DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.007

脑缺血再灌流线粒体磷脂含量及膜流动性改变*

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

提 要 研究脑缺血再灌流时线粒体磷脂含量与膜流动性改变,结果发现缺血20 min再灌流1 h组线粒体卵磷脂(PC)、脑磷脂(PE)、心磷脂(CL)含量与膜流动性均显著降低;磷脂酶C(PLC)抑制剂苯甲基磺酰氟化物(PMSF)治疗组线粒体PC、PE、CL含量与膜流动性均明显增高,并能显著地减轻海马CA_1区迟发性神经元坏死。提示线粒体磷脂含量与膜的流动性密切相关,肌醇磷脂信使系统参与了缺血性脑损伤。

关键词 脑缺血再灌流;线粒体;磷脂;膜流动性;PMSF

中图法分类号 R322.24;R743.31

线粒体是一个敏感而多变的重要细胞器,是细胞中能量储存和供给的场所。磷脂为线粒体中主要成分,本实验采用HPLC法及荧光探针DPH动态观察脑缺血再灌流期线粒体磷脂含量及膜流动性的变化,并观察磷脂酶C(PLC)抑制剂苯甲基磺酰氟化物(PMSF)对二者以及海马迟发性神经元坏死的影响,探讨肌醇磷脂信使系统与缺血性脑损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

健康Wistar大鼠,体重180±30 g,雌雄不拘,随机分为假手术组(SAM)、缺血20 min(I20 min)组、I20 min后再灌流1 h(R1 h)、R6 h、R2 d、R7 d组。动物模型采用Pulsinelli法[1]术前12 h禁食,乙醚麻醉下分离双侧颈总动脉,热凝闭双侧椎动脉,次日以动脉夹夹闭双侧颈总动脉,夹闭时间为缺血期,松掉动脉夹为再灌流期。SAM组不闭塞血管,其它操作同前。以4%阿拉伯胶液作溶媒配制PMSF液,缺血前60 min以PMSF 100 mg/kg腹腔注射作为PMSF组,仅用4%阿拉伯胶液1 ml腹腔注射者为Vehicle组。

1.2 线粒体磷脂含量测定

采用改良的Clark技术[2]将脑匀浆差速离心分离出粗制线粒体,再以不同浓度Ficoll液低温离心得提纯线粒体。用氯仿:二甲醇:HCl(2:1:0.01,V/V)抽取磷脂,尽取下层液40~50℃温育,N_2吹干;加入正乙烷:异丙醇液(1:1,V/V),然后用HPLC法测定磷脂含量[3]。

1.3 线粒体膜流动性测定

取线粒体2ml,加入2×10^{6} mol/L DPH液2 ml 25℃温育30 min,离心,用PBS液洗涤,最后悬浮在4 ml PBS液中,以荧光分光光度计测得荧光偏振度,计算出平均微粘度η[4]。

1.4 病理学检查

将SAM组、PMSF组与Vehicle组大鼠按要求时间迅速断头取脑,置于福尔马林液中固定,常规脱水、包埋、切片,片厚5 μm,H.E.染色,光镜下以视网格每毫米长度海马CA_1区锥体细胞层神经元数目表示。

2 结果

2.1 脑缺血再灌流期磷脂含量的动态变化

本实验测定了卵磷脂(PC)、脑磷脂(PE)、心磷脂(CL)、磷脂丝氨酸(PS)、磷脂肌醇(PI)五种成份,在SAM组,依次分别占总磷脂量的55%、32%、2%、4%和5%。由表1所见R 1 h组与SAM组比较,脑线粒体五种磷脂成份的含量中,前三者显著降低。

表1 脑线粒体磷脂含量(μg/mg)

Tab 1 Contents of phospholipid of brain mitochondria (μg/mg)

Group	PC	PE	CL	PS	PI
SAM	99.29±7.60	57.32±4.42	3.14±0.44	7.90±0.81	6.20±0.71
I20 min	87.11±9.60	51.50±4.54	2.56±0.51	7.45±0.79	5.80±0.52
R1 h	68.99±9.90*	37.46±5.24**	1.93±0.40*	7.40±0.62	5.86±0.49
R6 h	77.60±11.45	45.54±6.99	2.18±0.41	7.46±0.49	5.90±0.64
R2 d	83.49±11.23	49.07±6.26	2.45±0.36	7.56±0.56	5.96±0.80

*:$P<0.05$, **:$P<0.01$ *vs* SAM

* 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

2.2 脑缺血再灌流期线粒体膜的流动性变化(见表2)

表2 脑线粒体膜流动性变化

Tab 2 Change of membrane fluidity of brain mitochondria (microviscosity η)

SAM	I20 min	R1 h	R6 h	R2 d
2.82±0.28	3.90±0.76	4.73±0.62**	3.97±0.75	3.92±0.64

$n=6$, **: $P<0.01$ *vs* SAM

膜流动性以平均微粘度η表示,η越大膜流动性越低,与SAM组比较,I20 min组膜流动性略降低,R1 h膜流动性明显降低,以后逐渐恢复。

2.3 PMSF对脑线粒体磷脂含量与膜流动性的影响(见表3)

表3 PMSF对脑线粒体磷脂含量与膜流动性的影响(μg/mg线粒体)

Tab 3 The effect of PMSF on the content of phospholipids and the membrane fluidity of brain mitochondria (μg/mg mitochondria)

Group	n	SAM	Vehicle group (R1 h)	PMSF group (R1 h)
PC	6	99.29±7.6	67.20±9.90△	90.10±7.16*
PE	6	57.32±4.42	36.16±5.14△△	52.21±4.12*
CL	6	3.14±0.44	1.90±0.38△	52.21±4.12*
Membrane fluidity (Microviscosity η)	6	2.82±0.28	4.60±0.58△	3.06±0.52*

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* SAM;
*: $P<0.05$ *vs* vehicle

2.4 PMSF对海马CA_1区神经元密度的影响

由表4可知,R7 d未治疗疗组与SAM组比较,神经元密度明显减少,PMSF治疗组神经元密度却元明显降低。

表4 海马CA_1区神经元密度

Tab 4 The density of Neuron in the CA_1 subfield of hippocampus

Group	n	Neuronal density (No of nouron/mm)
SAM	7	196±12
Vehicle (R7 d)	7	80±10△
PMSF (R7 d)	7	156±15*

△: $P<0.05$ *vs* SAM; *: $P<0.05$ *vs* Vehicle

3 讨论

磷脂是线粒体膜的主要成分,与线粒体ATP合成及膜的流动性等密切相关,是线粒体发挥正常生理功能不可缺少的重要成份。本实验动态观察脑缺血再灌流期线粒体磷脂成分和膜的流动性,结果发现R1h组线粒体磷脂中PC、PE、CL含量和线粒体膜流动性均明显降低;随着再灌时间延长,线粒体PC、PE、CL含量增高、膜的流动性亦恢复,表明线粒体磷脂含量与膜流动性密切相关。生物膜流动性与生物膜上脂肪酸链长度和不饱和程度、胆固醇与磷脂比值、卵磷脂与鞘磷脂的比值等有关。脑缺血与再灌早期,磷脂酶A_2(PLA_2)被激活,使膜磷脂降解,磷脂含量降低,多不饱和脂肪酸丢失,生物膜上脂肪酸链缩短,导致线粒体膜流动性下降[5]。随着再灌时间延长,脑线粒体呼吸功能逐渐恢复,使依赖ATP的溶血磷脂再酰化作用逐渐增强,故磷脂含量和膜流动性逐渐恢复。

线粒体膜磷脂降解,可引起膜通透性增加,使Ca^{++}易于进入线粒体,导致"钙超载",影响线粒体功能;线粒体膜磷脂降解,使游离脂肪酸含量增加,后者是一种脱偶联剂,使ADP/O比值减少,影响线粒体呼吸功能[6];线粒体膜磷脂降解,影响其酶的活性,如心磷脂是脑线粒体内膜的主要成分,细胞色素C氧化酶及ATP合成酶的活性与心磷脂紧密相关,影响二酶的活性,可使ATP合成减少[7];因此当脑缺血再灌时,线粒体膜磷脂降解影响线粒体的功能,参与缺血性神经元损伤。

新近肌醇磷脂信使系统在缺血性脑损伤中的作用已受到关注,神经递质可与细胞膜受体结合,通过G蛋白偶联,激活PLC,PLC激活后使生物膜上多磷酸肌醇磷脂裂解,产生三磷酸肌醇(IP_3)与甘油二酯,IP_3可介导线粒体内贮存的Ca^{++}释放至胞浆,胞浆内Ca^{++}增高致使细胞损伤;另方面,胞浆Ca^{++}增高,又可进一步激活PLA_2,加速了脑缺血时膜磷脂的降解。本实验证明,PLC抑制剂PMSF能使脑缺血再灌流早期脑线粒体磷脂含量与膜的流动性增高使海马CA_1区神经元密度增高防止脑缺血引起的海马神经元迟发性坏死。因而,从肌醇磷脂信使系统的角度,PMSF又是一种良好的神经元保护剂,值得进一步探讨。

参考文献

1 Pulsinelli MA, Breierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the anesthatized rat. Stroke, 1979; 102:267

2 Clark JS, Willian J, Nickolas. The metabolism of rat brain mitochondria. J Biochem, 1970; 245:4724

3 汤习锋,康格非,曾成鸣. 高效液相色谱分析生物膜磷脂. 生物化学与生物物理进展, 1993; 20:399

4 Moto A, Hirashima Y, Endo S *et al*. Changes in lipids metabolites and enzymes in rat brain due to ischemia and re-

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

circulation. Molecular and Chemical Neuropathology，1991；14：35
5 Shapira Y. Accumulation of calicium in the following head trauma. Neurol Res，1989；11：69
6 Guntehero D. Lipids of mitocnondria. Acta Biochem Biophys，1985；822：1
7 Nakahara I，Kikuchi Taki W *et al*. Changes in major phos－pholipids of mitochondria during postischemic reperfusion in rat brain. J Neurosurg，1992；76：244

（收稿：1995-04-25；修回：1995-09-20）
（编辑　刘　鹏）

Changes of phospholipids and membrane fluidity of brain mitochondria in cerebral ischemia and reperfusion

Wang Qingsong，Zeng Caimei，Li Lusi（Department of Neurology，Southwest Hospital，Third Military Medical University，Chongqing，630038）

Abstract　In order to elucidate the role of phosphoinositide transduction system played in the mitochondrial damages during cerbral ischemia－reperfusion injury，the changes of phospholipids and membrane fluidity of the mitochondria were observed. It was found that the phospholipid level and mitochondrial membrane fluidity were decreased significantly in the 1st h after reperfusion and came up later to the level of SAM group. In addition，treatment with PMSF could increase phospholipid level，improve mitochondrial mebrane fluidity and attenuate the severity of delayed death of CA_1 pyramidal cells in the hippocampus. These findings suggest that the damages to the mitochondria during cerebral ischemia－reperfusion injury are closely related to the level of mitochondrial phospholipids.

Key words　cerebral ischemia and reperfusion；mitochondrion；phospholipid；membrane fluidity；PMSF

（上接 12 页）

2　讨论

2.1　根据组织来源可将第四脑室内脑膜瘤分为如下两型

2.1.1　起源于第四脑室脉络丛，仅在第四脑室内生长。

2.1.2　起源于下髓帆脉络膜，肿瘤部分生长在第四脑室内，部分在小脑半球及蚓部，可与附近脑膜有粘连。所见报告的24例病人中，以第一种类型最多见[1]。本组3例病人肿瘤均位于第四脑室内，与脑膜有轻度粘连。病理诊断与原发性第四脑室脑膜瘤相同，为纤维细胞型脑膜瘤。

2.2　鉴别诊断

第四脑室内脑膜瘤应与第四脑室内其他肿瘤鉴别。其中最困难的是第四脑室内脉络丛乳头状瘤。有人提出下列CT表现有助于两者区别[2]：①第四脑室内脑膜瘤边界清楚，光滑；而脉络丛乳头状瘤常表现为不规则的肿瘤边界。②脑膜瘤钙化发生率高于脉络丛乳头状瘤。③CT平扫时脑膜瘤及大多数乳头状瘤的密度高于脑组织，但等密度乳头状瘤并非少见。

2.3　手术及预后

第四脑室内脑膜瘤边界清楚，包膜完整，与底部粘连不重，手术易于分离切除。在显微操作下手术，可将肿瘤全切。第四脑室内脑膜瘤预后良好，死残率低。本组1例术前脑积水，术后并发双侧额颞部硬膜下积液，引流后好转。其余两例无并发症。3例病人随访1～2年，无肿瘤复发。

关键词　脑膜肿瘤/外科手术
中图法分类号　R739.45

参考文献

1 Roberto D. Meningiomas of the fourth ventricle：A case report. Neurosurg Rev，1992；15：147
2 Matsumura M. Primary intraventricular meningiomas of the fouth ventricle. Case report. Neurol Med Chir，1988；28：996

（收稿：1995-03-16；修回：1996-01-02）
（编辑　张大春）

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