DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.008

脑缺血与再灌流期脑组织内皮素和突触体游离 Ca^{2+} 的变化

郑彩梅 汪青松* 李露斯 (第三军医大学附属西南医院神经内科) 重庆,630038

提 要 建立全脑缺血再灌流大鼠模型,测定脑组织内皮素与脑突触体游离 Ca^{2+} 的含量,并观察尼莫地平治疗的影响。结果示缺血 20 min 内皮素与突触体 Ca^{2+} 含量明显增高,持续至再灌流第 4 天;尼莫地平治疗组脑组织内皮素(endothelin,ET)含量明显降低,神经元损害亦明显减轻。讨论在脑缺血和再灌流时 ET 参与神经元损害与细胞内 Ca^{2+} 超载的关系。

关键词 脑缺血;再灌流;内皮素;尼莫地平;钙
中图法分类号 R743.31

内皮素(endothelin,ET)是近年来发现的一种具有强烈缩血管的多肽,在许多疾病的病理生理过程中起着重要的作用,脑缺血后脑组织或血浆 ET 的变化已有少数文献报道[1],再灌流后 ET 的变化如何?它与细胞内和第二信使 Ca^{2+} 的关系如何?它们可能对再灌流脑损伤的影响怎样?现尚不很清楚,本实验采用大鼠全脑缺血再灌流模型,测定脑组织内皮素与脑突触 $[Ca^{2+}]i$ 的含量变化,旨在探讨它们的关系,并探讨钙拮抗剂对它们的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠,采用 Pulsinelli 4 血管闭塞法[2]制成全脑缺血,松开颈总动脉则为再灌流期,假手术组(SAM 组)操作方法同前,仅不夹闭动脉。实验分为缺血 20 min 组(I 组)、缺血 20 min 后再灌流 1 h、6 h、2 d、4 d 组(第 1 小时、第 6 小时、第 2 天、第 4 天组)。于第 4 天组缺血前 15 min 与缺血后 20 min 各腹腔注射一次尼莫地平 1 mg/kg,作为治疗组。

1.2 脑突触体内游离 Ca^{2+} 测定

按 Dodd 法[3]以不同浓度蔗糖液差速离心法分离出脑突触体后,加入 Napss 液与 10 μl 1 mm Fura-2AM 液中置 37℃下温育,参照 Grykievicz 等方法,用日立 MPF-4 型荧光分光仪检测,以 nmol/L 单位表示突触体内游离 Ca^{2+} 含量。

1.3 脑组织 ET 含量

脑组织取出后立即置入液氮中保存,ET 药盒由解放军总医院东亚免疫技术研究室提供,测定时取出脑组织,用内切式匀浆,取出部分匀浆按 Lowry 法测出蛋白含量,其余匀浆于 4℃下 1400× g 离心 20 min,取 0.1 ml 按药盒说明作 ET 含量放免测定,脑组织 ET 含量以 pg/mg pr 单位表示。

1.4 病理组织学观察

将 SAM 组、第 4 天未治疗组与第 4 天尼莫地平治疗组的鼠脑置于 4% Formalin 液固定后,常规脱水,石蜡包埋,切片厚 5 μm,HE 染色,光镜下观察新皮层与海马神经元损害程度,新皮层神经元按 Pulsinelli 的不完全定量计分法[4]表示。0 分:神经细胞正常;1 分:少数神经细胞损害;3 分:大部分神经细胞损害。海马神经元采用网格片每毫米长度 CA_1 区锥体细胞层中坏死神经元数目表示。

2 结果

脑缺血与再灌流各组脑突触体 $[Ca^{2+}]i$ 含量和脑组织 ET 含量见表 1。

当脑缺血 20 min 时,脑组织 ET 与突触体 $[Ca^{2+}]i$ 明显增高,第 1 小时组增高更明显,以后继续增高,到第 4 天有下降的趋势。

表 1 脑突触体 $[Ca^{2+}]i$ 和脑组织 ET 含量

Tab 1 The contents of free Ca^{2+} in synaptoms and brain ET

	SAM	I	R 1 h	R 6 h	R 2 d	R 4 d
Free Ca^{2+} in synaptoms (nmol/L)	102.97±14.77	234.90±27.07※※	403.58±54.53※※	1041.60±115.86※※	906.69±28.39※※	874.26±33.68※※
ET (pg/mg pr)	25.07±3.60	50.66±19.78※	54.92±31.62※	218.96±27.93※※	1397.98±237.77※※	212.75±37.11※※

※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$ *vs* SAM

* 现在解放军105医院 北京,100000

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

本实验将采用钙拮抗剂尼莫地平治疗的与未治疗的第4天组进行对比观察，比较两组脑 ET 含量、新皮层与海马 CA_1 区神经元损害程度，其结果见表2。

由表2可见，于再灌流4 d，无论治疗组与未治疗的与假手术组比较，脑组织 ET 含量均明显增高，皮层神经损害计数与海马 CA_1 区神经元坏死数目都明显加重，但治疗组与未治疗组比较，脑组织 ET 含量明显降低，神经元损害亦明显减轻。

表 2　尼莫地平治疗对脑 ET 含量与神经元损伤的影响

Tab 2　The effect of Nimodipine on the contents of brain ET and neuronal damage

	ET (pg/mg pr)	The score of Neuronal damage in neo-cortex	No of necrosis neuron in the CA1 subficalx of hippocampus/mm
SAM	25.07±3.60	0.00±0.00	0.00±0.00
No treatment group	212.75±37.11※※	1.44±0.53※※	137.78±25.62※※
Treatment group	105.95±53.35※※△△	1.05±0.05※※△△	70.26±12.01※※△△

※※：$P<0.01$ *vs* SAM group；△△：$P<0.01$ *vs* no treatment group

3　讨论

ET 是一种血管调节肽，其合成和分泌是在 mRNA 转录和翻译水平上进行的，神经细胞中也存有 ET 受体，受体的 mRNA 均在脑中有表达，ET 的合成与分泌受多种化学或物理因素的调节，如肾上腺素、正肾上腺素、凝血酶、缺氧、血管受机械性牵拉等[5]。当脑缺血、缺氧应激状态下，刺激血管内皮细胞合成与释放 ET，近年已有文献报道脑缺血后脑组织和血浆中 ET 含量增高[1]。本实验脑缺血大鼠除见到缺血期脑组织 ET 含量增高外，同时还发现再灌流早期脑组织 ET 含量仍继续增高，再灌流期 ET 含量增高的原因可能由于脑缺血后损害的内皮细胞恢复还需要一个过程；再者，脑缺血、缺氧可引起肾上腺素释放，后者又可诱导 ET 释放，单胺类递质代谢的紊乱不仅发生在脑缺血期，还可持续至再灌流早期[6]，因此再灌流早期脑组织 ET 含量仍然增高，ET 不仅参与了缺血性脑损伤，也可能参与了再灌流脑损伤。

ET 又是一种 Ca^{2+} 动员性肽，也是一种二氢吡啶敏感的 Ca^{2+} 通道激动剂，ET 激发神经细胞信息传递的机理不很清楚，目前认为可能通过两种信号传递系统，一是激活电压的 L 型 Ca^{2+} 通道，使胞浆内 Ca^{2+} 增高，二是通过与其特异性受体结合后激活磷脂酶 C (PLC)，PLC 水解磷脂酰肌醇产生 IP_3 与二酰甘油 (DAG)，IP_3 可促进细胞外 Ca^{2+} 流至胞浆，并动员细胞内贮存库内质网的 Ca^{2+} 释放至胞浆，因此胞浆内 Ca^{2+} 增高[1]。本实验观察到脑缺血与再灌流期脑组织 ET 含量增高，突触体胞浆内 Ca^{2+} 增高，皮层与海马神经元呈现严重的缺血性损害。Fuxe 等[7]在大鼠纹区注入 ET 后发现该区产生了剂量依赖性梗塞灶以及周围半暗带的形成。综上所述，ET 造成的缺血性损害主要通过 Ca^{2+} 内流，导致细胞内 Ca^{2+} 超载，Ca^{2+} 内流使血管平滑肌收缩，进一步加重缺血，细胞内 Ca^{2+} 超载是引起的细胞死亡的最终后果。本实验采用 Ca^{2+} 拮抗剂尼莫地平治疗后不仅能阻断 ET 对脑缺血神经元的损害作用，还可使脑组织 ET 含量降低，因为 ET 激活血管活性物质的活力取决于细胞内 Ca^{2+} 的存在，细胞内 Ca^{2+} 又调节 ET 的合成与释放，Ca^{2+} 拮抗剂可阻断由此形成的恶性循环。如果研制成功特异性 ET 受体拮抗剂与 Ca^{2+} 拮抗剂联合作用，有望获得更佳效果。

参考文献

1 卡留贯，张天锡，赵卫国. 内皮素和自由基在脑缺血中的相互作用. 中风与神经系统疾病，1993；10(4)：203

2 Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral in the unanesthetized rat hemispheric ischemia. Stroke, 1979；102：267

3 Dodd PK, Hardy JA, Oakley AE et al. A rapid method for preparing synaptom: Comparision alternative produces. Brain Res, 1981；226：107

4 Pulsinelli WA, Brierly JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann Neurol, 1982；11：491

5 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988；332(31)：411

6 Gaudet R, Weleh, Chabi E et al. Effect of transient ischemia on monamine levels in the cerebral cortex of gerbils. J of Neurochem, 1978；30：751

7 Fuxe K, Kurosawa N, Cintra A et al. Involvement of local ischemia in endothelin-1 induced lesions of the neostriatum of the anasthetized rat. Exp Brain Res, 1992；88；131

(收稿：1995-02-08；修回：1995-09-22)

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

Changes of endothelin in brain tissue and Ca^{2+} in syynaptoms after cerebral ischemia and reperfusion in rats

Zheng Caimei, Wang Qingsong, Li Lushi (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Miitaryy Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The level of endothelin in brain tissue and Ca^{2+} in synaptoms were determined in rats after they were inlicted with cerebral ischemiareperusion injury. The therapeutic effects of nimodipine were also observed. It was found that the level of endothelin in brain tissue and Ca^{2+} in synaptoms were significantly increased 20 min after cerebral ischemia and the high level persisted to the 4th day after reperfusion. After nimodipine treatment, the level of brain endothelin was significantly lowered and the neuronal damages attenuated. The relationship between brain endothelin and cellular Ca^{2+} loading and the development of cerebral ischemioreperfusion injury was discussed.

Key words cerebral ischemia; reperfusion; endothelin; nimodipine; calcium

胆囊切除术后左股静脉血栓形成一例

Report of a case of thrombosis of left femoral vein after cholecystectomy

陈 平 韩本立 何振平 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 630038

下肢深静脉血栓多发生在大手术、全麻和长期卧床的病人，胆囊切除术后出现下肢深静脉血栓形成较为少见，最近五年我科胆囊切除上千例，仅此一例下肢深静脉血栓形成，现报道如下.

病人，女性，62岁，工人，住院号：201834。因反复右上腹痛15年，加重2月，于1993年11月24日门诊以“慢性结石性胆囊炎”入院。既往无高血压及心脏病史，无下肢静脉曲张及脉管炎史。查：一般情况良好，BP 18/11 kPa，体重75 kg，身高158 cm，较肥胖，皮肤巩膜无黄染，心肺(－)，腹软，右上腹胆囊区轻微压痛，无反跳痛，肝脾(－)，余(－)。B超：胆囊结石，慢性胆囊炎。心电图：正常，无房颤等心律失常。血常规：Hb 110 g/L，RBC 350万/mm^3，WBC 5 000/mm^3，N 78%，L 22%，PLT 14万/mm^3，BT 1分，CT 2分。肝肾功能、胸片正常。入院后未进行特殊处理，口服头孢氨苄，舒胆通等消炎利胆药物。入院后17 d，在持续硬膜麻醉下行胆囊切除术，手术顺利，术中血压平稳，无波动。术后恢复顺利。术后第3天，下床活动后1 min，突然心慌，出冷汗，感到左下肢麻木，继之肿胀，约2 min后，左下肢(自腹股沟韧带以下)皮肤颜色转为紫红，且逐渐加深，伴剧烈疼痛，肿胀。左足背动脉搏动较对侧减弱，B超证实为左侧股静脉血栓形成。经止痛对症，输入低分子右旋糖酐、复方丹参液，抬高患肢等内科处理，24 h后，左下肢皮肤颜色逐渐恢复，疼痛缓解，1周后肿胀开始消退，3周后病人痊愈出院。

讨 论

术后下肢深静脉血栓形成多为下腹部或盆腔手术的并发症。吴亚群等报道[1]13例术后下肢深静脉血栓形成病人中11例来自下腹部手术，故认为术中静脉内膜钝性挫伤是形成血栓的原因之一。另外，全麻，长期卧床也是术后下肢深静脉血栓形成的常见原因。郑瑞芬等分析了34例髂静脉血栓形成病人后认为，长期卧床、肝癌、胰腺癌等肿瘤病人由于体内凝血机制的变化，也是下肢深静脉血栓形成的常见病因[2]。

复习了我科5年来上千例胆囊切除术后病人，仅此一例左下肢深静脉血栓形成。表明行单纯胆囊切除术后此并发症发生率很低，可能与手术创伤小，手术平稳，病人术后活动较早有关。此病人出现左侧股静脉血栓的原因，可能与手术中制动和肥胖，高脂血症引起的血液流变学改变有关，提示：在年龄较大，特别是较肥胖的病人，既使是胆囊切除这样手术创伤较小，卧床时间较短的病人，也应注意防止深静脉血栓形成。

关键词 胆囊切除术，血栓形成，股静脉

中图法分类号 R657.4

参考文献

1 吴亚群，覃修福，薛新波等. 手术后下肢深静脉血栓形成病因分析及手术治疗. 同济医科大学学报，1991；20(增刊)：60

2 郑瑞芬，刘自宽. 髂股静脉血栓形成34例临床分析. 普外临床，1993；8(3)：147

(收稿：1994-09-05；修回：1995-07-28)

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