DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.020

氯胺酮对缺血再灌注脑组织兴奋性氨基酸递质及钙含量的影响

任家顺 毕 敏 (第三军医大学附属西南医院麻醉科) 重庆,630038

提 要 用"四动脉闭塞法"(双侧椎动脉和颈总动脉)制成兔脑缺血再灌注损伤模型,测定其脑组织兴奋性氨基酸递质、脑组织钙及线粒体钙含量变化,同时观察兴奋性氨基酸受体拮抗剂氯胺酮对上述指标的影响。结果提示:缺血20 min,脑组织兴奋性氨基酸递质谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp)明显降低,再灌注后其降低更加明显;而脑组织钙及线粒体钙在缺血20 min时无明显升高,再灌注后两者非常显著地高于对照及缺血20 min。氯胺酮能明显升高缺血再灌注期Glu和Asp含量,并能明显降低脑组织钙及线粒体钙含量。文中探讨了氯胺酮的作用机理及治疗意义。

关键词 氯胺酮;缺血再灌注;兴奋性氨基酸;递质;钙

中图法分类号 R640.2-3

由于兴奋性氨基酸和钙在缺血性细胞损伤中的作用渐被认识,因而其拮抗剂的应用目前倍受重视。本文就所观察到的氯胺酮对缺血再灌注过程中脑组织兴奋性氨基酸递质和钙含量方面的影响加以介绍和讨论。

1 材料及方法

1.1 动物分组

雄性日本大耳白兔35只,重2.2~2.5 kg,随机分为7组(表1)。

表1 动物分组

Tab 1 Animal Groups

Group	Control	Resperfusion after ischemia 20 min			Ketamine treating reperfusion after ischemia 20 min		
		0 min	60 min	180 min	0 min	60 min	180 min
n	5	5	5	5	5	5	5

1.2 模型制作

动物以25%乌拉坦麻醉。右侧股动、静脉切开,置管分别测平均动脉压、中心静脉压和补液。气管切开放入导管并固定和分离两侧颈总动脉及椎动脉穿线备用。待动物清醒后结扎双侧椎动脉和钳夹两侧颈总动脉,并记录缺血时间。再通组按规定时间松掉动脉夹。实验开始后均行控制呼吸,保持动脉血pH值在7.35~7.50。实验完毕后解剖发现未确切结扎椎动脉者不计入组内。对照组除不结扎椎动脉和钳夹颈总动脉外均同实验组。治疗缺血前10 min静注氯胺酮10 mg/kg,再灌注后10 min补注8 mg/kg,再灌3 h组于1 h时再补注6 mg/kg,治疗缺血20 min组于缺血前10 min静注18 mg/kg。

1.3 取材及处理

1.3.1 脑组织氨基酸 到规定时间后迅速打开颅腔,活取右侧颞叶,称重后加10%磺基水杨酸在冰浴中制成匀浆,高速离心后取上清液用121 MB型氨基酸分析仪测其11种氨基酸浓度,并计算出脑组织氨基酸含量。

1.3.2 脑组织钙及线粒体钙 活取右侧顶叶在37℃ La^{3+}液[1]中温浴20 min,取出脑组织超纯水冲洗后于70℃烤箱烘烤72 h。然后称取干脑组织加浓硝酸彻底消化后取样,用1%$LaCl_3$稀释和原子吸收分光光度计测其钙浓度,并计算出干脑组织的钙含量。同时活取左侧颞顶叶,加入4℃线粒体介质,迅速于冰浴中制成匀浆,差速冷冻离心分得线粒体[2]。将其分成两份,一份加盐酸消化后取样测钙,另一份测线粒体蛋白,并计算出单位线粒体蛋白的钙含量。

1.4 统计学处理

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,以计算机为工具行单因素方差分析,在F检验"保护"下用FLSD法行多重比较。

2 结果

2.1 脑组织兴奋性氨基酸(EAA)递质谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp)变化

2.1.1 缺血再灌注对EAA递质的影响 缺血20 min,Glu和Asp明显低于对照组,再灌注后其降低程度随再灌注时间延长进一步明显增大,且非常显著地低于缺血20 min组(表2)。

2.1.2 氯胺酮对EAA递质的影响 氯胺酮能增加缺血期EAA递质,且能明显提高再灌注期Glu和Asp含量(表2)。

2.2 脑组织钙(Tca)及线粒体钙(Mca)含量的变化

2.2.1 缺血再灌注对钙含量的影响 缺血20 min,Tca及Mca增加,但与对照比较无显著升高。再灌注后Tca及Mca均非常显著地高于对照和缺血20 min组,且其增高幅度随再灌注时间延长而明显增大(表2)。

2.2.2 氯胺酮对Tca及Mca的影响 氯胺酮治疗后,缺血20 min组与未治疗组比较Tca及Mca差别不显著,再灌注后治疗组Tca及Mca均非常显著地低于未治疗组(表2)。

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

表 2　氯胺酮对缺血再灌注期脑组织 EAA(umol/g wet wt) Tca (μg/g drg wt)及 Mca(μg/100 mg pro)含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　the effect of ketamine on the contents of the EAA and Ca in ischemic brain tissue in rabbits ($\bar{x}\pm s$)

	Control	Peperfusion after ischemia 20min			Ketamine treating reperfusion after ischemia 20min		
		0 min	60 min	180 min	0 min	60 min	180 min
Asp	4.92±0.51	4.16±0.55	3.15±0.78	2.55±0.39	4.58±0.80	3.93±0.26※	3.74±0.47※※
Glu	12.90±0.41	11.63±0.79	9.19±0.91	8.06±0.77	12.18±0.91	10.59±1.06※※	9.85±0.73※※
Tca	107.78±2.91	112.11±4.72	171.32±9.24	198.38±6.87	110.23±3.65	120.59±7.20※※	121.68±9.36※※
Mca	34.85±1.75	36.31±1.75	47.35±4.75	54.80±4.69	35.80±2.63	37.32±3.06※※	40.11±2.94※※

※：$P<0.05$；※※：$P<0.01$ *vs* No treating group

3　讨论

3.1　EAA 递质诱发细胞内钙增加

缺血期 Glu 和 Asp 降低可能与能量供应障碍使其生成减少，以及由于缺血缺氧大量 Glu 及 Asp 由神经细胞释放到细胞外间隙继而通过血-脑屏障和脑-脑脊液屏障流入血液及脑脊液有关，再灌注时 Glu 和 Asp 的进一步降低主要由后一原因所致。Glu 等大量释放到细胞外间隙，可通过多种途径引发钙内流，且其内流主要发生在再灌注期。目前认为经 N-甲基-D 型天门冬氨酸(NMDA)受体启动的钙通道和经膜去极化打开的电压敏感性钙通道在钙内流过程中起着主要作用，而再灌注期血液可以补充大量内流钙源[3]。我们实验发现，缺血再灌注时间越长(6 h 内)，脑组织 EAA 递质越低，钙含量就越高，超微结构改变也越严重，从而证明 EAA 递质的脑外释放和 Ca^{2+} 的脑内贮积在缺血再灌注脑损伤中具有重要作用[4,5]。

3.2　氯胺酮对缺血再灌注期脑组织 EAA 递质和钙含量的影响

随着 EAA 神经毒性作用的发现及其毒性机理的不断阐明，其拮抗剂的研究和应用倍受重视。实验表明氯胺酮作为一种非竞争性 NMDA 受体拮抗剂，能有效地阻断脑内 NMDA 兴奋性氨基酸受体，保护离体海马和皮质的缺氧性损伤和阻断 NMDA 所介导的兴奋性效应。

我们实验发现，与未治疗组比较，氯胺酮能明显提高缺血再灌注期脑组织 EAA 递质含量和降低 Tca 和 Mca 含量。超微结构观察也提示，氯胺酮治疗组其病理改变明显轻于未治疗组。证明氯胺酮能够减少再灌注期脑细胞钙内流和 EAA 递质释放，防止细胞内钙超载，减轻脑细胞的延迟性损害。提示在缺血性脑复苏过程中，应用氯胺酮对防止脑损害有益。其作用机理可能是氯胺酮与 NMDA 受体结合，阻碍了由 EAA 递质通过 NMDA 受体所介导的钙内流，防止了钙的细胞毒性作用，同时也减少了由神经末梢内钙增加所诱导的 EAA 递质的继发释放。

参考文献

1 Velss GB, Besun T. Calcium kinetics in vascular smooth muscle. Chest, 1985; 28(Suppl 4): 220s

2 Vitorica J, Machado A, Satrustegui J, Aged-dependant variations in peroxide-utilizing enzymes from rat brain mitochondria and cytoplasm, J. Neurochem, 1984; 42: 351

3 任家顺，毕　敏. 兴奋性氨基酸在脑缺血缺氧性钙内流损伤中的作用. 国外医学：麻醉学与复苏分册，1992；13：279

4 任家顺，毕　敏. 缺血再灌注对脑组织递质性氨基酸代谢的影响. 中华麻醉学杂志，1993；13：204

5 任家顺，毕　敏，陈意生. 缺血再灌注对兔脑钙积聚和超微结构的影响. 中华麻醉学杂志，1994；14：334

(收稿：1995-09-04；修回：1996-03-11)

(编辑　仇玉福)

Effects of ketamine on the metabolism of excitatory amino acid transmitters and calcium in ischemic brain tissue in rabbits

Ren Jiashun, Bi Min (Department of Anesthesiology Southwest Hospital. Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract　Cerebral ischemia-reperfusion model was established in rabbits with the 4-artery-obstruction method. The changes of excitatory amino acid (EAA) transmitters and calcium level in the brain tissue

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

(Tca) and in the mitochondria (Mca) of the cerebral cortex were determined and the effects of ketamine observed. It was found that 20 minutes after ischemia, the amount of EAA transmitters (Glu and Asp) in the brain tissue was decreased and it was further decreased after reperfusion. Tca and Mca were increased 20 minutes after ischemia and they were further increased, being higher than the level during ischemic stage and the control value, after reperfusion. Ketamine increased the level of EAA transmitters and decreased the level of Tca and Mca in the process of ischemia-reperfusion.

Key words ketamine; ischemia-reperfusion; calcium; excitatory amino acid transmitter; rabbit

用α-互补法筛选HPV DNA重组质粒

Selecting HPV-DNA recombinants by α-complementation

孙仁山 谭 骏* 李文维** (第三军医大学附属西南医院皮肤科) 重庆,630038

由于人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus,HPV)与性病及宫颈癌的密切关系,使得有关HPV的研究不断增多,至今已分离鉴定了60多个HPV型别。我们在分离鉴定HPV-CA DNA时[1],为了获得HPV DNA重组质粒,成功地应用了α-互补原理(α-Complementation)进行筛选,该方法比快速破碎法有省时、简单、直观等优点,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

大肠杆菌JM103系本校遗传室保存菌种;载体PUC_{19}及X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)与IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)均购自华美生物工程公司。

1.2 方法与步骤[2]

1.2.1 常规制作含氨苄青霉素(0.1 mg/ml)的LB平板,待其凝固后,滴加20 mg/ml的X-gal 0.04 ml与0.25 mol/L的IPTG 0.016 ml。平板直径为11 cm。

1.2.2 用涂布棒将上述溶液均匀地涂布于培养基表面,在37℃孵箱里放置4 h,使X-gal的溶剂二甲基甲酰胺挥发干净。

1.2.3 接种0.1 ml转化菌至X-gal平板,待接种液被培养基吸收后,平板倒置,37℃条件下孵育12~16 h。

1.2.4 保存平板于4℃环境下数小时,使颜色显示充分。

1.2.5 观察结果、蓝白色菌落计数并以快速破碎法验证。

2 结果与讨论

大肠杆菌JM103的LacZ基因系一缺陷基因,因此它不能表达有活性的β-半乳糖苷酶。PUC_{19}含有部分LacZ基因,它所产生的α-肽(α-peptide)可与JM103的LacZ基因表达产物互补,产生有活性的β-半乳糖苷酶,该酶在IPTG诱导下,可代谢X-gal产生蓝色。当目的基因插入PUC_{19}的多克隆位点时,将不能产生α-互补,最后呈现的将是白色或无色菌落。

本实验菌落计数,得到比较清晰的蓝色菌落为284个;白色菌落为67个,二者之比大约为4∶1。经快速破碎法验证,大部分白色菌落的质粒载体含有插入片段;而蓝色菌落的质粒均为空载体。少部分白色菌落携带空的质粒载体,我们考虑与IPTG或/和X-gal涂布不均匀有关系。

α-互补法对比快速细胞破碎法,省去了细菌扩增、细菌破碎液电泳、紫外灯下观察等步骤;比插入失活法(Insertional Inactivation)也有简单、直观等优点。因此,在进行目的基因亚克隆时,α-互补法是一种值得推荐的重组子筛选方法。

关键词 α-互补;DNA重组;质粒

中图法分类号 Q343

参考文献

1 孙仁山,李文维,谭 骏.从尖锐湿疣中克隆人乳头瘤病毒基因组的初步研究.免疫学杂志,1993;9(1):27

2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Identification and analysis of recombinants. In "Molecular Cloning". New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989: 1.85~1.86

(收稿1995-08-02,修回1996-02-17)

(编辑 仇玉福)

* 基础部分子生物学教研室 重庆,630038

** 附属大坪医院皮肤科 重庆,630042

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