DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.031

脑伤早期神经细胞钙通道变化及其机理研究

A study on the alteration of calcium channels in newe cells and its mechanisms at the early stage of traumatic brain injury

宁 可 王正国 朱佩芳 陈长才* (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室) 重庆, 630042

近年来,颅脑创伤引起的伤残率及死亡率仍居创伤的首位,其主要原因是伤后常出现继发性脑损害(Secondary brain damage, SBD)。如何处理 SBD,包括脑缺血、水肿、脑肿胀等,是脑创伤救治的关键。引起 SBD的确切机理尚不清楚。目前国内外研究趋向主要着眼于 Ca^{2+} 通道与神经介质及相应膜系统的改变。细胞内钙超载(Ca^{2+} -overload)被认为是神经细胞死亡的最后共同通路,但至今国内外对神经细胞 Ca^{2+} 超载的认识,主要采用生化检测或荧光探针显示等方法测定突触体等的 Ca^{2+} 浓度,或用 Ca^{2+} 通道阻断剂治疗后可减轻 Ca^{2+} 含量,从而间接推测颅脑创伤后 Ca^{2+} 通道是开放的。要明确脑创伤后神经细胞钙通道的变化及其分子机理,只有通过膜片钳研究才能达到,国内外尚未见到这方面的研究报道。

一氧化氮(NO)作为一种新发现的细胞间信息传递的信使分子,在中枢神经系统中发挥作用,它既参与神经细胞间的信息传送,又可能参与多种神经系统疾病的病理过程,起损伤和/或起保护作用。有报道一氧化氮合酶(NOS)抑制剂对大鼠局部脑缺血产生的损害有保护作用。然而,颅脑创伤后 NO有何变化? NO是否与钙通道的变化有关?尚未见到有关研究报告。

c-fos原癌基因在正常情况下参与细胞生长、分化、信息传递、记忆等生理过程,多种刺激可引起中枢神经系统 c-fos原癌基因的快表达,其中谷氨酸受体在 c-fos的表达中起重要作用。有报道颅脑创伤后兴奋性氨基酸(EAA)释放增加。EAA是否与钙通道的开放有关?是否对钙通道电流有影响及是否与c-fos mRNA转录有关?有关问题及其机理尚不清楚。BW1003C87是英国 Wellcome研究所1992年研制成功的新型 EAA释放抑制剂,可抑制谷氨酸的释放。但该药对颅脑创伤是否有保护作用,尚未见文献报道。

尼莫地平是一种二氢吡啶类钙通道阻断剂,实验研究及临床初步应用提示对创伤性脑水肿有治疗作用。多数报道认为尼莫地平可阻止 Ca^{2+} 内流。但也有作者提出不同看法,特别是脑缺血或脑损伤后,钙阻滞剂能否抑制细胞外 Ca^{2+} 进入细胞仍有争议,有人认为脑缺血后神经细胞内游离 Ca^{2+} 升高系细胞器释放 Ca^{2+} 所致,而钙通道阻断剂对此不起作用。要明确钙通道阻断剂对脑外伤后神经细胞钙离子内流有无抑制作用,也只有通过膜片钳研究才能达到,至今仍未见该类研究报道。

基于上述原因,本课题通过大鼠脑撞击伤模型、培养的神经细胞及脑外伤病人,观察了脑创伤后电压依赖性钙离子通道电流(I_{Ca})的改变;检测了 EAA钙通道阻断剂等对 I_{Ca}的影响;探讨了脑创伤后诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及 c-fos基因表达的变化及其与钙通道、创伤性脑水肿的关系;观察了 EAA释放抑制剂 BW1003C87对大鼠脑创伤的治疗作用及对 iNOS c-fos mRNA转录的影响;并观察了钙通道阻断剂对重型颅脑损伤病人的治疗作用及副作用。以期进一步阐明脑损伤后神经细胞 Ca^{2+} 超载的分子机理以及临床应用钙通道阻断剂(尼莫地平)救治重型颅脑损伤的必要性和可行性。主要结果与结论如下:

(1)大鼠左侧半球脑撞击伤后,伤侧脑组织含水率及 Ca^{2+} 含量明显增加;健侧及对照组无明显改变;伤后用钙通道阻断剂或 BW1003C87治疗,能使脑组织含水率及 Ca^{2+} 含量明显下降。

(2)建立了相对简便、可靠的新生大鼠神经细胞原代培养方法,神经元可成功存活2周以上,NGF有促进培养神经细胞生长的作用,神经细胞膜的活性、质量能满足膜片钳研究的要求。培养神经元全细胞膜片钳记录结果显示: EAA(谷氨酸、天门冬氨酸)可使神经元 I_{Ca}明显增加,钙通道阻断剂对该 I_{Ca}有明显抑制作用。该组结果提示,EAA有促进神经细胞钙通道开放的作用。

(3)膜片记录结果发现:从伤侧海马 CA_1区及损伤灶边缘区皮质分离到神经元的 I_{Ca}明显高于健侧或对照组相应部位分离到神经元的 I_{Ca};对该分离的皮层神经元在体外用钙通道阻断剂灌流后,伤侧 I_{Ca}的下降率明显大于健侧。该组结果提示,脑损伤后神经元钙通道开放时间延长,钙通道阻断剂对减轻神经细胞 Ca^{2+} 内流有一定作用。

(4)mRNA狭线杂交结果表明:脑损伤早期 iNOS mRNA转录迅速增加,持续数小时后逐渐下降。原位杂交结果显示:脑损伤早期,伤侧脑皮质、海马、中脑等部位出现 iNOS阳性神经细胞;对照组未见阳性反应细胞;EAA释放抑制剂(BW1003C87)、钙通道阻断剂(尼莫地平)治疗可使阳性细胞明显减少;伤侧脑组织 c-fos mRNA转录也于伤后早期出现,用钙通道阻断剂治疗组 c-fos阳性细胞减少。脑组织 NADPH-d组化染色显示,伤侧阳性细胞分布与 iNOS mRNA转录基本一致,但健侧脑组织也可见少量 NADPH-d阳性神经细胞,这可能与正常脑组织存在原生型一氧化氮合成酶(cNOS)有关。

(5)钙通道阻断剂(尼莫地平)临床应用的前瞻性研究结果表明:重型颅脑损伤病人,伤后早期血清及脑脊液 EAA含量明显增高,钙通道阻断剂可减轻脑水肿及减缓颅内压(ICP)的升高,并取得良好临床疗效。但应用钙通道阻断剂过程中 ICP及生命体征可出现波动,并可能对病人的肝、肾功能有一定损害作用,应注意肝、肾功能损害的预防和治疗。

关键词 脑外伤;神经元;钙通道
中图法分类号 R651.15
(收稿: 1996-06-25;修回: 1996-07-09)
(编辑 张大春)

* 第一军医大学珠江医院神经外科 广州, 510000

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