DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.04.003



# MK－801对缺血性脑损伤脑线粒体呼吸功能疗效的研究*

李露斯 郑彩梅 （第三军医大学西南医院神经内科）630038
黎红华 （武汉军区总医院神经内科）

**提 要** 用MK－801这种N-甲基-D-天门冬氨酸(N-mechyl D-aspartate,NMDA)受体拮抗剂对脑缺血再灌流大鼠进行治疗,观察其阻滞兴奋性氨基酸与突触后受体结合,从而保护脑线粒体的功效。观察提示,在脑缺血及再灌流期脑线粒体呼吸功能较假手术组有非常显著的降低,用MK－801治疗组的脑线粒体呼吸功能较未治疗组有非常明显的改善,为治疗缺血性脑损伤提供了新的途径。

**关键词** 脑缺血;再灌流损伤;线粒体;MK－801*
**中图法分类号** R743.3

不少学者研究了与脑缺血再灌流有关的脑线粒体功能变化,发现在脑缺血期和缺血后再灌流脑线粒体的呼吸功能相继恶化。可能的机制包括脑内自由基的含量,细胞内的pH,$Ca^{2+}$的稳态和自由脂肪酸的变化等[1]。Steven等还提出脑缺血时兴奋性氨基酸过度释放,通过作用于突触后受体产生神经毒性作用,参与缺血性脑损伤过程[2]。MK－801是N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate,NMDA)受体拮抗剂,能有效阻滞兴奋性氨基酸与突触后受体结合[3],从而保护神经元免于损伤。本文用MK－801对脑缺血再灌流大鼠进行治疗,观察其对脑线粒体呼吸功能的疗效。旨在进一步探讨缺血性脑损伤的机理和MK－801的治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康Wistar大鼠40只,雌雄皆有,体重180±40 g,由本校动物所提供。

### 1.2 仪器设备

低温高速离心机(J2－21型,Beckman公司);氧电极(上海植物生理研究所);恒温循环水浴箱(国产);图像记录仪(重庆仪表总厂);721分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

### 1.3 药品与试剂

MK－801由美国Merck sharp and Dohme实验室提供。ADP系美国Sigma公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

### 1.4 实验方法

1.4.1 脑缺血再灌流动物模型的制作:采用改良的Pulsinelli法[4]。大鼠乙醚浅麻醉,用玻璃针分离暴露两侧第一颈椎横突孔,热灼凝闭两侧椎动脉。分离两侧颈总动脉,用微动脉夹夹闭两侧颈总动脉20 min,为脑缺血期。缺血期满松掉动脉夹为再灌流期。整个缺血期意识丧失,直立反射消失者留作实验动物,有抽搐及短暂昏睡动物废弃之。手术方法相同,仅不烧灼双侧椎动脉,不夹闭颈总动脉的大鼠为假手术组。

1.4.2 实验分组:假手术组;脑缺血20 min组;脑缺血20 min再灌流4 d组;脑缺血20 min再灌流4 d用MK－801治疗组。MK－801原粉,以灭菌生理盐水配成0.2 mg/ml溶液,按1 mg/kg体重给动物行腹腔注射。缺血前20 min及缺血后20 min各给药一次。每组10只成活动物。

1.4.3 大鼠脑线粒体的分离:采用改良的Clark技术[5]按实验分组达到预定时间将大鼠断头后迅速(30 s)取出前脑(去除脑干和小脑),浸入带有冰渣的分离介质中(0.025mol/L蔗糖,0.075 mol/L甘露醇,1 mmol/L EGTA pH7.4,Tris调)剪碎,用分离介质洗3次,玻璃匀浆器手工匀浆(8上8下),制得脑匀浆。差速离心2 000×g 3 min,取上清;12 500×g 8 min,取沉淀;用3% Ficoll液10 ml(3% Ficoll:0.12 mol/L蔗糖,0.03 mol/L甘露醇和25 μmol/L EDTA－K pH7.4)悬浮沉淀。仔细分层入6% Ficoll溶液20 ml(6% Ficoll:0.24 mol/L蔗糖,0.06 mol/L甘露醇和50 μmol/L EDTA-K,pH7.4),离心10 400×g 30 min,取沉淀。用分离介质再悬浮沉淀离心12 100×g 10 min后得到的沉淀为提纯的脑线粒体。用分离介质稀释至含20 mg蛋白质/ml备用。以上所有操作均在0～2℃条件下进行,分离介质必须始终保持有冰渣状态。用Lowry法测定脑线粒体蛋白质。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39270273

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

1.4.4 脑线粒体呼吸功能的测定：采用氧电极法[5]。将1只大鼠脑提取的线粒体100 μl 加入2 ml 的反应体系中(120 mmol/L KCl，15 mmol/L Tris－Cl，2 mmol/L Tris－$PO_4$，75 mmol/L 蔗糖，25 mmol/L 甘露醇，0.05 mmol/L EDTA－K，pH7.4)温度30℃，孵育2 min，加入底物10 μl(5 mmol/L 丙酮酸钠＋5 mmol/L 苹果酸钠)后加入 ADP(200 nmol)测得的氧气消耗率为呼吸三态($O_2$ nmol/min/mg 蛋白质)待 ADP 完全磷酸化，氧气的消耗速度下降，此时测得的氧气消耗率为呼吸四态。三态/四态比率为呼吸控制率。

1.4.5 统计学处理：实验所得数据处理后用均数±标准差表示。数据采用双样本 $t$ 检验。

## 2 结果

用氧电极法以丙酮酸钠＋苹果酸钠作为底物测得假手术组，缺血20 min 再灌流4 d 组(简称再灌流未治组)，缺血20 min 再灌流4 d 用 MK－801治疗组(简称治疗组)线粒体的呼吸三态，四态和呼吸控制率如下表：

**附表** MK－801对缺血再灌流大鼠脑线粒体呼吸功能影响

**Table The effects of MK－801 on cerebral mitochondrial respiration after ischemia and reperfusion in rats**

| Conditions ($n$ =10) | State 3 respiration | State 4 respiration | Respiratory control ratio |
|---|---|---|---|
| Control group | 26.00±10.27 | 6.40±2.42 | 4.15±0.29 |
| Ischemia group | 14.15± 0.74※※ | 7.21±0.19 | 1.96±0.24※※ |
| Reperfusion group | 38.60± 9.44※※ | 17.00±2.75※※ | 2.32±0.66※※ |
| MK－801 treatment group | 29.16± 4.99▲▲ | 10.00±1.89▲▲※※ | 2.98±0.38▲▲※※ |

Values are means±standard error of the means. ※※: Compared with control group, $P<0.01$; △△: Compared with non-treatment group, $P<0.01$.

在本实验中，脑缺血20 min 脑线粒体的呼吸功能明显下降，其特点是呼吸三态和呼吸控制率的下降分别为假手术组的54%和47%；再灌流未治疗组，虽然呼吸功能有所恢复，但与假手术组相比，仍有非常显著的差异，主要特点是呼吸四态的延长和呼吸控制率的降低，分别为假手术组的265%和53%；用 MK－801治疗组的呼吸功能与未治疗组有非常显著的差异，有明显的好转。与假手术组比，呼吸三态无明显差异，呼吸四态与呼吸控制率分别恢复至假手术组的156%和71%。

## 3 讨论

线粒体通过氧化磷酸化生成大量 ATP 供细胞内各种化学反应与功能的能量需要，是重要的细胞器。Russel 等的组织病理研究发现，在脑缺氧缺血的损伤中，线粒体的改变发生最早[6]。Sims 等发现短暂脑缺血及缺血后再灌流可引起线粒体的功能失调，启动脑细胞损伤的一系列病理生理过程[7]。呼吸三态为在有底物和 ADP 刺激下线粒体氧化磷酸化能力，呼吸四态为只有底物刺激下线粒体呼吸链的功能，呼吸控制率为代表线粒体呼吸功能的灵敏指标。本文利用大鼠四血管闭塞造成脑缺血后再灌流的动物模型，提纯脑线粒体并保持其生物活性，用氧电极测定大鼠脑线粒体的呼吸三态、四态和呼吸控制率。发现在大鼠脑缺血20 min 时脑细胞线粒体的呼吸三态和呼吸控制率较假手术组有非常明显下降，与以往研究一致[8]。说明短暂的脑缺血，即可引起脑线粒体呼吸功能的下降，氧化磷酸化偶联能力降低。脑缺血后再灌流4 d 组在脑供氧恢复情况下，呼吸三态恢复，但呼吸四态明显延长，可能与一系列病理生理损害[1]使线粒体呼吸链的功能下降有关。

兴奋性氨基酸受体拮抗剂对脑缺血的治疗作用愈来愈受人们重视。MK－801是一种强有力的非竞争性的 NMDA 受体拮抗剂. 较易通过血脑屏障，能有效地阻滞兴奋性氨基酸与突触后受体结合，保护神经元免于损伤。在本实验中，同样是脑缺血再灌流4 d，用 MK－801治疗组与未治疗组相比，呼吸三态、四态和呼吸控制率都有非常显著的差异。治疗组的呼吸三态与呼吸控制率都较缺血组有非常显著的好转，更接近于假手术组。

本实验室黎红华等在研究大鼠海马氨基酸含量的动态变化时发现在脑缺血20 min，兴奋性氨基酸谷氨

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

酸轻度降低，天门冬氨酸显著降低，再灌流1 h两者均显著降低，再灌流6 h及48 h、4 d都恢复至假手术组水平。生理情况下谷氨酸和天门冬氨酸在中枢神经系统中起着兴奋性神经递质作用。在缺血及再灌流早期，两者含量下降可能与其合成不足释放增多有关。这种过度释放具有神经毒性作用，可能参与脑缺血缺氧病理生理过程[9]。用MK－801治疗的大鼠脑线粒体呼吸功能较未治组有显著好转，可能与MK－801能在一定程度上保护脑线粒体氧化磷酸化功能，免于受到兴奋性氨基酸的毒性作用有关。但用MK－801治疗组的呼吸功能与假手术组相比还有显著差异，说明缺血性脑损伤的病理机制是多方面的，MK－801只能起到一定的脑保护作用，有效的治疗需走综合治疗的途径。

## 参考文献


1 Hillered L, Chan PH. Effects of arachidonic acid on respiratory activties in isolated brain mitochondria. J Neurosci Res, 1988,19:94～100

2 Steven M, Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic－ischemic brain damage. Annals of Neurology,1986,19(2):105～111

3 Park CK. Focal cerebral ischemia in the cat : treatment with the glutamate antagonist MK－801 after induction of ischemia. J Cereb Blood Flow Metab,1988,8(5):757～762

4 Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral in the unanes thatized rat hemispheric ischemia. Stroke,1979,10: 267～271

5 Clark JB, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria: preparation and characterization. J. Biol Chem, 1970,245:4724～4731

6 McGee－Russel SM, Brown AW, Brierley JB. A combined light and electron microscope study of early anoxic－ischemic cell change in rat brain. Brain Res,1970,20:193～200

7 Neils Sims. Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. J Neurosury,1991,76:244～250

8 Benveniste H, Drejer J, Schousboe A. Elevation of the extracellular concentration of glutameate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerbral microdialysis. J Neurochem,1984,43:1369～1374

9 Benveniste H, et al. Elevation of the extracellular concentration glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerbral microdialysis. J Neurochem,1984,43:1369～1374


(收稿:1993-12-13;修回:1994-4-24)

# Studies of the effects of MK－801 on cerebral mitochondrial respiratory capacity after ischemia and reperfusion in rats

Li Lusi, Li Honghua, Zhen Caimei (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

**Abstract** Rats after cerebral ischemia and reperfusion were treated with MK－801. It was found that MK－801 could block the combination of the excitatory amino acids with N-methyl-D-aspartate receptors and protect the respiratory capacity of the brain mitochondria. These findings suggest that the administration of MK－801 is able to improve the cerebral mitochondrial respiratory capacity.

Key words cerebral ischemia; reperfusion injury; mitochondria; MK－801

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