DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.023


# 急性脑缺血谷氨酸受体的变化特征

何明利* 陈曼娥 王景周 蒋晓江 张 猛 (第三军医大学附属大坪医院神经内科)重庆,400042

提 要 目的:观察脑缺血再灌流过程中缺血灶和下丘脑的谷氨酸受体的变化特征。方法:应用高效液相色谱仪,受体的放射配体结合分析分别监测大脑中动脉阻塞再灌流大鼠缺血灶和下丘脑的谷氨酸(Glu)含量,GluR容量及离解常数 Kd变化。结果:缺血及再灌流全过程中,缺血灶的 GluR及其亲合力持续降低,而下丘脑呈现两次大幅度起伏变化,两部位 Glu含量与 GluR容量均呈显著负相关($r$分别为 -0.233和 -0.385, $P$分别 <0.05和 0.001)。结论:缺血早期缺血灶的 GluR有敏感的生物学活性,早期阻滞其 GluR对缺血性脑损伤有重要干预意义;缺血及再灌流全过程中,下丘脑的 GluR始终具有敏感的生物学活性,干预其 GluR对减轻缺血性应激性脑损伤有重要价值。

关键词 脑缺血;谷氨酸;受体
中图法分类号 R743.31

已证明,急性脑缺血(Acute cerebral ischemia, ACI)时神经元过量释放的谷氨酸(Glutamate, Glu)对缺血神经元损伤起关键作用。然而,有关谷氨酸受体(Glutamate receptor, GluR)在急性脑缺血-再灌流过程中的变化特征及作用机制的研究,目前尚缺乏报道。本实验利用可再灌流的大鼠大脑中动脉阻塞(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,动态监测了缺血灶和下丘脑的 Glu含量,GluR容量及其离解常数 Kd的变化,拟深入探讨 GluR在 ACI过程中的量变特征及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型

1.1.1 动物分组 Wistar大鼠(军科院购买)90只,雌雄不拘,体重 0.25~0.30 kg,随机分为对照(Control)组、缺血前(Preischemia, Pre)、缺血 15 min(I15min)、I30min、I1h、缺血 1 h再灌流(Repurfusion)3 h(IR3h)、IR24h、IR48h、IR96h 9组,每组 10只大鼠(Glu含量、GluR容量各用 5只)。

1.1.2 大鼠 MCA缺血-再灌流模型 按照 Rodney等[1]报道的方法复制。

### 1.2 指标检测

1.2.1 Glu含量 冰盘上切取下丘脑、海马各约 60~120mg,称重后,用 10%磺基水杨酸钠溶液 2 ml冰浴匀浆,1000 $g$离心 15 min,将上清液定容为 2 ml,高效液相色谱仪检测,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 参照 Meeker等[2]报道方法进行。谷氨酸标准品为 Sigma公司产品,$^3$H-谷氨酸由上海原子核研究所标记。

### 1.3 数据统计

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$表示。采用 Exce 17.0计算机软件进行 $t$检验和相关分析等。

## 2 结果

### 2.1 Glu含量变化

与对照组相比,MCAO 15 min,缺血灶和下丘脑的 Glu含量均迅速增加,于 I1 h达高峰,IR3 h下降到基线水平。IR24 h后,缺血灶的 Glu含量无显著增加,而下丘脑再次中等程度升高,并持续至 IR 96h。

### 2.2 GluR容量的变化

MCAO 15 min缺血灶的 GluR容量显著降低($P$ <0.05),并于再灌流各时相点持续降低而不能回升;下丘脑 GluR容量于 I30 min显著降低($P$ <0.001),I 1h达低谷,IR 3h回升至基线水平,IR 24h再次下降,于 IR 48h开始缓慢复升,至 IR 96h基本复至基线水平($P$ >0.05)。

### 2.3 Kd值的变化

MCAO 15min缺血灶的 GluR Kd值显著升高($P$ <0.001),并于再灌流各时相点持续降升高。下丘脑于 I 15min显著低于缺血前及对照组($P$ <0.05),于 I1 h过低谷,IR3h回升至基线水平,IR 24h和 IR 48h再次显著下降,IR 96h再次回升到基线水平,说明 GluR的亲和力在缺血和再灌注过程中两次升高。见附表。

* 何明利,男,35岁,主治医师,硕士

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

附表　缺血灶、下丘脑谷氨酸含量、谷氨酸受体容量和 Kd值变化 ($\bar{x}\pm s$)

**Table　The changes of Glu content, GluR capacity and Kd values in ischemic focus (IF) and in hypothalamus (HY) ($\bar{x}\pm s$)**

| Index | Location | Control | Pre | I 15min | I 30min | I 1h | IR 3h | IR 24h | IR 48h | IR 96h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glu | IF | 6.24± 0.81 | 6.16± 0.98 | 11.90± 2.90 | 16.94± 1.36*** | 18.87± 5.29*** | 7.11± 1.09 | 7.57± 1.23 | 7.58± 1.17 | 7.18± 0.82 |
| (mg·g$^{-1}$, wt) | HY | 3.2± 0.51 | 3.33± 0.33 | 5.62± 1.28* | 10.91± 4.52** | 14.16± 2.58*** | 3.66± 0.14 | 5.52± 0.58*** | 7.67± 1.18*** | 4.50± 0.78* |
| GluR | IF | 2.92± 0.48 | 3.16± 0.41 | 2.59± 0.25 | 2.14± 0.43** | 1.35± 0.48*** | 1.27± 0.29*** | 1.24± 0.31*** | 1.21± 0.33*** | 1.08± 0.37*** |
| (pmol·g$^{-1}$, pre) | HY | 1.94± 0.40 | 2.17± 0.47 | 2.04± 0.45 | 1.51± 0.45* | 1.05± 0.36** | 2.16± 0.20 | 0.98± 0.44** | 1.13± 0.40 | 1.59± 0.67 |
| Kd values | IF | 3.23± 0.42 | 2.85± 0.37 | 4.19± 0.38 | 5.18± 1.23*** | 7.27± 0.90*** | 4.37± 0.43* | 5.73± 0.69*** | 6.27± 0.75*** | 6.50± 0.93*** |
| (nmol) | HY | 1.78± 0.28 | 1.66± 0.26 | 2.65± 0.88 | 4.02± 0.88*** | 5.65± 0.69*** | 1.69± 0.23 | 3.32± 0.52*** | 3.94± 0.31*** | 2.17± 0.39 |

$n$ = 5,* : $P$ < 0.05,** : $P$ < 0.01,*** : $P$ < 0.001 *vs* control

### 2.4　Glu含量与 GluR容量及 Kd值的关系

MCAO后缺血灶的 Glu含量与其 GluR容量间呈显著负相关 ($r$ = − 0.233, $P$ < 0.05);下丘脑的 Glu含量与其 GluR容量间呈极显著负相关 ($r$ = − 0.385, $P$ < 0.001)。

## 3　讨论

在体和离体研究均证实,Glu的兴奋毒性作用是神经元缺血性损伤和迟发性坏死的重要原因,Glu的兴奋毒性作用的发挥有赖于 GluR的活性[3,4]。Glu主要刺激突轴后膜上的 NMDA受体,使 $Na^+$、$K^+$、$Ca^{2+}$ 通透性增加导致缓慢兴奋效应,致使神经元过度兴奋,ATP耗竭;次外,Glu激活非 NMDA受体,引起 $Na^+$、$K^+$ 单价阳离子通道开放,导致快速兴奋效应[5]。GluR的过度激活引起细胞渗透压增加,能量代谢障碍和 $Ca^{2+}$ 超载,导致神经元急性损伤和迟发性坏死[6]。然而 GluR本身在脑缺血及再灌流过程中的量变特征及机制的研究目前尚未见报道。

本实验证实,MCAO 15min缺血灶的 GluR容量显著降低,并于再灌流各时相点持续降低而不能回升,而下丘脑的 GluR容量呈现两次大幅度起伏变化,两部位的 Glu含量与 GluR容量密切相关。显然,缺血早期缺血灶的 GluR容量的降低是由于 GluR对突然大幅度升高的 Glu的抑制反应,表现为下向调节。随着缺血及再灌注损伤的加重,缺血脑组织合成 GluR的能力虽然受损,而呈现持续失活,即受体容量和亲合力持续降低,提示缺血脑组织的 GluR在缺血早期阻滞其 GluR对缺血性脑损伤有重要干预意义;鉴于下丘脑的 GluR及其亲合力在缺血及再灌流全过程中两次起伏,并与 Glu的含量密切相关,呈下向同种特异性反向调节,提示缺血及再灌流全过程中,下丘脑的 GluR始终具有敏感的生物学活性,干预其 GluR对减轻缺血性应激性脑损伤有重要价值。

## 参考文献


1 Rodney J, Jan Jakubowski, Robert W. Middle cerebeal artery occlusion without craniectomy in rats, which method works best. Stroke, 1993; 24(2): 294

2 Meeker R B, Greenwood R S, Hayward J N. Glutamate receptors inthe rat hypothalamas and pituitary. Endocrinology, 1994; 132(2): 621

3 Castillo J, Davier A, Navwiro *et al*. Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct syze and neurological deficit in ischemic stroke. Stroke, 1996; 27(6): 1060

4 Bullock R, Zauner A, Woodward J *et al*. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. Stroke, 1995; 26(3): 2187

5 Dalkara T, Ayata C, Demirci M *et al*. Effects of cerebral ischemia on N-methyl-D-aspartateand dihydropyridine-sensitive calcium currents. Stroke, 1996; 27(1): 127

6 Jullio H, Garcia, Liu Kaifeng *et al*. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in wistar rats prigresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. Stroke, 1996; 24(4): 636


(收稿: 1997-05-23;修回: 1997-12-18)

(编辑　汪勤俭)

# Characteristics of changes of glutamate receptors in the brain during acute cerebral ischemia in rats

He Mingli, Chen Man'e, Wang Jingzhou, Jiang Xiaojiang, Zhang Meng (Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

**Abstract** **Objective**: To observe the characteristics of changes of glutamate (Glu) receptors in ischemic foci and the hypothalamus during cerebral ischemia/reperfusion. **Methods**: After the middle cerebral artery was occluded and reperfused in rats, the changes of the Glu content and GluR capacity and its Kd in the is-

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

chemic foci and the hypothalamus were observed with radio-legend binding assay and high-performance liquid chromatography. **Results**: In the whole course of the acute cerebral ischemia/reperfusion, GluR capacity and affinity were continuously decreased. Glu content and GluR capacity in the ischemic foci were negatively correlated with those in the hypothalamus ($r = -0.233$ and $-0.385$, $P < 0.05$ and 0.001). **Conclusion**: In the early stage of ischemia, GluR in the ischemic foci is biologically sensitive, which suggests that the blocking of GluR in the early stage of ischemia is very important for reducing ischemic damage in the brain. GluR in the hypothalamus exhibits persistent sensitive biological activity during the whole course of ischemia/reperfusion. Therefore, blocking of GluR is also of important value for reducing ischemic stress reaction-induced brain damage.

**Key words** cerebral ischemia; glutamate; receptor; rat

# 肥厚性瘢痕中胶原降解及其影响因素的实验研究

# An experimental study on collagen degradation and its affected factors in hypertrophic scar

武继祥* 吴宗耀 (第三军医大学附属西南医院康复理疗科) 重庆, 400038

肥厚性瘢痕(HTS)是烧伤和创伤后最常见的后遗症,更是烧伤后康复的一大难题,但其发病机制至今仍不清楚,临床上也无确切有效的防治方法。HTS是创伤愈合过程中胶原合成与降解平衡失调,胶原异常聚积的结果,它以组织纤维化、胶原、4硫酸软骨素(Ch-4-S)等细胞外基质(ECM)明显增多为特征。从理论上讲,胶原合成过度或胶原降解减少都可能导致HTS的形成。前者已有了大量的研究,后者的研究却极少。胶原酶(MMP-1)是基质金属蛋白酶家族的重要成员,是Ⅰ、Ⅲ型胶原降解的关键酶,在启动体内胶原降解中具有重要的作用,其表达与活性受许多因素的影响,如生长因子、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)及ECM成份等。目前对HTS中MMP-1表达与活性、胶原降解及调控因素尚不清楚。为此本文应用原位杂交、斑点杂交、免疫组化、氨基酸分析、SDS聚丙烯酰胺凝胶加胶原底物电泳、$^3$H-脯氨酸掺入法和形态学观察等多项技术对HTS组织中TGFβ、MMP-1和TIMP-1的表达,酶活性及胶原降解状况,以及TGFβ、透明质酸(HA)和Ch-4-S等对HTS成纤维细胞MMP-1、TIMP-1表达、酶活性及胶原合成与降解的影响进行了较为系统的研究,观察了HA和Ch-4-S对TGF-β生物活性的影响,以及用胶原酶治疗HTS的作用,以阐明胶原降解其及调控因素在HTS形成中的作用,探讨用胶原酶等酶制剂治疗HTS的可行性。主要研究结果如下:① 首次报道了HTS组织中TGFβ、MMP-1和TIMP-1表达、酶活性以及HTS组织的形态特征,结果发现:在HTS组织中1)胶原降解较正常皮肤(NS)明显减少。2)MMP-1表达与NS无差异,但MMP-1活性显著下降。3)TIMP-1表达较NS明显增高。4)TGFβ表达和蛋白产物较NS显著增加。5)在形态上,HTS显著增多的细胞外基质成份(Ch-4-S)包绕胶原纤维。这些结果提示:MMP-1活性下降,胶原降解减少可能是HTS形成的重要原因。TIMP-1可能是抑制MMP-1活性最重要的因子。TGF-β的过度表达和蛋白产物积聚与胶原降解减少、HTS形成密切相关。异常增多的Ch-4-S可能阻止MMP-1对胶原纤维的降解。② 首次研究了TGFβ、HA和Ch-4-S等对HTS成纤维细胞MMP-1、TIMP-1表达和对酶活性的影响,发现TGFβ抑制酶的表达和活性,促进TIMP-1的表达,提示HTS胶原降解减少可能跟TGFβ对MMP-1表达与酶活性的抑制有关。HA上调酶的表达和酶的活性,促进胶原纤维的有序排列。③ 研究了TGFβ、HA和Ch-4-S等对HTS成纤维细胞胶原合成与降解的作用,结果显示:TGFβ促进胶原合成,抑制胶原降解,HA促进胶原降解。这些结果提示TGFβ对胶原代谢的双重调节作用是导致HTS形成的主要原因。HA减轻瘢痕形成可能与它促进胶原降解、改善胶原纤维排列有关。④ 首次观察了HA和Ch-4-S对TGFβ活性的影响,发现HA减弱TGFβ对MMP-1表达和活性的抑制作用。Ch-4-S显著增加TGFβ促胶原合成的作用,提示Ch-4-S和TGFβ的协同作用是HTS胶原合成异常增加的重要原因。⑤ 在HTS裸鼠移植模型中,局部注射胶原酶可以促使胶原降解,使瘢痕变小变薄,提示局部应用胶原酶等酶制剂可能是治疗HTS的一个新的途径。

关键词 肥厚性瘢痕;胶原酶;金属蛋白酶组织抑制因子;胶原降解;胶原合成;成纤维细胞;透明质酸;转化生长因子β;4-硫酸软骨素

中图法分类号 R619.6

(收稿: 1997-12-03;修回: 1998-01-05)

(编辑 张大春)

* 武继祥,男,36岁,讲师,博士研究生

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