DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.016
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)11-0981-03

论著

氟桂利嗪对大鼠脑出血后脑细胞内游离钙的影响

李 玲,陈康宁,陈福明 (第三军医大学西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 观察氟桂利嗪对脑出血不同时点脑细胞内游离钙的影响。方法 采用胶原酶法制备大鼠脑出血模型,利用Fura-2/AM法测定脑出血后各时点脑细胞[Ca^{2+}]i浓度,同时观察氟桂利嗪对上述指标影响。结果 ①脑出血后0.5 h细胞内游离Ca^{2+}浓度开始增高,6 h急剧增高,24 h达高峰,72 h开始降低,120 h明显降低。②氟桂利嗪能明显降低脑出血早期Ca^{2+}浓度。结论 氟桂利嗪降低Ca^{2+}过量跨膜进入细胞内,减轻脑组织的病理损害,对脑出血后神经元损伤有一定保护作用。

关键词:氟桂利嗪;Ca^{2+};实验性脑出血;Fura-2/AM
中图法分类号:R743.34 文献标识码:A

Effects of flunarizine on the intracellular free calcium concentration in acute intracerebral hemorrhage in rats

LI Ling, CHEN Kang-ning, CHEN Fu-ming (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of flunarizine on the intracerebral hemorrhage (ICH) of Wistar rats at different time points. Methods An ICH rat model was established by collagenase. The concentrations of intracellular free Ca^{2+} at different time points after ICH were determined by the fluorescence detector with an indicator, Fura-2/AM. The effects of flunarizine on the concentrations at different time points were also observed. Results The concentration of intracellular free Ca^{2+} began to increase at 0.5 h, increased significantly at 6 h, and peaked at 24 h (about 4 folds as high as that before hemorrhage), but began to decrease at 72 h after acute intracerebral hemorrhage. Flunarizine decreased the concentration of intracellular free Ca^{2+} significantly ($P<0.01$). Conclusion Flunarizine can inhibit the excessive flow of calcium into the brain cell and decrease intracellular free Ca^{2+} concentration in ICH rats, suggesting that flunarizine may have the protective effect on the injured brain cells after ICH.

Key words: flunarizine; Ca^{2+}; experimental intracerebral hemorrhage; Fura-2/AM

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是神经系统的常见病,是影响人类生存及生存质量的最严重的疾病之一。然而我们对脑出血引起的神经元损伤的机制几乎一无所知,对脑出血的治疗仅停留在脱水的基础上,所以对脑出血的病理生理变化及脑细胞保护剂的研究尤为重要。近年来国内外资料表明:脑出血血肿周围存在局部脑血流下降[1];而脑缺血后导致的Ca^{2+}超载在脑组织损伤中起重要作用。因而钙拮抗剂正逐渐被应用于脑出血的治疗。但因钙拮抗剂具有扩血管作用,既往被认为有加重出血之可能,故国内外钙拮抗剂治疗脑血肿的报道不多。本实验观察氟桂利嗪对大鼠脑出血后各时点细胞内游离Ca^{2+}影响,探讨氟桂利嗪对脑出血后神经元保护机制,为临床脑出血病理损伤过程中运用钙拮抗剂作为神经保护剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组

由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供的成年健康Wistar大鼠(雌雄不拘)66只,体质量180~220 g,随机分为:未出血对照组(PRE组),6只;脑出血组(ICH组)和氟桂利嗪组(ICH+flunarizine组),后两组观察时相点分别为出血后0.5、6、24、72、120 h,每组动物各6只,共10小组。

1.2 方法

1.2.1 脑出血模型制备 参照文献[2]方法,略加改动。健康大鼠术前禁食水,0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内麻醉。俯卧固定于脑立体定位仪上,去头皮正中切口,暴露前囟及冠状缝,选择胶原酶注射部位:前囟后0.5 mm、右3 mm、深度5.5 mm。微量注射器注入胶原酶Ⅳ 0.4 U和肝素4 U。头皮缝合。

基金项目:第三军医大学校管基金资助项目(2002)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2002)
作者简介:李 玲(1975-),女,山东省肥城市人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事脑出血血肿周围神经元损伤机制及保护方面的研究,现在解放军第44医院内二科。电话:(0851)3833271
通信作者:陈康宁,电话:(023)68765253
收稿日期:2003-11-24;修回日期:2004-02-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2 模型制备及给药方法 脑出血组及氟桂利嗪组均作脑出血模型。氟桂利嗪药粉用生理盐水配成1 mg/ml混悬液。出血前1 d及出血后5 d,每只大鼠1 mg/kg腹腔内注射给药,每日1次。

1.2.3 仪器和药品 Fura-2/AM(SIGMA公司)胰蛋白酶(SIGMA公司)F-2500荧光分光光度计(HITACHI公司),氟桂利嗪(西安杨森公司)。

1.2.3.1 脑细胞分离 参照文献[3]方法。大鼠断头,以不含钙镁的4 ℃Hank平衡盐溶液(HBSS)(Glucose 6、KCl 5、NaCl 137、Na_2HPO_4 0.3、HEPES 10 mol/L;pH 7.4)冲洗,去除小脑、脑干及分白质并仔细剥离脑膜、血管,再次以不含钙镁的4 ℃HBSS冲洗3次后剪碎,置于5 ml含胰蛋白酶0.125%(不含钙镁)的HBSS中于37 ℃消化15 min,以4 ℃的含10%牛血清HBSS(Glucose 6、$MgSO_4$ 1、KCl 5、NaCl 137、$CaCl_2$ 1、Na_2HPO_4 0.3、HEPES 10 mmol/L,pH 7.4)终止反应,组块以吸管轻轻吹打20次后过200目筛。滤液以2 000 r/min离心5 min,再以HBSS冲洗1次,最后细胞悬于HBSS中,台盼蓝排斥试验检查,细胞存活率在95%。

1.2.4 Fura-2/AM负载 参照文献[4]方法。取1.5 ml细胞悬液37 ℃预温5 min,加入终浓度为5 μmol/L的Fura-/AM(DMSO 1 mg/ml,分装保存),37 ℃恒温振荡45 min,负载后的细胞以HBSS洗1次,最后细胞悬于HBSS中,调整细胞到2×10^5个/ml分装数管,每次测钙浓度前再以HBSS离心(1 000 r/min)洗1次,然后于37 ℃复温5 min。

1.2.5 荧光测定 采用HITACHI公司的F-2500荧光分光光度计,测定前脑细胞悬液37 ℃预温2~3 min,首先测定温孵液的激发光谱(Fura-2/AM不与Ca^{2+}结合),其最大激发波长367 nm,然后测定负载后细胞悬液的激发波长,在340 nm处有一荧光高峰,说明Fura-2已负载进入细胞内。因此发射波长500 nm,激发波长340 nm和367 nm,两波长的最大荧光由加入终浓度为0.2%TritonX-100测得,最小荧光由加入终浓度为5 mmol/lEGTA(pH>8.5)测得。选择公式$[Ca^{2+}]i=Kd\times(F-Fmin)/(Fmax-F)$,Kd值=224 mmol/L。电脑软件自动计算,即$[Ca^{2+}]$值。

1.3 统计学处理

各组数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用医用统计SPSS软件进行t检验。

2 结果

脑损伤后脑细胞内游离Ca^{2+}浓度(表1):本实验分离的脑细胞$[Ca^{2+}]i$为(258.17±43.25) mmol/L,在文献[5]报道的范围之内。与正常组比较,出血后0.5 h $[Ca^{2+}]i$明显升高($P<0.01$),出血后6、24 h显著升高,72 h呈下降趋势,120 h明显下降但仍略高于正常组。氟桂利嗪组治疗后各时点$[Ca^{2+}]i$明显降低,有非常显著性差异($P<0.01$)。

表1 各组脑细胞游离钙浓度($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Intracellular free Ca^{2+} concentration in each group ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	PRE	ICH 0.5 h	ICH 6 h	ICH 24 h	ICH 72 h	ICH 120 h
PRE	262.47±58.28	—	—	—	—	—
ICH	—	504.20±90.57*	978.26±69.90*	1092.48±68.72*	823.59±46.25*	431.32±34.35*
ICH+SIBELIUM	—	283.71±45.84#	636.46±44.87#	541.94±44.31#	401.61±37.66#	211.90±29.83#

*: $P<0.01$, *vs* PRE; #: $P<0.01$, *vs* ICH

3 讨论

ICH最重要的病理改变是血肿本身及其周围继发性损伤。国内外的研究表明脑血肿局部存在血流量下降。Mayer等[6]在研究中发现ICH后数小时血肿周围脑血流量下降,出现明显缺血,血肿体积无明显变化,但平均水肿体积增加36%,血流缺损量容积平均下降55%,且CT水肿区多与SPECT灌注缺损区对应,证明病变周围缺血是造成脑水肿的重要原因之一。脑缺血缺氧致使脑血肿周围产生一系列病理生理变化,其中之一为胞内钙超载,机制可能为:①EAA受体(主要NMDA受体)被激活,Ca^{2+}通道开放;②离子稳态遭破坏,膜去极化,电压依赖性门控通道开放,导致胞内钙超载。

Ca^{2+}在信号转导通路中有着较为重要的作用,与神经细胞正常代谢和功能密切相关,在神经递质释放,酶活性调节及DNA的合成方面均起着重要作用。正常静息状态下细胞内游离钙浓度为$10^{-9}\sim10^{-7}$ mol/L,细胞外游离钙浓度为$10^{-3}\sim10^{-2}$ mol/L,二者相差5~6个数量级。故当胞浆钙异常升高时,受调节的磷脂酶、蛋白酶、核酸内切酶等被激活,同时促进血小板聚集,导致磷酸分解和细胞骨架被破坏,使细胞产生不可逆损伤。总之细胞内外钙离子浓度梯度的破坏是导致细胞死亡的最终共同通路。

脑出血后,血肿周围缺血区内神经细胞的钙离子聚集引起脑损害,是引起血肿周围水肿的原因之一。胞内钙超载可激起连锁反应导致脑水肿[7],其机制可能为:①Ca^{2+}沉积于线粒体干扰磷酸化过程,氧化代谢异常,自由基产生过多。清除自由基的各类酶的活性下降,自由基不能被及时清除而产生氧化反应,促使脑水肿发生和发展。②细胞内Ca^{2+}增多,干扰氧化磷酸化过程,葡萄糖氧化代谢紊乱,转向无氧糖酵解,产生大量乳酸,引起酸中毒,从而加重了脑水肿。③细胞内Ca^{2+}超载,氧化磷酸化受干扰,ATP生成不足,Na^+ K^+ ATP酶活性下降,Na^+进入细胞内,水钠潴留,产生细胞水肿。④Ca^{2+}大量进入细胞内,膜磷脂代谢障碍,产生大量不饱和脂肪酸,后者和氧自由基发生反应,膜脂质过氧化,影响膜的通透性及离子转运,促使脑水肿发

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生。⑤脑血管内皮细胞 Ca^{2+} 内流, 内皮细胞收缩, 内皮间隙扩大, 血脑屏障开放, 产生血源性脑水肿。⑥脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 超载, 致血管痉挛, 血管阻力增加, 血肿周边缺血、缺氧加重, 血肿周围区域细胞坏死增多, 水肿带扩展。同时既往研究表明: 钙超载可以通过损害线粒体结构、功能, 激活蛋白酶、蛋白激酶, 引起血管收缩, 促进兴奋性氨基酸释放, 促进自由基生成等途径导致神经元死亡[8]。

氟桂利嗪(商品名为西比灵)为双苯哌嗪类化合物, 是第 4 代钙离子拮抗剂, 已普遍应用于临床治疗眩晕、偏头痛及缺血性脑梗塞等疾病, 其疗效已得到肯定性证实。近年来对脑出血应用氟桂利嗪做为脑保护剂治疗已受到广泛重视。氟桂利嗪被认为是钙通道阻滞剂中唯一能通过血脑屏障的药物。其药理作用主要是通过维持细胞内重要的离子调控, 从而阻止了细胞内 Ca^{2+} 超载, 除阻断电压依赖性钙通道外, 还可阻断电压依赖性钠通道, 且对心脏收缩和传导无影响, 不导致血压降低或缺血现象。李光勤等[9] 建立大鼠脑出血模型, 采用第 2 代钙通道阻滞剂——尼莫地平干预, 发现血肿体积不增加, 出血周围血区明显缩小。其机制可能与尼莫地平扩张脑血管、增加脑血流及阻滞钙内流、减轻脑损害有关。本实验结果显示氟桂利嗪治疗后血肿周围 Ca^{2+} 浓度明显降低, 与血肿组比较有非常显著差异($P<0.01$)。表明氟桂利嗪能阻断病理状态下 Ca^{2+} 过度内流, 从而推测可以减轻 Ca^{2+} 过度内流造成的细胞损害过程, 同时, 氟桂利嗪可选择性扩张小血管, 解除血管痉挛, 改善血循环, 从而可以促进神经功能的恢复, 保护脑细胞减轻脑水肿均有明显效果, 故早期应用钙拮抗剂可能将改善脑血肿周围脑组织的预后。

但脑出血后脑缺血损害是一个复杂的病理生理过程, 动物实验和临床实践也存在差距, 国外有报道, 缺血性损害与动物模型建立方式有一定关系, 而且临床实际工作中, 出血前用药不可能, 出血后使用钙拮抗剂时间窗的问题仍在探索中, 故仍需进一步加强临床应用钙拮抗剂的研究。

参考文献:

[1] Villar C, Krieger D, Mullani N, *et al*. Hypometabolism and ischemic penumbra surrounding intracerebral hemorrhage in human demonstrated by positron tomography[J]. Stroke, 1997, 28: 254.

[2] Rosenberg G A, Mun Bryce S, Wesley M, *et al*. Collagenase-induced intrecerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21(5): 801－807.

[3] 曹云鹏, 李　智, 董　汉, 等. 成年大鼠脑细胞内钙的测定[J]. 中国医科大学学报, 1998, 27(3): 290－292.

[4] 陈立华, 杨于嘉, 何正文. Fura-2/AM 法测定突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的方法[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 375－378.

[5] Hartmann H, Muller W E. Age-related changes in receptor-mediated and depolarization-induced phosphatidylinositol turnover in mouse brain[J]. Brain Res, 1993, 622(1-2): 86－92.

[6] Mayer S A, Lignelli A, Fink M E, *et al*. Perilesional blood flow and edema foemation in acute intracerebral hemorrhage: a SPECT study[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1791－1798.

[7] 韦志益, 何宁宇, 梁延生, 等. 氟桂利嗪对实验性脑血肿继发脑水肿的治疗研究[J]. 临床神经病学杂志, 2001, 14(4): 244－245.

[8] 陈康宁, 董为伟. 灯盏花注射液对脑缺血损伤的防治研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(11): 684－686.

[9] 李光勤, 董为伟. 尼莫地平对大鼠脑出血周围缺血面积及 MPO 活性影响的初步报告[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1999, 25(1): 58－59.

(编辑　张大春)

(上接 980 页)

乙基铅并可抑制脑内单胺氧化酶, 对海马细胞中神经丝等细胞骨架蛋白起破坏作用[3], 并使中枢神经系统的细胞内类脂平衡障碍, 皮层或皮层下结构功能受损, 皮层兴奋抑制平衡失调引起脑电图改变[4]。本研究所观察 6 例患者符合上述损害部位及其表现特征。三乙基铅对球结膜、呼吸道粘膜具有刺激作用。心脏、肝、肾、骨髓等器官也可受损。四乙基铅可干扰合成血红蛋白的酶, 导致卟啉代谢异常, 血红蛋白合成减少。心电图窦性心动过缓可能与四乙基铅能引起迷走神经张力增高有关[5]。2 例重症患者肌酶谱及脑电图显著异常, 所以密切监测其改变有助于病情及预后判断。

急性四乙基铅中毒的治疗首先应用解毒剂及排毒药物, 巯乙胺为四乙基铅中毒较好的解毒剂。依地酸钙钠有驱铅作用, 有文献报道对四乙基铅中毒效果欠佳。本组 5 例中毒患者选取依地酸钙钠驱铅及人体白蛋白非特异性排毒治疗有一定疗效, 应用后尿排铅量明显增高。1 例患者因当时诊断不明确没有特异性及非特异性排铅治疗, 中毒 15 d 后死亡。对重症患者镇静、止痉和防治脑水肿等对症治疗是成功的关键, 及时给予脱水剂或糖皮质激素, 躁动或阵挛应使用足量镇静剂, 必要时行人工冬眠治疗。还要注意营养和支持治疗如保肝、预防感染、电解质、水盐平衡。

关键词: 四乙基铅; 急性中毒; 临床表现
中图法分类号: R595.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Umit T, William J, Clericib O. Differential ototoxicities induced by lead acetate and tetraethyl lead[J]. Hearing Research, 2002, 166(1-2). 113－123.

[2] 王世俊, 史志澄, 刘镜愉, 等. 临床职业病学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994. 131.

[3] 何凤生, 王世俊, 任引津. 中华职业医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 227－230.

[4] 王　莹, 顾祖维, 张胜年, 等. 现代职业医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 683.

[5] 俞永熹. 420 例四乙基铅汽油作业工人心电图观察[J]. 中国职业医学, 1986, 13(4): 17－18.

(编辑　栾　嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net