

脑活素激发细胞内钙升高介导大鼠皮质神经元死亡

欧阳颖¹, 林穗珍¹, 李晓瑜¹, 颜光美², 杜敏联¹

(中山大学 1. 附属第一医院儿科; 2. 中山医学院药理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要 【目的】探讨脑活素对原代培养大鼠大脑皮质神经元的作用及机制。【方法】采用原代培养的胎鼠大脑皮质神经元, 观察脑活素对大脑皮质细胞形态学及生存的影响, 用FDA/PI 染色法测定细胞生存率, 并用Fluo-3/AM 与带有自动加样装置的荧光成像 96 孔板测量仪测定细胞内钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的变化。【结果】脑活素为 0、0.1、1.0、2.5、5.0、10 mL/L 时, 其存活率分别为 100%、43% ± 3%、38% ± 5%、32% ± 3%、22% ± 2%、19% ± 1%。地佐环平 (MK-801) 预处理后, 其存活率分别为 91% ± 4%、76% ± 5%、75% ± 3%、58% ± 5%、54% ± 3%、50% ± 4%, 可保护脑活素的神经毒性。同时脑活素浓度依赖性地触发细胞内钙浓度升高, 而 MK-801 可降低脑活素导致的细胞内钙浓度的升高。【结论】脑活素对原代培养的大鼠大脑皮质神经元具有毒性作用, 其机制是通过升高细胞内钙介导的。

关键词: 脑活素; 神经毒性; 皮质神经元; 大鼠

中图分类号: R994.1; R971

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)06-0528-04

Cerebrolysin Induces Cultured Rat Cortical Neuronal Death by Increasing Intracellular Calcium

OUYANG Ying¹, LIN Sui-zhen¹, LI Xiao-yu¹, YAN Guang-mei², DU Min-lian¹

(1 Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, 2. Department of Pharmacology, SUN Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of cerebrolysin on primary cultured rat cortical neurons and its mechanisms of action. 【Methods】Primary cultured rat cortical neurons were exposed to cerebrolysin and the survival of cells were observed. The neuronal survival was detected by fluorescein diacetate/propidium iodide (PI) staining. The intracellular $[Ca^{2+}]_i$ was measured by using the fluorometric light imaging plate reader (FLIPR) with calcium indicator Fluo3/AM. 【Results】Cerebrolysin induced the death of cortical neurons in a dose-dependent manner. At the concentration of 0, 0.1, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 mL/L the survival percentages were 100%, 43% ± 3%, 38% ± 5%, 32% ± 3%, 22% ± 2% and 19% ± 1%, respectively. Pretreatment with MK-801, a non-competitive excitatory amino acid receptor antagonist, the survival percentages were 91% ± 4%, 76% ± 5%, 75% ± 3%, 58% ± 5%, 54% ± 3% and 50% ± 4%, respectively. Cerebrolysin elevated $[Ca^{2+}]_i$ in a concentration-dependent pattern. MK-801 significantly attenuated the rise of $[Ca^{2+}]_i$ induced by cerebrolysin. 【Conclusion】The neurotoxicity of cerebrolysin on primary cultured rat cortical neurons is mediated by elevating the intracellular $[Ca^{2+}]_i$.

Key words: cerebrolysin; neurotoxicity; cortical neurons; rat

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(6): 528 ~ 531]

收稿日期: 2003-06-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770782); 广东省自然科学基金资助项目 (970052)

作者简介: 欧阳颖 (1971-), 女, 湖南娄底人, 医学硕士, 医师, 现在中山大学附属第二医院儿科 (510120); 林穗珍, 硕士生导师, 课题负责人. E-mail: ooying@163.net

脑活素是一种猪脑蛋白水解物,含85%游离氨基酸和15%小分子多肽的水溶液,在我国广泛应用于脑血管疾病、老年性痴呆、新生儿缺氧缺血性脑病和脑瘫等,然而其疗效并未得到国际公认。近年来其不良反应的报道日益增多^[1],已报道的副作用有过敏性休克、针刺样疼痛、诱发癫痫和神经精神症状等。同时亦有报道指出脑活素可诱导体外培养大鼠小脑颗粒神经元死亡^[2]。本实验首次通过检测大鼠皮质细胞存活率,细胞内钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)的变化,探讨脑活素对原代培养大鼠大脑皮质神经元的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 孕18 d母鼠,由中山大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 脑活素(cerebrolysin)为奥地利EBEWE 大药厂产品(批号706449)。Pauks saline A液、神经细胞基础培养基DMEM液和B27无血清添加剂购于美国GIBCO公司,二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)、碘化丙啶(propidium iodide, PI), MK-801, 6, 7-dinitroquinoxaline-2, 4-dione(DNQX) 购于Sigma公司。Fluo3/AM 购于Molecular Probes(USA)公司。

1.2 方法

1.2.1 大脑皮质神经元的培养 取孕18d SD胎鼠大脑皮质,经浓度为0.5 g/L胰酶消化后,加入0.5 g/L胰酶抑制剂和50 mg/L DNA酶以终止消化,离心去上清,细胞在Pauks Saline A液中上下吹打,再离心去上清,将细胞加入含体积分数10%胎牛血清的神经元基础培养基内,以 0.6×10^6 /L的密度种植在包被好的培养皿中,细胞培养在体积分数5% CO₂、37℃的培养箱中。为使神经元纯化,抑制胶质细胞的生长,在种植48~72 h后,更换含有B27(50×,体积分数为0.02)的无血清培养基。培养基中不加任何抗生素^[3]。

1.2.2 双染色法检测神经元存活率 神经元体外培养8 d后,予脑活素处理24 h,去掉培养液,加入染活细胞的FDA 10 mg/L,荧光下呈绿色和染死细胞的PI 4 mg/L,荧光下呈红色。温育5 min,用PBS液清洗细胞2次,然后用倒置荧光显微镜(NiKong diaphot)观察细胞的生存与死亡情况。每

个样本随机拍照16个低倍视野后,由未知者分别计活细胞数目,并按下列公式计算神经元的存活率(rate of neuronal survival)。存活率=(各组细胞数÷对照组活细胞数)×100%^[4]。

1.2.3 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定 采用96孔板培养了8 d的大脑皮质细胞,加入5 μmol/L Fluo3/AM 荧光探针,在细胞培养箱内负载45 min后,用缓冲液(140 mmol/L NaCl; 5 mmol/L KCl; 10 mmol/L Glucose; 1.8 mmol/L CaCl₂; 0.4 mmol/L NaH₂PO₄; Hepes 10 mmol/L; Glycine 10 μmol/L),洗涤3次,放在带有自动加样装置的荧光成像96孔板测量仪上(Fluorometric Light Imaging Plate Reader (FLIPR, Molecular Devices)),自动运行,记录细胞基础内钙离子的浓度后,自动加样并立即测量,每秒记录一次荧光值,60 s后每6 s记录1次荧光值,实时测量细胞内钙离子浓度。激发波长为485 nm的FLIPR 激光,采用荧光强度值(fluorescence intensity unit, FIU)代表细胞内钙离子的浓度^[5]。

1.2.4 实验分组 神经元存活率检测分3组:脑活素组、脑活素加MK-801组、脑活素加DNQX组,每组16孔。 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定分2组:脑活素组、脑活素加MK-801组,每组16孔。每个实验重复3次以上。实验时间为2000年4月至2001年2月。

1.3 统计学分析处理

测量数据为 $\bar{x} \pm s$,显著性检验用ANOVA,随后SNK-*q*检验,或配对*t*检验(SPSS7.0统计软件包)。

2 结果

2.1 脑活素剂量依赖性地诱导大鼠大脑皮质神经元死亡

在培养了8 d的大脑皮质神经元培养液中,分别加入不同浓度的脑活素(0~10 mL/L),24 h后在倒置显微镜下观察,结果发现脑活素处理过的神经元剂量依赖性地出现细胞肿胀,胞体膨大,胞体内可见黑色小颗粒,神经突触网络逐渐断裂和消失,细胞数目减少,存活率降低。双染色法检测神经元存活率,脑活素浓度为0为对照组,在脑活素为0.1、1.0、2.5、5.0和10 mL/L时,其存活率分别为43%±3%、38%±5%、32%±3%、22%±2%和19%±1%(图1)。

2.2 MK-801和DNQX对脑活素毒性的影响

用上述神经元加入 MK-801 (5 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 10 min 后,加入不同剂量的脑活素(0 ~ 10 mL/L),其存活率分别为 91% \pm 4%、76% \pm 5%、75% \pm 3%、58% \pm 5%、54% \pm 3%、50% \pm 4% ,细胞存活率明显高于脑活素作用组($P < 0.001$),而 DNQX (10 $\mu\text{mol/L}$) 则无明显保护作用(图 1、2)。

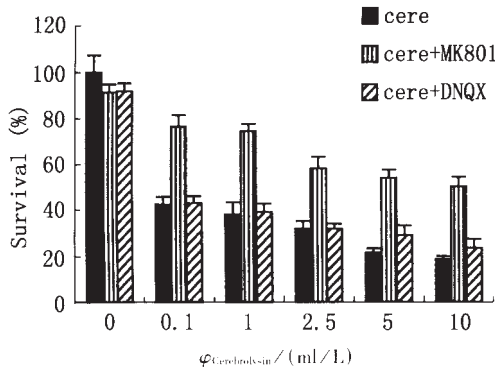


图 1 脑活素的神经毒性及 MK-801 和 DNQX 的影响
Fig. 1 Effects of MK-801 and DNQX on neurotoxicity induced by cerebrolysin

Cere + MK801 groups compared with another two groups respectively $P < 0.001$

2.3 NMDA 对脑皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

在体外培养 8 d 的大脑皮质细胞培养液中加入不同浓度 NMDA(5、10、50 $\mu\text{mol/L}$), 20 s 内即

可检测到 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 达高峰, 随时间延长, 呈逐渐下降趋势。加入 NMDA 非竞争性受体拮抗剂 MK-801(5 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 10 min 可以明显阻滞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高(表 1)。

表 1 NMDA 剂量依赖性升高大脑皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及 MK-801 的阻滞作用

Table 1 NMDA elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a concentration-dependent pattern and MK-801 significantly attenuated the rise of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by NMDA. Comparison among NMDA groups with different concentration (FIU, $\bar{x} \pm s$)

NMDA concentration	n	NMDA	NMDA + MK801	t	P
Control group	16	229 \pm 21	238 \pm 31	0.96	> 0.05
5 $\mu\text{mol/L}$	16	2 035 \pm 31	245 \pm 109	22	< 0.001
10 $\mu\text{mol/L}$	16	4 013 \pm 31	580 \pm 152	88	< 0.001
50 $\mu\text{mol/L}$	16	4 719 \pm 54	715 \pm 137	108	< 0.001

2.4 脑活素迅速升高大脑皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及 MK-801 的影响

用上述神经元,加入不同浓度脑活素(0.1、1、5、10 mL/L), 动态观察 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度, 20 s 内即可观察到 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高, 达到高峰, 随时间延长逐渐降低, 但 6 min 时仍明显高于正常。加入 NMDA 非竞争性受体拮抗剂 MK-801(5 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 10 min 可以部分阻滞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高(表 2)。

表 2 脑活素诱发大脑皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高及 MK-801 的部分阻滞作用

Table 2 Cerebrolysin elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and MK-801 partially attenuated the rise of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by cerebrolysin (FIU, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	0 mL/L	0.1 mL/L	1 mL/L	5 mL/L	10 mL/L
Cerebrolysin	16	239 \pm 26	5 731 \pm 162	10 570 \pm 47	11 712 \pm 47	11 691 \pm 42
Cerebrolysin + MK801	16	260 \pm 32 ¹⁾	4 610 \pm 53 ²⁾	6 089 \pm 61 ²⁾	7 267 \pm 173 ²⁾	8 247 \pm 201 ²⁾

1) Compared with cerebrolysin group, $P > 0.05$; 2) compared with cerebrolysin group at the same concentration, $P < 0.001$

3 讨论

脑活素(又称脑蛋白水解物)内含约 85% 游离氨基酸和 15% 小分子多肽, 相对分子质量小于 10 000, 含量为 215.2 g/L, 溶剂为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液。有学者认为其具有改善脑代谢, 活化神经细胞, 促进记忆, 改善思维障碍的作用^[6]。体外实验报道脑活素具有类似神经营养因子作用, 在鸡胚皮质神经元的培养液中加入 0 ~ 6.4

g/L 的脑活素培养 8 d, 可剂量依赖性地保护碘乙酸诱导的皮质神经元迟发性死亡^[7]; 而在研究以脑活素保护胆红素的神经毒性时, 结果发现脑活素除加重胆红素毒性外, 并呈剂量时间依赖性地诱导大鼠小脑颗粒细胞死亡^[8]。王春艳等^[9]为了探讨脑活素的神经营养作用, 在脑胶质瘤体外培养细胞系中加入不同浓度的脑活素, 结果发现随着脑活素剂量的增大, 细胞存活率降低。本实验中发现脑活素对大脑皮质神经元存在剂量依赖性的毒性作用, 与上述实验结果相符。上述两种不同的实验结果, 可能

为鸡胚神经元与大鼠皮质细胞存在种属上的差异所致,但大鼠与人在种系发生上更为接近。

合理浓度的谷氨酸在神经系统的发育中起着重要作用,对神经元的迁移及突触的可塑性进行复杂的调控,能提高体外培养的小脑颗粒细胞的存活率,此种作用与神经元所处的成熟阶段有关^[10]。但细胞外液高浓度的谷氨酸将使神经元过度兴奋并导致损伤。在哺乳动物脑内至少存在5种兴奋性氨基酸受体类型:N-甲基-D-天冬氨酸型(NMDA), α -氨基羟甲基恶唑丙酸型(AMPA),海人藻酸型(KA),L-2-氨基磷酸基丁酸型(L-AP4)及亲代谢型。本实验中在加入兴奋性氨基酸NMDA型非竞争性受体拮抗剂MK-801预处理后,再加入不同浓度的脑活素(0.1~10 mL/L),可以很好地消除脑活素的毒性作用,说明脑活素的神经毒性部分是通过兴奋性氨基酸所介导的。非NMDA型受体拮抗剂DNQX保护性作用不明显,考虑脑活素主要通过激活NMDA型受体而起作用。

细胞内钙超载被认为是细胞死亡的最后共同通路^[11]。对脊椎动物的多数细胞来说, $[Ca^{2+}]_i$ 的升高主要依赖于胞外钙经钙通道内流和/或胞内储存钙的释放。神经细胞上的钙通道主要分为:①配体门控性或化学门控性离子通道;②电压门控性离子通道。配体门控性通道主要有NMDA受体通道,对谷氨酸起反应而开放。本研究发现脑活素可诱导大鼠大脑皮质神经元死亡,部分是通过激动NMDA受体起作用,而NMDA受体为配体门控性钙通道受体,因此推测脑活素可触发 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,而实验结果亦证实这一点。本实验中MK-801可以完全阻滞不同浓度的NMDA所介导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,而只能部份阻滞脑活素诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,也说明脑活素除了通过激动NMDA受体钙通道外,还激动其他钙通道而升高 $[Ca^{2+}]_i$ 引起神经元死亡。

脑活素在儿科主要应用于新生儿缺氧缺血性脑病,而新生儿血脑屏障尚未完善,缺氧缺血性脑病急性期,血脑屏障受到损伤,通透性升高,应注意

其毒副作用。

(本文图2见插页2. Fig. 2 shown in back coloured page 2)

参考文献:

- [1] 张恒,陈保东. 脑活素的不良反应[J]. 中国药事, 1998, 12(4): 247.
- [2] 李晓瑜,欧阳颖,林穗珍,等. 脑活素诱导体外培养神经元死亡的研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(2): 104.
- [3] Dildy J E, Leslie S W. Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells[J]. Brain Res, 1989, 499(2): 383.
- [4] Yan G M, Lin S Z, Irwin R P, et al. Activation of muscarinic cholinergic receptor blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons[J]. Mol Pharmacol, 1995, 47(2): 248.
- [5] Sullivan E, Tucker E M, Dale I L. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ using the fluorometric imaging plate reader (FLIPER) [J]. Methods Mol Biol, 1999, 114(1): 125.
- [6] 张骁,束梅英. 脑活素的药理作用临床应用及市场前景[J]. 中国药理学报, 1997, 3(3): 178.
- [7] Hutter Paier B, Steiner E, Windisch M. Cerebrolysin protect isolated cortical neurons from neurodegeneration after brief histotoxic hypoxia[J]. J Neural Transm, 1998, 53 (suppl): 351.
- [8] 李晓瑜,欧阳颖,林穗珍. 脑活素对原代培养大鼠小脑颗粒神经元影响的研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2000, 8(15): 464.
- [9] 王春艳,王广秀. 脑活素对体外培养脑胶质瘤细胞的作用[J]. 天津医科大学学报, 1997, 3(2): 22.
- [10] Yan G M, Ni B, Weller M, et al. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons[J]. Brain Res, 1994, 656(1): 43.
- [11] Choi D W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death[J]. Trends Neurosci, 1995, 18(2): 58.

(编辑 张恩健)

脑活素激发细胞内钙升高介导大脑皮质神经元死亡 (正文见第 528 页)
 Cerebrolysin Induces Cultured Rat Cortical Neuronal Death by Increasing Intracellular Calcium (Text in page 528)

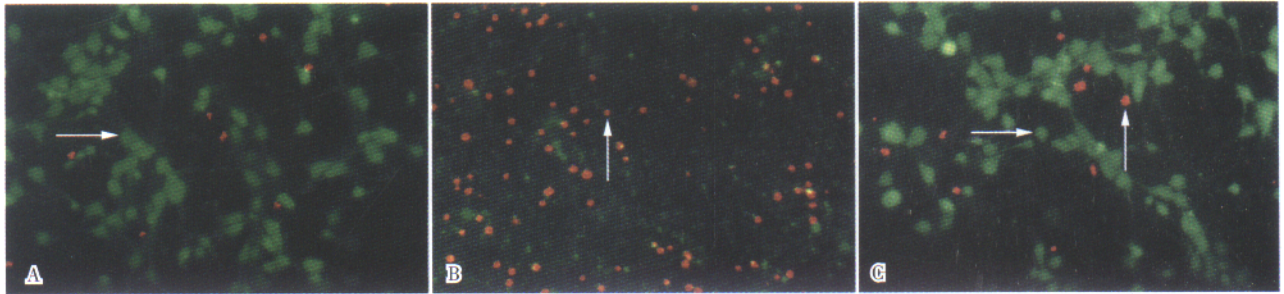


图 2 脑活素的神经毒性及 MK-801 的保护作用

Fig. 2 Neuroprotection of MK-801 on neurotoxicity induced by cerebrolysin

A: Control; B: Cerebrolysin 10 mL/L; C: MK-801 + Cerebrolysin) 10 mL/L). →: living cells were stained green; ↑: dead cells were stained red. (×400)

高纯度分离子宫内膜腺上皮及间质细胞和体外培养技术 (正文见第 589 页)
 A Method to Isolate and Culture Highly Purified Populations of Glandular Epithelial and Stromal Cells from Human Endometrial Specimens (Text in page 589)

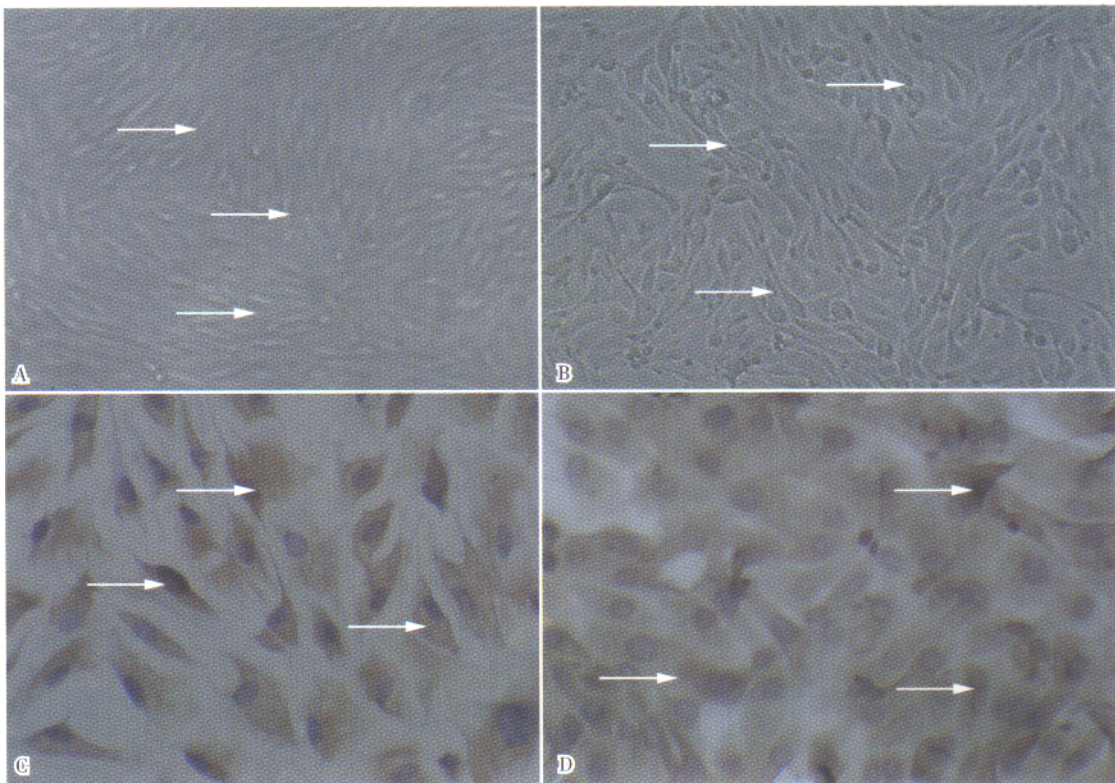


图 1 培养 5 天的子宫内膜细胞

Fig.1 Primary endometrial cells cultured for 5 d

A: Primary endometrial stromal cells inverted microscopy (×100); B: Primary endometrial epithelial cells inverted microscopy (×100); C: Endometrial stromal cells show positive immunocytochemistry stain for vimentin (×200); D: Endometrial epithelial cells show positive immunocytochemistry stain for keratin (×200)