DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.003
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
630 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0630-03

谷氨酸在模拟高原梭曼中毒性脑损伤的作用研究

赵吉清,吴 强,董兆君,王仕丽,李云鹏,刘 勇,魏相德 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨谷氨酸(Glutamic acid, Glu)在缺氧复合梭曼中毒脑损伤的作用机制。方法 采用氨基酸分析和放免技术,研究高原缺氧、梭曼中毒单一与复合致伤后12、24、48 h脑组织Glu和CaM含量的变化以及钙/钙调蛋白激酶Ⅱ(Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ)活性的影响及其机制。结果 缺氧复合梭曼中毒组脑组织Glu、CaM含量在中毒后24 h明显高于单纯中毒组、缺氧对照组和正常对照组;缺氧中毒组脑组织Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性在中毒后24 h明显低于单纯中毒组、缺氧对照组和正常对照组;而N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂地佐环平(MK-801)和钙通道拮抗剂尼莫地平(Nimodipine)可对抗这种改变。结论 高原缺氧复合梭曼中毒后Glu的兴奋毒引起脑损伤和Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ的活性下降,主要由NMDA受体介导和胞外Ca^{2+}内流增加有关。

关键词:缺氧;梭曼;谷氨酸;Ca^{2+}/CaM依赖性蛋白激酶Ⅱ
中图法分类号:R742.89;R977.4;R996 文献标识码:A

Effect of glutamic acid on brain damage in simulated high altitude hypoxia combined soman intoxication

ZHAO Ji-qing, WU Qiang, DONG Zhao-jun, WANG Shi-li, LI Yun-peng, LIU Yong, WEI Xiang-de (Department of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of glutamic acid (Glu) on brain damage in high altitude hypoxia combined soman intoxication. Methods The content of Glu, CaM and activity of Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ in brain tissue after hypoxia combined soman intoxication were studied with RIA and amino acid analyzing. Results The content of Glu, CaM were significantly higher in soman intoxicated combined hypoxia group than that in simple soman intoxicated group or simple hypoxia group 24 h after infoxication; but the activity of Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ were significantly decreased; NMDA receptor antagonist MK801 and calcium antagonist Nimodipine could antagonize EAA induced inhibition of Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ activity. Conclusion NMDA receptor may be involved in excitotoxicity induced inhibition of Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ activity in high altitude hypoxia combined soman intoxication.

Key words: hypoxia; soman; glutamic; Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ

梭曼属于速杀性化学战剂,可以迅速地抑制乙酰胆碱酯酶(AChE),导致胆碱能神经末梢释放的乙酰胆碱(ACh)积累,引发动物出现呼吸困难、肌颤、惊厥,甚至死亡。快速进驻高原地区可造成机体缺氧性损伤,高原缺氧复合梭曼中毒可加大其毒性。这种低氧所致的脑损伤至今对其发病机制尚不十分清楚,因而也缺少有效的防治措施。近年来的研究认为,兴奋性氨基酸释放增加参与低氧性脑损伤,但必须在胞内过量Ca^{2+}存在的条件下[1,2]。国外发现兴奋性氨基酸参与了梭曼中毒的毒性作用[3]。对于缺氧和梭曼中毒两因素的协同作用机制尚有待于进一步研究。

1 材料与方法

1.1 动物和药品

Wistar鼠126只,雌雄不拘,体重180~220 g。分为平原对照组(6只),平原梭曼中毒组(24只),高原缺氧对照组(24只),高原梭曼中毒组(24只),尼莫地平治疗组(24只),MK-801治疗组(24只)。

梭曼(纯度94.28%)由军事医学科学院六所提供,临用前以生理盐水配制溶液。CaM试剂盒:购于解放军总医院;[^{32}P]ATP由北京福瑞公司提供;MK-801为RBI产品;尼莫地平由天津中央制药七厂提供。

1.2 方法

平原对照组直接取样;高原对照组和高原中毒组动物均预先在模拟高原4 000 m停留6 h,中毒组大鼠再皮下注射梭曼后继续停留低压舱12、24、36、48 h取样,同时对照组在相应时相点活杀取脑组织。

1.3 检测指标

1.3.1 海马组织Glu测定 将新鲜海马组织用冷冻10%磺基水杨酸制成10%匀浆,10 000× g冰冻离心20 min,取上清液,在全自动氨基酸分析仪检测。

1.3.2 脑组织CaM含量的测定 采用北京解放军总医院提供的^{3}H-cGMP放免试剂盒测定。

1.3.3 脑组织Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性的测定 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性测定根据张光毅[4]的蛋白激酶Ⅱ活性依赖Ca^{2+}/CaM分解[^{32}P]ATP的方法。取皮层组织立即放入预冷(4 ℃)缓冲溶液中研成匀浆,然后低温离心(4 ℃,4 000× g,50 min)分离出酶。根据此酶可催化ATP的γ-磷酸基团转移到其底物蛋白上的性质,在Ca^{2+}和CaM存在时,在适当的反应体系中加入该酶、底物(组蛋白)和γ^{32}-ATP,30 ℃反应10 min,吸取20 μl反应液滴在滤纸片上,立即投入冰冷的10%三氯醋酸(TCA)—2%磷酸溶液内终止反应,反复数次,放入5%TCA洗2次(每次15 min),无水乙

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L015)
作者简介:赵吉清(1970—),男,山东省牟平县人,硕士,讲师,主要从事神经毒理方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752356
收稿日期:2000-12-15;修回日期:2001-04-17

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

醇脱水 5 min, 滤纸片吹干, 将滤纸放入闪烁瓶中, 加入 6 ml 的闪烁液, 用液闪计数仪计数。

1.4　统计学处理

由本校数学教研室设计的 SPMR 医用统计程序包进行多因素及双因素方差分析, 所有计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2　结果

2.1　脑组织 Glu 含量测定

高原中毒组脑组织 Glu 含量随时间延长而递增, 在 48 h 明显高于其它时相点; 24、48 h 均明显高于平原中毒组, 高原对照组和正常对照组。平原中毒组脑组织 Glu 含量呈先升高后下降的趋势, 中毒后 12 h 最高。高原对照组脑组织 Glu 含量呈逐渐上升趋势, 高原缺氧 48 h 显著高于 12、24 h 和正常对照。多因素方差分析表明, 高度因素和时间因素均对 Glu 含量有显著的影响作用, 且交互作用明显, 见表 1。

表 1　脑组织谷氨酸含量的变化($n=6$, nmol/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of content of Glu in brain tissue($n=6$, nmol/ml, $\bar{x}\pm s$)

	Control	Time after intoxication(h)		
		12	24	48
Ⅰ	6.27±1.28	13.36±1.04**	11.89±1.61**	10.22±1.33**
Ⅱ		10.48±1.85**	13.97±2.14**	16.89±2.54**
Ⅲ		15.27±2.81**▲★	18.60±2.22**▲★	25.16±17.33**▲★

Ⅰ: Soman intoxication at sea level; Ⅱ: Simulated high altitude; Ⅲ: Soman intoxication at high altitude; **: $P<0.01$ *vs* control; ▲: $P<0.01$ *vs* Ⅰ at the same time point; ★: $P<0.01$ *vs* Ⅱ at the same time point

2.2　脑组织 CaM 含量测定

高原中毒组脑组织 CaM 含量随时间延长而递增, 在 48 h 明显高于其它时相点; 24、48 h 均明显高于平原中毒组, 高原对照组和正常对照组。平原中毒组脑组织 CaM 含量呈逐渐下降趋势, 中毒后 12 h 最高。高原对照组脑组织 CaM 含量呈逐渐上升趋势, 高原缺氧 48 h 显著高于 12、24 h 和正常对照。多因素方差分析表明, 高度因素和时间因素均对 CaM 含量有显著的影响作用, 且交互作用明显, 见表 2。

表 2　脑组织钙调蛋白含量的变化($n=6$, nmol/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of content of CaM in brain tissue($n=6$, nmol/ml, $\bar{x}\pm s$)

	Control	Time after intoxication(h)		
		12	24	48
Ⅰ	11.53±1.38	16.10±1.05**	13.62±1.22**	13.36±1.66**
Ⅱ		12.43±0.98	13.77±1.31*	16.08±1.23**
Ⅲ		15.30±1.14**▲★	17.27±1.90**▲★	19.65±1.52**▲★

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; ▲: $P<0.01$ *vs* Ⅰ at the same time point; ★: $P<0.01$ *vs* Ⅱ at the same time point

2.3　脑组织 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性的变化

高原中毒组脑组织 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性随时间延长而递减, 在 48 h 明显低于其它时相点; 各时相点均明显低于平原中毒组, 高原对照组和正常对照组。平原中毒组脑组织 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性呈逐渐上升趋势, 中毒后 12 h 最低。高原对照组脑组织 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性呈逐渐下降趋势, 高原缺氧 48 h 显著低于 12、24 h 和正常对照。尼莫地平治疗组和 MK-801 治疗组脑组织 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性各时相点均明显高于高原中毒组, 与正常对照无差别, 见表 3。

表 3　脑组织 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性的变化($n=6$, pmol·min^{-1}·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Activity of Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ in brain tissue($n=6$, pmol·min^{-1}·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

	Control	Time after intoxication(h)		
		12	24	48
Ⅰ	198.38±11.70	163.93±16.8**	173.45±22.17**	182.17±14.56**
Ⅱ		181.36±14.55**	176.49±10.37**	157.21±10.86**
Ⅲ		175.53±13.81**▲★	162.48±11.59**▲★	140.25±11.21**▲★
Ⅳ		190.43±9.29*●	194.70±11.37*●	195.82±16.79*●
Ⅴ		194.17±10.28●	189.64±12.59●	192.53±14.67●

Ⅳ: Nimodipine treament group; Ⅴ: Mk-801 treament group; **: $P<0.01$ *vs* control; ▲: $P<0.01$ *vs* Ⅰ at the same time point; ★: $P<0.01$ *vs* Ⅱ at the same time point; ●: $P<0.01$ *vs* Ⅲ at the same time point

3　讨论

文献[5]报道梭曼中毒和高原缺氧均可引发脑组织缺氧性损伤。而梭曼中毒和高原缺氧的复合效应可加重缺氧程度。关于在复合效应下神经元损伤除与胆碱能系统受损有关外, 非胆碱能系统在神经元损伤过程中可能发挥了重要的作用。本室业已证明在缺氧条件下梭曼中毒所造成的神经元损伤过程中, Ca^{2+} 升高及超载可能起了重要作用, 而钙的升高及超载则可能是胆碱能系统和兴奋性氨基酸共同介导所致[6]。本研究在测定高原缺氧复合梭曼中毒动物脑内兴奋性氨基酸的含量时发现, 出现动物脑内有明显的谷氨酸(Glutamic acid, Glu)含量的升高。选用谷氨酸受体(Glu-R)的拮抗剂 MK-801 或钙拮抗剂尼莫地平单药用于梭曼中毒的预防, 它不能阻止惊厥的出现, 却可减轻动物的中毒症状, 终止动物的持续性惊厥状态, 降低动物的死亡率[7]。说明海马内早期 NMDA 受体的参与在致惊中发挥重要作用。这由于 NMDA 受体与 Glu 结合后, 使受体依赖离子通道缓慢开放, 导致惊厥产生。

兴奋性氨基酸的神经毒性作用机制在于通过受体引起靶细胞过度兴奋和代谢紊乱, 诱发惊厥发作。Glu 受体分 NMDA 受体, 非 NMDA 受体和代谢型受体三种亚型, 其中 NMDA 受体对 Ca^{2+} 高度通透[8]。国外报道也证实梭曼中毒引发的兴奋毒主要与 NMDA 受体有关[9]。本研究结果表明在缺氧复合梭曼中毒后神经细胞内 Ca^{2+}、脑组织 CaM, Glu 的增加同时伴随有靶酶——Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ的活性降低, 早期即可出现, 而 MK-801 和尼莫地平可拮抗该酶的活性降低。说明高原缺氧复合梭曼中毒在加重缺氧性脑损伤的同时, 可使谷氨酸释放和(或)摄取减少, 引起兴奋毒损伤, 导致神经细胞内的 Ca^{2+} 超载, 它触发了导致神经元死亡的级联反应, Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性的迅速抑制可能是该级联反应中的一个重要环节[10]。Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ富含于神经组织, 占全脑总蛋白的 1%, 在海马则达到 2%。Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ是一多功能蛋白激酶, 在体外可磷酸

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

化40多种蛋白质，在细胞生物合成，神经递质胞吐和突触可塑性等过程中起重要作用[11]。神经元去极化使胞内 Ca^{2+} 水平增高，Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ发生自身磷酸化，其活性即由 Ca^{2+}/CaM 依赖型向 Ca^{2+}/CaM 非依赖型转变，由于正常情况下神经元内 Ca^{2+} 浓度变化的瞬时性，该酶的 Ca^{2+} 非依赖性活性又缓慢地回复到 Ca^{2+} 依赖性状态。而高原缺氧复合梭曼中毒后神经元内持续处于 Ca^{2+} 超载状态，使 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ自身磷酸化型剧增而非磷酸化型锐减，因此 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ的 Ca^{2+} 依赖性活性急剧降低；而 NMDA 受体拮抗剂可拮抗 Ca^{2+} 升高，抑制 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性，保护神经元形态的损伤[12]。提示高原缺氧复合梭曼中毒后 Glu 的兴奋毒引起皮层神经元的迟发性损伤和 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ的活性下降，主要由NMDA受体介导和胞外 Ca^{2+} 能内流增加有关。

综上所述，高原缺氧复合梭曼中毒引起的脑损伤的非胆碱能机制很复杂，目前认为可能是通过：兴奋性氨基酸→NMDA 受体→Ca^{2+} 内流→Ca^{2+} 靶酶（Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ）。这为寻求更有效的梭曼抗毒剂量提供了理论依据。

参考文献：

[1] Bickler P E, Hansen B M. Causes of calcium accumulation in rat cortical brain slices during hypoxia and ischemic: role of ion channels and membrane damage[J]. Brain Res, 1994, 665(2): 269-276.

[2] 赵吉清，吴 强，王仁丽，等. 缺氧复合梭曼中毒 PC_{12} 细胞中 [Ca^{2+}]、cAMP、CaM 和 Ca^{2+}/CaM-PkⅡ的变化[J]. 第三军医大学学报，2001，23(2)：169-171.

[3] Solberg Y, Belkin M. The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning[J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(6): 183-185.

[4] 张光毅，唐放鸣，赵文君，等. 脑缺血生化机制的研究. Ⅰ 脑缺血 Ca^{2+}/CaM 依赖性蛋白激酶活性的变化[J]. 徐州医学院学报，1990，10(2)：112-117.

[5] Petras J M. Neurology and neuropathology of soman-induced brain injury: an overview[J]. J Exp Anal Behav, 1994, 61(2): 319-329.

[6] 吴 强，董兆君. 梭曼中毒复合缺氧损伤对 PC12 细胞游离钙的影响[J]. 第三军医大学学报，1997，19(7)：328-330.

[7] Karlsson B M, Waara L M, Fredriksson S A, *et al*. The effect of the calcium antagonist nimodipine on the detoxification of soman in anaesthetized rabbits[J]. J Pharm Pharmacol, 1997, 49(3): 296-300.

[8] Sola C, Barron S, Tusell J M, *et al*. The Ca^{2+}/calmodulin signaling system in the neural response to excitability[J]. Prog Neurobiol, 1999, 58(3): 207-232.

[9] Raveh L, Chapman S, Cohen G. The involvement of the NMDA receptor complex in the protective effect of anticholinergic drugs against soman poisoning[J]. Neurotoxicology, 1999, 20(4): 551-559.

[10] Watanabe K, Yamamoto T, Ozono S. A novel glutamate-mediated inhibitory mechanism linked with Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ in identified Euhadra neurons[J]. J Neurobiol, 1997, 32(2): 139-149.

[11] 周 伟. 缺氧缺血性脑损伤的分子生物学研究进展[J]. 国外医学：儿科学分册，1998，25(1)：32-36.

[12] 裴 林，纵艳艳，张 磊，等. 大鼠海马脑片缺氧诱导 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ活性抑制机理的研究[J]. 生理学报，1997，49(1)：61-66.

（编辑 陈聪连）

（上接629页）

生活协助。

呼吸道并发症护理：老年患者机体抗病能力弱，且术前常伴有慢性支气管炎等慢性肺部疾病，加上气管插管等因素影响，使得术后呼吸道易感性明显增加，应多帮助病人翻身，定时拍背，鼓励其咳嗽排痰，做深呼吸，痰液粘稠者予祛痰剂及雾化吸入。同时注意保暖。

糖尿病护理：此患者全身抵抗力下降，易致肺部、泌尿道及切口等感染，切口恢复慢，要定期测血糖，及时调节饮食及胰岛素用量，注意防止低血糖。

心血管疾病护理：老年患者极易发生心血管疾病，要做好生命体征监测，及时巡视病房，控制输液滴速，术后疼痛及精神紧张、感染等易诱发高血压、心律失常，应及时予镇静、止痛及抗感染等治疗，询问有无心慌、气急等症状，观察心律及血压，若出现上述症状及时通知医生及早处理。能进食者饮食宜予低盐饮食，以减轻心脏等负担。

保证充分的氧气吸入：老年患者心肺功能差，各组织器官衰退，对缺氧耐受性差，加之术中 CO_2 气腹极易产生高碳酸血症，故术后常规吸氧 2～8 h，到呼吸平稳，无心慌，皮肤青紫改善，及血气分析等指标正常后，方可停止吸氧。

营养补充：老年患者营养状况差，术后恢复慢，而消化吸收能力减弱，因此术后第 2 天尚不能进食者，要及时静脉补充足够营养，如静脉输入白蛋白、氨基酸、维生素、能量合剂等。

皮肤护理：老年患者身体消瘦，肌层较薄，皮肤抵抗力下降，卧床时间长，极易发生褥疮。而患者年老体弱且术后伤口疼痛使其活动受到限制，因此要随时注意床单的清洁、干燥、平整，协助翻身，按摩受压处，必要时垫气圈、棉垫，如受压处皮肤发红，需用 50％的酒精按摩局部。

出院指导：根据不同的健康状况，指导患者选择合理的饮食结构，以低脂、低盐、高蛋白、高维生素、易消化饮食为宜。避免刺激性饮食及适当控制饮食量，禁烟、酒，嘱患者养成良好的卫生习惯，鼓励参加适当体育锻炼，嘱其定期到医院检查，发现问题及时处理。

体会：虽然老年患者个体差异大，合并症多，且机体免疫力、代偿力等功能下降，但只要做好术前各项功能检查，及时纠正内科疾病，术后坚持细心观察，精心护理，及时预防及处理合并症，以和蔼的语言，恰当的心理疏导，取得患者的紧密配合，治疗便能取得成功。

关键词：老年；腹腔镜胆囊切除术；护理
中图法分类号：R473.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 郭应华，张丽娜. 老年人胆道疾病围手术期护理[J]. 黑龙江护理杂志，2000，1(6)：21-22.

[2] 陈万成，谢兴旺，王晓琴. 老年人腹腔镜胆囊切除术临床体会[J]. 腹部外科，1999，12(1)：40-41.

[3] 杜秀珍. 老年腹腔镜胆囊切除术围手术期护理及并发症预防[J]. 铁道医学，1999，27(1)：59-60.

（编辑 王 红）

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