维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0427-03

Nifedipine对缺血突触体游离钙和氨基酸释放的影响

徐蜀远[1]，蒋青松[2]，周岐新[2]，杨俊卿[2]
（1. 四川省自贡市第三人民医院药剂科，自贡 643020；2. 重庆医科大学基药理教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：通过Nifedipine对缺血突触体内游离钙浓度及氨基酸释放量的影响，初步探讨其脑缺血保护作用与兴奋性氨基酸（EAA）和抑制性氨基酸（IAA）释放关系。方法：营养液中去除糖和氧建立大鼠脑突触体缺血模型，检测静息及高钾去极化状态下缺血突触体游离钙浓度及EAA和IAA释放量的变化，并检测Nifedipine对此变化的影响。结果：大鼠突触体缺血状态致游离钙浓度、门冬氨酸和甘氨酸、牛磺酸、γ-氨基丁酸释放量明显增加，而谷氨酸亦有增加趋势。缺血＋50 mmol/L高钾刺激后，游离钙浓度及上述EAA及IAA释放量均进一步增加。10^{-4} mol/L Nifedipine可明显降低两种状态下缺血突触体内游离钙浓度，同时亦显著阻遏静息状态缺血突触体IAA的释放及去极化状态EAA和IAA的释放。结论：Nifedipine的抗脑缺血致脑损伤作用主要与其对抗缺血引起的突触体内游离钙浓度升高有关，其抑制EAA和IAA释放与脑缺血保护作用的关系有待进一步研究。

【关键词】脑缺血；突触体；硝苯地平；游离钙浓度；氨基酸
【中国图书分类法分类号】R743.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-01-24

Effects of nifedipine on the level of free calcium and release of amino acids from ischemic synaptosomes

XU Shuyuan, et al
(The Third People's Hospital, Zigong, Sichuan)

【Abstract】*Objective*: The effects of nifedipine on the release of amino acids and free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) from ischemic synaptosomes were investigated in order to explore the relationship between its protective action against brain injury induced by ischemia and its influence on $[Ca^{2+}]_i$ as well as release of excitatory amino acids (EAA) and inhibitory amino acids (IAA). *Methods*: Ischemic synaptosome model was established by substration of glucose and oxygen from synaptosome suspension. The release of EAA, IAA and $[Ca^{2+}]_i$ from or in ischemic synaptosomes were determined under the conditions of either resting or stimulation of 50 mmol/L K^+. *Results*: Ischemic condition induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in both resting and 50mmol/L K^+- stimulated synaptosomes. Obviously it caused more release of aspartate, glutamate, glycine, taurine, GABA from 50 mmol/L K^+- stimulated synaptosomes than resting synaptosomes. 10^{-4} mol/L nifedipine not only reduced the $[Ca^{2+}]_i$ increase, but also decreased the release of aspartate, glutamate, and glycine, taurine, GABA in ischemic synaptosomes. *Conclusion*: The neuronal protection of nifedipine against brain damage induced by ischemia is related to inhibiting calcium influx. However, whether the protective effect of nifedipine is related to simultaneously blocking release of EAA and IAA needs further illustration.

【Key words】Cerebral ischemia; Synaptosomes; Nifedipine; Free calcium; Amino acids

脑缺血时氧和葡萄糖供应不足，引起一系列病理生化改变，最后导致神经元损伤或死亡。其产生机制并不十分清楚，目前认为至少涉及以下几个不同的方面：能量耗竭、细胞内钙超负荷、兴奋性氨基酸（EAA）的释放增加、酸中毒、毒性氧自由基产生、花生四烯酸产生等。其中，细胞内钙超载是神经元迟发性死亡的主要原因和缺氧缺血脑损伤的最后共同通路[1]。因此，阻滞外钙内流，抑制内钙释放，减轻缺血时神经细胞内钙超载，是保护神经细胞免于损害或减轻损害的重要环节。钙通道阻滞剂对脑缺血的治疗效果较为肯定，但关于其对氨基酸释放的研究较少，尤其是对抑制性氨基酸（IAA）的作用几乎未见报道。本实验采用突触体缺氧缺糖模型，即模拟在体缺血状态，研究缺血时钙通道阻滞剂 Nifedipine 对突触体内游离钙浓度（$[Ca^{2+}]_i$）和EAA及IAA释放的影响。

作者介绍：徐蜀远（1958- ），男，副主任药师，硕士，
主要研究方向：神经药理学与临床药理学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar大鼠，200～250 g，雄性。由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 试剂 Nifedipine购自天津医药工业研究所，Digitonin为Sigma产品，Quin-2/AM为Aldrich Chem Co.产品，其它试剂均为市售分析纯。所用氮气为高纯氮，氧气为医用纯氧。

1.3 仪器

KuboBakr-20000T型冷冻离心机；RF-540荧光分光光度计和UV-260可见紫外分光光度计均为日本岛津公司生产。

1.4 方法

1.4.1 缺血突触体的制备

参照本室建立的突触体制备方法[2]，得突触体悬浮液，冰浴待用（蛋白浓度1 mg/ml）。

缺血突触体模型组培养液中去除葡萄糖，并预先在37 ℃通纯氮2 h，然后将冰浴待用的突触体悬浮于该培养液中，通纯氮，在37℃培养60min（氮气流速为50ml/min）。正常对照模型组装置同上，培养液中含葡萄糖，导管接纯氧。另外，在缺血条件下，温育开始时即加入10^{-4} mol/L Nifedipine，继续温育至60 min，即为Nifedipine给药组。

培养液（人工脑脊液）的组成成分为（mmol/L）：NaCl 132，KCl 5，NaH_2PO_4 1.2，$MgCl_2$ 1.2，$CaCl_2$ 1.2，Glucose 10，Tris 20 μmol/L，pH 7.4。

1.4.2 突触体内$[Ca^{2+}]_i$的测定

取冰浴待用的突触体两份，一份作对照，另一份加入Nifedipine 10^{-4} mol/L，分别在正常和缺血条件下温育30 min，以Quin-2/AM为指示剂，用荧光法在λ ex 339 nm和λ em 492 nm波长处测定荧光值，并按公式：$[Ca^{2+}]_i = (F - F_{min}) / (F_{max} - F) \times 115$ (nmol/L) 计算$[Ca^{2+}]_i$浓度[3]。最后在各测定池中分别加入KCl 50 mmol/L，测得高钾去极化的荧光值。

1.4.3 突触体内氨基酸释放量的测定

突触体温育结束后，正常组、缺血组和Nifedipine给药组各取悬液两份，一份加入50 mmol/L KCl去极化，一份加入等体积培养液作静息对照。在9000 × g通过硅油层（比重1.03）离心10 min。取上清液用PICO-TAG法[4]定量测定门冬氨酸（Asp）、谷氨酸（Glu）、甘氨酸（Gly）、牛磺酸（Tau）和γ-氨基丁酸（GABA）等氨基酸，以Waters游离氨基酸标准化合物为标准品，采用外标法定量。

1.5 统计处理

实验结果均以$\bar{x} \pm S$表示，用t检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 Nifedipine对缺血突触体内$[Ca^{2+}]_i$的影响

突触体在除去葡萄糖和氧的培养液中温育60 min后，其$[Ca^{2+}]_i$与正常突触体比较，静息及去极化状态分别增加2.1和2.2倍，均具显著性（$P<0.05$）。50 mmol/L高钾去极化引起缺氧缺糖突触体内$[Ca^{2+}]_i$较静息增高2.9倍（$P<0.01$）。

Nifedipine 10^{-4} mol/L能显著降低缺血时静息状态和高钾去极化引起的突触体内$[Ca^{2+}]_i$增加（分别减少1.3和1.2倍，$P<0.05$）。结果见表1。

表1 Nifedipine 10^{-4} mol/L对缺血突触体游离钙浓度的影响（nmol/L）（$\bar{x} \pm S$，$n=10$）

组别	静 息	KCL（50 mmol/L）
正常	155.2 ± 90.3*	413.0 ± 123.0**△
缺血	317.8 ± 157.1	912.9 ± 272.3△△
缺血+Nifedipine	208.6 ± 33.9*	702.5 ± 213.0*△

与缺血组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；
与静息组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$

2.2 Nifedipine对缺血突触体内氨基酸释放量的影响

与正常静息突触体比较，缺氧缺糖突触体静息状态Asp和Gly、Tau、GABA释放量显著增加（$P<0.05$），其中以EAA Asp增加最明显（增加了3.7倍，其它分别增加1.4、1.5和1.6倍）。缺氧缺糖突触体高钾去极化后EAA释放量进一步增加（Asp和Glu均增加3.0倍）（$P<0.05$），但IAA（Gly、Tau和GABA）的释放量仅有增加趋势（$P>0.05$）。缺血去极状态Asp、Glu和Tau释放量显著高于正常突

表2 Nifedipine 10^{-4} mol/L对缺血突触体氨基酸释放的影响（nmol/mg蛋白）（$\bar{x} \pm S$，$n=5$）

		Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
静息	正常	1.0 ± 0.2*	5.9 ± 0.6	3.1 ± 0.8*	9.7 ± 1.7*	1.4 ± 0.2*
	缺血	3.8 ± 0.7	5.8 ± 1.4	4.3 ± 0.4	14.7 ± 2.4	2.2 ± 0.3
	缺血+Nifedipine	3.9 ± 1.0	6.4 ± 1.2	3.1 ± 1.1	9.3 ± 1.5*	1.3 ± 0.2*
高钾	正常	6.4 ± 0.7*△	9.9 ± 0.3*△	4.5 ± 0.5△△	10.2 ± 2.0*	2.7 ± 0.8△
	缺血	11.6 ± 1.3△	17.3 ± 1.5△	5.6 ± 1.1	15.9 ± 1.0	3.5 ± 1.0
	缺血+Nifedipine	7.0 ± 0.6*△	10.1 ± 0.9*△	2.9 ± 0.4*	10.8 ± 1.0*	2.5 ± 0.2*△

*$P<0.05$ 与缺血组比较；△$P<0.05$，△△$P<0.01$与静息组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

触体去极状态（分别增加1.8、1.7、1.6倍，$P<0.05$）。其它氨基酸（Gly和GABA）的释放量也较正常去极突触体高，但无显著性。

Nifedipine 10^{-4} mol/L明显抑制静息状态缺血突触体IAA Tau和GABA的释放（均减少1.4倍，$P<0.05$），同时显著降低去极化引起的缺血突触体各种氨基酸释放的增加（Asp、Glu和Gly、Tau、GABA均约降低1.4倍，$P<0.05$）。结果见表2。

3 讨 论

脑缺血缺氧时，能量耗竭，ATP短缺，细胞外K^+浓度升高，引起突触前膜去极化和EAA的释放增加，后者作用于相应的受体，引起受体门控的离子通道开放，Ca^{2+}、Na^+、Cl^-和水进入细胞内，引起急性神经元肿胀坏死。细胞内$[Ca^{2+}]_i$大量增加，造成迟发性神经元死亡[5]。同时，胞内$[Ca^{2+}]_i$升高又可促进突触前膜Glu释放增加而加重兴奋毒的损害，加快细胞死亡[6]。故选用高钾（KCl 50 mmol/L）去极化模型更接近于脑缺血时机体的应激条件。本实验测得突触体缺血模型$[Ca^{2+}]_i$浓度明显升高，高钾去极化后增加更明显，与以上观点一致；静息状态下，大鼠缺血突触体释放Asp和IAA均明显增加，其中Asp增加更明显，高钾去极化后，EAA（Asp与Glu）释放量进一步增加，支持$[Ca^{2+}]_i$的增加和EAA的释放是脑缺血致脑损伤的主要原因的观点，同时亦说明脑缺血应激状态下，EAA中Glu是产生兴奋毒的主要氨基酸。最近的研究表明，IAA，如Tau，GABA等在脑缺血时有明显的神经保护作用。初步认为IAA可能是一种内源性的神经保护剂，通过促使突触后膜超极化或复极来减轻兴奋毒性的损害[7,8]。研究结果表明，缺血突触体不仅EAA释放量增加，而且IAA（Gly，Tau及GABA）的释放亦同时增加。因此，能降低细胞内钙增加，阻遏EAA释放，同时使IAA释放明显增加的药物可能在缺血致组织损伤的保护方面更具重要意义。但亦有人认为兴奋毒导致的细胞死亡至少部分与抑制性受体（如Gly和GABA受体）激活后所产生的致死性的Cl^-内流有关[9]。研究显示Nifedipine能显著降低缺血时静息和去极化状态下IAA的释放，且抑制程度与对EAA的一致。照此看来，Nifedipine对EAA和IAA释放的影响在脑缺血致组织损伤方面的作用难下定论，可能与其对钙的抑制作用有关。

目前认为，在脑缺血过程中，细胞内钙超载是神经元死亡的主要原因。EAA的大量增加，激动其受体门控的钙通道和EAA去极化使电压依赖性钙通道开放是细胞内Ca^{2+}增加的两条重要途径[10]。Nifedipine是二氢吡啶类L-型钙通道阻滞剂，主要通过抑制电压依赖性钙通道而起作用，其抗脑缺血作用较为肯定[11]。本实验中，Nifedipine 10^{-4} mol/L使静息与去极化状态缺血突触体$[Ca^{2+}]_i$显著降低，这是其脑缺血保护作用的主要方面。而同时去极化状态EAA释放亦显著减少，这可能与其阻断电压依赖性钙通道后，阻遏了钙的增加或调节钙的释放有关。但Nifedipine对EAA的释放是否有直接的抑制作用、与IAA释放的关系及意义尚需进一步实验证实。

参 考 文 献

[1] 赵卫国. 细胞内钙超载与缺血性脑损伤[J]. 上海第二医科大学学报，1990;10(3):259-263.

[2] 徐蜀远，周歧新，黄 萌. 大鼠脑突触体的制备及形态与活性研究[J]. 重庆医科大学学报，1997;22(3):191-193.

[3] Keelan J, Betes TE, Clark JB, et al. Intrasynaptosomal free calcium concentration during rat brain development; effects of hypoxia, aglycaemia,and ischemia[J]. J Neurochem, 1996;66 (6):2460- 2467.

[4] 张晓萍，邱宗荫，李明伟，等. PICO-TAG法测定脑脊液及纹状体灌流液中游离氨基酸的研究[J]. 重庆医科大学学报，1995;20(3):160-164.

[5] 冯亦璞. 脑缺血的病理生化机制和药物治疗. 宋振玉，刘耕陶，主编. 当代药理学[M]，北京：中国协和医科大学-北京医科大学联合出版社，1994;200-210.

[6] Marc F, Wolf S. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future[J]. Arch Intern Med, 2000;160(21):3196-3206.

[7] Saransaari P, Oja SS. Involvement of metabotropic glutamate receptors in ischemia induced taurine release in the developing and adult hippocampus[J]. Neurochem Res, 2000; 25(8): 1067-1072.

[8] Schwartz-Bloom RD, Sah R. gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia[J]. J Neurochem, 2001;77(2):353-371.

[9] Chen Q, Moulder K, Tenkova T, et al. Excitotoxic cell death dependent on inhibitory receptor activation[J]. Exp Neurol, 1999;160(1):215-225.

[10] Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death[J]. Stroke, 1998;29 (2): 705-718.

[11] Ralph K, Larry D.C, Stuart A.T. Calcium channel blockers and excitatory amino acids[J]. Brain Res, 1991;551(1-2):331-333.