

· 基础研究 ·

亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后谷氨酸载体 EAAC1mRNA 表达和损伤神经细胞凋亡的变化

吴国祥 李承晏 刘春英 邹小丽 夏军

【摘要】目的 探讨亚低温对大鼠脑缺血再灌注损伤后谷氨酸载体兴奋性氨基酸载体 (EAAC) 1mRNA 表达和损伤神经细胞凋亡的影响。方法 采用大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 大脑中动脉阻塞 30 min, 再灌注损伤 90 min, 用原位杂交法和原位缺口末端标记法分别检测假手术组、对照组和亚低温组的谷氨酸载体 EAAC1mRNA 表达阳性率和凋亡细胞百分率。结果 与对照组比较, 假手术组的 EAAC1mRNA 表达阳性率和凋亡细胞百分率均明显降低 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 而亚低温组 EAAC1mRNA 表达阳性率显著升高 ($P < 0.05$), 但凋亡细胞百分率明显下降 ($P < 0.05$)。结论 亚低温的抗脑缺血再灌注损伤后损伤神经细胞凋亡作用可能与其上调 EAAC1mRNA 表达, 诱导 EAAC1 合成及增加谷氨酸的摄取有关。

【关键词】亚低温; 脑缺血再灌注损伤; 兴奋性氨基酸载体 1mRNA; 凋亡

Changes of the glutamate transporter EAAC1mRNA expression and injured nerve cell apoptosis in rat with cerebral ischemia/reperfusion injury treated by mild hypothermia WU Guo-xiang*, LI Cheng-yan, LIU Chun-ying, ZOU Xiao-li, XIA Jun. * Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: LI Cheng-yan, Email: Lcy@med. mail. com. cn

【Abstract】Objective To investigate the changes in the glutamate transporter EAAC1mRNA expression and the injured nerve cell apoptosis after rat cerebral ischemia/reperfusion injury is treated with mild hypothermia. Methods The middle cerebral arteries (MCA) of Sprague-Dawley rats were occluded for 30 minutes, and reperused for 90 minutes. Using DIG-labeled CRNA probe and TUNEL, the positive rate of glutamate transporter EAAC1mRNA expression and apoptotic cell rate were determined in the sham-operated group, the control group and the mild hypothermia group, respectively. Results The positive rate of EAAC1mRNA expression and apoptotic cell rate were significantly lower in sham-operated group than those in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The positive rate of the EAAC1mRNA expression was significantly higher and the apoptotic cell rate was significantly lower in mild hypothermia group than those in the control group ($P < 0.05$). Conclusion That the mild hypothermia decreases the injured nerve cell apoptosis might be related to the increased EAAC1mRNA expression, the induced synthesis of EAAC1 and the increased uptake of glutamate.

【Key words】Mild hypothermia; Cerebral ischemia / reperfusion injury; EAAC1mRNA; Apoptosis

有研究表明, 脑缺血再灌注损伤后兴奋性氨基酸的大量释放所致的神经细胞毒性作用是造成受损神经细胞死亡的原因之一^[1,2]。在正常情况下, 谷氨酸是突触间隙内的一种兴奋性氨基酸递质, 谷氨酸载体通过重新摄取谷氨酸来保持突触间隙内的谷氨酸浓度平衡^[3,4]。兴奋性氨基酸载体 1 (excitatory amino acid carrier1, EAAC1) 就是其中的一种神经元型谷氨酸载体^[5]。近年研究表明, 亚低温具有抗脑缺血再灌注损伤后受损神经细胞凋亡作用^[6,7]。

本实验观察亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后 EAAC1mRNA 表达和凋亡细胞百分率的变化, 并探讨

亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后 EAAC1mRNA 表达与其抗受损神经细胞凋亡的关系。

材料与方法

一、动物与分组

健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重为 170 ~ 230 g, 由湖北省医药工业研究所实验动物中心提供, 并随机分为假手术组、对照组和亚低温组, 每组 10 只。

二、动物模型制作和亚低温处理

采用改良的线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞再灌注损伤模型^[8]。假手术组: 栓线仅插入 8 mm, 使大脑中动脉起始部不致阻塞; 对照组: 脑缺血 30 min, 再灌注损伤 90 min; 亚低温组: 脑缺血 30 min, 再灌注损伤 90 min, 并在脑缺血后立即将大鼠置于温控环境中以

作者单位: 430060 武汉大学人民医院神经内科 (吴国祥、李承晏、刘春英、邹小丽), 康复医学科 (夏军)

通讯作者: 李承晏, Email: Lcy@med. mail. com. cn

诱导亚低温,诱导时间约为 30 min,且使大鼠体温稳定地控制在 $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$,持续 120 min 后立即深度麻醉大鼠并断头取脑。

三、标本制作

从额极开始将大鼠大脑平行切成 5 等份,并分别置于 5 份 10% 中性福尔马林液中固定 24 h 以上,取中间脑片,常规脱水、透明、石蜡包埋和切片,厚度为 $8\ \mu\text{m}$ 。

四、原位杂交法检测 EAAC1mRNA 表达水平

用 EcoR I 消化小鼠 EAAC1cDNA (500 bp),再经蛋白酶 K 处理,酚及氯仿抽提纯化,溶于 Rnase-free 和 ddH_2O 中,然后用异羟基洋地黄毒苷-RNA 标记试剂盒进行标记,具体操作步骤按异羟基洋地黄毒苷-RNA 标记试剂盒(博士德公司产品)说明书进行。将切片从杂交保护液中取出,经预杂交后,再将切片置于 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ 标记 cRNA 探针的杂交液中, $42 \sim 43^\circ\text{C}$ 杂交 16 ~ 18 h 后取出脑片,放入抗异羟基洋地黄毒苷抗体 Fab 段以 1:500 稀释于抗体稀释液中,室温孵育 2 h 后,再置于硝基四氮唑盐和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐显色液中避光染色 6 ~ 8 h。阴性对照方法:(1)应用未标记的探针;(2)不加探针;(3)杂交前用 Rnase 处理。显微镜下胞质和部分突起的近端呈蓝色者为阳性细胞。每张切片在光镜 400 倍视野下选择 6 个具有代表性的视野,计数阳性细胞数和阴性细胞数,并计算阳性率[阳性率 = 阳性细胞数 / (阳性细胞数 + 阴性细胞数) $\times 100\%$]。

五、原位缺口末端标记法检测凋亡细胞

石蜡切片经脱蜡入水后,置于 0.3% 过氧化氢液中,室温 30 min,再用细胞凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞,具体操作方法参照细胞凋亡检测试剂盒(博士德公司产品)说明书,在光镜 400 倍下选择 6 个具有代表性的视野,计数阳性细胞(镜下核染色呈棕黄色)数和阴性细胞数,并计算凋亡细胞百分率[凋亡细胞百分率 = 阳性细胞数 / (阳性细胞数 + 阴性细胞数) $\times 100\%$]。

六、统计学分析

数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 χ^2 检验。

结 果

假手术组、对照组和亚低温组 EAAC1mRNA 表达阳性率和凋亡细胞百分率比较见表 1。

由表 1 可见,对照组 EAAC1mRNA 表达阳性率和凋亡细胞百分率均高于假手术组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);亚低温组 EAAC1mRNA 表达阳性率明显高于对照组 ($P < 0.05$),而凋亡细胞百分率却明显低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 3 组 EAAC1mRNA 表达阳性率和凋亡细胞百分率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组 别	只数	EAAC1mRNA 表达阳性率	凋亡细胞百分率
假手术组	10	4.46 ± 0.65	0.51 ± 0.12
对照组	10	20.36 ± 0.87^a	20.32 ± 3.18^c
亚低温组	10	59.28 ± 0.89^b	6.45 ± 1.25^b

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

细胞凋亡是能量依赖的细胞内死亡程序活化而致的“程序性细胞死亡”,是细胞的一种生理性、主动性的“自觉自杀行为”。目前认为细胞凋亡的机制主要有营养理论学说、基因学说以及与钙超载、自由基、NO 和兴奋性氨基酸毒性作用有关。本实验结果显示,大鼠局灶性脑缺血 30 min 再灌注损伤 90 min 后 EAAC1mRNA 表达阳性率和凋亡细胞百分率较假手术组明显升高。这一方面说明脑缺血再灌注损伤可促使受损神经细胞凋亡;另一方面说明脑缺血再灌注损伤后 EAAC1mRNA 表达上调可能是脑细胞对缺血反应的敏感指标,因此可作为评价亚低温对脑缺血再灌注损伤干预效果的一种新方法。有研究表明,脑缺血再灌注损伤后大量的谷氨酸释放到突触间隙而造成受损神经细胞凋亡的机制有三:(1)过度兴奋谷氨酸受体;(2)过度激活 N-甲基-D-天门冬氨酸受体,造成大量 Ca^{2+} 内流,并作为第二信使激活一系列 Ca^{2+} 酶;(3)激活非 N-甲基-D-天门冬氨酸受体,造成大量 Ca^{2+} 和 Cl^- 内流,从而导致损伤神经细胞钠水储留肿胀溶解^[9,10]。EAAC1 是一种具有高亲和力的 Na^+ -依赖谷氨酸载体,在正常脑组织内有一定程度的表达^[11],所以在假手术组中可见少量的 EAAC1mRNA 阳性表达。

近年来研究表明,亚低温可降低脑细胞的新陈代谢和氧耗,诱导脑组织的缺血耐受现象,提高缺血脑组织的缺血耐受力,从而减少氧自由基、NO、兴奋性氨基酸的产生、钙超载形成及调控某些基因表达来发挥其抗受损神经细胞凋亡作用^[6,7]。本实验结果还显示,亚低温处理大鼠脑缺血 30 min 再灌注损伤 90 min 后 EAAC1mRNA 表达阳性率较对照组明显升高,而凋亡细胞百分率则较对照组明显降低。这提示亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后 EAAC1mRNA 表达上调与其抗受损神经细胞凋亡有关。在神经元中 EAAC1 主要分布于胞体、树突和轴突,故阳性信号也主要分布于胞体和部分突起的近端。EAAC1 的生理作用是重新摄取突触间隙内的谷氨酸,维持谷氨酸的生理浓度^[3]。有研究表明,当突触前膜的跨膜离子梯度遭到破坏时,EAAC1 也可起逆向转运作用,将谷氨酸以非

囊泡形式释放到突触间隙内,但谷氨酸载体的逆向转运在脑缺血再灌注损伤后的谷氨酸持续释放中并不起重要的作用^[12,13]。由此可推测,亚低温减少脑缺血再灌注损伤后受损神经细胞凋亡可能是通过促进 EAAC1 mRNA 表达和诱导 EAAC1 合成而增强谷氨酸载体重新摄取谷氨酸的作用来实现的。

参 考 文 献

- [1] Szydłowska K, Zawadzka M, Kaminska B. Neuroprotectant FK506 inhibits glutamate-induced apoptosis of astrocytes in vitro and in vivo. *J Neurochem*, 2006, 99:965-975.
- [2] Dohmen C, Kumura E, Rosner G, et al. Extracellular correlates of glutamate toxicity in short-term cerebral ischemia and reperfusion: a direct in vivo comparison between white and gray matter. *Brain Res*, 2005, 1037:43-51.
- [3] Nicholls D, Atwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmac Sci*, 1990, 11: 464-468.
- [4] Adachi N. Cerebral ischemia and brain histamine. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 50:275-286.
- [5] Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, et al. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, 1995, 375: 599-603.
- [6] 王强,孙毅明,李铁山,等.亚低温对大鼠局灶性脑缺血后神经细胞凋亡及 Bcl-XL、Bcl-Xs、HSP70 mRNA 表达的影响. *中华物理*

- 医学与康复杂志, 2005, 27:272-274.
- [7] 张付生,张刚,董瑞国.亚低温减少和延迟缺血再灌注后沙土鼠海马 CA1 区细胞凋亡. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 584-586.
- [8] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Bio*, 1992, 119:493-501.
- [9] Kang TC, Hwang IK, Park SK, et al. Chronological changes of N-methyl-D-aspartate receptors and excitatory amino acid carrier 1 immunoreactivities in CA1 area and subiculum after transient forebrain ischemia. *J Neurocytol*, 2001, 30:945-955.
- [10] Sun N, Zou X, Shi J, et al. Electroacupuncture regulates NMDA receptor NR1 subunit expression via PI3-K pathway in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Res*, 2005, 1064:98-107.
- [11] Shashidharan P, Hnuttley GW, Murray JW, et al. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Res*, 1997, 773:139-148.
- [12] Kanai Y, Nussberger S, Romero MF, et al. Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high affinity glutamate transporter. *J Biol Chem*, 1995, 270: 16561-16568.
- [13] Obrenovitch TP. Origins of glutamate release in ischemia. *Acta Neurochir (Suppl)*, 1996, 66:50-55.

(修回日期:2007-10-12)

(本文编辑:松 明)

· 短篇论著 ·

削平手术并冷冻术治疗瘢痕疙瘩的远期疗效观察

冯珍 吴磊

瘢痕疙瘩是皮肤科常见疾病之一,治疗方法繁多,疗效不一。我们自 1998 年至 2006 年采用削平手术并冷冻术治疗瘢痕疙瘩患者共 57 例,并对其远期疗效及相关因素进行了分析,现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料:瘢痕疙瘩患者 57 例,其中男 21 例,女 36 例;瘢痕疙瘩皮损 67 块,其中胸前 40 块,肩背部 13 块,其他部位 15 块;皮损面积最大 8.0 cm × 1.6 cm,最小 0.8 cm × 0.6 cm;1 例有家族史。根据术前是否接受其它治疗分为 2 组,既往未行任何治疗者 27 例,作为 A 组,共 33 块皮损;既往接受不同方式(包括单纯手术、放疗或糖皮质激素注射等)治疗者 30 例,作为 B 组,共 34 块皮损。2 组患者的性别、年龄、病程、病灶数和病

变部位等比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。

2. 治疗方法:2 组均采用相同治疗方法。充分暴露皮损,用 2% 碘酒、75% 酒精消毒后铺无菌巾,2% 利多卡因局部麻醉,用矩形刀片沿瘢痕边缘平皮肤将瘢痕疙瘩整块削除,创面压迫止血,切口不缝合。再根据创面的大小,选择自制冷冻治疗头,采用液氮冷冻加压接触治疗,冷冻治疗时间 1.5 min,以冰霜面积超过病灶周缘约 2 mm 为宜,待自然解冻后再用相同方法重复接触冷冻治疗 1 次,共 2 个冻-融周期,冻毕,创面放置明胶海绵止血,覆盖消毒纱布,胶布固定,压迫约 15 min 即可。所有患者术后均用 0.9% 生理盐水处理创面,每日换药 1 次,连续 3 d,无须使用抗菌素。

表 1 2 组一般资料比较

组别	例数	性别 (男/女,例)	年龄(岁)	病程(例)					病灶数 (块)	病变部位(块)		
				<1 年	~5 年	~10 年	>10 年	不详		胸前	肩背部	其他
A 组	27	11/16	29.08 ± 10.07	4	12	10	0	1	33	21	5	7
B 组	30	10/20	30.29 ± 9.48	2	15	7	2	4	34	19	7	8

作者单位:330006 南昌,南昌大学第一附属医院康复医学科(冯珍);南昌大学公共卫生学院流行病学教研室(吴磊)