

·论著·

清开灵对大鼠谷氨酸神经毒性脑水肿时 突触体游离钙的影响

陶永光, 岳少杰, 俞燕, 杨于嘉

(湖南医科大学附属湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

【摘要】 目的 探讨清开灵注射液对谷氨酸(Glu)神经毒性脑水肿时突触体内游离钙($[Ca^{2+}]_i$)的影响。方法 30只大鼠分成正常对照组、模型组、治疗组3组,右侧脑室注射Glu制作大鼠神经毒性脑水肿模型,4h后处死大鼠测定其脑皮质含水量、钠、钾、钙和突触体 $[Ca^{2+}]_i$ 含量。结果 模型组脑含水量($82.04 \pm 0.8\%$),钠含量(244.4 ± 29.3) mmol/kg, $[Ca^{2+}]_i$ (327.9 ± 33.2) nmol/L 分别较正常对照组($79.93 \pm 0.59\%$), (213.8 ± 13.0) mmol/kg, (159.6 ± 18.6) nmol/L 显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),模型组钙(4.76 ± 0.74) mmol/kg 较正常对照组(5.21 ± 0.81) mmol/kg 显著降低($P < 0.05$)。治疗组脑含水量($80.13 \pm 0.72\%$),钠含量(209.4 ± 14.7) mmol/kg, $[Ca^{2+}]_i$ (162.5 ± 17.6) nmol/L 较模型组显著降低(P 均 < 0.01),钙(5.44 ± 0.76 mmol/kg, 干重)却增高($P < 0.05$)。结论 清开灵对大鼠谷氨酸神经毒性脑水肿有保护作用,其机制可能与拮抗突触体钙离子内流有关。

【关键词】 清开灵;脑水肿;钙;谷氨酸;大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2000)05-0325-03

Effects of Qingkailing on Free Calcium of Synaptosomes in Rats with Neurotoxic Brain Edema Induced by L-glutamate

TAO Yong-Guang, YUE Shao-Jie, YU Yan, et al.

Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Hunan Medical University, Changsha 410008, China

Abstract: **Objective** To determine the effects of Qingkailing Injection (QKL) on free calcium of synaptosomes in rats with neurotoxic brain edema (NBE) induced by L-glutamate. **Methods** Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: ①sham control group (SHA, $n=10$); ②model group (MOD, $n=10$); ③therapy group (QKL, $n=10$), each rat was injected QKL (10 ml/kg, i.p.). The water content and the concentrations of sodium, potassium, calcium of the cerebral cortex and free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) of the synaptosomes were determined at 4 hours after injecting chloride sodium or glutamate into the right lateral ventricle. **Results** The level of water content $82.04\% \pm 0.8\%$, and the concentrations of sodium (244.4 ± 29.3) mmol/kg and $[Ca^{2+}]_i$ (327.9 ± 33.2) nmol/L significantly increased in MOD compared with SHA $79.93\% \pm 0.59\%$, (213.8 ± 13.0) mmol/kg, (159.6 ± 18.6) nmol/L, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$ respectively, while the concentration of calcium in MOD (4.76 ± 0.74) mmol/kg significantly decreased compared with SHA (5.21 ± 0.81) mmol/kg ($P < 0.05$). The water content $80.13\% \pm 0.72\%$ and the concentrations of sodium (209.4 ± 14.7) mmol/kg and $[Ca^{2+}]_i$ (162.5 ± 17.6) nmol/L significantly decreased in QKL compared with MOD ($P < 0.01$, 0.01 , 0.01 respectively), while calcium (5.44 ± 0.76) mmol/kg increased ($P < 0.05$). **Conclusions** These findings suggest that QKL can protect against NBE, whose mechanism may be related to preventing the free calcium of the synaptosomes influx.

Key words: Qingkailing; Brain edema; Calcium; Glutamate; Rat

[收稿日期] 2000-05-27; [修回日期] 2000-06-15
[基金项目] 国家自然科学基金资助(No.39700193)
[作者简介] 陶永光(1973-),男,硕士研究生。

清开灵注射液具有清热解毒、化痰通络、醒神开窍等功效,对中枢神经系统有镇静作用^[1]。神经元细胞内兴奋性氨基酸尤其是谷氨酸(Glu)的增加,引起 Na^+ 、 Cl^- 内流,造成细胞肿胀,同时激活细胞膜上Glu受体,导致细胞内游离钙($[\text{Ca}^{2+}]_i$)超载,造成细胞超微结构改变而致细胞损伤^[2]。本研究采用本科建立的谷氨酸神经毒性脑水肿模型,探讨清开灵是否通过对钙的影响产生对脑水肿的保护作用。

1 材料及方法

1.1 材料

Sprague-Dawley大鼠,30只,雌雄不拘,体重(254 ± 18)g,由湖南医科大学实验动物中心提供。清开灵注射液购自北京中医学院实验药厂。Fura-2/AM, Triton X-100, EGTA, Glu, BSA均购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 采用本科建立的大鼠谷氨酸神经毒性脑水肿模型^[3],大鼠采用25%乌拉坦(3 ml/kg)腹腔注射麻醉,用脑立体定位仪固定头部,从矢状缝右旁开3.5 mm,冠状缝后2 mm交汇处钻孔,孔径约2 mm,用50 μl 微量移液器垂直向孔内进针,插入4 mm进入右脑室。注入1.67 mol/L Glu 25 μl (约40 μmol)以诱发神经毒性脑水肿,正常对照组注入等量等浓度的生理盐水。4 h后断头取脑于冰台上,切取左大脑皮层后半部测含水量、右大脑皮层制备突触体。动物随机分成3组,每组10只。正常对照组注生理盐水,模型组注Glu,治疗组于注Glu前30 min腹腔注射清开灵注射液7 ml/kg,并于注Glu后2 h追加半量。模型组和对照组同时注射等量生理盐水。

1.2.2 脑含水量及钠、钾、钙测定 干湿法测定脑含水量,原子吸收光谱法测定钠、钾、钙含量,方法同文献^[4]。

1.2.3 大脑皮层突触体制备 采用蔗糖梯度离心法制备^[5]。冰台上取右大脑皮质,按W/V为1:10加入0.32 mol/L蔗糖(含4 mmol/L HEPES),匀浆后1 000 r/min离心10 min,取上清置1.2 mmol/L蔗糖液面上,20 000 r/min离心20 min,取中间液置0.8 mol/L蔗糖液面上,20 000 r/min离心20 min,沉淀中加入HEPES液(含0.1% BSA)1 ml, Fura-2/AM 2.5 μl (终浓度为2.5 $\mu\text{mol/L}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温避光水浴45 min,加入冷HEPES液(含0.1% BSA)5

ml终止反应,20 000 r/min离心5 min,沉淀中加入冷Hank's液5 ml洗两遍,去除多余Fura-2/AM,沉淀中加入冷HEPES液1 ml,混匀后待测。

1.2.4 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定 测定前突触体经HL-600透射电镜确认,细胞悬液测定前在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴复温5 min。日本岛津RF-5000双波长荧光分光光度计,在激光波长340 nm和380 nm,发射波长510 nm条件下,测定突触体荧光强度,以未加Fura-2/AM的突触体悬液作对照分别读取R(样本测定值), R_{max} (加入300 μl 10% Triton X-100混匀后测值), R_{min} (加入10 μl 4 mol/L EGTA混匀后测值),以公式 $K_d \times (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$ 计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L)。其中 K_d 是Fura-2/AM的 Ca^{2+} 解离常数为224 nmol/L。

1.2.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用F检验。采用Sigma Stat软件包计算检验各组有无显著性意义。

2 结果

2.1 肉眼观察

模型组大鼠脑组织均有肿胀,体积增大,脑回增宽变平,脑沟变浅,脑膜紧张,血管充血较多,灰、白质分界欠清楚。而对照组脑组织不肿胀,体积不增大,脑沟正常,血管不充血,灰、白质分界清楚。治疗组介于两组之间,血管不充血,灰、白质分界较清楚。

2.2 脑组织含水量、钠、钾测定结果

模型组脑含水量和钠含量较正常对照组明显增高,差异有显著性意义(P 值分别 $<0.01, 0.05$);治疗组脑含水量和钠含量较模型组均明显降低,有极显著性差异($P < 0.01$)。脑组织钾含量各组间无显著性差异($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组脑皮质含水量、钠含量和钾含量的变化

Table 1 The changes of water content and the concentrations of sodium and potassium in the cortex in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	含水量(%)	钠(mmol/kg)	钾(mmol/kg)
正常对照组	10	79.93 ± 0.59	213.8 ± 13.0	473.8 ± 18.1
模型组	10	82.04 ± 0.80^a	244.4 ± 29.3^b	460.4 ± 21.2
治疗组	10	80.13 ± 0.72^c	209.4 ± 14.7^c	467.0 ± 22.0
F值		34.9 ^d	10.6 ^d	1.22

注:与正常对照组比较a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$;与模型组比较c: $P < 0.01$;各组总比较d: $P < 0.01$

2.3 脑组织突触体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、钙含量测定结果

模型组突触体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 较正常对照组明显增

高,而钙含量却明显降低,差异有显著性意义(P 值分别 $<0.01, 0.05$);治疗组突触体 $[Ca^{2+}]_i$ 较模型组明显降低,而钙含量明显增高,均有显著性差异(P 值分别 $<0.01, 0.05$)。见表2。

表2 各组突触体 $[Ca^{2+}]_i$ 和脑皮质钙含量的变化
Table 2 The changes of the concentrations of free calcium in the synaptosomes and tissue calcium in the cortex in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	钙(mmol/kg)
正常对照组	10	159.6 ± 18.6	5.21 ± 0.81
模型组	10	327.9 ± 33.2^a	4.76 ± 0.74^b
治疗组	10	162.5 ± 17.6^c	5.44 ± 0.76^d
F值		12.0 ^e	7.6 ^e

注:与正常对照组比较 a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$;与模型组比较 c: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$;各组总比较 e: $P < 0.01$

3 讨论

兴奋性神经递质主要包括谷氨酸(Glu)和天冬氨酸,以Glu最为重要。Glu是中枢神经系统含量最多的非必需游离氨基酸,以大脑皮质、尾核、小脑和海马中含量最高。Glu大部分参与神经细胞的中间代谢过程,少量作为兴奋性神经递质参与信号传递。当神经末梢去极化时,突触体前神经元内Glu释放进入突触间隙,在生理条件下,突触体内的Glu被星形胶质细胞转化成谷氨酰胺而灭活。当Glu含量明显增高时,使N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体激活,不仅使兴奋性神经细胞突触后去极化,同样又刺激Glu释放,形成恶性循环,即增强兴奋毒性作用。其机制可能一种是持续去极化导致细胞内外 Cl^- 分布失去平衡, Cl^- 内流引起 Na^+ 和水内流,细胞肿胀而死亡;另一种是与 Ca^{2+} 有关的作用,Glu激活Glu受体,引起 Ca^{2+} 大量内流,继发通过电压门钙通道,NMDA受体或 $Na^+ - K^+$ 交换子(exchanger)等钙通道的开放引起细胞内长期 Ca^{2+} 聚积,从而激活一系列蛋白酶,引起细胞的超微结构改变和树突断裂,造成神经元损伤或坏死^[2,6,7]。

正常情况下,脑脊液从侧脑室产生后,不断沿脑室系统单向流动,到达上矢状窦两旁的蛛网膜粒,吸收进入静脉窦而被吸收入血,完成整个脑脊液的循环。本研究从大鼠侧脑室注入一定量的Glu,使Glu沿脑室系统进入脑脊液的循环,引起细胞外Glu增高,从而导致神经细胞的增强兴奋作用,导致脑水肿。肉眼观察发现脑组织肿胀,脑回增宽变平,脑沟变浅,脑膜紧张,脑血管充血,说明已成功复制了大

鼠Glu神经毒性脑水肿模型。本科业已证明Glu含量增高可能是感染性脑水肿的启动因素^[8]。本研究在侧脑室注入Glu 4 h后,发现脑皮层含水量、 Na^+ 含量增加,同时还发现突触体内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量显著增加,而脑皮层 Ca^{2+} 却明显降低。说明脑水肿的发生与Glu增加密切相关,很可能是由于Glu通过Glu受体使钙通道开放,引起细胞内外 Ca^{2+} 浓度失衡,突触体内 $[Ca^{2+}]_i$ 超载和脑组织 Ca^{2+} 降低,从而导致脑水肿。

清开灵注射液由黄芩、水牛角、牛黄、银花、山栀等药组成,具有清热解毒、镇静开窍等功效。该方具有调整机体阴阳、扶正祛邪,通过活血化瘀、疏通脉络,保护神经元,增强机体抗病能力^[1]。本科已证实清开灵可明显减轻Glu神经毒性所致脑含水量及 Na^+ 含量的增加^[3]。陈光福等^[9]证实清开灵成份之一黄芩甙可降低兔感染性脑水肿时脑含水量和 Na^+ 含量,增加 K^+ 含量,降低颅内压,对脑水肿有保护作用。本研究发现清开灵在降低脑含水量、 Na^+ 含量,减轻脑水肿程度的同时,而且可以拮抗突触体 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加,并使脑组织 Ca^{2+} 降低至正常。说明清开灵对脑水肿有保护作用,其机制可能与拮抗突触体 Ca^{2+} 内流有关。

【参考文献】

- [1] 蒋玉凤,黄启福,邹丽琰,等. 清开灵注射液对SH-SP出血性中风病作用的研究[J]. 北京中医药大学学报, 1997, 20(1): 34-37.
- [2] Christopher SC, Michael SL. Glutamate receptor-induced toxicity in neostriatal cells[J]. Brain Res, 1996, 724(2): 205-212.
- [3] 岳少杰,罗自强,虞佩兰,等. 清开灵对谷氨酸神经毒性脑水肿的保护作用[J]. 北京中医药大学学报, 1998, 21(1): 32-33.
- [4] 虞佩兰,杨于嘉. 小儿脑水肿与颅内高压[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999, 349-350.
- [5] Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, et al. A rapid method for preparing synaptosomes: Comparison alternative procedures[J]. Brain Res, 1981, 226(1): 107-118.
- [6] Phillis JW, Song D, O'Regan MH. Effects of hyperosmolarity and ion substitutions on amino acid efflux from the ischemic rat cerebral cortex[J]. Brain Res, 1999, 828(1): 1-11.
- [7] Fern R, Moller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: A fatal glutamate release feedback loop[J]. J Neurosci, 2000, 20(1): 34-42.
- [8] 尹飞,杨于嘉,虞佩兰,等. 百日咳菌液诱发大鼠脑水肿时脑组织中兴奋性氨基酸时相的变化[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(1): 9-12.
- [9] 陈光福,虞佩兰,金立明,等. 黄芩甙、川芎嗪对兔感染性脑水肿与磷脂酶 A_2 的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 1999, 1(3): 149-152.

(本文编辑:尹飞)