

MK801慢性处理引起皮层神经元³H-GABA 释放的改变

施李正 钮心懿

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所 100050,北京)

某些急性和慢性神经退行性病变及精神紊乱与兴奋性氨基酸(EAAs)有关^[1]。因此,发展专一性强、效能高并毒性低的兴奋性氨基酸拮抗剂对进一步了解受体的分布性质和功能,以及它们的致病机理,均有重要的理论和应用价值。近年来,有报道用犬尿酸(一种 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体甘氨酸位点的非特异性拮抗剂)处理海马神经元能增加其对神经毒性的敏感性,兴奋性增加表现出癫痫样活动。整体的研究也有长期使用受体拮抗剂后,急性撤药增加神经元的兴奋性的报道^[2]。1992年 Williams 用¹²⁵I-MK801放射配基结合分析证明 MK801和 AP₅慢性处理神经元可以使 NMDA 受体的数目上调^[3]。我们在大鼠皮层神经元原代培养模型上,以谷氨酸(Glutamate)介导的³H 标记的 γ -氨基丁酸(GABA)释放作为神经元释放递质功能的指标,研究 MK801慢性处理后神经元的功能的改变。

大鼠皮层神经元的原代培养方法参照 Dichter 的方法稍作改动^[4]。培养细胞的 EAAs 受体的功能以³H-GABA 释放作为指标,参考 Weiss 的方法稍作改进^[5,6]:12孔板去除培养基后,用平衡缓冲液(balanced buffer solution(BBS;单位 mmol·L⁻¹): NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄8.0, KH₂PO₄1.5, MgCl₂0.5, CaCl₂0.9, Glucose 5.5)洗两次,用含 0.1 μ mol·L⁻¹³H-GABA 的 BBS 37℃ 水浴温孵 20 min, BBS 中含 10 μ mol·L⁻¹ 氨氧乙酸和 1 μ mol·L⁻¹ β -丙氨酸,温孵后用 BBS 洗三次,驱除多余的³H-GABA,加入 0.6 ml BBS,每5分钟收集一次温孵液,再补入同量的 BBS,共收集五次。前三次未加 EAAs 时,测得的³H-GABA 放射性强度 DPM 为自发基础释放,第四次加入 1 mmol·L⁻¹ Glu 作为刺激释放,最后用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 0.6 ml 消化细胞,将消化液也收集。将每次的收集液及消化液各取 50 μ l 点在玻璃纤维膜上,干燥后加入 5 ml Triton-X100-甲苯闪烁液液闪计 DPM。培养细胞谷氨酸受体的功能效应的评价以(第四次的 DPM—前三次释放的 DPM 平均值)/消化液的 DPM×100% 作为指标。数据以均数±标准差表示,用 *t* 检验方法作显著性检验, *P*<0.05 定为显著差别(*)。

首先确定收集液的³H-GABA 纯度,方法如下:未标记的 GABA(约 10 mmol·L⁻¹)点在硅胶板上,然后将 10 μ l 收集液点在未标记的 GABA 相同的点膜位置。流动相用正丁醇:冰乙酸:水(4:1:1)展开约 1 h 后,用碘蒸气显色,把显色部位刮下,碾细放入计数瓶中加入 5 ml Triton-X100 甲苯闪烁液液闪计 DPM,求收集液点硅胶板的 DPM 与直接点膜的 DPM 的百分比(I)。相同的方法把标准³H-GABA(0.01 μ mol·L⁻¹)分别点膜和硅胶板,求标准³H-GABA 点硅胶板 DPM 和点膜 DPM 的百分比(II)。估算收集液中的³H-GABA 的纯度为百分比(I)/百分比(II)×100%。用薄层层析的方法,10 μ l 收集液层析后的计数为点膜计数的 83.15±17.98%(*n*=5),标准(0.01 μ mol·L⁻¹)³H-GABA 液层析后的计数是点膜计数的 89.34±9.86%(*n*=3)。故约大于 93% 的计数是³H-GABA。收集液中的同位素为³H-GABA。

在14天培养细胞上谷氨酸引起的 ^3H -GABA释放随浓度增加而增加,如图1所示。从第8天开始实验,约第11~12天 ^3H -GABA释放达到峰值,第14天释放下降,且保持基本稳定到第18天。如图2所示。

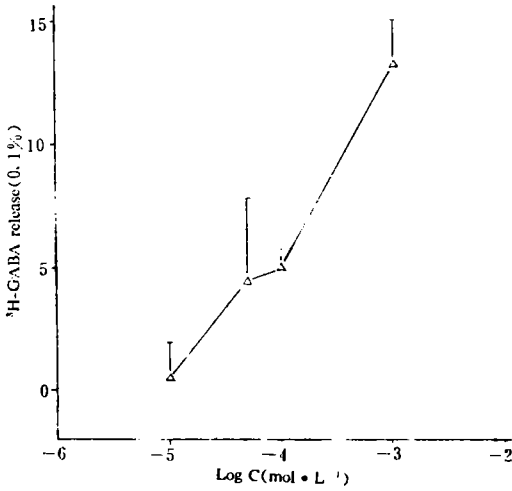


Fig 1 Concentration dependence of glutamate-evoked ^3H -GABA release from rat cortical neurons in primary culture (14th day *in vitro* $n=3$ sister cultures).

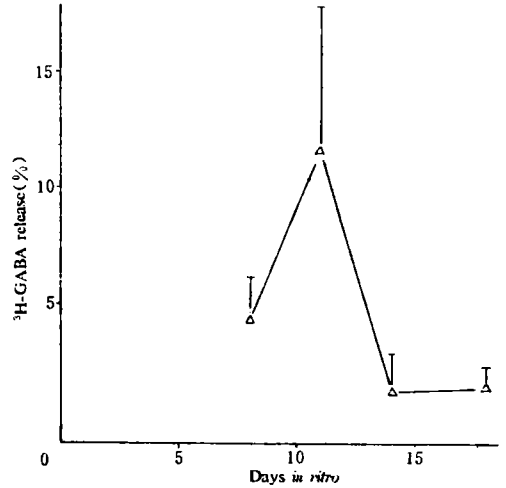


Fig 2 Time dependence of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glutamate-evoked ^3H -GABA release from rat cortical neurons in primary culture ($n=3$ sister cultures). It suggests the cultured mature neurons (from 14th to 18th day in culture) have almost stable glutamate-evoked ^3H -GABA release.

从第14天开始用 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK801处理4天后, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸引起的 ^3H -GABA释放比非处理组显著增加(非处理组 $2.174 \pm 1.40\%$;处理组 $7.63 \pm 1.92\%$ $P < 0.05$);高钾刺激($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl)引起 ^3H -GABA释放则无显著差别,结果见表1。

Tab 1 Increase of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glutamate-evoked ^3H -GABA release ($P < 0.05$) contrast to the effect of $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ after MK801 pretreatment for 4 days *in vitro*.

Control	Glu-evoked	Control	KCl-evoked
2.17 ± 1.40	$7.63 \pm 1.92^*$	3.67 ± 2.53	3.12 ± 2.15

本实验提示 MK801慢性处理后的大脑皮层培养细胞上谷氨酸受体存在功能上调现象,并与存在谷氨酸受体介导的神经毒作用增加的现象(结果待发表)有一定的关系。这为进一步探讨兴奋性氨基酸受体拮抗剂在将来的临床试用中可能发生的不良反应提供基础。

关键词 MK801; γ -氨基丁酸

参 考 文 献

- 1 Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, 1990,11:379
- 2 McDonald JW, Sivelstein FS, Johnston MV. MK801 pretreatment enhances *N*-methyl-*D*-aspartate-mediated brain injury and increases brain *N*-methyl-*D*-aspartate recognition binding in rats. *Neuroscience*, 1990,S38:103
- 3 Wolliams K, Dichter MA, Molinoff PB. Up-regulation of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors on cultured cortical neurons after exposure to antagonists. *Mol Pharmacol*, 1992,42:147
- 4 Dichter MA. Rat cortical neurons in cell-culture methods, cell morphology, electrophysiology and synapse formation. *Brain Res*, 1978,149:279
- 5 Weiss S, Kemp DE, Baucé L *et al.* Kainate receptors coupled to evoked release of ^3H - γ -aminobutyric acid from striatal neurons in primary culture; potentiation by lithium ions. *Mol Pharmacol*, 1990,38:229
- 6 Weiss S. Excitatory amino acid-evoked γ - ^3H -aminobutyric acid from striatal neurons in primary culture. *J Neurochem*, 1988,51:433

INCREASE OF ^3H -GABA RELEASE FROM RAT CULTURED CORTEX NEURONS AFTER CHRONIC EXPOSURE TO MK801

LZ Shi and XY Niu

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

ABSTRACT Excitatory amino acids are involved in acute and chronic neurodegenerative diseases. Little is known about the potential consequences of chronic blockade of NMDA receptors (one subtype of excitatory amino acid receptors). Receptor function measured as ^3H -GABA release in culture media after pretreatment with MK801 was studied in rat cortical neurons in primary cultures. Cultured neurons were exposed to $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MK801 for 4 days since the 14th day. Glutamate ($1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) evoked ^3H -GABA release was shown to be significantly increased (control $0.2174\% \pm 1.40\%$; MK801 treatment $0.763\% \pm 0.192\%$). KCl $40\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ stimulation showed no such effect. This result suggests that the NMDA receptor function of releasing neurotransmitters changed after chronic treatment with noncompetitive antagonists.

Key words MK801; ^3H -GABA