DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.004
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0823-03

论著

慢性二氧化碳潴留大鼠脑 $GABA_A$ 受体 mRNA 的变化研究

张献全[1],范卫东[2],钱桂生[1] ([1]第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]建设医院,重庆 400050)

提 要:目的 观测慢性二氧化碳潴留大鼠脑组织γ-氨基丁酸A型(Gamma-aminobutyric $acid_A$, $GABA_A$)受体mRNA的变化情况,探讨 $GABA_A$ 受体在呼吸衰竭中的作用。方法 建立慢性二氧化碳潴留大鼠模型,应用Northern ELISA测定不同脑区 $GABA_A$ 受体亚单位 α_1、α_2、β_2、γ_2 的变化情况。结果 4种亚单位mRNA在脑干和海马区均非常显著的增高,大脑皮质显著增高,以 α_1、β_2、γ_2 明显,而小脑无明显变化。结论 二氧化碳潴留时 $GABA_A$ 受体 α_1、β_2、γ_2 mRNA表达增强,$GABA_A$ 受体可能参与了中枢性呼吸衰竭的产生。

关键词:二氧化碳潴留;$GABA_A$ 受体;mRNA
中图法分类号:R322.81;R342.22 文献标识码:A

Effect of chronic hypercapnia on the expression of $GABA_A$ receptor mRNA in brain of rat

ZHANG Xian-quan, FAN Wei-dong, QIAN Gui-sheng (Research Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of chronic hypercapnia on the expression of $GABA_A$ receptor mRNA in the brains in order to explore the role of $GABA_A$ receptor in respiratory failure in rats. Methods After the establishment of rat model with hypercapnia, the subunits α_1, α_2, β_2 and γ_2 of $GABA_A$ receptor in the different regions of the brain were examined with Northern ELISA. Results The mRNA of these 4 subunits of $GABA_A$ receptor was significantly increased in the brain stem and hippocampus. Except α_2, the mRNA of the other three subunits was obviously elevated in the cerebral cortex. However, the mRNA of none of them showed an increase in the cerebellum. Conclusion The expression of the subunits α_1, α_2, β_2 and γ_2 mRNA of $GABA_A$ receptor can increase in the brains of rats with hypercapnia. $GABA_A$ receptor might participate in the process of central respiratory failure.

Key words: hypercapnia; $GABA_A$ receptor; mRNA

呼吸衰竭是临床上的常见和危重病症,二氧化碳潴留时患者出现嗜睡、昏迷、呼吸抑制等神经精神症状,其机制尚未阐明。γ-氨基丁酸(Gamma-aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统中的最主要抑制性递质,与其A型受体($GABA_A$ 受体)结合是抑制性突触后电位的产生基础。近年的研究发现,呼吸相关神经元表达有大量的 $GABA_A$ 受体的多种亚单位mRNA和蛋白质[1],但二氧化碳潴留与 $GABA_A$ 受体的关系尚未明确。本研究旨在通过观测不同程度的二氧化碳潴留大鼠脑组织 $GABA_A$ 受体mRNA的变化,探讨 $GABA_A$ 受体在二氧化碳潴留为主的呼吸衰竭中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组和模型

健康雄性Wistar大鼠36只,体重(250±50)g,随机分为3组,每组12只。①正常对照组:放置在本所研制的常压缺氧和高二氧化碳动物饲养舱内,舱内的气体浓度为(20.9±1.1)%O_2

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570306)
作者简介:张献全(1965—),男,内蒙古赤峰市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事呼吸衰竭的发生机制方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-02-05;修回日期:2000-04-24

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

+0.5% CO_2，相对湿度为(60±10)%，温度为20 ℃，每天持续22~23 h，连续5 d；②持续二氧化碳潴留Ⅰ组：舱内气体浓度为(20.9±1.1)% O_2+15% CO_2，其余同正常对照组；③持续二氧化碳潴留Ⅱ组：舱内气体浓度为(20.9±1.1)% O_2+15% CO_2，连续7 d，其余同正常对照组。大鼠处死前在舱内抽动脉血气，大鼠断头后，迅速在低温操作台上取脑，1% DEPC PBS冲洗血液，冰浴中分取大脑皮层、小脑、脑干、海马置液氮中保存备用。

1.2 主要材料

质粒pA1(rat α_1+pSPT19)、pKP137(rat β_2+pKP94)、pKP104(rat γ_{2S}+pSPT19)、pHR90(rat α_2+pSPT19)由瑞士Bern大学Sigel教授惠赠，菌种XL1-blue购于宝灵曼公司。主要试剂质粒提取试剂盒、地高辛RNA标记试剂盒、Northern ELISA试剂盒及内切酶均购于Boehringer公司。mRNA分离试剂盒购于Promega公司。

1.3 血气测定

大鼠断头前抽动脉血于630血气仪上测定。

1.4 脑组织总RNA的提取、鉴定、定量及mRNA的分离

按一步法提取总RNA[2]，紫外分光光度计鉴定并定量，使 D_{260}/D_{280} 均在2.00±0.10范围内，并将样品浓度调定为5 μl/μg。参照试剂盒说明采用磁珠方法分离mRNA，紫外分光光度计定量后−80 ℃存放。

1.5 cRNA探针的制备

电穿孔转化的菌种经LB扩增后，采用试剂盒提取，酶切鉴定后，试剂盒回收并纯化，参照试剂盒行体外转录并标记得正义和反义探针，定量后−80 ℃贮存。

1.6 Northern ELISA

参照试剂盒进行。生物素标记mRNA——乙醇沉淀——定量生物素标记的mRNA——杂交——免疫吸附——清洗——分光光度计检测 D_λ 值。以β-actin作标准曲线(D_{450}/mRNA)，求得mRNA的相对含量(mRNA/总RNA)。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用完全随机设计资料方差分析进行显著性检验。

2 结果

2.1 大鼠动脉血气分析结果见表1

表1 动脉血气分析结果($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Results of arterial blood gas analysis ($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

Group	pH	PO_2 (p/kPa)	PCO_2 (p/kPa)	HCO_3^- (C_B/mmol·L^{-1})
Control	7.40±0.03	13.70±1.09	5.41±0.78	25.64±2.47
Hypercapnia Ⅰ	7.21±0.02**	13.26±0.91	14.56±0.46**	41.83±2.72**
Hypercapnia Ⅱ	7.20±0.02**	12.75±1.05	14.70±0.51**	43.27±2.27**

**: $P<0.01$ *vs* control

2.2 各组不同部位$GABA_A$受体mRNA的相对含量见表2

表2 $GABA_A$ 受体mRNA在大鼠脑不同部位相对含量[ω(mRNA)/ng·mg^{-1}]

Tab 2 Content of $GABA_A$ receptor mRNA in different part of rat brain[ω(mRNA)/ng·mg^{-1}]

	Group	α_1	α_2	β_2	γ_2
Cerebellum	Control	302.25±42.25	53.33±7.03	255.77±37.75	162.75±22.75
	Hypercapnia Ⅰ	295.67±38.29	51.19±8.19	261.21±35.76	168.16±19.98
	Hypercapnia Ⅱ	312.56±40.12	54.29±7.99	249.65±34.11	165.10±20.21
Brainstem	Control	256.24±18.26	149.47±11.81	223.96±7.54	300.08±9.70
	Hypercapnia Ⅰ	319.45±18.07**	147.27±12.11	261.78±15.64**	348.79±17.35**
	Hypercapnia Ⅱ	321.97±19.28**	150.71±11.68	259.27±16.28**	352.67±19.34**
Hippocapum	Control	117.00±11.00	167.14±4.29	100.29±12.57	200.57±6.42
	Hypercapnia Ⅰ	212.78±19.16**	219.25±19.67**	139.65±15.34**	262.14±50.15**
	Hypercapnia Ⅱ	209.89±20.11**	223.26±19.11**	141.12±18.25**	271.19±48.29**
Cerebral cortex	Control	308.75±10.73	91.51±9.39	238.62±30.36	174.97±30.24
	Hypercapnia Ⅰ	358.12±18.14**	89.91±10.12	258.69±39.49*	194.98±37.12*
	Hypercapnia Ⅱ	360.16±17.16**	92.78±11.29	262.98±40.27*	197.91±36.49*

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

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

3　讨论

本研究结果表明, $GABA_A$ 受体 4 种亚单位 α_1、α_2、β_2、γ_2 之 mRNA 在脑组织中的含量不同, α_1 分布最为广泛, 大脑皮质、小脑、海马和脑干均有较高含量, 其中以脑干含最高; α_2 主要分布在海马和脑干, 大脑皮质和小脑含量很低; β_2 与 α_1 类似; γ_2 在海马、大脑皮质和脑干含量都很高, 小脑则很少。它们在呼吸相关部位脑干区的高表达, 提示它们参与呼吸调节和呼吸衰竭的可能。二氧化碳潴留大鼠, 不同脑区的 $GABA_A$ 受体 4 种亚单位的含量变化也不一致, α_1、β_2、γ_2 在脑干和海马区的升高非常明显, 在大脑皮质也有显著升高, 而在小脑则无明显变化, 说明 α_1、β_2、γ_2 亚单位与二氧化碳潴留的关系密切, 提示含有 α_1、β_2、γ_2 亚单位的 $GABA_A$ 受体可能参与二氧化碳潴留时的呼吸调节, 将不同亚单位的组合表达在卵母细胞膜上, 进行电生理测定可进一步明确。本研究还发现, 15%二氧化碳潴留大鼠 5 d 组的血气值、$GABA_A$ 亚单位 mRNA 的含量与 7 d 组无明显差异, 提示连续 5 d 高二氧化碳呼吸便可制备二氧化碳潴留大鼠模型。GABA 及 $GABA_A$ 受体参与呼吸调节的推论已提出多年, 在体动物给予 GABA 或 $GABA_A$ 受体的激动剂均可引起动物的呼吸抑制, 相反给予 $GABA_A$ 受体拮抗剂则引起呼吸增强, 但确切机制至今尚未阐明[3]。近年随着分子生物学、分子药理学和电生理膜片学技术的发展, 在对 $GABA_A$ 受体的结构有了深刻的认识后, 才逐步认识到 GABA 及 $GABA_A$ 受体在呼吸调节中的重要作用和它的主要机制, 即 GABA 与呼吸相关神经元细胞膜上的 $GABA_A$ 受体氯离子通道复合物结合, 打开氯通道, 引起氯离子内流, 使呼吸神经元出现超极化, 最终调节呼吸节律[4,5]。并且将呼吸中枢的概念扩大丰富, 呼吸中枢是指所有参与呼吸节律产生的神经元的总和, 而呼吸节律则由呼吸神经元的内在膜电位特性和它们之间的突触联系所决定[6]。近年 Feldman 实验室已成功的在 pre-Bötzinger 区分离出 7 种呼吸神经元, 并发现 $GABA_A$ 受体的功能的变化引起的呼吸神经元膜电位的改变与呼吸节律的变化密切相关[7,8]。最近的实验[9,10]提示二氧化碳确实可以作用于 $GABA_A$ 受体而改变大鼠呼吸状态。本研究发现二氧化碳潴留引起大鼠脑干和海马区 $GABA_A$ 受体 α_1、β_2、γ_2 mRNA 的增高, 提示二氧化碳潴留与 $GABA_A$ 受体有一定的关系, 其蛋白表达也可能增高, 进而表现为整体功能增强, 最终引起呼吸抑制。但 $GABA_A$ 受体表达增强及二氧化碳与 $GABA_A$ 受体的作用机制尚不明确, 我们推测可能与呼吸衰竭时中枢神经系统的整体神经递质平衡等因素有关, 确切的机制尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] Ellenberger H H. Distribution of bulbospinal gamma-aminobutyric acid-synthesizing neurons of the ventral respiratory group of the rat [J]. J Comp Neurol, 1999, 411(1): 130—144.

[2] Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1989, 162(1): 156—159.

[3] Brockhaus J, Ballanyi K. Synaptic inhibition in the isolated respiratory network of neonatal rats[J]. Eur J Neurosci, 1998, 10(12): 3 823—3 839.

[4] Rabbits M P, Aranda J, Bansal R. Effect of increased brain concentrations on breathing in unanesthetized newborn rabbits[J]. Biol Neonate, 1999, 76(3): 168—180.

[5] Mehta A K, Ticku M K. An update on $GABA_A$ receptors[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1999, 29(2-3): 196—217.

[6] Bianchi A L, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters[J]. Physiol Rev, 1995, 75(1): 1—45.

[7] Shao X M, Feldman J L. Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Bötzinger complex: differential roles of glycinergic and GABA ergic neural transmission [J]. J Neurophysiol, 1997, 77(4): 1 853—1 860.

[8] Gray P A, Rekling J C, Bocchiaro C M, *et al*. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the pre-Bötzinger complex[J]. Science, 1999, 286(5 444): 1 566—1 568.

[9] Dreshaj I A, Haxhiu M A, Abu-Shaweesh J, *et al*. CO_2-induced prolongation of expiratory time during early development[J]. Respir Physiol, 1999, 116(2-3): 125—132.

[10] Abu-Shaweesh J M, Dreshaj I A, Thomas A J, *et al*. Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats [J]. J Appl Physiol, 1999, 87(2): 484—490.

（编辑　陈聪连）

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