DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.021

内皮素及其 A受体在兔颅脑创伤后脑血流量变化中的作用及意义

张云东* 邹咏文 许民辉 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经外科) 重庆, 400042

提 要 目的: 了解内皮素(ET)及其 A受体在颅脑创伤后脑血流量变化中的作用及意义。方法: 130只家兔致以左额顶叶为着力部位的加速性撞击伤,动态观察脑组织内皮素含量变化、内皮素 A受体 mRNA表达和定位变化,内皮素 A受体拮抗剂 BQ123的作用及上述变化对脑血流量变化的影响。结果: 脑创伤后血浆、脑脊液和局部脑组织内皮素含量显著升高;内皮素 A受体 mRNA主要分布于脑血管内皮细胞,表达显著增强;创伤后局部脑血流量显著降低,应用 BQ123治疗的动物,血流量下降被明显抑制。结论: 内皮素通过其 A受体的调节在颅脑创伤后脑缺血的形成中有重要作用;应用内皮素 A受体拮抗剂可以防治颅脑创伤后脑缺血。

关键词 内皮素;内皮素 A受体; BQ123;脑损伤;脑血流量
中图法分类号 R349.21; R651.15

颅脑创伤后早期脑缺血与临床症状和预后密切相关,明显的脑缺血总是导致严重的继发性损害。近年研究发现: 内皮素(ET)是血管收缩作用最强的血管活性因子,对脑血管的收缩作用明显强于外周血管的作用,但目前对颅脑创伤后脑血流量下降的原因尚不明确,本实验探讨了颅脑创伤后 ET及 ETA受体在脑血流量变化中的作用及意义,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

健康 4~5月龄雄性家兔 130只,体重(2.7±0.5) kg,随机分为: 假伤对照组 35只,颅脑撞击伤组 45只,颅脑撞击伤治疗组 25只和治疗对照组 25只。除假伤对照组外,其余各组又分成伤后 30 min、2、8、24 h治疗组,以 Brures图谱[1]定位,参照 Feuerstein[2]方法,伤后立即从脑室给予拮抗剂 BQ123 18 μg体积 5 μl治疗对照组则给予载体磷酸缓冲液(pH7.4) 5 μl。3%戊巴比妥钠静脉注射麻醉(30 mg/kg)后,用 BIM-2型生物撞击机,以左侧额顶部为着力部位,调节高压气舱压力为 0.7 MPa,二次锤撞击速度 8 m/s,撞击幅度为 0.4 cm。

1.2 血浆、脑脊液和局部脑组织 ET-1含量的测定

于左颈静脉采血 2 ml,按 301医院长城免疫技术研究所提供的 ET放免药盒说明书进行。

1.3 脑组织 ETA受体 mRNA的检测

用地高辛标记 ETA受体 cDNA探针,采用漂浮法行原位杂交[3],于光镜 200倍下任选 10个视野对阳性细胞定量计数。

1.4 局部脑血流量的测定

固定头部,按 Brures图谱确定皮层、基底节和海马坐标,依伤后各时相点用 POG-200型末梢循环血流量测定仪测量血流量。

1.5 病理学观察

1.6 统计学分析

依不同情况行单因素和双因素方差分析。

2 结果

2.1 伤后 ET-1含量的变化

伤后 30 min血浆 ET-1含量开始升高,2 h明显升高,与假伤对照组相差显著($P<0.05$),8 h达高峰,24 h仍显著高于假伤对照组。伤后 30 min即发现脑脊液中 ET-1含量已明显升高,较假伤对照组相差显著($P<0.05$),2 h达高峰,逐渐回落,但 24 h仍显著高于伤前水平。伤后 30 min即发现大脑皮质、基底节、海马处 ET-1含量较假伤对照组显著升高($P<0.05$),三部位组织均于伤后 2 h达高峰。

2.2 伤后脑组织 ETA受体 mRNA原位杂交结果

正常 ETA受体 mRNA在血管内皮细胞有表达,见图 1,伤后 ETA受体 mRNA在血管内皮细胞表达明显增强,见图 2,在皮质、基底节和海马可见较多阳性染色的内皮细胞,阳性细胞计数及变化规律,见表 1。

2.3 局部脑血流量变化

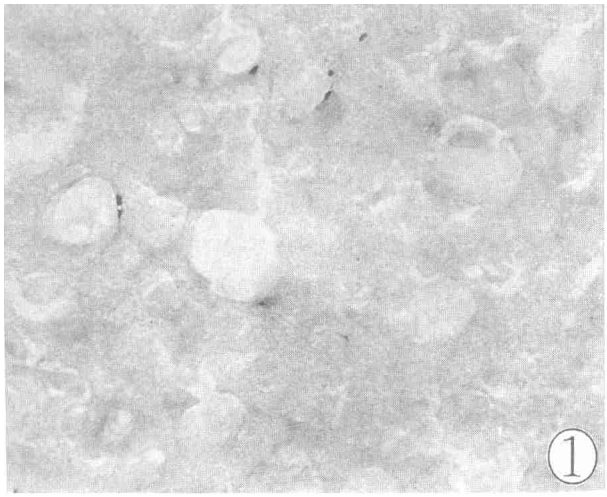
伤后 0.5 h大脑皮质、基底节、海马血流量即迅速下降,2 h下降至最低点,24 h仍较伤前明显降低。使用 ET受体拮抗剂 BQ123的动物,脑组织血流量下降明显被抑制,但仍显著低于伤前水平,各组比较,见表 2。

2.4 病理改变

光镜: 伤后 2 h脑实质呈点、片状出血,神经细胞呈缺血性改变,血管周围间隙增宽。电镜: 撞击伤后 2 h可见血管内皮细胞内腔面出现膨出样小泡指状突起,胞饮小泡数量明显增多,血管周围的神经细胞或其触突肿胀,空泡形成,神经细胞胞浆变性水肿、空泡化。治疗组上述改变明显减轻。

* 张云东,男,31岁,住院医师,硕士

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



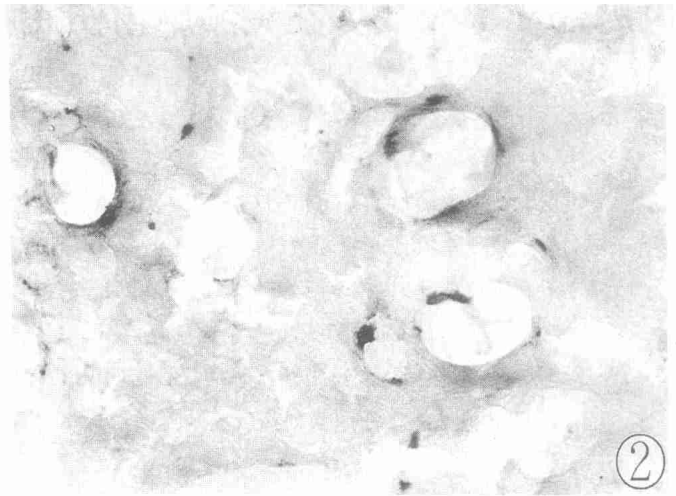


图 1 正常脑组织毛细血管内皮细胞 ETA受体 mRNA表达 (原位杂交× 400)

Fig 1 Expression of ETA receptor mRNA in endothelial cells of normal cerebral capillary vessels (*in situ* hybridization× 400)

图 2 伤后 24 h, ETA受体 mRNA在脑组织毛细血管内皮细胞表达 (原位杂交× 400)

Fig 2 Expression of ETA receptor mRNA in endothelial cells of cerebral capillary vessels 24 h after TBI (*in situ* hybridization× 400)

表 1 家兔颅脑撞击伤后脑组织 ETA受体 mRNA阳性细胞计数 ($\bar{x}\pm s$,阳性细胞数 /× 200视野, $n=10$)

Tab 1 The number of positive cells expressing ETA mRNA in brain tissue after TBI ($\bar{x}\pm s$, positive cells/× 200, $n=10$)

Position	Fake TBI group	Time phase after TBI (h)			
		0.5	2	8	24
Cortex	35.1± 15.4	50.1± 15.9△	60.4± 19.3△△	107.7± 36.2△△	82.9± 25.2△△
Basilarnode	38.7± 15.1	47.1± 15.4	88.5± 24.9△△	106.3± 39.5△△	92.8± 26.2△△
Hippocampus	37.8± 16.6	50.7± 14.9	60.3± 26.0△	93.8± 25.8△△	100.0± 24.3△△

△: $P<0.05$,△△: $P<0.01$ *vs* Fake TBI group on the same location

表 2 家兔颅脑撞击伤后脑局部血流量变化 ($\bar{x}\pm s$, q_v/ml min^{-1}· 100 g^{-1})

Tab 2 Variation of regional CBF after TBI ($\bar{x}\pm s$, q_v/ml min^{-1}· 100 g^{-1})

Group	Fake TBI group	Time phase after TBI (h)			
		0.5	2	8	24
Cortex					
TBI group	62.84± 12.74	36.12± 8.44△△*	23.76± 4.46△△**	27.40± 10.04△△*	33.31± 8.46△△**
Treated group	63.74± 11.31	48.63± 6.08△	44.60± 7.60△△	47.50± 9.77△	50.04± 6.35△
Treated control group	63.16± 15.00	38.52± 10.04△	24.22± 4.61△△☆☆	28.62± 10.14△△☆	33.91± 8.94△△☆
Basilarnode					
TBI group	62.78± 13.27	37.03± 8.34△△	21.99± 9.38△△**	22.65± 5.99△△**	29.97± 8.94△△**
Treated group	62.6± 9.94	49.14± 11.20	45.55± 9.38△	48.36± 5.88△	50.80± 9.09
Treated control group	60.79± 14.60	37.38± 8.56△	22.05± 8.16△△☆☆	23.97± 6.27△△☆☆	30.48± 7.43△△☆☆
Hippocampus					
TBI group	55.75± 11.67	33.87± 5.53△△	20.62± 7.84△△**	22.22± 6.26△△**	28.76± 7.66△△**
Treated group	56.00± 9.48	44.77± 9.64△	42.82± 6.92△	43.13± 5.49△	43.74± 10.88
Treated control group	52.45± 13.25	33.76± 5.45△	20.38± 6.54△△☆☆	22.13± 7.16△△☆☆	28.74± 7.81△△☆

△: $P<0.05$,△△: $P<0.01$ *vs* Fake TBI group on the same location;* : $P<0.05$,** : $P<0.01$ *vs* treated group at the same time phase and location;☆: $P<0.05$,☆☆: $P<0.01$ *vs* treated control group at same time phase and location

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

3 讨论

ET在中枢神经系统的多种调节功能日渐受人们的重视。脑组织血管内皮细胞、平滑肌细胞、神经元和胶质细胞均可产生 ET,而这些细胞存在 ET的真正作用只有在使用 ET特异性受体拮抗剂后才会明确。

本实验发现家兔颅脑撞击伤后 30 min,脑组织 ET-1含量即显著升高,伤后 2 h达高峰,24 h仍然处于较高水平,伤后 ETA受体 mRNA在脑血管内皮细胞上的表达迅速增加;同时测定了脑组织血流量,在伤后 30 min即迅速下降,伤后 2 h降至最低点,为伤前的 35%,24 h仍显著低于伤前水平。脑创伤后 ET含量迅速升高,与脑血管内皮细胞上调的 ETA受体结合,使脑血流量下降,致脑缺血。BQ123治疗的动物,脑血流量下降被显著抑制。推测伤后脑血流的变化,可能是由于伤后脑微血管周围的神经细胞和血管壁细胞合成和释放 ET-1显著增加,同时 ETA受体在脑血管内皮细胞上的表达迅速增加,ET-1与其 A受体结合,激活血管壁 ETA受体,发生血管收缩,引起局部血流显著减少[4]。大量释放的 ET可能参与脑血管痉挛和脑梗塞的病理过程。有研究发现:蛛网膜下腔出血病人脑脊液中 ET-1含量升高,同时有脑血管痉挛;颅脑撞击伤后常有脑缺血存在,且有血浆和脑脊液 ET含量升高,说明 ET-1与其 A受体结合在脑血管痉挛中可能起重要作用。

ETA受体的特异性拮抗剂 BQ123是一种多肽,BQ123抑制 ET-1与 ETA受体结合的作用比对 ETB受体的作用强 2500倍[5]。使用 BQ123治疗后,脑池内注入自体血引起的脑血流量下降可被显著抑制。在颅脑撞击伤后使用 ETA受体特异性拮抗剂 BQ123,可显著阻止脑血流量下降,表明 ETA受体参与了脑血管收缩,脑组织血流量下降主要是由脑组织增加的 ET-1通过 ETA受体引起[6]。

ET-1致脑血流量减少的机制可能为:在脑组织的毛细血管内皮细胞,ET-1与其 A体结合激活磷脂酰肌醇水解和促进 DNA的合成[7]。由于三磷酸肌醇(IP3)的形成,IP3可作用于光面内质网和肌浆网,使细胞内贮钙池中 Ca^{2+} 释放入胞浆,增加细胞内游离 Ca^{2+} 浓度[8],而激活细胞内的收缩蛋白,导致血流量下降。伤后脑血流量、脑组织 ET-1含量和 ETA受体发生了异常改变,由于 ET-1对脑血流动力学的严重影响,必然导致脑组织细胞损伤。由此,对 ET及其受体各亚型的深入研究,将对颅脑创伤后继发性脑损害的预防和治疗有一定意义。

参考文献

1 范进藩,江振裕 译.电生理学方法.上海:上海科学技术出版社,1963. 348~358

2 Feuerstein G, Gu J L, Ohlstein E H, *et al*. Peptidic endothelin-1 receptor antagonist BQ123, and neuroprotection. Peptides, 1994, 15(3): 467

3 蔡文琴,王伯沄 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994. 415~418

4 Fuxe K, Kurosawa N, Cintra A, *et al*. Involvement of local ischemia in endothlin-1 induced lesions of the neostriatum of the anaesthetized rat. Exp Brain Res, 1992, 88(1): 132

5 Ihara M, Noguchi K, Saeki T, *et al*. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. Life Sci, 1991, 50(2): 247

6 Adner M, You J, Edvinsson L, *et al*. Characterization of endothelin-A receptors in the cerebral circulation. Neuroreport, 1993, 4(3): 441

7 Vigne P, Marsault R, Breittmayer P J, *et al*. Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesisin brain caillary endothelial cells. Biochem J, 1990, 266(3): 415

8 Masaki T. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation implications for vascular function. Circulation, 1991, 84(4): 1457

(收稿: 1998-09-15;修回: 1999-03-30)

(编辑　汪勤俭)

Role and significance of endothelin and its receptor A in changes of cerebral blood flow after traumatic brain injury in rabbits

Zhang Yundong, Zou Yongwen, Xu Minghui (Department of Neurosurgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the role of endothelin (ET) and its receptor A in cerebral blood flow (CBF) after traumatic brain injury (TBI). Methods: After the model of TBI was established in 130 adult rabbits, the changes in content of ET-1, expression and location of messenger ribonucleic acid

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