

体外液压冲击伤对大鼠神经细胞内游离钙和 pH 值的影响

陈庆文¹, 张相彤², 张永春¹, 孙建平¹, 杨宝峰^{1*}

(1. 哈尔滨医科大学药理教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的 研究体外液压冲击伤后大鼠神经细胞内游离钙和 pH 值的变化及其药物的保护作用。方法 培养新生乳鼠的大脑皮层神经细胞, 给予 2.5 kPa, 20 ms 的液压冲击伤, 通过激光扫描共聚焦显微镜检测伤后单个神经细胞内游离[Ca²⁺]_i和 pH 值的变化, 并分别给予尼莫地平和 D-AP-5, 观察药物对上述变化的影响。结果 伤后细胞内[Ca²⁺]_i迅速升高, 持续 12 h 达高峰, 随后逐渐下降, 48 h 接近正常; pH 值下降较慢, 于 12 h 达低谷, 48 h 未恢复正常。尼莫地平和 D-AP-5 均可明显抑制细胞内[Ca²⁺]_i的升高和 pH 值的下降。结论 可根据液压冲击伤后神经细胞内游离[Ca²⁺]_i及 pH 值的变化规律指导用药。

关键词: 神经元培养; 液压冲击性脑损伤; 细胞内游离钙

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)05-0339-04

颅脑损伤后血脑屏障通透性增加、脑水肿、神经元变性坏死等病理改变与兴奋性氨基酸(EAA)、Ach 等多种兴奋性神经递质过度释放、神经细胞钙通道开放、细胞内 Ca²⁺ 大量积聚、cAMP 应答元件蛋白(CREB)磷酸化增加直接相关, 其中神经细胞钙通道变化是引起继发性脑损害的重要环节, 也是造成细胞损害的多种生化改变中出现最早的关键因素之一; 颅脑损伤后由于代谢紊乱、细胞内外离子的失衡等, 细胞内 pH 值发生变化, 进一步加重继发性脑损害。本文采用培养的神经细胞, 通过激光扫描共聚焦显微镜检查技术观察细胞创伤后 [Ca²⁺]_i 和 pH 值随时间的定量变化及其规律; 并于不同的时相点给予尼莫地平和 D-AP-5, 观察药物的保护作用。

材 料 和 方 法

药品和试剂 尼莫地平(nimodipine)注射液由德国 Bayer 药厂提供。D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP-5) 购于 Sigma 公司。荧光染料 Fluor-3/AM 和 BCECF/AM 以及 4-Br-A23187, zero calcium buffer(无钙缓冲液)和 high calcium buffer

(高钙缓冲液)均购于美国 BIO-RAD Microscience Ltd; 胰蛋白酶、hepes 购于原平皓生物技术有限公司; RPMI-1640 购于 Gibco BRL; 胎牛血清(FBS)购于 Hyclone; 多聚赖氨酸、二甲基亚砷购于 Sigma 公司。

主要仪器 Insight Plus-IQ 型激光扫描共聚焦显微镜: 美国 Meridian 公司; CO₂ 培养箱: 日本 Sanyo 公司; pH 计 240 型: 美国 Corning 公司; 磁力搅拌器 4658 型: 美国 Cole-Parmer Instrument Company 公司; 超纯水器 Milli-Q: 法国 Millipore 公司。

神经细胞的培养 参考 Banker 等^[1]的方法无菌分离新生 1-2 d 的 Sprague Dawley (SD) 乳鼠的大脑皮层, 剔除软脑膜及血管, 用 Hanks 液冲洗后剪碎, 置于 0.125% 胰蛋白酶中, 于 37℃ 消化 20 min, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化, 制备成细胞数为 5 × 10⁴/mL 的细胞悬液, 接种于 100 mL 培养瓶中预先放置的涂有多聚赖氨酸的盖玻片上, 在 37℃, 5% CO₂ 环境中培养, 隔日换培养液, 培养 8-14 d 待细胞成熟后进行实验。

液压冲击伤模型 参照 Scott's 模型^[2]制备培养的大鼠神经细胞液压冲击伤模型, 冲击压力为 2.5 kPa, 作用时间为 20 ms。

实验分组设计 (1) 对照组; (2) 创伤组: 创伤 15 min, 30 min, 1 h, 2 h 15 min, 2 h 30 min, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 组; (3) 治疗组: 分别于神经细胞创

收稿日期: 2000-09-26.

基金项目: 黑龙江省科委科技计划项目资助(G98C19-13).

作者简介: 陈庆文, 女, 讲师(在读博士).

* 通讯作者 Tel: (0451) 6671354, Fax: (0451) 6699644,

E-mail: yangbf@ems.hrbmu.edu.cn

伤后 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 10 h, 22 h 给予 0.002% 尼莫地平和 0.005% D-AP-5, 2 h 后, 观察药物对细胞内 [Ca²⁺]_i 和 pH 变化的影响。

荧光探针的负载 实验前将成熟的神经细胞用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤两次后, 于 37℃ 条件下用 Fluor3/AM (终浓度为 10 mol·L⁻¹) 负载 50 min 以标记细胞内 Ca²⁺; 用 H⁺ 敏感性荧光探针 BCECF/AM (终浓度为 3 mol·L⁻¹) 负载 15 min 以标记细胞内 H⁺, 负载后的神经细胞用 Hanks 液洗涤 3 次以除去细胞外残存染料, 将盖玻片正面朝下置于自制的底铺有盖玻片的浴槽内, 加入 Hanks 液 (pH 7.4) 以保证良好的生存环境。

细胞内 [Ca²⁺]_i 的测定^[3] Fluor3/AM 被动扩散进入细胞后, 被酯酶水解释出 Fluor3, Fluor3 与细胞内 Ca²⁺ 络合, 用波长为 488 nm 的氩激光激发, 产生发射峰为 530 nm 的荧光, 其强度与 [Ca²⁺]_i 呈正相关。由公式 [Ca²⁺]_i = Kd[(F - F_{min})/(F_{max} - F)] 计算出 [Ca²⁺]_i。

细胞内 pH 值的测定^[3] 荧光染料 BCECF 与细胞内 H⁺ 络合, 用氩激光 488 nm 激发, 测量 530/640 nm 发射荧光比值, 其比值与细胞内 pH 值呈正相关。根据标准曲线进行线性回归求得神经细胞内的 pH 值。

统计学处理 实验结果以均数 ± 标准差 (x̄ ± s) 表示, 组间采用双样本异方差 t 检验进行统计学分析。

结 果

1 创伤后神经细胞内 [Ca²⁺]_i 的变化

生长在盖玻片上经 Fluor3/AM 负载的神经细胞在 40× 镜下, 通过 488 nm 的激光照射激发后, 细胞体呈圆形或梭状, 两端有较长的突起。镜下找到细胞的最佳切层面进行扫描。在静息状态下, 细胞外 Ca²⁺ 为 2.0 mmol·L⁻¹ 时 (Hanks 液), 测得对照组培养的神经细胞内 [Ca²⁺]_i 为 (123 ± 39) nmol·L⁻¹。给予 2.5 kPa, 20 ms 的液压冲击伤 15 min 后神经细胞内 [Ca²⁺]_i 迅速升高 (P < 0.001), 并持续 12 h 达峰值为 (847 ± 131) nmol·L⁻¹, 随后逐渐下降, 48 h 恢复正常。

2 尼莫地平和 D-AP-5 对创伤后神经细胞内 [Ca²⁺]_i 变化的影响

在液压冲击伤后 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 10 h 和 22 h 分别给予终浓度为 0.002% 的尼莫地平和

0.005% 的 D-AP-5, 药物作用 2 h 后, 发现尼莫地平和 D-AP-5 均能显著降低相应时相点的细胞内 [Ca²⁺]_i (P < 0.001), 并且以 10 h 之内给药作用效果较佳 (图 1)。

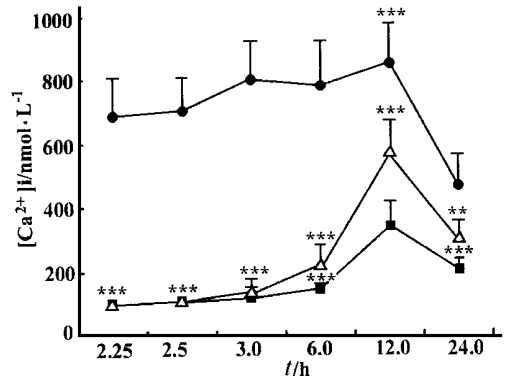


Fig 1 Effects of nimodipine and D-AP-5 on intracellular [Ca²⁺]_i following fluid percussion injury in cultured Sprague Dawley rat neurons. Every cell was treated with 0.002% nimodipine or 0.005% D-AP-5 or no treatment (control) after being injured for 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 10 h, 22 h. Two hours later, the change of intracellular [Ca²⁺]_i was measured n = 10 (cells), x̄ ± s, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs control. ●—● Control; ■—■ Ni modipine; △—△ D-AP-5

3 创伤后神经细胞内 pH 值的变化

神经细胞内经 BCECF/AM 负载的 H⁺ 被 488 nm 的激光激发后, 测量 530/640 nm 的发射荧光强度之比, 通过线性回归求出细胞内 pH 值的大小。在细胞外液 pH 为 7.4 的静息状态下 (Hanks 液), 测得对照组培养的神经细胞内 pH 值为 7.22 ± 0.51。给予 2.5 kPa, 20 ms 的液压冲击伤后发现 pH 值逐渐下降, 12 h 达低谷, 细胞内酸中毒最高可达 5.64 ± 0.31, 48 h 未恢复正常。

4 尼莫地平和 D-AP-5 对创伤后神经细胞内 pH 值变化的影响

在液压冲击伤后 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 10 h 和 22 h 分别给予终浓度为 0.002% 的尼莫地平和 0.005% 的 D-AP-5, 药物作用 2 h 后, 发现尼莫地平和 D-AP-5 均能降低细胞内酸中毒现象 (P < 0.05), 但 10 h 后再给药作用明显减弱 (P > 0.05) 见 (图 2)。

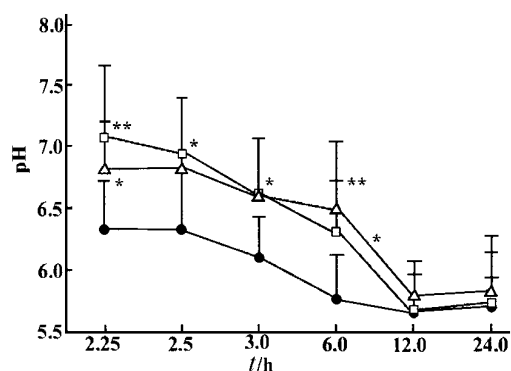


Fig 2 Effects of nimodipine and *D*-AP-5 on intracellular pH following fluid percussion injury in cultured Sprague Dawley rat neurons. Every cell was treated with 0.002% nimodipine or 0.005% *D*-AP-5 or no treatment (control) after being injured for 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 10 h, 22 h. Two hours later, the change of intracellular pH was measured

$n=10$ (cells), $\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control. ●—● Control; □—□ Ni modipine; △—△ *D*-AP-5

讨 论

本文采用激光扫描共聚焦显微镜技术对液压冲击伤后神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 pH 值的变化进行了定性、定量研究。

颅脑外伤引起继发性损害的过程中,神经细胞 Ca^{2+} 通道变化是重要环节^[4]。伤后 EAA 的过度释放是引起继发性脑损害的重要原因^[5],其造成的神经毒性作用一是以 Na^+ , Cl^- , H_2O 内流引起神经元水肿为特征的急性过程;二是通过激活 EAA 受体,直接或间接启动电压依赖性钙通道,细胞外 Ca^{2+} 大量内流,细胞内 Ca^{2+} 释放增加,导致细胞内钙超载,激活不同的 Ca^{2+} 依赖酶,造成迟发性神经元变性坏死(DND),这种由 EAA 引起的兴奋性细胞死亡以后者的延迟性细胞损伤为主,因此给予钙拮抗剂尼莫地平以及兴奋性氨基酸受体拮抗剂 *D*-AP-5 可对抗创伤后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。

尼莫地平对颅脑外伤的疗效评价仍处于前瞻性临床研究中,实验与临床研究表明^[4],尼莫地平直接刺激神经细胞 Ca^{2+} -ATP 酶,增高其活性,一方面通过促进胞浆内 Ca^{2+} 的排除,另一方面增强线粒体和内质网的 Ca^{2+} 库摄取和储存钙的作用,从而减轻神经细胞内钙超载和脑水肿等继发性脑损害。本实

验证明伤后 15 min 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高,12 h 达高峰,而后逐渐下降,48 h 恢复正常,这是由于大脑存在自动调节功能,在轻、中型外伤后,大脑有一定的自我恢复能力,因此伤后 48 h 进入神经细胞内过多的 $[Ca^{2+}]_i$ 逐渐被排出,钙库摄取、贮存钙,使细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 逐渐恢复正常,伤后 10 h 内给予尼莫地平则疗效最佳,但 10 h 之后给药也有治疗效果,此结果与临床研究相符合^[4]。

D-AP-5 是一种作用较强、代谢稳定的 NMDA (*N*-甲基-*D*-天门冬氨酸盐)受体竞争性拮抗剂,NMDA 受体是重要的一种 EAA 受体,与 Ca^{2+} 通道偶联并与神经元变性坏死关系密切。目前采用此类 EAA 受体拮抗剂治疗脑创伤仍处于动物实验阶段和初步临床研究应用阶段,有研究报道^[6],应用 EAA 受体拮抗剂对动物创伤后继发性脑损害有保护作用,能明显减轻神经元和脑组织水肿、肿胀和坏死的程度。本实验研究证明,脑创伤后及早应用 NMDA 受体拮抗剂,可明显减轻创伤后神经细胞内钙超载,有效防止并减轻继发性脑损害,效果与尼莫地平相似。

创伤后由于 EAA 的神经毒性作用,细胞内代谢紊乱,钙超载使细胞的能量代谢发生障碍^[7],酸性代谢产物增多,ATP 产生急剧减少, Na^+ - K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶等活性受抑制,使 Na^+ - Ca^{2+} 交换减弱, H^+ - Na^+ 交换增强,细胞内 pH 值降低,酸中毒,产生延迟性细胞损害。本实验证明,创伤后细胞内酸中毒出现较慢,并且恢复也慢,尼莫地平 and *D*-AP-5 可能通过调节细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的平衡,从而间接地减轻细胞内酸中毒现象,但作用较弱,并且实验结果表明应在 10 h 内早期给予药物治疗为佳。

以上研究结果表明,根据颅脑损伤后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 及 pH 值的随时间的变化规律,及早应用尼莫地平 and *D*-AP-5,可明显减轻神经细胞内的钙超载和酸中毒,有效地防止和减轻脑外伤后的继发性损害,加速脑神经细胞损伤的恢复。

REFERENCES:

- [1] Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture [J]. *Brain Res*, 1977, **126**(3): 397 - 425.
- [2] Shepard SR, Ghajar JB, Giannuzzi R, et al. Fluid percussion barotrauma chamber: a new *in vitro* model for traumatic brain injury [J]. *J Surg Res*, 1991, **51**(5): 417 - 424.
- [3] Li N. *Laser Scanning Confocal Microscopy* [M].

- Beijing: The People's Surgeon Press, 1997.
- [4] Yi SY, Fei Z, Xu RX. The basic and clinical research of nimodipine on acute brain injury [J]. *Chin J Neurosurg* (in Chinese), 1994, **10**(1):28-30.
- [5] Cheng OM, Hu CL, Dong WW. The relationship between excited amino acid and its receptor and central neural system diseases [J]. *J Clin Neurol* (in Chinese), 1999, **12**(2):123-125.
- [6] Bullock R, Fujisawa H. The role of glutamate antagonists for the treatment of CNS injury [J]. *J Neurotrauma*, 1992, **9**(Suppl 2):S443-S462.
- [7] Vink R, Head VA, Rogers PJ, et al. Mitochondrial metabolism following traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1990, **7**(1):21-27.

EFFECTS OF FLUID PERCUSSION INJURY ON INTRACELLULAR $[Ca^{2+}]_i$ AND pH IN CULTURED RAT NEURONS

CHEN Qing-wen¹, ZHANG Xiang-tong², ZHANG Yong-chun¹, SUN Jiar-ping¹, YANG Bao-feng¹

(1. Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the change of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ and pH in cultured neurons after fluid percussion injury, and the therapeutic effect of drugs. **METHODS** The neurons of Sprague Dawley rats were cultured for 8-14 days, then treated them with fluid percussion injury (2.5 kPa, 20 ms). Alterations of $[Ca^{2+}]_i$ and pH in single neural cell following fluid percussion injury were measured by a laser scanning confocal microscope. After being injured for several hours the cultured neurons were treated with nimodipine or D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP-5). Two hours later, the effects of drugs on intracellular $[Ca^{2+}]_i$ and pH were studied. **RESULTS** The intracellular $[Ca^{2+}]_i$ increased quickly after brain injury and reached peak in 12 hours. It then decreased gradually and became normal at 48 hours. The pH decreased slowly, reached minimum in 12 hours, and then kept at a lower level. It did not recover normal at 48 hours. Nimodipine and D-AP-5 decreased significantly the ascension of $[Ca^{2+}]_i$ and the descent of pH. But nimodipine and D-AP-5 must be given within 10 hours after injury for a good therapeutic effect. **CONCLUSION** According to the change of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ and pH, early use of nimodipine and D-AP-5, will get a better therapeutic effect.

KEY WORDS: cultured neurons; fluid percussion brain injury; intracellular $[Ca^{2+}]_i$