论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0192-04

重度颅脑创伤后应用(S)-4C3HPG减轻小鼠颅脑损伤的作用

王 昊[1],戴双双[2],杨 楠[3],周元国[3],许民辉[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:神经外科[1],第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[3];400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨重度颅脑创伤(severe traumatic brain injury,sTBI)后不同时间点使用谷氨酸释放调节剂(S)-4C3HPG对颅脑创伤急性期伤情的影响,以明确调节谷氨酸释放获得有效脑保护作用的最佳时间点。**方法** 以自由落体撞击方法制作重度小鼠颅脑损伤模型,分别在小鼠致伤后15 min、1、3、6 h 4个时间点腹腔注射(S)-4C3HPG 5 mg/kg,观察了其对颅脑创伤后24 h时神经功能缺损评分、脑含水量、脑脊液中谷氨酸浓度及炎症因子TNF-α、IL-1β mRNA表达的影响。**结果** 致伤后24 h检测(S)-4C3HPG药物处理15 min组和1 h组神经功能缺损[分别为(1.70±0.48)、(1.90±0.56)]显著低于对照组[(2.80±0.42),$P<0.01$],脑含水量[分别为(80.14±0.28)%、(80.17±0.52)%]显著低于对照组[(82.55±0.34)%,$P<0.01$],脑脊液中谷氨酸浓度[分别为(4.24±0.28)、(6.12±0.23) μmol/L]显著低于对照组[(9.03±0.32) μmol/L,$P<0.01$],炎症因子TNF-α mRNA的表达[分别为(0.722±0.160)、(0.793±0.122)]显著低于对照组[(1.006±0.125),$P<0.01$],IL-1β mRNA的表达[分别为(0.594±0.128)、(0.651±0.111)]显著低于对照组[(1.012±0.088),$P<0.01$],证明于致伤后15 min和1 h给予(S)-4C3HPG能明显减轻重度颅脑损伤,而于致伤后3 h和6 h给予(S)-4C3HPG与对照组比较,神经功能缺损、脑含水量、脑脊液中谷氨酸浓度及炎症因子TNF-α、IL-1β mRNA的表达无统计学差异,说明神经功能保护作用不明显。**结论** 重度颅脑创伤后,尽早使用(s)-4C3HPG控制谷氨酸释放将有效减轻急性期的脑损伤。

[关键词] 重度颅脑创伤;(s)-4c3HPG;谷氨酸;炎症因子

[中图法分类号] R-332; R651.15; R977.6 [文献标志码] A

Effect of (S)-4C3HPG on alleviating brain injury in severe traumatic brain injury and the underlying mechanisms

Wang Hao[1], Dai Shuangshuang[2], Yang Nan[3], Zhou Yuanguo[3], Xu Minhui[1] ([1]Department of Neurosurgery, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Department 7, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of (S)-4C3HPG (S-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine) on acute brain injury at different time points after severe traumatic brain injury (sTBI) in mice, and to elucidate the possible mechanisms. **Methods** Mice model of sTBI was established by bumpiness of free falling body, and the model mice were injected with (S)-4C3HPG, 5 mg/kg (i.p. $n=10$ per group), at 15 min, 1 h, 3 h and 6 h after sTBI, respectively. Neurological deficit scores, water content in injured brain and glutamate concentration in cerebral spinal fluid (CSF) were measured, and mRNA expressions of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) in injured cortex were detected by Real-time PCR at 24 h after TBI. **Results** Neurological deficits[(1.70±0.48) and (1.90±0.56)], cerebral edema[(80.14±0.28)% and (80.17±0.52)%] and glutamate concentration in CSF[(4.24±0.28) μmol/L and (6.12±0.23) μmol/L] were significantly attenuated or decreased in mice treated with (S)-4C3HPG at 15 min and 1 h post sTBI as compared with those in the control group[(2.80±0.42), (82.55±0.34)% and (9.03±0.32) μmol/L; $P<0.01$]. mRNA expressions of TNF-α[(0.722±0.160) and (0.793±0.122)] and IL-1β[(0.594±0.128) and (0.651±0.111)] significantly were decreased in mice treated with (S)-4C3HPG at 15 min and 1 h post sTBI as compared with those in the control group[(1.006±0.125) and

[基金项目] 国家自然科学基金(30900587);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5317);第三军医大学青年创新基金(0656)

[通信作者] 许民辉,电话:(023)68757973,E-mail: minhuixu@yahoo.com

(1.012 ± 0.088); $P < 0.01$]. However, these changes were not significant in the groups of mice treated with (S)-4C3HPG at 3 h or 6 h post sTBI as compared with those of the control group. **Conclusion** (S)-4C3HPG treatment at early stage alleviates acute brain injury in sTBI, and its mechanism is possibly related to suppression of glutamate release.

[**Key words**] severe traumatic brain injury; (S)-4C3HPG; glutamate; inflammatory cytokines

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900587), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5317), and the Youth Innovative Foundation of Third Military Medical University (0656). Corresponding author: Xu Minhui Tel: 86-23-68757973, E-mail: minhuixu@yahoo.com

谷氨酸是脊椎动物中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质,其不但维持神经细胞的正常功能,而且还可以调节突触稳定性及效能,参与学习和记忆过程。在颅脑创伤后,由于脑损伤区域神经元及神经胶质细胞崩解等原因,谷氨酸会从神经元、星形胶质细胞大量释放到细胞间液,激活谷氨酸受体而发挥兴奋性毒性作用,导致颅脑创伤后的继发性损伤,因此通过伤后控制谷氨酸的释放,将可能产生有效的脑保护作用。作为苯甘氨酸衍生物(S)-4C3HPG是混合型代谢型谷氨酸受体调节剂,既是Ⅰ组代谢型谷氨酸受体(group Ⅰ glutamate metabotropic receptor, mGluR Ⅰ)的拮抗剂也是Ⅱ组代谢型谷氨酸受体(group Ⅱ glutamate metabotropic receptor, mGluR Ⅱ)的激动剂[1]。在我们前期的研究中发现中度颅脑创伤模型中,致伤前给予(S)-4C3HPG可以显著减轻创伤后继发性颅脑损伤[2],而在更为严重的重度颅脑创伤(severe traumatic brain injury, sTBI)中该药物是否也存在显著的脑保护作用尚不清楚。因此,在前期研究的基础上,在sTBI模型小鼠致伤后不同时间点给予(S)-4C3HPG,观察其对sTBI后急性期伤情的影响,以期明确在sTBI中调节谷氨酸释放获得有效脑保护作用的可能性,进而基于(S)-4C3HPG应用阻断谷氨酸兴奋性氨基酸毒性作用为创伤性重型颅脑损伤的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF级C57BL/6雄性小鼠60只,体质量22~25 g,2~3月龄,(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。完全随机分为:假手术组:使用1.5%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠后仅进行开颅和缝合处理;对照组:仅致伤,无任何药物干预;(S)-4C3HPG药物处理组:分别在sTBI后15 min、1、3、6 h这4个时间点予以腹腔注射谷氨酸释放抑调节剂(s)-4c3HPG 5 mg/kg[2]。共6组,每组10只。

1.2 试剂与器材

戊巴比妥钠(英国TOCRIS公司)、谷氨酸释放抑制剂(s)-4c3HPG(英国TOCRIS公司)、L-谷氨酸(L-GLu)(上海康达氨基酸厂)、邻苯二甲醛(O-phthaldehyde, OPA)(瑞士Fluka公司)、甲醇(HPLC级,天津大茂化学试剂厂)、四氢呋喃(HPLC级,天津光复精细化工研究所)、乙酸钠(分析纯,重庆化学试剂厂)、自由落体撞击装置(自制)、高效液相色谱仪(美国Beckman)、ODS C18柱(2.5 cm×4.6 mm,5 μm,美国SUPELCOSIL)、157荧光检测器(美国Beckman)、定量PCR仪(Stratagene Mx3000P,美国Stratagene公司)、微量注射器(浙江省医用器材厂)。

1.3 模型的建立

参照本课题组建立的方法进行[3]。使用戊巴比妥钠麻醉小鼠,在小鼠左侧顶叶前囟及后囟间开4 mm×4 mm骨窗,使用20 g重物自50 cm高度落下,对左侧顶叶进行撞击,撞击直径3 mm,深度3 mm,致伤后复原骨片,缝合皮肤。

1.4 神经功能缺损评分

参照本课题组方法在致伤后24 h进行神经功能缺损评定[3]。评分标准如下:0级:正常;1级:右侧肢轻瘫,右前肢不能伸直;2级:右侧肢瘫痪,有追尾现象;3级:无法活动,翻正反射消失。

1.5 脑含水量测定

神经功能评定后小鼠断头、快速剥离出全脑,距创伤左侧边缘约2 mm处取出100 mg左右脑组织,用电子分析天平(精确度0.1 mg)称湿质量后置入预称量的小瓷缸中,恒温干燥箱110 ℃烘烤24 h,烤至恒量(2次称量差别≤0.2 mg),取出后冷却10 min后称干质量,按Eilliot公式计算脑组织含水量:

脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%

1.6 脑脊液中谷氨酸浓度检测

采用梯度高效液相法测定各组伤后24 h脑脊液中谷氨酸浓度[4]。

1.7 伤侧皮层炎症因子测定

TBI伤后24 h常规方法提取伤侧皮层总RNA,逆转录为cDNA后用Real-time PCR方法检测炎症因子mRNA表达水平变化。TNF-α引物P1:5′-AATGGCCTCCCTCTCATCAG-3′,P2:5′-CCACTTGGTGGTTTGCTACG-3′,IL-1β引物P1:5′-GTGTGACGTTCCCATTAGAC-3′,P2:5′-CATTGAGGTGGAGAGCTTTC-3′。定量PCR反应体系:模板2 μl,引物1 μl,SYBR primix EX *Taq* 12.5 μl,H_2O 9.5 μl。定量PCR反应条件:95 ℃ 10 min,然后按以下步骤循环40次:95 ℃ 30 s,61 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s。

1.8 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SigmaPlot 10.0软件进行单因素方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分比较

在小鼠sTBI后24 h,(S)-4C3HPG 15 min、1 h药物处理组[分别为(1.70±0.48)、(1.90±0.56)]的神经功能缺损评分均显著低于对照组(2.80±0.42)($P<0.01$)。(S)-4C3HPG 3、6 h组的神经功能缺损评分[分别为(2.40±0.51)、(2.60±0.51)]与对照组相比无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 脑含水量的变化

脑含水量的改变在一定程度上反映颅脑创伤后损伤区域脑水肿的情况。sTBI后24 h时检测致伤组的脑含水量较假手术组显著增高。但在致伤组中,与对照组比较,(S)-4C3HPG药物处理15 min、1 h组伤后24 h脑含水量显著降低($P<0.01$);而(S)-4C3HPG药物处理3、6 h组与对照组比较无统计学差异。见表1。

表1 sTBI后不同时间给药对TBI后24 h脑含水量及脑脊液中谷氨酸水平的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	脑含水量(%)	谷氨酸浓度(μmol/L)
假手术组	78.74±0.55	1.82±0.13
对照组	82.55±0.34[a]	9.03±0.32[a]
药物处理15 min组	80.14±0.28[ab]	4.24±0.28[ab]
药物处理1 h组	80.17±0.52[ab]	6.12±0.23[abc]
药物处理3 h组	81.33±0.30[a]	7.83±0.31[a]
药物处理6 h组	80.98±0.34[a]	8.16±0.36[a]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与药物处理15 min组比较

2.3 脑脊液谷氨酸含量的变化

在sTBI后24 h时检测致伤组小鼠脑脊液中谷氨酸浓度较假手术组显著增高($P<0.01$)。但与对照组比较,(S)-4C3HPG药物处理15 min、1 h组在伤后24 h测得的脑脊液中谷氨酸浓度虽都显著低于对照组($P<0.01$),但这两个处理组间也存在显著差异($P<0.01$)。而(S)-4C3HPG药物处理3、6 h组与对照组比较无统计学差异。见表1。

2.4 伤侧皮层炎症因子表达的变化

在对伤侧皮层炎症因子的检测中显示,sTBI后24 h,(S)-4C3HPG药物处理15 min、1 h组在TNF-α、IL-1β mRNA表达水平上与对照组比较明显降低($P<0.01$)。而在(S)-4C3HPG药物处理3、6 h组中伤侧皮层TNF-α、IL-1β mRNA表达水平上与对照组无统计学差异。见表2。

表2 sTBI后不同时间给药对sTBI后24 h伤侧皮层炎症因子TNF-α、IL-1β mRNA水平的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α mRNA	IL-1β mRNA
对照组	1.006±0.125	1.012±0.088
药物处理15 min组	0.722±0.160[a]	0.594±0.128[a]
药物处理1 h组	0.793±0.122[a]	0.651±0.111[a]
药物处理3 h组	0.936±0.153	0.705±0.098[a]
药物处理6 h组	0.955±0.087	0.905±0.110

a:$P<0.01$ 与对照组比较

3 讨论

创伤性颅脑损伤是神经外科的常见疾病,其中重型颅脑损伤的高致残、致死残严重威胁人类的生命。颅脑损伤机制十分复杂,创伤后兴奋性氨基酸的过度释放、炎症反应、离子通道的失衡、脑水肿、氧自由基生成、细胞凋亡等,这些机制既同时发生作用又互相关联构成连锁反应,最终导致神经细胞的死亡的病理过程[5]。深入探讨颅脑损伤的发生机制,对降低其致残、致死率,提高治愈率和改善预后具有重要的临床意义。

谷氨酸作为中枢神经系统中含量最高、作用最广泛的兴奋性氨基酸,在生理条件下对维持细胞正常功能有着十分重要的作用。目前已有大量研究证明在颅脑创伤后细胞外液和脑脊液中谷氨酸的急剧增加,产生兴奋性神经毒性作用,导致神经元损伤,从而加重伤情引起严重的神经功能损害[6-7]。Dai等[8]研究发现在小鼠中度TBI模型中细胞外高浓度谷氨酸可促进炎症因子TNF-α、IL-1β的表达。在本实验中小鼠sTBI后也存在此现象,在sTBI后24h小鼠脑脊液中谷氨酸浓度较正常小鼠显著增高,并且伤后随谷氨酸浓度的增高,炎症因子TNF-α、IL-1β的表达也明显增高。说明在重度颅脑损伤后由于血脑屏障和脑组织的原发性损害导致脑损伤区域兴奋性氨基酸,特别是谷氨酸的急剧释放,其兴奋性毒性作用引起神经细胞缺血、缺氧并诱导了炎症因子的表达,这些作用共同导致了创伤后的血脑屏障通透性改变、脑血流紊乱、脑水肿、神经元死亡等一系列复杂的继发性改变,加重了颅脑损伤后神经功能损害的形成[9-10],实验证明神经功能损害程度及脑水肿的程度与伤后谷氨酸浓度及炎症因子表达水平的增高密切相关。

在颅脑创伤后调节中枢神经系统内谷氨酸的释放,降低其兴奋性毒性作用及其诱导的炎症反应,减轻颅脑损伤后带来的神经功能损害是有重要意义的。目前已证实(S)-4C3HPG对阿尔茨海默病、帕金森病、抑郁症、精神分裂症、癫痫症及椎体外系疾病的治疗、减轻脑缺血后的脑梗死灶等慢性疾病及神经保护方面都有较好的效果[11-13]。在创伤性颅脑损伤中原发性损伤无法预防和逆转,而继发性损伤却是具有可逆性并对预后具有决定性作用。通常,对于重度颅脑损伤而言,伤后早期干预,尤其对急性期(24 h内)的早期诊断、早期处理,有效降低颅内压和防治并发症是降低死

亡率的3大主要措施[14-15]。结合本课题组前期的实验[2],我们根据颅脑创伤急性期谷氨酸浓度波动曲线进行伤后时间窗的选择[8],选择伤后24 h内15 min、1、3、6 h予以(S)-4C3HPG观察其在sTBI后对是否存在较好的神经保护作用,实验证明sTBI后24 h脑脊液中谷氨酸浓度的变化水平与炎症介质(TNF-α、IL-1β)的变化水平具有同向性,在sTBI早期(15 min和1 h)给予(S)-4C3HPG降低了谷氨酸浓度和炎症因子的表达水平,显著减轻了sTBI后脑水肿和神经功能损伤($P<0.01$),具有更好的神经保护作用,而后期给药谷氨酸浓度降低不明显,与对照组比较无统计学差异,而脑含水量及炎症因子的表达则进一步升高,说明伤后(3 h和6 h)给药对无显著的脑保护作用。因此在颅脑创伤后尽早应用(S)-4C3HPG来调节谷氨酸的释放,可明显减少兴奋性氨基酸毒性作用,降低炎症反应的诱发因素,减轻了神经功能的损害,而在急性期后致伤的因素重点主要可能是炎症反应,即使抑制了谷氨酸的毒性作用,也不能有效减轻神经系统的损害。据研究表明:弥漫性脑损伤后mGluRⅠ表达增加并参与神经元损伤的病理过程,伤后mGluRⅡ表达减少,使神经元保护作用减弱[16]。提示(S)-4C3HPG在颅脑创伤后的作用机理可能是与谷氨酸竞争结合谷氨酸受体(拮抗mGluRⅠ、激动mGluRⅡ)来发挥其生物学效应的。但(S)-4C3HPG对mGluRⅠ、Ⅱ组受体在创伤后如何与谷氨酸受体结合发挥作用的具体机制仍需进一步研究。

综上所述,作为颅脑损伤的重要机制谷氨酸兴奋性毒性作用与进炎症反相互促进,从而加重了对神经功能的损害[17]。颅脑创伤后尽早应用混合型谷氨酸受体调节剂(S)-4C3HPG可有效减轻继发性颅脑损伤,对颅脑损伤患者开展院前急救及早期治疗有重要的理论指导作用,为开发高选择性促代谢型谷氨酸受体调节剂提供依据,具有重要的医学科研和临床意义。

参考文献:

[1] Orlando L R, Standaert D G, Penney J B Jr, *et al*. Metabotropic receptors in excitotoxicity: (S)-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine ((S)-4C3HPG) protects against rat striatal quinolinic acid lesions[J]. Neurosci Lett, 1995, 202(1/2): 109-112.

[2] 杨楠, 戴双双, 宁亚蕾, 等. (S)-4C3HPG对小鼠中度颅脑创伤后急性期伤情的影响及机制[J]. 生理学报, 2010, 62(6): 555-559.

[3] Li W, Dai S, An J, *et al*. Chronic but not acute treatment with caffeine attenuates traumatic brain injury in the mouse cortical impact model [J]. Neuroscience, 2008, 151(4): 1198-1207.

[4] 李玮, 安建宏, 朱佩芳, 等. 小鼠急性脑损伤后微量脑脊液谷氨酸浓度的测定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(12): 1290-1291.

[5] Chesnut R M, Marshall L F, Klauber M R, *et al*. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury[J]. J Trauma, 1993, 34(2): 216-222.

[6] Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia[J]. Life Sci, 2001, 69(4): 369-381.

[7] Zhang H, Zhang X, Zhang T, *et al*. Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of patients with acute head injuries[J]. Clin Chem, 2001, 47(8): 1458-1462.

[8] Dai S S, Zhou Y G, Li W, *et al*. Local glutamate level dictates adenosine A2A receptor regulation of neuroinflammation and traumatic brain injury[J]. J Neurosci, 2010, 30(16): 5802-5810.

[9] Hayakata T, Shiozaki T, Tasaki O, *et al*. Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury [J]. Shock, 2004, 22(2): 102-107.

[10] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema [J]. J Neurosurg, 2000, 92(1): 108-120.

[11] Lorenc-Koci E, Wardas J, Wolfarth S, *et al*. (S)-4C3HPG, a mixed group I mGlu receptor antagonist and a group II agonist, administered intrastriatally, counteracts parkinsonian-like muscle rigidity in rats [J]. Brain Res, 2001, 903(1/2): 177-184.

[12] Henrich-Noack P, Hatton C D, Reymann K G. The mGlu receptor ligand (S)-4C3HPG protects neurons after global ischaemia in gerbils [J]. Neuroreport, 1998, 9(6): 985-988.

[13] Rauca C, Henrich-Noack P, Schafer K, *et al*. (S)-4C3HPG reduces infarct size after focal cerebral ischemia[J]. Neuropharmacology, 1998, 37(12): 1649-1652.

[14] 徐伦山, 许民辉, 邹咏文, 等. 重型颅脑损伤患者死亡原因分析及应对策略[J]. 创伤外科杂志, 2005, 7(1): 11-13.

[15] Tsang K K, Whitfield P C. Traumatic brain injury: review of current management strategies[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2011, [Epub ahead of print]. http://www.bjoms.com/article/s0266-4356(11)00077-5/abstract

[16] 费舟, 章翔, 刘恩渝, 等. 弥漫性脑损伤大鼠脑皮质Ⅰ、Ⅱ组代谢型谷氨酸受体表达及意义[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2002, 1(1): 57-59.

[17] 武明明, 孙晓川, 吴海涛, 等. 载脂蛋白E基因多态性与星形胶质细胞损伤后兴奋性氨基酸变化的关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9): 928-931.

(**收稿**:2011-10-06;**修回**:2011-11-23)

(编辑 王小宴)