DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.022
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0057-03

论著

实验性犬脑干缺血模型牛磺酸含量及 PLA_2 活性的动态变化

邓志宽,王东武,何 英 (第三军医大学附属新桥医院神经内科,重庆 400037)

提 要:目的 观察犬脑干持续缺血后Tau含量及磷脂酶A_2(PLA_2)活性的动态变化,探讨脑干缺血时Tau的神经保护作用及PLA_2的激活情况。方法 建立犬脑干缺血模型,动态观察缺血后各时点脑干组织中Tau含量(应用美国Beckman公司生产的6300黄金系列高效氨基酸分析仪测定)及PLA_2活性(微量酸滴定法)的改变,同时观察神经元病理损害情况。结果 与假手术组相比,缺血30 min,Tau含量显著增加($P<0.05$),PLA_2活性亦显著增高($P<0.05$),神经元轻度异常;缺血3 h,Tau含量增加更显著($P<0.01$),PLA_2活性非常显著升高($P<0.01$),神经元呈中度缺血改变;缺血6~12 h,Tau含量及PLA_2活性仍继续增高($P<0.01$),神经元呈重度缺血改变或死亡。结论 脑干持续缺血后Tau的含量及PLA_2的活性不断增高;Tau可能在脑干缺血早期起神经保护作用。

关键词:牛磺酸;脑缺血;脑干;磷脂酶A_2
中图法分类号:R-332;R345.561;R743.31 文献标识码:A

The dynamic changes of the content of taurin and the activity of phospholipase A_2 in experimental models of ischemia in the canine brainstem

DENG Zhi-kuan, WANG Dong-wu, HE Ying (Department of Neurology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To observe the dynamic changes of the content and the activity of phospholipase A_2 (PLA_2) after ischemia in canine brainstem and to explore the neuroprotection of taurin and the activation of PLA_2. **Methods** The ischemic brainstem models were established with dog. The content of taurin and the activity of PLA_2 were determined after different durations of ischemia in the brainstem with Gold series high performance aminoacid analyzer and trace acid titration respectively. Meanwhile, the pathological changes of neurons were observed with microscope. **Results** Compared with those of the pseudo-operation group, the content of taurin and the activity of PLA_2 in the brainstem increased significantly 30 min after ischemia in the brainstem ($P<0.05$) and mild damages to neurons were found. At 3 h post ischemia, the increase of the content of taurin and the activity of PLA_2 became more significant ($P<0.01$) and neurons turned to be moderate insult. During 6~12 h post ischemia in the brainstem, the content of the taurin and the activity of PLA_2 in brainstem continued increasing ($P<0.01$), neurons became seriously injured and more and more neurons were found lost. **Conclusion** The content of the taurin and the activity of PLA_2 increase continuously after sustained ischemia in the brainstem. The increase of the content of taurin may be of neuroprotection at the early stage of ischemia in the brainstem.

Key words: taurin; cerebral ischemia; brainstem; phospholipase A_2

许多研究表明[1,2],磷脂酶A_2(Phospholipase A_2,PLA_2)在缺血性脑损伤中起非常重要的作用。PLA_2是一种脂肪水解酶,脑缺血时,可因神经递质的直接作用或因递质介导的Ca^{2+}过度内流而被过度激活,过度激活的PLA_2通过水解细胞膜磷脂,破坏细胞膜;同时产生花生四烯酸、血小板激活因子、氧自由基等对神经元造成进一步损伤;PLA_2还可激活蛋白激酶C(PKC),引起一系列病理过程,导致神经元损伤。另外,PLA_2尚可通过细胞膜的破坏或膜磷脂分解产物促进兴奋性递质从细胞内释到细胞外,引起细胞外递质的过度集聚,产生兴奋毒性损伤。脑缺血时应用PLA_2活性抑制剂,对缺血性损伤具有明显神经保护作用[3]。牛磺酸(Taurine,Tau)为一种在神经系统内起抑制作用的氨基酸类递质或调质,研究表明,它对脑缺血性损伤具有明

作者简介:邓志宽(1965-),男,江苏省东台市人,博士,主治医师,讲师,主要从事脑及脑干缺血损伤机制方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68755000-74613

收稿日期:2001-08-05;修回日期:2002-02-15

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

显神经保护作用，其机制虽然已从多方面作了观察[4,5]，但其在脑干缺血时含量的动态变化及其与 PLA_2 激活的关系尚未见报道。本研究拟在持续性犬脑干缺血模型中观察 Tau 含量及 PLA_2 活性的动态变化及其与神经元病理损害之间的关系，探讨 Tau 在脑干缺血过程中的神经保护作用及其与 PLA_2 激活的可能关系。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型建立

犬25只，雌雄不拘，体重8.5~12.5 kg，随机分为假手术组、缺血30 min组、缺血3 h组、缺血6 h组、缺血12 h组，每组5只。3%戊巴比妥钠(2 mg/kg)静脉麻醉，并维持至取材；股静脉插管建立静脉通道，气管切开插入气管套管，PaO_2 升高时给予人工呼吸，股动脉插管监测动脉血压；间断分析血气，使 $PaCO_2$ 维持在4.0~5.3 kPa，室温控制在24~26℃，直肠温度维持在37~38℃。

犬实验性脑干缺血模型的建立参考赵士富等[6]的方法并予以改进，即改由颞、颈入路为经颈前一个入路。暴露颅底枕骨大孔并分离硬脑膜，从腹侧缘向前咬骨窗直至基底动脉远心端，打开硬脑膜，暴露基底动脉，银夹夹闭上、中、下端，依次缝合至皮肤。假手术组除不夹闭基底动脉外，其余操作同缺血组。

1.2 牛磺酸含量及 PLA_2 活性的测定

1.2.1 标本采集及处理 缺血组动物在脑干缺血达规定时点、假手术组动物在完成规定操作后迅速开颅取一侧缺血脑干耳蜗前庭核区组织约2 g，均匀分成两份，立即分别低温下(冰盒内)称湿重；一份(测定 Tau 含量)加入5%三氯乙酸溶液4 ml，内切式匀浆机匀浆，真空超速离心机在-4℃下15 000 r/min离心，取上清液2 ml，-70℃保存待测。另一份(测定 PLA_2 活性)按重量体积比1∶4加入组织稀释液(含甘氨酸0.1 mol/L，硼酸3.57 mmol/L，去氧胆酸钠6.03 mmol/L)，内切式匀浆机匀浆，60℃恒温水浴30 min。

1.2.2 牛磺酸含量测定 应用美国 Beckman 公司生产的6300黄金系列高效氨基酸分析仪测定。

1.2.3 PLA_2 活性测定 应用微量酸滴定法测定[7]。

1.3 组织病理学观察

各组动物所取另一侧缺血脑干耳蜗前庭核区组织，双面刀片切成2~3 mm冠状脑片，置于100 ml/L中性福尔马林溶液中固定，常规脱水，石蜡包埋切片，片厚5 μm，HE染色，Olympus显微镜观察神经元病理改变并照相。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

与假手术组相比，缺血30 min，Tau 含量显著增加($P<0.05$)，缺血3 h，Tau 含量增加更显著($P<0.01$)，缺血6~12 h，Tau 仍继续增高($P<0.01$)。与假手术组相比，缺血30 min，PLA_2 活性显著增高($P<0.05$)，缺血3 h，PLA_2 活性非常显著升高($P<0.01$)，缺血6~12 h，PLA_2 活性仍继续增高($P<0.01$)，见表1。

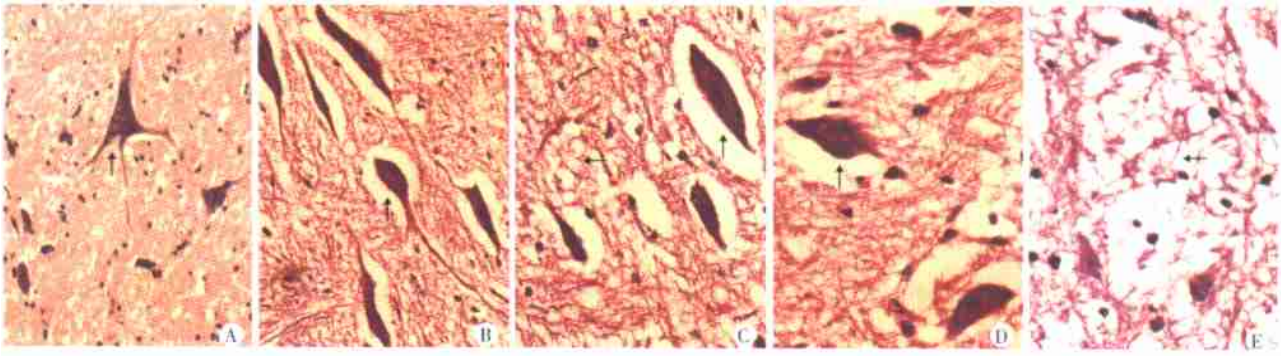
表1 犬脑干缺血后 Tau 含量及 PLA_2 活性的动态变化($n=5$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The dynamic change of taurin content and PLA_2 activity after brainstem ischemia($n=5$，$\bar{x}\pm s$)

Ischemic time(h)	Taurin content(μmol/g)	PLA_2 activity(μmol·L^{-1}·s^{-1})
0	1.748±0.315	182.6±14.8
0.5	2.138±0.386*	203.2±15.1*
3	2.968±0.327**	231.5±18.3**
6	3.566±0.120**	280.6±15.7**
12	3.748±0.257**	391.5±12.6**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs pseudo-operation group (ischemic 0 h)

假手术组神经元形态正常，间质无异常。缺血30 min，神经元体积轻度缩小，间质轻度水肿，细胞周围间隙轻度增大。缺血3 h，大多数神经元胞体缩小，细胞周隙明显增大，胞核固缩，间质水肿增重。缺血6 h，大部分神经元胞体严重缩小，核皱缩、变形，神经元开始出现死亡，数量减少；间质明显水肿。缺血12 h，神经元数量明显减少，散在的神经元胞体固缩，形态不规则，间质严重水肿，可见"鬼影"细胞及细胞碎片，见图1A~E。



A: Neurons are normal in pseudo-operation group(↑); B: After 30 min ischemia, neurons are shrunken mildly(↑) and the peripheral space of neurons widened; C: After 3 h ischemia, neurons are shrunken obviously(↑). The parenchyma become swollen(←); D: After 6 h ischemia, neurons begin to necrose(↑); E: After 12 h ischemia, most neurons lost. "Ghost cells" and fragments of neuron(↑) can be seen. The parenchyma become heavily swollen(←)

图1 犬脑干缺血后各时点神经元缺血损伤的病理改变 (HE×400)

Fig 1 The neuropathological change at different timepoint after brainstem ischemia (HE×400)

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

3　讨论

牛磺酸是哺乳类动物脑内含量最丰富的游离氨基酸之一, 广泛分布于神经元胞体、树突、轴突、末梢及胶质细胞。它既非蛋白组成成分, 亦与体内物质代谢无关, 其生理作用仍不十分清楚。研究表明它对维持细胞内外渗透压平衡起重要作用。有人观察到, 在不同脑区应用外源性 Tau 可引起神经元兴奋的抑制, 脑片培养液中加入 Tau 可以产生 γ-氨基丁酸(GABA)样抑制性作用[4], 并且脑内存在有高亲合性的 Tau 摄入系统, 因而提出 Tau 可能是一种抑制性神经递质。但到目前为止, 仍无证据表明 Tau 具有其特异性受体[8]; 去极化后 Tau 的释放为非 Ca^{2+} 依赖途径; 在某些脑区的作用缺乏特异性; 故尚不能肯定 Tau 是一种抑制性神经递质。Tau 可激活 $GABA_A$、$GABA_B$ 或 Gly 受体上的结合位点, 使神经元对 Cl^- 的通透性增加, 该作用可被相应受体拮抗剂所阻断[9]。另外, 研究表明, Tau 还参与调节脑内神经末梢 Ca^{2+} 的流动[10], 减少兴奋性氨基酸递质从神经末梢的释放。Tau 尚有一定的抗自由基作用。PLA_2 是一种重要的脑缺血损伤介质[1,2], 研究表明, 它的产生和激活与许多因素有关, 但其活性的改变与 Tau 的关系如何尚无报道。

本研究观察到, 脑干缺血 30 min, 脑干内 Tau 含量迅速显著升高, 并随着缺血时间的延长, 含量不断增加, 与其它脑区观察到的结果一致[10]。原因可能为缺血后神经组织水肿, 在 ATP 耗竭尚不明显时, 神经元或胶质细胞为维持细胞内外渗透压, 主动运输 Tau 出细胞外[2], 而在 ATP 完全耗竭时, 则为 Tau 被动渗透出细胞外[8]。同时观察到的 PLA_2 的活性改变表明, 脑干缺血后 30 min, 脑干组织的 PLA_2 的活性明显增高, 并随着缺血时间的延长, 其活性进一步升高; 至缺血 12 h, 仍有升高趋势。结果表明, 随 PLA_2 的活性升高, Tau 含量也不断增加, 由于研究已经证实 Tau 在多种病理情况(包括脑缺血)下均会大量释放, 以起神经自身保护作用[8], 因此, 脑干缺血时 PLA_2 的病理性激活也可能诱导了 Tau 的释放。细胞外 Tau 含量的增高, 虽然可抑制兴奋性神经递质的释放[5], 减少 Ca^{2+} 过度内流, 理论上有降低 PLA_2 的激活的作用, 但在持续缺血情况下, 由于多种损害因子介导的病理损伤途径(包括梗塞周围去极化、自由基损害、钙蛋白酶等)被激活, 细胞膜功能和结构被损害, 且有研究表明, 缺血早期 GABA 受体即被破坏, 因而 Tau 抑制兴奋性氨基酸递质释放和减缓 Ca^{2+} 内流的作用不显著, 其抑制 PLA_2 激活的效应表现不明显。

从脑干缺血后神经元病理损害的动态过程可以看出, 脑干缺血后 3 h 内, 即使 PLA_2 被激活, 神经元损害相对发展较慢, 而在 6～12 h, 病理改变迅速趋于严重, 与所报道的其它脑区(大脑皮层、海马、纹状体等)的缺血性病理损害在缺血 30 min 时即非常明显不一致, 原因可能有[11]: ①本模型为不完全性脑干缺血模型; ②脑干神经元对缺血性损害可能具有较好的拮抗性。由于在脑干缺血早期, Tau 的含量即开始明显升高, 因而 Tau 可能参与了脑干神经元对缺血性损害的拮抗机制。由于 Tau 的增高似乎不影响 PLA_2 的激活, 其活性仍不断增高, 因此 Tau 的神经保护作用可能主要通过其它机制。

参考文献:

[1] Clapp L E, Klette K L, DeCopster M A, *et al*. Phospholipase A_2-induced neurotoxity *in vitro* and *in vivo* in rats[J]. Brain Res, 1995, 693(1-2): 101－111.

[2] Saransaari P, Oja S S. Modulation of the ischemia－induced taurine release by adenosine receptors in the developing and adult mouse hippocampus[J]. Neuroscience, 2000, 97(3): 425－430.

[3] Kamisaki Y, Maeda K, Ishimura M, *et al*. Effects of taurine on depolarization-evoked release of amino acids from rat cortical synaptosomes[J]. Brain Res, 1993, 627(2): 181－185.

[4] Hauster M A, Yung W H, Lacey M G. Taurine and glycine activate the same Cl^- conductance in substancia nigra dopamine neurons[J]. Brain Res, 1992, 571(1): 103－108.

[5] Block F, Kunkel M, Sontag K H, *et al*. Posttreatment with EPC－K1 an inhibitor of lipid peroxidation and of phospholipase A_2 activity, reduces functional deficits after global ischemia in rats[J]. Brain Res Bull, 1995, 36(3): 257－260.

[6] 赵士富, 王东武, 张基谟, 等. 实验性犬脑干缺血模型的建立[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1995, 21(2): 40－41.

[7] 陈思锋, 吴立中. 体液和组织磷脂酶 A_2 简便快速测定法[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10(3): 254－256.

[8] Saransaari P, Oja S S. Taurine and neural cell damage[J]. Amino Acids, 2000, 19(3-4): 509－526.

[9] Kontro P, Oja S S. Interactions of taurine with GABAB binding sites in mouse brain[J]. Neurophamacology, 1990, 29(3): 243－247.

[10] Phillis J W, Ren J, O' Regan M H. Studies on the effects of lactate transport inhibition, pyruvate, glucose and glutamine on amino acid, lactate and glucose release from the ischemic rat cerebral cortex[J]. J Neurochem, 2001, 76(1): 247－257.

[11] 邓志宽, 王东武, 郑　健, 等. 脑干缺血模型兴奋性氨基酸含量的变化及其意义[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(5): 305－307.

(编辑　张大春)

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