DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.008

蛋白激酶 C激动剂 PMA对培养神经元胞内游离钙的影响*

陈康宁** 董为伟 张 帆 (第三军医大学附属西南医院神经内科) 重庆,400038

提 要 目的: 探讨蛋白激酶 C(PKC)激活参与神经元损伤的机理。方法: 采用新生 Wistar大鼠神经元分散培养,观察 PKC激动剂 PMA对培养神经元的毒性率及神经元内游离钠的影响。结果: PMA可以明显地增加细胞内游离钙和神经元的毒性率。结论: PKC激活引起神经元损伤可能是通过引起钙聚积来实现的。

关键词 蛋白激酶 C,神经元内游离钠;神经元损伤

中图法分类号 R745

PKC通过对蛋白质的磷酸化,在神经元兴奋性调节、信号传递、突触塑形、细胞增殖中起着关键的作用[1]。近年来,PKC在神经元缺血损伤中的作用倍受人们的重视,但是 PKC激活参与神经缺血损伤的机理尚不清楚[2],有人推测与 PKC激活参与了细胞内钙的调节有关。为提供 PKC激活参与细胞内钙调节的直接依据,我们采用新生 Wistar大鼠大脑神经元分散培养模型,用 PKC激动剂—— PMA处理培养神经元,观察神经元胞内游离钙和 PMA的毒性率,旨在探讨 PKC参与神经元损伤的机理。

1 材料和方法

1.1 神经元分散培养的试剂

从 GIBCO/BRL生命技术有限公司及 Sigma/Aldrich公司购得。Fura-2/AM由中国医学科学院提供。

1.2 二氧化碳培养箱

为 Sheldon-M2306型。

1.3 神经元的分离

取一窝新生鼠(出生 24 h以内,6~10只),用 70%乙醇浸泡消毒 3~5 min,迅速断头取脑,置于 4℃孵化液中,体视显微镜下去除脑膜,分离出皮层和基底节,将其切成碎片,转移入离心液中,加入 10~15 ml胰蛋白酶(0.25%),200μl DNase I(0.2%),37℃消化 10 min,以吸液轻轻吹打分散细胞。加入 200μl DNase I,1000 r/min离心 5 min,去除上清液。加入 15 ml含 20%小牛血清的培养基,吹打混匀。1000 r/min离心 5 min,去除上清液。加 15 ml含 10%小牛血清的培养基,吹打混匀。取 50μl细胞悬液,以 0.08%台盼蓝染色,光镜下观察细胞存活率,达 95%以上,可以用于细胞培养。另取 50μl细胞悬液,光镜下以血球计数板计数。

1.4 细胞培养

将制备的细胞悬液按 1×10⁶/ml种植于 96孔板内,用于细胞毒性率的观察。用 1×10⁶种植于 6孔板内,用于细胞内钙浓度的测定。种植后次日更换培养基(更换 2/3),以后每 3 d更换 1次培养基。种植后第 3、5、7 d加入阿糖胞苷(终浓度为 30μmol/L),以抑制胶质细胞生长。

1.5 PMA的干预

于种植后第 8天,按 5ng/ml、10ng/ml加入 PMA,观察 PMA对神经元毒性作用及对细胞内游离钙的影响。每一处理方式包括 3~6复孔。48 h以后进行以下的测定。

1.6 MTT法测定细胞毒性率

参照孙绩耀等人 MTT过夜检测法,略加改变。即助溶剂 10% Triton-50%异丙醇中加入稀盐酸酸化,以避免酚红干扰测定。按 Green等[3]的方法计算 PMA对神经元的毒性率:

$$细胞毒性率=\left(1-\frac{D处理}{D对照}\right)\times 100\%$$

D为 550 nm的吸光度值。

1.7 培养神经元内游离钙测定

参照 Daily等[4]的方法。培养细胞用 0.125%胰蛋白酶消化 20 min(37℃),用 10%小牛血清中止消化。1000 r/min离心 5 min,于沉淀中加入完全培养基,然后加入 Fura-2/AM(终浓度为 5μmol/L),37℃恒温振荡负载 30 min,用荧光分光光度计测定光值。从而测定游离钙浓度(nmol/L)。

1.8 统计处理

采用 Oxstal-II 程序进行统计处理。

2 结果

2.1 PMA神经元毒性率

正常对照组神经元的毒性率为 3.71%±3.07%,加入 5ng

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670269

** 陈康宁,男,33岁,讲师,博士

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

PMA后,细胞毒性率明显增加达 30.71%± 6.10% (与对照组相比, $P < 0.001$),加入 10ng PMA后,细胞毒性率进一步的增加,不但明显高于对照组,而且明显高于加入 PMA5ng组(P 值均 < 0.001),见表 1.

表 1　PMA对神经元毒性率及细胞内钙的影响($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effect of PMA on neuronal toxic rate and Ca^{2+} content ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

	Control	PMA(5ng)	PMA(10ng)
Activity (%)	3.71± 3.07	30.71± 6.10*	44.68± 4.60*△
Calcium (C_B/nmol·L^{-1})	115.7± 18.1	251.89± 8.84*	422.9± 10.87*△

*: $P < 0.001$ *vs* control; △: $P < 0.001$ *vs* PMA(5ng)

2.2　PKC激动剂

PMA对培养神经元细胞内钙的影响,本组培养神经元胞内游离钙浓度为 115.7± 18.1 nmol/L,加入 5ng PMA后,细胞内钙明显增加(与对照组相比, $P < 0.001$). 加入 10ng PMA后,神经元内钙达对照组的 3.7倍,明显高于对照组及加入 5ng PMA组(P 均 < 0.001),见表 1.

2.3　细胞内钙增加与神经元毒性的关系

经相关性检验, $r = 0.98$, $P < 0.001$,说明细胞内钙增高与神经元毒性率密切相关.

3　讨论

自 PKC被发现以来,其生理作用受到了人们的极大重视. 近年来,人们又发现 PKC在许多病理条件下起着重要的作用.

1993年, Domanska等[5]发现脑缺血可以诱导 PKC的移位激活,推测 PKC的确参与了神经元的缺血损伤. 以后,许多作者的研究都证明了这一点. 然而,对 PKC激活参与神经元缺血损伤的机理尚不清楚.

我们的研究发现, PKC的激动剂 PMA可以引起培养神经元内游离钙浓度增加. 当加入 5 ng PMA时,神经元内游离钙增加更为明显地高于对照组,随 PMA量的增大—— 当加入 10 ng PMA时,神经元内游离钙增加更为明显,不仅明显地高于对照组,而且明显地高于 5 ng PMA组. 经相关性检验证明细胞内钙增高与神经元毒性率密切相关. 结果提示, PKC的激活,可以促进神经元内钙积聚. 由此我们推测,缺血条件下 PKC激活参与神经元损伤,可能与 PKC激活促进细胞内钙积聚有关. 细胞内钙积聚可以激活一系列蛋白酶、蛋白激酶、磷脂酶,从而导致神经元的损伤. 我们的研究也发现,随着 PMA剂量的增大,细胞内钙积聚越明显,细胞损伤也越明显(细胞毒性率明显的升高).

PMA致 PKC激活,从而导致细胞内钙聚积的可能与以下几点有关:① PKC磷酸化底物消耗了 ATP(由 ATP提供磷基),从而干扰依赖于 ATP的细胞内钙的泵出[6];② PKC可以使 NMDA受体磷酸化,磷酸化以后的 NMDA受体,其开启更容易,而且 Mg^{2+} 对其阻滞的作用明显降低,从而介导钙内流[6];③ PKC激活,可以降低 G蛋白依赖的钙通道阻滞作用,从而导致钙从这些通道大量的内流[7];④ PKC激活,抑制了神经元对兴奋性氨基酸谷氨酸的摄取,加重了细胞外谷氨酸的堆积,通过激活 NMDA受体,增加钙内流[8];⑤ PKC激活,磷酸化电压依赖的钙通道,直接促进钙内流[9].

我们的研究发现, PMA激活 PKC,可以导致神经元的损伤. 在加入 5 ng PMA时,毒性率为 30.71%± 3.07%,明显地高于对照组,当加入 10 ng PMA,毒性率较对照组增加了 3倍多. 在离体实验,证实了 PKC激活可以导致神经元的损伤. PKC激活导致神经元损伤,这是通过促进细胞内钙聚积而实现的. 细胞内钙聚积,可以通过影响线粒体结构与功能、激活蛋白酶、蛋白激酶、促进兴奋性氨基酸释放、促进自由基生成等途径导致神经元损伤.

我们的结果提示, PKC激活可以促进钙积聚,从而导致神经元损伤.

参考文献

1 Nishizuka Y. Moleculan heterogencity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. Nature, 1988, 334 (6184): 661

2 Chen K N, Dong W W. The role of PKC in the progress of ischemic Neuoonal injury: Approach to the mechanism. J Neurochem, 1996, 67(Suppl): S44

3 Green L M, Reade J L, Ware C F. Rapid colormetric assay for all injury viabi-lity: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitor, lymphokines. J Immun Methe, 1984, 70(2): 257

4 Dildy J E, Leslie S W. Ethanol inhitits NMDA-induced increase in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cell. Brain Res, 1989, 499(2): 383

5 Domanska J K, Zablocka B. Protein Kinase C as a early and sensitive maker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. Mol Chem Neuropathol, 1993, 20(2): 111

6 Chen L, Nuang L Y M. Potein Kinase C reduced Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. Nature, 1992, 356(6369): 521

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

7 Swartz K J. Modulation of Ca^{2+} channels by kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. Neuron, 1993, 11(2): 305
8 卢步峰,鲁友明,黄诒森. PKC对大鼠缺血海马突触体 Glu摄取的调控作用. 生物化学杂志, 1994, 10(3): 371
9 Hall K E, Browing M D, Dudek E *et al*. Enhancement of high thseshold calcium currents in rat primary afferent neuron by constitutively active protein kinase C. J Neurosci, 1995, 15(9): 6069

(收稿: 1997-05-20;修回: 1997-08-26)
(编辑 王 红、沈锡庚)

Effects of PMN, an activator of protein kinase C, on free calcium in cultured rat neurons*

Chen Kangning, Dong Weiwei, Zhang fan (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the mechanism of participation of activated protein kinase C (PKC) in damaging the neurons. Methods: The neurons dissected from the neonatal Wistar rats were cultured to observe the effects of PMN, an activator of PKC, on changes of intraneuronal free calcium and neuronal toxic rate. Results: PMN could markedly increase the content of intraneuronal free calcium and the neuronal toxic rate. Conclusion: The activation of PKC causes the damage of the neurons through mediating accumulation of intraneuronal free calcium.

Key words protein kinase; intraneuronal free calcium; neuronal injury; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39670269

唇裂术后5天呼吸道梗阻一例

Report case of respiratory tract obstruction 5 days after repairment of the clefe lip

肖 朝林* (第三军医大学附属新桥医院口腔科) 重庆, 400037

1 临床资料

患儿,男性, 1岁。因上唇裂开要求整复入院,诊断为双侧先天性唇腭裂(III°)。入院后查体无阳性征、无哮喘病史;常规实验室检查未见异常。于1996年8月28日在气管插管全麻下行双侧唇裂整复术。麻醉复苏缓慢,体温38℃~40℃左右,生命体征平稳, 10 h后清醒。术中及术后检查无误吸血凝块。术后第5天早晨8时20分,患儿突然出现呼吸困难,面唇部紫绀、窒息。经迅速吸痰、采取头侧卧位后,患儿出现呕吐,内容物似蛋花样。经吸痰、给氧后症状缓解。手术后10 d痊愈出院。

2 讨论

呼吸道意外是唇裂整复术后的严重并发症,但术后5 d出现呼吸道意外却罕见[1]。本例患儿在突发性呼吸困难前有一明显地后仰动作。由于患儿术后一直食用牛奶制品,且食用次数多、浓度高,而胃蛋白酶对蛋白质的消化不完全,从而使未消化蛋白质凝结沉积于胃,当发生体位变化时,使胃内容物倒流于食管,误吸后致上呼吸道梗阻。术后第5天出现并发症往往给诊断带来一定困难。因此要求护理人员及其家属,应对唇裂术后患儿的活动幅度严格控制,密切加以观察,并在饮食方面加以调配,不宜食用单一高蛋白食物,这样的严重并发症是可以预防的。

关键词 唇裂;呼吸道梗阻
中图法分类号 R782

参考文献

1 尹 音,胡 敏 主编. 儿童口腔病学. 北京: 人民军医出版社, 1994. 130~132

(收稿: 1997-02-11;修回: 1997-07-12)
(编辑 张大春)

* 肖朝林,男, 32岁,住院医师,进修生,总后勤部第8医院 贵阳, 550002

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