DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.016

论著

文章编号:1000-5404(2003)03-0222-04

严重烫伤大鼠海马NMDA受体活性变化的机制研究

陆建华[1],党 健[2],黎海蒂[1],高京生[3],赵邦云[1],熊加祥[1] ([1]第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]兰州军区乌鲁木齐总医院干部病房,乌鲁木齐 830000;[3]第三军医大学防原医学教研室、预防医学系全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究严重创伤对海马NMDA受体(NR)活性的影响及其相关机制,为设法调节NR的活性从而控制创伤后HPA轴的过度兴奋提供实验依据。方法 以大鼠背部30%TBSA Ⅲ度烫伤作为严重创伤过度应激模型,利用放射配基结合法检测烫伤后海马NR活性(最大结合容量及亲和力)的变化;Western-blot+免疫共沉淀方法检测烫伤海马NR1、NR2A、NR2B酪氨酸磷酸化的改变;高效液相色谱方法检测烫伤海马谷氨酸含量的变化。结果 严重烫伤后0.5、1、2、4、8、24、48 h海马NR的亲和力显著增加,尤以烫伤后2 h最为明显,最大结合量从1 h起亦显著增加;各时相点海马酪氨酸磷酸化NR1、磷酸化NR2A及磷酸化NR2B蛋白水平皆显著增高;烫伤后0.5、1、2、4 h,海马内谷氨酸释放量增加非常明显,伤后24 h及48 h无明显变化。结论 严重烫伤导致海马NR持续过度激活;NR酪氨酸磷酸化水平的增加是其过度激活的重要原因,谷氨酸释放量的变化可能不是其持续激活的主要因素。

关键词:烧伤;应激;海马;NMDA受体;磷酸化;谷氨酸
中图法分类号:R338.26;R392.11;R644.02 文献标识码:A

Study of mechanisms of the changes of hippocampal NMDA receptor activity in rats after severe scald burn

LU Jian-hua, DANG Jian, LI Hai-di, GAO Jing-sheng, ZHAO Bang-yun, XIONG Jia-xiang (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of hippocampal NMDA receptor activity in rat after scald burn stress and the related mechanisms. Methods Adult male Wistar rats were inflicted with 30% TBSA full thickness scalding (burn), which was applied as severe trauma stress model. The hippocampal NMDA receptor activity, tyrosine phosphorylation level and hippocampal glutamate content were detected by radio-ligand binding assay, immunoprecipitation + Western-blot and high performance liquid chromatography methods in burn rats, respectively. Results Kd value of hippocampal NMDA receptor decreased significantly in rats at 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h, and 48 h after burn, but the change was most significant at 2 h. Receptor maximal binding capacity (B_{max}) was markedly elevated from 1 h to 48 h, especially at 2 h. Tyrosine phosphorylated protein of NMDA receptor 1 increased markedly at 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 h after burn, and that of NMDA receptor 2A and 2B also increased in these time-point burn groups. Glutamate content in hippocampus increased at 0.5, 1, 2, 4 h, but decreased to normal level at 24 h and 48 h. Conclusion The burn-induced hyperactivation of hippocampal NMDA receptor may be resulted from enhanced tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits.

Key words: burn; stress; hippocampus; NMDA receptor; phosphorylation; glutamate

严重创伤往往导致过度的应激反应,其主要表现形式之一就是下丘脑-垂体-肾上腺轴(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA轴)的亢进。HPA轴的亢进可导致机体免疫麻痹,诱发系统性炎性反应综合症(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。近年来,海马NMDA受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NR)在HPA轴亢进中的作用倍受重视。然而,严重创伤对海马NR活性的影响及其机制仍不清楚。本研究以大鼠背部30%TBSA Ⅲ度烫伤作为严重创伤过度应激模型,研究了严重烫伤后海马NR活性的变化。NR活性的变化既可能是细胞内因素的作用,如NR各亚型蛋白磷酸化水平的变化[1],也可能是细胞外因素的作用,如配体(谷氨酸)含量的变化等。海马内NR的亚型主

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
作者简介:陆建华(1966-),男,江苏省南通市人,博士,主治医师,主要从事创伤应激不良发生机制方面的研究。电话:(023)68752254
通信作者:黎海蒂,电话:(023)68752253
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-11-16

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

要有NR1、NR2A、NR2B。我们从谷氨酸含量的变化及这些亚型的酪氨酸磷酸化的变化着手, 初步探寻了NR活性变化的可能机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

^{3}H-MK801(7.68×10^{11} Bq/mmol)由上海原子核研究所标记, 磷酸酪氨酸单抗及抗NR1、NR2A、NR2B单抗为Santacruz公司产品, Protein-A-Sepharose为pharmacia公司产品, Leupeptin为Sigma公司产品, 生物素标记的羊抗兔IgG、辣根酶标链酶卵白素为北京中山公司产品。

1.2　动物分组

本校实验动物中心提供的Wistar大鼠64只随机分为对照组(n=8)、烫伤后0.5、1、2、4、8、24、48 h组, 每个时相点8只动物。烫伤组动物背部剃毛, 以剃毛区浸入90℃开水10 s造成30%TBSA Ⅲ度烫伤; 对照组动物背部剃毛后浸入37℃温水10 s作为对照。放射配基结合法检测烫伤后海马NR活性(最大结合容量及亲和力)的变化, Western-blot+免疫共沉淀方法检测各组海马NR1、NR2A、NR2B酪氨酸磷酸化的改变; 高效液相色谱方法检测各组海马谷氨酸含量的变化。

1.3　严重烫伤后海马NR最大结合容量及亲和力的测定[2]

动物断头活杀取海马, 置于预冷的含0.3 mol/L蔗糖的Tris-醋酸缓冲液中, 匀浆, 4℃离心(5 000×g)10 min, 取上清, 再4℃离心(27 000×g)15 min, 将沉淀悬浮于10 ml 150 mmol/L Tris醋酸缓冲液中, 调整蛋白浓度至100~200 μg/100μl。测定管中加入100μl含膜制备的稀释液, 在非特异性结合管中加入100μl 20 μmol/L非标记的MK801和100μl缓冲液, 每测定管均加入3.7×10^4 Bq的^{3}H-MK801, 30℃水浴孵育30 min, 反应结束后加入预冷的50 mmol/L Tris-醋酸缓冲液50μl, 在纤维素滤膜上抽滤, 将纤维素滤膜置于闪烁杯中, 75℃烘箱烤干后加入7 ml甲苯闪烁液, 以液体闪烁计数仪测定^{3}H放射性活度, 样本蛋白含量采用Lowry′s方法, NR的活性由Rosenthal HE软件直接计算出。

1.4　各组海马NR1、NR2A、NR2B酪氨酸磷酸化水平的检测

组织总蛋白的提取: 各时相点动物断头活杀, 迅速取海马置于匀浆器中, 按1∶10加入匀浆缓冲液(mmol/L: 50 MOPS, 0.2 DTT, 100 KCl, 0.5 $MgCl_2$, 0.5 Na_3VO_4, 0.1 EDTA, 1 EGTA, 0.5 abain, 以及50 μg/ml Leupeptin, 5 μg/ml Pepstain和0.32 mol/L Sucrose)高速匀浆, 800×g离心10 min, 取上清液, Lowry法蛋白定量。免疫沉淀: 样品蛋白200 μg, 加入SDS和二硫代苏糖醇(DTT)至终浓度分别为0.5%和1 mmol/L, 煮沸5 min后, 用Buffer B(20 mmol/L Mops pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.2 mmol/L sodium orthovanadate, 0.2 mmol/L PMSF)稀释4倍, 加入磷酸酪氨酸单抗2.5 μg及其它抗体, 4℃, 轻轻摇动4 h, 加入Protein-A-Sepharose继续摇动4 h, 离心, 沉淀再用Buffer B洗涤3次, 沉淀加2.5倍浓度的上样缓冲液, 煮沸10 min, 离心取上清, 7.5% SDS-PAGE电泳。Western-blot: 40 μg总蛋白上样, 以湿转法电转移至PVDF膜上, 转移完毕后, 将PVDF膜浸入封闭液, 4℃过夜, 加入用封闭液稀释的一抗(1∶1 000 NR1或NR2A、NR2B单抗,), Buffer A(10 mmol/L Tris, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 0.1 Tween 20)洗膜10 min×3次, 加入二抗(1∶300的生物素标记的马抗羊或羊抗兔IgG,), Buffer A洗膜3次, 加入3抗(1∶300辣根酶标记链酶卵白素), Buffer A洗膜3次, 最后将膜放入DAB溶液中显色。将PVDF膜上的目的蛋白条带在Gel Doc 2000凝胶成像系统上分析处理, 磷酸化蛋白量以ODu×面积表示。

1.5　高效液相色谱方法检测海马组织谷氨酸含量

冰盘上切取海马, 称重后用10%磺基水杨酸钠溶液2 ml冰浴匀浆, 1 000×g离心15 min, 取上清, 将上清液定容为2 ml, HPLC分析系统检测, 磷酸二甲苯等柱前衍生, 柱长26 cm, 柱温37℃, 流动相为30%甲醇/磷酸缓冲液。

1.6　统计学处理

实验所获数据以$\bar{x}\pm s$表示, 利用SPSS 10.0统计软件对组间数据进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　严重烫伤后海马NR最大结合容量及亲和力的变化

与对照组相比, 大鼠严重烫伤后0.5、1、2、4、8、24、48 h海马NR最大结合容量(B_{max})分别比对照组增加7.6%($P>0.05$)、18.9%($P<0.05$)、26.7%($P<0.05$)、22.4%($P<0.05$)、24.6%($P<0.05$)、19.9%($P<0.05$)、22.1%($P<0.05$)。NR解离常数Kd值分别减小27.6%($P<0.05$)、25.8%($P<0.05$)、42.8%($P<0.01$)、39.1%($P<0.01$)、31.3%($P<0.05$)、29.6%($P<0.05$)、30.2%($P<0.05$), 以烫伤后2 h最为明显, 见表1。

表1　烫伤对海马NR B_{max}及Kd值的影响(n=8, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of burn on B_{max} and Kd of NR (n=8, $\bar{x}\pm s$)

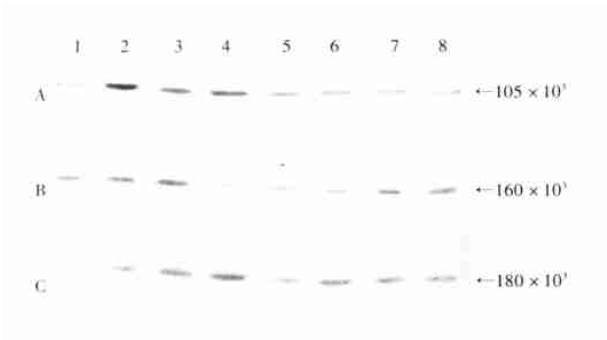
Group	B_{max} (fmol/mg)	Kd(nmol/L)
Control	128.5±18.6	0.671±0.033
0.5 h	138.3±22.6	0.486±0.031 *
1 h	152.7±12.6 *	0.499±0.045 *
2 h	162.8±15.5 *	0.364±0.021 **
4 h	157.2±16.2 *	0.409±0.026 **
8 h	160.1±21.6 *	0.461±0.091 *
24 h	154.0±23.9 *	0.472±0.099 *
48 h	156.9±24.2 *	0.468±0.084 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control

2.2　NR1、NR2A、NR2B酪氨酸磷酸化水平的变化

利用免疫共沉淀+Western-blot方法, 分别得到了大鼠分子量约为105×10^{3}的磷酸化NR1、分子量约为160×10^{3}的磷酸化NR2A及分子量约为180×10^{3}的磷酸化NR2B蛋白条带, 见图1, 条带在Gel Doc 2000凝胶成像系统上分析处理后发现: 与对照组相比, 大鼠烫伤后各时相点磷酸化NR1、磷酸化NR2A及磷酸化NR2B均显著增加, 尤其以烫伤后2 h最为明显, 见图2。

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



A: p-NR1; B: p-NR2A; C: p-NR2B; 1: Control; 2: 0.5 h group; 3: 1 h group; 4: 2 h group; 5: 4 h group; 6: 8 h group; 7: 24 h group; 8: 48 h group

图1 各组磷酸化NR1、磷酸化NR2A及磷酸化NR2B蛋白条带

Fig 1 Blot Band of p-NR1, p-NR2A, p-NR2B protein in each group after burn

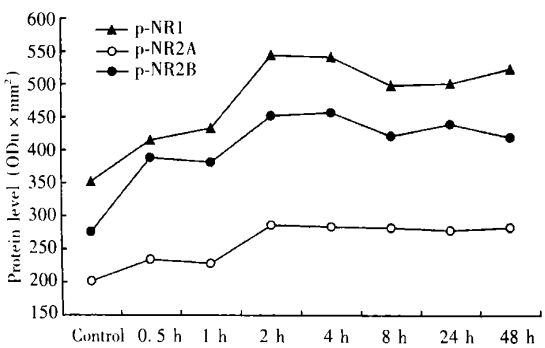


图2 烫伤对海马p-NR1, p-NR2A以及p-NR2B蛋白水平的影响

Fig 2 Graph representing p-NR1, p-NR2A and p-NR2B levels in hippocampus of burn rat

2.3 海马内谷氨酸含量的变化

严重烫伤后0.5、1、2、4 h, 海马内谷氨酸释放量增加非常明显, 分别比对照组增加59.8%($P<0.01$)、48.3%($P<0.01$)、49.5%($P<0.01$)、39.7%($P<0.01$), 烫伤后8 h($P<0.05$), 谷氨酸的含量即有所回落, 烫伤后24 h及48 h谷氨酸含量已和正常大鼠无明显差异, 见表2。

表2 烫伤后海马组织谷氨酸含量的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of glutamate content in rat hippocampus after burn($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Glutamate content(W_{Glu}/mg·g^{-1})
Control	8	8.2±0.9
PBH 0.5	8	13.1±1.3**
1	8	12.1±0.8**
2	8	12.3±1.0**
4	8	11.4±0.9**
8	8	9.2±0.8*
24	8	8.8±1.5
48	8	8.5±1.4

PBH: Post-burn hour; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control

3 讨论

NR是兴奋性神经递质谷氨酸的离子型受体。NR通道开放时, 主要介导阳离子内流, 尤其是Ca^{2+}的内流。NMDA和谷氨酸是NR的激动剂。NR参与兴奋性突触传递、神经递质释放、突触长时程增强等生理活动, 其过度激活还参与一系列病理过程[3]。Regner等[4]发现, 脑创伤可导致NR的最大结合量B_{max}显著增加, 亲合力显著上升。那么, 作为一种不直接导致脑损害的严重烫伤对脑尤其是海马NR活性影响如何仍不清楚。我们的研究显示, 大鼠严重烫伤后0.5、1、2、4、8、24、48 h NR Kd值显著下降, 2 h组下降最为明显。由于Kd值与受体的亲和力呈反比, 表明严重烫伤后海马NR的亲和力显著增加, 尤以烫伤后2 h最为明显。另外, 大鼠烫伤后1、2、4、8、24、48 h B_{max}显著增加。这些结果都说明严重烫伤可造成海马NR的持续过度激活。

分子克隆显示NR的亚型有: 1种NR1、4种NR2(NR2A-2D), 海马是NR的富含区域, NR的这几种亚型在海马皆有表达, 但以NR1、NR2A及NR2B为主, NR2D很少。NR为3或5跨膜结构, NR1是NR的功能亚单位, NR2A及NR2B是NR的调节亚单位, NR的C-末端在胞内。C-末端区存在多种蛋白激酶磷酸化位点, 此为NR的磷酸化和去磷酸化调节提供了结构基础。研究证明NR C-末端可以被酪氨酸蛋白激酶(Protein tyrosine kinase, PTK)磷酸化[5,6]。实质上, 目前已经提出: 在对NR活性调控的因素中, 各种蛋白激酶对NR胞内C-末端的磷酸化调节是其活性调节的主要方式。本研究表明, 烫伤后各时相点海马酪氨酸磷酸化NR1、磷酸化NR2A及磷酸化NR2B蛋白水平显著增高, 这表明严重烫伤可使海马NR主要亚单位的磷酸化水平持续升高。NR1 C-末端磷酸化时, 可解除Mg^{2+}对NR阻断, 促进Ca^{2+}通过NR通道内流, NR2A及NR2B作为调节亚单位, 其磷酸化的增强, 可通过变构效应, 促进功能亚基NR1通道Ca^{2+}的内流。总之, NR磷酸化时, 通道激活, 去磷酸化时, 通道失活, 因此, 严重烫伤导致的NR1及NR2A、NR2B的磷酸化将促进NR的激活, 因而是烫伤后NR持续过度激活的重要原因。

作为一种离子通道受体, NR活性具有明显的可调控性, 神经科学目前的一大热点就是通过调控NR的活性来调控某些病生反应。调节NR通道的活性, 使用NR通道拮抗剂固然不失为一个有力的措施, 但是这些拮抗剂本身毒性尚需进一步考虑, 为解决此矛盾, 许多人提出通过控制NR磷酸化状态, 从而控制该通道的活性, 进而控制某些病理变化[7]。既然严重烫伤导致NR的磷酸化是烫伤后海马NR激活的重要原因, 而海马NR的激活又与HPA轴的兴奋性密切相关, 则

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

提示我们：通过调节 NR 的磷酸化来调节 NR 的活性，可能有助于调节创伤后 HPA 轴的兴奋性、促进机体稳态的恢复，此有待于进一步证明。

谷氨酸是 NR 的激动剂，谷氨酸释放的增加自然将激活 NR，促使 Ca^{2+} 通过 NR 通道内流。我们的实验发现，严重烫伤后 0.5、1、2、4 h，海马内谷氨酸释放量增加非常明显，这说明，谷氨酸释放的增加是严重烫伤早期海马 NR 激活的重要原因。我们的研究还显示，烫伤后 8 h，谷氨酸的含量即有所回落，烫伤后 24 h 及 48 h 谷氨酸含量已和正常大鼠无明显差异，然而，此时海马 NR 依然处于激活状态，这说明谷氨酸的释放可能不是烫伤大鼠 NR 持续激活的主要因素。

参考文献：

[1] Takagi N, Shinno K, Teves L. Transient ischemia differentially increases tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits 2A and 2B[J]. Neurochem, 1997, 69(3): 1060－1065.

[2] Stecher J, Muller W E, Hoyer S. Learning abilities depend on NMDA-receptor density in hippocampus in adult rats[J]. Neural Transm, 1998, 105(10-12): 1341－1350.

[3] Liu Y, Zhang J. Recent development in NMDA receptors[J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(10): 948－956.

[4] Regner A, Alves L B, Chemale I. Neurochemical characterization of traumatic brain injury in humans[J]. Neurotrauma, 2001, 18(8): 783－792.

[5] Moon I S, Apperson M L, Kennedy M B. The major tyrosine-phosphorylated protein in postsynaptic density is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(9): 3954－3958.

[6] Wang Y T, Salter M W. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases[J]. Nature, 1994, 369(6477): 233－235.

[7] Parsons C G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain [J]. Eur J Pharmacol, 2001, 429(1-3): 71－78.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2003)03-0225-01

个案与短篇

聚丙烯酰胺凝胶乳房充填术的并发症及处理

Management of the complications due to polyacrylamide hydrogel injection for augmentation mammoplasty

孙志成，李世荣，毋巨龙 （第三军医大学附属西南医院整形中心，重庆 400038）

聚丙烯酰胺凝胶（HPAMG）作为一种稳定的生物充填材料在整形美容领域广泛应用于乳房充填术。然而由于手术操作引发的并发症在临床中屡见不鲜[1]。我科自 1999 年以来收治的采用聚丙烯酰胺凝胶进行乳房充填术引起的各类并发症 62 例。现报告如下。

1 临床资料

本组 62 例，其中感染 12 例；硬结 11 例；材料漏出 11 例；血肿 10 例；乳房不对称 8 例；创伤性无菌性炎症 5 例；胸大肌炎 5 例。

2 并发症及其防治

2.1 感染

术后 2～3 d 局部表现为红、肿、热、痛，乳房有明显压痛，多伴有注射针孔渗出。主要因为术中消毒不严格，乳房本身有急慢性炎症等禁忌症。一旦感染形成，应积极用抗生素治疗，全部抽出凝胶，冲洗，负压引流，适当加压包扎。治愈后 3～6 个月可重新注射。

2.2 血肿

术后乳房体积增大，逐渐出现乳房胀痛，皮下瘀斑。乳腺后间隙的血管穿支管径非常细[2]，故穿刺针头直接损伤血管的可能性极小。血肿的产生主要是注射量过大或手术动作粗暴导致乳腺后间隙内软组织撕裂伤，造成毛细血管断裂。其次 HPAMG 对已断裂血管内血液有虹吸作用。另外在月经期或有凝血机能障碍者可诱发血肿。血肿一经发现，应尽早抽出血性状态的凝胶，冲洗。给予加压包扎，辅以抗感染、止血等对症治疗。3 个月后可恢复注射。

2.3 硬结

表现为皮下、乳腺间中等硬度的孤立性结节，表面光滑。乳房整体手感良好，无触痛及明显不适感。硬结形成的主要原因是注射层次不正确。小的硬结，可以用生理盐水、利多卡因、庆大霉素注入硬结中，使包膜破裂。较大的硬结用生理盐水、利多卡因、庆大霉素注入硬结稀释后，可将胶体抽出。

2.4 乳房不对称

一般术后早期双侧乳房形态正常对称，术后 10 d 出现双侧乳房大小不一致，或术后出现单侧乳房形态不良。主要原因是因为两侧乳房注射的凝胶量不一致，两侧乳房的胶体稀释比例

（下转 229 页）

作者简介：孙志成（1970－），男，黑龙江省哈尔滨市人，硕士，主治医师，主要从事器官移植及瘢痕机制方面的研究。电话：(023)68754192

收稿日期：2001-08-25；修回日期：2002-05-22

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