DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.011

牛磺酸减轻兴奋性氨基酸对培养新生大鼠小脑皮层神经元的损害*

杨 忠 蔡文琴 (第三军医大学基础部组织胚胎学教研室)重庆,630038

提 要 取新生大鼠小脑皮层进行体外神经细胞培养,用兴奋性氨基酸建立离体的神经元损害模型,观察了不同浓度牛磺酸对兴奋性氨基酸神经毒性的影响。结果表明:500 μmol/L 谷氨酸或使君子酸均能造成培养神经元大量死亡,培养液中乳酸脱氢酶含量同步明显增高,在培养液中加入牛磺酸能明显降低神经细胞死亡率,其中以 2.0 mmol/L 浓度效果最为明显。提示牛磺酸可拮抗兴奋性氨基酸神经毒性。

关键词 牛磺酸;兴奋性氨基酸;神经元;大鼠

中图法分类号 R338.1

兴奋性氨基酸是脑内主要的兴奋性神经递质,在脑损伤等病理情况下它参与了对神经元的损害已获公认。牛磺酸是人体内含量极高的游离氨基酸,在中枢神经系统含量仅低于谷氨酸(一种主要的兴奋性氨基酸),属抑制类神经递质;已有研究提示牛磺酸在一些病理条件下对神经元有保护作用[1]。本研究用离体的兴奋性氨基酸神经毒性模型,观察了牛磺酸对兴奋性氨基酸神经毒性的影响,以期为脑损伤时神经元的保护提供线索。

1 材料与方法

1.1 小脑皮层神经元培养

取生后一周内 Wistar 大鼠小脑皮层,放于盛有 D-Hanks 平衡盐液(无 Ca^{2+},Mg^{2+})的培养皿内,在解剖镜下剥除脑膜后,剪成碎块,于 D-Hanks 液中 37℃水浴 10 min;吸去液体,加入 0.1%胰酶溶液,37℃水浴 30 min,吸去胰酶溶液,用含有 10%胎牛血清的培养液洗涤 2~3 次,吸干;再加入适量含 10%胎牛血清的培养液,用细口径吸管反复轻轻抽吸,直到形成均匀的细胞悬液。用血球计数板计数细胞;取预先涂有多聚赖氨酸的 22 mm×22 mm 的盖片放入直径 35 mm 的培养皿内,每片约种植(2~4)×10^5 个细胞,静置于 CO_2 培养箱(37℃,含 5% CO_2 空气)4 h,然后每皿加培养液 2 ml。培养液成分为:F_{12}/DMEM,补加葡萄糖 30 g/L,青霉素 10^5 U/L,链霉素 10^5 U/L,氯化钾 25 mmol/L 及 10%胎牛血清(胎牛血清为 Gibco 公司产品,F_{12}、DMEM 购自 Sigma 公司)。培养 24 h 后加 10^{-5} mol/L 阿糖胞苷(Ara-c,Sigma)以抑制非神经细胞增殖,持续使用至实验结束;其间每 2 d 换液一次,每次约换一半液体。培养 5~6 d 后开始实验。

1.2 培养皮层神经元鉴定

将盖玻片标本用 F_{12} 洗涤 2 次,加破伤风毒素 100 μl(50 mg/L,Calbiochem 产品)孵育 30 min,冲洗后用马抗破伤风毒素 100μl(1500u,武汉生物制品所)孵育 30 min,冲洗后再用罗丹明标记的兔抗马免疫球蛋白 G(稀释度 1∶40,Sigma 产品)4℃孵育 30 min。最后用冷冻酸酒精(冰乙酸:无水乙醇为 1∶20)固定 10 min,荧光显微镜观察。

1.3 兴奋性氨基酸神经毒性模型的建立

参照 Choi 等方法[2],培养 5 d 的细胞先收集培养液,Tris 缓冲液洗涤 2 次,然后置于含 500 μmol/L 谷氨酸或使君子酸的 Tris 缓冲液中,作用时间 5 min,温度约 20℃,作用结束后用 DMEM 培养液洗涤 2 次,重加入上述收集的培养液,继续培养 24 h。对照用不含兴奋氨基酸的 Tris 缓冲液。Tris 缓冲液的成分为:120 mmol/L 氯化钠,5.4 mmol/L 氯化钾,1.8 mmol/L 氯化钙,25 mmol/L Tris 盐酸(pH7.4),15 mmol/L 葡萄糖。

1.4 实验分组

在谷氨酸、使君子酸两种不同兴奋性氨基酸造成损伤模型基础上,设立 6 个牛磺酸浓度组,即将牛磺酸按不同浓度分别溶于最后一次换液的培养液中,6 个浓度为 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,10.0 mmol/L,共分两部分(谷氨酸处理部分、使君子酸处理部分)12 组,每组设 3~5 皿,重复 3 次,观察不同浓度牛磺酸对兴奋性氨基酸神经毒性的影响。

1.5 细胞染色计数

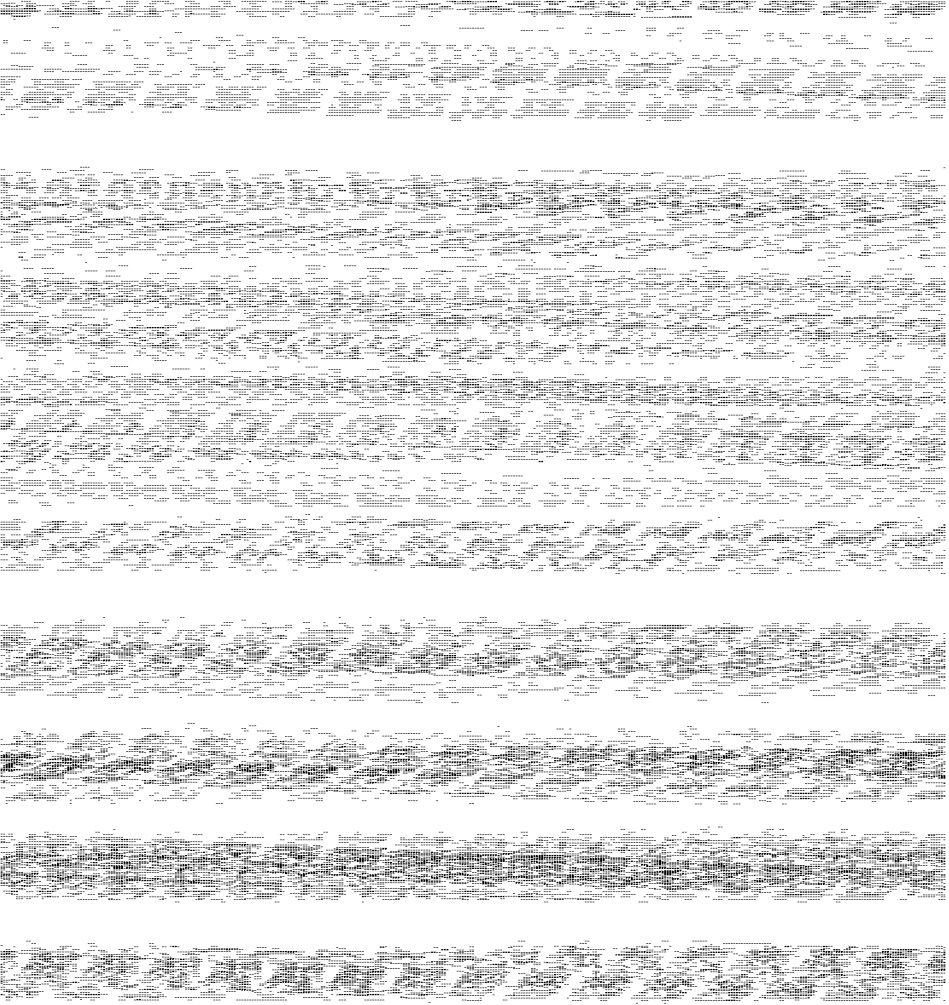
上述经药物处理继续培养 24 h 的细胞,用 Tris 缓冲液轻洗 2 次;后以 Tris 缓冲液配制的 0.4%台盼蓝溶液直接滴于盖片样本上,每片约 200 μl,3 min 左右镜下观察;每一标本(盖片)随机计数 500 个相邻细胞中蓝染(死亡细胞)及未蓝染(活存细胞)细胞个数,计算神经元死亡百分率或活存率。

1.6 培养液乳酸脱氢酶检测

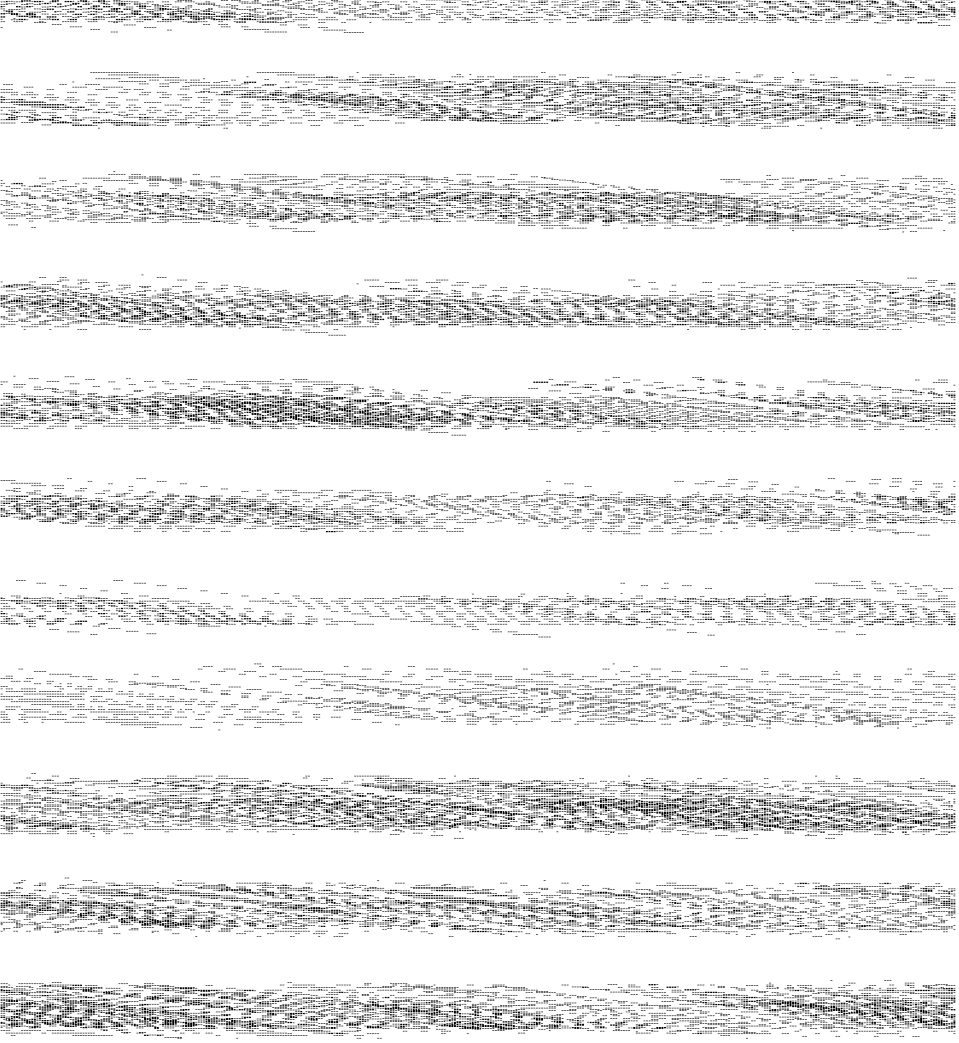
上述经处理继续培养 24 h 的样本,分别收集其培养液,

* 全军"八五"攻关项目

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



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



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

Kainate- and quisqualate-stimulated release of taurine from electrophysiologically monitored rat hippocampal slices. Brain Res，1991；549：1

（收稿：1995-04-19；修回：1995-12-26）
（编辑　仇玉福）

Taurine minimizes excitatory amino acid-induced neurotoxicity on cultured neonatal rat cerebellar cortical neurons

Yang Zhong，Cai Wenqin（Department of Histology and Embryology，Third Military Medical University，Chongqing，630038）

Abstract　The effects of taurine on the excitatory amino acid-induced toxicity to cultured neonatal rat cerebellar cortical neurons were observed. The death of the neurons was determined with 0.4% trypan staining and the overall cell injury assessed with the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity. The findings were as follows：(1) The cultures were treated with 500 μmol/L of glutamine and quisquallate in Tris buffer for 5 min and the death rate of the neurons in 24 h was 41.8%±3.5%，47.1%±3.5% respectively. (2) 1.0，2.0，4.0 and 6.0 mmol/L of taurine exerted obvious protection to the cultures and the maximal protection was found when 2.0 mmol/L of taurine was used since the death rate of neurons was decreased to 25.1%±1.9% (Glu group) and 30.6%±3.0% (QA group) respectively. Our findings suggest that taurine can antagonize the neurotoxicity of excitatory amino acids.

Key words　taurine；excitatory amino acid；neurotoxicity；rat

（上接 18 页）

10例患者均行B超检查，3例见宫内胚囊完整，6例见宫腔内有绒毛组织残留，1例见宫腔内无内容物，但见子宫右侧有一包块与子宫紧密相连，诊断不明。

1.2　腹腔镜检查及处理

手术均在局麻下施行，例1子宫后壁见两个穿孔，分别为0.8 cm和0.5 cm大小，有少量活动性出血，大网膜见出血点及血凝块，小肠壁浆膜有三处损伤灶，患者子宫颈细长，直视下经阴道探针不能进入宫腔。例2系双子宫畸形，左子宫妊娠，两子宫间有2个小穿孔，无活动性出血，直视下经多次试探，器械均未能进入左子宫，此2例均改为剖腹手术，术者一手在腹内握持子宫，另一手经阴道放入器械完成人流术。例3子宫前壁体部有2个2 cm的裂口，相距1.0 cm，肠脂垂嵌入穿孔处，镜下试取未成功，改为剖腹手术，术中先在直视下行清宫术，再取出穿孔处嵌入物行子宫修补术。例4为中孕引产后清宫术中，卵圆钳夹出网膜样组织而转入我院，镜下见子宫前壁有1 cm穿孔，穿孔处有少量活动性出血，直视下由助手行清宫术，术毕见子宫穿孔处仍有活动性出血而改行剖腹子宫修补术。例5术前B超未见宫内残留，术中见子宫底部穿孔0.3 cm大小，无出血，子宫前壁右侧见直径7 cm大的肌瘤，术后给予抗感染保守治疗。其余5例中，子宫前壁穿孔3例，后壁穿孔2例，均无活动性出血，5例中有2例系双子宫畸形，由腹腔镜确诊，1例疤痕子宫，1例哺乳期子宫，此5例均在腹腔镜监护下顺利完成清宫术。

2　讨论

人工流产术或清宫术中子宫穿孔，系器械操作不当所致，由于是非直视下手术，所以对损伤情况不能完全确定。我们对疑有子宫穿孔，尤其伴不全流产而无腹腔镜检查禁忌者，均行腹腔镜检查，可以迅速明确诊断，了解穿孔位置、大小，出血情况及有无内脏损伤。在腹腔镜监护下行清宫术，可避免再次清宫的盲目性和危险性，并能明确人流术失败的原因[1]，本组2例人流失败者均为双子宫畸形，在腹腔镜监护下顺利完成了人流术，避免了盲目清宫的危险和开腹手术之弊。但当发生严重内出血或可疑有肠管损伤者，仍以剖腹探查为宜[2]。

关键词　腹腔镜；子宫穿孔；人工流产
中图法分类号　R711.4

参考文献

1 景锦华，沈庆泉.6例人流术子宫穿孔的腹腔镜诊断与处理.中国实用妇科与产科杂志，1994；10(3)：174
2 王淑贞 主编.实用妇产科学.北京：人民卫生出版社，1993：847

（收稿：1995-04-20；修回：1996-01-05）
（编辑　刘　鹏）

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