

·论著·

新生大鼠缺氧缺血性脑病模型脑组织 钙调蛋白测定及脑活素治疗作用

刘建萍, 张国成, 许东亮

(第四军医大学西京医院儿科, 陕西 * 西安 710032)

[摘要] 目的 研究脑组织中钙调蛋白(CaM)含量与新生大鼠缺氧缺血性脑病(HIE)发病机制的关系及脑活素的治疗作用。方法 在建立新生大鼠 HIE 模型的基础上,采用依赖环核苷酸的磷酸二酯酶(PDE)法检测 103 只大鼠(其中对照组 15 只,实验组 88 只分 3 组)脑组织 CaM 含量,结合病理切片和透射电镜观察脑组织病理改变,同时通过侧脑室及肌内两种途径给予脑活素治疗。结果 HIE 组脑组织 CaM 含量均明显增高,24 h(521.27 ± 46.04) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;48 h(509.52 ± 35.98) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;72 h(421.05 ± 31.81) $\mu\text{g/g}$ 脑组织,与正常组(187.63 ± 54.22)比较差异有显著性($P < 0.01$);治疗组 CaM 含量均明显降低,侧脑室注射组:24 h(435.21 ± 56.17) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;48 h(260.38 ± 32.43) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;72 h(197.64 ± 19.21) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;肌内注射组:24 h(441.04 ± 30.66) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;48 h(305.39 ± 32.99) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;72 h(217.71 ± 52.89) $\mu\text{g/g}$ 脑组织;与 HIE 组比较差异有显著性($P < 0.01$),接近正常组水平。在神经元变性、坏死和间质水肿等方面,治疗组明显轻于 HIE 组。结论 CaM 含量异常升高在 HIE 的发病环节中起一定作用。脑活素治疗 HIE 的机制可能与其显著降低脑组织中 CaM 含量有关。

[关键词] 脑缺氧;脑缺血;钙调蛋白;脑活素;动物模型

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)03-0243-04

Calmodulin in Brain Tissues of Newborn Rats with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and the Therapeutic Effect of Cerebrolysin

LIU Jian-Ping, ZHANG Guo-Cheng, XU Dong-Liang

Department of Neonatology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003, China

Abstract: **Objective** To study the relationship between calmodulin (CaM) concentrations in brain tissues of newborn rats and the pathogenesis of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) and the therapeutic effect of cerebrolysin on HIE. **Methods** Morphological and metabolic effects of cerebral ischemia were investigated in a newborn rat model of neonatal HIE. In addition, the effect of cerebrolysin (EBEWE, Austria) on acute brain hypoxic-ischemia was studied. Eighty-eight HIE newborn rats (48 cerebrolysin-treated and 40 controls) were subjected to left cerebral artery ligation and one hour later they were placed in a hypoxic environment (8% oxygen and 92% nitrogen mixed) for two hours. Immediately afterwards, cerebrolysin (2.5 ml/kg body mass) was administered daily, either by intracerebroventricular infusion (i. c. v) or by intramuscular injection. CaM concentrations were determined using cyclicnucleotide dependent phosphodiesterase methods, and 15 normal rats were used as the control group. **Results** CaM concentrations in brain tissues increased in HIE group at different duration after hypoxic-ischemia: 24 h = (521.27 ± 46.04) $\mu\text{g/g}$ brain tissue; 48 h = (509.52 ± 35.98) $\mu\text{g/g}$ brain tissue; 72 h = (421.05 ± 31.81) $\mu\text{g/g}$ brain tissue, compared to the control group [187.63 ± 54.22] $\mu\text{g/g}$ brain tissue ($P < 0.01$). Cerebrolysin treatment groups facilitated recovery, as indicated by a

[收稿日期] 2000-09-28; [修回日期] 2001-01-16

[作者简介] 刘建萍(1967-),女,硕士,主治医师,现在陕西省西安市儿童医院新生儿科。

decrease in CaM concentration (i. c. v group: 24 h = (435.21 \pm 56.17) μ g/g brain tissue; 48 h = (260.38 \pm 32.43) μ g/g brain tissue; 72 h = (197.64 \pm 19.21) μ g/g brain tissue; i. m. group: 24 h = (441.04 \pm 30.66) μ g/g brain tissue; 48 h = (305.39 \pm 32.99) μ g/g brain tissue; 72 h = (217.71 \pm 52.89) μ g/g brain tissue ($P < 0.01$). Morphological examination showed that the volume of neuron degeneration, necrosis and intercellular edema was increased in HIE groups and significantly reduced in cerebrolysin treatment groups. **Conclusions** CaM concentration in brain tissues is increased after hypoxic-ischemic injury and may be implicated in the pathogenesis of newborn rats with HIE. Cerebrolysin is effective in protecting brain cells from further damage through its influence on cerebral CaM concentration.

Key words: Brain hypoxia; Brain ischemia; Calmodulin; Cerebrolysin; Animal model

钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) 是迄今已知的钙结合蛋白中重要的一种, 作为钙离子的受体影响细胞的多种功能。研究表明, 许多脑部疾病与 CaM 含量异常有关^[1,2]。我们检测了 103 只大鼠脑组织 CaM 含量, 研究侧脑室及肌内注射脑活素这两种不同给药方法对 CaM 含量的影响, 并通过病理切片和透射电镜观察脑组织病理改变, 以初步探讨 CaM 在新生大鼠 HIE 发病过程中的地位及脑活素的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择生后 7 d 健康 SD 大鼠 103 只, 体重 (14 \pm 2) 克。由本校动物中心提供 (SPF) 动物。每次按同窝随机分成 4 组。其中 (A) HIE 对照组 40 只: 侧脑室注射生理盐水 (2.5 ml/kg); (B) 脑活素治疗 1 组 24 只: 侧脑室注射脑活素 (2.5 ml/kg); (C) 脑活素治疗 2 组 24 只: 肌内注射脑活素 (2.5 ml/kg); (D) 正常对照组 15 只: 伪手术后不造成缺氧缺血 (HI)。

1.2 主要试剂及仪器

脑活素针剂: 奥地利, 依比威大药厂。CaM 试剂盒由中国医学科学院基础所药理室提供。QAE-Sephadex A-25; 瑞典 (Sweden, Pharmacia)。液体闪烁计数器: FJ-2107。

1.3 新生 SD 大鼠 HIE 模型的制作

将新生 SD 大鼠乙醚麻醉后取颈正中切口, 结扎左侧颈总动脉, 先造成一侧半球不全缺血, 休息 1 h 后, 将其置于容器中, 持续输入 8% 氧、92% 氮混合气体入该容器, 输入量为 2 L/min 左右。容器另一端以一塑料管与外界相通, 以保持容器内压力与大气一致及持续低氧状态。缺氧 2 h, 制成 HIE 模型^[3]。

1.4 给药方法

侧脑室内注射药物的方法: 参照 Noble 法进行。

暴露大鼠颅骨, 于前囟向后约 1.0 mm, 矢状缝旁左侧 1.5 mm 处将 1 根外径 0.8 mm, 内径 0.5 mm 的不锈钢导管垂直插入颅骨下约 2.5 ~ 3.5 mm, 见

脑脊液从导管流出, 表明插入位置正确, 此时即可进行侧脑室内给药。

肌内注射药物的方法: 选择 SD 大鼠大腿外侧, 注射时垂直迅速刺入肌肉, 回抽针栓如无回血, 即可进行注射。多选用 5.5 号针头。

脑活素用量: 2.5 ml/kg, 每日 1 次。

1.5 CaM 检测方法

1.5.1 样品采集及处理 按分组和时间点将动物断头取脑, 定量称取脑组织, 用 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (含 1 mM EGTA, pH 7.0) 制成匀浆 (200 mg 脑组织/ml), 18000 rpm 离心 50 min, 取上清, 100 煮沸 5 min; 再 12000 rpm 离心 30 min, 取上清, 用 4.5 mM CaCl₂ 水溶液对半稀释, 4℃ 冰箱保存。

1.5.2 CaM 含量测定 按照文允镒等^[4]的依赖环核苷酸的磷酸二酯酶 (PDE) 测定方法, 用液体闪烁计数器先测定未添加样本的 PDE 活性计数, 称为 PDE 基本活性计数, 再测定添加标准 CaM 的 PDE 活性计数, 称为 PDE 最大活性计数, 最后分别测定添加了样本的 PDE 活性计数, 根据这 3 个活性计数推算出 CaM 含量。

1.6 统计学处理

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 完全随机设计资料采用方差分析, 两组间均数比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 PDE 活性计数

PDE 基本活性计数: 10 319, PDE 最大活性计数: 69 612。

2.2 正常对照组、HIE 模型各组及脑活素各治疗组中 CaM 含量

HI 后不同时间内脑组织中 CaM 含量均高于正常对照组, 且差异有显著性 ($P < 0.01$), 以 HI 后 24 h CaM 含量最高, 随着时间推移有逐渐下降的趋势。HI 后 3 d, 脑组织中 CaM 含量仍未降至正常, 与正常对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。脑活素治疗组: 侧脑室及肌内注射脑活素各治疗组中

CaM 含量均明显低于同期对照各 HIE 组 ($P < 0.01$),与正常对照组比较,差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。侧脑室及肌内注射脑活素的效果比较:治

疗后 24 h,两组脑组织中 CaM 含量差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。于治疗后 48 h,两组有显著性差异 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 4组不同时间的脑组织中 CaM 含量比较 (μg/ g 脑组织)

Table 1 CaM concentrations in brain tissues of newborn rats HIE ($\bar{x} \pm s$, μg/ g brain tissue)					
组 别	n	立即	24 h	48 h	72 h
对照组	15		187.63 ±54.22		
HIE 组	40	307.15 ±57.79 ^a	521.27 ±46.04 ^a	509.52 ±35.98 ^a	421.05 ±31.81 ^a
侧脑室注射组	24		435.21 ±56.17 ^b	260.38 ±32.43 ^b	197.64 ±19.21 ^b
肌内注射组	24		441.04 ±30.66 ^c	305.39 ±32.99 ^c	217.71 ±52.89 ^c

注:a 与对照组比较 $P < 0.01$; b 与 HIE 组比较 $P < 0.01$; c 与侧脑室注射组比较 $P < 0.05$

2.3 各处理组脑组织的光镜及超微结构改变

正常新生大鼠的脑组织结构层次明显,皮质及髓质界限清楚。神经细胞核清晰可见,核仁清楚,胞浆丰富,可见 Nissl 小体。血管周围无水肿空隙区(图 1)。

HI 各组,脑组织层次结构较模糊,皮质及髓质界限不清,部分区域神经细胞核固缩,着色加深,核结构不易辨认,胞体缩小呈三角形(图 2)。胞浆 Nissl 小体明显减少,或仅见于细胞周边部分,提示神经元出现变性、坏死。脑间质及血管周围水肿明显,并可见新鲜出血灶。脑组织局部胶质细胞反应性增生,并可见嗜神经细胞现象(图 3)。电镜下观察,胞浆基质疏松变淡,核结构不清,出现核碎裂改变。线粒体肿胀,嵴变短、变少甚至消失。内质网广泛解体,离断、空泡变。血管基底膜增厚明显。

脑活素各治疗组的病理改变均明显轻于同期对照各 HIE 组,表现在:神经元变性不如 HIE 组广泛,未见神经元坏死体现;胞浆 Nissl 小体减少不明显;间质水肿及血管基底膜增厚不如 HIE 组明显;胶质细胞反应性增生程度轻于 HIE 组(图 4)。

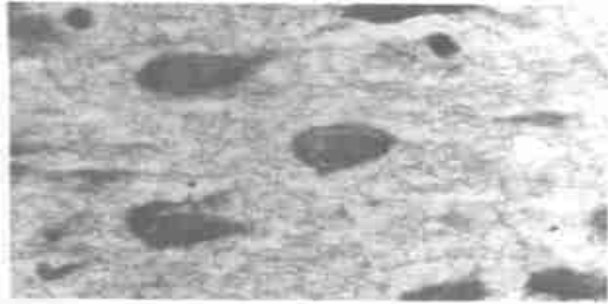


图 1 正常神经细胞核仁清晰,胞浆丰富,可见 Nissl 小体

Figure 1 Normal neuron had a clear nucleus and the abundant cytoplasm and contained Nissl body (×100, LM)

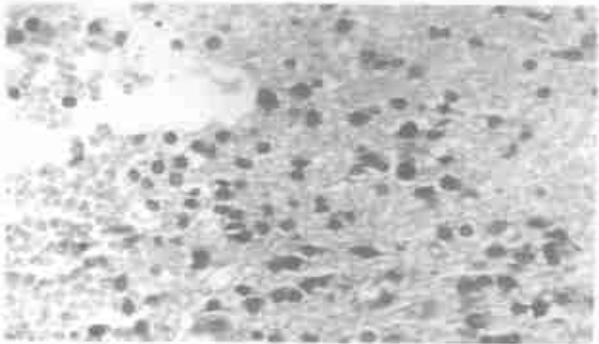


图 2 HI 后 24 h 脑组织神经细胞核固缩,着色加深,核结构不易辨认,胞体缩小呈三角形

Figure 2 Characteristics of neuron in brain tissues after HI for 24 h: nucleus were phknotic, color-deepened, and illegible; the cyton was shrinked into the shape of triangle (×400, LM)

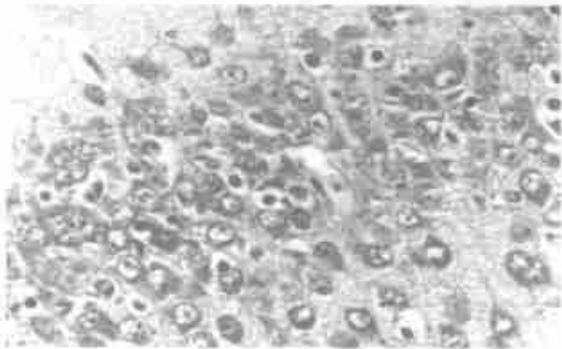


图 3 HI 后 24 h 左侧下方可见神经元胞体周围被 5 个少突胶质细胞围绕,即“嗜神经细胞”现象

Figure 3 The cyton on the left side was surrounded by 5 oligodendrocytes, which called “neuronophagia”, in brain tissues after HI for 24 h (×400, LM)

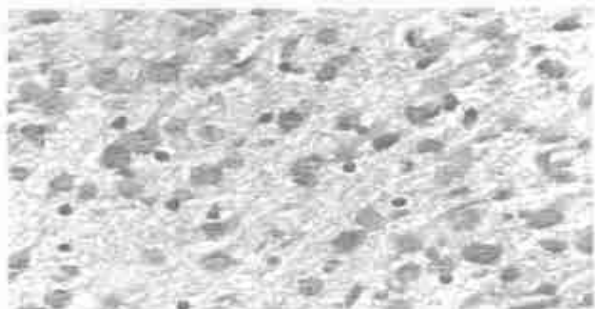


图4 侧脑室注射脑活素48 h后,神经元变性坏死、间质水肿、胶质细胞反应性增生程度和范围较轻

Figure 4 After cerebrolysin treatment by intracerebroventricular (i. c. v.) for 48 h, the volume of neuron degeneration, necrosis, intercellular edema and neuroglial cell reactive hyperplasia was reduced ($\times 400$, LM)

3 讨论

CaM 是迄今已知的钙结合蛋白中最重要的—种,广泛分布于各类真核细胞,作为 Ca^{2+} 的受体影响细胞的多种功能。CaM 和 Ca^{2+} 的结合具有特异性,并以 Ca^{2+} -CaM 复合物的形式发挥作用。近年来研究表明,HI 后的再灌注损伤中,神经细胞内 Ca^{2+} 超载是神经细胞坏死的重要原因。当胞浆 Ca^{2+} 浓度过高、持续时间过久时,CaM 活性将异常升高,可直接激活蛋白酶、酯酶、核酸内切酶等,从而对脑细胞的结构和功能产生损害^[5,6]。

通过采用依赖环核苷酸的磷酸二酯酶的放射酶法,测定脑组织样品中活性型 CaM 的含量,了解 HI 后脑细胞 Ca^{2+} 超载情况及 CaM 与脑 HI 性损害的关系。结果表明,HI 后短时间内即出现脑组织 CaM 含量明显增加,于伤后 24 h 达高峰,HIE 对照组 CaM 含量是正常组的 2.5 倍。随时间进程,脑组织中 CaM 含量逐渐降低,HI 后 72 h,HIE 对照组 CaM 含量降至正常组的 2.0 倍。关于 HI 后脑组织中 CaM 含量增高的原因,可能与 HI 所导致的脑细胞能量代谢障碍等因素使细胞膜发生损伤,引起其通透性改变,加上缺氧使 ATP 合成减少,能量供应不足使钙泵活性下降导致脑细胞内 Ca^{2+} 异常聚集,即钙内流现象。另一方面,HI 使内质网调节能力受

损,导致细胞内 Ca^{2+} 储库释放 Ca^{2+} ,胞浆中 Ca^{2+} 浓度急剧增加,充分激活细胞内 CaM。目前已明确,至少有 20 种代谢酶类受 CaM 调节,这些酶的活性改变可引起脑细胞代谢障碍,可进一步导致脑细胞功能与结构损伤,甚至死亡^[7]。

本研究表明,脑活素可以明显降低新生大鼠 HI 性脑损伤时脑组织中 CaM 含量,可能通过此途径发挥对脑细胞的保护作用。有研究认为脑活素主要是通过促进蛋白质合成,提高腺苷酸环化酶活性而间接调节神经细胞膜的通透性及酶活性,调节神经元的生长,从而改善神经细胞的功能,使已发生紊乱的脂质代谢正常化,神经细胞能量代谢恢复,内质网调节能力提高,有助于钠-钾泵和钙泵活性恢复正常,使神经细胞内 Ca^{2+} 失衡得到纠正^[8,9]。本研究同时发现侧脑室注射脑活素的治疗作用优于肌内注射的治疗作用,这为临床探索脑活素的治疗用药新途径提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Takayasu M, Shibuya M, Kanamori M, et al. S-100 protein and calmodulin levels in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosurg, 1985, 63(3): 417 - 422.
- [2] 费舟,易声禹. 重型颅脑损伤时脑脊液和血浆钙调素含量变化及脑活素的作用 [J]. 中华创伤杂志,1993, 9(3): 129 - 131.
- [3] Therdestein M, Bagenholm R. Scavengers of free oxygen radicals in combination with magnesium ameliorate perinatal hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Pediatr Res, 1993, 34(1): 2 - 4.
- [4] 文允镒,胡蓓,张淑芳. 血浆钙调素微量测定方法 [J]. 生理科学,1988, 8(6): 489 - 493.
- [5] Cheng WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation [J]. Science, 1980, 207(4426): 19 - 24.
- [6] 张志明,文允镒. 钙调素与中枢神经系统的某些功能 [J]. 生理科学,1988, 8(增刊): 445 - 450.
- [7] 赵明,刘毓谷. 神经细胞损伤与细胞钙稳态失调 [J]. 国外医学 分子生物学分册,1989, 11(3): 117 - 121.
- [8] Gelmers HJ. The effect of Nimodipine on clinical course of patients with acute ischemic stroke [J]. Acta Neurol scand, 1984, 69(4): 232 - 238.
- [9] 易声禹,费舟,徐如祥. 尼莫地平救治重型颅脑损伤的理论与临床研究 [J]. 中华神经外科杂志,1994, 10(1): 28 - 31.

(本文编辑:曹励之)