

茯苓水提液对新生大鼠神经细胞内钙离子浓度的影响*

陈文东¹ 安文林² 楚 晋¹ 景向红³ 李瑞午³ 王惠琴² 李 林¹

内容提要 目的:探讨茯苓水提液对神经细胞内钙稳态的影响。方法:应用双波长荧光分光光度计和激光共聚焦扫描显微镜测定新生大鼠大脑皮层神经细胞悬液和海马神经元原代培养在加入茯苓水提液后细胞内钙离子浓度的变化。结果:茯苓水提液在 31~250mg/L 时,可诱导细胞内钙离子浓度升高 9.9%~33.7%,并且这种作用随给药浓度的增大而增强;当浓度大于或等于 500mg/L 时,无明显升高胞浆内钙离子浓度的作用。31~2000mg/L 茯苓水提液均有不同程度抑制 500 μ mol/L 谷氨酸诱导的升钙作用。结论:茯苓水提液对神经细胞内钙离子浓度具有双向调节作用。

关键词 茯苓水提液 胞浆内钙离子 神经细胞 谷氨酸 激光共聚焦扫描显微镜

Effect of Water Extract of Poria on Cytosolic Free Calcium Concentration in Brain Nerve Cells of Neonatal Rats
Chen Wendong, An Wenlin, Chu Jin, et al *Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing (100053)*

Objective: To investigate the effect of Poria cocos, a Chinese medicinal herb, on cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in brain nerve cells of neonatal rats. **Methods:** Double-wave-length fluorospectrophotometer and laser confocal scanning microscope were used to measure the $[Ca^{2+}]_i$ in neurons. **Results:** The water extract of poria (31~250mg/L) induced a dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$, but poria at the range of 500mg/L did not cause $[Ca^{2+}]_i$ to increase. It was also shown that the water extract of poria significantly inhibited the increment of $[Ca^{2+}]_i$ induced by 500 μ mol/L glutamate. The similar results were observed from the experiments in primarily cultured hippocampal neurons of neonatal rats by using laser confocal scanning microscope. **Conclusions:** The water extract of Poria cocos has the effect of bidirectional regulation on cytosolic free calcium in brain nerve cells.

Key words Poria cocos, cytosolic free calcium, neuron, glutamate, laser confocal scanning microscope

茯苓性甘淡、平,归心肺脾肾经,是具有健脾宁心、利水渗湿功效的传统中药。用于水肿尿少,痰饮眩悸,心神不安,惊悸失眠。现代医学研究表明茯苓对中枢神经系统有镇静作用⁽¹⁾。不少中枢神经系统疾病与胞浆内钙稳态失衡有密切关系(如老年性痴呆,血管性痴呆等),尤其是胞浆内钙离子超载,可以导致细胞的结构和功能破坏^(2,3),因而纠正胞浆内钙离子超载可能是一些对中枢神经系统疾病有治疗作用的中药的作用机理之一。为了探索防治与胞浆内钙离子失衡相关的疾病的药物,本研究利用先进的测定技术,对茯苓水提

液是否影响神经细胞内钙离子浓度进行了研究。

材料与方法

1 材料

1.1 药品与试剂 茯苓购自北京同仁堂药店,产地湖南怀化,为多孔菌科真菌茯苓(*Poria cocos* wolf)的干燥菌核。本室自制水提液,即茯苓饮片加五倍量蒸馏水,浸泡 30min 后,加热回馏 1h,2 次,合并两次滤液,15000r/min 离心 30min,取上清液, -20℃ 保存,每毫升含生药 0.25g。Fura-2/AM 由中国医学科学院药物研究所合成;DMEM 培养基购自美国 GIBCOL 公司;Fluro-3/AM、F-127、Triton-X-100、EGTA、谷氨酸均购自美国 SIGMA 公司。

1.2 动物 新生 Wistar 大鼠,雄性,20~30g,购自首都医科大学动物室。

*北京市科委,北京市中医药管理局资助项目(No.JX9515)

1. 首都医科大学宣武医院药理研究室,北京市脑老化重点实验室神经药理学部(北京 100053);2. 首都医科大学营养与食品卫生教研室;3. 中国中医研究院针灸研究所

1.3 仪器 双波长荧光分光光度计(日本岛津 RF-5000 型);激光共聚焦扫描显微镜(美国 MERIDIAN 公司 ACAS-575)。

2 方法

2.1 双波长荧光分光光度计测定神经细胞内钙离子浓度 参考张均田等的方法^[4]。取新生 1~3 天 Wistar 大鼠,速冻 5min,迅速开颅取出整个大脑,置于冰冷的平均缓冲液中,分离大脑皮层,去脑膜和血块,将分离的大脑组织切碎,加入适量的胰酶(终浓度为 0.125%)混匀,在 37℃ 水浴中消化 10min。然后将组织块移至冰冷的终止液(含 10% 小牛血清的 DMEM)终止消化,将组织块吹打成细胞悬液,过 200 目网筛,收集细胞悬液,将细胞密度控制在 $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$ 之间,置于 37℃ 水浴温育 5min,再加入 Fura-2/AM 使其终浓度为 $5\mu\text{mol/L}$ 。37℃ 水浴温育 60min,然后以 500r/min 离心 7~8min,弃上清液,用含 0.2% 牛血清白蛋白的 Hank's 液冲洗两遍,去除细胞外多余的 Fura-2/AM。用台盼蓝细胞排斥反应检测细胞活性,当细胞存活率大于 90% 方可上机进行测定。测定条件:应用日本岛津 RF-5000 型荧光分光光度计,激发狭缝和发射狭缝为 10nm,激发波长为 480nm,响应因子为 0.02,激发波长交换的时间为 1s,测定细胞悬液在 37℃ 水浴复温 5min,依次测定静息期,加入激动剂或药物后的荧光强度,最后测定最大荧光 F_{max} (加 10% Triton-X-100)和最小荧光强度 F_{min} (加 400mmol/L EGTA)。根据公式: $[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{\text{min}}) Fr2 / (R_{\text{max}} - R) Fb2$ nmol/L 计算出胞浆内钙离子浓度。其中 K_d 为中 K_d 为 224nmol/L, R 、 R_{max} 和 R_{min} 为测得的荧光,最大和最小的荧光比值。Fr2 和 Fb2 分别为无钙离子和钙离子饱和时 380nm 激发光产生的荧光强度。

2.2 激光共聚焦扫描显微镜动态观察单个海马细胞内钙离子浓度的变化 将出生 1~3 天的 Wistar 大鼠速冻 2~3min,消毒后在无菌条件下开颅取脑,置于冰冷的平衡缓冲液,分离海马,将海马切碎后,用终浓度为 0.125% 胰酶在 37℃ 5% CO_2 孵育箱中消化 30min。将消化后的组织块移至接种液(含 10% 马血清,10% 小牛血清,80% DMEM,100 $\mu\text{g/L}$ 谷氨酰胺)终止胰酶消化,将组织块吹打成细胞悬液。用台盼蓝排斥反应检查细胞活性并计算细胞密度。用接种液将细胞稀释至 $(8 \sim 10) \times 10^7/\text{L}$,接种于 35mm 培养皿中。第二天换培养液,进行无血清培养。7~11 天后,将 Fluo-3/AM(终浓度为 $4\mu\text{mol/L}$)和助染剂 F-127(终浓度为 1%)加入培养液,与细胞温育 50min,取出后吸弃

培养液,用测定液清洗 2~3 遍,洗掉未进入细胞内的 Fluo-3/AM。首先用激光共聚焦扫描显微镜在 $\text{Ex} = 488\text{nm}$, $\text{Em} = 530\text{nm}$ 条件下扫描处于稳态的细胞 5min(10~20s/次),然后再加入激动剂或药物,动态记录单个海马神经细胞内钙离子浓度的变化的荧光图像,并对神经细胞内不同区域的钙离子浓度的变化进行分析。

结 果

1 茯苓水提液对正常神经细胞内钙离子浓度的影响 茯苓水提液在 31~250mg/L 范围内,可以引起神经细胞内钙离子浓度上升(9.9%~33.7%),并与药物浓度呈正相关;当药物浓度大于或等于 500mg/L,其对胞浆内钙离子浓度基本无明显影响。用激光共聚焦扫描显微镜动态观察低浓度的茯苓水提液(31mg/L)对海马神经细胞内钙离子的影响。通过连续扫描结果发现在未加药时(24s 处)细胞中反应胞浆内钙离子浓度的色温为绿色,加入药物后,49s 处呈黄色,161s 处呈黄白色,表明胞浆内钙离子浓度不断升高;坐标显示同一细胞内不同区域钙离子浓度的变化,三个区域钙离子浓度的变化趋势相同。高浓度的茯苓水提液(2000mg/L)对海马神经细胞内钙离子浓度的影响不明显,在扫描过程中反应胞浆内钙离子浓度的颜色未发生明显变化。

2 谷氨酸对神经细胞内钙离子浓度的影响 31~1000 $\mu\text{mol/L}$ 的谷氨酸刺激胞浆内钙离子浓度升高的能力,随着谷氨酸浓度的增大,细胞内钙离子浓度也随之升高(比静息态钙离子浓度增高 12.7%~106.7%)。激光共聚焦扫描显微镜动态观察在加入谷氨酸(终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$)后单个海马细胞内钙离子浓度的变化:先描记未加谷氨酸时胞浆内钙离子浓度,细胞的色温值没有变化;30s 时加入谷氨酸,细胞的色温值不断升高,然后逐渐降低。细胞的两个不同区域钙离子浓度的变化曲线,在加入谷氨酸后红线的色温值由 400 上升到 1000,绿线的色温值由 700 上升到 2000。

3 茯苓水提液对谷氨酸诱导的神经细胞内钙离子浓度上升的抑制作用 结果发现茯苓水提液对 500 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸诱导的神经细胞内钙离子浓度升高有明显的抑制作用,当茯苓水提液浓度大于 500mg/L 时,其抑制作用趋于平稳,保持在较强水平,500 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸升高胞浆内钙离子浓度的能力由 76.2% 降至 23.2%。

海马细胞与 2000mg/L 茯苓预孵育 10min 后,加

入 $100\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸,发现细胞中反映胞浆内钙离子浓度的变化的颜色没有明显变化,在细胞中取的两区域的色温值变化不明显,结果表明 2000mg/L 的茯苓水提液抑制了由 $100\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸诱导的胞浆内钙离子浓度的上升。

讨 论

在正常神经细胞中,许多生理功能是通过钙离子来介导的,特别在学习记忆中,钙离子的适当升高有利于与学习记忆相关的 *c-fos* 基因的表达,同时也有利于与记忆相关的电生理活动的形成和维持^[5]。从我们的研究结果可以看出,低浓度的茯苓水提液对正常的神经细胞内钙离子浓度有增强作用,同谷氨酸诱导的升钙能力比较,茯苓作用不是很强(比静息态钙离子浓度升高 33.7% ,谷氨酸增高钙离子浓度可达 106.7%),而高浓度茯苓无此作用。茯苓水提液的这种轻度升钙作用也许对学习记忆有益,在一些强脑醒神、主治健忘的古方中(如《备急千金要方》中的开心散,定志丸等)含有茯苓,提示可能与茯苓轻度提高胞浆内钙离子浓度有关。通过现在对神经细胞内调控系统的了解,导致胞浆内钙离子浓度上升的主要途径有两条:一是细胞外钙离子通过钙通道进入胞浆内;二是胞浆内钙库(内质网等)释放钙离子入胞浆^[6]。茯苓水提液是通过哪条途径诱导胞浆内钙离子浓度上升有待进一步的研究。

谷氨酸是脑中主要的兴奋性神经递质,但是谷氨酸分泌过度,可以引起神经细胞结构改变和树突断裂,甚至引起神经细胞死亡。这种神经毒性大部分是由于过多的钙离子内流是神经细胞钙离子超载造成的,许多中枢神经系统疾病(如老年性痴呆,血管性痴呆等)均存在谷氨酸含量过高的现象^[7]。谷氨酸受体阻断剂可改善谷氨酸造成的神经细胞损伤^[8]。我们的结果表明茯苓水提液具有拮抗谷氨酸的升高胞浆内钙离子浓度的作用,提示茯苓可能对由谷氨酸造成的神经细胞损伤有抑制作用,因而有可能用于治疗有胞浆内钙离子超载的神经系统疾病。

谷氨酸可以和神经细胞上的 N-甲基-天门冬氨酸(NMDA)受体结合,使得与 NMDA 受体耦合的钙离子通道开放,胞外钙离子内流,胞浆内钙离子浓度上升;同时谷氨酸还可与胞膜上的谷氨酸受体结合,激活鸟苷酸环化酶,促进 1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)生成, IP_3 可与胞内的钙库上的 IP_3 受体结合,使得钙库释放钙离子入胞浆,同样可造成胞浆内钙离子浓度上升^[6]。因茯苓水提液抑制谷氨酸诱导胞浆内钙离子浓度上升的作用部位可能有三处:一是阻断谷氨酸与 NMDA 受体结合,阻止与 NMDA 受体耦合的钙通道的开放;二是阻断谷氨酸与谷氨酸受体结合,抑制 IP_3 的生成;三是阻断 IP_3 与钙库上的 IP_3 受体结合,阻止内钙释放。茯苓究竟作用在什么环节目前还不清楚,我们正在进行有关这方面的研究。

总之,我们的结果表明茯苓对神经细胞内钙离子浓度具有双向调节作用,可能对促进学习记忆,治疗某些中枢神经系统疾病具有一定应用前景。

参 考 文 献

1. 黄泰康主编.常用中药成分与药理手册.第1版.北京:中国医药科学技术出版社,1994:1389.
2. Disterhoft TF. The calcium rationale in aging and Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 1994;747:382—406.
3. 陈文东,李 林.神经细胞内钙离子超载与 Alzheimer 病.首都医科大学学报 1996;16:105—110.
4. 张均田,李锡明,石成璋.用 Fura-2/AM 测定细胞内游离钙浓度的方法.中国药理学杂志 1991;26:655—658.
5. 刘 文.学习记忆与原癌基因 *c-fos*.中国药理学报 1995;11(1):1—4.
6. Hartmann H. Disturbances of the neuronal calcium homeostasis in the aging nervous system. *Life Sci* 1994;55:2011—2018.
7. Siesjö BK. Calcium, excitotoxins and neuronal death in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1989;568:234—251.
8. Cleland TA. Inhibitory glutamate receptor channels. *Mol Neurobiol* 1996;13:97—136.

(收稿:1997-07-21 修回:1998-02-05)

征 文 通 知

中国中医药学会内科学消渴病专业委员会,定于 1999 年第二季度在云南省昆明市召开全国第二届消渴病学术会议,现将会议征文事宜通知如下。

1 征文内容:(1)消渴病概念的讨论;(2)并发症的诊断与治疗标准讨论;(3)临床报道、实验研究;(4)名老中医经验;(5)流行病学调查,预防与调护;(6)消渴病教育等。

2 征文要求:论文限 5000 字之内,并附 400 字论文摘要。截稿日期 1998 年 12 月 30 日。来稿请寄:哈尔滨市动力区和平路 24 号黑龙江中医药大学 31 号信箱宋福印、栗世铀(收);邮编:150040;电话:(0451)2116661;会议具体事宜另行通知。