DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.031
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
1194 2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1194-03

脑出血血肿周边脑区谷氨酸及受体的变化

蒋晓江[1],董为伟[2],许志强[1],李书林[1],杨海棠[1] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042;[2]重庆医科大学附属一院神经内科,重庆 400016)

提 要:目的 观察脑出血过程中血肿周边脑区谷氨酸(Glu)、谷氨酸受体(GluR)的变化规律,探讨其对局部神经元的损伤机制。方法 应用高效液相色谱、受体的放射配基结合分析等,监测实验性脑出血后大鼠血肿周边脑区的谷氨酸及其受体含量。结果 脑出血后3 h血肿周边脑区Glu含量开始升高,在血肿形成的高峰期12 h达峰值;而血肿周边脑区GluR的表达在脑出血后6 h处于明显的低表达状态;Glu的含量与GluR的表达呈显著的负相关;血肿周边脑区GluR Kd值处于持续升高状态,且GluR与其Kd值变化表现非常显著的负相关。结论 Glu与血肿周边脑区神经元损伤密切相关,血肿周边脑区Glu与GluR结合力的分离,是血肿周边脑区神经元不可逆损伤的重要因素之一。

关键词:脑出血;谷氨酸;谷氨酸受体
中图法分类号:R341.17;R651.15 文献标识码:A

Changes of glutamate and its receptor contents in perihematomal brain regions following intracerebral hemorrhage

JIANG Xiao-jiang, DONG Wei-wei, XU Zhi-qiang, LI Shu-lin, YANG Hai-tang (Department of Cerebrovascular Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the changing principle of glutamate (Glu) and its receptor (GluR) contents in perihematomal brain regions after intracerebral hemorrhage for their roles in local neuron injury. Methods The contents of Glu and GluR in perihematomal brain regions were determined in the experimental intracerebral hemorrhage rat model with high-performance liquid chromatography (HPLC), radio-ligand binding assay of receptors (RBA). Results The Glu content in perihematomal brain regions began to elevate 3 h after the hemorrhage and reached a peak at the 12 th hour after the maximum hematoma. The expression level of GluR was low in the regions 6 h after the hemorrhage. The Glu content was negatively correlated to the GluR expression. The Kd value of GluR remained in an increasing tendency and it had a significant negative correlation with the expression of GluR. Conclusion The Glu in perihematomal brain regions is associated with the neuron injury around the hematoma. The dissociation of Glu and GluR might be one of important factors of the non-reversible neuron injury in perihematomal brain regions.

Key words: intracerebral hemorrhage; glutamate; glutamate receptor

兴奋性氨基酸(Excitatory amino acids, EAAs)受体是调节中枢神经系统(CNS)突触兴奋性的主要递质受体[1]。急性脑缺血(Acute cerebral ischemia, ACI)时,神经元过量释放谷氨酸(Glutamate, Glu)对缺血神经元的损伤起着重要作用[2],然而脑出血(Intracerebral hemorrhage, ICH)时,血肿周边谷氨酸(Glutamate, Glu)、谷氨酸受体(Glutamate receptor, GluR)以及GluR与GluR离解常数(Dissociation constant, Kd值)的变化规律尚不十分明确;血肿周边Glu代谢与血肿周边神经元的损伤的关系鲜见报道。为此,本实验对ICH时不同时相血肿周边脑区Glu的含量、GluR的容量及其Kd值进行了测定,拟探讨ICH条件下,血肿周边Glu、GluR及其Kd值变化与神经元损伤的相互关系及其病生机制。

作者简介:蒋晓江(1961—),重庆江津市人,博士,副教授,主要从事急性脑血循环障碍方面的研究。电话:(023)68757753

收稿日期:2000-05-04;修回日期:2000-10-10

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

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　实验动物选用健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 250～300 g, 由第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所动物中心提供。实验动物按随机原则分组接受不同的实验处理。本实验选用 8 个时相点, 分别为出血前(Pre-hemorrhage), 出血 30 min, 出血 3、6、12、24、48 及 72 h, 每个时相点均为 5 只动物。

1.1.2　大鼠脑出血模型的建立　　参照 Rosenberg[3] 报道的方法, 结合任氏改良即选用胶原酶(Collagenase)加肝素联合注射建立脑出血动物模型。手术对照组除不注入胶原酶及肝素外其余条件与出血组一致。

1.2　方法

1.2.1　Glu 含量检测　　冰盘上切取血肿周边脑组织约 60～120 mg, 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 将上清液定容为 2 ml, HPLG 分析系统检测, 磷苯二甲醛等柱前演生, 柱长 26 cm, 柱温 37 ℃, 流动相为 30% 甲醇/磷酸缓冲液。

1.2.2　GluR 最大结合容量及 Kd 值测定　　参照 Meeker 等[4] 方法进行。谷氨酸标准品为美国 Sigma 公司生产, ^{3}H-谷氨酸由上海原子核研究所标记。

1.2.3　脑出血模型各时相血肿容量的测定　　各时相造型结束后, 再次麻醉大鼠, 头部原位液氮冷冻 2～3 min, 快速断颅取全脑, 再置于－20 ℃冰柜中冷藏。以血肿中心为起点用冰冻切片机切片, 切片厚 25 μm, 连续切片 5 张, 切片血肿纵向长度(μm)＝切片厚度× 5, 每张切片的血肿截面积在显微镜下绘出, 然后通过 MAS-1 图像分析系统计算出血肿容量。

1.3　统计学处理

所有数据均由 Excel 7.0 数理统计程序进行贮存, 转换和运算。组内自身对照和配对实验数据用配对 t 检验。组间比较采用方差分析。

2　结果

2.1　脑出血组血肿容量的变化

造型 3～6 h, 血肿容量为(40.35±5.07)～(56.34±6.88) μl; 12～24 h, 血肿容量最大, 为(65.03±9.25)～(70.49±5.78) μl, 较 3～6 h 明显增大($P<0.01$); 而 48～72 h 血肿不再继续增大, 反呈明显缩小, 为(35.65±1.68)～(33.25±3.04) μl, 与 24 h 比较相差非常显著, $P<0.01$。

2.2　血肿部位 Glu 活性

对照组各时相 Glu 活性无明显变化, 与术前比较 $P>0.05$。出血组, 出血 3 h Glu 含量升高($P<0.05$); 12～24 h 达峰值, 与对照组比较相差极为显著($P<0.01$); 48～72 h 呈明显降低趋势, 见表 1。

表 1　脑出血血肿周边脑区谷氨酸活性变化(ω_B/ mg·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of Glu activity of perihematoma region in ICH(ω_B/ mg·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pre-hemorrhage (n=5)	Time after hemorrhage						
		30 min(n=5)	3 h(n=5)	6 h(n=5)	12 h(n=5)	24 h(n=5)	48 h(n=5)	72 h(n=5)
Control	3.26±0.39	4.01±0.66	5.68±1.35	5.73±1.86	3.28±0.62	3.56±0.74	3.54±0.57	3.47±0.69
ICH	3.18±0.57	4.56±1.35	8.01±1.35 *#	20.45±3.56 **##	37.62±4.38 **##	32.75±4.08 **##	6.53±1.75 **##	4.18±0.75 **##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* pre-hemorrhage; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control

2.3　血肿周边脑组织 GluR 的表达

对照组术后各时相, 血肿周边 GluR 的表达无明显变化, 与术前比较, $P>0.05$。脑出血后 3 h 血肿周边 GluR 开始呈下调趋势; 6 h 达低谷值, 与对照组及出血前比较, $P<0.05$; 以后呈缓慢上升趋势, 但均低于同时相对照组受体的表达水平($P<0.05$), 见表 2。

表 2　脑出血血肿周边脑区谷氨酸受体的表达(m_B/ pmol·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expression of GluR of perihematoma region in ICH(m_B/ pmol·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pre-hemorrhage (n=5)	Time after hemorrhage						
		30 min(n=5)	3 h(n=5)	6 h(n=5)	12 h(n=5)	24 h(n=5)	48 h(n=5)	72 h(n=5)
Control	3.27±1.27	3.54±1.04	2.53±0.76	2.46±0.54	3.22±1.47	3.39±1.20	3.47±1.28	3.98±1.55
ICH	3.18±1.03	3.14±1.06	2.46±0.86	1.50±0.35 **	1.55±0.21 **#	1.78±0.39 *#	1.98±0.41 *#	2.05±0.34 *#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* pre-hemorrhage; #: $P<0.05$ *vs* control

2.4　血肿周边 GluR Kd 值的变化

对照组术后与术前比较, 各时相 Kd 值无明显变化($P>0.05$)。脑出血后 6 h 血肿周边 GluR 的 Kd 值明显升高; 12 h 达峰值(6.05±1.05)nmol/ l], 与对照组比较, $P<0.01$, 见表 3。

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

表3 脑出血血肿周边脑区谷氨酸受体Kd值的变化(C_B/ nmol·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Changes of Kd value of perihematoma region in ICH (C_B/ nmol·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pre-hemorrhage (n=5)	Time after hemorrhage						
		30 min(n=5)	3 h(n=5)	6 h(n=5)	12 h(n=5)	24 h(n=5)	48 h(n=5)	72 h(n=5)
Control	3.58±1.42	3.55±1.37	3.98±1.42	3.65±0.57	3.54±0.57	3.56±0.98	3.63±0.45	3.55±0.79
ICH	3.24±1.05	3.65±1.28	3.56±1.58	5.32±1.24 $^{\#}$	6.05±1.05 $^{**\#\#}$	5.68±1.35 $^{*\#\#}$	5.34±1.45 $^{*\#\#}$	5.37±1.67 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* pre-hemorrhage; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control

2.5 血肿周边Glu与GluR及GluR Kd值的相关分析

血肿周边Glu与GluR呈显著负相关(n=40, r=−0.306, P<0.05); GluR与GluR Kd值呈非常显著负相关(n=40, r=−0.452, P<0.01); 而Glu与GluR Kd值不相关(n=40, r=0.273, P>0.05)。

3 讨论

Glu是兴奋性氨基酸的重要成员, 在CNS是含量最丰富的氨基酸, 不仅具有神经递质的作用, 而且具有介导神经元代谢的机能。本实验研究在脑出血特定条件下, 血肿周边脑区Glu, GluR及其亲合力的变化规律, 探讨其致伤机制。实验结果表明: 血肿周边Glu的含量在脑出血后3 h开始明显上升, 在血肿的高峰期12 h达峰值, ; 在血肿面积减小的吸收期48~72 h, Glu含量虽有明显下降, 但仍然极为明显的高于对照组水平(P<0.01), 反映了血肿周边Glu活性变化存在着一定的自身规律。另外血肿周边脑组织GluR的表达在脑出血6 h后处于明显的低表达状态, 12 h以后虽有回升趋势, 但与对照组比较仍处于明显低水平(P<0.05); 并且, 血肿周边Glu的含量与其GluR表达呈显著的负相关(P<0.05)。血肿周边GluR Kd值也呈一定规律性, 是Glu与其受体结合力的倒数, 与GluR表达的变化相反, 脑出血后6 h开始Kd值处于持续升高的状态(P<0.05), 与此同时血肿周边GluR与其Kd值仍表现非常显著的负相关(P<0.01)。

大鼠脑出血血肿高峰期GluR及其亲合力与Glu的关系为下向特异性逆向调节, 24~72 h呈上向特异性逆向调节, 探讨血肿周边GluR变化的病理生理机制, 可能是由于血肿周边NC在Glu损伤作用下, NC合成的GluR发生了质的变化, 其亲合力处于低落状态, 虽然并未使GluR数目下降, 但造成了GluR与其亲合力的分离现象, 这并非出血灶周边NC的保护机制(为了减轻Glu对NC的毒性作用), 而是出血周边NC的不可逆性损害的重要病理表现。

脑出血血肿高峰期Glu含量升高的机制可能与下列因素有关: ①血肿周边NC损害, 自发性释放增多; ②Glu与GluR的亲合力下降, Glu-GluR复合物减少, 游离的Glu增多; ③NC快速除极时Ca^{2+}-依赖性释放; ④血浆Glu病灶局部外渗增多[5]; ⑤血肿周边缺血带NC能量代谢障碍, 使Glu重摄取减少[6]。

我们认为在NC变性坏死过程中, 脑出血时, 细胞外间隙过度的Glu堆积, 在血肿周边脑水肿区, 由于Glu被星形胶质细胞摄取, 促进乳酸积聚[5], 促发超载效应网络(Network of overloading effect, NOE)扩大坏死区, 增加半影带, 从而加重脑出血CNS损害的发生、发展。另有人报道, 脑温的轻度变化, 对Glu的毒性作用有较大的影响, 轻度的降低脑温和升高脑温通过调节细胞外间隙Glu的弥散, 而起着保护和损害作用[7], 因此, 脑出血强调低温脑保护有着重要的临床意义。

参考文献:

[1] Nakanishi N. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function[J]. Science, 1992, 258(5 082): 597—603.

[2] Benveniste H, Jorgensen M B, Sandbery M, *et al*. Ischemic damage in hippocampal CAI is dependent on glutamate release and intact innervation from CA3[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1989, 9(5): 629—639.

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

[4] Meeker R B, Greewood R S, Khayward J N. Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary[J]. Endocrinology, 1994, 134(2): 621—629.

[5] Wagnet K R, Xi G, Hua Y, *et al*. Early metabolic alterations in edematous perihematomal brain regions following experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1998, 88(6): 1 058—1 065.

[6] Yurdakok M, Coskun T, Erdem G, *et al*. Cerebrospinal fluid amino acid levels in newborn infants with intracranial hemorrhage [J]. Acta Paediatr Jpn, 1995, 37(6): 694—696.

[7] Suehiro E, Fujisawa H, Ito H, *et al*. Brain temperature modifies glutamate neurotoxicity *in vivo*[J]. J Neurotrauma, 1999, 16(4): 285—297.

(编辑 冯崇英)

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