DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.010
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
22 2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0022-04

梭曼诱发惊厥后大鼠脑内兴奋性氨基酸的变化

景德强[1],陈尔瑜[2],余争平[3],程天民[3] ([1]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学解剖学教研室,上海 200433;[3]第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要 目的:对脑内兴奋性氨基酸的变化进行定位研究。方法:应用Beckman-6300氨基酸分析仪和601黄金系统色谱工作站,对梭曼惊厥后不同时相大鼠的新鲜脑组织进行定位检测。结果:梭曼诱发惊厥后脑内谷氨酸和天门冬氨酸的水平显著降低,谷氨酸下降最明显的是惊厥30 min后的大脑皮质和海马,分别是正常组的53.2%和52.6%,小脑的嗅球内谷氨酸水平显著下降,天门冬氨酸更易受梭曼中毒的影响,惊厥后5、30、90 min 3个时点测定的6个脑区(纹状体、大脑皮质、海马、中脑、小脑、间脑和嗅球)中均显著下降。结论:梭曼中毒后脑内谷氨酸和天门冬氨酸水平显著降低,递质耗竭是递质活动增加的征象,因此,谷氨酸和天门冬氨酸递质活动增加可能在梭曼中毒性惊厥的发生和维持中起重要作用。

关键词 梭曼;惊厥;谷氨酸;天门冬氨酸;脑
中图法分类号 R827.171 文献标识码 A

Changes of excitatory amino acids in discrete brain regions after soman-induced seizures in rats

JING De-qiang, CHEN Er-yu, YU Zheng-ping, CHENG Tian-min (Department of Neurobiology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To detect changes in levels of glutamate and asparate in rat discrete brain regions which may be involved in the mechanism of seizure initiation and maintenance in soman-induced seizures. Methods: Total amino acids in freshly prepared brain regions in rats at different time phases after seizure dissected under microscope were detected by using a Beckman-6300 analyzer and 601 Gold system for spectrochrome analyzer. Results: The levels of total glutamate and asparate were significantly decreased in the rat brain after soman-induced seizures. The lowest level of glutamate was observed in cerebral cortex and hippocampus in 30 min after seizure initiation. It decreased in other regions including cerebellar cortex and olfactory bulb. Asparate appeared to be more vulnerable to soman intoxication. The levels of asparate in 6 brain regions including striatum cerebral cortex, hippocampus, midbrain, cerebellum, diencephalon and olfactory bulb at 5, 30 and 90 min after seizure were significantly decreased as compared with the control. Conclusion: The excitatory amino acid transmitter activity may play an important role in soman-induced seizures.

Key words soman; seizures; glutamate; asparate; brain

梭曼(Pinacolyl methylphosphono-fluoridate)所致惊厥的非胆碱能机制日益引起人们的重视。虽然梭曼中毒后乙酰胆碱的变化最为显著,但在中枢神经系统中,乙酰胆碱的变化并不能解释所有的神经行为。梭曼中毒后,大鼠脑内乙酰胆碱和胆碱的水平升高并伴有一个大于90%的乙酰胆碱酯酶抑制峰,动物发生紧张阵挛性惊厥[1]。近年来的研究已确立了兴奋性氨基酸在惊厥中的作用[2]。兴奋性氨基酸可能是引起兴奋性脑损伤、缺血缺氧脑损伤的共同介质[3]。谷氨酸、天门冬氨酸通过NMDA受体介导钙内流,引起神经元内级联

作者简介:景德强(1963.10),男,河南省新乡市人,博士,副教授,主要从事神经解剖学方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752232

收稿日期:1998-09-03;修回日期:1998-12-29

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

事件的发生，进而引起包括基因转录变化的一系列细胞生物学变化[2,4,6]。本研究运用液相色谱法测定了梭曼所致惊厥大鼠脑内兴奋性氨基酸－谷氨酸、天门冬氨酸的变化。

1　材料和方法

1.1　动物及分组

健康笼式分性别群养的雄性 Wistar 大鼠 25 只（三医大动物所提供），体重 250～300 g，依据实验目的进行分组，见表 1。

表 1　动物分组

Tab 1　Groups of experimental animals

Groups	Time after soman injection (min)			
	0	20	45	105
Normal	5	–	–	–
Control	–	1	2	2
Convulsion	–	5	5	5

1.2　动物致惊

所用梭曼纯度大于 96.4%，由军事医学科学院药物毒物研究所提供，梭曼经丙二醇－生理盐水稀释后冰冻贮存备用。惊厥组动物以 LD_{50} 剂量（100 μg/kg 体重）梭曼皮下注射。对照组设 2 组，其一为正常动物组，不加任何处理；另一组为亚惊厥剂量中毒组，以 60 μg/kg 体重剂量的梭曼皮下注射。

1.3　样品准备

动物存活至相应时间后，断头处死。在 7 个脑区包括纹状体、大脑皮质（顶叶）、海马、中脑（上、下丘所对应部分）、小脑（皮质）、间脑（包括丘脑、下丘脑）以及嗅球迅速取材，精确称重。置样品于冰浴玻管中，加入 10%磺基水杨酸（4 ml/100 mg 组织），冰浴下，以玻璃匀浆器手动匀浆。组织匀浆以低温高速离心机 14 000 r/min 离心 20 min，取上清液，保存在－40 ℃低温冰箱待测。

1.4　样品测定

1.4.1　试剂和仪器　　标准混合氨基酸（光谱纯，美国 Beckman 公司），Li-A 缓冲液、Li-C 缓冲液、Li-S 稀释液、Li-S 缓冲液、Li-R 再生液（Beckman 公司），茚三酮（分析纯，上海生物制品研究所），二甲亚砜（分析纯，江苏正兴化工研究所）。检测仪器为 Beckman 6300 黄金系统氨基酸分析仪和 601 黄金系统色谱工作站。

1.4.2　色谱条件　　色谱柱，Beckman 氨基酸分析锂柱（10 cm×4.0 mm）流动相。Li-A、Li-C、Li-R，流速 20 ml/h。茚三酮显色剂，流速 10 ml/min。柱温，33.5℃，77℃。进样量：50 μl/次。比色波长 570 nm。

1.4.3　标准曲线　　将混合氨基酸标准液稀释成 400、200、100、50、25、15 μg/ml，每个浓度二针进样，获得混合氨基酸标准曲线，其最低检测限为 12 μmol/L。6 种混合氨基酸在 15～400 μg/ml 范围内线性良好（r=0.975～0.998）。

2　结果

2.1　动物惊厥表现

接受亚惊厥剂量注射的所有动物均未发生阵挛性惊厥，其中一例发生轻微的惊厥前驱症状，即轻度的“湿狗样颤抖”。惊厥组所有动物，在注射 15 min 后，均发生典型紧张阵挛性惊厥：前肢、头面肌阵挛发作，全身肌紧张、匍匐，Straud 尾征明显。

2.2　梭曼诱发惊厥后，大鼠主要脑区谷氨酸、天门冬氨酸的变化

惊厥相关脑区各组谷氨酸浓度的测定值见表 2。

表 2　梭曼诱发惊厥后大鼠脑内谷氨酸水平的变化（m_B/μmol·g^{-1}，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Changes of Glu levels in rat brain after soman-induced seizures（m_B/μmol·g^{-1}，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Regions	Control	Non-convulsion	Convulsion (5 min)	Convulsion (30 min)	Convulsion (90 min)
Striatum	9.23±2.41	10.11±2.54	10.73±1.91	9.21±0.63	9.19±3.73
Cerebral cortex	11.65±1.59	8.56±1.11	7.19±2.30	6.20±1.07**	8.07±0.67**
Hippocampus	9.89±2.21	8.66±1.31	8.33±2.74	5.20±0.95**	7.57±1.39*
Mid-brain	8.61±1.55	9.30±2.17	7.29±1.45	7.47±0.89	6.42±0.81*
Cerebellum	8.42±0.91	7.66±1.18	6.54±0.78*	6.72±0.99*	7.55±1.12
Olfactory bulb	10.32±1.51	13.17±0.94*	10.11±1.62	8.43±0.78*	8.65±1.01*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

接受亚惊厥剂注射的对照组各例动物，除嗅球外各个测定脑区谷氨酸的测定值与正常大鼠的测定值之间差异不显著（$P>0.05$）。惊厥组动物，惊厥 5 min 以后，大部分脑区没有显著变化，只有小脑内显著减少（$P<0.05$）。惊厥 30 min 的动物，大脑皮质和海马内谷氨酸浓度下降非常显著（$P<0.01$），分别是正常组的 53.2%和 52.6%，小脑和嗅球内的谷氨酸也显著下降

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

($P<0.05$)，比例分别是 79.81%和 81.69%，纹状体和中脑内的变化不显著。惊厥后 90 min，皮质中谷氨酸浓度的下降最显著，海马、中脑嗅球内也有显著下降，纹状体小脑内谷氨酸浓度的变化没有显著意义。有显著变化脑区谷氨酸浓度下降的百分比见表 3。

天门冬氨酸的浓度比谷氨酸更易受梭曼中毒的影响。非致惊剂量注射的动物的纹状体、小脑和间脑内天门冬氨酸水平已显著降低 ($P<0.05$)，但皮质、海马、中脑和嗅球内的变化不显著。惊厥组动物，天门冬氨酸浓度变化均显著。在测定的 7 个脑区中，天门冬氨酸水平出现程度不同的下降。各脑区天门冬氨酸测定值见表 4。

表 3 梭曼诱发惊厥后大鼠脑内谷氨酸浓度的百分比(%)

Tab 3 Percentage* Glu concentration in the brain regions after soman-induced seizures(%)

Regions	Convulsion		
	5 min	30 min	90 min
Cerebral cortex	-	53.22	69.27
Hippocampus	-	52.58	76.54
Midbrain	-	-	74.54
Cerebellum	77.67	79.81	89.67
Olfactory bulb	-	81.69	83.82

*: Data calculated from the mean values

表 4 梭曼诱发惊厥后大鼠脑内天门冬氨酸水平的变化(m_B/μmol·g^{-1}, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes of Asp levels in rat brain after soman-induced seizures (m_B/μmol·g^{-1}, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Regions	Control	Non-convulsion	Convulsion(5 min)	Convulsion(30 min)	Convulsion(90 min)
Striatum	2.36±0.47	1.59±0.51	1.32±0.06	1.89±0.09*	
Cerebral cortex	2.81±0.51	2.73±0.41	2.41±0.45*	2.05±0.16	2.36±0.07*
Hippocampus	2.51±0.26	2.45±0.23	2.30±0.14*	1.96±0.08	1.98±0.12**
Mid-brain	3.12±0.57	3.45±0.43	2.74±0.85*	2.56±0.39	2.79±0.09**
Cerebellum	2.12±0.41	1.55±0.39	1.62±0.54*	1.59±0.11	1.79±0.09**
Diencephalon	2.39±0.17	1.97±0.44*	1.86±0.80*	1.65±0.35*	1.83±0.24**
Olfactory bulb	2.81±0.37	2.14±0.58	2.26±0.44*	2.07±0.21**	2.18±0.61

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

3 讨论

梭曼中毒后脑内各种神经递质均发生显著变化[3]。本结果表明：梭曼诱发惊厥的大鼠脑内兴奋性氨基酸总体水平显著下降；谷氨酸水平的下降在惊厥 5 min 尚不明显，30 min 和 90 min 后，大脑皮质、海马内显著下降，小脑、嗅球、中脑也有程度不一的下降。天门冬氨酸下降的幅度没有谷氨酸大，但出现更早、更广泛。在非致惊剂量的中毒动物，纹状体、小脑和间脑内的天门冬氨酸已有明显下降，而惊厥组的 3 个时相点 5 min、30 min、90 min 的所有测定脑区（纹状体、大脑皮质、海马、中脑、小脑皮质、间脑和嗅球）均出现了显著下降。兴奋性氨基酸是脑内主要兴奋性递质之一，许多作者在不同的动物模型中测定了它们的脑内变化，由于检测方法和取材过程不同得出的结果参差不一。例如 Fosbraey[5] 在豚鼠梭曼中毒模型中，测定了脑内氨基酸的变化，天门冬氨酸和谷氨酸的下降主要出现在海马、大脑皮质、纹状体中，最明显的时相点是用药后 60～240 min，而下降的幅度与本结果有较大的差异；谷氨酸下降幅度最大的部位是用药 60 min 后的大脑皮质，是正常对照的 81.6%比本结果的 53.22%要高得多。除了动物种属外，中毒剂量可能也是差别的原因之一，他们使用的剂量是 31.2 μg/kg。不同类型的惊厥，引起谷氨酸变化也有差别，Allen[6] 在同型半胱氨酸水平就明显下降，至 90 min，海马内下降幅度最大，但只占对照组的 41%。许多作者在许多惊厥模型中都报道了谷氨酸和天门冬氨酸的变化，虽然出现的部位和程度不尽相同[5,7]，但惊厥后脑内谷氨酸、天门冬氨酸总体水平下降的结论是一致的。

对梭曼性惊厥来说，报道兴奋性氨基酸变化的区域有梨状皮质、海马、大脑皮质、小脑、纹状体等区，较其它类型惊厥涉及的脑区更为广泛。梨状皮质、大脑皮质（同型新皮质）海马是被经常报道变化最明显的脑区。这些区域也是兴奋性氨基酸末梢支配较为丰富的脑区[8]。颅内微透析分析表明：惊厥后，海马细胞外液谷氨酸、天门冬氨酸的水平明显增高，惊厥刺激可以导致培养的海马脑片释放谷氨酸[7]。谷氨酸通过酶降解和重摄取灭活，从而导致其总体水平的降低。局部脑区递质耗竭是该脑区递质活动增加的征象[5,8]。惊厥脑区谷氨酸合成的前体谷氨酰胺有明显的升高[5]，NMDA 受体阻断剂对梭曼性惊厥有良好的治疗作用，上述事实都说明梭曼惊厥中兴奋性氨基酸递质活动增加。

参考文献

[1] Lundy P M, Shih T M. Examination of the role of central

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

cholinergic mechanisms in the therapeutic effects of HL-6 in organophosphate poisoning[J]. J Neurochem, 1993, 40(2): 132—138.

[2] Lallement G, Carpentier P, Pernot-Marino I, *et al*. Involvement of the different rat hippocampal glutamatergic receptors in development of seizures induced by soman: an autoradiographic study [J]. Neuretoxicology, 1991, 12(9): 862—873.

[3] Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids[J]. Trends Pharmacol Sci, 1990, 11(4): 462—468.

[4] Schreiber S S, Baudry M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus: a role for gene expression[J]. Trends Neurosci, 1995, 18(4): 446—451.

[5] Fosbraey P, Wetherell J R, French M C. Neurotransmitter changes in guinea-pig brain regions following soman intoxication [J]. J Neurochem, 1990, 54(1): 72—74.

[6] Allen I C, Grieve A, Griffiths R. Differential changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures[J]. J Neurochem, 1986, 46(22): 1582-1592.

[7] Dingledine R, McBrain C J, McNamara J O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy[J]. TIPS, 1990, 11(4): 334—338.

[8] 张祖暄. 兴奋性氨基酸[A]. 见: 韩济生 主编. 神经科学纲要[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 399—406.

（编辑　刘　鹏）

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)01-0025-01

尿毒症病人行食管癌和食管平滑肌瘤手术治疗 1 例报告

Surgical resection of eosophageal carcinoma and leiomyoma in a patient with uremia

程　波, 张国强　　(第三军医大学附属新桥医院胸外科, 重庆 400037)

患者, 女, 65 岁。1976 年因偶有进食梗噎感, 食管吞钡拍片及胃镜活检诊断为“食管平滑肌瘤”, 未行治疗; 1989 年因浮肿、夜尿增多、贫血, 经检查诊断为“慢性肾小球肾炎”、“慢性肾功能不全”, 长期门诊治疗; 1998 年 6 月出现进行性加重的吞咽困难, 于 7 月 13 日入院。查体: 慢性病容、贫血貌、双下肢凹陷性水肿, 余无特殊; 实验室检查 BUN 27.95 mmol/L, Cr 848.3 μmol/L, 入院后经胃镜活检诊断为食管粘膜中分化鳞癌。在手术前 3 d 给病人行血透 2 次, BUN 降至 9.47 mmol/L, Cr 降至 370.5 μmol/L, 行食管下段癌及平滑肌瘤切除, 食管胃主动脉弓下吻合器吻合术。术后第 3 天 BUN 升至 24.34 mmol/L, Cr 升至 642.4 μmol/L, 在带胸腔引流管条件下行血透 1 次, 第 4 天经胸片证实无胸腔积液后, 拔引流管; 术后病理报告: ①食管中分化鳞癌; ②食管平滑肌瘤。患者于术后 20 d 出院, 目前仍健在。

讨论

食管平滑肌瘤合并食管癌, 在临床上较为少见[1,2]。本例因患者有尿毒症, 通常列为外科手术禁忌征。通过该病例的治疗, 我们体会到对于尿毒症病人合并其他外科疾病时, 只要透析治疗有效, 加之对肾功能的严密监测和保护, 是可以进行包括胸部手术这类外科治疗的。

尿毒症病人围手术后期补液应严格控制液体量, 量出为入, 特别要严格控制晶体和钾的补充。严格观察血钾及肾功能, 病人术前的最后 1 次透析及术后第 1 次透析以采用无肝素透析为佳, 以减少病人术中、术后渗血。尿毒症患者伤口愈合能力差, 抵抗力差, 要重视防治感染, 使用无肾毒性的抗菌素, 本例采用的是莫敌, 使用激素应慎重, 本例术后未使用激素。

关键词　食管癌; 食管平滑肌瘤; 治疗; 尿毒症
中图法分类号　R692.505　　文献标识码　B

参考文献

[1] Yoshikane H, Tsukawoto Y, Niwa Y, *et al*. The coexistence of esophageal submucosal tumor and carcinoma[J]. Endoscopy, 1995, 27(1): 119—123.

[2] Nagashima R, Takeda H, Motoyama T, *et al*. Coexistence of superficial esophageal carcinoma and leiomyoma: Case report of an endoscopic resection[J]. Endoscopy, 1997, 29(7): 683—684.

（编辑　王　红）

作者简介: 程　波(1960.4), 男, 贵州省安顺市人, 主治医师, 讲师, 发表论文 5 篇。电话: (023)68755724

收稿日期: 1999-03-24; 修回日期: 1999-10-22

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