

·论著·

胆红素诱导原代培养神经细胞内
 Ca^{2+} 含量的变化及 MgSO_4 的拮抗作用

贡晓明¹, 秦玉明¹, 陈舜年², 孙安阳³, 吴圣楣¹

(1. 上海第二医科大学附属新华医院儿科研究所, 上海 200092; 2. 上海第二医科大学附属瑞金医院儿科, 上海 200025; 3. 上海医科大学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

[摘要] 目的 探讨胆红素诱导原代培养神经细胞内 Ca^{2+} 含量的变化, 以及 MgSO_4 的拮抗作用。方法 采用胎鼠大脑皮层细胞作原代神经细胞培养, 观察 100 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素对不同成熟程度神经细胞内 Ca^{2+} 含量的影响。原代培养神经细胞经 Fura - 2/AM 负载, 荧光图像分析测定细胞内 Ca^{2+} 含量。结果 未成熟神经细胞(培养2天)暴露于 100 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素 4 h, 细胞内 Ca^{2+} 从 75.3 nmol 增加到 320.8 nmol; 继续暴露 4 h, 细胞内 Ca^{2+} 增加到 400.7 nmol; 去除胆红素暴露, 细胞内 Ca^{2+} 不能逆转。成熟神经细胞(培养8天)暴露于 100 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素 4 h, 细胞内 Ca^{2+} 从 70.6 nmol 增加到 150.8 nmol; 继续暴露 4 h, 细胞内 Ca^{2+} 不再增加; 去除胆红素暴露, 细胞内 Ca^{2+} 浓度可显著降低。培养液中 Mg^{2+} 加至 2 mmol/L 可减轻胆红素诱导的神经细胞内 Ca^{2+} 含量变化。结论 胆红素可诱导原代培养的、未成熟的神经细胞 Ca^{2+} 超载, MgSO_4 可拮抗胆红素诱导的神经细胞 Ca^{2+} 超载。

[关键词] 胆红素; 原代神经细胞培养; 钙离子; 硫酸镁; 鼠

[中图分类号] R - 332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2000)04 - 0241 - 03

Bilirubin - induced Increase in Intracellular Ca^{2+}
in Primary Cultured Neurons and the Reversible Effect of MgSO_4

BEN Xiao-Ming, QIN Yu-Ming, CHEN Shun-Nian, et al.

Pediatric Research Institute, Shanghai Xinhua Hospital, Shanghai 200092, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of bilirubin on intracellular Ca^{2+} of cerebral cortex neurons and the therapeutic effect of MgSO_4 . **Methods** Cerebral cortical neurons were cultured from the embryonic rat brain. The free cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of the cultured neurons was determined with a fluorescent Ca^{2+} chelator (Fura - 2) after exposure of the neurons to different concentrations of bilirubin. **Results** Immature neurons (neurons cultured for only 2 days) responded within 4 hours to 100 mmol bilirubin by an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 75.3 nmol to 320.8 nmol, an increase that during another 4 hours of exposure reached to 400.7 nmol. This increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ could not be reversed by the removal of bilirubin. In contrast to these findings, mature neurons (8 days in culture) exhibited only a small increase (from 70.6 nmol to 150.8 nmol) in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ within 4 hours after the exposure to 100 mmol bilirubin, and this rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tended to decline on the following prolonged 4-hour exposure to bilirubin. Moreover, after the removal of bilirubin, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was partially reversible. The N - methyl - D - aspartate (NMDA) receptor antagonists MgSO_4 could significantly block the response. **Conclusions** Bilirubin can induce an increase in intracellular Ca^{2+} in primary cultured cerebral cortex neurons and the change can be partially reversed by NMDA receptor antagonists MgSO_4 .

Key words: Bilirubin; Primary cultured neuron; Calcium; MgSO_4 ; Rat

[收稿日期] 2000 - 03 - 08; [修回日期] 2000 - 06 - 15
[基金项目] 上海科学技术发展基金项目(954119025)
[作者简介] 贡晓明(1966 -), 男, 博士, 主治医师。

新生儿高胆红素血症是新生儿临床常见病症,并发胆红素脑病可致新生儿死亡,幸存者常留下神经系统后遗症,合理科学防治胆红素脑病对于优生优育有重要价值。近年来研究表明 N - 甲基 - D - 天冬氨酸(N - Methyl - D - Aspartate, NMDA)受体过度活化参与介导胆红素脑病发生^[1],为进一步探讨 NMDA 受体活化后信息传导机制及其防治措施,我们观察了胆红素诱导的神经细胞内 Ca^{2+} 含量的变化,以及 NMDA 受体拮抗剂 MgSO_4 的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 神经细胞原代培养

参照 Mcdonaod 方法^[2],取 3 w 胎龄胎鼠脑组织,立即置于冰冷 Hank's 液中($\text{pH} = 7.4$),仔细剔除软脑膜及血管,用 Hank's 液冲洗 3~4 次;取皮层切碎,加入 0.125 % 胰蛋白酶液,于 37℃ 水浴中用吸管轻轻吹打,以进一步分离细胞,然后以冰冷的 DMEM 培养液(Gibco 公司)加 10 % 小牛血清终止消化,过 200 目筛网,滤液以 1500 r/min 离心 5 分钟,弃上清,沉淀以 Hank's 液洗一次,加 DMEM 培养液,调整加样量至悬浮神经细胞计数 $10^4 \sim 10^5/\text{ml}$ 。取 1 ml 细胞悬液加 3 ml DMEM 培养液与 0.5 ml 10 % 小牛血清于培养板,置 5 % CO_2 培养箱 37℃ 孵育。

1.2 胆红素神经毒性诱导与 MgSO_4 拮抗

1.2.1 胆红素配制 参照 Amit 方法^[3],避光称取晶体胆红素(Sigma 公司)5.865 mg($10 \mu\text{mol}$)溶于 1 ml 0.5 M NaOH 中,加入双蒸水 9 ml,用 0.5 M HCl 调节 pH 至 8.5,配制胆红素溶液($1 \mu\text{mol}/\text{ml}$)。

1.2.2 胆红素神经毒性诱导 上述胆红素溶液 0.5 ml 分别加入培养 2 天、培养 8 天的神经细胞中(胆红素浓度 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$) 孵育 4 h,8 h 后检测细胞内 Ca^{2+} ;神经细胞在 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 胆红素环境中孵育 8 h 后去除胆红素暴露,4 h 后检测细胞内 Ca^{2+} 。

1.2.3 MgSO_4 拮抗 在上述培养板中加入胆红素的同一时间,加入 0.24 % MgSO_4 0.5 ml(培养液中 Mg^{2+} 浓度为 2 mmol/L),孵育 4 h,8 h 后检测细胞内 Ca^{2+} 。

1.3 细胞内 Ca^{2+} 浓度检测

1.3.1 Fura - 2/AM 配制 Fura - 2/AM(Sigma 公司)用二甲亚砜(DMSO)配成 0.25 mmol/L 贮备液,分装 - 20℃ 避光保存。

1.3.2 神经细胞 Fura - 2/AM 负载 参照 Murphy 方法^[4],上述时间点培养板中加入 0.125 % 胰蛋白酶液 0.1 ml,脱落贴壁神经细胞,1500 r/min 离心 5

min,弃上清,沉淀以 Hank's 液洗一次,加 DMEM 培养液,调整加样量至悬浮神经细胞计数 $10^5 \sim 10^6/\text{ml}$ 。取细胞悬液 2.5 ml,加 Fura - 2/AM 液 100 μl ,置于 5 % 的 CO_2 培养箱中,37℃ 孵育 45 分钟。细胞悬液于 1000 r/min 离心 5 分钟,弃上清,Hank's 液洗涤 2 次后再用 Hepe - Hank's 液悬浮。

1.3.3 神经细胞内 Ca^{2+} 荧光检测 参照 Uematsu 方法^[5],取少许细胞悬液于洁净玻片上,在荧光显微镜下观察神经元细胞,用荧光图像扫描仪检测单个细胞荧光强度,激发波长 340 nm 和 380 nm,发射波长 505 nm,利用 F340 nm/ F380 nm 比值估价细胞内 Ca^{2+} 强度,通过 F340 nm/ F380 nm 与 Ca^{2+} 浓度标准曲线计算单个细胞内 Ca^{2+} 浓度。每个视野检测 10 个细胞,每个样本检测 5 个视野,统计 50 个细胞内 Ca^{2+} 均值与标准差。

1.4 统计学处理

分析资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有分析用计算机操作,使用国际通用的 SPSS 软件系统,进行方差分析与 t 检验。

2 结果

2.1 荧光显微镜下神经元胞体内 Ca^{2+} 荧光图

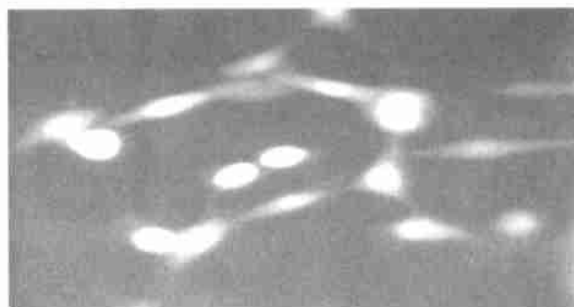


图1 荧光显微镜下神经元胞体内 Ca^{2+} 荧光图

Fig 1. Fluorescent image of cytosolic Ca^{2+} in neurons

2.2 不同成熟状态下神经元胞体内 Ca^{2+} 含量

培养 2 天的未成熟神经细胞暴露于 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 胆红素 4 h,细胞内 Ca^{2+} 均值从 75.3 nmol 增加到 320.8 nmol;继续暴露 4 h,细胞内 Ca^{2+} 增加到 400.7 nmol;去除胆红素暴露,细胞内 Ca^{2+} 不能逆转(表 1)。

培养 8 天的成熟神经细胞暴露于 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 胆红素 4 h,细胞内 Ca^{2+} 均值从 70.6 nmol 增加到 150.8 nmol;继续暴露 4 h,细胞内 Ca^{2+} 不再增加;去除胆红素暴露,细胞内 Ca^{2+} 浓度可显著降低(表 1)。

培养液中 2 mmol/L Mg^{2+} 可显著减少胆红素

诱导的神经细胞内 Ca^{2+} 含量变化(表 2)。

表 1 不同时间、不同状态下神经细胞内 Ca^{2+} 含量

Table 1. Cytosolic Ca^{2+} concentration in different cultured neurons (nmol, $\bar{x} \pm s$)

组别	培养 2 d	培养 8 d
对照组	75.3 $\pm$ 18.5	70.6 $\pm$ 16.5
暴露胆红素后 4 h 组	320.8 $\pm$ 26.3 ^{a,b}	150.8 $\pm$ 22.9 ^{a,c}
暴露胆红素后 8 h 组	400.7 $\pm$ 21.7 ^a	142.9 $\pm$ 28.7 ^{a,c}
去除胆红素后 4 h 组	393.4 $\pm$ 42.3 ^a	112.3 $\pm$ 26.5 ^{a,b,c}

注:a:与对照组比较 $P < 0.05$; b:与暴露胆红素后 8 h 组比较 $P < 0.05$; c:同组间比较 $P < 0.01$

表 2 MgSO_4 对神经细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

Table 2. The effects of MgSO_4 on cytosolic Ca^{2+} in cultured neurons (nmol, $\bar{x} \pm s$)

组别	未加 MgSO_4	加 MgSO_4	t 值
培养 2 d 神经细胞暴露胆红素后 4 h	320.8 $\pm$ 26.3	131.5 $\pm$ 40.2 ^a	4.62
培养 2 d 神经细胞暴露胆红素后 8 h	400.7 $\pm$ 21.7	152.4 $\pm$ 45.8 ^a	4.98
培养 8 d 神经细胞暴露胆红素后 4 h	150.8 $\pm$ 22.9	115.9 $\pm$ 38.5 ^a	2.73
培养 8 d 神经细胞暴露胆红素后 8 h	142.9 $\pm$ 28.7	103.6 $\pm$ 32.7 ^a	2.84

注:a:与不加 MgSO_4 组比较 $P < 0.05$

3 讨论

细胞内 Ca^{2+} 不仅在正常细胞功能中起着极其重要的作用,而且参与许多疾病的发生与发展。细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的改变是细胞生理功能的重要物质基础,也是多种受体激活后信息传递过程中心环节。胞内 Ca^{2+} 浓度微小的变化调节着活细胞内大量重要的生理生化过程,是细胞肿胀溶解及细胞萎缩凋亡介质。在有关胆红素神经毒性发生系列研究中,我们证实了胆红素神经毒性细胞 ATP 耗竭^[6]。由于 ATP 耗竭, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 泵功能衰竭, Na^+ 外移受阻, Na^+ 内移减少致 Ca^{2+} 胞内堆积($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 偶联、 $3\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 偶联);同时由于兴奋性氨基酸(Excitatory Amino Acid, EAA)突触堆积, NMDA 受体过度活化、内移 Na^+ 通道, Ca^{2+} 通道开放,致胞内 Ca^{2+} 超载^[4,7]。早期胞内 Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} 增多,水分子内移,细胞水肿溶解;后期胞内 Ca^{2+} 超载, Ca^{2+} 通过钙调素(CaM)形成 $\text{Ca}^{2+} - \text{CaM}$ 复合物,激活多种依赖 $\text{Ca}^{2+} - \text{CaM}$ 的蛋白激酶,从而引起细胞内广泛信号传导分子磷酸化;活化酯类包括四烯酸代谢产物,形成自由基;同时活化磷酸激酶 A (Phosphokinase A, PKA), 磷酸激酶 C (Phosphokinase C, PKC) 等可诱导细胞启动的一系列基因表达^[4]。

在既往研究中,McDonald 等^[1]报道胆红素脑病新生儿脑脊液中胆红素浓度可大于 100 $\mu\text{mol/L}$;本研究中未成熟神经细胞(培养 2 天)暴露于 100 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素 4 h,细胞内 Ca^{2+} 从 75.3 nmol 增加到 320.8 nmol;继续暴露 4 h,细胞内 Ca^{2+} 增加到 400.7 nmol;去除胆红素暴露,细胞内 Ca^{2+} 不能逆转。成熟神经细胞(培养 8 天)暴露于 100 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素 4 h,细胞内 Ca^{2+} 从 70.6 nmol 增加到 150.8 nmol;继续暴露 4 h,细胞内 Ca^{2+} 不再增加;去除胆红素暴露,细胞内 Ca^{2+} 浓度可显著降低。表明胆红素诱导神经细胞 Ca^{2+} 超载在未成熟神经细胞较敏感,且易导致不可逆改变;成熟神经细胞对胆红素耐受性较好,且轻度改变可以逆转。提示临床新生儿高胆红素血症对未成熟儿神经细胞危险性可能较大,且易导致不可逆性损伤。

胆红素诱导神经细胞 Ca^{2+} 超载,一方面可能由于 ATP 贮备耗竭, $\text{Na}^{2+} - \text{K}^+$ 偶联及 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 偶联障碍;另一方面可能由于 NMDA 受体过度活化致 Ca^{2+} 内流增加^[2]。本研究中我们采用 NMDA 受体拮抗剂 MgSO_4 干预后,胆红素诱导的神经细胞内 Ca^{2+} 超载显著减轻,提示在新生儿高胆红素血症与胆红素神经毒性防治中, NMDA 受体拮抗剂 MgSO_4 可能有临床应用前景。

[参 考 文 献]

[1] McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, et al. Excitatory amino acid neurotransmitter systems contribute to the pathophysiology of bilirubin encephalopathy [J]. Ann Neurol, 1990; 28(2): 413 - 416.

[2] Wahl P, Schousboe A, Honore T, et al. Glutamate - induced increase in intracellular Ca^{2+} in cerebral cortex neurons is transient in immature cells but permanent in mature cells [J]. J Neurochem 1989 Oct; 53(4): 1316 - 1319.

[3] Amit Y, Cashores W, Schiff D. Studies of bilirubin toxicity at the synaptosome and cellular levels [J]. Semin Perinatol, 1992; 17(2): 186 - 190.

[4] Murphy SN, Thayer SA, Miller RJ: The effects of excitatory amino acids on intracellular calcium in single mouse striatal neurons in vitro [J]. J Neurosci. 1987; 7(12): 4145 - 4147.

[5] Uematsu D, Greenberg H, Reivich M, et al. In vivo measurement of cytosolic free calcium during cerebral ischemia and reperfusion [J]. Ann Neurol. 1988; 24(3): 420 - 423.

[6] 陈舜年,贾晓明,夏振伟. 胆红素脑病动物模型制作与鉴定 [J]. 新生儿科杂志,1997, 12(4): 166 - 169.

[7] Clark GD. Role of excitatory amino acids in brain injury caused by hypoxic - ischemia, status epilepticus, and hypoglycemia [J]. Clin Perinatol. 1989; 16(3): 459 - 474.

(本文编辑:尹飞)