

## Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶参与缺氧所致大鼠皮质神经元内钙升高

李 石<sup>1</sup>, 郭 芳<sup>1</sup>, 董 惠<sup>2</sup>, 王永利<sup>1\*</sup>

(1. 河北医科大学药理学教研室, 石家庄 050017; 2. 河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050017)

**[摘要]** **目的:**探讨 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶对缺氧所致大鼠皮质神经元内钙升高的影响。**方法:**采用激光共聚焦显微镜及可视化动缘探测系统,测定培养大鼠皮质神经元在缺氧不同时间和双氢哇巴因(DHO,一种 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶抑制剂)不同浓度时细胞内钙离子浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)和细胞内钠离子浓度([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>),并观察 DHO 对缺氧后神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>和[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>升高作用的影响。**结果:**DHO(10<sup>-9</sup>~10<sup>-3</sup> mol/L)和缺氧(4~20 min)均可显著升高正常皮质神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>和[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>,并分别具有剂量依赖性和时间依赖性。在缺氧 4 min 时皮质神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>和[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>即明显升高,此时给予 DHO 10<sup>-3</sup> mol/L 可使二者进一步升高;但当皮质神经元缺氧 15 min 后,再给予相同剂量的 DHO 则不能使[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>和[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>进一步增加;若对 DHO(10<sup>-3</sup> mol/L)预先升高[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的正常神经元再进行缺氧灌流,则[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>不继续升高。**结论:**Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶抑制是缺氧所致大鼠皮质神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高的机制之一。

**[关键词]** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶; 神经元; 缺氧**[中图分类号]** R 743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0044-04

### Involvement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in hypoxia-induced increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat cortical neurons

LI Shi<sup>1</sup>, GUO Fang<sup>1</sup>, DONG Hui<sup>2</sup>, WANG Yong-li<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effect of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> level induced by hypoxia in rat cortical neurons. **Methods:** Using confocal laser scanning microscope and video based motion edge detection system, we measured the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and Na<sup>+</sup> concentration ([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>) in cortical neurons exposed to hypoxia for different time periods and at presence of different concentrations of dihydroouabain (DHO, an inhibitor of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase). We also observed the effect of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> level induced by hypoxia in rat cortical neurons. **Results:** DHO (10<sup>-9</sup>-10<sup>-3</sup> mol/L) dose-dependently and hypoxia (4-20 min) time-dependently increased the levels of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> in cultured cortical neurons. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> increased significantly 4 min after cortical neurons were exposed to hypoxia, and addition of DHO (10<sup>-3</sup> mol/L) further increased their concentrations. While 15 min after hypoxia exposure, different concentrations of DHO did not further increase [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. We also found that hypoxia exposure did not enhance DHO pretreatment-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase. **Conclusion:** Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is one of the mechanisms responsible for hypoxia-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in cortical neurons.

**[KEY WORDS]** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase; neurons; anoxia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 44-47]

缺血性脑血管病是危害人类健康的常见多发病。许多研究已经证实各种原因造成的脑缺血均可引起供氧不足而促进能量代谢障碍,ATP 产生不足甚至耗竭,从而使一些 ATP 依赖性的酶活性降低,影响 Ca<sup>2+</sup> 的动态平衡<sup>[1]</sup>。当 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性降低时,其引起的细胞外 K<sup>+</sup> 浓度显著升高可使神经元去极化,这一方面使电压依赖性钙通道开放,通过 Ca<sup>2+</sup> 内流升高细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>),另一方面去极化也促进 Na<sup>+</sup> 大量内流,升高的细胞内 Na<sup>+</sup> 浓度([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>)则可通过翻转 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交换促进 Ca<sup>2+</sup> 内流,引起神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>显著升高,导致缺血性神经元损伤,最终通过 Ca<sup>2+</sup> 促进内钙释放<sup>[2-3]</sup>。由于脑缺血是一个综合、复杂的病理变化过程,究竟

哪些机制参与了缺氧诱发的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高目前尚不完全清楚<sup>[4]</sup>。本实验室以往的研究曾发现,大鼠和沙土鼠全脑缺血后的 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性明显降低<sup>[5-6]</sup>,这表明 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶在缺血性脑病中占有重要地位,但缺氧所致的神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高是否与 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶有关仍然缺乏直接的实验证据。本研究拟在培养皮质神经元观察 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性改变对缺氧所致神经元[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>和[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>的影响,以探讨 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶在缺血性脑损伤中的作用。

**[作者简介]** 李 石, 博士生. E-mail: dong\_ji@tom.com

\* Corresponding author. E-mail: wangy152@heinfo.net

## 1 材料和方法

1.1 皮质神经元体外分散培养 取新生 24 h 以内的 SD 大鼠(由河北医科大学实验动物中心提供), 无菌条件下断头、取脑, 解剖显微镜下分离出双侧皮质, 置于 D-Hank 液中, 将皮质组织剪成体积为  $1 \text{ mm}^3$  的小块, 用 0.125% 胰蛋白酶消化 ( $37^\circ\text{C}$ 、25 min) 分散后, 用种植培养液 (10% 马血清、10% 胎牛血清、80% DMEM) 稀释成  $5 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞悬液, 接种于涂有多聚赖氨酸 ( $0.1 \text{ mg/ml}$ ) 的 24 孔细胞培养板中, 每孔  $200 \mu\text{l}$ , 于  $37^\circ\text{C}$ 、10%  $\text{CO}_2$  的培养箱 (Sanyo) 内培养。24 h 后倾去培养板内种植培养液, 改用饲养培养液 (98% Neurobasal、2% B27、谷氨酰胺  $100 \mu\text{g/ml}$ ) 培养。于接种第 5 日, 在培养板中加入阿糖胞苷 ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) 以抑制非神经细胞的过度增殖, 作用 48 h 后更换新鲜培养液, 以后每周半量换液 2 次。细胞培养至 14 d 后用于实验, 并采用免疫荧光法对皮质神经元体外分散培养进行鉴定 [以微管相关蛋白 (MAP-2, Santa Cruz) 标记皮质神经元]。

### 1.2 皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 $[\text{Na}^+]_i$ 测定

1.2.1 采用可视化动缘探测系统检测培养的皮质神经元  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光信号 用 Fura-2  $10 \mu\text{mol/L}$  (Sigma)  $37^\circ\text{C}$  避光孵育培养皮质神经元 30 min 以测定细胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , 用 SBFI  $10 \mu\text{mol/L}$  (Sigma)  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 1 h 以测定细胞内  $[\text{Na}^+]_i$ , 然后采用可视化动缘探测系统及双激发荧光光电倍增系统 (美国 ION OPTIX 公司, Fluorescence System Interface) 通过 340 或 380 nm 两个波长激发光照射并交替扫描以采集各自的荧光信号, 并由上述两种波长荧光强度的比值 ( $\text{Ratio} = F_{340}/F_{380}$ ) 反映相对的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$ 。每部分实验记录 4 片细胞 ( $n=4$ ), 每片细胞上记录 10 个细胞求平均值作为 1 个样本。

1.2.2 采用激光共聚焦扫描显微镜检测培养的皮质神经元  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  荧光信号 Fluo-3  $7.5 \mu\text{mol/L}$  (Sigma)  $37^\circ\text{C}$  孵育神经元 40 min 后, 用激光共聚焦扫描显微镜 (Leica TCS-SP2 激光共聚焦显微镜) 检测培养皮质神经元的相对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , 激发波长为 488 nm 的氩激光, 发射波长为 516 nm, 采样频率为 488 Hz。正常对照组荧光值为  $F_0$ , 缺氧后的荧光峰值为  $F$ , 钙离子荧光强度用  $R = F/F_0$  表示, 每组均计算 4 片细胞 ( $n=4$ ), 每片细胞上记录 10 个细胞求平均值作为 1 个样本。

1.3 双氢哇巴因 (DHO) 对皮质神经元  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  的影响 Fura-2 和 SBFI 负载神经元后, 用

正常 HBS 灌流皮质神经元 5 min, 记录基础的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光比值作为正常对照, 然后连续灌流含有不同浓度 DHO ( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-3} \text{ mol/L}$ , Sigma,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的一种抑制剂) 的 HBS 各 2 min, 检测神经元  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光比值。

### 1.4 缺氧对皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 $[\text{Na}^+]_i$ 的影响

1.4.1 皮质神经元体外缺氧培养 皮质神经元培养至 14 d, 将皮质神经元培养液换成无糖、无血清细胞外液 [成分为 (mmol/L): NaCl 116.4、KCl 5.4、 $\text{CaCl}_2$  1.8、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.8、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.6、 $\text{NaHCO}_3$  26.2, pH 7.2~7.4], 立即放入恒温 ( $37^\circ\text{C}$ ) 的密闭容器内, 连续充入无氧混合气 (95%  $\text{N}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ) 0、0.5、1、2 或 4 h, 测定神经元相对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。

1.4.2 皮质神经元急性缺氧灌流 在 Fura-2 和 SBFI 负载神经元后, 将负载好的细胞片放入灌流槽中, 灌流速度  $2 \text{ ml/min}$ , 室温保持在  $20 \sim 22^\circ\text{C}$ 。持续给予 5 min 正常 HBS [成分为 (mmol/L): NaCl 142.6、KCl 5.4、HEPES 10、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2、D-Glucose 8、 $\text{CaCl}_2$  3] 以稳定细胞状态, 记录基础的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光比值做为正常对照, 然后换为无氧无糖的 HBS [成分中去掉 D-Glucose, 提前以无氧混合气 (95%  $\text{N}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ) 饱和 1 h] 连续灌流 20 min, 分别于缺氧 2、4、6、8、10、15 和 20 min 时测定神经元  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光比值。

1.5 DHO 对缺氧皮质神经元  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  的影响 Fura-2 和 SBFI 负载神经元后, 将负载好的细胞片在正常 HBS 中平衡 5 min, 记录基础的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光比值做为正常对照, 连续灌流无氧无糖的 HBS 4 min 或 15 min 后测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光比值, 然后灌流含 DHO ( $10^{-3} \text{ mol/L}$ ) 的正常 HBS 2 min, 测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  和  $[\text{Na}^+]_i$  荧光比值。

用 Fluo-3 负载神经元后, 在正常 HBS 中平衡 5 min, 记录  $\text{Ca}^{2+}$  基础荧光比值做为正常对照, 灌流含有 DHO ( $10^{-3} \text{ mol/L}$ ) 的正常 HBS, 待  $\text{Ca}^{2+}$  的荧光信号稳定后, 采集荧光强度, 连续灌流含有 DHO ( $10^{-3} \text{ mol/L}$ ) 的无氧无糖 HBS 灌流 15 min, 测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  荧光强度。

1.6 统计学处理 实验所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 10.0 采用 Student's  $t$  检验进行组间差异分析, 采用 Pearson 检验进行相关性分析。

## 2 结果

2.1 培养皮质神经元的鉴定 皮质神经元接种后 1~2 h 开始贴壁, 细胞呈圆形或椭圆形, 3 d 后多数

细胞从胞体长出数个突起,神经元在7~10 d开始成熟,胞体晕光明显,突起变粗、变长并且有分支,12 d后神经细胞生长最为丰满,胞体圆形或多角形,经MAP-2染色后,神经元的胞体和树突可见明显的绿色荧光(图1)。

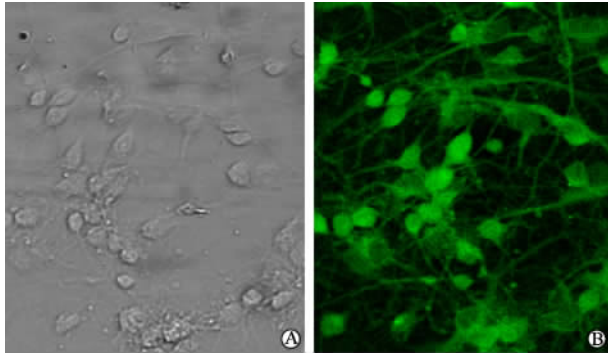


图1 培养的皮质神经元的鉴定

Fig 1 Immunocytochemical identification of cultured cortical neurons (×400)

A: Light photomicrograph of cortical neurons; B: Cortical neurons stained with MAP-2

2.2 DHO对皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 的影响 有氧状态下,不同浓度的DHO可剂量依赖性显著升高皮质神经元 $[Na^+]_i$  ( $r=0.939, P<0.01$ )和 $[Ca^{2+}]_i$  ( $r=0.984, P<0.01$ );当DHO的浓度为 $10^{-3}$  mol/L时,反映 $[Ca^{2+}]_i$ 的荧光比值从 $0.4678 \pm 0.0100$ 上升到 $0.7195 \pm 0.0048$ ,反映 $[Na^+]_i$ 的荧光比值从 $0.5368 \pm 0.0059$ 增加到 $0.5820 \pm 0.0072$ (图2),提示抑制 $Na^+, K^+$ -ATP酶可升高皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 。

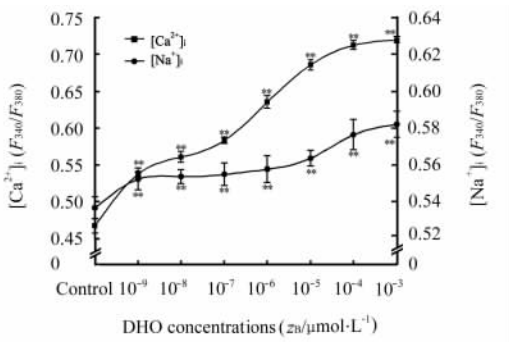


图2 DHO对皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 的影响  
Fig 2 Changes of  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[Na^+]_i$  induced by DHO in cultured cortical neurons

\*\*  $P<0.01$  vs control;  $n=4, \bar{x} \pm s$

2.3 缺氧对皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 的影响 皮质神经元在缺氧培养0.5~4 h的各时间点均能

显著升高,在缺氧培养0.5 h时 $[Ca^{2+}]_i$ 即可明显升高( $1.4090 \pm 0.3078, P<0.05$ ),在1、2和4 h均维持在最高峰( $1.7148 \pm 0.4617, 1.6154 \pm 0.4936, 1.5977 \pm 0.4653, P<0.01$ )。

鉴于神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 在缺氧培养30 min时即明显升高,我们又观察了急性缺氧灌流20 min以内神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 的变化。结果表明培养的皮质神经元在缺氧20 min内可时间依赖性升高 $[Ca^{2+}]_i$  ( $r=0.896, P<0.01$ )和 $[Na^+]_i$  ( $r=0.901, P<0.01$ ),在缺氧4 min时 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ (分别为 $0.5780 \pm 0.0346, 0.5705 \pm 0.0206$ )均显著高于缺氧前(分别为 $0.5064 \pm 0.0210$ 和 $0.5193 \pm 0.0176$ ) ( $P<0.01$ );缺氧15 min时又使 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 较缺氧4 min时进一步升高(分别为 $0.6336 \pm 0.0303$ 和 $0.626 \pm 0.0156$ ) ( $[Ca^{2+}]_i, P<0.05; [Na^+]_i, P<0.01$ )(图3)。为此我们选择4 min和15 min两个时间点分别观察DHO对皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 的影响。

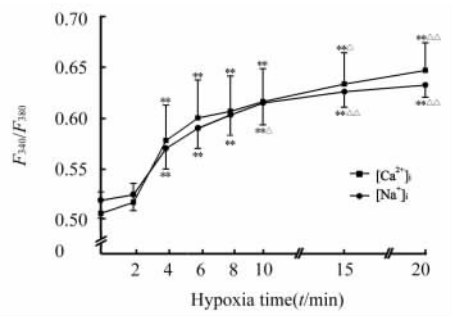


图3 缺氧对皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 的影响  
Fig 3 Changes of  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[Na^+]_i$  in cultured cortical neurons after different hypoxia exposure for different periods

\*\*  $P<0.01$  vs 0 min;  $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$  vs 4 min;  $n=4, \bar{x} \pm s$

2.4 DHO对缺氧皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Na^+]_i$ 的影响 实验结果表明,缺氧4 min时,培养皮质神经元 $[Na^+]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的分别从 $0.5078 \pm 0.0056$ 和 $0.5285 \pm 0.0181$ 上升到 $0.5278 \pm 0.0067$ 和 $0.5995 \pm 0.0129$  ( $P<0.01$ ),DHO ( $10^{-3}$  mol/L)可使神经元 $[Na^+]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_i$ 进一步显著升高( $0.5395 \pm 0.0068$ 和 $0.6253 \pm 0.0062, P<0.01$ ),提示缺氧引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能与 $Na^+, K^+$ -ATP酶抑制有关,而在缺氧4 min时, $Na^+, K^+$ -ATP酶的功能尚未被完全抑制。

神经元持续缺氧15 min时, $[Na^+]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_i$ 同步显著升高(分别从 $0.5188 \pm 0.0232$ 和 $0.5188 \pm 0.0318$ 上升到 $0.6148 \pm 0.0214$ 和

0.638 5±0.005 2,  $P < 0.01$ ),再给予 DHO( $10^{-3}$  mol/L)时,神经元 $[\text{Na}^+]_i$ 和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 0.605±0.004 69和 0.639±0.027 72,无明显改变,表明 15 min 的缺氧已使神经元  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的功能全部抑制。当预先用 DHO( $10^{-3}$  mol/L)升高皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (1.613 6±0.118 3)后,再用含相同浓度 DHO 的无氧无糖 HBS 灌注使其缺氧 15 min 并不改变 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (1.624 0±0.073 8),进一步提示缺氧所致的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高可能系  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶抑制的结果。

### 3 讨论

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶又称为钠泵,是一类广泛存在于真核生物细胞膜中的跨膜蛋白,可利用水解 ATP 释放的能量将胞内 3 个  $\text{Na}^+$  转运到胞外,同时将胞外的 2 个  $\text{K}^+$  转运到胞内,以恢复复极化后细胞内外的离子平衡。当其功能受到抑制时, $\text{Na}^+$  外排减少而大量聚集于细胞内,致使  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交换体逆向转运,终导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Na}^+$  是缺氧诱导的神经元损伤中两种主要的因素<sup>[7]</sup>, Haigney 曾发现,细胞缺氧后  $\text{Na}^+$  可通过电压依赖性  $\text{Na}^+$  通道内流而引起  $\text{Na}^+$  在胞内聚集,最终导致胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载<sup>[8]</sup>。有研究证明 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的大量增加要比 $[\text{Na}^+]_i$ 晚,在缺氧 5 min 以内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 仍然位于生理范围内,而 $[\text{Na}^+]_i$ 则超过了正常域值<sup>[9]</sup>。但也有研究表明胞内  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Na}^+$  的积聚与胞外  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Na}^+$  的降低、缺氧早期去极化同时出现<sup>[10]</sup>。本实验通过检测培养的皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 $[\text{Na}^+]_i$ ,发现缺氧可时间依赖性同步升高培养皮质神经元的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 $[\text{Na}^+]_i$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶抑制剂 DHO 也可剂量依赖性升高胞内 $[\text{Na}^+]_i$ 水平,同时伴有 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高,与上述文献报告相一致,表明缺氧后  $\text{Na}^+$  活动和  $\text{Ca}^{2+}$  活动密切相关。提示  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶对维持皮质神经元内  $\text{Ca}^{2+}$  稳态起重要作用。

有研究报道短暂缺氧(brief hypoxia)3 min,诱导的神经元去极化为可逆性的,不会造成神经元的永久损伤,短暂缺氧仅消耗约 30%的 $[\text{ATP}]_i$ <sup>[11]</sup>,这与本实验的结果一致,缺氧 4 min 再给予 DHO 可引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 $[\text{Na}^+]_i$ 的进一步升高,此时表明  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶向胞外转运  $\text{Ca}^{2+}$  功能存在,有助于皮质神经元内高钙的清除,对缺氧诱导的损伤仍有

代偿功能,提示  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶对神经元抵抗短暂缺氧损伤起积极保护作用。

本实验中缺氧 15 min 后再应用 DHO,则神经元的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 $[\text{Na}^+]_i$ 不再进一步升高。其原因可能是由于长时缺氧 ATP 不能得到补充呈耗竭状态, $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶已被完全抑制,再应用 DHO 并不能增加其抑制程度,所以 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 维持缺氧水平。提示缺氧时  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的功能抑制,可能是导致皮质神经元内  $\text{Ca}^{2+}$  超载的重要原因。此外本实验先给予 DHO 完全抑制  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的转运功能后,再使皮质神经元缺氧并不进一步升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,这从另外一个角度提示缺氧导致的神经元钙超载与  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶抑制关系密切, $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶抑制是缺氧所致大鼠皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的机制之一。

### [参考文献]

- [1] Farber JL. Biology of disease-membrane injuring and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis[J]. Lab Invest, 1982, 47: 114-23.
- [2] Blaustein MP. The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes[J]. Rev Biochem Pharmacol, 1974, 70: 33-82.
- [3] Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function[J]. Science, 1978, 235: 46-52.
- [4] 李峰,谢瑶,冯志博.低氧与缺血诱导培养海马和皮质神经元钙应答反应的比较[J].解剖学杂志, 2001, 24: 504-508.
- [5] 郭芳,齐亚娟,王永利.大鼠缺血性全脑损伤  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性及  $\alpha$  亚基表达的变化[J].中国药理学通报, 2006, 22: 234-237.
- [6] 白剑,王永利.双苯氟嗪对沙土鼠急性脑缺血性脑水肿的影响[J].中华医学杂志, 2002, 82: 1130-1132.
- [7] Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death[J]. Trends Neurosci, 1995, 18: 56-60.
- [8] Nicotera P, Orrenius S.  $\text{Ca}^{2+}$  and cell death[J]. Ann N Y Acad Sci, 1992, 648: 117-127.
- [9] Pisani A, Calabresi P, Tozzi A, et al. L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers attenuate changes and  $\text{Ca}^{2+}$  rise induced by oxygen/glucose deprivation in cortical neurons[J]. Stroke, 29: 196-202.
- [10] Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons[J]. Physiological, 1999, 79: 1431-1568.
- [11] Mironov SL, Langohr K. Mechanisms of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  influx into respiratory neurons during hypoxia[J]. Neuropharmacology, 2005, 48: 1056-1065.

[收稿日期] 2006-08-24

[修回日期] 2006-11-24

[本文编辑] 孙岩