

· 基础研究 ·

亚低温对大鼠急性脑梗死后脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 变化的影响

刘志超 李承晏 董红娟 毛善平

【摘要】 目的 探讨亚低温对大鼠急性脑梗死后脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、兴奋性氨基酸(EAA)及血浆内皮素(ET)变化的影响及意义。**方法** 将 48 只 SD 大鼠随机分为亚低温组及对照组,各组再分为 4 个亚组,每亚组 6 只,应用改良线栓法制备大鼠大脑中动脉梗死模型;亚低温组大鼠给予亚低温治疗,而对照组不作亚低温处理。分别于缺血后 1 h、2 h、4 h、8 h 处死 1 亚组,检测缺血区脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 含量。**结果** 亚低温组大鼠缺血区脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 含量随着缺血时间的延长仅轻度升高, Mg^{2+} 含量的下降也不明显,与对照组同时段比较差异有显著性($P < 0.01$)。**结论** 亚低温能明显阻止实验大鼠脑缺血后缺血区脑组织内损伤性因子 Ca^{2+} 、EAA 和 ET 含量的增高及保护性因子 Mg^{2+} 的下降,具有脑保护作用。

【关键词】 脑梗死; 亚低温; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; 兴奋性氨基酸; 内皮素

The effect of mild hypothermia on the content of Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA in rat brain tissue and ET in plasma after acute cerebral infarction LIU Zhi-chao, LI Cheng-yan, DONG Hong-juan, MAO Shan-ping. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of mild hypothermia on the content of Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA in rat brain tissue and ET in plasma after acute cerebral infarction. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly assigned into trial group and control group. Using the method of reformed line-thrombosis, the cerebral infarction models were established. The rats in the trial-group were cooled by mild hypothermia for half an hour, while those in the control group were subjected to no disposal. Every group was divided into 4 sub-groups according to the post-infarction disposal time. Every sub-group was composed of 6 SD rats and killed at the time points of 1 hour, 2 hour, 4 hour and 8 hour after infarction, respectively. Then the content of Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA in rat brain tissue and ET in plasma were measured. **Results** The post-infarction content of Ca^{2+} 、EAA and ET of trial-group increased mildly and Mg^{2+} reduced very little. There was a significant statistical difference between the trial group and the control group. **Conclusion** Mild hypothermia may significantly reverse the increase of the content of Ca^{2+} and EAA and the fall of Mg^{2+} and the increment of ET in plasma as well after acute cerebral infarction in experimental animals. So as a result, mild hypothermia possesses protective effect on brain.

【Key words】 Cerebral infarction; Mild hypothermia; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; EAA; ET

虽然亚低温脑保护的研究已有数十年历史,但有关亚低温治疗对缺血脑组织生化影响的实验研究还未见报道。本研究通过观察亚低温处理后实验大鼠缺血区脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAA)及血浆内皮素(endothelins, ET)含量的变化,探讨亚低温的脑保护机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

SD 大鼠雌雄各半共 48 只,由武汉医药工业研究所实验动物中心提供,体重 250 ~ 300 g,随机分成亚低

温组和对照组,每组 24 只,各组按缺血后处理时间再分为 4 个亚组,每个亚组 6 只,分别于缺血后 1 h、2 h、4 h、8 h 处死 1 个亚组。

二、脑梗死动物模型制作

采用改良线栓法制备大鼠左侧大脑中动脉闭塞模型。用 2% 戊巴比妥钠按 45 mg/kg 体重腹腔内注射麻醉,亚低温组大鼠将电子温度计插入肛门内 5 cm,定时监测深肛温,使肛温控制在 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$,术后将大鼠置于 4°C 环境中,温度过高时给大鼠全身喷洒稀释酒精降温或同时吹电风扇,温度过低时将大鼠置于室温(约 25°C)中自然复温,大鼠可以自由活动、饮水和进食。对照组大鼠置于室温下,不作亚低温处理。

三、分离梗死区脑组织

基金项目:湖北省科委科研基金资助项目(No. 952P1902)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经内科

于缺血后预定时间迅速断头处死大鼠,快速取脑,将脑组织置于 -20°C 下冷冻 20 min,用刀片从额极向后切成 2 mm 厚脑组织片,放入 10% TTC (2,3,5-Triphyltetrazolium) 溶液中于 37°C 温箱内 5~7 min 染色,正常脑组织被染成红色,梗死区不着色。

四、组织 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 含量测定

取梗死区脑组织 100 mg 2 块,一块经处理后置于原子吸收分光光度仪上,用火焰原子吸收法测定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量(波长分别 Ca^{2+} 为 422.7 nm, Mg^{2+} 为 285.2 nm,结果以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重表示);另一块置于液氮罐中于次日取出,按 20 mg:1 ml 加入 10% 磺基水杨酸,用玻璃匀浆器于冰浴下匀浆,以 20 000 rpm 离心 15 min。取上清液 0.5 ml,置于高效氨基酸分析液上测定 EAA(以谷氨酸为代表)含量(结果以 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 湿重表示)。

五、ET 含量测定

于大鼠断头时取动脉血 3 ml,分离出血浆,加入抑肽酶于 -40°C 保存,用放射免疫法测定血浆内皮素含量(结果以 ng/L 表示)。

六、统计学方法

应用 SPSS 软件包,采用 t 检验对亚低温组与对照组各时段 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA、ET 含量进行比较。

结 果

缺血后亚低温组和对照组脑缺血梗死部位以基底节区为主,大脑皮层保持完好。显微镜下可见缺血后对照组脑缺血区呈不可逆神经细胞损伤性改变,组织间水肿非常明显,神经细胞固缩,且与周围分界清楚,胞核呈三角形,绝大多数神经细胞坏死;而亚低温组因亚低温时间长短的不同,脑组织受损程度也不同,轻者神经细胞基本正常,仅见轴突和神经细胞体轻度水肿,形态基本正常,细胞核及细胞仁清晰可辨,血管内皮细胞损害不明显,血管间隙轻度增宽或不增宽;较重者细胞膜与周围分界清楚,胞浆内尼氏小体呈中央性消失,细胞染成淡红色。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA、ET 的测定结果见表 1~4。

表 1 各组 Ca^{2+} 含量($\mu\text{g}/\text{mg}$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	缺血后 1 h	2 h	4 h	8 h
对照组	122.61 $\pm$ 5.55	120.73 $\pm$ 5.21	127.37 $\pm$ 8.40	132.53 $\pm$ 6.32
亚低温组	80.11 $\pm$ 3.43 *	78.81 $\pm$ 5.07 *	76.30 $\pm$ 6.82 *	77.65 $\pm$ 4.38 *

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

表 2 各组 Mg^{2+} 含量($\mu\text{g}/\text{mg}$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	缺血后 1 h	2 h	4 h	8 h
对照组	66.93 $\pm$ 2.33	65.77 $\pm$ 1.85	63.42 $\pm$ 3.39	61.54 $\pm$ 3.25
亚低温组	88.29 $\pm$ 2.52 *	87.50 $\pm$ 2.17 *	85.10 $\pm$ 4.96 *	86.25 $\pm$ 4.12 *

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

表 3 各组谷氨酸含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	缺血后 1 h	2 h	4 h	8 h
对照组	30.49 $\pm$ 2.72	36.63 $\pm$ 2.52	38.49 $\pm$ 2.27	39.73 $\pm$ 1.92
亚低温组	15.68 $\pm$ 3.23 *	17.35 $\pm$ 2.60 *	18.05 $\pm$ 2.38 *	19.67 $\pm$ 1.77 *

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

表 4 各组 ET 含量(ng/L , $\bar{x} \pm s$)

组 别	缺血后 1 h	2 h	4 h	8 h
对照组	71.61 $\pm$ 4.66	90.13 $\pm$ 7.07	96.80 $\pm$ 15.51	128.20 $\pm$ 23.47
亚低温组	48.58 $\pm$ 6.60 *	50.90 $\pm$ 11.35 *	52.04 $\pm$ 8.12 *	57.45 $\pm$ 4.99 *

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

从表中结果可以看出:对照组缺血区脑组织内 Ca^{2+} 、EAA 及血浆 ET 含量随着缺血时间的延长明显升高, Mg^{2+} 含量下降;而亚低温组 Ca^{2+} 、EAA 及 ET 含量随着缺血时间的延长仅轻度升高, Mg^{2+} 含量的下降也不明显,2 组同时段 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 含量比较,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

讨 论

许多研究已证实亚低温对卒中后神经元有保护作用^[1],降低脑温作为一项抢救措施已成功应用于溺水、电击等引起的心跳骤停的治疗中,经头部降温,神经功能可得到明显改善^[2]。众多学者的研究表明,亚低温的脑保护作用机制主要包括:降低脑代谢率,减慢能量代谢及腺苷酸池的降解^[3];抑制兴奋性氨基酸的释放,增加神经元内泛素合成,抑制自由基及一氧化碳的产生^[4,5];抑制神经元的凋亡,调节损伤后钙蛋白酶 II 和蛋白激酶 C 的活性^[6-8];保护血脑屏障,减轻脑水肿,改善缺血后低灌注及防止过度灌注损伤^[5]等。

脑缺血后,血脑屏障被破坏,组织细胞内和组织间液中的 EAA 主要为谷氨酸和天门冬氨酸(Aspartic acid, Asp)进入神经细胞间隙,引起 NMDA 受体闸门钙通道开启,从而使大量钙离子进入细胞内,最终导致细胞破坏。本实验观察到,对照组急性脑缺血大鼠在缺血 1 h 后,脑组织内 Ca^{2+} 及谷氨酸含量即较亚低温组有明显升高,且随着缺血时间的延长, Ca^{2+} 及谷氨酸含量更进一步增高,而亚低温组增高不明显。2 组相同时段的数值相比,差异有显著性($P < 0.01$)。这与国外学者报道脑损伤后脑组织钙离子、谷氨酸和天门冬氨酸(Asp)含量均明显升高的结果相符合^[9-11],说明亚低温能阻止缺血后脑组织内的 Ca^{2+} 、EAA 的升高。ET 是目前发现的最强烈的血管收缩因子,脑梗死后脑组织局部缺血缺氧、血栓形成及应激性 AD 增高都可刺激血管内皮细胞分泌 ET,神经细胞上的 ET 受体与 ET 结合后,可激活细胞上

磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)、PLC 等,加速花生四烯酸代谢,产生大量自由基,引起神经细胞损害。本实验发现,缺血后亚低温组和对照组血浆 ET 含量均随着时间的延长而升高,但对照组 ET 含量的升高比亚低温组更显著,2 组相同时段的 ET 含量比较有显著性差异 ($P < 0.01$),说明亚低温能阻止缺血后脑组织内 ET 的产生。镁离子是目前较为确定的内源性脑保护因子,它具有稳定细胞内 DNA、RNA 和核糖体的作用。研究发现,脑损伤后,全脑组织镁含量下降,尤以损伤区脑组织内的含量下降明显,且与损伤的严重程度有关^[12,13]。本实验观察到:脑梗死后亚低温组和对照组缺血区脑组织内镁含量随着缺血时间的延长而有所下降,但对照组各时段镁下降较亚低温组更明显,2 组相同时段的镁含量比较差异有显著性 ($P < 0.01$),说明亚低温能阻止缺血后脑组织内 Mg^{2+} 的降低。

本研究无论是从组织形态,还是从分子水平上,都证实了亚低温对缺血后大鼠脑组织具有保护作用。组织观察:缺血后对照组脑缺血区呈不可逆神经细胞损伤性改变,组织间水肿非常明显,神经细胞固缩,且与周围分界清楚,胞核呈三角形,绝大多数神经细胞坏死;而各时段亚低温组脑组织的结构损坏明显较对照组轻。从分子水平观察:各时段亚低温组缺血区脑组织 Ca^{2+} 、EAA、ET 含量均较相应对照组低,而 Mg^{2+} 含量较相应对照组高。说明亚低温能阻止损伤性因子 Ca^{2+} 、EAA、ET 等的升高及保护性因子 Mg^{2+} 的下降,从而发挥脑保护作用。

参 考 文 献

- 1 Maier CM, Ahern K, Cheng ML, et al. Optimal depth and duration of hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia; effects on neurologic outcome, infarctsize, apoptosis, and inflammation. *Stroke*, 1998, 29: 2171-2180.
- 2 Kataoka K, Mitani A, Yanase H, et al. Ischemic neuronal damage. How does mild hypothermia modulate it? *Mol Chem Neuropathol*, 1996, 28: 191-195.
- 3 Yager JY, Asselin J. Effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism during the evolution of hypoxi-ischemic brain damage in the immature rat. *Stroke*, 1996, 27: 919-925.
- 4 Karibe H, Chen SF, Zarow GT, et al. Mild intras ischemic hypothermia suppresses consumption of endogenous antioxidants after temporary focal ischemia in rats. *Brain Res*, 1994, 649: 12-18.
- 5 Kil HY, Zhang J, Piantadosi CA. Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16: 100-106.
- 6 Yamashita T, Takita M, Akaike S, et al. Temperature-dependent Ca^{2+} mobilization induced by hypoxia-hypoglycemia in the monkey hippocampal slices. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205: 1843-1849.
- 7 Kumar K, Wu X, Evens AT. Expression of c-fos and fos-B proteins following transient forebrain ischemia; effect of hypothermia. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 42: 337-342.
- 8 Hara A, Yoshimi N, Mori H, et al. Hypothermic prevention of nuclear DNA fragmentation in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurol Res*, 1995, 17: 461-464.
- 9 Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons; a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*, 1996, 38: 1176-1195.
- 10 Faden AI, Demediuk P, Panter SS, et al. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, 1989, 244: 798-800.
- 11 Young W. Role of calcium in central nervous system injury. *J Biol Chem*, 1988, 263: 757-759.
- 12 Heath DL, Vink R. Traumatic brain axonal injury produces sustained decline in intracellular free magnesium concentration. *Brain Res*, 1996, 738: 150-153.
- 13 McIntosh TK, Vink R, Yamakami I, et al. Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. *Brain Res*, 1989, 482: 252-260.

(收稿日期: 2003-04-06)

(本文编辑: 阮仕衡)

补遗

由于我们工作失误,在今年第 8 期刊登的南登崑教授“对学科负责 对历史负责 慎用词语”一文中将原文倒数第二段漏排,谨向作者及读者深切致歉。

现将原文倒数第二段补登如下:

……又比如 board 一词是多义词,最常用是董事会、理事会、学会,人们看到 American Board of Physical Medicine & Rehabilitation, ABPM&R^[2]就“望文生义”地译为美国物理医学与康复董事会,或美国物理医学与康复理事会,美国物理医学与康复学会,从字面上看是对的,但是却没有反映出事物的本质。在美国医学会下面有专管各个学科考试和资格认可的委员会,称为各科的 board。ABPM&R 的 board 就是美国物理医学与康复学科“考试和资格认可的委员”。还有 workshop,常有人直译为“工作坊”,如果在学术大会上出现 workshop,我们就不能称之为“工作坊”,应该称“专题(项)讲习会”或“专题(项)讲习班”,请看牛津英文词典 2002 年修订十版解释: a meeting at which a group engages in intensive discussion and activity on particular subject or project。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部