DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.008
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)03-0201-04

论著

褪黑素在叠氮钠所致的海马锥体细胞钙超载中的神经保护作用

徐海伟[1],黎海蒂[1],范晓棠[2],吴 旋[1],曹 娟[1],唐 军[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察叠氮钠对急性分离的大鼠海马锥体神经元胞内游离钙的作用以及不同浓度的褪黑素(Melatonin,MT)的影响。方法 海马锥体细胞的急性分离、新型游离钙荧光探针Fluo-4AM负载海马锥体细胞,激光共聚焦动态检测胞内游离钙的变化及叠氮钠、褪黑素和荷包牡丹碱的作用。结果 在孵育液中加入叠氮钠(0.8 mg/ml)能使急性分离的海马锥体细胞胞内游离钙在200 s内急剧升高并维持在高水平,处于钙超载状态。褪黑素能使NaN_3所致的海马锥体细胞内处于超载状态的游离钙显著下降,并有量效关系。结论 叠氮钠导致海马神经细胞损伤的早期原因可能是钙超载,MT促进钙离子向细胞外的转运而抑制叠氮钠所致的钙超载。

关键词:褪黑素;钙超载;海马;激光共聚焦;大鼠
中图法分类号:R322.81;R741.02;R977.1 文献标识码:A

Neuroprotective effect of melatonin on calcium overload of pyramidal cell in the hippocampus due to sodium azide

XU Hai-wei, LI Hai-di, FAN Xiao-tang, WU Xuan, CAO Juan, TANG Jun(Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of sodium azide on the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]i$) in acute isolated pyramidale cells and the influence of melatonin at different dosages. Methods The pyramidale cells in the CA1 of the hippocampus were isolated and loaded with the new fluorescence probe of free calcium Fluo-4 AM. The dynamic real time changes of $[Ca^{2+}]i$ in the pyramidale cells were analysed with laser scanning confocal microscope (LSCM). The influence of sodium azide, melatonin and Biculline on the $[Ca^{2+}]i$ in pyramidale cells was also observed. Results The $[Ca^{2+}]i$ in the acute isolated pyramidale cells increased significantly and remained at high level of calcium overload 200 s after sodium azide (0.8 mg/ml) was added into the medium. $[Ca^{2+}]i$ decreased significantly when the cells were treated with melatonin at different dosages. The effect of melatonin was in a dose-dependent manner. Conclusion The early cause resulting in neuron injury in the hippocampus due to sodium azide is probably calcium overload. Melatonin can block the calcium overload by increasing the outflow of intracellular free Ca^{2+}.

Key words: melatonin; calcium overload; hippocampus; laser scanning confocal microscope; rat

钙离子平衡改变和钙超载在阿尔茨海默病(Alzheimer disese, AD)中的作用已为很多实验所证实。目前认为,一方面,Ca^{2+}可以影响β淀粉样蛋白(β amyloid peptide, Aβ)的合成和堆积而对神经细胞产生毒性作用。β-淀粉样蛋白前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)的异常水解是老化和AD中Aβ形成和堆积的主要原因,钙离子是惟一能加强APP水解形成Aβ的离子[1];另一方面,Aβ也能影响钙离子平衡,AD病人脑内神经细胞外升高的Aβ可破坏细胞内的钙离子平衡,Ca^{2+}不受控制地通过淀粉样通道进入胞内造成的钙超载可能是导致细胞死亡的共同机制[2,3]。

以往对AD中Ca^{2+}变化的研究多集中在Aβ对Ca^{2+}平衡的影响上,采用的研究方法大都将Aβ加入细胞长期培养(时间从3 h至14 d),对于AD早期的损伤因素,特别是在氧化应激形成的早期海马神经元中Ca^{2+}的变化,报道甚少。球形和非纤维状的Aβ存在于正常人体的脑中,它们可以提高神经细胞内的钙离子,提示钙离子和Aβ之间有密切联系,但Aβ(1~40)本身并不能对神

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900169,30100087);全军"十五"青年基金资助项目(01Q099);重庆市应用基础基金资助项目(2001)
作者简介:徐海伟(1972-),男,江苏省江阴市人,博士,讲师,主要从事褪黑素的神经保护作用及机制方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-02

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

经元产生短期和急性损伤，可能是通过影响Ca^{2+}而介导的[4]，提示钙离子是Aβ产生神经毒性早期的中介途径。Pappolla等[5]发现，褪黑素(Melatonin，MT)能降低Aβ所致的神经母细胞瘤胞内Ca^{2+}的升高而起神经保护作用，但MT对于NaN_3所致的氧化应激状态下海马神经元胞内游离钙有何影响，其量效关系如何，其他神经递质对MT的作用有何影响，国内外未见报道。了解MT在AD中枢神经系统神经元损伤中的早期作用及机制，具有一定意义。为此，我们采用新型荧光探针Fluo-4 AM，负载急性分离的海马锥体细胞，用激光共聚焦技术在细胞水平动态观察了MT对NaN_3所致的氧化应激状态下海马锥体细胞胞内游离钙($[Ca^{2+}]i$)的影响，以了解MT神经保护作用的早期机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

荧光探针 Fluo-4/AM(Eugene)，助染剂 Pluronic F-127(Eugene)，褪黑素(Sigma)，荷包牡丹碱(Sigma)，胰酶(Sigma)。

褪黑素粉末先用1%总体积的无水乙醇溶解后，再加入无菌生理盐水，配成终浓度为0.5 mg/ml的溶液。

1.2 海马锥体细胞的急性分离

将幼年Wistar大鼠24只(5~7 d龄)处死，断头取脑，于大脑半球腹内侧分离出双侧海马。用刀片垂直于海马长轴切片，厚约200~400 μm。进而分离出CA1区并置于32℃人工脑脊液中(ACSF)，通氧混合气(95%O_2+5%CO_2)孵育10 min，然后将脑片放入胰蛋白酶(1 mg/ml，无钙脑脊液配制)中，于37℃通氧消化30 min后将脑片放入细胞记录液中吹打约2~3 min制成细胞悬液。细胞记录液成分(单位：mmol/L)：NaCl 140，KCl 10.8，$CaCl_2$ 1.8，$MgCl_2$ 1.0，HEPES 5.0，葡萄糖 10.0，pH 7.2~7.4。

1.3 激光共聚焦

在急性分离细胞悬液中加入荧光探针Fluo-4/AM(终浓度5 μmol/L)和3 μl/ml 25%助染剂Pluronic F-127，在37℃避光孵育40 min。以记录液清洗2遍，再孵育20 min。待Fluo-4/AM在胞浆中水解为Fluo-4后，即可置激光共聚焦显微镜下观察。

以488 nm波长的激光作激发光在515 nm处探测荧光发射，选择形态佳、贴壁好、在3~5 min之间保持荧光值稳定的细胞进行监测，以测得荧光绝对强度代表Ca^{2+}相对强度。每隔20 s扫描1次，直接监测单个神经元胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]i$)在给药前后的动态变化过程。在钙超载形成并稳定1 min后，加入MT，使其在培养液中的终浓度分别达到0.2 mg/kg(1×MT)至2 mg/kg(10×MT)，荷包牡丹碱在MT前30 s加入孵育液，以不含MT的人工脑脊液作为对照组。

1.4 统计学处理

Ca^{2+}图像经激光共聚焦图像分析软件TCS-NT进行数据处理，换算成海马锥体细胞内Ca^{2+}荧光强度变化的曲线。

2 结果

2.1 急性分离的海马锥体细胞钙超载的形成

用新型荧光探针Fulo-4 AM避光37℃孵育急性分离的乳鼠海马锥体细胞40 min后，可见细胞染色良好，胞核染色最深，胞浆较浅，而细胞突起染色最浅，同时在细胞突起上可见一些圆形颗粒状的突触结构。在孵育液中加入浓度为6 mg/ml的NaN_3，使其终浓度达到0.8 mg/ml，细胞内的$[Ca^{2+}]i$在加入NaN_3后200 s即开始明显升高，见图1，并在随后的10 min中持续升高，11 min时上升趋势减缓(图2A)并维持在高水平，形成平台期，锥体细胞胞核和胞浆中$[Ca^{2+}]i$浓度的变化基本一致，而细胞突起内$[Ca^{2+}]i$变化却不明显，见图2 B。锥体细胞形态在加入NaN_3后发生明显的缩小，随后细胞体积开始缓慢恢复，同时突起长度缩短，见图2 C。在细胞的树突上的突触结构内$[Ca^{2+}]i$在加NaN_3后先略为升高，10 min以后突触内$[Ca^{2+}]i$急剧降低直至消失。同样体积的人工脑脊液对锥体细胞胞内$[Ca^{2+}]i$没有明显影响。

2.2 MT对NaN_3所致急性分离海马锥体细胞钙超载的影响

NaN_3导致的海马锥体细胞$[Ca^{2+}]i$升高状态稳定1 min后，分别加入1×MT、5×MT和10×MT，结果显示3种浓度的MT都能使升高的$[Ca^{2+}]i$显著下降，以10×MT降低$[Ca^{2+}]i$的速率最快，5×MT此之，1×MT降低$[Ca^{2+}]i$的速率较慢，MT降低处于钙超载状态海马锥体细胞$[Ca^{2+}]i$的量效关系较为明显。其中小剂量褪黑素(1×MT)加入孵育液后25 s，胞内$[Ca^{2+}]i$浓度开始明显下降，在前100 s内，胞内$[Ca^{2+}]i$下降速度较快，之后下降速度开始减缓，在曲线上表现为先出现一急速下降曲线，后继以较平缓的弧形下降曲线，锥体细胞胞核部分浅染，而胞浆部分可见一些深染的部分，胞内$[Ca^{2+}]i$的变化以胞浆部分最为明显。中等剂量褪黑素(5×MT)加入孵育液后25 s，细胞形态略为膨胀，使细胞显得较为丰满，同时胞内$[Ca^{2+}]i$浓度略为升高，并持续200 s左右，之后缓慢下降，在曲线上表现为先出现一缓慢上升的小高峰，而后持续缓慢下降，胞核、胞浆和突起内$[Ca^{2+}]i$变化较为一致，在10 min左右，细胞呈淡染，见图3，只隐约可见细胞轮廓，而同一视野的结缔组织内的$[Ca^{2+}]i$却始终未见明显变化，见图3。大剂量褪黑素(10×MT)使胞内$[Ca^{2+}]i$浓度急剧匀速下降，其下降的速度和幅度较1×MT和5×MT都快，在曲线上表现为出现一急速下降的弧形曲线，见图4。

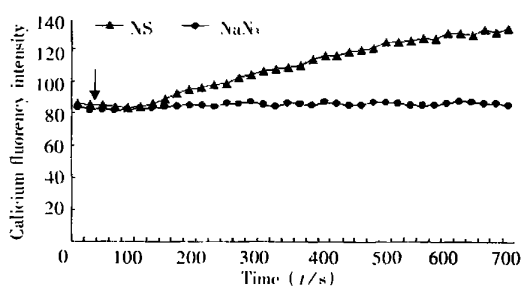


图1 叠氮钠导致急性分离的海马锥体细胞胞内游离钙升高(↓：加入叠氮钠)

Fig 1 The $[Ca^{2+}]i$ of pyramidal cell isolated from the hippocampus of rats increased significantly after being treated with NaN_3 (↓: NaN_3 was added)

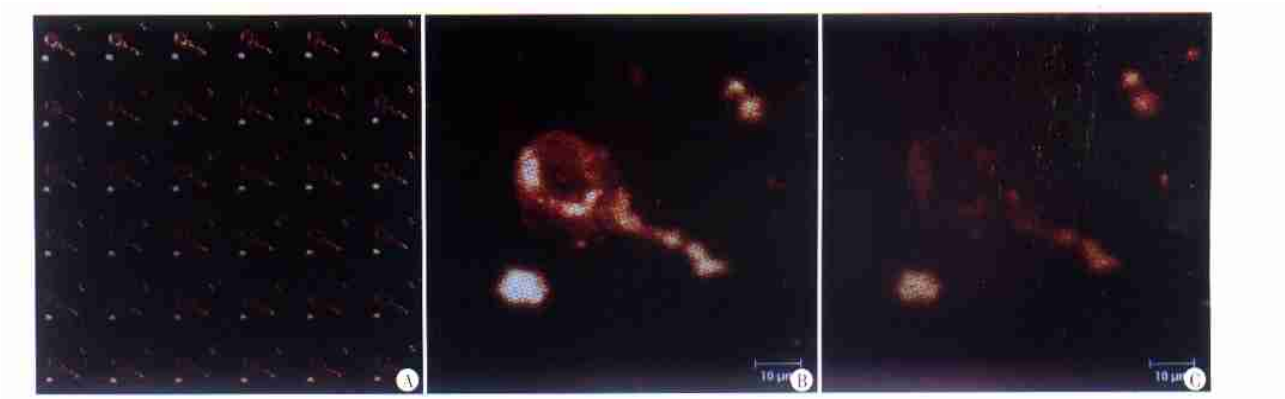
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Increase of [Ca^{2+}] i in the pyramidal cell of the hippocampus due to sodium azide;
B: Amplification of the 1st image of picture A; C: Amplification of the 14th image of picture A

图 2　叠氮钠导致海马锥体细胞的钙超载

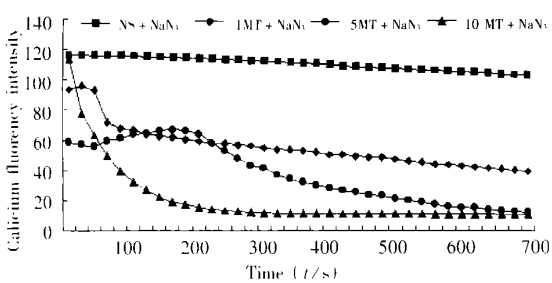
Fig 2　Calcium overload due to sodium azide in the pyramidal cell of the hippocampus



A: The increased [Ca^{2+}] i due to sodium azide decreased after being treated with 5× MT;
B: Amplification of the 1st image of picture A; C: Amplification of the last image in picture A

图 3　叠氮钠导致的海马锥体细胞内的钙离子升高可被 5 倍生理剂量的褪黑素所阻断

Fig 3　The increased [Ca^{2+}] i due to sodium azide was attenuated by 5× MT



(1MT: 0.2 mg/kg; 5MT: 1.0 mg/kg; 10MT: 2.0 mg/kg)

图 4　不同浓度的褪黑素对由叠氮钠所致处于钙超载状态的急性分离的海马锥体细胞胞内游离钙的作用

Fig 4　Effect of melatonin of different dosage on the [Ca^{2+}] i in acute isolated pyramidal cell of hippocampus on calcium overloading due to state azide

在孵育液中依次加入 NaN_3、10× MT 和荷包牡丹碱, 可以观察到锥体细胞胞内[Ca^{2+}] i 先急速上升, 同时细胞形态略为缩小, 加入 10 MT 后胞内[Ca^{2+}] i 又急速下降, 但细胞形态并没有恢复, 反而进一步缩小, 而在加 10 MT 前 30 s 加入荷包牡丹碱, 则[Ca^{2+}] i 又开始缓慢升高, 细胞形态也略为恢复。整个动态曲线形似"N", 见图 5。而人工脑脊液对锥体细胞胞内[Ca^{2+}] i 无显著影响。

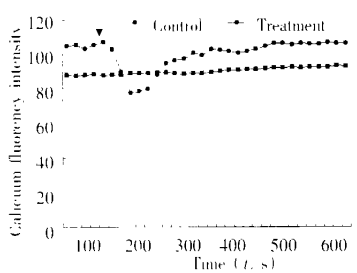


图 5　褪黑素对叠氮钠所致海马锥体细胞钙超载的作用及荷包牡丹碱的影响　(↓: 加入褪黑素; ⇩: 加入荷包牡丹碱)

Fig 5　Effect of melatonin on the calcium overloading of pyramidal cell of the hippocampus due to sodium azide and the influence of bicuculline　(↓: Melatonin added; ⇩: Bicuculline added)

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

3 讨论

钙离子介导了许多生命过程，包括生殖、基因表达、细胞分裂、生长和分化、肌肉收缩、神经递质合成和释放以及记忆的形成等。老化和AD中神经细胞胞内钙的变化是一个至关重要但却争论颇多的问题。AD病人出现的Aβ堆积、神经纤维缠绕和学习记忆障碍可能都有一个共同的早期损伤阶段，即钙超载[6]。同时Aβ也可以改变一系列信号传导途径，包括升高胞内游离钙[Ca^{2+}]i的水平，这一病理生理过程在AD中非常显著，Aβ导致的[Ca^{2+}]i升高可能是由于胞外Ca^{2+}内流增加，而不太可能是胞内贮存钙的释放[7]。同时，α7 nAChR受体依赖的Ca^{2+}通道的激活和乙酰胆碱的释放是学习记忆和认知功能中两个至关重要的过程，而Aβ(1~42)能抑制这两个过程[8]，表明钙离子和AD的典型病理改变Aβ存在密切联系，从钙离子入手研究AD损伤的早期机制及观察某些药物对其影响，可能是一较为有效的方法。

本实验表明NaN_3可导致细胞内钙离子超载。如何阻止钙超载这一初始病理生理过程，以避免一系列的继发性病理改变，是一个值得探讨的问题。近年来MT对钙超载的阻断作用较受重视，Zhang等[9]认为，MT对神经细胞[Ca^{2+}]i超载的抑制作用是MT抗老化的途径之一。MT能降低Aβ所致的神经母细胞瘤胞内Ca^{2+}的升高而起到神经保护作用[5]。Huang等[7]在研究Aβ的神经毒性时发现，Aβ可以导致钙超载，认为升高的钙离子是由胞外钙的内流而非胞内贮存钙释放而引起。本实验中急性分离的锥体细胞中发现NaN_3导致细胞内升高的钙更大的可能是来源于贮存钙，出现这一差异的原因可能是由于NaN_3和Aβ引起钙超载的机制不同所致。本实验显示MT可以抑制海马锥体细胞因氧化应激所致的[Ca^{2+}]i超载，并有量效关系，这和Pappolla等[5]的结果较为一致。不同剂量MT降低胞内升高的钙离子时，胞核、胞浆和细胞突起的[Ca^{2+}]i均降低，并未发现细胞内钙离子的重新分布现象，提示MT降低胞内[Ca^{2+}]i并不是通过促进钙离子的储存，可能是促进细胞内钙离子向细胞外的外流而引起，在实验中可观察到加入MT后某些细胞荧光强度明显低于未加NaN_3的正常细胞，再次提示此时该离子的外运可能处于活跃状态，但要证实这一结论，还需要采用膜片钳等技术对钙离子通道进行实时监测。

NaN_3可导致氧化应激，从而引起神经细胞的氧化性损伤，加速神经细胞的老化过程，由于NaN_3致氧化应激的早期反应是钙超载，而本实验在海马脑片和急性分离的海马锥体细胞中都观察到的MT具有明显的抑制钙超载的作用，提示MT能通过抑制这一过程而起神经保护作用。本实验还显示大剂量MT的作用能被GABA-A受体阻断剂Bicu部分阻断，提示GABA能神经递质参与了MT作用的调节。

参考文献：

[1] Chen M, Durr J, Fernandez H L. Possible role of calpain in normal processing of beta-amyloid precursor protein in human platelets[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(1): 170—175.

[2] Ronnback A, Fowler C J. beta-Amyloid(25-35) inhibits the activity of inositol(1, 4, 5)-trisphosphate-5-phosphatase[J]. Amyloid, 2000, 7(2): 90—94.

[3] Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N. Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14077—14083.

[4] Zhu Y J, Lin H, Lal R. Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein (1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity[J]. FASEB J, 2000, 14(9): 1244—1254.

[5] Pappolla M A, Sos M, Omar R A, *et al*. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide[J]. J Neurosci, 1997, 17(5): 1683—1690.

[6] Chen M, Fernandez H L. The Alzheimer's plaques, tangles and memory deficits may have a common origin. Part V: why is Ca^{2+} signal lower in the disease[J]? Front Biosci, 1999, 4(1): 9—15.

[7] Huang H M, Ou H C, Hsieh S J. Blockage of amyloid beta peptide-induced cytosolic free calcium by fullerenol-1, carboxylate C60 in PC12 cells[J]. Life Sci, 2000, 66(16): 1525—1533.

[8] Wang H Y, Lee D H, D'Andrea M R. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology[J]. J Biol Chem, 2000, 275(8): 5626—5662.

[9] Zhang Q Z, Zhang J T. Inhibitory effects of melatonin on free intracellular calcium in mouse brain cells[J]. Acta Pharmacol Sina, 1999, 20(3): 206—210.

（编辑 郭建秀）

离心机转速的写法及相对离心力的正确表示

有的作者将离心机转速用rpm表示，这已是非法定单位写法了。正确的写法是：当低速离心时用r/min表示；当高速或超速离心时用相对离心力“×*g*”表示，*g*是斜体，前面是乘号。

（本刊编辑部）

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