DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.022

DNA完整性改变的实验，本研究用它来检测水中有机提取物所引起的DNA链断裂。Ames实验是用于检测DNA碱基序列改变。二者反映的是不同的遗传学终点。本室Ames实验结果显示大部分水样在一定范围内可呈现阳性致突变性，提示C市的有机提取物不仅能引起DNA链断裂，还可引起DNA碱基序列改变。这种含有多种遗传毒物的有机物混合体对人群健康的危害不容忽视。

C市是传统的工业大市，顺长江与嘉陵江的交汇处而建，主城区拥有六百万人口，长江及嘉陵江为其主要饮用水源，工业生产带来的水环境污染问题较为严重。有研究表明乙肝感染、饮水类型以及肝胆器官疾病史是该市原发性肝癌相关程度最大的危险因素，其相对危险度分别为15.579，8.774，4.557[12]。结合本次实验结果提示饮用水污染是C市的肝脏肿瘤高发的一个重要因素，水环境的治理与保护应引起高度重视。

参考文献：

[1] Gagne F, Blaise C, Bermingham N. Lethal and sublethal effects of marine sediment extract on rainbow trout hepatocytes[J]. Toxicology Letters, 1996, 87(2-3): 85-93.
[2] Dong Y. Polychlorinated organic compounds (PCOCs) in the Yangtse River water samples using SPE and GC/ECD[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2000, 64(3): 383-389.
[3] 李蜀庆. 重庆环境保护产业发展战略研究[J]. 重庆环境科学, 2000, 22(1): 28-30.
[4] 王宇明，陈国政，董家鸿，等. 分离肝细胞的一种体外灌流法[J]. 中华消化杂志，1994，14(3)：175-175.
[5] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 184-191.
[6] 叶常明. 环境中的邻苯二甲酸酯[J]. 环境科学进展，1993，1(2)：36-46.
[7] 吴平谷，韩关根，王惠华，等. 饮用水中邻苯二甲酸酯的调查[J]. 环境与健康杂志，1999，16(6)：338-339.
[8] Boorman G A. Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation[J]. Environ Health Perspect, 1999, 107(Suppl): 207-231.
[9] 吴 静，蒋明辉，陈 约，等. 水中有机提取物和蓝藻对BALB/C3T3细胞的毒性作用[J]. 中国公共卫生，2001，17(1)：1019-1021.
[10] 张遵真，田怀军，衡正昌，等. 水中有机提取物对V79细胞DNA损伤的研究[J]. 环境与健康杂志，1999，16(1)：10-12.
[11] 江城梅，庄 颖，赵 红，等. 淮河水中非挥发性有机物的遗传毒性研究[J]. 癌变.畸变.突变，2000，12(3)：154-156.
[12] 孙安龙. 重庆市原发性肝癌的危险因素[J]. 中国肿瘤，2000，9(3)：123-124.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)05-0426-02

谷氨酸毒性对培养PC12细胞钙内流与游离钙的影响

Effects of glutmate intoxication on calcium influx and free calcium in PC12 cells

吴 南，冯 华，王宪荣 （第三军医大学附属西南医院神经外科，重庆 400038）

Ca^{2+}作为细胞内一种重要的第二信使，参与神经细胞的一系列活动，对神经细胞的代谢和功能产生广泛的影响，细胞内钙超载被称为细胞损伤的“最后共同通路”。谷氨酸是中枢神经系统内含量最多的兴奋性氨基酸，有神经兴奋毒性，它作用于NMDA受体，引起钙内流，在神经细胞的继发性损害中谷氨酸释放占重要地位[1,2]。PC12细胞是一种从鼠嗜铬细胞瘤分离的克隆细胞，因其在神经生长因子（Nerve growth factor，NGF）存在下，细胞形态、结构和功能皆类似于交感神经细胞，因而成为近年来神经科学工作者研究神经细胞递质合成、储存和释放、离子通道规律及受体的细胞模型[3]。本实验利用液闪计数法测定^{45}Ca内流，用激光共聚焦显微镜通过钙荧光探针Fluo-3测定游离钙变化，旨在探索谷毒酸毒性致神经细胞继发性损伤时钙离子的变化特点。

1 材料方法

1.1 细胞培养及处理

1.1.1 PC12细胞株（小鼠嗜铬细胞瘤，上海细胞生物研究所提供）。

1.1.2 细胞培养 培养液为RPMI-1640，内含10%小牛血清、100 U/ml青、链毒素、2.5 S NGF（终浓度75 ng/ml），PC12细胞在37 ℃，5%CO_2混合气体的孵箱（温度95%）中培养。

1.1.3 分组 对照组、谷氨酸毒性组。

1.1.4 时相点 取谷氨酸毒性损伤后1、4、24 h。

1.1.5 谷氨酸毒性组药物浓度 L-谷氨酸（终浓度0.75 mmol/L，购自北京制药二厂）[4]。

1.2 液闪计数法测^{45}Ca Bq值

以2.5×10^4个/ml细胞密度接种于24孔板内，给药前加入^{45}Ca 74 GBq/孔（Amsham公司，美国），不同时相点制样过程如下：

（下转433页）

作者简介：吴 南（1971-），男，河南省新乡市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事脑血管微创方面的研究。电话：(023)68754000-73071

收稿日期：2001-10-21；修回日期：2002-05-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[6] Moll R, Lowe A, Laufer J, *et al*. Cytokeratin 20 in human carcinomas [J]. Am J Pathol, 1992, 140(2): 427—447.
[7] Datta Y H, Adams P T, Drobyki W R, *et al*. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(3): 475—482.
[8] Herrtich P, Pals S, Ponta H. CD44 in colon cancer[J]. Eur J Cancer, 1995, 31A(7—8): 1110—1112.
[9] Rodriguez C, Monges C, Rouanet P, *et al*. CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR based study of splice variants[J]. Int J Cancer, 1995, 64(5): 347—354.
[10] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. p53 mutations in human cancers [J]. Science, 1991, 253(5015): 49—53.
[11] Merri A J, Potten S S, Kemp C J, *et al*. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53 deficient mice[J]. Cancer Res, 1994, 54(3): 614—617.
[12] 武忠弼. 病理学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 358.

（编辑　冯崇英）

（上接 426 页）

以 0.25% 胰酶将细胞消化下来, 以多头细胞收集器反复冲洗细胞后, 抽滤至 49 型玻璃纤维膜上, 烤干, 将滤膜放入闪烁杯内加闪烁液(二甲苯 ppo、popop), 放置 3 h, 上机检测。

1.3　激光共聚焦显微镜测细胞内游离钙[5]

以 2.5×10^4 个/ml 细胞密度接种于 24 孔板内玻片上, 给予谷氨酸后, 不同时相点制样过程如下: 以无血清培养液冲洗玻片 3 次, 取 100 μl Fluo-3/AM 探针(5 μmol/L, 第四军医大学李云庆教授惠赠)滴于波片中央, 37 ℃避光孵育 1 h, 以无血清培养液冲洗后, 用共聚焦显微镜测定。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 来表示, 采用第三军医大学数学教研室 GW-BASIC 统计程序包内 FISD 程序处理。

2　结果

2.1　谷氨酸毒性损伤致 PC12 细胞钙内流结果

谷氨酸毒性组^{45}Ca 内流的 Bq 值具有时间效应关系, 见表 1。

表 1　谷氨酸毒性损伤致 **PC12** 细胞钙内流变化（$n=4$, $\bar{x}\pm s$）

	^{45}Ca Bq		
	1 h	4 h	24 h
对照组	370.25±40.45	474.5±36.93	593.5±56.26
谷氨酸组	1446.75±103.78*	1808.5±148.14*#	2804.25±344.74*#○

*: $P<0.05$ 与对照组比较; #: $P<0.05$ 与 1 h 比较; ○: $P<0.05$ 与 4 h 比较

2.2　共聚焦显微镜测游离钙结果观察

正常 PC12 细胞普遍为低荧光强度细胞, 谷氨酸组 1 h 时相 PC12 细胞 60% 为低荧光强度 40% 为中荧光强度, 随着时间延长, 中高荧光强度细胞所占比例增大, 细胞荧光强度值, 见表 2。

表 2　谷氨酸毒性损伤致 **PC12** 细胞游离钙流变化（$n=4$, $\bar{x}\pm s$）

	荧光强度		
	1 h	4 h	24 h
对照组	69.05±17.82		
谷氨酸组	128.72±42.95*	174.58±41.14*#	200.62±32.49*#

*: $P<0.05$ 与对照组比较; ○: $P<0.05$ 与 1 h 比较; ×: $P<0.05$ 与 4 h 比较

3　讨论

钙超载是导致神经细胞死亡的"最后共同通路"[6,7], 而具有生物活性的是细胞内的游离钙, 细胞内游离钙的增加通常是细胞外钙的内流或细胞内钙库释放所致, 钙通道及钙释放通道在细胞内游离钙的变化中担任调节平衡作用[8]。神经系统损伤后, 多有谷氨酸释放, 它具有兴奋性神经毒性, 可作用于 NMDA 受体, 引起受体门控钙通道的开放, 游离钙增加进一步加重损伤, 因此谷氨酸在神经细胞继发性损害中起重要作用。

本实验液闪计数结果显示: 谷氨酸毒性致 PC12 细胞损伤后^{45}Ca 的内流有以下特点: 随着时间延长, ^{45}Ca 内流增加, 具有时间效应关系。钙内流是由于谷氨酸作用于 NMDA 受体, 引起受体门控钙通道开放所致。激光聚焦显微镜结果提示: 谷氨酸毒性致 PC12 细胞损伤后游离钙增加也具有时间效应关系。但两者的时间效应关系曲线不同, 在 4 h 和 24 h 时相 PC12 细胞游离钙的升高幅度大于^{45}Ca 内流增加的幅度, 由此可以推测此时细胞内钙库钙释放参与了细胞内游离钙的升高。我们据此可作以下推测: 谷氨酸作用于 PC12 细胞后早期钙内流导致细胞内游离钙增加, 随即细胞能量代谢发生障碍, 引起了线粒体、内质网等膜性结构的损害, 进而引起钙释放通道开放, 促使以结合钙形式存在的细胞内钙库释放出游离钙, 游离钙的进一步升高加重了细胞损伤。

关键词: 谷氨酸; PC12 细胞; 钙
中图法分类号: R741.02　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王　尧, 杜子威. 神经生物化学与分子生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 78—120.
[2] Rameau G A, Akaneya Y, Chiu L. Role of NMDA receptor functional domains in excitcitory cell death[J]. Neuropharmacology, 2000, 39(12): 2255—2266.
[3] Shafter T J, Atchison W D. Transmitter, ion channel and receptor proptrities of PC12 cells: a model for neurotoxi cological studies[J]. Neurotoxicology, 1991, 11(1-3): 473—489.
[4] Geanne M A, Diane B, Glauce S B. Effects of Gangliosides, Ouabain and Arachidonic acid on glutmated cytotoxicity in PC12 cells[J]. Biol pharm Bull, 1997, 20(2): 149-152.
[5] 龙开平, 王春梅. 用激光共聚焦显微镜测量大鼠 DRG 细胞内游离钙变化[J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(专): 82—84.
[6] Choi D W J. Excitotoxic cell death[J]. J Neurobiol, 1992, 23(4—6): 126.
[7] Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved[J]? Brain Res Bull, 2001, 53(4): 409—413.
[8] 张均田, 郑永芳. 细胞内钙和钙通道[A]. 见: 韩济生. 神经生物学经要[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 163—167.
[9] The European study group on nimodipine in severe head injury. A multicenter trial of the efficacy of nimodipine on outcome after severe head injury[J]. J Neurosurg, 1994, 80: 795—805.

（编辑　郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net