

番泻甙、大黄多糖和大黄素对脑细胞内游离钙浓度的影响*

林秀珍 靳珠华

(天津医科大学药理研究室,天津 300070)

近年来有关大黄及其有效成分的药理研究和临床应用有较大的进展^(1,2)。但大黄有效成分番泻甙(sennoside, SEN), 大黄多糖(polysaccharide from *Rheum palmatum*, RPP)和大黄素(emodin, EMD)直接对脑细胞内游离钙浓度的影响未见报道。本文用荧光指示剂 Fura-2 研究了 SEN, RPP 和 EMD 对脑细胞内游离钙浓度的影响。

材料与 方法

药物 Fura-2/Am 由中国科学院上海生理研究所提供;Eagle's MEM 为 NISSUI 制药公司产品;SEN(纯度大于 90%)和大黄多糖由国家医药管理局天津药物研究院提供;EMD 为 Sigma 公司产品;胰蛋白酶和其它试剂均为 AR 级。

脑细胞悬液制备 1~4 d Wistar 大鼠,断头处死。脑细胞按文献方法稍加修改进行分离⁽³⁾。用冰冷无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 Hank's 液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 137, KCl 5, glucose 5.6, Hepes 10, pH 7.4 冲洗,仔细去除脑膜和血管。用吸管反复吹吸分离脑组织,然后移入三角烧瓶,加入 20 ml 含 0.125% 胰蛋白酶的无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 Hank's 液。烧瓶在电磁振荡器上振摇 20 min (37°C , $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。然后加入 10 ml 冰冷的 Hank's 液终止消化,200 mesh 过筛,用无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 Hank's 液洗涤离心共 3 次 ($72 \times g$, 5 min) 后,再用 Eagle's 悬浮并稀释细胞至 $(1 \sim 2) \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

细胞负载及荧光测定 取细胞悬液 2 ml,加入 Fura-2/Am(终浓度 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,溶于 DMSO)和牛血清白蛋白(0.1%)。在超级恒温水浴振荡器中孵育 40 min (37°C , $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$)。再用无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 Hank's 液洗涤,离心($161 \times g$, 10 min)共 3 次。最后细胞悬浮在 2 ml 无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 Hank's 液中。测定前温育 5 min,加药后用吸管吹吸数次,使细胞分布均匀。本实验采用岛津 RF-510(带恒温器)型荧光分光光度计,将发射波长固定在 490 nm,通过快速转换激发波长(350 和 380 nm, 4~8 s 完成),记录 350/380 nm 的荧光比例变化。由公式⁽⁴⁾ $[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{Kd} \times (\text{R} - \text{R}_{\text{min}}) \cdot (\text{R}_{\text{max}} - \text{R})^{-1} \times \text{S}$ 计算出细胞内游离钙水平。其中, $\text{Kd} = 224 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在计算之前,需减去未负载 Fura-2 的细胞的自发荧光。

统计分析 本实验数据用平均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组均数间的差异采用“*t*”检验。

结 果

CaCl_2 和 KCl 对脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

在静息状态下,脑细胞在无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 Hank's 液(EGTA $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $176.25 \pm 44.67 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=10$)。在脑细胞悬液中,依次加入 CaCl_2 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

本文于 1994 年 6 月 16 日收到。

*国家自然科学基金资助课题

KCl ($120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后,脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 $307.76 \pm 73.32 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=10$) 和 $376.72 \pm 64.46 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=10$),均明显高于静息时水平 ($P < 0.01$,图 1)。

SEN 对脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

预先经 SEN ($0.07, 0.37 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 10 min 的脑细胞,在静息时 (EGTA $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或加入上述剂量的 $\text{CaCl}_2, \text{KCl}$ 后,除 SEN 在 $0.07 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时静息状态下脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 与对照组相比无明显减少外,其余 SEN 组与同一条件下对照组相比较脑细胞内游离钙水平均明显降低 ($P < 0.01$,图 1)。

RPP 对脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

在对照组,分别向脑细胞悬液中加入 CaCl_2 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 KCl ($120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后,脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 295.94 ± 55.59 ($n=7$) 和 $421.79 \pm 87.29 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=7$)。预先经 RPP ($50, 100, 200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 处理 10 min 的脑细胞,再加入上述剂量的 CaCl_2 和 KCl 后,脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 较对照组明显降低 ($P < 0.01$),其效应与 RPP 剂量相关(图 2)。

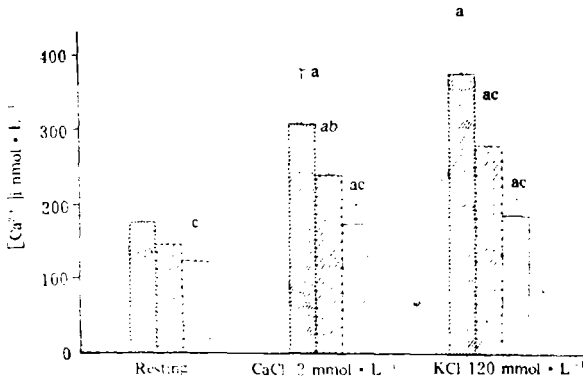


Fig 1 Effects of SEN on the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by CaCl_2 and KCl in isolated rat brain cells. $\bar{x} \pm s$. a. $P < 0.01$ vs resting; b. $P < 0.05$; c. $P < 0.01$ vs control. \square Control ($n=10$); \square SEN $0.07 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=8$); \square SEN $0.37 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=12$).

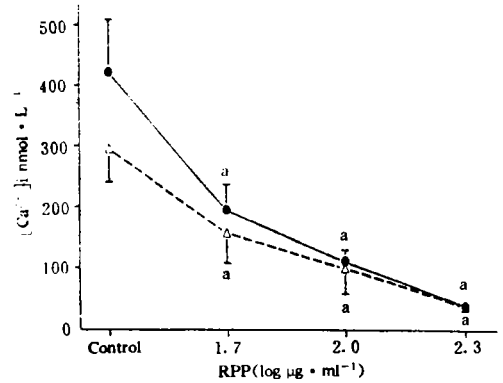


Fig 2 Inhibitory effects of RPP on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by CaCl_2 and KCl in isolated rat brain cells. $\bar{x} \pm s$. a. $P < 0.01$ vs control. \bullet — \bullet KCl $120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; \triangle — \triangle CaCl_2 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

EMD 对脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

脑细胞经 EMD ($0.037 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 10 min 后,在静息时 (含有 EGTA $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $298.18 \pm 94.07 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=15$),较对照组 $176.25 \pm 44.67 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=10$) 明显增高 ($P < 0.01$,图 3)。因为在静息时溶液中微量钙已被 EGTA 螯合,此时所测钙水平较对照组明显升高,说明 EMD 可促进内 Ca^{2+} 释放。加入上述剂量的 $\text{CaCl}_2, \text{KCl}$ 后,脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 572.99 ± 154.65 ($n=15$) 和 $669.94 \pm 112.60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=15$),均明显高于静息时和同一条件的对照组水平 ($P < 0.01$,图 3)。结果提示 EMD 不仅能促进内 Ca^{2+} 释放,还可促进外 Ca^{2+} 内流。

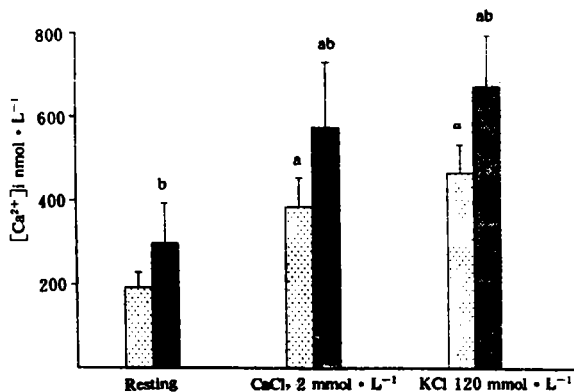


Fig 3 Effects of EMD on the increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by $CaCl_2$ and KCl in isolated rat brain cells. $\bar{x} \pm s$. a. $P < 0.01$ vs rest; b. $P < 0.01$ vs control. ▨ control ($n=10$); ■ EMD $0.037 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=15$).

讨 论

Ca^{2+} 对细胞有很重要的生理作用,如神经传导、肌肉收缩、细胞分泌和细胞增殖等^[6]。脑细胞的许多活动过程都需要通过 Ca^{2+} 调节。一旦钙平衡失调,细胞外 Ca^{2+} 大量进入细胞内,就会造成对细胞的严重损害。有报道癫痫病人脑细胞去极化时细胞内有钙聚集^[6]。Dubovsky等用维拉帕米治疗躁狂症成功地开创了钙拮抗剂治疗精神病的先例^[7]。以后发现很多钙拮抗剂有抗精神病作用^[8,9]。本文经SEN处理的脑细胞,在静息时($EGTA 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)或加入 $CaCl_2$ ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)或 KCl ($120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均较对照组水平降低,说明SEN有钙阻滞作用。RPP也可使 $CaCl_2$, KCl 诱导的 Ca^{2+} 水平呈剂量依赖性降低。此作用与文献报道大黄有钙通道阻滞作用^[10,11]一致,可能是大黄抗精神病作用^[12]的机理之一。反之,EMD不仅能促进内 Ca^{2+} 释放,还可促进外 Ca^{2+} 内流。EMD提高细胞内游离 Ca^{2+} 水平的作用不清,可能与促进脑细胞功能、促进酶促反应和促进递质的合成与释放有关。SEN,RPP和EMD均为大黄的有效成分,它们对细胞内游离 Ca^{2+} 有不同影响,提示大黄对脑细胞具有多种调节作用。

关键词 番泻甙;大黄多糖;大黄素;新型钙离子指示剂(Fura-2)

参 考 文 献

- 1 陈琼华. 中药大黄的生化药理学研究. 冶金医药, 1990, 7: 88
- 2 王少华, 徐斌, 金庆丰等. 大黄的临床应用经验. 中医杂志, 1992, 33: 4
- 3 李明, 王峻峰, 韩济生等. 应用 Fura-2/Am 检测分离的神经细胞内游离钙及其变化. 药理学, 1991, 20: 890
- 4 Grynkiewicz G, Poenini M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, 260: 3440
- 5 金有豫. 钙、钙拮抗剂与钙激动剂. 中国中药杂志, 1992, 2: 38
- 6 Chouza C. Parkinsonism, tardive dyskinesia, akathisia and depression induced by flunarizine. *Lancet*, 1986, 1: 1301

- 7 Dubovsky SL. Effectiveness of verapamil in the treatment of the manic patient. *Am J Psychiatry*, 1982, 139: 502
- 8 许律西, 翟书涛. 钙通道阻滞剂在精神科临床应用的估价. 中华神经精神科杂志, 1992, 25: 246
- 9 Schepelern S. Verapamil in treatment of severe schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*, 1987, 75: 557
- 10 高贤钧. 中草药钙通道阻滞剂的研究与展望. 中国中西医结合杂志, 1990, 10: 447
- 11 康毅, 郭世锋, 周文洛等. 大承气汤对肠梗阻大鼠离体结肠平滑肌⁴⁵Ca内流影响的实验研究. 中国中西医结合杂志, 1991, 11: 107
- 12 周长发. 大黄在治疗精神病中的应用. 中国中药杂志, 1993, 18: 441

EFFECTS OF SENNOSIDES, RHUBARB POLYSACCHARIDES AND EMODIN ON THE CYTOPLASMIC FREE CALCIUM IN ISOLATED RAT BRAIN CELLS*

XZ Lin and ZH Jin

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

ABSTRACT Free intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) levels in rat brain were measured by Ca^{2+} —sensitive fluorescent indicator Fura-2/Am and the effects of sennoside (SEN), polysaccharides from *Rheum palmatum* (RPP) and emodin (EMD) were studied. Results showed that the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level in the brain cells was $176.25 \pm 44.67 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=10$) in Ca^{2+} -free Hank's solution containing EGTA $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. After adding CaCl_2 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and KCl ($120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) to the brain cells suspension sequentially, the free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels were obviously elevated ($P < 0.01$) compared with that of resting level. The brain cells were pretreated with SEN ($0.07, 0.37 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 10 min. In the resting or using the above doses of CaCl_2 and KCl, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were obviously decreased compared with the control groups ($P < 0.01$) at the same conditions. RPP dose-dependently decreased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$. On the contrary, when brain cells were pretreated with EMD ($0.037 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 10 min, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were obviously increased compared with the control groups ($P < 0.01$) at the same conditions. The results showed that EMD could not only promote the release of intracellular Ca^{2+} but also the influx of extracellular Ca^{2+} . The opposite effects of the different active components of rhubarb on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels suggest that rhubarb may have different kinds of regulatory functions on brain cells.

Key words Sennoside; Rhubarb polysaccharide; Emodin; Fura-2/Am

* The project is supported by National Nature Science Foundation of China