扩散,引起钙超载等一系列炎症级联反应,从而导致神经元死亡。P2X₇ 受体是介导 ATP 毒性作用的主要受体^[13],它

是 P2 受体家族中 P2X 离子型受体亚型之一,均分布于细胞膜上,ATP 为其天然配体。P2X₇ 受体被配体激活后可通过不同的机制提高细胞内 Ca²⁺ 水平^[14-15]。有文献报道,ATP 作用于分化的 NG108-15 神经细胞上激活 P2X₇ 受体,不仅引起细胞内钙超载,而且通过三磷酸肌醇受体介导 Ca²⁺ 释放,最终导致细胞的凋亡,该过程可以被 ATP 的受体抑制剂所阻断^[16]。有研究证实,在分化的 SH-SY5Y 细胞上存在 P2X₇ 受体,P2X₇ 受体拮抗剂亮蓝 G (brilliant blue G, BBG) 既能衰减 6-羟基多巴胺引起的 SH-SY5Y 细胞神经毒性损伤,又可以降低细胞质中乳酸脱氢酶释放,具有细胞保护作用^[17]。LARSSON 等^[18]证实,未分化的 SH-SY5Y 细胞上表达有 P2X₇ 受体,实验结果显示,ATP 可激活 P2X₇ 受体离子通道和电压依赖性 Ca²⁺ 通道,介导细胞内 Ca²⁺ 浓度增加,P2X₇ 受体阻断剂 BBG 能够降低 ATP 诱导的细胞内 Ca²⁺ 增加。本实验探讨另一种 P2X₇ 受体特异性阻断剂 KN-62 对 ATP 诱导的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞内 Ca²⁺ 水平的变化,结果显示,其可有效减低 ATP 所诱导的细胞内 Ca²⁺ 升高,与 LARSSON^[18]的结果一致。这些都提示 P2X₇ 受体在 ATP 致伤神经元中起着重要作用,在脑中也扮演着“死亡受体”的角色。

综上所述,ATP 诱导的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞内 Ca²⁺ 升高具有浓度和时间依赖性,KN-62 可部分阻断 ATP 的这一作用,表明 P2X₇ 受体是调控 ATP 升高细胞内 Ca²⁺ 的分子靶标之一。

参考文献:

[1] BUTT A M. ATP:a ubiquitous gliotransmitter integrating neuronal networks[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2011,22(2):205-213.

[2] LOHR C,GROSHE A,REICHENBACH A,*et al.* Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems[J]. *Pflugers Arch*,2014,466(10):1859-1872.

[3] TODD K J,ROBITAILLE R. Purinergic modulation of synaptic signalling at the neuromuscular junction[J]. *Pflugers Arch*,2006,452(5):608-614.

[4] SUADICANI S O,BROSNAN C F,SCEMES E,*et al.* P2X₇ receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling[J]. *J Neurosci*,2006,26(5):1378-1385

[5] ALBERDI E,SANCHEZ-GOMEZ M V,MATUTE C,*et al.* Calcium and glial cell death[J]. *Cell Calcium*,2005,38 (3/4):417-425.

[6] MATUTE C,DOMERCQ M,SANCHEZANCHE-GOMEZ M V,*et al.* Glutamate-mediated glial injury:mechanisms and clinical importance[J]. *Glia*,2006,53(2):212-224.

[7] SZYDLOWSKA K,TYMIANSKI M. Calcium,ischemia and excitotoxicity[J]. *Cell Calcium*,2010,47(2):122-129.

[8] ZARJOU A,AGARWAL A. ATP as a death factor:purinergic signaling in renal epithelial-fibroblast cross talk[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2011,300(1):F60-F61.

[9] 卢娜,白瑞樱,魏林郁,等. 胞外高浓度 ATP 诱导 SH-SY5Y 细胞的自噬和凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(8):1388-1393.

[10] WARING P. Redox active calcium ion channels and cell death [J]. *Arch Biochem Biophys*,2005,434 (1):33-42.

[11] ABDULKAREEM Z A,GEE J M,COX C D,*et al.* Knockdown of the small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels is potentially

cytotoxic in breast cancer cell lines[J]. *Br J Pharmacol*,2016,173(1):177-190.

[12] TORTIGLIONE A,PIGNATARO G,MINALE M,*et al.* Na⁺/Ca²⁺ exchanger in Na⁺ efflux-Ca²⁺ influx mode of operation exerts a neuroprotective role in cellular models of *in vitro* anoxia and *in vivo* cerebral ischemia[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2002,976(1):408-412.

[13] EYO U B,MINER S A,AHLERS K E,*et al.* P2X₇ receptor activation regulates microglial cell death during oxygen-glucose deprivation[J]. *Neuropharmacology*,2013,73(5):311-319.

[14] RALEVIC V,BURNSTOCK G. Ralevica Receptors for purines and pyrimidines[J]. *Pharmacol Rev*,1998,50(3):415-492.

[15] BEAN B P. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels[J]. *Trends Pharmacol Sci*,1992,13(3):87-90.

[16] CHAO C C,HUANG C C,Lu D Y,*et al.* Ca²⁺ store depletion and endoplasmic reticulum stress are involved in P2X₇ receptor-mediated neurotoxicity in differentiated NG108-15 cells[J]. *J Cell Biochem*,2012,113(4):1377-1385.

[17] CARMO M R,MENEZES A P,NUNES A C,*et al.* The P2X₇ receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity,neurotoxicity and gliosis[J]. *Neuropharmacology*,2014,81(4):142-158.

[18] LARSSON K P,HANSEN H J,DISSING S. The human SH-SY5Y neuroblastoma cell-line expresses a functional P2X₇ purinoceptor that modulates voltage-dependent Ca²⁺ channel function[J]. *J Neurochemistry*,2002,83(2):285-298.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

《新乡医学院学报》2017 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于 1984 年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月 5 日出版,大 16 开本,每期 80 页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、技术与方法、护理研究、综述、医学教育研究、名院·名科·名医等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊,目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》、《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》、《中国药学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价 10.00 元,全年 120.00 元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www.xxyxyxb.com,E-mail:xxyxyxb@163.com。

本刊编辑部