

# 氟哌啶醇对大鼠离体海马脑片和原代神经元缺糖/缺氧和 N-甲基-D-天冬氨酸损伤的保护作用

严乐勤, 魏尔清\*, 沈建中, 沈波

(浙江大学医学院神经生物学实验室、药理学实验室, 浙江 杭州 310031)

**摘要:** 目的 观察氟哌啶醇对大鼠离体海马脑片和原代神经元的缺糖/缺氧(OGD)和 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)损伤的潜在保护作用及其机制。方法 海马脑片 OGD 以无葡萄糖的人工脑脊液中通 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 诱导。通过测定 TTC 染色后形成的红色产物来分析脑片活性。结果 氟哌啶醇(1 和 10 μmol·L<sup>-1</sup>)抑制 OGD 损伤, 抑制率分别为 17.7% 和 25%, 而 D<sub>2</sub> 多巴胺受体拮抗剂多潘立酮无此作用。NMDA 也能显著降低海马脑片及原代神经元的活性, 而氟哌啶醇可抑制这一损伤作用。结论 氟哌啶醇对大鼠离体海马脑片 OGD 和原代神经元 NMDA 损伤有保护作用。

**关键词:** 氟哌啶醇; 海马; 原代神经元; N-甲基-D-天冬氨酸

中图分类号: R971.4; R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2002)12-0922-05

氟哌啶醇是经典的抗精神病药, 是多巴胺 D<sub>2</sub> 受体的拮抗剂, 最近几年报道<sup>[1]</sup>能抑制 NMDA 受体活性, 且有亚单位特异性, 含 NR2B 亚单位的受体表现对该药更加敏感。氟哌啶醇还能抑制大鼠皮层神经元 NMDA 诱导的天然通道的活性<sup>[2]</sup>。越来越多的证据表明兴奋性毒性是缺血性脑损伤的最主要病因<sup>[3,4]</sup>, 而 NMDA 受体在介导急性谷氨酸兴奋性毒性中起最关键的作用。推断氟哌啶醇可能对缺血诱导的大鼠脑组织损伤有保护作用, 可作为一个先导化合物被进一步修饰开发成治疗脑缺血的新药。作者用脑缺血体外模型——急性分离的大鼠海马脑片培养液中暂时去除氧气和葡萄糖(oxygen and glucose deprivation, OGD)诱导的损伤, 观察氟哌啶醇是否对大鼠海马脑片 OGD 损伤有保护作用及其机制。

## 材料与 方法

化学试剂 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)购自上海化学试剂公司; 氯胺酮(ketamine)、氟哌啶醇(haloperidol)、多巴胺(dopamine)、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)、DNase I、胰酶、胰酶抑制剂、多聚赖氨酸

(MW > 300 000) 和 MK801 均购自 Sigma 公司; 多潘立酮(domperidone) 购自 Research Biochemicals International Co.(RBI); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐和氧化型辅酶 I 购自上海实生细胞生物技术有限公司。DMEM 高糖培养基、胎牛血清和牛血清白蛋白购自 Hyclone 公司, 神经基础培养基(NB) 和 B27 购自 Gibco 公司。

**实验动物** 健康 Sprague-Dawley(SD) 大鼠, ♂, 180~220 g; 清洁级 SD 孕鼠, 孕期 17~19 d, 由浙江大学医学院实验动物中心提供(合格证号: 22-9601018)。

**离体海马脑片制备** 参照文献<sup>[5]</sup>的方法, 健康 ♂ Sprague-Dawley 大鼠用 10% 水合氯醛麻醉后, 冰冷的改良脑脊液(mACSF) 40 mL 心脏灌流, 随后断头, 取出大脑, 立即浸入冰冷的预先通气(95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>) 的 mACSF 放置 1 min。快速分离双侧海马, 在切片机上切成 500 μm 厚的薄片, 放入冰冷的通气的 mACSF 中, 小心地将海马脑片移入 35℃ 预先通气的正常脑脊液(nACSF) 中恢复至少 1 h, 然后再用于缺氧缺糖实验。

离体脑片缺氧缺糖或 NMDA 处理及药物的作用 正常脑脊液(nACSF) 中的 10 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖用 10 mmol·L<sup>-1</sup> 蔗糖代替, 即成无糖脑脊液。为了达到缺氧, 脑脊液在脑片放入前至少通氮混合气(95% N<sub>2</sub> 和 5% O<sub>2</sub>) 30 min。恢复后的脑片分为正常对照

收稿日期: 2001-12-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770270); 浙江省自然科学基金资助项目(399090)。

\* 通讯作者 Tel / Fax: (0571) 8721 7391,

E-mail: Weiq2001@yahoo.com

组: 孵育在通氧的 nACSF 中; OGD 组: 孵育在通氮的无糖 ACSF 中; haloperidol 组: 孵育在通氮的无糖 ACSF 中含不同浓度的 haloperidol ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); ketamine 组: 孵育在通氮的无糖 ACSF 中含不同浓度的 ketamine ( $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); domperidone 组: 孵育在通氮的无糖 ACSF 中含不同浓度的 domperidone ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。NMDA 组: 脑片孵育在通氧的  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  nACSF 中; dopamine 组: 脑片孵育在含不同浓度的 dopamine ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的通氧的 nACSF 中。处理 1 h。

**TTC 染色** 参照文献<sup>[6]</sup>的方法, 处理后脑片在  $37^\circ\text{C}$  2% TTC 中避光温浴 60 min, 取出脑片用生理盐水漂洗, 用滤纸吸去表面水分后称湿重, 根据每克湿重加入抽提液(乙醇-二甲亚砜为 50:50) 20 mL, 在密闭容器内避光置 24 h, 摇匀后取 200  $\mu\text{L}$  至 96 孔板, 在波长 490 nm, 酶标仪测定各孔  $A_{490}$  值。脑片 TTC 染色下降百分率(组织损伤百分率) =  $(1 - A_{490\text{缺氧}} / A_{490\text{有氧}}) \times 100\%$ 。

**海马神经元原代培养** 参照 Sanfeliu 等<sup>[7]</sup>海马神经细胞原代培养方法进行并稍做改进。所有步骤均在无菌条件下进行。麻醉孕鼠, 剖腹取出胎鼠, 断头置于溶液 I 中。分离海马, 去除脑膜, 剪碎组织成糜状,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 将沉淀的组织重悬于溶液 II 10 mL。  $37^\circ\text{C}$  振荡水浴箱中消化 15 min ( $220 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 消化后立即加入溶液 IV 10 mL。上下颠倒数次后, 转移至两个干净的离心管,  $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min, 将沉淀再次重悬于溶液 III 3~4 mL 中。用巴斯德管吹打 40 次, 加入溶液 V 3~4 mL,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 7 min, 加入适量的 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清), 便得到海马细胞。稀释至浓度  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 种于 24 孔培养板(事先用多聚赖氨酸处理过), 每孔种 0.5 mL。d 2 用 NB-DMEM(1:1) 全量换液, d 4 加入阿糖胞苷(终浓度  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), d 5

半量换液, 此后每三四天半量换一次液。

**NMDA 处理** 海马神经元体外生长 12 d (DIV12) 时, 将培养基换成含  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘氨酸的无镁 Earles 液( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 143, KCl 5.4,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.0, HEPES 2.4, 葡萄糖 5.6, pH 7.5, 加入 NMDA, 使其终浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 室温孵育 15 min。作用后弃去无镁 Earles 液, 再用无镁 Earles 液洗 1 遍, 换成新鲜培养基,  $37^\circ\text{C}$  继续培养 24 h 后, 从每孔取出培养基 100  $\mu\text{L}$  用于 LDH 测定, LDH 测定参照文献<sup>[2]</sup>。然后, 每孔加入 MTT ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶于 PBS) 10  $\mu\text{L}$ , 置于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 2 h。弃去培养基, 加入二甲基亚砜(DMSO) 300  $\mu\text{L}$  避光放置 10 min。待结晶体完全溶解后, 取 200  $\mu\text{L}$  在酶标仪上测定波长 490 nm 处吸光度( $A_{490}$ )。氟哌啶醇在 NMDA 处理前 5 min 加入, 与 NMDA 共孵育 15 min。

**统计方法** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用方差分析检验差异的显著性, 以 SPSS for Window 7.0 进行统计学处理。

## 结 果

### 1 氟哌啶醇对大鼠海马脑片缺氧缺糖后 TTC 染色的影响

与正常对照组相比, 缺氧缺糖 1 h 后脑片 TTC 染色( $A_{490}$ ) 急剧下降。与仅用溶剂处理组相比, 氟哌啶醇  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  都能显著提高海马脑片缺氧缺糖后的 TTC 染色(表 1), 保护率分别是 17.7% 和 25%。 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氟哌啶醇则没有作用。NMDA 受体拮抗剂氯胺酮( $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 也能显著减轻海马脑片缺氧缺糖损伤(表 1), 氟哌啶醇本身( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 不会影响正常脑片 TTC 染色(数据未显示)。

Table 1 Effect of haloperidol on viability of rat hippocampal slices subjected to OGD insult

Normal	OGD	Ketamine / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		Haloperidol / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
		$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
$0.495 \pm 0.011$	$0.14 \pm 0.04^{##}$	$0.19 \pm 0.05^*$	$0.21 \pm 0.04^*$	$0.16 \pm 0.05$	$0.20 \pm 0.04^*$	$0.23 \pm 0.04^*$

The hippocampal slices were incubated in glucose-free normal ACSF and continuously bubbled with 95%  $\text{N}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  (OGD) with or without haloperidol for 1 h. The viability of slices was indexed by absorbance at 490 nm. The slices incubated in normal ACSF and continuously bubbled with 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  were taken as normal.  $n = 8 \sim 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{##} P < 0.01$  vs normal;  $^* P < 0.05$  vs OGD. OGD: Oxygen and glucose deprivation

2 多巴胺对正常海马脑片 TTC 染色的影响

多巴胺( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ 和 $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>)不影响孵育在通 95 %O<sub>2</sub> 和 5 %CO<sub>2</sub> nACSF 中的正常海马脑片 TTC 染色(表 2)。

3 多潘立酮对大鼠海马脑片缺氧缺氧后 TTC 染色的影响

与氟哌啶醇不同, D<sub>2</sub> 多巴胺受体特异拮抗剂——多潘立酮( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ 和 $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>)并不能提高海马脑片缺氧缺氧后的 TTC 染色(表 3)。

4 氟哌啶醇对大鼠海马脑片 NMDA 诱导损伤后 TTC 染色的影响

海马脑片经 NMDA( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 1 h 后,

TTC 染色显著下降,仅为对照的 38.9%,而氟哌啶醇( $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>)则能提高大鼠海马脑片 NMDA 诱导损伤后 TTC 染色(表 4)。

Table 2 Effect of dopamine challenge on the viability of normal hippocampal slices

Normal	Dopamine / mol·L <sup>-1</sup>		
	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
0.50 ± 0.12	0.53 ± 0.10	0.50 ± 0.12	0.49 ± 0.06

The hippocampal slices were incubated in normal ACSF continuously bubbled with 95 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub> and challenged with either vehicle (control) or dopamine ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  and  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>) for 1 h. The viability of slices was indexed by absorbance at 490 nm. n = 8 ~ 12,  $\bar{x} \pm s$

Table 3 Effect of domperidone on viability of hippocampal slices (absorbance at 490 nm) subjected to OGD insult

Normal	OGD	Domperidone / mol·L <sup>-1</sup>		
		$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
0.61 ± 0.09	0.17 ± 0.04**	0.16 ± 0.04**	0.17 ± 0.04**	0.18 ± 0.05**

The hippocampal slices subjected to OGD insult were treated with either vehicle (control) or domperidone ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  and  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>) for 1 h. n = 8 ~ 12,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* P < 0.01 vs normal

Table 4 Effect of haloperidol on viability of hippocampal slices (absorbance at 490 nm) subjected to NMDA insult

Normal	NMDA	Haloperidol / mol·L <sup>-1</sup>	
		$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$
0.55 ± 0.08	0.21 ± 0.05##	0.26 ± 0.04	0.32 ± 0.05*

The hippocampal slices subjected to  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NMDA were treated with either vehicle (control) or haloperidol for 1 h. n = 8 ~ 12,  $\bar{x} \pm s$ . ## P < 0.01 vs normal; \* P < 0.05 vs NMDA

5 氟哌啶醇对大鼠原代海马神经元 NMDA 诱导损伤后 LDH 释放和 MTT 染色的影响

NMDA( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 15 min 能显著增加 24 h 后上清液中的 LDH 活性,是对照的将近 3 倍,同时也显著降低海马神经元 MTT 比色后的吸光值(表 5),提示存活率下降。 $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 氟哌啶醇能抑制 NMDA 诱导的 LDH 释放增加,能提高 NMDA 处理后的海马神经元 MTT 比色后的吸光值,即存活率。 $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> 则不影响 LDH 释放率也不影响 MTT 比色。氟哌啶醇( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>) 不影响神经元本身 MTT 比色,却能使 LDH 释放轻微增加,但无显著性意义。

Table 5 Effect of haloperidol on MTT staining and LDH release of hippocampal neurons subjected to NMDA insult

Group	C/ mol·L <sup>-1</sup>	LDH / U·L <sup>-1</sup>	MTT (Absorbance)
Normal		9.6 ± 2.0	0.82 ± 0.05
Haloperidol	$1 \times 10^{-7}$	10.4 ± 0.6	0.84 ± 0.07
	$1 \times 10^{-6}$	11.3 ± 2.3	0.82 ± 0.05
	$1 \times 10^{-5}$	13 ± 4	0.77 ± 0.05
NMDA (control)	$5 \times 10^{-5}$	25 ± 5##	0.68 ± 0.04##
NMDA + Haloperidol	$1 \times 10^{-7}$	28 ± 4	0.65 ± 0.06
	$1 \times 10^{-6}$	22 ± 3	0.70 ± 0.05
	$1 \times 10^{-5}$	13 ± 5*	0.82 ± 0.04*

Neuronal cultures grown for 12 d *in vitro* (DIV) were used for NMDA exposure, culture medium was replaced with Mg<sup>2+</sup>-free Earles solution supplemented with  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  glycine and  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NMDA, with or without haloperidol (control) at room temperature for 15 min. MTT assay and LDH arbitrary unit in the culture medium were assayed 24 h later. n = 8,  $\bar{x} \pm s$ . ## P < 0.01 vs normal; \* P < 0.05 vs control

讨 论

本实验首次发现了氟哌啶醇对大鼠海马脑片缺氧缺氧损伤的保护作用。同时也发现了氟哌啶醇对大鼠海马脑片以及原代培养海马神经元 NMDA 损

伤的保护作用。结果与 Shimazu 等<sup>[8]</sup>报道氟哌啶醇能终止 NMDA 对培养的中脑脑片的毒性和 Nishikawa 等<sup>[9]</sup>报道的氟哌啶醇能阻断谷氨酸对皮层神经元的毒性一致。

在离体培养的海马脑片培养液中暂时去除氧气和葡萄糖(oxygen and glucose deprivation, OGD)诱导的脑片损伤,是模拟脑缺血的一种体外模型,已广泛地应用于药物筛选等研究。Preston 等<sup>[6]</sup>最近在实验性脑损伤的评价中,测定 TTC 与脑组织反应后形成的红色结晶产物,以有机溶剂抽提后用分光光度计测量  $A_{490}$  来判断脑缺血损伤情况,可以定量评价整体实验脑缺血损伤程度。作者将这一方法进行了改进并将它用于评价离体脑片 OGD 损伤,观察了作为脑缺血保护药物筛选方法的可行性<sup>[10]</sup>。本实验利用该方法对氟哌啶醇的作用进行评价。

氟哌啶醇是多巴胺  $D_2$  受体的拮抗剂,也是 NMDA 受体的抑制剂,氟哌啶醇的保护作用到底与何种受体参与有关,现在尚不清楚。海马中有多巴胺  $D_2$  受体<sup>[11]</sup>,有报道<sup>[12]</sup>脑缺血时过度释放的多巴胺通过激动  $D_1$  和  $D_2$  受体参与了缺血引起的 CCDPK II 活性抑制。因此有必要阐明多巴胺  $D_2$  受体是否参与了氟哌啶醇的保护作用。本实验中发现多巴胺受体的激动剂多巴胺不影响正常海马脑片的活性,特异性多巴胺  $D_2$  受体拮抗剂多潘立酮也不会改善海马脑片缺氧缺糖损伤后的脑片活性。这些结果提示了氟哌啶醇的保护作用与多巴胺  $D_2$  受体阻断无关。

氟哌啶醇能抑制 NMDA 受体活性且对 NR2B 亚单位具有选择性<sup>[1,13,14]</sup>, Shimazu 和 Nishikawa 等<sup>[8,9]</sup>认为氟哌啶醇是通过调节 NMDA 受体活性和抑制 NMDA 受体通道复合物来抑制 NMDA 对培养的中脑脑片以及谷氨酸对皮层神经元的毒性,发挥保护作用。兴奋性毒性是缺血性脑损伤的最主要病因<sup>[3,4]</sup>,而 NMDA 受体在介导急性谷氨酸兴奋性毒性中起着最关键的作用,NMDA 受体的拮抗剂如氯胺酮的使用能降低缺血性或低糖脑的动物模型损伤中神经元的死亡<sup>[15,16]</sup>。许多实验室都证明了 NMDA 受体的阻断能降低短暂或永久性局灶性缺血模型的梗死面积<sup>[17]</sup>。OGD 诱导的大鼠海马脑片体外缺血模型中有谷氨酸的释放<sup>[18]</sup>,实验中 NMDA 处理使大鼠海马脑片和原代培养的海马神经元损伤,而氟哌啶醇则能显著降低 NMDA 引起的损伤。结果提示了氟哌啶醇对大鼠海马脑片缺氧缺糖损伤的保护作用可能

与 NMDA 受体的阻断有关。

作者无法解释本实验中是否有其他受体如  $\sigma$  受体和其他机制参与了氟哌啶醇的作用。为了更好地评价氟哌啶醇的治疗潜能,还需要作进一步的研究。

总之,结果显示了氟哌啶醇对大鼠海马脑片 OGD 诱导的损伤具有潜在的保护作用,而这种作用与其本身的多巴胺  $D_2$  受体阻断无关,很可能与 NMDA 受体阻断有关。这提示了氟哌啶醇可作为一个先导化合物,被进一步修饰开发成可能治疗脑缺血的新药,从而具有广阔的应用前景。

## REFERENCES:

- [1] Lynch DR, Gallagher MJ. Inhibition of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors by haloperidol: Developmental and pharmacological characterization in native and recombinant receptors [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, **279**(1): 154 - 161.
- [2] Ilyin VI, White more ER, Guastella J, et al. Subtype selective inhibition of *N*-methyl-*D*-aspartate by haloperidol [J]. *Mol Pharmacol*, 1996, **50**(6): 1541 - 1550.
- [3] Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Ann Neurol*, 1986, **19**(2): 105 - 111.
- [4] Choi DW. Calcium mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage [J]. *Trends Neurosci*, 1988, **11**(10): 465 - 469.
- [5] Arias RL, Tasse JRP, Bowlby MR. Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an *in vitro* model of cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 1999, **816**(2): 299 - 308.
- [6] Preston E, Webster J. Spectrophotometric measurement of experimental brain injury [J]. *J Neurosci Methods*, 2000, **94**(2): 187 - 192.
- [7] Sanfeliu C, Hunt A, Patel AJ. Exposure to *N*-methyl-*D*-aspartate increases release of arachidonic acid in primary cultures of rat hippocampal neurons and not in astrocytes [J]. *Brain Res*, 1990, **526**(2): 241 - 248.
- [8] Shimazu S, Katsuki H, Takenaka C, et al. Akaike A.  $\sigma$  receptor ligands attenuate *N*-methyl-*D*-aspartate cytotoxicity in dopaminergic neurons of mesencephalic slice cultures [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, **388**(2): 139 - 146.
- [9] Nishikawa H, Hashino A, Kume T, et al. Involvement of direct inhibition of NMDA receptors in the effects of  $\sigma$ -receptor ligands on glutamate neurotoxicity *in vitro* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, **404**(1 - 2): 41 - 48.
- [10] Yan LQ, Wei EQ, Hu HT, et al. Novel quantitative method for evaluating oxygen/glucose deprivation-induced injury of hippocampal slices [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)* (浙江大学学报医学版), 2002, **31**(2): 81 - 85.
- [11] Kohler C, Ericson H, Radesater AC. Different laminar distributions of dopamine  $D_1$  and  $D_2$  receptors in the rat hippocampal region [J]. *Neurosci Lett*, 1991, **126**(2): 107 -

- 109 .
- [12] Hou XY, Zhang GY. Protection of dopaminergic antagonists against anoxia-induced inhibition of  $Ca^{2+}$ -calmodulin dependent protein kinase II activity in rat brain [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, **20**(11):995-999.
- [13] Whittemore ER, Ilyin V, Woodward RM. Antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors by  $\sigma$  site ligands: potency, subtype-selectivity and mechanisms of inhibition [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, **282**(1):326-338.
- [14] Brimecombe JC, Gallagher MJ, Lynch DR, et al. An NR2B point mutation affecting haloperidol and CPI01,606 sensitivity of single recombinant N-methyl-D-aspartate receptors [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, **286**(2):627-634.
- [15] Simon RP, Swan JH, Griffiths T, et al. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain [J]. *Science*, 1984, **226**(4676):850-852.
- [16] Wieloch T. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist [J]. *Science*, 1985, **230**(4726):681-683.
- [17] Albers GW, Goldberg MP, Choi DW. Do NMDA antagonists prevent neuronal injury? Yes [J]. *Arch Neurol*, 1992, **49**(4):418-420.
- [18] Roettger V, Lipton P. Mechanism of glutamate release from rat hippocampal slices during *in vitro* ischemia [J]. *Neuroscience*, 1996, **75**(3):677-685.

## PROTECTIVE EFFECT OF HALOPERIDOL ON OXYGEN/ GLUCOSE DEPRIVATION AND NMDA INDUCED INJURIES ON RAT HIPPOCAMPAL SLICES AND PRIMARY NEURONS

YAN Le-qin, WEI Er-qing, SHEN Jian-zhong, SHEN Bo

(Laboratory of Neurobiology, Department of Pharmacology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the potential neuroprotective effect of haloperidol on oxygen/glucose deprivation (OGD)- and N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced injuries on rat hippocampal slices *in vitro* and hippocampal neurons in primary culture, and the possible mechanism. **METHODS** OGD was performed in glucose-free artificial cerebrospinal fluid bubbled with 95%  $N_2$  + 5%  $CO_2$  in rat hippocampal slices. The viability of the slices was determined by measuring TTC formazan product. Hippocampal slices and primary neurons were also used to determine the toxic effect of NMDA and the protective effect of haloperidol. **RESULTS** OGD for 1 h significantly decreased the TTC staining of hippocampal slices. Haloperidol at 1 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  significantly inhibited OGD-induced decrease by 17.7% and 25% respectively, but domperidone, a  $D_2$  dopamine receptor antagonist, did not show this effect. Dopamine did not affect the viability of normal hippocampal slices. Like OGD insult, NMDA challenge significantly decreased both the viabilities of hippocampal slices and cultured primary neurons, which were prevented by haloperidol co-treatment. **CONCLUSION** Haloperidol exhibited protective effect on OGD-induced injury of rat hippocampal slices and NMDA-induced injuries on both hippocampal slices and primary neurons. Its effect on OGD insult may be via mechanisms beyond dopamine-receptor blockade, but probably related to NMDA-receptor inhibition.

**KEY WORDS:** haloperidol; hippocampus; primary neuron; N-methyl-D-aspartate