

# 缺氧缺糖条件下大鼠脑皮质神经元内游离钙浓度的变化及神经生长因子的作用

吴俊芳 张均田

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 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缺氧缺糖时体外培养的大鼠胎鼠神经细胞内游离钙( $[Ca^{2+}]_i$ )的变化,并观察了神经生长因子(NGF)的影响。结果表明,脑皮质细胞缺氧缺糖培养 16~24 h 时,细胞大量死亡。NGF 剂量依赖地减少神经元缺氧缺糖培养 24 h 时乳酸脱氢酶(LDH)的释放,提高细胞生存力。细胞缺氧缺糖早期引起  $[Ca^{2+}]_i$  减少,而后引起  $[Ca^{2+}]_i$  显著升高,导致细胞损害。NGF  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  在缺氧缺糖早期提高  $[Ca^{2+}]_i$  到正常水平,降低后期  $[Ca^{2+}]_i$  的升高。提示,NGF 通过稳定  $[Ca^{2+}]_i$  或降低后期的胞内钙升高保护了脑皮质神经元免受缺氧缺糖的损害。

**关键词** 神经生长因子; 细胞内游离钙; 新型钙离子荧光指示剂(Fura-2); 神经细胞; 乳酸脱氢酶

众所周知,  $Ca^{2+}$  在生理、病理的许多过程中都起重要作用,钙平衡紊乱导致细胞内游离钙( $[Ca^{2+}]_i$ )持续增高,是缺氧-缺血时神经元死亡的中心环节。研究表明<sup>[1,2]</sup>,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)能调节钙通道及  $[Ca^{2+}]_i$ ,保护培养的大鼠海马及皮层神经元免受缺糖、谷氨酸毒性和氧化损害<sup>[3,4]</sup>,但 NGF 抗缺血损伤的机制还不清楚。

中枢神经系统(CNS)神经元依赖氧和糖的持续供应。在衰老及某些疾病如脑卒中、Alzheimer's 病等<sup>[5,6]</sup>,血供受阻或能量代谢障碍的情况下,神经元尤为脆弱。本文通过测定培养大鼠神经细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  的变化,观察 NGF 的作用,以探讨神经元缺氧/缺糖损害及 NGF 保护作用的机制。

## 材 料 和 方 法

**药品和试剂** 从♂小鼠颌下腺提取纯化的 2.5 s NGF 由军事医学科学院提供,纯度大于

95%,以蒸馏水配制。Fura-2/AM 系 Sigma 产品,以二甲基亚砷溶解稀释成所需浓度;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒及连二亚硫酸钠为北京化工厂产品;DMEM 培养基系 Sigma 产品。其余试剂均为分析纯。

**动物** Wistar ♀ 大鼠,孕 16~18 d,由中国医学科学院动物中心提供。

**脑皮质细胞培养**<sup>[7]</sup> 取 Wistar 孕(16~18 d)鼠,水合氯醛  $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ip 麻醉后,无菌条件下剖腹取出胎鼠,开颅取出前脑置入预冷的 DMEM 培养基中,仔细剔除软脑膜和血管,将脑组织移入含新的 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清和 10% 马血清)的小烧杯中,用细口吸管反复轻轻吹打成细胞悬液,并经 200 目的金属网过滤,调整细胞数至  $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ 。将 1 ml 细胞悬液接种到经 0.01% 多聚-L-赖氨酸过夜处理的 24 孔培养板中,置 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养。d 2 待细胞贴壁后换液一次并去除死细胞,以后每 2~3 d 换液一次。在细胞培养至 d 6 时,加入终浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的阿糖胞苷以抑制非神经细胞的生长,18 h 后换新的 DMEM 培养基继续培养。

神经细胞缺氧/缺糖损伤<sup>[8]</sup> 取培养 8~10 d 的神经细胞,吸去原培养液,用无糖 Earle's 液 (mmol·L<sup>-1</sup>: NaCl 143, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgSO<sub>4</sub> 1.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, Hepes 2.4, pH 7.4) 洗 2 遍,加入含连二亚硫酸钠 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的无糖 Earle's 液 1 ml,置 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 24 h。正常对照组用含葡萄糖 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Earle's 液孵育。NGF 在缺氧/缺糖损伤前 24 h 加入。

细胞生存力和 LDH 的测定 细胞经缺氧/缺糖损伤处理后,吸出培养液换以含 0.1% 台盼蓝的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 按 Mattson 等<sup>[9]</sup> 方法计算细胞生存力。收集培养液,按文献方法<sup>[10]</sup> 测定培养液中 LDH 活性。

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的测定 细胞经缺氧/缺糖处理后,以终浓度 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,收集并制备 1 × 10<sup>6</sup>·ml<sup>-1</sup> 细胞悬液,加入终浓度 5 μmol·L<sup>-1</sup> 的 Fura-2/AM 于 37°C 恒温振荡水浴负载 45 min,用 Hanks 液洗 2 次后,将细胞悬在无 Mg<sup>2+</sup> 的测量液中 (mmol·L<sup>-1</sup>: NaCl 137, KCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 1.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 3.0, Hepes 20, glycine 0.2 × 10<sup>-3</sup>)。荧光测定采用日立 RF-5000 型荧光分光光度计。激发波长为 340 nm 和 380 nm,发射波长为 500 nm,光栅狭缝均为 5 nm,转换速度为 4 s,根据荧光强度变化按下式计算 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub><sup>[12]</sup>。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = Kd × (R - R<sub>min</sub>) / (R<sub>max</sub> - R) × sf<sub>2</sub>/sb<sub>2</sub>, 其中, Kd 为 Fura-2-Ca<sup>2+</sup> 的解离常数, 37°C 时 Kd 为 224 nmol·L<sup>-1</sup>; R 为 340/380 nm 的荧光强度比值; R<sub>max</sub> 为加入 0.1% Triton-X 100 后 340/380 nm 的荧光强度比值; R<sub>min</sub> 为加入 EGTA 5 mmol·L<sup>-1</sup> 后 340/380 nm 的荧光强度比值; sf<sub>2</sub> 和 sb<sub>2</sub> 分别为零钙和饱和钙时 380 nm 处的荧光强度。

统计学处理 所有计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 差异的显著性用 *t* 检验。

## 结 果

### 1 NGF 对缺氧/缺糖损伤的影响

以细胞生存力及释放 LDH 的量评价神经元缺氧/缺糖损伤的程度。细胞缺氧/缺糖 24 h 时,存活细胞数为 28%, LDH 活性为正常对照组的 276%。NGF 3~100 μg·L<sup>-1</sup> 剂量依赖地抑制 LDH 的释放,提高细胞生存力(表 1)。而在细胞缺氧/缺糖前 12 h 时,未观察到明显的神经元数目的减少。

Tab 1 Effects of NGF on hypoxic/hypoglycemic insult in primary cultures of cerebral cortical cells from fetal rats

Drug (μg·L <sup>-1</sup> )	Surviving neurons (% of total)	LDH (U·mg <sup>-1</sup> protein)
Control	92.3 ± 10.5	24.8 ± 4.1
Hypoxia/hypoglycemia	27.8 ± 4.9**	68.5 ± 11.3**
NGF 1	25.6 ± 4.6	61.2 ± 9.0
3	36.7 ± 6.5 <sup>#</sup>	55.4 ± 6.6 <sup>#</sup>
10	49.2 ± 7.3 <sup>#</sup>	45.6 ± 7.0 <sup>#</sup>
30	66.5 ± 5.8 <sup>#</sup>	37.2 ± 5.7 <sup>#</sup>
100	85.4 ± 9.6 <sup>#</sup>	29.5 ± 5.5 <sup>#</sup>

*n* = 8,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* *P* < 0.01 compared with the control group; <sup>#</sup> *P* < 0.05, <sup>#</sup> *P* < 0.01 compared with the hypoxia/hypoglycemia group.

### 2 NGF 对缺氧/缺糖损伤时 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响

细胞在缺氧/缺糖 15~60 min 时, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 降低了 9%~35%, 随着缺氧/缺糖时间的延长, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 逐渐升高, 至 12 h 时为正常水平的 155%。12 h 以后, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 显著上升, 至 24 h 时升高至对照组的 3.4 倍。图 1 显示 NGF 50 μg·L<sup>-1</sup> 提高缺氧/缺糖 15~45 min 时的 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 水平, 在 12 h 后, 则降低 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的升高。图 2 显示 NGF (3~100 μg·L<sup>-1</sup>) 剂量依赖地降低缺氧/缺糖 24 h 时 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的升高。

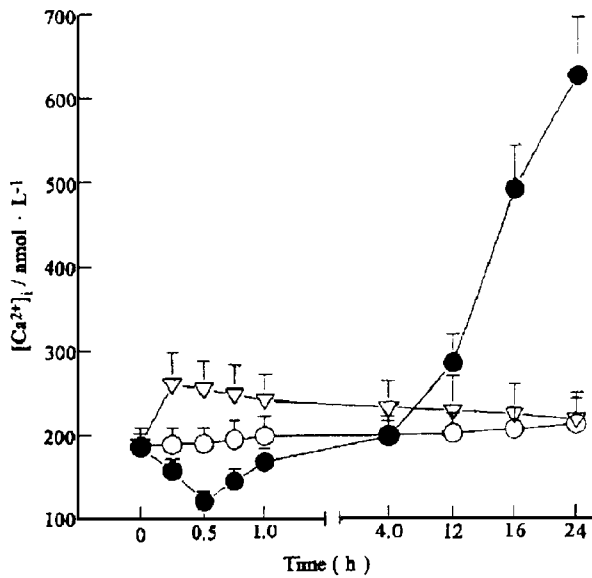


Fig 1 Effects of NGF(50 μg · L<sup>-1</sup>) on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in hypoxia/hypoglycemia cultures of cerebral cortical cells from fetal rats. NGF was added immediately after the initial [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> determination(time=0). ○—○ control; ●—● hypoxia/hypoglycemia; ▽—▽ NGF 50 μg · L<sup>-1</sup>.

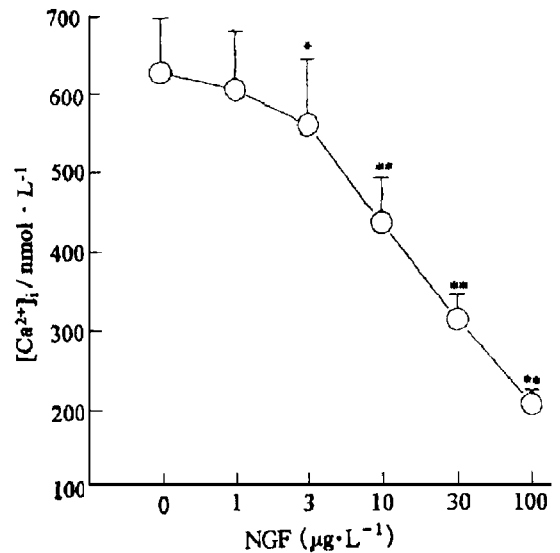


Fig 2 Dose-dependency of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-regulatory effects of NGF(1~100 μg · L<sup>-1</sup>) in oxygen/glucose-deprived cultures of cerebral cortical cells from fetal rats for 24 h.  $\bar{x} \pm s$ , n=8. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 compared with NGF-free.

### 3 Mg<sup>2+</sup> 和细胞外 Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>)对缺氧/缺糖时[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>和细胞生存力的影响

细胞缺氧/缺糖 24 h, 在[Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>为 0 时, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>及细胞生存力无明显变化, 这表明外

Ca<sup>2+</sup>流入参与了细胞缺氧/缺糖损伤。Mg<sup>2+</sup>降低了缺氧/缺糖引起的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高, 提高了细胞生存力, 这表明细胞缺氧/缺糖损伤时 NMDA 受体被激活了(表 2)。

**Tab 2 Effects of MgCl<sub>2</sub>(5 mmol · L<sup>-1</sup>) and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>(0 mmol · L<sup>-1</sup>) on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and neuronal survival in oxygen/glucose-deprived cultures of cerebral cortical cells from fetal rats for 24 h**

Drugs(mmol · L <sup>-1</sup> )	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (nmol · L <sup>-1</sup> )	Neuronal survival(% of total)
Control	185 ± 17	92.3 ± 10.5
Hypoxia/hypoglycemia	627 ± 71 * *	27.8 ± 4.9 * *
Hypoxia/hypoglycemia + MgCl <sub>2</sub> 5	248 ± 25 # #	85.1 ± 11.3 # #
Hypoxia/hypoglycemia + [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>o</sub> 0	206 ± 15 # #	88.4 ± 9.6 # #

n = 8,  $\bar{x} \pm s$ . \* \* P < 0.01 compared with the control group; # # P < 0.01 compared with the hypoxia/hypoglycemia group.

## 讨 论

钙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的损害及导致细胞死亡的“最后共同通路”。本实验结果

表明, 神经系统钙平衡是细胞缺氧/缺糖损伤和 NGF 神经保护作用的关键环节。

神经细胞缺氧/缺糖早期引起的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>减少, 可能是由于钙流被抑制和/或细胞膜去极化<sup>[13,14]</sup>。随着缺氧/缺糖时间的延长, 钙排出

受阻,谷氨酸受体激活,导致神经元内钙平衡紊乱。实验显示,细胞缺氧/缺糖 16~24 h,  $[Ca^{2+}]_i$  显著升高,而细胞生存力则明显下降,这表明,神经细胞缺氧/缺糖后期的  $[Ca^{2+}]_i$  显著升高导致了细胞损害。 $Ca^{2+}$  是如何介导细胞死亡的具体过程及机制,目前还不是很清楚。

由于  $Ca^{2+}$  在神经元缺血-缺氧损伤中起重要作用,因而对脑血管疾病的药物治疗主要侧重于对细胞内  $Ca^{2+}$  平衡的维持。NGF 能增加缺氧/缺糖损伤初期的  $[Ca^{2+}]_i$  到正常水平,而降低后期的  $[Ca^{2+}]_i$  升高,这表明 NGF 通过稳定  $[Ca^{2+}]_i$  水平来保护神经元免受缺氧/缺糖损伤。实验证明,在脑缺血时氧自由基与细胞内钙超载互为因果,导致细胞结构和功能损害。文献报道<sup>[4]</sup>, NGF 具有抗氧自由基损伤的作用,能提高神经细胞及 PC12 细胞抗氧化酶(谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等)活性,因而 NGF 稳定  $[Ca^{2+}]_i$  水平与其抗氧化、抗氧自由基毒性有关。

研究表明,脑缺血缺氧后兴奋性氨基酸尤其是谷氨酸过度释放,激活了 NMDA 受体,引起受体门控的离子通道开放,导致细胞内  $Ca^{2+}$  超载,而后者又是导致神经元迟发性死亡的关键因素之一。本实验结果表明,神经元缺氧/缺糖损伤的机制包括了 NMDA 受体的激活及外钙的流入,这与文献报道一致<sup>[3,15]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Caviedes P, Koistinaho J, Ault B, *et al.* Effects of nerve growth factor on electrical membrane properties of cultured dorsal root ganglion neurons from normal and trisomy 21 human fetuses. *Brain Res*, 1991, **556**:285
- 2 Chalazonitis A, Peterson E, Crain S. Nerve growth factor regulates the action potential duration of mature sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:289
- 3 Cheng B, Mattson MP. NGF and bFGF protect rat and human central neurons against hypoglycemic

damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron*, 1991, **7**:1031

- 4 Shimohama S, Ogawa N, Tamura Y, *et al.* Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res*, 1993, **632**:296
- 5 Cheng B, Mattson MP. Glucose deprivation elicits neurofibrillary tangle-like antigenic changes in hippocampal neurons: prevention by NGF and bFGF. *Exp Neurol*, 1992, **117**:115
- 6 Hoyer S, Oesterreich K, Wagner O. Glucose metabolism as the site of primary abnormality in early onset dementia of the Alzheimer type? *J Neurol*, 1988, **235**:143
- 7 Dildy JE, Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increase in free intracellular  $Ca^{2+}$  in dissociated brain cells. *Brain Res*, 1989, **499**:383
- 8 Salvaterra CG, Goldman WF. Direct effect of hypoxia on apparent intracellular calcium levels in cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am Rev Respir Dis*, 1991, **143**:A373
- 9 Mattson MP, Barger SW, Begley JG, *et al.* Calcium, free radicals and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol*, 1995, **46**:187
- 10 Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*, 1987, **20**:83
- 11 Lowry OH, Rosenbaugh NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**:265
- 12 Komulainen H, Bondy SC. The estimation of free calcium within synaptosomes and mitochondria with fura-2; comparison to quin-2. *Neurochem Int*, 1987, **10**:55
- 13 Spuler A, Endres W, Grafe P. Glucose depletion hyperpolarizes guinea pig hippocampal neurons by an increase in potassium conductance. *Exp Neurol*, 1988, **100**:248
- 14 Tromba C, Salvaggio A, Racagni G, *et al.* Hypoglycemia-activated  $K^+$  channels in hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 1992, **143**:185
- 15 Cheng B, Mattson MP. IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J Neurosci*, 1992, **12**:1558

## EFFECTS OF NERVE GROWTH FACTOR ON INTRACELLULAR FREE $\text{Ca}^{2+}$ IN OXYGEN/GLUCOSE-DEPRIVED CULTURES FROM CEREBRAL CORTEX OF FETAL RATS

Wu Junfang(Wu JF) and Zhang Juntian(Zhang JT)

*(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)*

**ABSTRACT** Oxygen/glucose deprived cortical cell cultures were used to explore the involvement of calcium in the mechanism of hypoxic/hypoglycemic insults and protection of nerve growth factor (NGF). Neuron viability and lactate dehydrogenase(LDH) efflux in the bathing medium of cerebral cortex cultures of fetal rats were measured as indication of the NGF effect. Calcium fluorescence indicator Fura-2/AM was used to measure free intracellular calcium( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). When cultures were deprived of oxygen/glucose, massive neuronal death occurred 16~24 h following the onset of hypoxia/hypoglycemia. NGF( $3 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dose-dependently attenuated the 24 h hypoxia/hypoglycemia-induced efflux of LDH and elevated the number of surviving neurons. Hypoxia/hypoglycemia induced a reduction in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in early stage and then a large elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in 12~24 h. NGF  $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  brought  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  to normal limits during the early stage of hypoxia/hypoglycemia and prevented the later elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . The  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation may be involved in the cell damage in hypoxia/hypoglycemia deprived cultures. It is believed that NGF protect cerebral cortical neurons against hypoxic/hypoglycemic insults via 'stabilizing'  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  level or preventing the late rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

**KEY WORDS** Nerve growth factor(NGF); Intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$ ; Fura-2; Neurons; Lactate dehydrogenase