

· 博士之窗 ·

救脑宁注射液对谷氨酸、5-羟色胺诱发大鼠皮质神经细胞内游离钙超负荷的影响*

黄世敬^{1△} 黄启福² 孙塑伦³

内容提要 目的:探讨救脑宁注射液对谷氨酸(Glu)、5-羟色胺(5-HT)诱发大鼠皮质神经细胞内游离钙($[Ca^{2+}]_i$)超负荷的影响。方法:以 Fura-2/AM 为细胞内钙离子的荧光指示剂,用双波长荧光分光光度计测定了急性分离的新生大鼠神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化,观察 Glu、5-HT 对 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响及救脑宁注射液的干预作用。结果:Glu 和 5-HT 剂量依赖性引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,导致细胞内钙超载;救脑宁注射液可显著降低细胞内钙的升高,保护神经细胞免受 Glu 和 5-HT 的损害。结论:救脑宁注射液对中风病的治疗作用与其对抗 Glu、5-HT 等毒性物质的作用,抑制受体依赖性钙通道的开放,减少外钙的流入,有效地防止钙超载等机制有关。

关键词 救脑宁注射液 细胞内游离钙 Fura-2/AM 神经细胞

Effect of Jiunaoning Injection on Overload of Intracellular Free Calcium of Cerebral Cortex Induced by Glutamic Acid or 5-Hydroxytryptamine in Fetal Rats HUANG Shijing, HUANG Qifu, SUN Sulun Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100091)

Objective: To explore the effect of Jiunaoning Injection (JNNI) on overload of intracellular free calcium of cerebral cortex induced by glutamic acid or 5-hydroxytryptamine (5-HT) in fetal rats. **Methods:** Double wavelength spectrofluorometer with Fura-2/AM as the fluorescence indicator for intracellular calcium ions ($[Ca^{2+}]_i$) was used to measure the changes of $[Ca^{2+}]_i$ in instantly separated cortical nerve cells of newborn rats affected by glutamic acid or 5-HT, as well as the interference of JNNI on it. **Results:** Glutamic acid or 5-HT could elevate the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ dose-dependently and induce $[Ca^{2+}]_i$ overload. JNNI could restrain the elevation markedly so as to protect the neurocytes from injury of glutamic acid and 5-HT. **Conclusion:** The therapeutic effect of JNNI in treating apoplexy is related with its action in suppressing the toxic substances as glutamic acid and 5-HT, restraining the opening of receptor dependent calcium channel, reducing the external cellular calcium influx and preventing the calcium overload effectively.

Key words Jiunaoning Injection, intracellular free calcium, Fura-2/AM, nerve cell

Ca^{2+} 在人体生理、病理的许多过程中都起着重要作用,钙平衡紊乱导致 $[Ca^{2+}]_i$ 持续增高,是缺血缺氧时神经元死亡的中心环节。中风病患者脑局部缺血区因细胞受损或膜通透性改变,导致病灶周围谷氨酸(Glu)、天冬氨酸、5-羟色胺(5-HT)等操纵钙通道的特异性激动剂的大量积累,与神经细胞膜上相应的受体结合,引起与受体偶联的门控钙通道开放,使大量 Ca^{2+} 从细胞外进入细胞内。因此,测定神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化,是观察药物对神经细胞的保护作用

以及探讨治疗中风疗效机理的重要客观指标。

材料与方法

1 动物 新生 Wistar 大鼠 10 只,鼠龄小于 48h 雌雄不拘,中国医学科学院动物中心提供。

2 药品和试剂 救脑宁注射液,含三七、牛黄等每毫升相当于生药 1g,由北京中医药大学制剂研究室研制提供。Fura-2/AM 系 Sigma 产品,以二甲基亚砜溶解稀释成所需浓度。DMEM 培养基系 Sigma 产品。

3 实验方法

3.1 脑皮层细胞分离 参照文献^[1],以新生 Wistar 大鼠 10 只,取双侧大脑皮层置含 DMEM 培养液的小平皿中,小心剥离脑膜及微血管,将脑组织移入含 2~3ml DMEM 培养液的小烧杯中,用细口玻璃吸管吸

*“九五”国家科技攻关课题(No.96-06-03)

1. 中国中医研究院西苑医院(北京 100091);2. 北京中医药大学病理教研室;3. 国家中医药管理局医政司

△博士后

心缓慢吹打分散细胞,过 200 目筛网,再加入 DMEM 液至总体积为 10ml,分成 10 管,分别加入 Fura-2/AM 使其终浓度为 $5\mu\text{mol/L}$, 37°C 振荡温育 30min, 4°C 1800r/min ,离心 3~5min,离心细胞沉淀加入人工脑脊液 ($\text{NaCl } 132\text{mmol/L}$, $\text{KCl } 3.0\text{mmol/L}$, $\text{MgCl}_2 1.0\text{mmol/L}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 1.2\text{mmol/L}$, $\text{Hepes } 10.0\text{mmol/L}$, $\text{Glucose } 10.0\text{mmol/L}$, $\text{CaCl}_2 1.0\text{mmol/L}$, 用时加入 2% 牛血清白蛋白) 3ml,并用尖玻璃吸管轻轻吹打分散细胞,再次 4°C 1800r/min ,离心 3~5min,离心细胞沉淀加入人工脑脊液 3ml 制成细胞悬液待测。

3.2 分组给药 Glu 对照组:先观察一段静息水平的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,再加入 Glu $150\mu\text{mol/L}$,待 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高到高峰稳定后再加入 Glu $150\mu\text{mol/L}$,稳定后第 3 次加入 Glu $150\mu\text{mol/L}$,所测出的 4 个值分别为静息、Glu 150、300、450 $\mu\text{mol/L}$ 时的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。救脑宁加 Glu 组:先观察一段静息水平的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,再加入救脑宁注射液 $3\mu\text{l}$ (终浓度为原液的 1/1000) 2min 后,依次加入 3 次 Glu $150\mu\text{mol/L}$ 。5-HT 对照组:每次加入 5-HT 终浓度为 $100\mu\text{mol/L}$,同上累加 3 次,分别测得静息、5-HT100、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 水平的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。救脑宁加 5-HT 组:加入救脑宁注射液 $3\mu\text{l}$ 2min 后,依次加入 3 次 5-HT100 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.3 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定 取 0.5ml 细胞悬液加 2.5ml 人工脑脊液置石英杯中,先进行荧光扫描,观察 Fura-2/AM 是否负载上以及激发、发射波长。荧光测定采用日立 RF-5000 型荧光分光光度计(中国医学科学院药物研究所提供)。激发波长为 340nm 和 380nm,发射波长为 500nm,光栅狭缝为 5nm,转换速度为 4s,根据荧光强度变化按下式计算⁽²⁾: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times sf_2/sb_2$ 。其中, K_d 为 Fura-2- Ca^{2+} 的解离常数, 37°C 时 K_d 为 224nmol/L , R 为 340/380nm 的荧光强度比值; $R_{\max}$ 为加入 0.1% Triton-X100 后 340/380nm 的荧光强度比值;

$R_{\min}$ 为加入 EGTA 5mmol/L 后 340/380nm 荧光强度比值; sf_2 和 sb_2 分别为零钙和饱和钙时 380nm 处的荧光强度。

4 统计学方法 组间比较用 t 检验,量效关系作回归分析。

结 果

1 救脑宁注射液对 Glu 诱发神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的抑制作用 见表 1。结果表明,神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 随 Glu 剂量的增加而升高, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 与 Glu 剂量呈线性相关 ($r = 0.916$, $P < 0.01$)。救脑宁注射液可抑制因 Glu 而引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高 ($P < 0.01$),从而防止 Ca^{2+} 超载,减轻细胞受损程度。

2 救脑宁注射液对 5-HT 诱发神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的抑制作用 见表 2。结果表明,随着 5-HT 剂量的增加神经细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,两者呈直线正相关 ($r = 0.97$, $P < 0.01$)。救脑宁注射液可显著降低 5-HT 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高幅度 ($P < 0.01$),从而防止 Ca^{2+} 超载,减轻 5-HT 的毒性作用,保护神经细胞。

讨 论

中风病乃气血逆乱,化火生风,为痰为瘀,使脑血管床功能障碍,脑组织缺血、缺氧,进而蕴生毒邪,自由基、兴奋性氨基酸(尤其是 Glu)、5-HT 等毒性物质积聚,而这些物质与 Ca^{2+} 超载的形成密切相关。 Ca^{2+} 超载在神经系统损伤的发生、发展中起决定作用,是引起神经细胞功能和结构损害及导致细胞死亡的“最后共同通路”。研究表明⁽³⁾,脑缺血、缺氧后引起神经元及其突触功能损伤的一系列过程中最早出现的是 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 急剧增加。其机理是由于缺血、缺氧后兴奋性氨基酸(如 Glu)、5-HT 的过度释放,激活了神经细胞膜上操纵钙通道的特异性受体,引起受体门控的离子通道开放⁽⁴⁾。

表 1 救脑宁注射液对神经细胞 Glu 损伤时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 (nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	$[\text{Ca}^{2+}]_i$			
		静息状态	Glu $150\mu\text{mol/L}$	Glu $300\mu\text{mol/L}$	Glu $450\mu\text{mol/L}$
Glu 对照	5	125.22 ± 35.22	254.70 ± 15.45	573.08 ± 53.17	1604.71 ± 729.18
救脑宁加 Glu	5	122.74 ± 7.51	222.60 ± 29.87	$374.79 \pm 53.10^*$	712

本实验用细胞内 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fura-2/AM 检测了不同剂量 Glu、5-HT 作用下急性分离的大鼠皮层神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 发现 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 与 Glu、5-HT 呈剂量依赖性增加, 提示 Glu、5-HT 可引起大量 Ca^{2+} 从细胞外进入细胞内, 导致细胞内钙超载。救脑宁注射液是三七、牛黄等药物有效成分的复合制剂, 具有化瘀解毒、清心开窍之功, 适用于出血性中风的治疗。实验表明⁽⁵⁾, 救脑宁注射液具有抗脑水肿、抗自由基、改善脑血管床功能状态。本实验研究发现, 救脑宁注射液可降低因 Glu、5-HT 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 大幅度升高, 因此认为救脑宁注射液对中风病的治疗机理, 可能与其抑制受体依赖性钙通道的开放, 减少外钙的流入, 有效地防止钙超载, 保护神经细胞等作用密切相关。

脑缺血时氧自由基与细胞内钙超载互为因果, 导

由基毒性有关。

参 考 文 献

1. Dily JE, Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increase in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells. *Brain Res* 1989;499:383—387.
2. Komulainen H, Bondy SC. The estimation of free calcium within synaptosomes and mitochondria with fura-2; comparison to quin-2. *Neurochemi Int* 1987;10:55.
3. Kass IR, Lipton P. Calcium and long-term transmission damage following anoxia in dentate gyres and CA1 regions of the rat hippocampal slice. *J Physical (Lond)* 1985;378:313—334.
4. 陈立华. 神经元细胞内钙离子的生理与测定方法. 国外医学神经病学神经外科学分册 1996;23(2):60—63.
5. 黄世敬.