DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.020

梭曼中毒复合缺氧损伤对 PC12细胞游离钙的影响

吴 强* 董兆君 魏相德 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室) 重庆, 630038

提 要 目的: 探索钙在梭曼中毒神经细胞损伤中的作用及其机理。方法: 采用 Ca^{2+} 指示剂 Fura-2作为细胞内钙离子荧光探针,检测了梭曼中毒复合缺氧损伤时 PC12细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。结果: 单纯梭曼对细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响,在乙酰胆碱和/或谷氨酸存在的情况下,梭曼中毒可明显升高 $[Ca^{2+}]_i$,单纯缺氧也可使 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,梭曼中毒复合缺氧损伤 $[Ca^{2+}]_i$ 升高更加明显。尼莫地平可对抗梭曼中毒引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。结论: 梭曼中毒复合缺氧损伤可导致神经细胞钙通道开启,从而使 PC12细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,进而引起神经细胞损伤或死亡。

关键词 梭曼中毒;缺氧;神经细胞;钙
中图法分类号 R827.17

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,且在神经细胞的损伤和死亡中起重要作用[1]。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(NGF)存在下培养表现出的细胞形态、结构和功能皆类似于交感神经细胞,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相互作用的细胞模型[1]。梭曼(Soman)是一种强有力的胆碱酯酶抑制剂,一般认为抑制胆碱酯酶,造成乙酰胆碱大量堆积,作用于胆碱能受体而引发一系列效应是其中毒的主要机理。最近有报道指出,梭曼中毒和缺氧可导致神经元损伤[2,3]。钙在梭曼中毒引起的神经元损伤中是否也起同样作用,其作用机理如何,国内尚未见报道。本实验利用 Fura-2荧光探针检测了梭曼中毒复合缺氧损伤时 PC12细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化,旨在探索钙在梭曼中毒神经元损伤中的作用及其机理。

1 材料与方法

1.1 试剂

梭曼(纯度 91.6%)由军事医学科学院提供,用丙三醇配成 1%母液,临用时以生理盐水配制成所需浓度; Fura-2/AM 由中国科学院上海药物研究所惠赠,用 DMSO(二甲基亚砜)溶解成 1 mmol/L)溶液,分装置 -20℃避光保存; RPMI-1640购自 GIBCO公司; HEPES(N-(2-羟乙基)哌嗪-N′-2-乙烷磺酸)为进口分装试剂,购自上海生物化学试剂公司;其余药品为国产分析纯。人工 CSF组成(mmol/L): NaCl 132.0, KCl 5.0, $CaCl_2$ 1.0, $MgCl_2$ 1.0, Na_2HPO_4 0.4, GS 10.0, HEPES 10.0 pH 7.4

1.2 仪器

美国 SHEL. LAB-2300二氧化碳培养箱;日本 HITACHI MPF-4荧光光度计。

1.3 细胞培养和处理

PC12细胞悬浮于含 10%马血清、5%胎牛血清及 50 U/ml 链霉素的 RPMI-1640培养液,在 37℃、通以 5% CO_2, 95%空气的培养箱中培育。用台盼蓝排斥法检测细胞活力。

细胞损伤模型: 将 PC12细胞悬液暴露于 90% N_2, 5% O, 5% CO_2的混合气体中培养不同时间而造成不同程度的缺氧;变动细胞培养液中梭曼浓度造成不同程度的梭曼中毒。复合致伤则同时暴露于缺氧及梭曼中毒。

1.4 Fura-2负载和荧光检测

培养成功的细胞用人工 CSF清洗两次, 1000 r/min离心,然后用 Fura-2/AM(终浓度 2μmol/L)负载, 37℃,震荡培养 45 min,用上述人工 CSF清洗两次,最后用人工 CSF悬浮 PC12细胞(10^6/L), $[Ca^{2+}]_i$ 的荧光检测: 激发波长 340 nm和 380 nm,光栅 5 nm;发射波长 510 nm,光栅 10 nm。分别加入 1% Triton和 20 mmol/L EGTA测最大和最小荧光强度。$[Ca^{2+}]_i$ 的计算参照 Grynkiewicz[4]的方法进行。

1.5 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理用两样本均数据的 t 检验。

2 结果

2.1 梭曼中毒后 PC12细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

在细胞外钙为 1 mmol/L时,梭曼对 PC12细胞静息状态的 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响,但在乙酰胆碱(10μmol/L)和/或谷氨酸(10μmol/L)存在的情况下,加入梭曼后 PC12细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高非常明显,并呈剂量依赖关系,见表 1

* 吴 强 男, 26岁,助教

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

表 1　梭曼中毒后 PC12细胞游离钙的变化 (n= 8,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of $[Ca^{2+}]_i$ in PC12 cell induced by soman intoxication (n= 8,$\bar{x}\pm s$)

Soman(μmol/L)	$[Ca^{2+}]_i$(nmol/L)			
	Res	Ach	Glu	Ach/Glu
Control	106.8± 13.7	113.3± 13.4	110.7± 15.3	115.5± 21.2
0.1	119.2± 14.7	130.1± 15.6	141.4± 22.5	149.1± 27.6
1.0	124.5± 17.6	154.0± 16.5	196.4± 22.5*##	226.1± 26.9*##
5.0	132.2± 16.3	203.4± 22.9*	242.8± 36.6*##	298.8± 27.6*##

Res: resting status; Ach: acetylcholine (10μmol/L); Glu: glutamic acid (10μmol/L); Ach/Glu: acetylcholine (10μmol/L) and glutamic acid(10μmol/L). Cells were exposed to indicated concentrations of Ach or Glu or Ach/Glu, $[Ca^{2+}]_i$ was determined with Fura-2 after 15 minutes of soman inducing. *: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* Res;#: $P<0.05$,##: $P<0.01$ *vs* control

2.2　梭曼中毒复合缺氧损伤 PC12细胞 $[Ca^{2+}]_i$的变化

将 PC12细胞悬液(含 10μmol/L Ach和 10μmol/L Glu)暴露于 90% N_2/5% $O_2$5% CO_2的混合气体中培养不同时间而造成不同程度的缺氧,发现随时间延长,由于缺氧损伤而造成 $[Ca^{2+}]_i$升高呈增加趋势;梭曼中毒复合缺氧损伤 PC12细胞 $[Ca^{2+}]_i$升高程度较单纯梭曼中毒和缺氧损伤更为明显见表 2.

表 2　梭曼中毒复合缺氧损伤 PC12细胞游离钙的变化 (n= 8,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of $[Ca^{2+}]_i$ induced by soman intoxication combined with hypoxia. (n= 8,$\bar{x}\pm s$)

Soman(μmol/L)	$[Ca^{2+}]_i$(nmol/L)			
	0 h	2 h	8 h	24 h
Control	115.5± 21.2	131.1± 16.7	196.0± 15.4#	248.5± 14.8*#
0.1	149.1± 27.6	158.7± 16.6	214.6± 22.6#	268.6± 21.8*#
1.0	266.1± 27.6##	295.4± 18.8##	339.9± 29.3*##	384.2± 20.4*##
5.0	298.8± 27.6##	314.4± 22.3##	370.0± 16.1*##	427.6± 22.6*##

Cell were exposed to indicated concentrations of Ach/Glu (10μmol/L). $[Ca^{2+}]_i$ was determined with Fura-2 after 15 minutes of soman inducing.*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* the value of 0 h hypoxia;#: $P<0.05$,##: $P<0.01$ *vs* control

表 3　尼莫地平对梭曼中毒和/或缺氧损伤引起的游离钙升高的影响

Tab 3　Effects of nimodipine on $[Ca^{2+}]_i$ contents induced by soman intoxication

Group	$[Ca^{2+}]_i$(nmol/L)	
	Nimodipine(-)	Nimodipine(+)
Control	115.2± 21.2	109.5± 13.7
Soman	226.1± 26.9	139.5± 11.1**
Hypoxia	248.5± 14.8	227.5± 14.0
Soman+ Hypoxia	384.2± 20.4	240.1± 11.0**

Cell were exposed to indicated concentrations of Ach/Glu (10μmol/L). Nimodipine was included in the culture medium 15 minutes before the addition of soman. *: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* Nimodipine(-)

2.3　尼莫地平对梭曼中毒和/或缺氧损伤引起的 $[Ca^{2+}]_i$升高的影响

在培养液中加入尼莫地平(1μmol/L)后,梭曼中毒组(1μmol/L)和梭曼中毒复合缺氧损伤组(1μmol/L, 24 h)的 $[Ca^{2+}]_i$分别由 226.1± 26.9, 384.2± 20.4下降至 139.5± 11.1, 240.1± 11.0($P<0.05$),缺氧损伤组(24 h)由 248.5± 14.8下降至 227.5± 14.0($P>0.05$),提示尼莫地平对梭曼中毒引起的 $[Ca^{2+}]_i$升高有明显的抑制作用,而对缺氧损伤导致的 $[Ca^{2+}]_i$升高无明显影响,见表 3.

3　讨论

越来越多的学者认为,钙超载(Overload)是导致细胞死亡的最后共同通路[5,6]。许多因素,诸如细菌、病毒和某些药物都能导致细胞内 $[Ca^{2+}]_i$的升高甚至超载,从而介导一系列 Ca^{2+}依赖性活动,干扰细胞生长

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

和发育,最终导致细胞死亡。细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加通常是细胞外钙的涌入或细胞内钙库的释放所致,而钙通道和钙释放通道在其中担任重要的调节、平衡作用[7]。新近研究表明,谷氨酸作为一种中枢兴奋性神经递质在神经元的损伤钙内流过程中发挥重要作用,并指出,谷氨酸能作用 NMDA受体,直接开放受体操纵性钙通道,使细胞膜去极化而打开电压依赖性钙通道以及内源性储存钙的释放。

本实验结果显示,单纯梭曼中毒对 PC12细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响,而乙酰胆碱和 或谷氨酸存在的情况下,梭曼可致 PC12细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 显著增加;缺氧也可导致 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,梭曼中毒复合缺氧损伤对 $[Ca^{2+}]_i$ 升高更加明显。尼莫地平是一种二氢吡啶类钙通道阻滞剂,对乙酰胆碱和谷氨酸介导的梭曼中毒所致 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高有明显的抑制作用,而对缺氧损伤所致 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响。由此推测,梭曼引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高乃是由乙酰胆碱和谷氨酸共同介导,间接作用于钙通道而使外钙内流;缺氧损伤所致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能是缺氧造成能量代谢障碍,开启细胞内钙释放通道,使细胞内储存钙释放所致。梭曼中毒复合缺氧损伤则是以上两种因素共同所致。因此,在梭曼中毒复合缺氧损伤所造成的神经元损伤过程中,$[Ca^{2+}]_i$ 的升高及超载起了重要作用,而钙的升高及超载则可能是胆碱能系统和兴奋性氨基酸共同介导所致,但也不排除其它因素的参与。至于其具体作用机理,有待于进一步研究。

参考文献

1 Shafer T J, Atchison W D. Transmitter, ion channel and receptor properites of PC12 cells: a model for neurotoxicological studies. Neurotoxicology, 1991, 11(1~3): 473

2 Anderson D R, Harris L W, Bowersox S L *et al*. Efficacy of injectable anticholinergic drugs against soman-induced convulsive activity. Drug Chem Toxicol, 1994, 17(2): 139

3 McDonough J H Jr, McLeod C G Jr, Nipwoda M T. Direct microinjection of soman or VX into the amygdala produces repetitive limbic convulsions and neuropathology. Brain Res, 1987, 435(1~2): 123

4 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properyies. J Biol Chem, 1985, 260(6): 3440

5 Choi D Wj. Excitotoxic cell death. J Neurobiol, 1992, 23(4~6): 1261

6 Larmet Y, Dolphin A C, Davis A M. Intracellular calcium regulates the survivial of early sensory neurons before they became dependent on neurotrophic factors. Cell, 1992, 69(4~6): 567

7 张均田,郑永芳.细胞内钙和钙通道.见:韩济生 主编,神经生物学纲要.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993. 163~176

(收稿:1996-10-17;修回:1997-06-17)
(编辑 王 红)

Effects of soman intoxication combined with hypoxia on the free calcium concentration in PC12 cells

Wu Qiang, Dong Zhaojun, Wei Xiangde (Department of Toxicology, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To explore the role of calcium in the injury of nerve cells induced by soman intoxication and its mechanism. Methods: The changes of free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in PC12 cells were determined using Ca^{2+}-sensitive indicator Fura-2 as the fluorescent probe for intracellular Ca^{2+}. Results: Soman intoxication could remarkably increase $[Ca^{2+}]_i$ at the presence of acetylcholine/glumatic acid (10μmol/L) and hypoxia also could do that. The increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by soman intoxication combined with hypoxia was much higher than that induced by soman intoxication or hypoxia only. This increase could be remarkably reversed by nimodipine. Conclusion: Soman intoxication combined with hypoxia can open the calcium channel in nerve cells, which results in the increase of intracellular $[Ca^{2+}]_i$. As a result, the injury or death of nerve cells occurs.

Key words soman intoxication; hypoxia; nerve cell; calcium

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