

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

研究 CIN-1 抑制 glutamate 及 缺氧/葡萄糖實驗引發神經細胞的死亡機制
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2321-B-040-008-
執行期間：96年12月01日至97年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系藥理學科

計畫主持人：關宇翔

計畫參與人員：此計畫無其他參與人員：

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年10月30日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

研究 CIN-1 抑制 glutamate 及 缺氧/葡萄糖實驗引發神經細胞的死亡機制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96 - 2321 - B - 040 - 008 -

執行期間：2007 年 12 月 01 日至 2008 年 07 月 31 日

計畫主持人：關宇翔

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系藥理科

中 華 民 國 97 年 10 月 30 日

前言與文獻探討

腦中風世界第二大死因 (Murray and Lopez, 1997)，在本國衛生署公佈腦中風也是如此。全球有六分之一的人皆曾經歷一次中風 (Seshadri et al., 2006)。中風三分之一的病人會有失去生活能力的狀況，至少六個月需依賴他人才得以生活 (Warlow, 1998)。因此常造成相當高的社會與經濟成本。腦中風 80% 的病因是缺血性中風 (ischemic stroke)，主要的病灶是在主要的大腦動脈 (通常是中大腦動脈, middle cerebral artery, MCA) 或其分支處發生栓塞性阻塞 (thrombotic or embolic occlusion)。利用體外初代神經細胞培養 (primary neural culture) 的方式，以深入研究缺血性腦中風所導致神經細胞死亡的分子機轉。進而研究缺血性腦中風的病理機轉，及如何治療腦中風包括兩種機制血液再流入 (recanalization) 與神經保護作用 (neuroprotection)。近年來缺血性腦損傷治療方法為投予血栓溶解劑 (thrombolysis)，或抗凝結劑 (anticoagulation) 與藥物支持療法。雖然血栓溶解劑可以有效的降低腦中風的發炎反應 (Audebert et al., 2004)，其中只有大約 2% 的中風病人適合使用血栓溶解劑 tPA (tissue plasminogen activator) (Demaerschalk and Yip, 2005)，可使血液再注入栓塞的部分。臨床上，缺乏較有效率的即時治療方法，所以腦神經疾病所引起的病狀和死亡的情形是常見的結果，目前許多的研究計畫多致力於尋找出腦神經細胞的死亡機轉，期望能藉此尋找出新藥物化合物可促進控制腦細胞缺血所引起的腦神經細胞損傷。

正常生理狀態下，腦所需能源幾乎皆由醣氧化而來。腦組織吸收大約 30-40 % 血中的氧，而僅使用大約 10-15 % 的血醣。在局部缺血的情況下，血流量降低，首先會影響到氧氣的供應。當血管阻塞時，腦組織氧含量快速下降而相對的二氧化碳上升。此時，血醣雖仍是腦部能量的主要來源，但主要進行無氧醣解作用 (Anaerobic glycolysis)，除大量降低能量的產生，進而造成能量衰竭 (energy failure) 外；同時產生大量的乳酸 (Lactate)，造成腦組織的酸中毒 (acidosis)。Acidosis 促使細胞自由基形成 (Free radical formation)，而干擾胞內蛋白質的合成，並惡化腦損傷 (Huang and McNamara, 2004; Mergenthaler et al., 2004)。Energy failure 則會干擾神經細胞的 Na^+/K^+ -ATPase 與 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATPase pump，並導致 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporter 逆流，進而引發胞膜的去極化，以致於神經細胞釋出 glutamate，同時也會引發更嚴重的腦損傷 (Phan et al., 2002)。

Glutamate 在中樞神經系統中，是一種主興奮性神經傳導物質。Glutamate 作用於離子通透性 (ionotropic glutamate receptors) 與代謝性 (metabotropic glutamate receptors, mGluRs) 二大類的接受器 (Pin and Duvosin, 1995)。離子通透性接受器，可依作用劑的不同，再分為三種型式 N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and kainate receptors (Nakanishi, 1994)。mGluRs 則屬於 G protein- coupled receptor (GPCR)。這些接受器在神經突觸可塑性相關 (synaptic plasticity)，如學習、記憶、神經發育與神經退化，皆有密不可分的關係 (Nakanishi, 1994; Pin and Duvosin, 1995)。高濃度的 Glutamate 刺激神經細胞時，作用於細胞膜上的接受器導致胞內鈣離子 (calcium) 濃度的增加與酸鹼值 (pH value) 的降低，在細胞形態則有膨脹 (swelling) 的現象。Glutamate 刺激細胞時，經由活化 mitogen-activated-protein (MAP) kinase，進而引發一連串的細胞反應，包括超氧自由基的生成、粒線體膜的去極化、與 caspase 的活化，最後導致神經細胞的凋亡 (apoptosis) 或壞死 (necrosis) (Schinder et al., 1996; White and Reynolds, 1996)，引發神經毒性 (Froissard and Duval, 1994, Davis and Maher, 1994)。因此，高濃度的 Glutamate 累積於腦內會引發數種神經退化性疾病 (neurodegenerative disorders)，如 Parkinson's disease, Alzheimer's disease, seizures, stroke and trauma (Coyle and Puttfarcken, 1993)。

CIN-1 從樟樹分離而萃取出來的化合物。CIN-1 是一種新生的抗氧化物以及自由基清道夫 (Hsiao et al., 2001)，亦為高脂溶性的化合物，因此容易通過血腦障壁而進入至腦中。其為血栓素合成酶 (Thromboxane synthase) 以及血栓素 A2 受器的雙抑制劑 (Yu et al., 1994a, Yu et al., 1994b)，並且有阻擋大白鼠心臟細胞的鈉離子及鈣離子內部流動的能力 (Su et al., 1999)。CIN-1

也已經證實能夠保護活體 (in vivo) 的肌肉避免缺血-再灌流的傷害 (Cheng and Chang, 1995)。近年來, CIN-1 已經被顯示在鼠腦研磨物中具有濃度依靠的特性, 來抑制非酵素型鐵離子誘發的脂質過氧化, 以及由銅離子所催化的氧化作用及 NADPH 依賴的微粒體脂質過氧化的活性 (Hsiao et al., 2001)。於是, 我們認為 CIN-1 可以保護活體的腦免於缺血-再灌流的傷害。在最近的研究發表中, 已經有證實 CIN-1 具有藉著降低受損處超氧化物形成以及降低脂質過氧化和 DNA 水解之氧化傷害的能力來達到保護作用, 避免受到短暫性病灶缺血的傷害, 並且減少神經性發炎以及腦栓塞現象與改善腦部缺血-再灌流後之 24 小時短期復原的神經行為表現結果 (Lee et al., 2005)。

研究目的

本研究利用體外培養初代神經細胞模式, 探討 CIN-1 是否能保護神經細胞在 glutamate 缺與氧/葡萄糖所引發的細胞傷害, 及其中的作用機轉。

研究方法

初代神經元培養 (primary neural culture) :

由於 Neuromics (Minneapolis MN, USA) 公司購入 E18 and E20 Rat Primary Neuronal Tissue 進行初代神經元純化與培養。取得大鼠腦皮質組織於冰涼的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中切成小塊狀。清洗三次後, 加入組織消解液 (100 U/ml papain, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml cysteine, 1.5 mM CaCl₂, and DNase I) 於 37°C 下, 作用 30 分鐘。加入去補體的 horse serum 終止消解反應。以 1,000 g 離心 10 分鐘, 移除上清液。加入含 10% horse serum 的 DMEM, 將細胞再懸浮並均勻散佈於培養液中並過篩。將細胞移入經 poly-D-lysine 處理過的細胞培養盤或蓋玻片, 並置於置放於濕度固定、溫度 37°C 及含 5% 二氧化碳之空氣 (5% CO₂/95% Air) 的細胞培養箱 (Incubator)。三至四小時後, 將培養液置換成含養分補充劑 B27 與抗生素 Penicillin/Streptomycin 的 neurobasal medium 之中。培養至第 2 天, 加入 10 μM 之 β-cytosine arabinoside (ara-C) 處理, 以抑制膠質細胞之生長。每三天置換培養液。第七天至第十天時, 分化成熟的神經細胞即可進行實驗。

利用 Propidium iodine (PI) 染色法評估 CIN-1 保護 Glutamate 造成神經細胞傷害作用

Propidium iodine (PI) 為一特殊的螢光染劑, 能嵌入雙鏈 DNA 及 RNA 的鹼基對中。當細胞破裂時, PI 可滲入細胞, 並與鹼基對。因此, 觀測細胞中是否具有 PI, 可以評估細胞的死亡。當神經細胞培養至可實驗時, 將培養液置換成不含 phenol red 的培養液。不加入或加入不同濃度的 CIN-1 處理細胞 20 分鐘後, 再加入 300 μM glutamate 刺激神經細胞 24 小時。當神經元完成反應後, 加入 10 μg/ml PI 染色 30 分鐘。清洗後, 在螢光顯微鏡下觀測並, 以數位照相系統進行分析。

利用 Trypan blue 染色法評估 CIN-1 保護 Glutamate 造成神經細胞傷害作用

Trypan blue 為一小分子的藍色染劑, 在活細胞時細胞膜完整, 並不會進入細胞內。但是在細胞死亡, 細胞膜破裂時, 則會滲入胞內。因此觀測細胞中是否具有 trypan blue 及偵測 trypan blue 含量變化, 可以評估細胞死亡程度。當神經細胞培養至可實驗時, 將培養液置換成不含 phenol red 的培養液。不加入或加入不同濃度的 CIN-1 處理細胞 20 分鐘後, 再加入 300 μM glutamate 刺激神經細胞 24 小時。當神經元完成反應後, 1.5% trypan blue 染色 2 分鐘, 清洗後, 在微分干涉 (Differential Interference contrast, DIC) 的顯微鏡下觀測。並以數位照相系統進行分析。而後, 以 Triton X-100 打破細胞, 利用微小盤吸光值變化監測系統 (microplate reader),

在波長 600 nm 下進行監測。

利用胞外乳酸脫氫酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 含量之測定評估 CIN-1 保護 Glutamate 造成神經細胞傷害作用

當細胞損傷時，造成細胞膜不完整，原先穩定存在細胞中乳酸脫氫酶 (LDH) 釋出至胞外的培養液中，因此測量培養液中 LDH 活性的高低可以評估細胞死亡程度。當神經細胞培養至可實驗時，將培養液置換成不含 phenol red 的培養液。不加入或加入不同濃度的 CIN-1 處理細胞 20 分鐘後，再加入 300 μ M glutamate 刺激神經細胞 24 小時。當神經元完成反應後，取培養液，利用 LDH assay kit (Promega) 分析其中 LDH 的含量。利用微小盤吸光值變化監測系統 (microplate reader)，在波長 490 nm 下進行監測。

評估 CIN-1 對 Glutamate 造成神經細胞內鈣離子濃度與 pH 值的影響

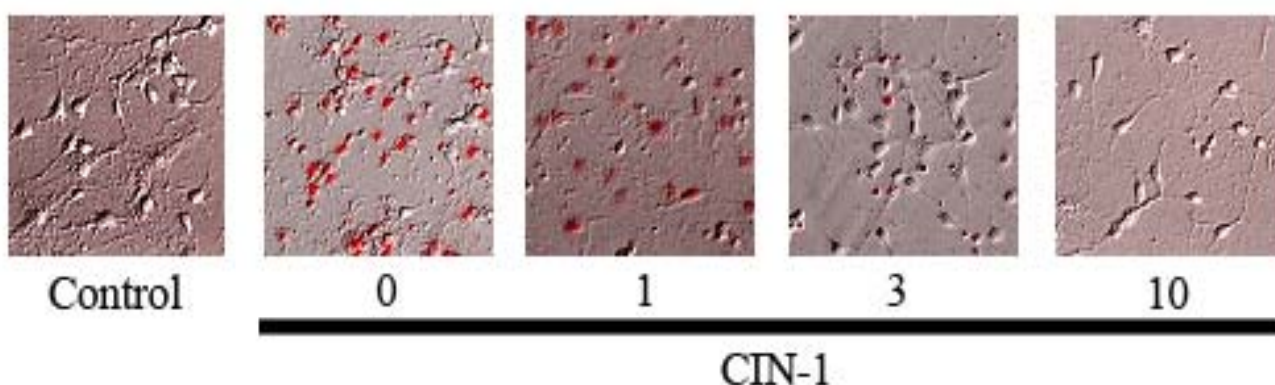
為了偵測神經細胞內鈣離子濃度與 pH 值的變化，首先將細胞養於 22 mm 的蓋玻片上，並分別與 5 μ M 的 fura-2-AM 與 BCECF-AM，於下分別反應 60 與 30 分鐘。清洗後，將玻片置於載台，而後加入或不加入不同濃度的 CIN-1 共置 20 分鐘，再加入 glutamate 刺激活化細胞。即時以具飛輪系統控制激發光的螢光顯微鏡系統進行觀測。胞內鈣離子濃度變化以雙激發波長 340 nm 及 380 nm 下，測放射光波長 505 nm 所產生螢光強度改變情形。胞內 pH 值變化以激發波長 440 nm 下，測放射光波長 530 nm 所產生螢光強度改變情形。以數位照相系統記錄實驗結果，並以自動影像處理系統 (MCID Elite) 來測量，神經細胞內鈣離子濃度與 pH 值的變化。

Oxygen glucose deprivation (OGD)

當神經細胞培養至可實驗時，利用 PBS 清洗神經細胞。而後將培養液置換成 OGD buffer (pH 7.4, Na⁺ 143.8 mM, K⁺ 5.5 mM, Ca²⁺ 1.8 mM, Mg²⁺ 1.8 mM, Cl⁻ 125.3 mM, HCO₃⁻ 26.2 mM, PO₄³⁻ 1.0 mM, SO₄²⁻ 0.8 mM, 以 5% CO₂ + 95% N₂ 氣體持續打入約 10 分鐘，使溶液中氧氣量少到最低)。利用氮氣將細胞培養箱中 O₂ 值降至 2%，形成減氧培養箱。當減氧培養箱狀態達到時，將已置換成 OGD buffer 的細胞置入培養箱中，並將蓋子打開，於培養箱中持續 60 分鐘或指定的時間。時間完成後，將細胞取出，並更換成新鮮的組織培養液，置於一般保溫箱中持續 24 小時。

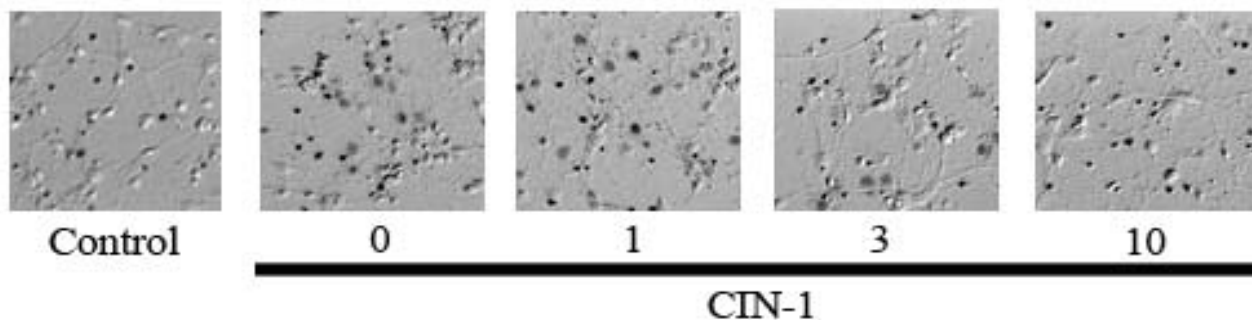
結果與討論

首先，我們將 CIN-1 與初代神經元細胞共處理 20 分鐘，而後加入 glutamate 於細胞培養箱 24 小時後，終止反應。再加入 Propidium iodine (PI) 染色後，清洗後再以顯微鏡觀察。發現 CIN-1 以濃度依存性的方式抑制 glutamate 所引發的神經細胞死亡，如下圖。

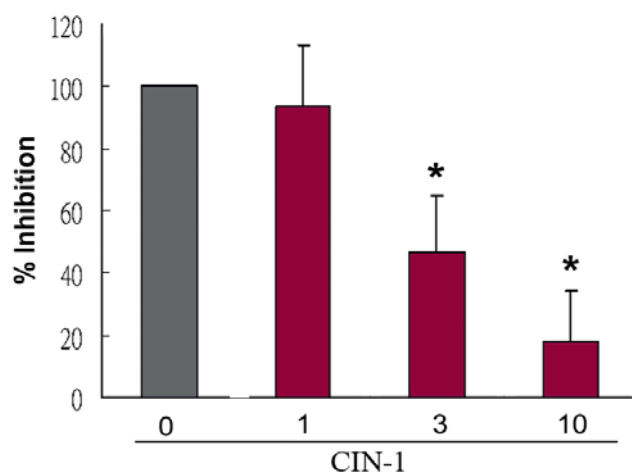


另一方面，我們將實驗完成的細胞利用 trypan blue 染色，更進一步將染色完成的細胞，利用 triton X-100 將細胞打破後，利用微孔盤分光光度計測量其吸光值的變化。以評估 CIN-1 保護 glutamate 所引發神經細胞死亡的量。如下圖(A) 為顯微鏡攝影結果，圖(B)為分光光度計計算的結果，可求得 IC_{50} 為 $4.3 \pm 2.0 \mu M$ 。

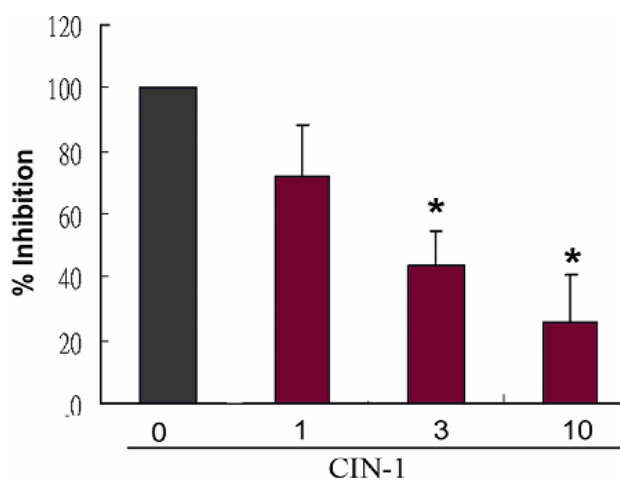
(A)



(B)

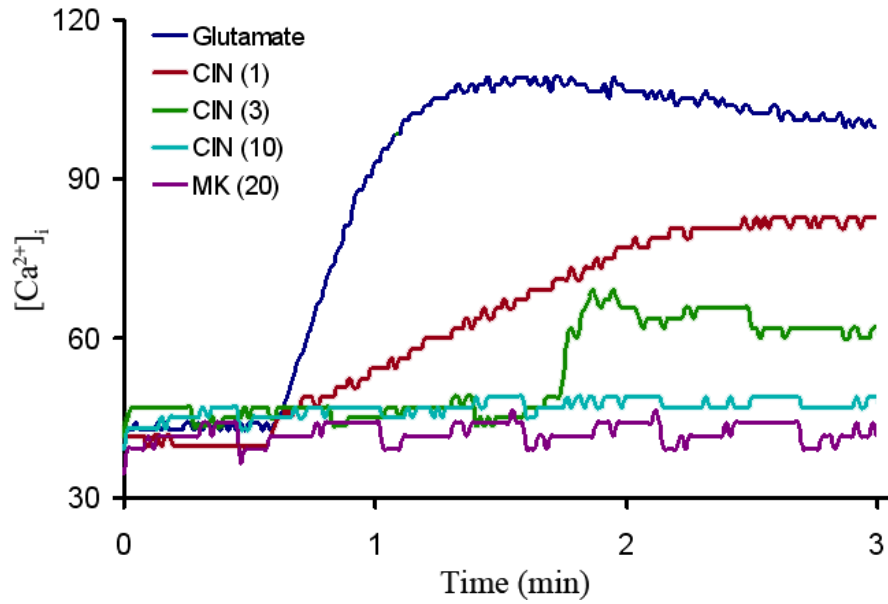


最後，我們運用實驗完成的組織培養上清液，進行 LDH 分析，可以得到下圖的結果。同樣的也可以求得 IC_{50} 為 $3.5 \pm 1.7 \mu M$ 。

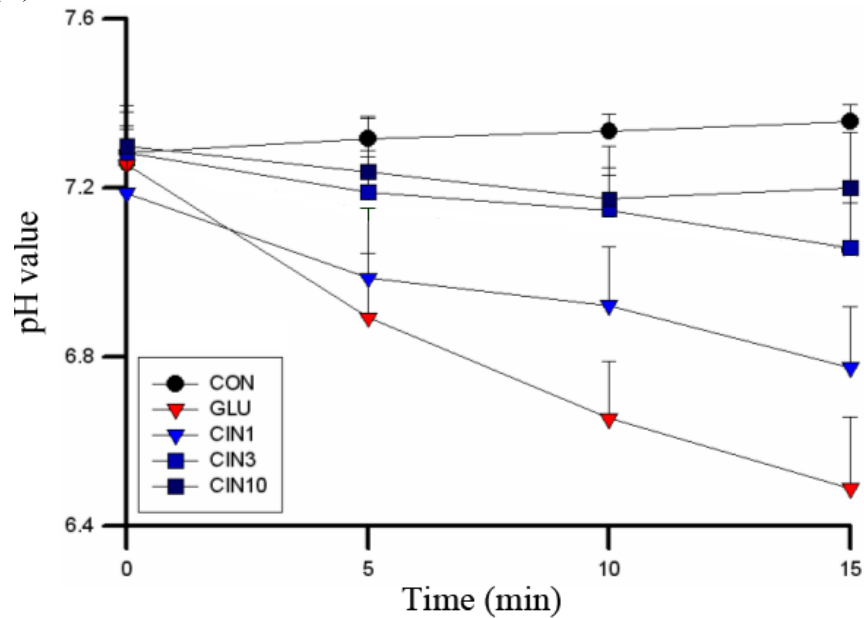


我們探討 CIN-1 保護機轉，首先針對初代神經細胞內的鈣離子濃度變化，進行探討。發現 CIN-1 以濃度依存性的方式抑制 glutamate 所導致鈣離子濃度增加，如下圖(A)，及 pH 值下降，如下圖 (B)。

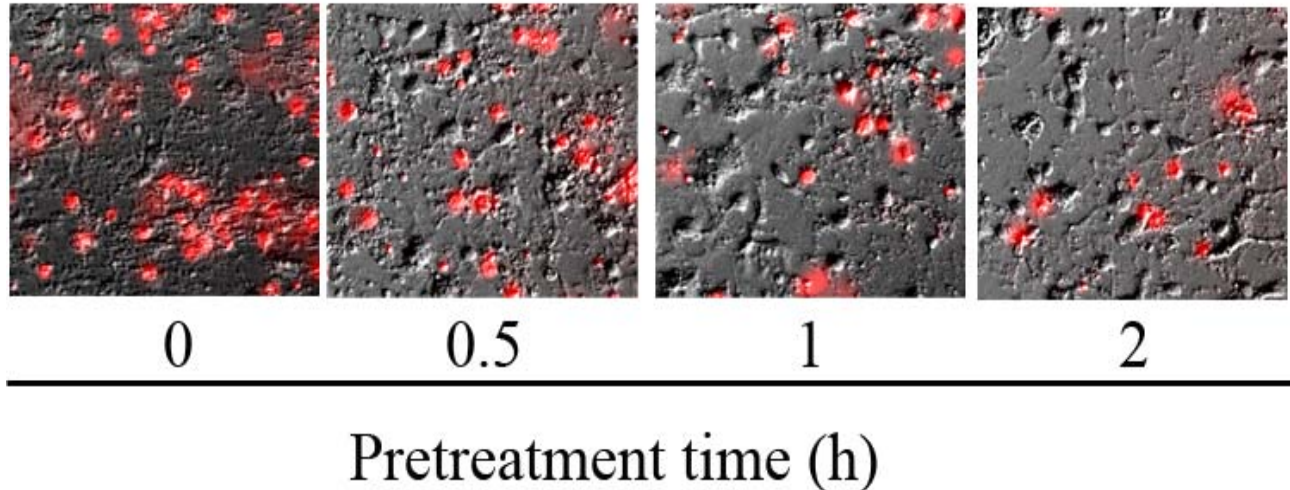
(A)



(B)



最後，我們利用不同時間點，將神經細胞與 CIN-1 處理不同時間後，進行缺氧缺葡萄糖 (Oxygen glucose deprivation) 1 小時，再恢復原始培養狀態 24 小時。利用 PI 染色後，清洗後以顯微鏡觀察。發現 CIN-1 以時間依存性的方式抑制 Oxygen glucose deprivation 所引發的神經細胞死亡，如下圖。綜合上述，CIN-1 為一有效的神經元保護劑。



參考文獻

- Audebert HJ, Rott MM, Eck T, Haberl RL. Systemic inflammatory response depends on initial stroke severity but is attenuated by successful thrombolysis. *Stroke* 2004; 35:2128–2133.
- Cheng HT, Chang H. Reduction of reperfusion injury in rat skeletal muscle following administration of cinnamophilin, a novel dual inhibitor of thromboxane synthase and thromboxane A2 receptor. *Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 43: 73-76.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-695.
- Davis JB, Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res* 1994; 652: 169-173.
- Demaerschalk BM, Yip TR. Economic benefit of increasing utilization of intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke in the United States. *Stroke* 2005; 36:2500–2503.
- Froissard P, Duval D. Cytotoxic effects of glutamic acid on PC12 cells. *Neurochem Int* 1994; 24:485-493.
- Hsiao G, Teng CM, Sheu JR, Cheng YW, Lam KK, Lee YM, Wu TS, Yen MH. Cinnamophilin as a novel antiperoxidative cytoprotectant and free radical scavenger. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1525: 77-88.
- Huang Y, McNamara JO. Ischemic stroke: “acidotoxicity” is a perpetrator. *Cell* 2004; 118: 665–666.
- Lee EJ, Chen HY, Lee MY, Chen TY, Hsu YS, Hu YL, Chang GL, Wu TS. Cinnamophilin reduces oxidative damage and protects against transient focal cerebral ischemia in mice. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 495-510.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 151–167.
- Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997;349:1269–76.

- Nakanishi S. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 1994; 13: 1031–1037.
- Phan TG, Wright PM, Markus R, Howells DW, Davis SM, Donnan GA. Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 1–10.
- Pin JP, Duvosin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 1995; 34, 1–26.
- Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1996; 16: 6125–6133.
- Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB, Wolf PA. The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham study. *Stroke* 2006; 37: 345–350.
- Su MJ, Chen WP, Lo TY, Wu TS. Ionic mechanisms for the antiarrhythmic action of cinnamophilin in rat heart. *J Biomed Sci* 1999; 6:376-386.
- Warlow CP. Epidemiology of stroke. *Lancet* 1998; 352(Suppl 3): SIII1–4.
- White RJ, Reynolds IJ. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 1996; 16 :5688–5697.
- Yu SM, Ko FN, Wu TS, Lee JY, Teng CM. Cinnamophilin, a novel thromboxane A2 receptor antagonist, isolated from *Cinnamomum philippinense*. *Eur J Pharmacol* 1994, 256, 85-91.
- Yu SM, Wu TS, Teng CM. Pharmacological characterization of cinnamophilin, a novel dual inhibitor of thromboxane synthase and thromboxane A2 receptor. *Br J Pharmacol* 1994a; 111: 906-912.