维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)01－0053－04

幼年鼠内毒素性脑水肿模型及脑组织钙离子和钙调素表达的研究

李　梅，蔡方成

(重庆医科大学儿科学院神经内科，重庆　400014)

【摘　要】目的：建立简单、易复制的幼年鼠内毒素性脑水肿模型，并从 Ca^{2+}、钙调素(CaM)水平探讨脑水肿的发生发展。方法：45 只幼鼠，随机分内毒素组(36 只)和对照组(9 只)，分别于腹腔内注射内毒素(LPS)10mg/kg 和等容量生理盐水，并用电镜观察其病理、用常规生化法测定脑含水量和伊文氏蓝(EB)含量、用荧光标记术和免疫印迹法分别测定脑组织细胞内[Ca^{2+}]和 CaM 表达。结果：脑组织含水量和 EB 含量显著高于对照组；细胞内[Ca^{2+}]明显增高，脑组织 CaM 表达增强；电镜显示血脑屏障(Blood－brain barrier，BBB)受损、神经元变性、胶质细胞肿胀、坏死等特征。结论：LPS 导致了 BBB 通透性改变，并引起了混合性脑水肿。LPS 引起了细胞内[Ca^{2+}]增高，并激活了 CaM，从而启动了 Ca^{2+}－CaM 信号通路，这可能与其增加 BBB 通透性并导致脑水肿形成有密切关系。

【关键词】内毒素；脑水肿；钙离子；钙调素

【中国图分类法分类号】Q95－3；Q952.5　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－03－22

Intracellular free calcium and calmodulin expression in a brain edema model induced by endotoxin in infant rats

LI Mei, et al

(*Department of Neurology, College of Pediatric Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a simple, reproducible brain edema model induced by endotoxin in infant rats and explore the role of intracellular free calcium and calmodulin (CaM) in the development of brain edema. *Methods*: A total of 45 infant rats were divided randomly into endotoxin treated($n=36$) and control($n=9$) group. The animals were intraperitoneally injected with 10mg/kg of endotoxin or saline respectively. The brain tissue intracelluar free [Ca^{2+}] as well as the expression of CaM was detected by fluorescence and protein hybridizaton methods respectively. The tissue water content, Evans Blue content and pathology under electronic microscope were also observed. *Results*: Brain water and EB content were remarkably increased in endotoxin treated animals compared with those in the control, in which the intracellular free [Ca^{2+}] was also significantly increased and the expression of CaM up－regulated. Electron microscopic studies revealed that the blood－brain barrier(BBB) was disrupted with neuronal degeneration, neurogliocyte swelling and necrosis. *Conculsion*: These results suggest that LPS increases the intracellular free [Ca^{2+}], and activates the CaM－dependent function via Ca^{2+}/CaM pathway, which might relate to the increased BBB permeability and brain edema formation.

【Key words】Endotoxin; Brain edema; Calcium; Calmodulin

内毒素性脑水肿作为儿科严重细菌感染所致感染中毒性脑病的常见并发症，其模型目前较局限。本文从腹腔内注入内毒素建立内毒素性脑水肿模型，并从脑水肿的发生机制角度，对脑组织中细胞内钙离子浓度与钙调素表达及它们之间的关系作一研究。

作者介绍：李　梅(1965－　)，女，副主任医师，硕士，主要研究方向：小儿神经疾病。

1　材料与方法

1.1　实验动物分组及脑水肿模型建立

实验用 Wistar 大鼠由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供，雌雄不拘，体重 70～100g。分组如下：单纯内毒素组(LPS 组)36 只：100mg/kg LPS 腹腔注射，于处理后 2h、6h、12h、24h 分批断颈活杀(各时间点 9 只)；对照组 9 只：1ml/kg 生理盐水腹腔注射后 6h 断颈活杀，取脑组织测定所需指标。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 测定指标与方法

1.2.1 蛋白定量方法、脑组织含水量测定、脑组织伊文氏兰(EB)含量测定均采用常规生化方法测定。

1.2.2 脑组织细胞内游离 Ca^{2+} 测定 取左侧大脑半球之前 1/2 脑组织,用 1.5% 胰蛋白酶消化 20min,过 200 目筛网,以 DMEM 培养基制成(10^6 ~ 10^7)/ml 细胞悬液,加入 Fura-2/AM 使终浓度为 5~7μmol/L,在荧光分光光度计上测定,发射波长 500nm,激发波长 340nm 和 380nm,依次记录静息、加入 0.1% ~0.2% Triton X-100 和 5mmol/L EGTA(pH 8.6)后 340nm/380nm 荧光比值。按下式计算 Ca^{2+} 含量(nmol/L):

224×(零钙时 380 荧光值/最大钙时 380 荧光值)×(静息态荧光值 - 加入 EGTA 时 340 与 380 荧光比值)/(加入 Triton X-100 时 340 与 380 荧光比值 - 静息态荧光值)

1.2.3 脑组织 CaM 表达蛋白杂交检测 如前所述取处理后的脑组织,用含有酶抑制剂的裂解液制成组织匀浆,4℃、15000g 离心 10min,取部分上清定蛋白。采用 4% 浓缩胶,12% 分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,每份标本的上样量为 50μg 蛋白,电泳结束后电转移至 PVDF 膜上进行常规免疫印迹检测。

1.2.4 电镜检查 动物断颈处死后,迅速取出脑组织,于 2.5% 戊二醛溶液中切成 $1mm^3$ 大小的组织块,常规戊二醛固定、水洗、丙酮脱水、环氧树脂包埋及超薄切片,铅铀双重染色后透射电镜观察。

1.3 统计学处理

所有数据均以均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$),采用 SPSS 软件进行单因素方差分析及均数间两两比较。$P<0.05$,认为有显著性差异;$P<0.01$ 认为差异非常显著。

2 结 果

2.1 脑组织含水量和 EB 含量的变化

从表 1 可见,自腹腔给予内毒素后 2h 开始,LPS 组动物脑组织含水量显著增加,以 6h、12h 尤为明显($P<0.01$),24h 即有所下降,与对照相比差异不再明显;脑组织 EB 含量显著增加($P<0.01$),6h 时达高峰,并持续 24h 之久。

表 1 脑组织含水量(%)和 EB 含量(μg/g 蛋白)及细胞内 Ca^{2+} 含量(nmol/L)的改变

组别	动物(只)	脑组织含水量 (%)	脑组织 EB 含量 (μg/g 蛋白)	脑细胞内 Ca^{2+} 含量 (nmol/L)
对照组	9	77.5±0.5	49.8±4.5	189.1±24.8
内毒素组	36			
注射后				
2h	9	78.4±1.0*	71.1±10.4**	238.0±50.9*
6h	9	79.1±0.8*	78.1±14.6**	238.3±45.6**
12h	9	79.1±0.6**	66.7±6.8**	309.9±58.1**
24h	9	78.1±0.6	64.4±9.7**	263.8±44.5**

与对照组相比:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 脑组织细胞内游离 Ca^{2+} 浓度变化

从表 1 可见,给予内毒素后脑组织细胞内 Ca^{2+} 浓度即逐渐增加,与对照组相比,2h 即有显著差异,12h 尤为明显,并持续 24h。

2.3 脑组织 CaM 表达

给予内毒素后 6h、12h、24h,脑组织中 CaM 表达明显增加。

2.4 电镜观察结果

对照组毛细血管、神经细胞和胶质细胞结构正常:毛细血管内皮细胞结构完整,周围无水肿间隙,胶质突起正常;神经细胞核仁、核膜清晰,粗面内质网、线粒体、高尔基氏体、溶酶体等细胞器结构未见异常;胶质细胞核以及细胞器结构正常。

给予 LPS 后 6h~12h 的主要表现为:

2.4.1 毛细血管改变 LPS 后 6h,毛细血管周围胶质突起轻微肿胀,部分出现空泡样改变,内皮细胞有较多突起伸入管腔内呈锯齿状改变、且吞饮泡已较丰富;LPS 后 12h,内皮细胞变性,胞浆空泡变,基底膜消失,毛细血管周围胶质细胞突起严重水肿。

2.4.2 神经细胞变性改变 核仁消失,染色质稀疏,粗面内质网脱颗粒,线粒体模糊、嵴紊乱、肿胀呈囊泡状,高尔基器囊泡状扩张,胞体周围出现大量空泡结构,神经毡周围出现高密度的电子碎块示突起肿胀变性呈空泡状。

2.4.3 胶质细胞变性改变 LPS 后 6h,胞浆肿胀,胞体透明,细胞器疏散,胶质细胞周围突起肿胀;LPS 后 12h,胶质细胞周围突起严重水肿,空泡变。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

3.1 内毒素与血脑屏障

细菌难以透过 BBB[1]，内毒素（脂多糖 lipopolysaccharide，LPS）由革兰氏阴性细菌产生，可激发免疫细胞产生多种因子。近年的研究表明，外周给予 LPS 可引发复杂多样的脑内事件、LPS 对 BBB 的通透性有不同程度的影响[2]，可致脑水肿的发生。

颅内感染、脑缺血缺氧、外伤、肿瘤等疾病的病理生理改变主要为脑水肿。研究发现，它们几乎都同时存在两种类型的脑水肿，即血管源性和细胞毒性脑水肿[3~5]。两者的主要区别在于 BBB 功能完整性：细胞毒性脑水肿 BBB 功能基本完整；血管源性脑水肿中 BBB 功能则有明显破坏，从而使大小分子量的血浆物质及水份进入脑组织。临床上多见的是血管源性，因为它主要伴随有水份渗入脑组织而导致的一系列急性颅内压增高症状，而细胞毒性临床上相对难以判定[6]，其主要特点是细胞膜上钠泵受损，造成细胞内因钠和水潴留而肿胀。

细菌毒素，尤其内毒素在严重毒血症基础上常合并感染中毒性脑病。后者是儿科严重细菌感染中常见并发症。为开展相关的动物实验研究，文献中曾介绍使用高浓度的百日咳杆菌细菌悬液颈内动脉灌注，以诱导感染性脑水肿模型[3]，但这并不能排除细菌菌栓导致缺血缺氧性脑水肿。也有给动物脑室内直接注射 LPS 来建立脑水肿模型[7]。从幼年大鼠腹腔内注射 LPS 建立脑水肿模型，既排除了细菌菌栓对 BBB 损害的影响，又模拟了常见的感染状态，特别是细菌感染早期，此时菌血症尚未完全形成，但细菌内毒素已释放入血，引起了一系列的病理生理改变，包括作用于 BBB，增加其通透性。这可能为后续的细菌颅内感染创造了一定的条件。本实验显示，给予 LPS 后不同时间，脑组织含水量和 EB 含量明显升高。正常情况下，EB 入血后几乎完全与血浆白蛋白结合，并持续数小时存在于血液中而不能透过 BBB，只有在 BBB 损害时，EB－白蛋白复合物才能进入脑内。本实验中脑组织 EB 含量明显增加，为对照组的 1.21～1.57 倍，提示 BBB 受到破坏，加之脑含水量的增加，进一步说明 LPS 可损伤 BBB，增加其通透性，导致脑水肿的形成。这与文献报道的结果基本一致[8]。邝芳等人也发现，即使静脉给予小剂量 LPS（250μg/kg）也可降低大鼠 BBB 的开放阈[9]。体外实验也证实 LPS 可增加脑血管内皮细胞的通透性[2]。

电镜改变是判断脑水肿的主要标准之一。本实验改变显示，LPS 所致的脑水肿为混合性脑水肿：既有毛细血管损害为主的血管源性脑水肿又有神经细胞损害为主的细胞毒性脑水肿。说明已成功地复制了幼年内毒素性脑水肿模型。其方法简单，重复性好。

3.2 Ca^{2+}、CaM 与脑水肿

Ca^{2+} 是重要的细胞内信使之一，神经细胞内适当浓度的游离 Ca^{2+} 对维持正常的生理生化过程起着十分重要的作用[10,11]。在多种病理过程中，Ca^{2+} 也起着十分重要的作用。本研究同时探讨导致脑内上述组织病理和病理生理改变的细胞生物学基础。结果表明，LPS 可引起脑组织细胞内 Ca^{2+} 浓度明显升高和 CaM 表达显著增强。

在本实验中，将 LPS 注入大鼠腹腔内仅 2h，脑组织细胞内 Ca^{2+} 浓度即逐渐增加，并持续达 24h。这与文献报道 LPS 引起神经元内 Ca^{2+} 浓度增加相符[12]。大量研究显示，细胞内 Ca^{2+} 超载可导致细胞能量代谢障碍，质膜离子泵失效，质膜通透性增高，引起细胞肿胀，导致细胞毒性脑水肿[13]；还可激活 Ca^{2+}－钙结合蛋白，促使细胞内 Ca^{2+} 依赖性路径酶等磷酸化，产生具有细胞毒作用的活性物质，包括自由基等，并损害细胞骨架和膜结构，导致内皮细胞膜损伤[14,15]，也可使内皮细胞收缩，血管内皮细胞间隙增大，BBB 通透性增高，从而导致血管源性脑水肿。

CaM 是脑组织中最主要的一种 Ca^{2+} 结合蛋白，Ca^{2+} 发挥生物学作用主要是通过与细胞内特异性钙结合蛋白结合。细胞内游离的 CaM 本身并不具有酶活性，但一旦与超载的胞内 Ca^{2+} 结合，CaM 即被激活，从而与细胞内各种 CaM 结合蛋白相互作用，进一步加重细胞内 Ca^{2+} 超载及细胞能量代谢障碍，这不仅加重脑水肿过程，甚至导致脑水肿后迟发性神经元死亡[16]。本研究中，LPS 致胞内 Ca^{2+} 明显超载和脑组织中 CaM 表达增强，均是大鼠发生脑水肿的重要细胞生物学基础。

参 考 文 献

[1] Boulton IC, Gorringe AR, Shergill JK, et al. A dynamic model of the meningococcal transferrin receptor[J]. J Theor Bi-

维普资讯 http://www.cqvip.com

ol,1999;198(4):497－505.

[2] De Vries HE, Blom Roosenialen MC, de Bore AG, et al. Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996; 277(3):1418－1423.

[3] 尹 飞,杨于嘉,虞佩兰,等.百日咳菌液诱发大鼠脑水肿对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.

[4] Rosenberg GA. Ischemic brain edema[J]. Prog Cardiovasc Dis,1999;42(3):209－216.

[5] 信照亮,吕 健,段国荣,等.局部应用地塞米松对创伤性脑水肿及血脑屏障通透性的影响[J].中华实验外科杂志,1997;14(6):355－356.

[6] Lothar Schilling, Michael Wahl. Brain edema: Pathogenesis and therapy[J]. Kidney Int,1997;51(59):69－75.

[7] 张育才,张宇鸣,汤定华,等.家兔内毒素性脑水肿降钙素基因相关肽的表达[J].中华儿科杂志,1999;37(10):601－603.

[8] Xaio h, Banks WA, Niehoff ML, et al. Effects of LPS on the permeability of the blood－brain barrier to insulin[J]. Brain Res,2001;896(1－2):36－42.

[9] 邝 芳,王百忍,鞠 躬.静脉注射脂多糖和小剂量肾上腺素后血脑屏障的开放[J].第四军医大学学报,2000;21(1):83－85.

[10] Stanley EF. Presynaptic calcium channels and the depletion of synaptic cleft calcium ions[J]. J Neurophysiol,2000;83(1):477－482.

[11] Starikova AM, Pogorelaya NC, Kostyuk PG. Long－term depolarization changes morphological parameters of PC12 cells[J]. Neuroscience,2000;95(3):923－926.

[12] Hou. L, Wang X. PKC and PKA, but not PKG mediate LPS－induced CGRP release and [Ca^{2+}](i) elevation in DRG neurons of neonatal rats[J]. J Neurosci Res,2001;66(4):592－600.

[13] Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, et al. Role and mechanims of secondary mitochondrial failure[J]. Acta Neurochir Suppl,1999;73(1):7－13.

[14] Morioka M, Hamada JI, Ushio Y, et al. Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury[J]. Prog Neurobiol,1999;58(1):1－30.

[15] Ray SK, Fidan M, Nowak MW, et al. Oxidative stress and Ca^{2+} influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells[J]. Brain Res,2000;852(2):326－334.

[16] Miyazaki H, Tanaka S, Fujii Y, et al. Neuroprotective effects of a dihydropyridine derivative, 1,4－dihydro－2,6－dimethy 1－4－(3－nitrophenyl)－3,5－pyridinedicarboxylic acid methyl 6－(5－phenyl－3－pyrazolyloxy)hexyl ester (CV－159), on rat ischemic brain injury[J]. Life Sci, 1999; 64(10):869－878.

(上接第 48 页)实验中 S_1 与 Fa 的差异可能与细胞粘附面积及细胞半径的差异有关。

参 考 文 献

[1] Weiss L, Dimitrow DS. A fluid mechanical analysis of the velocity, adhesion, and destruction of cancer cells in capillaries during metastasis[J]. Cell Biophysics,1984;6:9－22.

[2] 吴泽志.烧伤大鼠粒细胞与内皮细胞粘附力学特性的研究[J].生物医学工程学杂志,1996;13(3):219－222.

[3] 龙 勉,吴泽志.肝细胞粘弹性实验研究[J].生物物理学报,1996;12(1):169－172.

[4] 袁孔华,郭实土.卡介菌多糖核酸对膀胱癌患者细胞免疫功能的影响[J].中华实验外科杂志,1993;10(3):126－127.

[5] Rees DA, C. W, Loyd, et al. Control of grip and stick in cell adhesion through lateral relationships of membrane glycoproteins[J]. Nature(Lond),1977;267:124－128.

[6] Nicolson GL. Molecular mechanisms of cancer metastasis: tumor and host properties and the role of oncogenes and suppressor genes[J]. Curr Opin Oncol,1991;3:75－92.

[7] Sung PAV, L K－L, kuhlman P, et al. Force contribution of the LFA－1/ICAM－1, complex to T Cell adhesion[J]. J Cell Sci,1992;103:259－266.