

丁基苯酞对原代培养的大鼠皮层神经细胞外液 6-keto-PGF_{1α} 和 TXB₂ 及其比值的影响

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 目的旨在观察丁基苯酞(NBP)对神经细胞培养液中 6-酮-PGF_{1α} 和 TXB₂ 含量及其比值的影响。用放射免疫方法, 结果发现神经细胞在低糖低氧 5 h 或低糖低氧 5 h/恢复糖氧 3 h 条件下, *d*-, *l*-和 *dl*-NBP(0.1~100 μmol·L⁻¹)能够剂量依赖性升高细胞外液中的 6-酮-PGF_{1α} 含量, 降低 TXB₂ 水平, 从而使 6-酮-PGF_{1α} 与 TXB₂ 比值升高。而阿司匹林仅在小剂量(0.1, 1 μmol·L⁻¹)时能升高 6-酮-PGF_{1α} 与 TXB₂ 比值, 大剂量(10, 100 μmol·L⁻¹)时无影响。提示: NBP 对 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 比值的升高可能与其增加局部脑血流和改善缺血性脑损伤有关。

关键词 丁基苯酞; 神经细胞培养; 前列腺环素; 血栓素 B₂; 阿司匹林

前期研究表明, 丁基苯酞(*dl*-3-*n*-butylphthalide, NBP)有明显抗脑缺血作用^[1,2], 能增加大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)后同侧纹状体的局部脑血流^[3], 并能明显影响一氧化氮合酶—一氧化氮—鸟核苷酸环化酶—环鸟核苷酸(NOS-NO-GC-cGMP)系统^[4]。众所周知, NO 不仅与血管的舒缩功能有密切关系, 同时还与血小板的功能密切相关。实验发现 NBP 能提高局部脑缺血大鼠海马、纹状体和脑皮层中 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 的比值^[5], 在这些实验基础上, 本文进一步用原代培养大鼠脑皮层神经细胞的方法, 研究 *d*-, *l*-和 *dl*-NBP 对低糖低氧条件下神经细胞外液中 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 含量的影响, 并与阿司匹林进行了比较。

材 料 和 方 法

仪器 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); 放射性 γ 计数器(LKB, 1271 型, 芬兰生产)。

动物 清洁级 Wistar 孕鼠, 孕期为 17 d, 由中国医学科学院实验动物中心提供。

药品 NBP (批号 911-11, 含量为 97.05%) 由中国医学科学院药物研究所北京协和药厂提供, 为浅黄色油状液体; 阿司匹林由新华制药厂生产; DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品; 小牛血清、马血清为天津市生化制品厂出品; ¹²⁵I-标记的血栓素 B₂ 和 6-酮-前列腺素 F_{1α} (4.6 × 10⁴ Bq·ml⁻¹) 放免试剂盒由中国人民解放军总医院东亚免疫技术研究所生产。

胎鼠皮层神经细胞的原代培养 按文献^[6]方法进行大鼠脑皮层神经细胞原代混合培养。当神经细胞培养至 10 d 时, 换以含药物的低糖低血清 DMEM 培养基(含 5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖, 5% 小牛血清, 5% 马血清, 30 mmol·L⁻¹ HEPES)孵育, 并中止氧供以造成低氧环境, 温孵 5 h 后换为正常的 DMEM 培养基并恢复氧供以模拟动物的缺血再灌状态。

收稿日期 1997-11-10

本研究为国家科委 1035 工程重大项目基金(94-ZD-01)和国家自然科学基金重大项目基金(29790122)资助

6-酮-PGF_{1α}和 TXB₂ 的放射免疫分析 于细胞培养液或 6-酮-PGF_{1α}(或 TXB₂)标准品各 200 μl 中,分别加入抗血清及碘标记的 6-酮-PGF_{1α}(或 TXB₂)及缓冲液各 100 μl,反应总体积为 400 μl, 4℃ 过夜。非特异性管中只有¹²⁵I-6-酮-PGF_{1α}(或 TXB₂) 100 μl,最大结合管中只有抗血清和¹²⁵I-6-酮-PGF_{1α}(或 TXB₂)各 100 μl,次日依次向反应管中加入分离试剂 500 μl,混匀后常温离心 20 min(3500 r·min⁻¹),取沉淀,于 γ 计数器上测各管溶液的 cpm 值。

标准曲线及结果计算 分别以 6-酮-PGF_{1α}和 TXB₂ 标准品的浓度为横坐标, B/B₀ % 为纵坐标做标准曲线(B: 标准品或样品的 cpm 值减去非特异性结合管的 cpm 值, B₀: 最大结合管的 cpm 值 - 非特异性结合管的 cpm 值),求回归方程及相关系数,根据所测样品的 cpm 值,计算 B/B₀ %, 以此求出样品中 PGF_{1α} 和 TXB₂ 的含量,并作稀释倍数的校正。

统计方法 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进行统计学处理。

结 果

1 *d-*, *l-*, *dl*-NBP 及阿司匹林对低糖低氧 5 h 的胎大鼠皮层神经细胞外液中 6-酮-PGF_{1α} 和 TXB₂ 含量及其比值的影响

由表 1 可见, *d*-NBP, *l*-NBP 及 *dl*-NBP 均可剂量依赖性地升高原代培养神经细胞外液中 6-酮-PGF_{1α} 含量。*l*-NBP 在 1 μmol·L⁻¹ 时,即表现出升高 6-酮-PGF_{1α} 的趋势,但无统计学意义, 10 μmol·L⁻¹ 时可明显升高其水平, 100 μmol·L⁻¹ 时可使细胞外液中 6-酮-PGF_{1α} 的含量升高 1.7 倍;而 *d*-NBP 在 100 μmol·L⁻¹ 时才显示出明显的作用, *dl*-NBP 与 *l*-NBP 作用相似;阿司匹林则与 NBP 作用不同,在小剂量时对 6-酮-PGF_{1α} 含量作用不明显,而在大剂量(100 μmol·L⁻¹) 时则可明显降低细胞外液中 6-

酮-PGF_{1α} 含量。

此外,当细胞于低糖低氧环境下培养 5 h 后, *dl-*, *d-*, *l*-NBP 以及阿司匹林(0.1~100 μmol·L⁻¹) 均可剂量依赖性地降低细胞外液中 TXB₂ 的含量,上述药物在 100 μmol·L⁻¹ 时可使 TXB₂ 含量分别下降 39.56%, 24.46%, 27.95% 和 55.76%。阿司匹林对细胞外液 TXB₂ 的抑制作用最强(IC₅₀ = 48.43 ± 4.61 μmol·L⁻¹), *d*-NBP 的作用最弱。

结果显示, *l-*, *d-* 及 *dl*-NBP (0.1~100 μmol·L⁻¹) 均可剂量依赖性地升高原代培养神经细胞外液中 6-酮-PGF_{1α} 和 TXB₂ 的比值,尤其是 *l*-NBP, 在 0.1 μmol·L⁻¹ 时即显示升高的趋势,以后随着剂量的增加,其作用更为明显, 100 μmol·L⁻¹ 时可使 6-酮-PGF_{1α} 和 TXB₂ 比值升高约 274%; *dl*-NBP 虽然在 10 μmol·L⁻¹ 时才有明显作用,但在 100 μmol·L⁻¹ 时可使 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 比值升高约 285%; *d*-NBP 在 10 μmol·L⁻¹ 时起效,其作用比较温和, 100 μmol·L⁻¹ 时仅使 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 比值升高 148%;阿司匹林与上述 3 药均不同,小剂量(0.1 及 1 μmol·L⁻¹) 时,能升高 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 比值,大剂量(10 及 100 μmol·L⁻¹) 时,由于同时抑制了 PGI₂ 和 TXB₂,因而对其比值无明显影响。

2 *d-*, *l*-NBP 及阿司匹林对低糖低氧 5 h/恢复糖氧 3 h 时大脑皮层神经细胞外液中 6-酮-PGF_{1α}, TXB₂ 含量及其比值的影响

细胞在低糖低氧环境中孵育 5 h 后换以正常的培养基继续培养 3 h,以模拟整体动物的“缺血再灌”状态,此时 *l*-NBP 及 *d*-NBP(0.1~100 μmol·L⁻¹) 仍然表现为剂量依赖性地升高细胞外液中 6-酮-PGF_{1α} 含量的作用, 100 μmol·L⁻¹ 时其作用最为明显,该结果与表 1 结果相同;相反,阿司匹林则表现为对 6-酮-PGF_{1α} 的抑制作用,在 10 和 100 μmol·L⁻¹ 时,阿司匹林能够显著抑制细胞内 6-酮-PGF_{1α} 的释放(见表 2)。

Tab 1 Effects of different concentrations of NBP and Aspirin on TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} release in cultured rat cortical neurons exposed to hypoxic/hypoglycemic media for 5 h

Concentration/ μmol·L ⁻¹	Aspirin		L-NBP		D-NBP		DL-NBP	
	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}
0	68.29±9.58	0.56±0.051	60.72±3.55	0.47±0.088	60.72±3.55	0.47±0.088	60.72±3.55	0.47±0.088
0.1	45.99±7.05*	0.54±0.063	63.86±11.46	0.43±0.084	58.26±5.5	0.47±0.114	50.02±4.08	0.5±0.092
1	44.9±4.33*	0.5±0.223	46.79±2.94*	0.52±0.13	57.76±5.67	0.54±0.051	45.08±5.09	0.63±0.129
10	41.95±5.03*	0.44±0.086	52.36±4.3	0.81±0.074*	50.97±5.84	0.7±0.073	44.12±3.51*	0.91±0.101*
100	30.21±5.04**	0.33±0.027*	36.7±5.7*	1.1±0.094**	45.87±2.6*	0.88±0.095*	43.75±3.2*	1.28±0.12**

n = 4, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group.

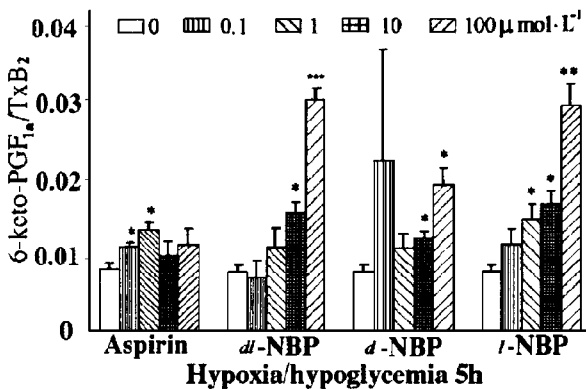


Fig 1 Effects of different concentrations of NBP and Aspirin on 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ level in cultured rat cortical neurons exposed to hypoxic/hypoglycemic media for 5 h. n = 4, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs the corresponding control group.

在低糖低氧 5 h/恢复糖氧 3 h 时阿司匹林仍可剂量依赖性降低 TXB₂ 含量。d-NBP 和 l-NBP 则需在较大剂量(100 μmol·L⁻¹)时对 TXB₂ 才显示明显降低作用。

与表 1 中的结果相似, d-, l-NBP 均能剂量依赖性地升高细胞外液中 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 的比值, 100 μmol·L⁻¹ 时, d-NBP 和 l-NBP 分别使比值升高 145% 和 109% (与溶剂对照组相比 P < 0.01); 相反, 阿司匹林较小剂量(0.1 μmol·L⁻¹) 时, 对 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 比值无明显影响, 1 μmol·L⁻¹ 时可升高 6-酮-PGF_{1α}/TXB₂ 比值(P < 0.05, n = 4), 但继续增加剂量(10 及 100 μmol·L⁻¹) 时, 对此比值的影响不明显。

Tab 2 Effects of different concentrations of NBP and Aspirin on TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} release in cultured rat cortical neurons exposed to hypoxic/hypoglycemic media for 5 h and following normal media for 3 h

Concentration/ μmol·L ⁻¹	Aspirin		L-NBP		D-NBP	
	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}
0	75.56±5.3	0.631±0.059	70.15±4.91	0.626±0.046	70.15±3.55	0.626±0.046
0.1	73.75±6.36	0.629±0.084	58.85±5.64	0.631±0.097	56.58±5.08	0.603±0.089
1	60.94±5.83	0.676±0.146	53.72±3.18	0.678±0.125	57.04±3.67	0.778±0.164
10	54.63±3.79*	0.402±0.045*	53.74±4.16	0.806±0.081	53.12±4.35	0.856±0.05
100	49.97±3.02**	0.4±0.033*	51.62±3.39*	0.959±0.067*	50.78±3.78*	1.11±0.11*

n = 4, * P < 0.05 vs the control group.

讨 论

花生四烯酸的环氧酶途径代谢产物,血栓素 A_2 (TXA_2)和前列腺环素(PGI_2)是体内的一对生理拮抗剂,前者具有强烈的促血管收缩和血小板聚集作用,而后者则具有抗血小板聚集和舒血管作用,生理状态下血浆或组织中的两者的比例处于相对稳定状态,以保持机体内环境的恒定,某些病理因素引起其比例失调是造成血管痉挛、血小板聚集或血栓形成的重要原因之一。通常认为 TXA_2 主要是由血小板微粒体合成并释放的,而 PGI_2 则主要是由血管内皮细胞合成并释放的,它们的生物半衰期很短,分别为 30 s 和 3 min,继而转化为活性极低但十分稳定的 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 及 TXB_2 。所以,研究中一般通过测定这两种代谢产物的含量,反映 PGI_2 与 TXA_2 的水平。众多的实验表明^[7,8],脑缺血以及脑缺血再灌时,血液及脑脊液中 AA 的各种代谢产物均显著升高,但 TXB_2 升高的幅度远大于 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 升高的幅度,其结果是 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 与 TXB_2 比值大大下降,现已证明 TXB_2 和 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 的平衡在脑血流的调节中起重要作用^[8,9], PGI_2 与 TXA_2 比值的显著降低是造成脑缺血再灌期脑组织持久低灌流的重要因素之一。因此在研究抗脑缺血药物时,观察药物对于 AA 代谢产物 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 和 TXB_2 的作用是很有必要的。

本实验用原代培养大鼠皮层神经细胞的方法证明,“低糖低氧”或“低糖低氧 5 h/恢复糖氧 3 h”条件下,皮层神经细胞能合成和释放一定量的 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ (每百万细胞 0~1.8 ng)和 TXB_2 (每百万细胞 0~100 ng)。种兆忠等发现局部脑缺血再灌后 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 的比值明显下降^[5]Stevens 和 Yaksh^[7,8]等也报道在全脑缺血 15 min 再灌 60 min 时,脑脊液中 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 比值可显著下降,说明神经细胞确能合成和释放 PGI_2 和 TXA_2 。

实验表明在单纯“低糖低氧 5 h”时, *dl*-

NBP, *l*-NBP 和 *d*-NBP 均能明显升高 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 比值;“低糖低氧 5 h/恢复糖氧 3 h”时, *l*-NBP 和 *d*-NBP 仍能显著升高细胞外液中 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 比值,这一结果与以前整体动物实验中所得结果基本一致^[5]。而阿司匹林仅在小剂量时能够升高 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 比值,较大剂量时由于同时抑制 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 ,对 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 比值影响不大,因此 NBP 有可能成为一种新型的预防脑卒中的药物。关于 NBP 对血管内皮细胞和血小板所产生的 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 的影响正在研究中。

参 考 文 献

- 1 冯亦璞,胡盾,张丽英. 丁基苯酞对小鼠全脑缺血的保护作用. 药理学报, 1995, **30**:741
- 2 刘小光,冯亦璞. 丁基苯酞对局部脑缺血大鼠行为和病理改变的保护作用. 药理学报, 1995, **30**:896
- 3 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 Sinica*, 1998, **19**:117
- 4 阎超华,冯亦璞. 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. 药理学报, 1998, **33**:418
- 5 Chong ZZ, Feng YP. Effect of *dl*-3-*n*-butylphthalide on production of TXB_2 and 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ in rat brain during focal cerebral ischemia and reperfusion. *Acta Pharmacol Sinica*, 1997, **18**:505
- 6 阎超华,张均田,冯亦璞. 丁基苯酞对 KCl 及 *N*-甲基-*D*-门冬氨酸诱导的大鼠皮层神经细胞损伤的保护作用. 药理学报, 1997, **32**:340
- 7 Stevens MK, Yaksh TL. Systematic studies on the effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 on cerebral blood flow and responsivity, EEG, and blood-brain barrier following complete reversible cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, **10**:77
- 8 Stevens MK, Yaksh TL. Time course of release *in vivo* of PGE $_2$, PGF $_{2\alpha}$, 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ and TXB_2 into the brain extracellular space after 15 min of complete global ischemia in the presence and absence of cyclooxygenase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988, **8**:790
- 9 Moskowitz MA, Coughlin SR. Basic properties of the prostaglandins: current concepts of cerebrovascular disease-stroke. *Stroke*, 1981, **12**:696

EFFECTS OF BUTYLPHTHALIDE ON EXTRACELLULAR 6-KETO-PGF_{1α}, TXB₂ AND 6-KETO-PGF_{1α}/TXB₂ RATIO IN 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 3-*n*-butylphthalide(NBP) on the levels of 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ ratio were studied with methods of RIA. *d*-NBP and *l*-NBP(0.1~100 μmol·L⁻¹) concentration-dependently increased 6-keto-PGF_{1α} release, decreased TXB₂ release from neuronal cells, and significantly enhanced extracellular 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ ratio in primary cultured rat cortical neurons exposed to hypoxic-hypoglycemic media for 5 h or hypoxic-hypoglycemic media for 5 h following normal media for 3 h. Aspirin(0.1~100 μmol·L⁻¹) was also shown to inhibit TXB₂ release from cortical neurons in a dose-dependent manner. However aspirin only increased 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ ratio at low dose because aspirin inhibited both 6-keto-PGF_{1α} and TXB₂ release simultaneously at large dose(10~100 μmol·L⁻¹). This suggests that the action of *l*-NBP, *d*-NBP and *dl*-NBP on the increase of 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ ratio might be one of the mechanisms in which NBP enhanced focal cerebral blood flow and improved ischemic brain damage.

KEY WORDS 3-*n*-Butylphthalide; Cell culture; Aspirin; Prostacyclin; Thromboxane B₂