

## 氨培养胎鼠神经细胞钙离子浓度变化与凋亡的相关性

陈学平<sup>1)</sup>, 罗志刚<sup>1)</sup>, 曹丽玲<sup>1)</sup>, 杨 姝<sup>1)</sup>, 张琳英<sup>1)</sup>, 高燕云<sup>1)</sup>, 杨晋辉<sup>2)</sup>, 唐映梅<sup>2)</sup>

(1) 昆明市第一人民医院消化内科, 云南昆明 650011; 2) 昆明医科大学第二附属医院肝胆胰内科, 云南昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 观察体外培养神经细胞在氨作用下钙离子浓度变化与凋亡的关系, 探讨氨毒性机制. **方法** 体外培养胎鼠神经细胞 7 d, 实验分组为对照组、低氨组和高氨组; 分别作用 24 h 后, 用流式细胞仪测定神经细胞凋亡比率, 用 Fluo-3/AM 荧光探针测定细胞内钙离子浓度. **结果** 对照组神经细胞有少量凋亡, 细胞内钙离子浓度正常, 随着 NH<sub>4</sub>CL 浓度的提高, 细胞内钙离子浓度明显升高, 神经细胞凋亡增加. 低氨组和对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 高氨组和低氨组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). **结论** 氨诱导神经细胞凋亡与细胞内钙离子浓度相关.

**[关键词]** 氨; 神经细胞; 凋亡; 钙离子

**[中图分类号]** R363.1+3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 06 - 0016 - 03

## The Correlation between Concentration of Intracytoplasm Calcium Ion and Apoptosis in Fetal Rat Neuron Induced by Ammonia in vitro

CHEN Xue - ping<sup>1)</sup>, LUO Zhi - gang<sup>1)</sup>, CAO Li - ling<sup>1)</sup>, YANG Shu<sup>1)</sup>, ZHANG Lin - ying<sup>1)</sup>, GAO Yan - yun<sup>1)</sup>, YANG Jin - Hui<sup>2)</sup>, TANG Ying - Mei<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Gastroenterology, The First People's Hospital of Kunming, Kunming Yunnan 650011; 2) Dept. of Hepatopancreatobiliary Disease, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the correlation between intracellular free calcium ion concentration and apoptosis in neurons induced by ammonia in Vitro, to explore the mechanism of ammonia intoxication. **Methods** Fetal rat neurons were cultured in vitro for 7 days, Neurons were assigned to the control group, low concentration of ammonia group, and high concentration of ammonia group. After treated for 24 h, Flow cytometry was used to count apoptosis cells, Fluo-3/Am was used to detect the variation of calcium in neurons. **Results** There was significant difference between control group and the low concentration of ammonia group. The difference was statistically significant between the low concentration of ammonia group and high concentration of ammonia group. **Conclusion** Ammonia might induce apoptosis of fetal rat neuron in vitro; there is striking correlation between intracellular free calcium ion concentration and neuronal apoptosis induced by ammonia.

**[Key words]** Ammonia; Neurons; Apoptosis; Calcium ion

肝性脑病时大脑皮层神经细胞可发生凋亡, 但其机制并不清楚, 钙超载是细胞发生凋亡的重要机制之一, 是否参与氨培养诱导的神经细胞凋

亡需要进一步研究, 有助于深入了解肝性脑病发生机制.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81360072)

**[作者简介]** 陈学平 (1975~), 云南永胜县人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事肝脏疾病基础与临床研究工作.

**[通讯作者]** 唐映梅. E-mail:exp2005235@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Fluo-3/AM (日本同仁化学研究所); DMEM 培养基 (HyClone 公司); 氯化铵 (天津化学试剂公司); 其余试剂为国产分析纯. 流式细胞仪 (Beckman, Coulter Epics XL). 实验动物为昆明医科大学实验动物中心提供的孕 13~15 d 昆明种小鼠.

### 1.2 方法

**1.2.1 神经细胞培养和鉴定** 孕期 13~15 d 小鼠处死后取出胎鼠, 剪断胎鼠头, 放入酒精消毒, 转入 D-Hanks 液培养皿中, 在显微镜下剥离脑膜, 用显微镊子夹取并剪碎大脑皮质, 吹打成细胞悬液, 加入培养液, 调整细胞浓度约 10 万个/mL, 接种于 24 孔培养板, 定期换液, 在第 3 天换液时加阿糖胞苷换液, 细胞培养 7 d 后行神经微丝蛋白免疫组化染色鉴定, 经统计细胞阳性率大于 90%.

**1.2.2 实验分组** 培养 7 d 后的神经细胞分为对照组 (不加任何处理); 低氨浓度组, 加入  $\text{NH}_4\text{Cl}$  终浓度为 2.5 mmol/L; 高氨浓度组, 加入  $\text{NH}_4\text{Cl}$  终浓度为 5 mmol/L.

**1.2.3 神经细胞凋亡检测** 各组细胞分别培养 24 h, 弃培养基, 磷酸盐缓冲液冲洗, 胰蛋白酶消化, 收集细胞制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 100 万个/mL. 70% 冰乙醇固定, 磷酸盐缓冲液轻洗 1 次, 加 TdT 在 37 °C 孵育 1~2 h, 用 1 mL 含 5 mg/mL PI, 0.1% RNase A 的磷酸盐缓冲液重悬. 在流式细胞仪上机检测凋亡细胞百分数.

**1.2.4 细胞内钙测定** 各组细胞分别培养 24 h 后去培养基, 磷酸盐缓冲液洗 2 次, 胰蛋白酶消化, 用无钙磷酸盐缓冲液终止消化, 并制成细胞悬液, 低速离心后弃上清液, 收集细胞, 重悬, 调整细胞密度为 50 万个/mL. 加入 Fluo-3/AM (终浓度为 5 mol/L), 避光孵育 1 h. 取出细胞悬液离心, 无钙磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬至 1 mL 后, 用流式细胞仪检测各组细胞的荧光强度值.

### 1.3 统计学处理

所得数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用 SPSS 软件进行分析, 计数资料采用  $t$  检验, 组间比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 神经细胞凋亡情况

对照组仅有少量细胞凋亡, 低氨、高氨培养组均可引起神经细胞的凋亡, 且随着氨浓度的增加, 细胞凋亡更加明显, 见表 1, 图 1.

### 2.2 细胞内钙离子浓度

低氨组和高氨组细胞内钙离子荧光强度均升高, 低氨组和高氨组与对照组相比差异显著, 高氨组与低氨组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1.

表 1 氨培养神经细胞凋亡及坏死结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The result apoptosis and necrosis of cultured astrocytes induced by ammonia ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	凋亡 (%)	细胞内钙离子 (荧光值)
对照组	9.2 ± 0.6	4.7 ± 1.4
低氨组	18.2 ± 4.1*	6.1 ± 1.2*
高氨组	21.9 ± 3.8 <sup>△</sup>	9.4 ± 1.8 <sup>△</sup>

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与低氨组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

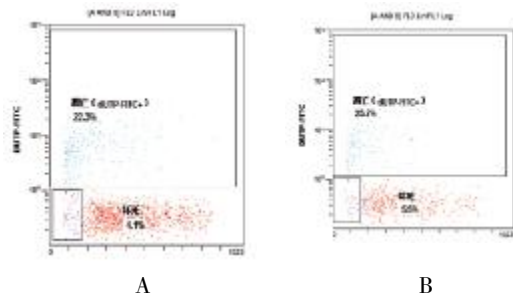


图 1 流式细胞仪观察细胞凋亡

Fig. 1 The apoptosis of cells detected by flow cytometry

A: 低氨组神经细胞凋亡; B: 高氨组神经细胞凋亡.

## 3 讨论

肝性脑病患者常出现意识障碍, 智力、言语、认知功能减退, 精神、行为异常. 影像学和病理学检查发现部分患者脑皮层变薄, 神经细胞减少<sup>[1]</sup>. 体外实验显示氨可引起神经元的凋亡, 表明氨对神经细胞的直接毒性是肝性脑病的发生机制之一<sup>[2,3]</sup>. 笔者的研究发现, 在正常情况下, 神经细胞可发生少量凋亡, 氨培养组凋亡细胞数量明显增加, 以高氨组更为显著. 但氨导致神经细胞凋亡的机制目前并不清楚.  $\text{Ca}^{2+}$  是细胞内重要的第二信使, 其主要参与神经递质的合成与释放、细胞内外信息的传递、酶的代谢与调节等, 而细胞内钙离子超载则是导致细胞死亡的最后共同途径<sup>[4-6]</sup>. 因此, 测定氨培养神经细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 探索钙超载与细胞凋

亡的关系,对于了解肝性脑病的发病机制具有重要意义。

本实验证实氨培养的神经细胞内钙离子浓度升高,并与神经细胞凋亡相关,在高氨组尤其明显,推测这种升高可导致细胞的结构损伤和功能代谢改变。正常神经细胞内的游离钙离子浓度很低,只有细胞外钙离子浓度的 1/104。如此高的电化学梯度是依赖于细胞对钙离子的主动排出和细胞对钙离子的相对无通透性来完成的,细胞内的钙离子平衡对维持正常细胞生理功能非常重要。高氨环境中,神经细胞谷氨酸盐释放增加,过度激活神经细胞上的离子型 NMDA 受体和代谢性谷氨酸受体,  $\text{Ca}^{2+}$  内流和细胞内钙池释放钙离子增加,细胞内游离钙离子浓度升高。触发一系列生化过程包括激活蛋白酶、磷脂酶,产生花生四烯酸的代谢产物,自由基形成,线粒体功能障碍,能量耗竭,最终导致神经细胞细胞凋亡和坏死<sup>[7-11]</sup>。钙离子浓度增加还激活 NO-CGMP 途径,促进谷氨酸盐的释放,进一步加重神经毒性<sup>[12]</sup>。钙超载对神经细胞凋亡的途径还可能:激活  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  依赖的内源性核酶内切酶,使 DNA 降解导致神经元凋亡<sup>[13]</sup>。激活 Caspase 蛋白 E,导致聚 ADP-核糖聚合酶裂解<sup>[14-16]</sup>。参与  $\text{Ca}^{2+}$  钙调素依赖的磷酸酯酶的作用,是磷酸化的物质脱磷,引起凋亡。

氨中毒导致神经细胞凋亡是肝性脑病的发病机制之一,其确切机制尚不清楚。笔者发现细胞内钙离子浓度升高与凋亡发生具有相关性是其中的重要因素之一,钙离子通道抑制剂在肝性脑病时神经细胞保护、抑制细胞凋亡方面值得进一步研究。

### [参考文献]

- [1] ZENEOLI M L, CILNI G. Prevalence of brain atrophy in liver cirrhosis patients with chronic persistent encephalopathy[J]. *J Hepatology*, 1987, 4(3):283 - 292.
- [2] 刘洪艳,王静艳,雷薇,等. 氨对肝硬化大鼠模型脑神经细胞凋亡的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(8):1 865 - 1 867.
- [3] 吕飒,孙锦春,王静艳,等. 氨对体外培养胚胎大鼠大脑皮质神经元凋亡的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2001, 30(3):181 - 183.
- [4] WILKINSON D J, SMEETON N J, WATT P W. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link[J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 91(3):200 - 219.
- [5] ROTHMAN D L, DE FEYTER H M, MACIEJEWSKI P K, et al. Is there in vivo evidence for amino acid shuttles carrying ammonia from neurons to astrocytes [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(11):2 597 - 2 612.
- [6] DALKARA T, AYATA C, DEMIRCI M, et al. Effects of cerebral ischemia on N-methyl-D-aspartate and dihydropyridine-sensitive calcium currents. An electrophysiological study in the rat hippocampus in situ [J]. *Stroke*, 1996, 27(1):127 - 133.
- [7] MONTFORT P, KOSENKO E, ERCEG S, et al. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors [J]. *Neurochem Int*, 2002, 41(2-3):95 - 102.
- [8] LLANSOLA M, ERCEG S, FELIPO V. Chronic exposure to ammonia alters the modulation of phosphorylation of microtubule-associated protein 2 by metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in cerebellar neurons in culture [J]. *Neuroscience*, 2005, 133(1):185 - 191.
- [9] DADSETAN S, KUKOLJ E, BAK L K, et al. Brain alanine formation as an ammonia-scavenging pathway during hyperammonemia: effects of glutamine synthetase inhibition in rats and astrocyte-neuron co-cultures [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(8):1 235 - 1 241.
- [10] MANGIA S, GIOVE F, DINUZZO M. Metabolic pathways and activity-dependent modulation of glutamate concentration in the human brain [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(11):2 554 - 2 561.
- [11] ZOU J, WANG Y X, DOU F F, et al. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons [J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(4):577 - 584.
- [12] YANG L, OMORI K, OMORI K, et al. GABAC receptor agonist suppressed ammonia-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons by restoring phosphorylated BAD level [J]. *J Neurochem*, 2003, 87(3):791 - 800.
- [13] SULPICE J C, ZACHOVISK A, DEVANX D F, et al. Requirement for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced phospholipid redistribution in the human erythrocyte membrane [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(9):6 347 - 6 354.
- [14] SQUIER M K, COHEN J J. Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis [J]. *J Immunol*, 1997, 158(8):3 690 - 3 697.
- [15] CAGNON L, BRAISSANT O. Role of caspases, calpain and cdk5 in ammonia-induced cell death in developing brain cells [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(2):281 - 292.
- [16] ARAS R, BARRON A M, PIKE C J. Caspase activation contributes to astrogliosis [J]. *Brain Res*, 2012, 4(23):102 - 115.

(214 - 02 - 16 收稿)