

to be ineffective per se on  $H_2O_2$  production as a stimulus, but there were biphasic effects on fMLP-stimulated neutrophils. ATP and neutrophils were incubated for 2 min,  $H_2O_2$  production was increased markedly. With the prolong of time at 5 min,  $H_2O_2$  production was changed into inhibition. This change is coincided with metabolism of ATP in time course. ATP starting from 2 min was changed into ADP and AMP, which was breakdowned to adenosine. The inhibition of ATP on neutrophils was antagonized by CGS15943, an antagonist of adenosine. It was indicated that the biphasic effects of ATP, from stimulation to inhibition, was related to metabolism of ATP to adenosine. In other words, the stimulation was performed by  $P_{2u}$  receptor, while the inhibition was performed by adenosine  $A_2$  receptor.

**Key words:** ATP Neutrophil  $H_2O_2$  Adenosine

## 氯化钾或谷氨酸对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞钙离子通透性的影响\*

陈文东 李雅莉 李 林

(首都医科大学宣武医院药理研究室 北京脑老化重点实验室 北京 100053)

人神经母细胞瘤细胞是一种分化程度较低的肿瘤细胞。该细胞繁殖快,细胞形态、生理和生化功能与正常神经细胞相似,胞体也呈锥体状,同时具有明显的轴突<sup>[1]</sup>。高浓度的氯化钾或谷氨酸对正常的神经细胞均具有损伤作用,甚至造成细胞死亡。其损伤机制的主要原因之一是由于氯化钾或谷氨酸引起细胞膜上的  $Ca^{2+}$  通道开放,使得细胞内  $Ca^{2+}$  超载,造成细胞损伤<sup>[2]</sup>。我们的研究目的是考察氯化钾或谷氨酸对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系是否具有同样的损伤作用,希望能用该细胞作为神经药理研究中的实验细胞模型。

### 材料与方 法

#### 1. 试剂和主要仪器

氯化钾(分析纯)为北京德茂生物化工厂产品;谷氨酸购自 Serva 公司;3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT),2-thiobarbituric acid (TBA)为 Sigma 公司产品;DMEM 培养基,胎牛血清为 Gibco 公司产品。

LP4000 型全自动酶标仪,法国巴斯德公司生产;RF5000 型荧光分光光度计,日本岛津公司生产;IMT-2 型相差倒置显微镜,日本奥林巴斯公司生产。

#### 2. SH-SY5Y 细胞培养

SH-SY5Y 细胞由瑞典卡罗琳斯卡研究所 B. Winblad 教授赠送。将传代的 SH-SY5Y 细胞用 DMEM 培养液(内含 10% 胎牛血清)从培养瓶壁上吹散下来,用台盼蓝拒染法在显微镜下计算,算出活细胞密度,然后用含胎牛血清 DMEM 培养液稀释至  $5 \times 10^4$  /ml,将其接种于培养板中(96 孔和 24 孔板),在 37℃ 二氧化碳孵箱培养 4 天后待用。

#### 3. 细胞活性的测定(MTT 法)

接种在 96 孔板的 SH-SY5Y 细胞在  $CO_2$  孵箱培养 4 天后,分组分别加入不同浓度的细胞损伤诱导剂(氯化钾或谷氨酸),将细胞在  $CO_2$  孵箱内培养 4h;然后每孔加入 20 $\mu$ l 浓度为 5mg/ml 的 MTT 溶液,再置入  $CO_2$  孵箱培养,4h 后弃培养孔中的上清液,每孔加入 200 $\mu$ l 的 DMSO,轻轻振荡后,于全自动酶标仪在 550nm 处测定吸光度,其值代表细胞活性大小。

#### 4. 细胞脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的测定

接种在 24 孔板的细胞在  $CO_2$  孵箱培养 4 天后,分组分别加入细胞损伤的诱导剂(氯化钾或谷氨酸),然后将细胞在  $CO_2$  孵箱内培养 4h,每孔取 150 $\mu$ l 上清液与等体积的 12.5% 冰醋酸混合,2000rpm 离心 10min,

本文 1999 年 4 月 19 日收到,2000 年 5 月 8 日接受。

\*北京市科委资助北京市重点科技实验室项目(编号 951890600),北京市科委资助北京市科技项目(编号 952601800),国家人事部资助优秀留学回国人员科研项目(1998)。

取上清液与等体积的0.67% TBA溶液(内含0.034% EDTA)混合,95℃水浴20min,然后用冷水冷却,再加入3ml的正丁醇,振荡30s,2000rpm离心10min,将2ml上清液移至石英比色杯中,用荧光分光光度计以520nm为激发光波长,在553nm波长处测定荧光强度值,该值代表细胞脂质过氧化程度,间接反映细胞受损情况。

### 5. 细胞形态观察

接种在48孔板的SH-SY5Y细胞在CO<sub>2</sub>孵箱培养4天后,分组分别加入细胞损伤的诱导剂(氯化钾或谷氨酸),然后将细胞在CO<sub>2</sub>孵箱内培养4h,利用相差显微镜在20倍物镜下观察细胞形态的改变。

### 6. 统计分析

实验结果用SPSS软件处理,结果用均数±标准差( $\bar{X} \pm s$ )表示,组间比较采用t检验。

## 结 果

培养的SH-SY5Y细胞与不同浓度的氯化钾(10-80mmol/L)或谷氨酸(25-100mmol/L)共同温育4h后,观察反映细胞存活率的MTT值的变化。以含Ca<sup>2+</sup>的Hank's缓冲液为温育液时,高浓度的氯化钾(40-80mmol/L)或谷氨酸(50-100mmol/L)使SH-SY5Y细胞存活率明显降低。而以不含Ca<sup>2+</sup>的Hank's缓冲液为温育液时,细胞与不同浓度的氯化钾或谷氨酸温育4h后的细胞存活率无明显变化(图1,图2)。

当温育液中含Ca<sup>2+</sup>时,与不同浓度氯化钾

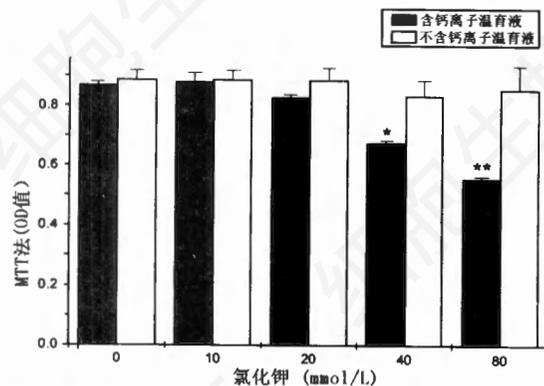


图1 氯化钾对SH-SY5Y细胞存活率的影响  
\*p<0.05, \*\*p<0.01,与不含钙离子温育液对照组比较。

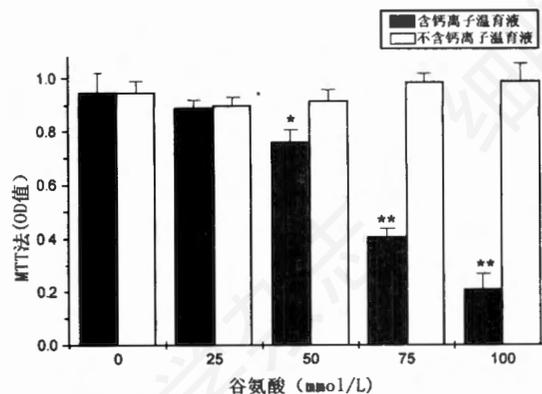


图2 谷氨酸对SH-SY5Y细胞存活率的影响  
\*p<0.05, \*\*p<0.01,与不含钙离子温育液对照组比较。

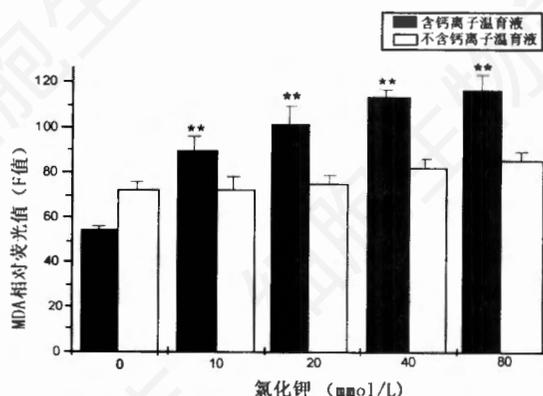


图3 氯化钾对SH-SY5Y细胞脂质过氧化产物丙二醛的影响

\*\*p<0.01,与不含钙离子温育液对照组比较。

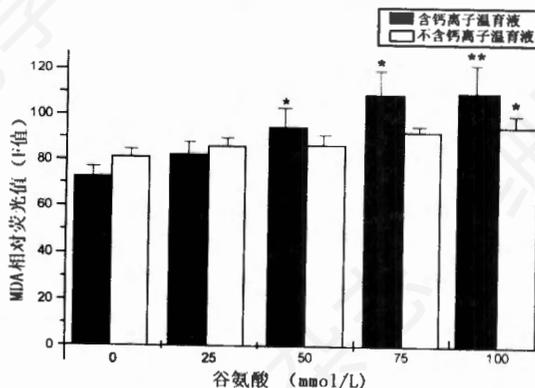


图4 谷氨酸对SH-SY5Y细胞脂质过氧化产物丙二醛的影响  
\*p<0.05, \*\*p<0.01,与不含钙离子温育液对照组比较。

(10-80mmol/L)或谷氨酸(50-100mmol/L)温育4h的细胞组中反映MDA的荧光强度值明显升高,表明细胞脂质过氧化程度增强;但当温育液中无 $\text{Ca}^{2+}$ 时,细胞与不同浓度的氯化钾或谷氨酸共同温育4h后的MDA荧光强度值无明显变化(图3,图4)。

相差显微镜的观察结果也表明,以含 $\text{Ca}^{2+}$ 的Hank's缓冲液为温育液时,高浓度的氯化钾(40mmol/L)或谷氨酸(100mmol/L)使得SH-SY5Y细胞形态发生变化,同正常细胞比较,细胞胞体变圆,轴突断裂、消失,不再具有神经细胞形态,并且死亡细胞较多(图版图B,E);而温育液中无 $\text{Ca}^{2+}$ 时,细胞与氯化钾或谷氨酸温育后的形态改变则不明显(图版图C,F)。

## 讨 论

近年的研究发现许多中枢神经系统疾病与神经细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 超载有关,神经细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 超载可以造成细胞损伤,甚至细胞死亡<sup>[3]</sup>。神经细胞膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道主要有两种,一种为电压依赖性钙通道,另外一种为N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体耦合的钙通道。氯化钾可以改变细胞膜电位,使得电压依赖性钙通道开放,谷氨酸则可以和NMDA受体结合,造成与NMDA受体耦合的钙通道开放,二者均可造成细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流<sup>[4]</sup>。如果这些通道持续开放,则造成细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 超载,引起细胞损伤<sup>[5]</sup>,因而我们分别采用氯化钾或谷氨酸作为细胞损伤工具药。根据上述特点,我们用细胞存活率和脂质过氧化程度来反映细胞损伤程度。反映细胞存活我们采用MTT法。MTT法反映的是细胞线粒体脱氢酶活性高低,可以间接反映细胞存活情况<sup>[6]</sup>。细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 超载的一个重要后果是引起细胞内自由基的增加,脂质过氧化程度也随之增高,进而造成细胞损伤。

从实验结果可以看出,在含 $\text{Ca}^{2+}$ 温育液中,高浓度的氯化钾或谷氨酸均可以造成细胞损伤;但是如果温育液中没有 $\text{Ca}^{2+}$ 时,氯化钾或谷氨酸的细胞损伤作用则诱导不出或不明显。

由此看来这种损伤作用与 $\text{Ca}^{2+}$ 关系密切,细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 过度进入细胞内是造成细胞损伤的主要原因之一。由于人神经细胞瘤SH-SY5Y细胞系繁殖较快,对外界环境要求较低,比较适用于大规模的实验,因此我们认为在某些神经药理学研究中该细胞系可以作为实验细胞模型。

## 摘 要

用人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞系作为研究对象,通过测定细胞存活率(MTT法)和脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA),探讨了氯化钾(KCl)或谷氨酸分别对人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞的损伤作用。结果发现在含 $\text{Ca}^{2+}$ 的温育液中,SH-SY5Y细胞与KCl(40-80mmol/L)或谷氨酸(50-100mmol/L)一起温育4h后,细胞存活率显著降低,脂质过氧化程度明显增高。当温育液中无 $\text{Ca}^{2+}$ 时,KCl或谷氨酸均未引起细胞存活率和脂质过氧化程度的显著变化。相差显微镜观察细胞形态的变化与上述结果吻合,提示氯化钾或谷氨酸分别对SH-SY5Y细胞均有损伤作用,并且这种作用与细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流和脂质过氧化有关。该传代细胞模型为筛选神经保护药提供了一种快速而简便的手段。

**关键词:**神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y  
氯化钾 谷氨酸 细胞损伤 脂质过氧化 钙离子

## 参 考 文 献

- [1] Plman, S., et al., 1990, *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **592**:25-37.
- [2] Disterhoft, J. F., et al., 1994, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **747**:382-406.
- [3] Hartmann, H., et al., 1994, *Life Sci.*, **55**:2011-2018.
- [4] Miller, R. J., 1987, *Science*, **235**(4784):46-52.
- [5] Siesj, B. K., 1989, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **568**:234-251.
- [6] Li L and B. H. S. Lau, 1993, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **29A**:531-536.

## INFLUENCE OF POTASSIUM CHLORIDE OR GLUTAMATE ON CALCIUM ION PERMEABILITY OF HUMAN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELL LINE

CHEN Wen Dong LI Ya Li LI Lin

(Department of Pharmacology, Xuan-Wu Hospital of Capital University of Medical  
Sciences, Beijing Key Laboratory for Brain Aging, Beijing 100053)

### ABSTRACT

The present study investigated the injury of cultured human neuroblastoma SH-SY5Y cell line induced by potassium chloride(KCl) or glutamate, using the methods of MTT and TBA assays which measured the cell viability and malondialdehyde (MDA), respectively. The results showed that, when the cultured SH-SY5Y cells were incubated with KCl (40 – 80mmol/L) or glutamate (50 – 100mmol/L) for 4 hours in Hank's buffer containing  $Ca^{2+}$ , the cell viability was significantly decreased and the MDA content standing for the degree of lipid peroxidation increased; but the incubation of KCl or glutamate with SH-SY5Y cells in Hank's buffer without  $Ca^{2+}$  did not induce the obvious changes in cell viability and lipid peroxidation. The morphological changes observed through the phase-contrast microscope were in accord with above results. The experiments indicate that the cultured human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be injured by KCl or glutamate, and their injur effects are related to the inflow of extracellular  $Ca^{2+}$  and lipid peroxidation. This cell model may provide a quick and simple means for screening the neuro-protective drugs.

**Key Words:** Neuroblastoma cell lines SH-SY5Y Potassium chloride Glutamate Cellular injury Lipid peroxidation Calciumion

## 还原型谷胱甘肽对亚砷酸钠诱导的内皮细胞凋亡的保护作用

肖南 刘初 田昆仑 刁有芳 汪志文

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所 重庆 400042)

内皮细胞(endothelial cells, ECs)由于其分布的特殊性,在结构和功能上均很重要。ECs的凋亡可能导致血管内皮屏障功能的丧失,使血管易于渗漏及组织器官水肿。研究表明 ECs的凋亡与细胞内氧化应激反应有关<sup>[1]</sup>,而还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)及其相关氧化—还原循环在维持细胞还原状态,抗氧化损伤中具有重要意义<sup>[2]</sup>。本研究采用亚砷酸钠(sodium arsenite, Ars)诱导 ECs 发生凋亡,观察 GSH对 ECs 的保护作用,并初步探讨其保护作用的机理。

### 材料和方法

#### 1. 主要试剂和仪器

GSH(Sigma), DMEM 培养基(Gibco), Ars(Merck, Germany), 胰蛋白酶(Sigma), Dihydrorhodamine 123(Sigma), mouse anti human CD54: FITC (Serotec), 7-amino-actinomycin D(7-AAD), 流式细胞仪(Coulter), CO<sub>2</sub> 培养箱(Shel-Lab), 恒温水浴(Cole-Parmer), 其他有关试剂均为国产分析纯。

#### 2. 人内皮细胞的培养

本文 1999 年 9 月 7 日收到, 2000 年 2 月 14 日接受。