

绿茶抑制血小板活化因子对神经细胞的损害

韩恩吉 韩雪飞 Joseph Rajiv

摘要 目的 观察绿茶抑制血小板活化因子(PAF)对神经细胞损害的作用。方法 细胞形态学, 乳酸脱氢酶释放, 神经细胞胞浆钙离子测定。结果 发现绿茶低浓度(0.5g/L 和1.0g/L)对神经细胞有保护作用, 浓度升高到2.0g/L 时可见对神经细胞的损害, 绿茶对神经细胞的保护作用可能与绿茶降低PAF 诱导神经细胞胞浆钙离子升高有关。结论 由于PAF 参加很多神经系统疾病的病理过程, 绿茶抑制PAF 对神经细胞的损害可能成为其防治某些疾病的研究基础。

关键词 血小板活化因子(PAF) 绿茶 神经细胞

Inhibitory effect of green tea on PAF-induced neurotoxicity Han Enji, Han Xuefei, Joseph Rajiv. Department of Neurology, Affiliated Hospital, Shandong Medical University, Jinan 250012

Abstract Objective Inhibition of green tea on PAF-induced neurotoxicity was studied. **Methods** Cell morphology, LDH-release, cytoplasmic calcium were studied. **Results** Green tea in the concentration 0.5g/L and 1.0g/L showed protective effect, the concentration of 2.0g/L was applied, green tea obviously damaged cells. Reduction of intracellular calcium induced by PAF is involved in the protective effect of green tea on neurons. **Conclusion** PAF plays an important role in the various neuron injuries, the protective effect of green tea on neuron from PAF-induced injury could be a basis for the prevent of some diseases.

Key words Platelet-activating factor (PAF) Green tea Neuron

血小板活化因子(Platelet-activating factor, PAF)是一种内源性的磷脂,除强烈地引起血小板活化外,还有很多生物学作用,其中包括中枢神经系统的毒性作用^[1]。很早人们就注意到PAF参与缺血性脑血管病的病理过程,随后证实了脑组织含有PAF,而且发现抽搐和中风后APF含量增加^[2]。PAF对神经细胞的作用与浓度有很大的关系,50nmol/L~2.5μmol/L能促进神经元的分化,超过3.5μmol/L表现为神经细胞毒性作用^[3]。

茶起源于我国,现在是世界上最畅销的饮料之一,现代研究指出它有很多药理作用。茶与癌肿之间的关系已成为国内外医学研究的热点。为了探索绿茶是否有保护神经细胞的作用,本文采用体外培养神经母细胞瘤细胞系列为靶细胞,高浓度的PAF(7μmol/L~10μmol/L)诱导细胞损害,以细胞形态学、乳酸脱氢酶释放、细胞胞浆钙离子为指标观察了绿茶对PAF毒

性作用的干扰。初步发现绿茶(0.5g/L~1.0g/L)能抑制PAF对神经细胞的损害。

1 材料与方法

1.1 材料 除绿茶(金轮牌)系中国畜牧土杂产品进出口公司广东茶叶分公司生产外,其余各种设备和试剂皆由美国亨利福特医院(Henry Ford Hospital, Detroit)分子神经病学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人类神经母细胞瘤细胞系列LaN1,培养液由95%DMEM和5%胎牛血清组成,培养箱内保持含5%CO₂的潮湿空

此项目由世界卫生组织和美国国立卫生院(NIH)联合设立的国际神经科研究基金资助(1F05TW04634-01)

作者单位:250012 济南 山东医科大学附属医院神经内科(韩恩吉);美国底特律亨利福医院(韩雪飞, Joseph Rajiv)

气和恒温37℃。试验前12~24h收集细胞,接种在无胎牛血清的DMEM培养液中,细胞呈指数分裂期进行各种实验。

1.2.2 乳酸脱氢酶(LDH)^[4] 当细胞死亡时,胞内的LDH释放到培养液中,利用比色法测量培养液中LDH浓度,做为细胞死亡的一项指标,用以评价绿茶对细胞的作用。比色时分光光度计的波长为455nm,实验结果以百分比表示,2% tritonX-100裂解全部细胞释放出的LDH为百分之百。

1.2.3 神经细胞胞浆钙离子测定^[5,6] 神经细胞经过低渗处理后,导入水母发光蛋白,水母发光蛋白与钙离子结合放出蓝光,用血小板胞浆钙离子测定仪(Chrono Log, Haverston, PA)测定并计算出神经细胞胞浆钙离子浓度。本文把导入水母发光蛋白的神经细胞分为两组:实验组和对照组。每份标本1ml含细胞 1.0×10^6 。实验组细胞首先加入各种浓度的绿茶10 μ l(绿茶浓度分别为1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L)37℃预热2min,再加入PAF(7 μ mol/L)测量胞浆钙离子浓度变化。对照组细胞不接触绿茶,首先加入生理盐水10 μ l预热2min(消除绿茶溶剂的作用),再加入PAF(7 μ mol/L)。

1.2.4 绿茶制备 20g绿茶加入250ml蒸馏水中煮沸10min,离心煎剂(1000g, 15min),取上清液过滤后,烘干箱(80℃)内蒸发水分。4ml生理盐水溶解蒸发后的剩余物,离心去除未溶解成份(5000g \times 1min)。绿茶水溶液(5kg/L)贮存于-20℃冰箱中备用。实验前用生理盐水稀释成各种浓度,50g/L, 100g/L, 200g/L, 300g/L。应用前离心(5000g, 30s),以保证各种实验中应用相同的绿茶成分。细胞培养100 μ l绿茶水溶液加入10ml培养液中,胞浆钙离子测定10 μ l绿茶水溶液加入1ml标本中,绿茶最终浓度分别是0.5g/L, 1.0g/L, 2.0g/L, 3.0g/L(此浓度低于饮用茶浓度)。

2 结果

2.1 绿茶和PAF对神经细胞LaN1的作用 培养液中分别含绿茶0.5g/L和1.0g/L培养细胞6h,LaN1无明显损害,当绿茶浓度升高

至2.0g/L培养细胞4h,可见明显的细胞损害。培养液中含PAF10 μ mol/L培养细胞6h,LaN1出现严重的细胞损害。细胞突消失,胞体变圆和细胞死亡。

2.2 绿茶抑制PAF对神经细胞的损害 实验组:应用绿茶0.5g/L和1.0g/L培养细胞10min,然后加入PAF(10 μ mol/L)培养细胞6h。对照组:先加入与绿茶等体积生理盐水(100 μ l)10min,再加入PAF(10 μ mol/L)培养细胞6h。绿茶对神经细胞显示保护作用:(1)显微镜观察细胞形态,实验组损害程度明显轻于对照组。(2)LDH的释放(以下PAF浓度均为10 μ mol/L各组均为9个),对照组(PAF)为 $52.1\% \pm 24.2\%$;实验组1(绿茶0.5g/L + PAF)为 $31.3\% \pm 23.7\%$;实验组2(绿茶1.0g/L + PAF)为 $9.8\% \pm 8.0\%$;常规培养(无绿茶,无PAF)为 $4.7\% \pm 4.6\%$;对照组与实验组1、2比较,P值分别为 < 0.01 、 < 0.001 。

2.3 绿茶抑制PAF诱导的神经细胞胞浆钙离子浓度(μ mol/L)(PAF浓度7 μ mol/L,标本数为6个):当PAF时为 3.90 ± 0.28 ,绿茶1.0g/L + PAF时为 3.23 ± 0.43 ,绿茶2.0g/L + PAF时为 2.46 ± 0.27 ,绿茶3.0g/L + PAF时为 1.83 ± 0.04 ,LaN1胞浆时(无绿茶,无PAF)为 1.50 ± 0.25 。

3 讨论

本文以形态学改变和LDH释放为指标证实了绿茶在一定浓度下(0.5g/L和1.0g/L)能对抗PAF对神经细胞的毒性作用,显示了绿茶对神经细胞的保护作用。虽然PAF引起神经细胞损害的机制还不十分清楚,但是过去的研究已经证实神经细胞膜上存在着PAF受体^[7],PAF与其特异性受体相结合能引起胞浆钙离子升高,从而触发凋亡过程^[2,3]。本文中神经细胞胞浆钙离子测定不仅进一步证实了这一观点,而且初步揭示了绿茶对神经细胞保护作用与其能抑制PAF诱导的胞浆钙离子升高有关。由于PAF参与多种神经系统损害的病理过程如外伤、癫痫、脑血管病,本文的发现可能成为绿茶防治某些神经系统疾病的研究基础。绿茶

对神经细胞的作用与浓度有很大关系,当绿茶浓度升高到 2.0g/L 时,对神经细胞产生毒性作用,这一结果与过去的研究结果一致^[8]。

参考文献

- 1 韩恩吉,徐从高.血小板活化因子与缺血性脑血管病.国外医学 神经病学神经外科学分册,1990,17(4):183.
- 2 Lindsberg PJ, Yue TL, Frerichs KU, et al. Evidence of Platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits. Stroke, 1990, 21: 1452.
- 3 Kordecki E, Ehrlich YH. Neuroregulatory and neuropathological actions of the ether-phospholipid platelet-activating factor. Science, 1988, 240: 1792.
- 4 Cabau PG, Wroblewski F. Colorimetric measurement of lactic

dehydrogenase activity of body fluids. Am J Clin Pathol, 1958, 30: 234.

- 5 Joseph R, Han E. Amyloid β protein fragment 25-35 causes activation of cytoplasmic calcium in neurons. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 184(3): 1441.
- 6 韩恩吉.水母发光蛋白导入-凝胶过滤法测量血小板浆游离钙离子.中华血液学杂志,1991,12(2):94.
- 7 Marcheselli VL, Rossow ska MJ, Domingo MT, et al. Distinct platelet activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. J Biol Chem, 1990, 265: 9140.
- 8 范贤骏,王云霞,冯素瑜.绿茶儿茶素对体外培养细胞生长的影响.中华肿瘤杂志,1992,14(3):190.

(1998-07-07收稿 1998-09-21修回) (本文编校 张见影)

原发性延髓出血1例报告

赵东生 于臣志

患者,男,50岁。3小时前于劳累后感枕部剧烈疼痛,随即出现恶心、呕吐(非喷射性)、意识障碍、小便失禁,无抽搐发作。既往高血压病史5年。体检:脉搏80次/分,血压 $28/17\text{kPa}$,呼吸不规则,间以呼吸暂停及鼾音。双肺呼吸音粗,可闻及痰鸣音。心率规则,各瓣膜听诊区无病理性杂音。浅昏迷,压眶无反应,双侧瞳孔等圆,直径约 2.0mm ,对光反应迟钝。眼底:双侧视乳头色淡红,鼻侧欠清楚,生理凹陷存在,静脉充盈,动静脉比约 $1:3$,视网膜无出血及渗出。双眼球固定正中,角膜反射消失。咽反射消失,舌后坠。四肢肌张力均高,双上肢曲屈,双下肢伸直。左侧肱二、三头肌腱反射亢进,左侧 Babinski 征阳性。头颅 CT 示延髓腹侧面及桥脑高密度影,范围约 $2\text{cm} \times 1.5\text{cm} \times 2\text{cm}$,四脑室内无高密度影。入院后给予吸氧、大量脱水药物应用、气管切开、抗感染及对症治疗。患者曾一度清醒,但仅能以睁或闭眼表示“是”与“否”,持续约4小时,病情迅速加重,体温升至 41°C ,呼吸衰竭,于病后23小时抢救无效死亡。

讨论 CT 报告为延髓出血,但由于病变在后颅凹,伪影较重,给明确诊断带来一定困难。结合临床表现,延髓内颅神经、呼吸中枢及双侧锥体束均已受累,可断定病变在延髓平面,故支持原发性延髓出血的诊断。其发生的原因包括血管畸形、高血压等,本例虽有

高血压病史,劳累后发病,但由于未尸检证实,仍不排除血管畸形的可能。出血虽未破入脑室,但已侵及桥脑说明为较大血管破裂,出血量较多。由于延髓血供来源于椎动脉系,压力低,据此推断出血原因可能为血管畸形。血肿压迫延髓网状结构,使丘脑散热中枢传出的冲动中断,是中枢性高热的主要原因,肺部感染是高热的另一原因。

本病发生率较低,少见报道,临床表现不具特异性,仅依症状体征难于诊断。据报道^[1],16例诊断明确的原发性延髓出血,通过尸检诊断者为3例,CT为4例,MRI为6例,手术为3例。目前较可靠的诊断仍依据MRI尸检,而在广大的基层医院尚不能普及开展,是误诊的另一原因。

参考文献

- 1 罗伟良.原发性延髓出血1例报告.中风与神经疾病杂志,1998,15(1):40.

(1998-05-14收稿 1998-09-23修回) (本文编校 程门雪)

作者单位:457001 中原油田职工总医院第十六分院内科(赵东生);中原油田职工总医院神经内科(于臣志)