

丁基苯酞对原代培养胎大鼠皮层神经细胞外液 NO 及胞浆内 cGMP 水平的影响*

阎超华 冯亦璞

(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 用分光光度法和放射免疫分析法分别检测 NO 及 cGMP 水平, 同时观察 *l*-丁基苯酞(*l*-NBP) 和 *d*-丁基苯酞(*d*-NBP)对原代培养的胎大鼠皮层神经细胞外液 NO 及胞浆内 cGMP 水平的影响。结果表明, *d*-NBP(0.1~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对低糖低氧条件下或含 *N*-甲基-*D*-门冬氨酸(NMDA)或含 KCl 的培养基中皮层神经细胞外液 NO 及细胞内 cGMP 水平明显升高, 而 *l*-NBP(0.1~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)则能明显降低 NO 和 cGMP 水平。提示: *d*-NBP 和 *l*-NBP 对低糖低氧, NMDA 或 KCl 诱导的 NO 释放和 cGMP 生成有相反的作用。

关键词 丁基苯酞; 大脑皮层细胞原代培养; N^G -硝基-*L*-精氨酸甲酯; 一氧化氮; 环-磷酸鸟苷

丁基苯酞(3-*n*-butylphthalide, NBP)是我组研制的一个新型的抗脑缺血药物, 前期的工作表明, 丁基苯酞的抗脑缺血作用机制可能与其增加缺血区局部脑血流量(rCBF)有关^[1], 进一步的研究发现, NBP 增加局部脑血流量可能与其对 NO 合酶(NOS)的作用有关。*d*-NBP 能够选择性地激活不同脑区及不同细胞来源的原生型 NO 合酶(cNOS), 而 *l*-NBP 能非选择性地抑制中枢神经系统的 cNOS 及诱生型 NOS(iNOS)(待发表), 两者作用相反。为了更深入地研究 NBP 对 NOS-NO-cGMP 系统的作用, 同时也为了获得更多的证据支持“*d*-NBP 是一个选择性 cNOS 激活剂, *l*-NBP 是一个非选择性 cNOS 和 iNOS 抑制剂”这一论点, 我们用分光光度法和放射免疫(RIA)的方法分别研究 *d*-NBP 和 *l*-NBP 对原代培养的胎大鼠皮层神经细胞外 NO 及胞浆内 cGMP 水平的影响。并与工具药 NOS 抑制剂 N^G -硝基-*L*-精氨酸甲酯(N^G -nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME)

及钙拮抗剂尼莫地平(Nim)的作用进行了比较。

材 料 和 方 法

仪器 752 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂产品); 超净工作台(北京半导体设备一厂生产); 二氧化碳培养箱(德国 Heraeus); 倒置显微镜(Olympus); 24 孔培养板(美国 Costar 公司生产); γ 射线计数仪(LKB, 1271 型, 芬兰生产)。

动物 清洁级 Wistar 孕鼠, 孕期 14~18 d, 由中国医学科学院实验动物中心提供。

药品与试剂 *d*- 和 *l*-NBP 由中国医学科学院药物研究所合成室杨靖华教授提供, 为浅黄色油状液体, 以聚乙二醇-400 配制; 尼莫地平为协和药厂提供; 多聚赖氨酸(分子量 15 万以上), NMDA, NAME 为 Sigma 公司产品, DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品; 对氨基苯磺酰胺(sulfanilamide)及 *N*-1-萘基乙二胺盐酸盐 [*N*-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride] 购自北京化学试剂公司, 二者均属

本文于 1996 年 11 月 10 日收到。

* 国家科委 1035 工程基金(94-2D-01)和国家自然科学基金(27790122)资助

分析纯,前者以 5% H_3PO_4 配成 1% 溶液;后者以双蒸水配成 0.1% 溶液;亚硝酸钠为北京化工厂产品(分析纯)应用当天以双蒸水配成 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度;Greiss 试剂:等量的对氨基苯磺酰胺溶液与萘基乙二胺溶液混匀;cGMP 测定试剂盒,购自上海第二医科大学实验核医学教研室,灵敏度为 10^{-15} mol ,可测 cGMP 范围为 $0.01 \sim 0.8 \text{ pmol}$,cAMP 的交叉反应为 1:500。

胎大鼠皮层神经细胞原代培养^[2] 选怀孕 14~18 d 清洁级大鼠用水合三氯乙醛麻醉,75% 乙醇消毒胸腹部,于超净台内取出胎鼠皮层置于 DMEM 培养液(含 10% 小牛血清,10% 马血清,青霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{ml}^{-1}$,链霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{ml}^{-1}$),经冲洗、吹打、分散、过滤和调整细胞浓度后接种至预先用 0.01% 多聚赖氨酸覆盖过的 24 孔培养板(每孔 1 ml),置 5% CO_2 孵箱孵育。培养细胞每隔 3~4 d 换一次新鲜的含血清 DMEM,细胞培养至 14 d,换以含药物的低糖低血清 DMEM(含葡萄糖 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,5% 小牛血清,5% 马血清,30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES 以稳定培养基的 pH 值)孵育,同时用封口膜密封培养板中止氧供以造成低糖低氧环境,温孵 10 h 后换为正常的 DMEM 培养液并恢复氧供以模拟动物的缺血再灌状态。

NO 的测定 参照文献^[3]方法,取细胞外液(细胞的培养介质)1 ml 与等量的 Greiss 试剂混匀,室温放置 20 min,于 $\lambda = 545 \text{ nm}$ 测吸收度,根据亚硝酸钠标准曲线,求出相应的亚硝酸钠含量,以代表 NO 释放水平。

cGMP 的放射免疫测定^[3] 细胞培养结束后,迅速吸出培养板各孔中的培养液,并向每孔加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 1ml,37°C 温孵 30 min,吸出上清液分别测定 cGMP 含量。反应总体积为 308 μl 。标准管中含:cGMP 标准品 100 μl (浓度范围为 $0.04 \sim 0.80 \text{ pmol}$)或样品 100 μl ,乙酰化试剂 8 μl (三乙胺—醋酸酐 = 1:1),¹²⁵I-ScGMPTME 50 μl (约 $150 \text{ dpm}\cdot\mu\text{l}^{-1}$),以及抗血清 50 μl (1:3000)。非特异性结合管不含 cGMP 标准品和抗血清,最大结合管不含

cGMP 标准品,其总体积以 $50 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸缓冲液补至 308 μl 。上述操作均于冰浴中进行,全部试剂加完后将各试管摇匀,置 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 过夜,依次分离各管中游离和结合的 cGMP:先向试管中加入冰冷的淋洗缓冲液约 1 ml,立即滴加在抽滤器的微孔滤膜上,减压抽滤,用同一缓冲液约 5 ml 洗试管两次,洗液也滴加在膜片上抽滤,取下膜片置 γ 测定管中用 γ 计数器测 cpm 值。

样品中 cGMP 含量的计算 以 cGMP 标准品的绝对浓度为横坐标, B_0/B_x 为纵坐标,得一直线(B_0 : 最大结合管的 cpm 值 - 非特异性结合管的 cpm 值, B_x : 标准品或样品管的 cpm 值 - 非特异性结合管的 cpm 值),求出回归方程及相关系数,根据所测样品的 cpm,计算 B_0/B_x ,最后按回归方程求出样品中的 cGMP 浓度,并作稀释倍数的校正。

统计学处理 文中数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一组内给药前后差异用配对 t 检验来评价,不同组间的差异用方差分析(ANOVA)进行统计学处理。

结 果

1 *d*-NBP, *l*-NBP, NAME 及 Nim 对原代培养的皮层神经细胞释放 NO 的影响

1.1 对 NMDA 诱导的神经细胞释放 NO 的影响(表 1)

细胞培养至 14 d 时,与 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NMDA 37°C 孵育 10 h,此时,可见细胞外液 NO 水平明显升高;与 NMDA 孵育的同时加入不同浓度的 *l*-NBP($1 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),可使细胞外液的 NO 水平明显下降。与 *l*-NBP 不同,*d*-NBP($1 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞外液 NO 水平不仅没有降低作用,在大剂量($30 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)时还有明显的升高作用。

1.2 对低糖低氧诱导的神经细胞释放 NO 的影响

当细胞培养至 14 d 时,换以低糖的 DMEM 培养基(内含不同浓度的药物,药物体

积为培养基体积的 1%)，并以封口膜和胶布密封培养板，以造成缺 O₂ 环境，于 37℃ 继续温孵 10 h。由表 1 可见，*l*-NBP 大剂量时 (100 μmol·L⁻¹) 能明显抑制 NO 的释放；与 *l*-NBP 不同，*d*-NBP (0.1~100 μmol·L⁻¹) 能促进大脑皮层细胞释放 NO，在 3 μmol·L⁻¹ 时其作用趋

势已表现出来，随着剂量的增加，而进一步增强，100 μmol·L⁻¹ 时其作用变得非常明显。可见 *d*-NBP 和 *l*-NBP 对低糖低氧诱导的细胞释放 NO 有不同的作用，尤其在大剂量 (100 μmol·L⁻¹) 时，二者呈明显的相反作用。这一结果与 1.1 项结果一致。

Tab 1 Effects of *d*-NBP or *l*-NBP on NMDA and hypoxia-hypoglycemia induced NO release in cultured rat cortical neuronal cells. Results are expressed as extracellular nitrite concentrations

Concentration (μmol·L ⁻¹)	Nitrite (nmol·ml ⁻¹ /10 ⁶ cell)			
	NMDA induced		Hypoxia-hypoglycemia induced	
	<i>l</i> -NBP	<i>d</i> -NBP	<i>l</i> -NBP	<i>d</i> -NBP
Control	2.15 ± 0.09	2.15 ± 0.09		
Vehicle	2.76 ± 0.14	2.76 ± 0.14	4.67 ± 0.04	4.67 ± 0.04
1	2.75 ± 0.12	2.80 ± 0.22	4.72 ± 0.03	4.75 ± 0.08
3	2.52 ± 0.35	2.94 ± 0.049	4.78 ± 0.03	4.89 ± 0.09
10	2.40 ± 0.12	3.02 ± 0.364	4.76 ± 0.15	4.97 ± 0.08
30	2.30 ± 0.10*	3.19 ± 0.065*	4.78 ± 0.06	4.94 ± 0.08
100	2.37 ± 0.05*	3.43 ± 0.11*	4.53 ± 0.08*	5.01 ± 0.04**

$\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the vehicle point.

1.3 对 KCl 诱导神经细胞释放 NO 的影响

正常皮层细胞与 KCl (20 mmol·L⁻¹) 孵育 10 h 后也可引起 NO 水平的明显升高 (溶剂对照: 3.16 ± 0.1 vs 对照: 2.15 ± 0.09 nmol·ml⁻¹/10⁶ cell), *l*-NBP 和 Nim (10 μmol·L⁻¹) 与溶剂对照组相比, 均有明显降低细胞外 NO 含量的作用。但 *d*-NBP (10 μmol·L⁻¹) 对 KCl 诱导的 NO 释放无明显作用, 可能与其剂量偏小有关 (图 1)。

2 *d*-NBP, *l*-NBP, NAME 及 Nim 对原代培养的大鼠皮层神经细胞内 cGMP 水平的影响

2.1 对低糖低氧条件下细胞内 cGMP 水平的影响

由图 2 可见 *d*-NBP 能够明显的升高细胞内 cGMP 水平, 尤其是在大剂量 (100 μmol·L⁻¹) 时, 作用最为明显 (*d*-NBP: 7.64 ± 2.27 vs 溶剂对照: 3.52 ± 1 pmol/10⁶ cell), 而 *l*-NBP 则与 *L*-NAME 相似, 能够明显降低细胞内 cGMP 水平, 其降低作用在 3 μmol·L⁻¹ 时已表现出 (*l*-NBP: 2.05 ± 0.46 vs 溶剂对照:

3.52 ± 1 pmol/10⁶ cell), 以后随剂量增加其降低作用有所增强。低糖低氧介质中 *d*-及 *l*-NBP 对细胞内 cGMP 水平的相反作用, 正好与其对细胞内 NO 释放的作用 (表 1) 相一致。

2.2 对 NMDA 存在情况下, 细胞内 cGMP 水平影响 (图 3)

在含 NMDA (30 μmol·L⁻¹) 的培养液中, 同时加入 *d*-NBP (0.1~100 μmol·L⁻¹) 能明显升高细胞内 cGMP 水平, 其作用在 1 μmol·L⁻¹ 时已很明显 10 μmol·L⁻¹ 时达高峰, 100 μmol·L⁻¹ 时略有下降; 与 *d*-NBP 相反, *l*-NBP 及 NAME (0.1~100 μmol·L⁻¹) 则表现为降低细胞内 cGMP 含量的作用。这一结果不仅与 *d*-, *l*-NBP 对低糖低氧环境中细胞内 cGMP 水平的影响 (图 2) 一致, 而且与 *d*-, *l*-NBP 对 NMDA 诱导的细胞内 NO 释放的影响 (表 1) 相吻合。

2.3 对 KCl 存在情况下, 细胞内 cGMP 水平影响 (图 4)

与 KCl (20 mmol·L⁻¹) 孵育的同时, 加入

d-NBP($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 能引起明显的 cGMP 水平升高; 与此相反, *l*-NBP, NAME 和 Nim($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 则能引起明显的 cGMP 水平下降, 此结果与图 1 及图 3 相吻合)。

d-NBP($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 能引起明显的 cGMP 水平升高; 与此相反, *l*-NBP, NAME 和 Nim($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 则能引起明显的 cGMP 水平下降, 此结果与图 1 及图 3 相吻合)。

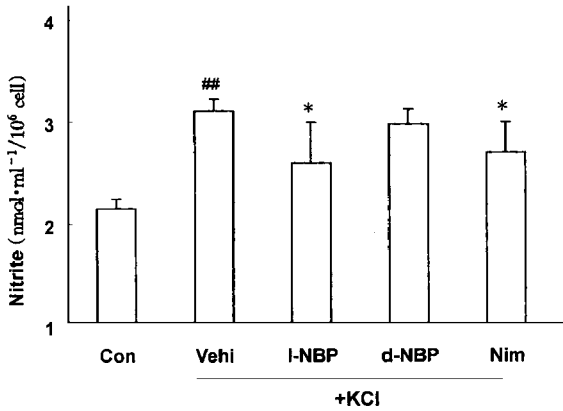


Fig 1 Effects of different drugs($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on KCl($20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) induced NO release in cultured rat cortical neuronal cells. Results are expressed as extracellular nitrite concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$). $\#\# P < 0.01$ vs control group. $* P < 0.05$ vs vehicle. Con: control; Vehi: vehicle; Nim: nimodipine.

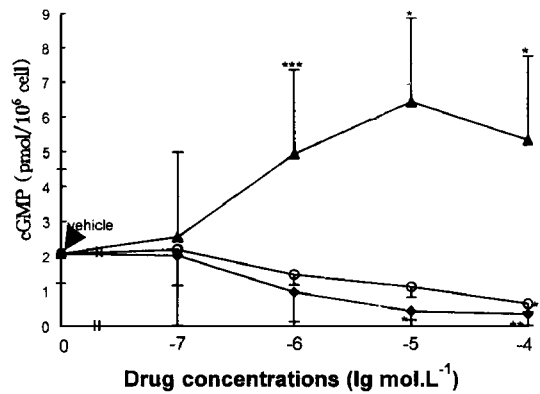


Fig 2 Effects of drugs on cytosolic cGMP level in primary cortical neuronal cultures. Neurons were incubated for 10 h with *d*-NBP, *l*-NBP, *dl*-NBP or NAME in the presence of hypoxia-hypoglycemia. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ vs the vehicle group. \triangle — \triangle *d*-NBP; \blacktriangle — \blacktriangle NAME; \circ — \circ *l*-NBP; \bullet — \bullet *dl*-NBP.

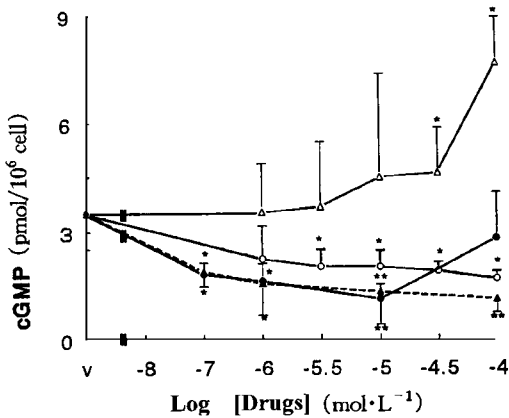


Fig 3 Effects of different concentrations of drugs on cytosolic cyclic GMP level in cultured rat cortical neurons. Neurons were incubated for 10 h with *d*-NBP, *l*-NBP, or NAME in the presence of $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NMDA. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ compared with vehicle group. \blacktriangle — \blacktriangle *d*-NBP; \circ — \circ *l*-NBP; \bullet — \bullet NAME.

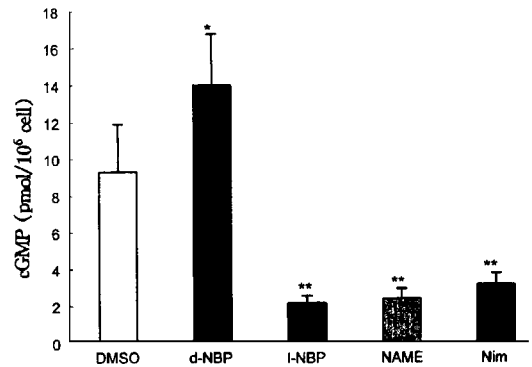


Fig 4 Effects of *d*-NBP, *l*-NBP, NAME($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and Nim($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cytosolic cyclic GMP level in the presence of $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl in cultured rat cortical neurons. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ compared with vehicle group.

讨 论

NO作为一种新型的非经典的递质,在神经、免疫、心血管等多个系统中起着广泛而复杂的生理及病理作用^[4]。现已证明,NOS-NO-GC-cGMP系统是NO发挥其生理及病理作用的一条重要途径:当NOS激活后,催化L-Arg形成NO,NO作用于可溶性鸟苷酸环化酶(GC-S)的血红素并使其激活,生成cGMP,后者通过作用于cGMP依赖性蛋白激酶及其底物而发挥一系列生理效应,如促进神经信息的传递、抑制血小板聚集、扩张血管等^[5];此外NO还能够介导兴奋毒性^[6,7],NO的这一病理作用也有NOS-NO-GC-cGMP系统的参与:由于兴奋性氨基酸作用于NMDA受体门控性离子通道,大量Ca²⁺内流,引起NO释放,cGMP水平升高,可见NOS-NO-GC-cGMP系统在NO发挥其生理及病理作用的过程中极为重要。

本室在发现*d*-NBP及*l*-NBP对NOS有相反作用的基础上(待发表),进一步研究了*d*-,*l*-NBP对NO-cGMP的影响,结果表明,无论是给细胞造成一个低糖低氧的培养环境,还是给予NMDA(30 μmol·L⁻¹)或KCl(20 mmol·L⁻¹)使神经细胞受损伤,均可引起NO的释放增加,并伴有细胞内cGMP生成增多。这是由于低糖低氧或NMDA或KCl能够通过不同的机制引起细胞内钙增加,进而激活NOS-NO-GC-cGMP系统。如果在低糖低氧培养基中或在含NMDA或KCl的培养基中加入*d*-NBP,则能进一步促进NO的释放及cGMP的产生;相反,加入*l*-NBP后不但不引起NO和cGMP水平的升高,大剂量(100 μmol·L⁻¹)时反而明显降低NO和cGMP含量,这一结果正好与NBP对rCBF的研究结果一致:*d*-NBP能激活nNOS,明显增加蛛网膜下腔出血(SAH)大鼠的rCBF,而*l*-NBP则抑制nNOS和iNOS,对SAH大鼠的rCBF无作用(待发表),推测可能的机制为:*d*-NBP首先激活神经元中的NOS,促使NO释放,后者又通过细胞间的相互作用进一步激活了胶质细胞内的GC-S,最终导致细胞内

cGMP含量升高,改善了rCBF,发挥一系列的生理及病理作用;而*l*-NBP则能抑制神经元中的cNOS,减少NO的释放,降低细胞内cGMP含量,对rCBF无作用。NAME由于抑制了NOS而有减少NO的释放,降低细胞内cGMP含量作用;Nim则由于抑制KCl诱导的Ca²⁺内流而减少NO的释放,降低细胞内cGMP含量,这与理论推测相符。

关于NO在脑缺血过程中所起的作用,目前尚无定论,比较公认的观点是NO对中枢神经系统具有利和弊作用,即神经保护作用 and 神经毒性作用。早期NO增加能扩张血管,抑制血小板和白细胞聚集和粘附,维持血流通畅,及时改善缺血组织尤其是缺血阴影区的微循环,从而对缺血性脑损伤发挥有益的作用,但NO过量产生,与超氧阴离子(O₂⁻)反应生成硝基过氧化物,进而产生羟自由基(·OH),硝基过氧化物和·OH引起蛋白质、核酸及脂质膜的损伤,或作用于Fe-S蛋白酶类,影响细胞呼吸和能量代谢^[8,9]。据报道^[10,11],NOS抑制剂如L-NAME和L-NA等在低剂量或者治疗给药,使不抑制早期NO,对脑缺血有保护作用,如用预防给药或大剂量治疗给药,由于抑制了早期NO则无保护作用,表现为脑梗死体积增加。说明缺血早期NO增加是有利的因素,如被抑制,则对脑缺血不利。鉴于*d*-NBP和*l*-NBP对NOS-NO-GC-cGMP系统的不同作用,推测消旋NBP可能会获得更佳疗效,其原因是:*d*-NBP增加NO对脑缺血早期是有利的,而*l*-NBP的作用对*d*-NBP(增加早期NO)虽有抵消作用,但它对抑制脑缺血后期NO增加是有利的。有关*d*-NBP和*l*-NBP的不同作用,可能是由于生物大分子如酶和受体等的立体选择性不同所致,探索其确切机制则有待于进一步研究。

综上所述,*d*-NBP能够促进低糖低氧,NMDA及KCl诱导的NO释放及cGMP生成,相反,*l*-NBP则能抑制NO释放并降低cGMP水平,尽管*d*-NBP和*l*-NBP对NO-cGMP有相反的作用,但都能保护各种原因导致的神经元

损伤^[12,13],说明其神经保护作用还有其它机制参与。

参 考 文 献

- 1 Yan CH, Feng YP, Zhang JT. Effects of *dl*-3-*n*-butylphthalide on regional cerebral blood flow in middle cerebral artery occlusion rats. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, **12**:36
- 2 Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 1987, **7**:357
- 3 Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM. Interleukin 1 induces prolonged *L*-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1991, **87**:62
- 4 Schmidt HW, Walter U. NO at work. *Cell*, 1994, **78**:919
- 5 Schmidt HW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1178**:153
- 6 Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, et al. Mechanism of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 1993, **13**:2651
- 7 Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**:9030
- 8 Beckman JS, Ye YZ, Chen J. The interactions of nitric oxide with oxygen radicals and scavengers in cerebral ischemic injury. In: Siesjo BK, Wieloch T, eds. *Advances in Neurology*. Vol 71. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishes, 1996:339~354
- 9 Cross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanism. *Annu Rev Physiol*, 1995, **57**:737
- 10 Samdaani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*, 1997, **28**:1283
- 11 Meldrum BS. The role of nitric oxide in ischemic damage. In: Siesjo BK, Wieloch T, eds. *Advances in Neurology*. Vol 71. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:355~364
- 12 阎超华, 张均田, 冯亦璞. *l*-甲基苯酞对氯化钾及 *N*-甲基-*D*-门冬氨酸诱导的大鼠皮质神经细胞损伤的保护作用. *药理学报*, 1997, **32**:340
- 13 阎超华, 冯亦璞. *l*-甲基苯酞对低糖低氧诱导的大鼠皮层神经细胞损伤的保护作用. *药理学报*, 1998, **33**:待发表

EFFECTS OF *D*-3-*N*-BUTYLPHTHALIDE AND *L*-3-*N*-BUTYLPHTHALIDE ON EXTRACELLULAR NO LEVEL AND INTRACELLULAR cGMP LEVEL IN PRIMARY CULTURED RAT CORTICAL NEURONS

Yan Chaohua(Yan CH) and Feng Yipu(Feng YP)

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

ABSTRACT The effects of *l*-3-*n*-butylphthalide(*l*-NBP) and *d*-3-*n*-butylphthalide(*d*-NBP) on extracellular nitric oxide(NO) levels and intracellular cyclic GMP(cGMP) levels were studied in primary cultured rat cortical neuronal cells. Nitric oxide and cGMP levels were measured by using spectrometry and radioimmunological analysis(RIA), respectively. The results showed that *d*-NBP ($0.1 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) markedly increased extracellular NO levels and intracellular cGMP levels in primary cultured neurons that were exposed for 10 h to hypoxic/hypoglycemic, *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA), or KCl media. On the contrary, *l*-NBP($0.1 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) significantly decreased extracellular NO levels and intracellular cGMP levels. It is suggested that there is a contrary effect of *d*-NBP and *l*-NBP on NO release and cGMP production induced by hypoxia/hypoglycemia, NMDA, or KCl.

KEY WORDS 3-*n*-Butylphthalide; Cortical neuronal culture; Nitric oxide; Cyclic GMP; *N*^G-nitro-*L*-arginine methyl ester