DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.038

经验交流

脑外伤后 Ca^{2+} 在继发性神经损害中的作用

Role of Ca^{2+} in secondary neuronal damage following traumatic brain injury

范润金* 王宪荣 (第三军医大学附属西南医院神经外科) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨钙离子在脑外伤后继发性神经损害中的作用。方法: 选用60只 Wistar大鼠,外伤组动物以自由落体致脑外伤模型,分别于伤后不同时相点取脑标本测定细胞内游离钙。结果: 脑外伤后6 h,脑细胞内游离钙显著升高,约为对照组的5倍,伤后 72 h达到最高峰,10倍于对照组,病理检查显示不同时相有相应程度的神经损害。结论: 脑外伤后, Ca^{2+} 在继发性神经损害中起着重要作用。

近年来国外的许多研究表明,在缺血缺氧条件下,神经细胞内游离钙在很短时间内就可以显著升高,并成为神经细胞继发性损害、死亡的重要原因[1]。但国内还没有有关神经细胞胞体游离钙变化方面的研究。本实验检测了细胞胞体的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化、探讨 Ca^{2+} 在脑外伤后继发性神经损害中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型

60只 Wistar大鼠(由第三军医大学动物所提供),体重 220 ± 20 g 随机分成正常对照组(n = 10),脑外伤组、外伤组又分成6 24 48 72 和168 h 5个不同的时相点(每组 n = 10)。

动物按袁氏撞击致脑外伤模型,打击力度为 3000 cm·g,打击深度为 5 mm 于不同时相点断头取出左右大脑半球,一半作含水量测定,另一半病理取材后,测细胞内游离钙。

1.2 脑细胞游离钙的测定

新取出的脑组织块剪碎至1 mm× 1 mm× 1 mm大小、置于装有 4 ml 0.25% 的胰蛋白酶溶液(含 NaCl 0.2 mol/L, KCl 5.4 mmol/L, Glucose 5.56 mmol/L, NaCl 16.9 mmol/L, EGTA5.26 mmol/L, pH7.8)中,在 37℃的水浴箱中保温消化 20 min,终止消化后将细胞悬液调制到 10^{-7} 个细胞/ml,台盼蓝检测细胞活性不小于95%,取 1 ml细胞悬液,加入 Fura-2/AM (终浓度 5μm)混匀后置于 37℃水浴箱中、保温 45 min,最后以日立 F-3010型荧光检测仪测出 F Fmax 及 Fmin,按以下公式计算出 $[Ca^{2+}]_i$

$$[Ca^{2+}]_i = Kd\frac{F-Fmin}{Fmax-F}(nmol/L) \qquad Kd = 224$$

1.3 脑水含量测定

标本取出吸去表面的水份,称重,置于 110℃的电热瓶器烘烤 24 h 再称取干重、按以下公式计算出含水量:

$$含水量(g/g干组织) = \frac{湿重-干重}{干重}$$

1.4 病理检查

病理标本分别进行光镜及电镜检查。

1.5 统计学处理

所有数据均以第三军医大学统计程度单因素方差分析及相关分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 脑细胞内游离钙变化

脑外伤后、脑细胞内游离钙 6 h即有明显升高,约为正常对照组的5倍,此后进一步升高,伤后 72 h达到高峰,约为对照组的10倍,伤后 7 d虽然明显下降,但仍高于对照组(P < 0.01),见表1。

表1 脑细胞内游离钙的变化

脑外伤后时间(t /h)	n	对照组	外伤组
	10	152.3± 10.91	
6	10		805.27± 64.95**
24	10		924.32± 62.58**
48	10		1214.12± 142.76**
72	10		1449.34± 67.89**
168	10		311.73± 37.84**

** : P < 0.01与对照组比较

2.2 脑组织含水量的变化

脑外伤后 6 h 脑组织含水量就有明显增加,与对照组比较 P < 0.01,伤后 72 h达到高峰,之后逐渐下降,但伤后 168 h仍高于正常,与对照比较 P < 0.01,见表2

* 范润金 男, 32岁,主治医师,硕士,现在成都军区昆明总医院神经外科 昆明, 650032

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

表 2　脑组织含水量的变化

脑外伤后时间 (t /h)	n	对照组	外伤组
	10	3.26± 0.15	
6	10		3.50± 0.11**
24	10		3.89± 0.15**
48	10		4.01± 0.11**
72	10		4.05± 0.10**
168	10		3.63± 0.13**

** : $P < 0.01$与 对照 组比 较

2.3　病理改变

2.3.1　光镜改变　伤后 6 h可见广泛的神经细胞肿胀,胞浆疏松,尼氏小体减少或消失,血管周围间隙增宽。伤后 72 h 上述现象更为明显,另外,还可见局灶性出血及软化灶,其中有炎细胞浸润。

2.3.2　电镜改变　伤后 6 h神经元显示不同程度的变性,表现为核染色质结块、集边,核仁靠边。胞浆中线粒体嵴断裂,呈空泡样变性,突触明显扩张、髓鞘样变性,突触小泡减少或消失。伤后 72 h 上述改变更为明显、神经元核染色质消失、溶解。胶质细胞核固缩,髓鞘变性较 6 h 更显著,血管内皮细胞肿胀,胞浆疏松化,管腔狭窄。

3　讨论

钙离子作为一种第二信使,普遍存在真核生物的细胞内。静息状态下,细胞内游离钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]i$)仅为 0.1 μm,而细胞受到某种刺激后可以升高到几个 μm,如果 $[Ca^{2+}]i$ 持续升高就会造成细胞损害。Philip等[1]用脑片缺氧模型研究发现:在缺氧条件下,细胞内游离钙浓度在 3~ 5 min 内就由 100~ 250 nmol,升高到 1000~ 2500 nmol 在 $[Ca^{2+}]i$ 升高的同时伴有组织间乳酸脱氢酶 (LDH)的升高,由此推测在脑缺血缺氧损害时,首先破坏细胞膜的完整性。

脑外伤时神经细胞 Ca^{2+} 通道变化的研究刚刚起步。KeyiYang等[2]用 TBI模型研究发现:脑外伤后有过度的兴奋性神经递质释放,其中谷氨酸还可直接引起细胞内 Ca^{2+} 持续升高,它与继发性神经损害有直接的关系[3]。落体致伤模型研究发现:脑外伤后 30 min,神经细胞突轴体游离钙明显升高。本研究结果发现:脑外伤后 6 h,脑细胞内游离钙显著升高,约为对照组的 5 倍,此后继续升高,到伤后 72 h达到高峰,约为对照组的 10倍,伤后 7 d,仍高于正常对照组 ($P < 0.01$)。

神经细胞钙超载被认为是其死亡的共同途径,如果不及时阻止细胞内钙升高,受损细胞最终将走向死亡。$[Ca^{2+}]i$升高后对神经细胞的损害作用主要表现在以下几个方面:① $[Ca^{2+}]i$升高到一定程度就会转移并沉积于线粒体腔和嵴上,干扰线粒体氧化磷酸化过程的电子传递,ATP生成障碍,使细胞内 ATP依赖的一切活动下降,甚至停滞[4]。本实验电镜观察:伤后 6 h 神经细胞显示不同程度的变性,核染色质结块、集边、胞浆中线粒体嵴断裂、溶解或呈现空泡状变性内质网扩张。伤后 72 h 上述改变更明显,核膜断裂;部份核溶解,线粒体空泡状变性,这一形态学改变几乎与 $[Ca^{2+}]i$升高是同步的,进一步说明 Ca^{2+} 参与细胞损伤的过程;② 残余氧可以生成氧自由基,对细胞造成损害;③ 高浓度的细胞内钙可以使糖分解的多种酶失活,而多种蛋白酶、磷脂酶等被激活。中性蛋白激活可以分解微管微丝、髓鞘和其它一些膜性蛋白成份,使细胞骨架受损[5]; Ca^{2+} 还可以激活磷脂酶,使膜磷脂分解,释放出磷酯酰、有机磷酸和花生四烯酸等,花生四烯酸又可转化成前列腺素 (PG)和白细胞介素 (IL),产生大量的自由基。膜溶解后,大量溶酶体释放,造成了广泛的细胞损害;④ 脑内 Ca^{2+} 聚积时, Ca^{2+} 进入细胞血管内皮细胞,引起内皮细胞肿胀,内皮细胞间隙扩大、胞饮作用增加,血脑屏障开放,产生血管源性脑水肿。光镜观察:神经细胞周围间隙扩大,核固缩、尼氏小体消失,有脑软化灶及出血灶形成,血管周围间隙增宽。电镜证实,脑外伤后 6 h脑内血管内皮细胞肿胀明显,伤后 72 h 血管内皮肿胀更明显,管腔变窄。测定脑水含量发现:伤后 6 h脑水含量显著升高,伤后 48、72 h升高更为明显 ($P < 0.01$)相关分析结果:脑组织含水量变化与神经细胞 $[Ca^{2+}]i$的变化呈非常显著的正相关 ($r = 0.801$, $P < 0.001$),可以推测: Ca^{2+} 在继发性神经损害、脑水肿的发生过程中起着重要作用。

关键词　脑外伤; Ca^{2+} ;第二信使

中图法分类号　R651.15

参考文献

1 Philip E, Bickler. Bonnic M *et al*. Causes of calcium accumulation in rat cortical brain slices during hypoxia and ischemic: role of ion channels and membrane damage. Brain Res, 1994; 665: 269

2 Keyi yang, William C, Edward D *et al*. Alteration of protein kinase C in rat hippocampus following traumatic brain injury. J of Neurotraum, 1993; 10(3): 287

3 David D, Limbrick J R, Leren B *et al*, Inability to restore resting intracellular calcium levels as an early indicatory of delayed neuronal cell death. Brain Res, 1995; 690: 145

4 Vink R, Head V A, Rogers P J *et al*. Mitochondial metabolism following traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma, 1990; 7(1): 21

5 Young W. Role of calcium in central nervous system injuries. J of Neurotrauma, 1992; 9(Supp I): s9

(收稿: 1997-06-20;修回: 1998-01-07)

(编辑　冷怀明)

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