

· 基础研究 ·

高压氧对急性损伤期全脑缺血再灌注大鼠脑内兴奋性氨基酸水平的影响*

侯燕芝¹ 陈 瑞¹ 于培兰¹ 孙 林¹

摘要 目的:探讨高压氧(HBO)对缺血再灌注脑内兴奋性氨基酸水平的影响。方法:将 SD 大鼠分为缺血再灌注组(I/R 组)、高压氧处理组(HBO 组)及假手术对照组(Sham-O 组),以四动脉阻断法建立全脑缺血再灌注大鼠模型。动物缺血 20min 后分别再灌注 6h、24h、48h 和 96h,各 HBO 组在再灌注后分别行不同次数的高压氧处理。取动物的全脑测定谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp)含量。结果:24h 和 48h HBO 组 Glu 水平明显低于对应时间点的 I/R 组($P < 0.01$),且 24h HBO 组 Asp 含量也低于 I/R 组($P < 0.05$),而各时间点 I/R 组的 Glu 水平均高于 Sham-O 组($P < 0.01$)。结论:在一定时间内进行高压氧处理可抑制由全脑缺血再灌注所诱导的兴奋性氨基酸的过度释放,这可能是高压氧治疗缺血再灌注脑损伤的机制之一。

关键词 高压氧;脑缺血;再灌注;兴奋性氨基酸

中图分类号:R743.31, R493, R804.5 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-01-0038-04

Effect of hyperbaric oxygen on the level of excitatory amino acid of brain after complete cerebral ischemia and reperfusion in rats/HOU Yanzhi, CHEN Rui, YU Peilan, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(1):38-41

Abstract **Objective:** To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on the level of excitatory amino acid (EAA) in the brain after complete cerebral ischemia and reperfusion. **Method:** SD rats were divided into three groups: ischemia/reperfusion(I/R) group, hyperbaric oxygen treatment(HBO) group and sham-operated (Sham-O) group. The complete cerebral ischemia was induced by a four-vessel occlusion model. After 20 minutes of ischemia the animals were reperfused for 6, 24, 48 and 96 hours, respectively. The HBO group was subjected to different runs of hyperbaric oxygen treatment after reperfusion, respectively. The whole brain specimens of animals were obtained and the contents of glutamate (Glu) and aspartate (Asp) in the specimens were determined. **Result:** The levels of Glu of HBO groups at 24h and 48h were significantly lower than that of I/R groups of corresponding time ($P \leq 0.01$). Furthermore, the levels of Asp of HBO group at 24h was also lower than that of I/R groups ($P \leq 0.05$), but the levels of Glu of I/R groups at different time points were higher than that of Sham-O group ($P \leq 0.01$). **Conclusion:** The hyperbaric oxygen treatment can inhibit the overrelease of EAA induced by transient complete cerebral ischemia and reperfusion in the period of time. It may be one of mechanisms of HBO treatment brain damage following complete cerebral ischemia and reperfusion.

Author's address Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Capital University of Medical Sciences, Beijing, 100054

Key words hyperbaric oxygen; brain ischemia; reperfusion; excitatory amino acid

兴奋性氨基酸的过度释放激活相应受体而产生的兴奋性神经毒性在缺血再灌注脑损伤中起着极为重要的作用,很大程度上影响了脑损伤的预后^[1]。然而,目前抗兴奋性神经毒性药物大多是通过阻断兴奋性氨基酸受体发挥效应,疗效不尽人意,且具有明显的毒副作用,难以应用于临床。近年来国内外学者对高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗脑缺血进行了广泛的研究,且动物实验多数显示 HBO 有一定疗效,但对其作用的机制尚不清楚^[2]。本研究从影响脑内兴奋性氨基酸释放的角度,探讨了 HBO 治疗在对

抗兴奋性神经毒性,改善预后方面的作用,为 HBO 在临床治疗缺血性神经损伤中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 脑缺血再灌注动物模型的建立

按照 Pulsinelli^[3]等报道的四动脉阻断法建立大

* 基金项目:北京市教委科技发展计划基金资助项目(00KJ-108)

1 首都医科大学生物化学与分子生物学系,北京,100054

作者简介:侯燕芝,女,副教授

收稿日期:2005-05-30

鼠脑缺血再灌注动物模型。用 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠 (300mg/kg 体重)。大鼠取俯卧位固定, 切开颈部皮肤分离肌肉, 暴露第一颈椎, 用电灼针灼烧第一颈椎孔处双侧的椎动脉, 缝合皮肤。术后约 1h, 大鼠清醒, 均出现平衡障碍。次日再次麻醉, 大鼠取仰卧位, 切开颈部皮肤, 暴露两侧颈总动脉, 用动脉夹夹闭两侧颈总动脉, 20min 后再通血流。术后大鼠出现肢体活动障碍。假手术组 (对照组) 行同样手术, 但不阻断动脉。实验所用 200—250g 二级雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自首都医科大学动物部。

1.2 实验动物分组

实验动物 51 只随机分成 9 组, 包括: 假手术对照组 (Sham-O 组), 缺血再灌注组 (I/R 组) 和缺血再灌注+高压氧处理组 (HBO 组); 其中 I/R 组和 HBO 组又分别分为再灌注 6h、24h、48h 和 96h 时相点共 8 组, 每组 5—6 只。

1.3 实验动物的处理

HBO 组: SD 大鼠置于上海 701 所杨园医用氧舱厂制造的 DWC150—300 型透明动物实验舱内, 纯氧洗舱 5min, 升压 5min 至 0.1MPa (2 个大气压) 后稳压, 吸纯氧 45min, 减压 10min。HBO 组脑缺血再灌注 3h 后行高压氧处理 1 次, 24h、48h 和 96h 缺血再灌注组在每天同一时间行高压氧处理一次。

I/R 组和 Sham-O 组处于常压空气环境中不行高压氧处理。

1.4 脑组织样品的制备

各组动物断头处死, 取脑组织称重, 加入 5% 冰的三氯醋酸于冰浴环境下制成匀浆液。低温超速离心 15min, 去除蛋白沉淀, 取上清液 -20℃ 保存待测。

1.5 脑组织样品中 Asp 和 Glu 含量的测定

脑组织样品中的 Asp 和 Glu 含量采用高效液相色谱 (HPLC) 柱前衍生法测定, 并以外标法定量。主要试剂: 氨基酸标准品、邻苯二甲醛 (o-phthalaldehyde, OPA)、硼酸为美国 Sigma 公司产品, 巯基乙醇、甲醇、无水乙酸钠等均为国产分析纯试剂。主要仪器: 美国惠普公司生产的 HP 1100 型 HPLC 仪, 美国 BAS 公司生产的 L-4 型电化学检测器及 LC4B/17 型玻璃工作电极 Ag/AgCl。参比电极的电压为 +0.70V, 灵敏度为 10nAFS。色谱条件: Nova Pak C18 色谱柱, 150mm×4.8mm i.d., 粒径 5μm。柱温: 25℃, 流速: 0.8ml/min。流动相组成: A 液为 0.025mol 乙酸钠缓冲液; B 液为甲醇。样品采用自动进样器自动进样, 进样程序及衍生化反应为: ①洗针; ②吸取样品 10μl; ③吸取 OPA 4μl; ④混和 8 次; ⑤进样 12μl。样品采用下述梯度洗脱程序快速洗脱: 0—

7min, 80% A 液+20% B 液; 7—9min, 10% A 液+90% B 液; 9—14min, 80% A 液+20% B 液。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各时相点 HBO、I/R 组及 Sham-O 组之间比较采用 *F* 检验。显著性检验水准为 $\alpha \leq 0.05$ 。

2 结果

2.1 HPLC 色谱图

用本研究的 HPLC 法分别测定标准氨基酸混合液和大鼠脑组织样品中 Glu 和 Asp 的含量, 得到的色谱图如图 1—2 所示。

图 1 氨基酸标准混合液色谱图

图 2 大鼠脑组织样品 Glu 和 Asp 色谱图

2.2 各组动物脑内 Glu 和 Asp 的含量及分析比较

如表 1 所示, 动物缺血 20min 后分别再灌注 6h、24h、48h 和 96h, 各缺血再灌注组 (I/R 组) 动物脑内 Glu 的含量均明显高于假手术对照组 (Sham-O 组) ($P < 0.01$), 分别缺血再灌注 6h 和 24h 组动物脑内的 Asp 含量也明显高于对照组 ($P < 0.01$), 但 48h 和 96h 组 Asp 的含量与对照组差异无显著性意义。动物缺血再灌注 3h 后行高压氧处理 1 次, 24h、48h 和 96h 组在每天同一时间行高压氧处理 1 次。其结果是: 经高压氧处理 6h、48h 和 96h 时间点的动物 (HBO 组) 脑内 Glu 的水平虽明显高于对照组 ($P < 0.01$), 但 24h 组动物脑内 Glu 的水平却与对照组无显著差异; 而 48h 和 96h HBO 组动物脑内的 Asp 含

表 1 大鼠脑内 Glu 和 Asp 的含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Glu($\mu\text{mol/g}$, brain)	Asp($\mu\text{mol/g}$ brain)
Sham-O(control)	6	2.00 $\pm$ 0.33	0.74 $\pm$ 0.14
6h-I/R	6	12.28 $\pm$ 0.63 ^①	3.66 $\pm$ 0.51 ^①
6h-HBO	6	10.54 $\pm$ 0.64 ^①	4.35 $\pm$ 0.50 ^①
24h-I/R	6	10.26 $\pm$ 0.73 ^①	3.16 $\pm$ 0.38 ^①
24h-HBO	5	3.15 $\pm$ 0.38 ^③	2.13 $\pm$ 0.16 ^{①②}
48h-I/R	6	11.72 $\pm$ 0.61 ^①	1.30 $\pm$ 0.46
48h-HBO	6	7.66 $\pm$ 0.53 ^{①③}	0.74 $\pm$ 0.10
96h-I/R	5	6.37 $\pm$ 1.61 ^①	0.95 $\pm$ 0.80
96h-HBO	5	8.23 $\pm$ 0.75 ^①	0.52 $\pm$ 0.04

①与 Sham-O 组比 $P<0.01$; 相应时间点 HBO 组与 I/R 组比② $P<0.05$, ③ $P<0.01$

量也与对照组差异无显著性意义。但与对应时间点的缺血再灌注组比较, 24h 和 48h HBO 组 Glu 的含量均明显偏低($P<0.01$), 且 24h HBO 组 Asp 含量也低于缺血再灌注组($P<0.05$)。

2.3 不同时间高压氧处理对缺血再灌注大鼠脑内兴奋性氨基酸水平的影响

如图 3—4 所示, 动物缺血再灌注 3h 后, 不同时间行不同次数的高压氧处理, 大鼠脑内兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)水平差异有显著性意义。其中, 经高压氧处理 1 次缺血再灌注 6h 时间点的动物脑内 Glu 和 Asp 含量明显高于 24h、48h 和 96h 组($P<0.01$); 经高压氧处理 2 次, 缺血再灌注 24h 组 Glu 的水平明显低于 6h、48h 和 96h 组($P<0.01$), 而 24h 组 Asp 的水平低于 6h 组却高于 48h 和 96h 组($P<0.01$); 而 48h 和 96h 组 Glu 和 Asp 含量差异均无显著性意义($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 缺血再灌注脑损伤与 EAA

图 3 高压氧对缺血再灌注大鼠脑内 Glu 水平的影响

* 与 6h-HBO 组比 $P<0.01$; Δ 与 24h-HBO 组比 $P<0.01$; $\blacktriangle$ 与 48h-HBO 组比 $P<0.01$; $\blacksquare$ 与 96h-HBO 组比 $P<0.01$

图 4 高压氧对缺血再灌注大鼠脑内 Asp 水平的影响

* 与 6h-HBO 组比 $P<0.01$; Δ 与 24h-HBO 组比 $P<0.01$; $\blacktriangle$ 与 48h-HBO 组比 $P<0.01$; $\blacksquare$ 与 96h-HBO 组比 $P<0.01$

近年来的研究表明, 缺血再灌注可导致脑内兴奋性氨基酸(EAA)的大量释放, 并对神经细胞产生兴奋性毒性作用。目前认为, EAA 的兴奋性毒性作用主要是通过以下机制实现的: ①脑缺血导致氧和血糖供应不足, 能量生成减少, 诱导神经元和神经胶质细胞去极化, 使突触前膜电压依赖性 Ca^{2+} 离子通道开放, Glu 大量释放到突触间隙; 另外, 突触前膜由于能量缺乏, 对 Glu 的重摄取受到抑制, 进一步增加了细胞外 Glu 的堆积。大量的 Glu 激活突触后膜 NMDA 受体, 引起 Ca^{2+} 大量内流, 导致细胞内 Ca^{2+} 超载, 并启动一系列神经细胞损伤的病理反应, 如激活 Ca^{2+} 依赖性蛋白溶解酶、核酸内切酶、磷脂酶、一氧化氮合酶等。其中激活的蛋白溶解酶能降解细胞骨架; 激活的磷脂酶 A2 和环氧合酶可催化产生氧自由基, 引起炎症反应和细胞凋亡; 激活的 NOS 催化产生过量的 NO, 能与超氧阴离子形成过氧亚硝酸根离子和羟自由基, 损伤线粒体膜, 使线粒体形成漏洞, 开放线粒体转换孔, 致使离子平衡紊乱^[4]。②大量的 Glu 激活代谢型 Glu 受体, 从而激活了与 Gq 蛋白相耦联的磷脂酰肌醇信号转导途径, 最终导致细胞通透性发生改变, 使大量的 Na^+ 和 Cl^- 进入细胞内, 水被动进入胞内引起细胞肿胀, 诱导细胞坏死和凋亡^[5]。因此, 在脑缺血的过程中, EAA 的神经毒性作用即是损伤脑组织的启动者又是执行者^[6]。

3.2 HBO 在脑缺血再灌注损伤中作用的可能机制

已有研究表明, 在一定压力及时间范围内, HBO 可能通过以下多种机制在缺血再灌注过程中对脑组织起保护作用: ①提高血氧含量及氧分压, 使血氧弥散能力增强, 改善缺血部位周围组织氧的供给^[7]。②防止脑细胞能量衰竭, 使无氧代谢转向有氧代谢。③减少神经元凋亡, 促进细胞存活。④减少中性粒细胞浸润^[8]。另有研究表明, 超过一定的缺血时限后, 机体就不能消耗所施加的高压纯氧用于供能, 导致在再灌注期间产生大量氧自由基, 而后者对细胞生物膜、蛋白质及核酸会产生有害作用, 并引起脑血管的强烈收缩而加重脑组织的损伤^[9]。

3.3 HBO 对缺血再灌注脑组织 EAA 水平的影响

本研究从影响脑内兴奋性氨基酸释放的角度, 探讨了 HBO 治疗在对抗兴奋性氨基酸神经毒性, 改善预后方面的作用, 目前这方面的研究国内外还未见相关报道。研究结果显示, 缺血再灌注后经高压氧处理 24h 和 48h 时间点的 HBO 组大鼠脑内 Glu 的含量明显低于对应时间点不经高压氧处理的缺血再灌注组, 且 24h 时间点的 HBO 组 Asp 的含量也明显低于同一时间点的缺血再灌注组。提示在一定时

间内进行高压氧处理可抑制由全脑缺血再灌注所诱导的兴奋性氨基酸的过度释放,这可能是高压氧治疗缺血再灌注脑损伤的机制之一。此外我们注意到,动物缺血再灌注 3h 后,不同时间行不同次数的高压氧处理,大鼠脑内 EAA 水平出现明显差异。其中,经高压氧处理 1 次,缺血再灌注 6h 的动物脑内 Glu 和 Asp 含量最高,经高压氧处理 2 次,缺血再灌注 24h 的动物脑内 Glu 的含量最低。提示 HBO 对缺血再灌注脑组织 EAA 水平的影响可能有一定的剂量和时间依从性。此外在本研究中我们观察到:不论经不经高压氧处理,动物在缺血再灌注 96h 之后,脑内 Glu 和 Asp 含量都明显降低。这可能是由于缺血再灌注所诱导的兴奋性氨基酸的过度释放主要发生在脑缺血的早、中期^[10]。此外,在缺血再灌注的后期,由于部分神经细胞的凋亡或坏死,也将会导致脑内总兴奋性氨基酸的释放量相应减少。

参考文献

- [1] Culmsee C, Junker V, Kremers W, et al. Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol[J]. Stroke, 2004, 35(5):1197—1202.
- [2] Mrsic PJ, Pelcic G, Vitezic D, et al. Hyperbaric oxygen treatment: the influence on the hippocampal superoxide dismutase and Na⁺, K⁺ATPase activities in global cerebral ischemia-exposed rats [J]. Neurochem Int, 2004, 44(8):585—594.
- [3] Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. [J]. Stroke, 1988, 19:913—914.
- [4] Gomi S, Karp AH. Regional alterations in an excitatory amino acid transporter, blood flow, and glucose metabolism after middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. Exp Brain Res, 2000, 130(4):521—528.
- [5] Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury[J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10):871—890.
- [6] Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels [J]. Cell, 2004, 118(6):687—698.
- [7] Calvert JW, Yin W, Patel M, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia ischemia in a neonatal rat model [J]. Brain Res, 2002, 951(1):128—132.
- [8] Atochin DN, Fisher D, Thom SR, et al. Hyperbaric oxygen inhibits neutrophil infiltration and reduces postischemic brain injury in rats [J]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova, 2001, 87(8):1118—1125.
- [9] Lou I, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic window use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats [J]. Stroke, 2004, 35(2):578—583.
- [10] Huang Y, McNamara JO. Ischemic stroke: "acidotoxicity" is a perpetrator [J]. Cell, 2004, 118(6): 665—666.

中国康复医学会运动疗法专业委员会第八届全国学术会议通知

会议主题: 提高康复治疗技术 规范专科操作技能。

征文范围: 1. 运动疗法新进展和新技术; 2. 康复评定新进展及其临床应用; 3. 运动疗法基础研究; 4. 运动疗法在各类疾病康复治疗中的应用; 5. 步态分析; 6. 表面肌电图及其临床应用; 7. 矫形器的临床应用; 8. 康复医学教育; 9. 康复医学学科发展及管理模式; 10. 全民健身运动。

征文要求: 论文必须具有科学性、先进性和实用性, 未在公开发刊刊物或全国性学术会议上交流的文章。征文以 1000 字论文摘要为限, 格式按科技期刊的要求, 文责自负; 用 word 文档打印, 附个人简历, 包括作者姓名、工作单位、详细地址、邮编和通讯方式。欢迎通过电子邮件投递, 邮寄请附软盘。论文截止日期: 2006 年 1 月 10 日, 无文章参加会议者, 请寄本人简历。3. 来稿请寄: 广东省广州市沿江西路 107 号(中山二院) 广东省康复医学会, 邮编: 510120。Email: garm@vip.163.com, 电话/传真: 020-81332880 手机: 13710371064(周医生)。

部分境外专家讲座: 1. 疼痛物理治疗和运动锻炼(ISPRM 荣誉秘书长, 巴西 Marta Imamura 教授); 2. 功能性电刺激(ISPRM 前任主席, 以色列 Haim Ring 教授); 3. 脑外伤康复治疗 and 运动锻炼(澳大利亚康复医学会主席 John Olver 教授); 4. 脊髓损伤后康复治疗 and 运动锻炼(泰国康复医学会主席 Apicana Koindha 教授); 5. 脑瘫康复治疗 and 运动锻炼(ISPRM 下届主席 Chang-il Park 教授); 6. 心脏病康复治疗 and 运动锻炼(香港康复医学会前任会长李常威教授)。

会议时间及地点: 2006 年 2 月 17 日—2 月 21 日(2 月 17 日全天报到), 地点为珠海市珠海宾馆。