DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.009

人参二醇组皂甙对正常和"缺血"诱导的大鼠大脑皮层神经元 L-型钙通道的影响

开 丽 王中峰* 萧家思* (第三军医大学基础部药理学教研室)重庆, 630038

提 要 目的: 研究人参二醇组皂甙(PDS)对正常和"缺血"状态下大鼠大脑皮层神经元 L型钙通道的影响。方法: 急性分离大鼠大脑皮层神经元建立体外"缺血"模型,用细胞贴附膜片钳单通道记录方法。结果: 在"缺血"过程中,大鼠大脑皮层神经元 L-型钙通道平均开放时间明显增加,并出现长达 20 ms的长时程开放,平均关闭时间缩短,开放概率增加。PDS 1.5 mg/ml可显著抑制正常和"缺血"诱导的 L型钙通道的开放,使其平均开放时间缩短,平均关闭时间延长,开放概率降低,此作用与经典钙通道阻断剂 Verapamil相似,但作用稍弱。结论: PDS可抑制正常和"缺血"诱导的大鼠大脑皮层神经元 L型钙通道开放,从而减少钙内流,对缺血脑细胞可能有保护作用。

关键词 膜片钳;钙通道;大脑皮层神经元;缺血;人参二醇组皂甙;大鼠
中图法分类号 R338.1

脑缺血时脑细胞内钙浓度急剧增加,此增加与缺血性细胞损伤,以及缺血后迟发性神经元死亡等密切相关[1,2]。应用钙通道阻断剂可明显减轻脑损伤,降低脑梗塞体积,说明细胞膜钙通道在脑内钙超载中起重要作用[3,4]。人参单体皂甙 Rb1和 Rg1可减少缺血所致的脑细胞内钙聚集,从而保护缺血性脑损伤[5,6]。本实验拟用膜片钳单通道记录技术,研究"缺血"对大鼠大脑皮层神经元 L型钙通道的影响,并观察人参二醇组皂甙(PDS)对正常和"缺血"状态下的 L型钙通道作用。

1 材料与方法

1.1 药品

PDS(购自白求恩医科大学有机化学教研室,经高效液相色谱和薄层扫描法测定纯度为 92%,含 Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd); 胰蛋白酶(Sigma); 多聚赖氨酸(Sigma); 天门冬酸钾(Sigma); N-trimethylsilyldiethylamine(Sigma); HEPES(Fluka); Verapamil(Sigma)。

1.2 大鼠大脑皮层神经元急性分离

将生后 2周~ 4周的 Wistar大鼠断头取脑,分离大脑皮层,将其切成 400 μm~ 500 μm的冠状脑片,在通混合氧气(95% O_2+ 5% CO_2)的人工脑脊液(ACSF,成分 mmol/L: NaCl 126; KCl 5; NaH_2PO_4 1.25; $NaHCO_3$ 26; $CaCl_2$ 2; $MgSO_4$ 2; 葡萄糖 10, pH7.2)中孵育,后将 2片脑片移入含 0.1%胰蛋白酶的 ACSF中消化 30 min,将脑片剪碎后,用尖端火抛光的 Pasteur吸管顺序吹打,使组织块分散,静置后将上清液滴于事先涂有 0.1%多聚赖氨酸的盖玻片上, 8 min~ 10 min细胞贴壁,分离细胞完成。

1.3 实验分组

共分四组:① 正常组;② PDS组: 细胞分离完成后加入正常细胞浴液(成分 mmol/L: 天门冬酸钾 130; HEPES 10; EGTA 10; $MgCl_2$ 5; 葡萄糖 10; pH 7.3,用 KOH调制),在实验前该溶液通混合氧 1 h以上;记录到正常电活动后,在浴液中加入 PDS 1.5 mg/ml或 Verapamil(Ver), 5 min后再次记录同一膜片的通道电活动;③ "缺血"组: 按文献[2]所介绍的方法,加入的细胞浴液成分除不含葡萄糖外,其余成分同正常浴液,在实验前,该溶液通混合氮气(95% N_2+ 5% CO_2) 1 h以上,实验时加入此浴液, 20 min后开始实验记录;④ "缺血"+ PDS组: 浴液成分及处理同"缺血"组,实验前在浴液中加入 PDS 1.5 mg/ml,实验记录同"缺血"组;⑤ "缺血"+ Ver组: 浴液成分及处理同"缺血"组,实验前在浴液中加入 Ver 20 μmol/L,实验记录同"缺血"组。每种药物每组记录 10个膜片,共 60个膜片。

1.4 单通道记录

用膜片钳微电极专用拉制器(日本)分两步将 GG-17玻璃毛坯(外径 1.6 mm,中科院上海脑研究所)拉制成微电极,在其尖端涂布 N-trimethylsilyldiethylamine后进行热抛光,充灌电极液(成分 mM: $BaCl_2$ 110; HEPES 10; pH7.3)后电极电阻 2-4 MΩ。

细胞分离后,用正常浴液冲洗盖玻片 2~ 3次后,加入 2 ml浴液即可开始记录。采用细胞贴附(Cell-attached)的膜片钳记录方式,当封接完成后,用 pClamp 6.02软件(美国 Axon公司)的 Clampex程序发出去极化脉冲,电流信号经膜片钳放大器(CEZ-2200,日本)放大,由 Clampex同步采集数据信号,放大器的低通滤波设置 1KHz 记录 L型钙通道时,钳制电位 -40 mV,去极化到 0 mV,持续时间 150 ms,采样间隔 5 s,以保证钙通道从失活状态中恢复。一次采集 50条曲线存入磁盘,以备进一步分析。

所用细胞浴液和电极液在使用前均经孔径 0.2 μm的微孔滤膜滤过。实验均在室温(20℃~ 24℃)下进行。

1.5 数据处理

用 pClamp的 Fetchan和 Pstat程序处理。线性漏电流和电容性电流用叠加无通道开放的曲线删去。用高斯曲线拟合采样

* 生理学教研室

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

点电流序列密度直方图法拟合通道开放电流;用指数曲线拟合平均开放时间、平均关闭时间;开放概率由每条曲线的开放总时间除以总采样时间求得。计算出各组的通道电流大小,平均开放和关闭时间,开放概率,用 t 检验和单因素方差分析进行统计学处理。

2 实验结果

实验记录选用封接电阻大于 5 GΩ 的膜片,小于 5 GΩ 的膜片弃之不用。图 1A为正常大鼠皮层神经元 L-型钙通道的单通道电活动,该通道开放时,通道电流 1.5 pA左右,平均开放时间 2.85 ms,平均关闭时间 39.18 ms,开放概率 0.047, PDS可明显抑制其开放,延长其平均关闭时间,减少开放概率;"缺血"组在加入无糖无氧浴液后 20 min, 记录到的结果表明: 与对照组相比,通道平均开放时间明显增加,达 9.11 ms($P < 0.001$),其中突出的特点是出现了长时程的开放状态,个别达20ms以上,通道的平均关闭时间明显缩短($P < 0.001$),而通道电流大小变化不明显;"缺血"+ PDS组, PDS 1.5 mg/ml可显著抑制"缺血"诱导的 L型钙通道的长时程开放,其平均开放时间与"缺血"组相比,由 9.11 ms缩短到 2.14 ms($P < 0.001$),平均关闭时间延长,说明 PDS可阻止"缺血"诱导的 L-型钙通道开放,减少"缺血"时的钙内流,但对通道电流大小无明显影响;"缺血"+ Ver组, Ver 20μmol/L也可抑制"缺血"所致的 L型钙通道开放,其作用要强于 PDS 结果见图 1表 1和表 2

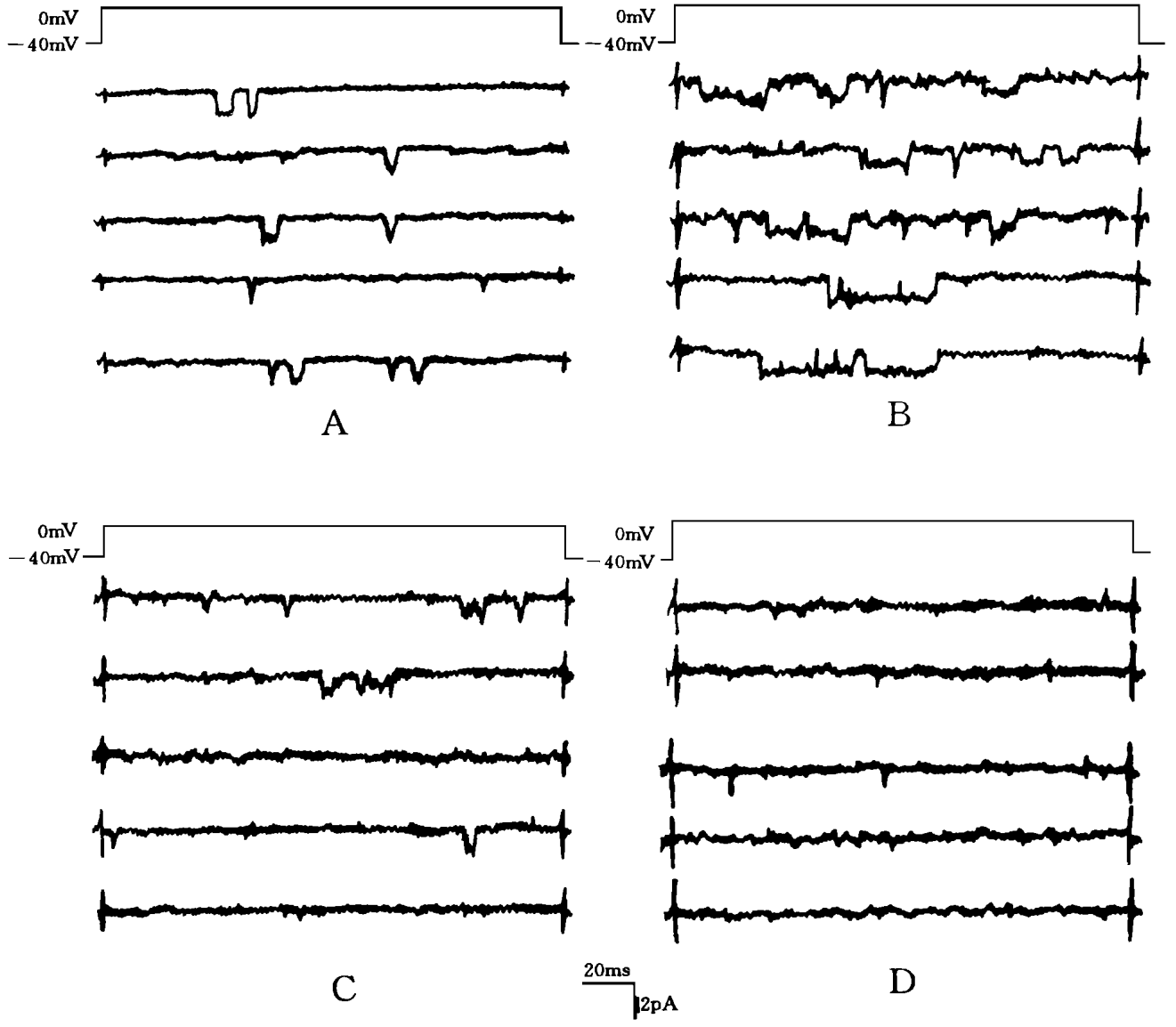


图 1 人参二醇组皂甙(PDS)和 Verapamil对"缺血"诱导的大鼠皮层神经元 L-型钙通道的影响

A: 对照组 B: 缺血组 C: PDS 1.5 mg/ml组 D: 维拉帕米 20μmol/L组

Fig 1 Effects of PDS and verapamil on L-type calcium channel induced by ischemia-like condition in cortical neurons of rats.

A: Control; B: Ischemia; C: PDS 1.5 mg/ml; D: Verapamil 20μmol/L

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

表 1　人参二醇组皂甙(PDS)和 verapamil(Ver)对大鼠皮层神经元 L-型钙通道的影响

Tab 1　The effects of panaxadiol saponins(PDS) and verapamil(Ver) on L-type calcuim channel in cortical neurons of rats (n= 10)

	Open time (L /ms)	Close time (L /ms)	Current amplitude(pA)	Open-state probability
Control	2.23± 0.47	38.44± 9.84	1.58± 0.05	0.043± 0.006
PDS	1.03± 0.25***	74.15± 16.14***	1.55± 0.07	0.012± 0.004***
Control	2.40± 0.65	37.54± 8.89	1.57± 0.06	0.046± 0.004
Verapamil	0.61± 0.18***	120.14± 19.25***	1.55± 0.06	0.008± 0.001***

*** P < 0.001 *vs* control

表 2　人参二醇组皂甙(PDS)和 Verapamil对"缺血"诱导的大鼠大脑皮层神经元 L-型钙通道的影响

Tab 2　Effects of PDS and verapamil on L-type calcium channel induced by ischemia-like condition in cortical neurons of rats (n= 10)

	Open time (L /ms)	Close time (L /ms)	Current amplitude(pA)	Open-state probability
Control	2.85± 0.21	38.18± 8.24	1.56± 0.05	0.047± 0.008
Ischemia	9.11± 1.04***	10.13± 3.36***	1.57± 0.07	0.165± 0.029***
PDS	2.14± 0.35***###	46.34± 9.55***###	1.56± 0.09	0.021± 0.009***###
Verapamil	0.86± 0.11***###	75.32± 11.54***###	1.56± 0.06	0.014± 0.009***###

*: P < 0.05,**: P < 0.01,***: P < 0.001 *vs* control; ###: P < 0.001 *vs* ischemia

3　讨论

脑缺血是危害人类健康的重要疾病之一,国内外对其损伤机制进行了广泛的研究,认为自由基产生、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸的神经毒以及一氧化氮的毒性作用等起重要作用。在缺血过程中,细胞内钙的急剧增高与缺血性细胞损伤、以及缺血后迟发性神经元死亡等密切相关,而脑内钙增高可能与细胞膜电压依赖性钙通道、NMDA受体通道的开放有关。因为应用钙通道阻断剂和 NMDA受体阻断剂均可减少脑缺血所致的胞内钙累集,从而减轻脑损伤、降低梗塞体积、产生脑保护作用[4,7]。但这些结果均是通过间接手段推测膜通道的变化,而缺乏直接证据。本实验采用急性分离大鼠大脑皮层神经元,用缺氧缺糖来模拟体内的"缺血"状态,从而建立了体外"缺血"模型。应用膜片钳单通道记录方法证明,在"缺血"过程中,大鼠大脑皮层神经元 L型钙通道开放明显增加,且出现了长达 20 ms以上的长时程开放,而平均关闭时间明显缩短,开放概率明显增加。因此,L型钙通道的开放时间延长是导致脑内钙急剧增高的重要原因之一。

人参皂甙是中药人参的主要活性成分之一。其总皂甙可增加脑缺血再灌注脑血流量、减轻脑水肿、减少胞内钙累集[5]。单体皂甙 Rb1 Rg1可减少局灶性脑缺血的钙累集和钾丢失[6],说明人参皂甙对脑缺血有保护作用,而其主要作用之一就是减少了脑内钙累集。从本实验结果来看,PDS 1.5 mg/ml可显著抑制正常和"缺血"诱导的大鼠大脑皮层神经元 L型钙通道开放,使其平均开放时间明显缩短,"缺血"所致的长时程开放消失,平均关闭时间延长,降低"缺血"所致的开放概率增加,说明 PDS可抑制正常和"缺血"诱导的 L型钙通道的开放,从而减少了"缺血"时胞内的钙累集,可能对脑缺血有保护作用。本研究证实了其作用与经典的钙通道阻断剂 Ver作用相似,但稍弱。

本研究应用膜片钳技术证实了"缺血"过程中大鼠大脑皮层神经元 L型钙通道开放时间延长、钙内流量增加,PDS可以抑制正常和"缺血"状态下的开放,这可能是其脑缺血保护作用的机制之一,为研究中药来源的脑缺血保护剂提供了有力的证据。

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

参考文献

1 Bonnekoh P, Kuroiwa T, Kloiber O *et al*. Time profile of calcium accumulation in hippocampus, striatum and frontoparietal cortex after transient forebrain ischemia in the gerbil. Acta Neuropathol, 1992; 84(4): 400

2 Mitani A, Yanase H, Sakai K *et al*. Origin of intracellular Ca^{2+} elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. Brain Res, 1993; 601(1-2): 103

3 Barone F C, Price W J, Jakonbsen P *et al*. Pharmacological profile of a novel neuronal calcium channel blocker includes reduced cerebral damage and neurological deficits in rat focal ischemia. Pharmacol Biochem Behav, 1994; 48(1): 77

4 Rami A. Kriegistrin J. Neuronal protective effects of calcium antagonists in cerebral ischemia. Life Sci, 1994; 55(25-26): 2105

5 张英鸽,刘天培.人参总皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用.中国药理学与毒理学杂志, 1994; 8(1): 7

6 张英鸽,刘天培.人参皂甙 Rb1和 Rg1对大鼠可逆性局灶性脑缺血的影响.中国药理学报, 1996; 17(1): 44

7 Lobner D, Lipton P. Intracellular calcium levels and calcium fluxs in the CA_1 region of the hippocampal slice during in vitro ischemia: relationship to electrophysiological cell damage. J Neurosci, 1993; 13(11): 4861

(收稿: 1996-12-06;修回: 1997-03-28)

(编辑 张大春)

Effects of panaxadiol saponins on the L-type calcium channel of cortical neurons of rats in normal and "ischemia"

Kai Li, Wang Zhongfeng*, Xiao Jiasi* (Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: To study the effects of panaxadiol saponins(PDS) on the L-type calcium channel of cortical neurons of rats in normal and "ischemia". **Methods**: Using acutely isolated cortical neurons of Wistar rats to estabilish the *in vitro* cerebral "ischemic model" and patch clamp technique of cell-attached configulation. **Results**: The results indicated that the open time of L-type calcium channel of rat cortical neurons was increased, at the same time, the close time decreased and the open-state probability increased significantly during "ischemia". The particular change was long-lasting open (the open time was more than 20 ms). PDS (1.5 mg/ml) shorten the open time, prolong the close time and decrease the open-state probablity in normal and "ischemia"-like condition (P all < 0.001). These results were consistent with calcium antagonist verapamil, but were less than that of verapamil. **Conclusion**: The experiment suggested that PDS inhibited the open of L-type calcium channel in cortical neurons of rats in normal and "ischemia", reduced the calcium inflow, and may protect brain from the ischemic injury.

Key Words patch clamp; calcium channel; cortical neurons; ischemia-like condition; panaxadiol saponins; rats

* Department of Physiology

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