DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.03.007

递质和非递质性氨基酸在脊髓缺血性继发损伤中的作用

胡文辉 杨恒文 廖维宏 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 用6300黄金系列氨基酸自动分析仪对清醒兔脊髓缺血20 min,再灌不同时间后测定L_4脊髓组织中的兴奋性氨基酸(谷氨酸,门冬氨酸),抑制性氨基酸(甘氨酸,r-氨基丁酸,牛黄酸,丙氨酸)和非递质性氨基酸(谷氨酰胺,苏氨酸,丝氨酸)的变化。缺血20 min时各氨基酸均无变化,谷氨酸,门冬氨酸分别在再灌36 h和48 h显著下降,甘氨酸在再灌2 h和48 h、丙氨酸在2 h和24 h、r-氨基丁酸在灌36 h下降显著,牛黄酸在24 h和36 h显著升高。谷氨酰胺在36 h和48 h下降,苏氨酸和丝氨酸在各时相点无明显变化。上述变化的时间与脊髓缺血性继发损伤时间一致,本文对各氨基酸变化的机制进行了讨论。

关键词 氨基酸;脊髓损伤;缺血;再灌流损伤

中图法分类号 R651.2

人类"进展性中风"的功能恶化时间主要在发病后48 h,主动脉手术后1～5 d部分病人才发生截瘫,兔脊髓缺血再灌后14～48 h出现继发性功能障碍[1]。我们建立了清醒兔脊髓缺血再灌模型,其继发性功能障碍时间为17～40 h[2]。这种继发性损伤机制尚不清楚,本文探讨兴奋性和抑制性氨基酸(EAA、IAA)及非递质性氨基酸的作用。

1 材料与方法

1.1 缺血再灌模型与脊髓标本制备

健康日本大耳兔36只,雌雄不拘,体重2.5～3.0 kg。2%戊巴比妥钠(25～30 mg/kg)经耳缘静脉麻醉。动物右侧卧位,经腹膜后显露腹主动脉,在左肾动脉分支之下的主动脉上套一粗绳,并用导管引出固定。在动物苏醒后24～36 h牵拉粗绳并保持一定时间松开,造成脊髓缺血再灌模型(图1)。缺血20 min再灌后的继发损伤率达87%[2]。

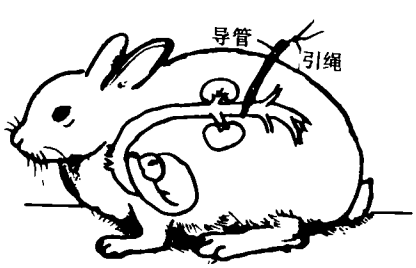


图1 兔腹主动脉阻断示意图

Fig 1 Schematic diagram of infrarenal aoria occlusion in rabbit

动物随机分为缺血20 min,再灌2、12、24、36和48 h,每时相点5只;对照组6只。取材时颈动脉放血处死动物,迅速显露和切取L_4脊髓,用JN－A型精密扭力天平称重(约80～90 mg)后置于冰镇玻璃试管中,按每100 mg组织3 ml的比例加入4℃的10%磺基水杨酸,用内切式组织匀浆机制成匀浆。然后用ZK380型低温离心机(西德Herlmes产品)经13 700 rpm离心20 min,取上清液保存于－40℃低温冰箱中待测。

1.2 氨基酸测定

用6300黄金系列氨基酸自动分析仪(Beckman公司产品)检测谷氨酸(Glu)、门冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)、r-氨基丁酸(GABA)、牛磺酸(Tau)、丙氨酸(Ala)、谷氨酰胺(Gln)、苏氨酸(Thr)和丝氨酸(Ser)。样品以柠檬酸锂缓冲液1∶3进行稀释,最终浓度以nmol/mg湿重组织表示[3]。

1.3 统计学方法

采用单因素方差分析和FLSD比较,各值以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 兴奋性氨基酸变化

Glu和Asp在缺血20 min及再灌不同时间均有不同程度下降,但只有Glu在再灌48 h和Asp在再灌36 h的下降具有显著性(附表,图2)。

2.2 抑制性氨基酸变化

Gly和Ala在再灌2 h显著下降、12 h恢复,Ala在再灌24 h、Gly在再灌48 h又显著下降;GABA只在再灌6 h下降显著;Tau在再灌24 h和36 h升高非常显著(附表,图3)。

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

附表　缺血再灌对清醒兔脊髓组织递质性和非递质性氨基酸的影响

Table　Effect of ischemia and reperfusion on neurotransmitter and nonneurotransmitter amino acid contents in L_4 spinal cord of awake rabbits

Amino Acids	Control (6)	Ischemia 20 mins(5)	Postreperfusion				
			2 h(5)	12 h(5)	24 h(5)	36 h(5)	48 h(5)
Glu	4.65±0.45	4.13±0.44	4.19±0.44	4.56±0.45	4.43±1.17	4.09±0.54	4.03±0.37
Asp	3.27±0.45	3.07±0.30	3.01±0.28	3.09±0.29	3.11±0.04	2.72±0.32*	2.92±0.35
Gly	3.49±0.33	3.24±0.45	3.12±0.24*	3.27±0.08	3.25±0.28	3.20±0.49	3.07±0.14
Tau	0.97±0.14	1.19±0.66	1.06±0.44	0.91±0.23	1.73±0.58**	1.39±0.26**	0.96±0.32
GABA	0.36±0.12	0.37±0.23	0.30±0.13	0.35±0.07	0.36±0.05	0.27±0.05*	0.32±0.07
Ala	1.45±0.08	1.42±0.11	1.43±0.07*	1.35±0.05	1.29±0.07*	1.36±0.09	1.38±0.09
Gln	4.27±1.09	3.63±0.94	3.82±0.48	3.89±0.83	3.78±0.47	2.91±0.54*	3.10±0.30
Thr	1.43±0.09	1.41±0.11	1.43±0.07	1.47±0.05	1.42±0.05	1.46±0.07	1.43±0.03
Ser	1.70±0.14	1.75±0.21	1.90±0.27	1.79±0.17	1.69±0.12	1.70±0.17	1.69±0.12

Compared with Control, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; Numbers of rabbits is inparenthesis.

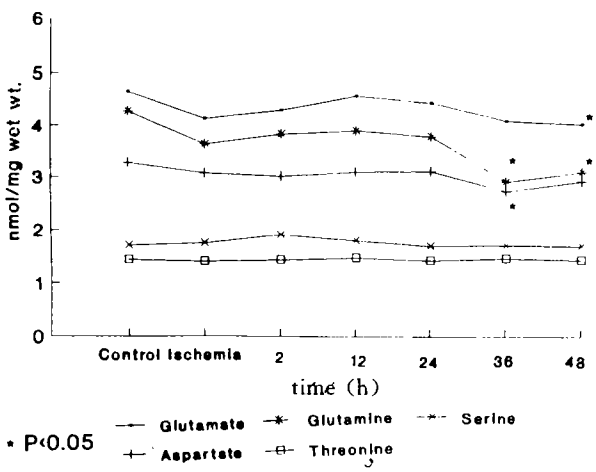


图 2　脊髓缺血再灌后兴奋性和非递质性氨基酸变化

Fig 2　Total spinal cord tissue levels of excitatory and nonneurotransmitter amino acids as a function of time postinjury

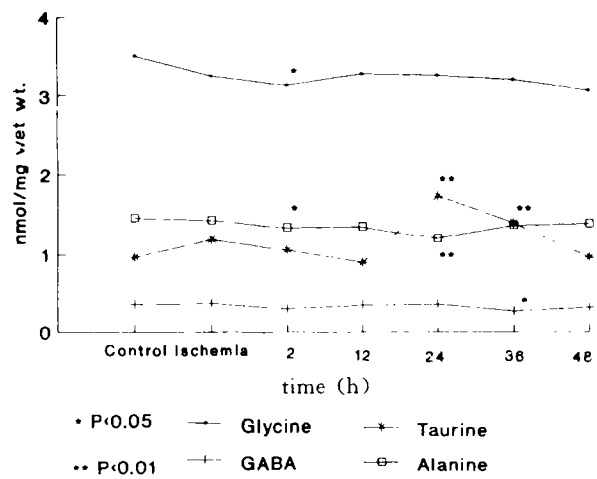


图 3　脊髓缺血再灌后抑制性氨基酸变化

Fig 3　Total spinal cord tissue levels of inhibitory nurotransmitter amino acids as a function of time postinjury

2.3　非递质性氨基酸变化

Gln 在再灌 36 h 和 48 h 显著下降；而 Thr 和 Ser 在各时相点均无显著变化(附表，图 2)。

3　讨论

中枢神经损伤后，组织总 EAA 含量([EAA]t)下降、细胞外 EAA 含量([EAA]e)升高，具有一定普遍性，各家报道较一致[4~11]。狗脊髓缺血后[EAA]t 快速下降、并持续至再灌 24 h[4]，猫脊髓缺血后 1～4 周[EAA]t 下降[5]；大鼠脊髓创伤后 5 min[EAA]t 下降，持续至伤后 4～24 h，并与损伤程度密切相关[6]；脑缺血、缺氧、创伤等也导致[EAA]t 下降[7]。本文观察到清醒兔脊髓缺血 20 min 再灌 36～48 h[EAA]t 显著下降，并与继发损伤和功能障碍时间吻合[2]。[EAA]t 下降提示 EAA 从细胞内释放或漏出，进而流入血液和脑脊液[6,7]。已证明兔脊髓和大鼠脑缺血后[EAA]e 显著升高[8~11]。缺血再灌时的 Na－K 平衡破坏和细胞膜损伤将影响神经元对 EAA 的梯度维持和再摄取机制[6,7]，胶质细胞的摄取和代谢转化也可能使[EAA]t 下降[6]；EAA 作用于相应受体，引起正反馈性 EAA 释放，造成恶性循环[7]。本文的脊髓缺血再灌

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

早期[EAA]t下降程度可能尚不足以导致细胞损伤，功能上仅为暂时性抑制，再灌36～48 h EAA进一步释放引起受体过度兴奋，从而导致脊髓继发损伤和功能障碍。已有证明EAA受体拮抗剂可显著改善脊髓缺血[12]和创伤[13]后的神经功能。

IAA变化因模型、方法、种属、组织部位不同而异。Homma报道猫脊髓缺血1～4周组织总的GABA和Gly显著下降，而Tau显著升高，其程度与神经元受损程度平行[5]，这与本文结果一致。Miyata(1972，1975)和Davidoff(1967)也分别证实猫脊髓缺血后GABA和Gly下降[5]，但Davidoff在猫[5]和Chavko在狗[4]发现GABA无明显变化。大鼠脑缺血引起组织总GABA和Ala升高，而Gly和Tau无变化[7]。兔脊髓[8]脑[9,10]缺血后细胞外GABA、Gly和Tau均显著升高。因此，IAA变化似乎与EAA变化一致。关于IAA的作用和机制尚不清楚。Gly是脊髓中含量最丰富的IAA，主要起突触后抑制作用，其Ⅰ型受体的作用类似NMDA受体，可引起钙内流性细胞死亡[8]。因而Gly与EAA间可能有协同或叠加作用。Gly主要存在于抑制性中间神经元，Glu、Asp主要存在于兴奋性中间神经元，且二者在神经元中的含量高于胶质细胞中[5]。GABA主要存在于背角抑制性神经元[5]，在脊髓中起突触前抑制作用，在脑中起突触后抑制作用。脊缺血后Gly、GABA、Glu和Asp均见下降，可能与中间神经元缺失或损伤有关[5]。脊髓缺血后GABA下降或无变化，而脑缺血后组织总的和细胞外的GABA升高，提示GABA在脊髓中的作用可能不如脑中的强。但细胞外Gly和GABA升高，提示在单个细胞水平，Gly和GABA对受体的作用增强，可能引起“抑制毒性作用”。

对Tau在中枢神经中的作用了解甚少。Tau可抑制运动神经元、润绍细胞和背角中间神经元的活动，可拮抗NMDA受体而限制钙内流[5]，作用似乎与Gly相反。这与本文脊髓缺血后组织总Tau升高而Gly下降的结果一致。但Tau在细胞外的含量也显著升高[8]，其机制尚不清楚。Tau升高可能还与胶质细胞增殖有关，因Tau与胶质细胞有高亲和力[5]为少数脑区存在的含量低的IAA[7]，也有作者将Ala划为非递质性氨基酸[6]。脑缺血和脊髓创伤后Ala升高[6,7]，被认为是谷丙转氨酶活性升高所致。本文观察到脊髓缺血再灌2 h和24 h Ala显著下降，与继发性功能障碍时间一致，其机制尚待研究。

Gln在再灌36～48 h显著下降，可能是Gln优先用于糖代谢或向Glu转化所致[8]。Homma报道组织总Gln升高与胶质细胞增殖有关[5]，Simpson发现脊髓缺血后细胞外Gln无变化[8]；但脊髓创伤后组织总Gln下降[6]，细胞外Gln升高[11]能与神经元破损和局部出血有关[11]。脊髓创伤和脑缺血后Thr和Ser等非递质氨基酸升高，与蛋白合成减少和降解增强有关[6,7]。本文未见Thr和Ser有明显变化，提示蛋白代谢障碍在缺血性继发损伤中可能不是主要因素。研究表明中枢神经缺血60 min以上(不可逆性损伤)才发生明显的蛋白代谢障碍[14]。

参考文献

1 Moore Jr WM, Hollier LH. The influence of severity of spinal cord ischemia in the etiology of delayed-onset paraplegia. Ann Surg, 1991, 213(5): 427

2 胡文辉，杨恒文，鲁晓滨，等. 清醒兔脊髓缺血再灌流损伤的功能观察. 中国病理生理学杂志，1993，9(4)：483

3 周成贵 孙 伟 李才安，等. 脑组织中兴奋及抑制性氨基酸的实验研究. 氨基酸杂志，1992，4：35

4 Chavko M, Martimak J, Luxova M, et al. Free amino acid in the dog spinal cord during prolonged ischemia. Physiol Bohemoslov, 1982, 31: 415

5 Homma A, Suzuki T, Muraama S, et al. Amino acid and substance P contents in spinal cord of cats with experimental hind-limb rigity produced by occlusion of spinal cord blood supply. J Neurochem, 1979, 32: 619

6 Demediuk P, Daly MP, Faden AI. Effect of impact trauma on neurotransmitter and nonneurotransmitter amino acids in rat spinal cord. J Neurochem, 1989, 52: 1529

7 Erecinska M, Nelson D, Wolson DF, et al. Neurotransmitter amino acids in the CNS. I Regional changes in amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion. Brain Res, 1984, 304: 9

8 Simpson Jr RK, Robertsin CS, Goodman JC. Spinal cord ischemia-induced elevation of amino acids: Extracellular measurement with microdialysis. Neurochem Res, 1990, 15: 635

9 Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, et al. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra-to extracellilar compartments. J Cereb Blood Flow Metab, 1985, 5: 413

10 Korf J, Klein HC, Venema K, et al. Increases in striatal and hippocampal inpedance and extracellular levels of

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

amino acids by cardiac arrest in freely moving rats. J Neurochem, 1988, 50: 1087

11 Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. Brain Res, 1991, 547: 344

12 Madden KP, Clark WM, Kochhar A, et al. Efficacy of LY233053, a competitive glutamate antagonist, in experimental central nervous system ischemia. J Neurosurg, 1992, 76: 106

13 Faden AI, Lemke M, Simon RP, et al. N-methyl-D-aspartate antagnoist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. J Neurotrauma, 1988, 5: 33

14 Gottlibse M, Chavko M, Marsala J. Effect of ischemia on the activity of DNA-dependent RNA polymerase and DNA polymerase. J Neurochem, 1981, 37: 255

(收稿: 1993-02-24; 修回: 1993-06-28)

The effects of neurotransmitter and non-neurotransmitter amino acids in secondary ischemic spinal cord injury in rabbits

Hu Wenhui, Yang Hengwen, Liao Weihong (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract To induce ischemia of the spinal cord, the abdominal aorta was occluded below the origin of the renal arteries for 20 minutes. The tissue content of excitatory (glutamic and aspartic acid), inhibitory (glycine, GABA, taurine and alanine) and neutral (glutamine, threonine and serine) amino acids was determined in the 4th lumbar segment of the spinal cord before and certain intervals after the reperfusion of the cord. It was found that all the amino acids showed no significant changes during ischemia, glutamate and aspartate were markedly decreased in the 36th and 48th hour after reperfusion, and glycine was decreased in the 2nd and 48th hour, GABA in the 36th hour, and alanine in the 2nd and 24th hour after reperfusion respectively. But taurine was increased in the 24th and 36th hour, glutamine was decreased in the 36th and 48th hour and threonine and serine were not changed at all the time points. The occurrence of the abnormal changes of the amino acids was consistent to the development of the secondary ischemic damages of the spinal cord. The mechanism of the change of each amino acid was discussed.

Key words amino acids; spinal cord injuries; ischemia; reperfusion injury

微波炉融化新鲜冰冻血浆对免疫球蛋白等的影响

成晓玲 林式存 李 兵 (第三军医大学西南医院输血科) 630038
陈绍华 (第三军医大学西南医院检验科) 630038

微波炉(Microwave Oven, MWO)融化新鲜冰冻血浆(FFP),具有时间短、温度低,能保持良好的凝血因子活性及白蛋白水平的优点,但对FFP中免疫球蛋白(Ig)、补体C_3及抗-A、抗-B凝集素的影响尚无报道,我们检测了20例,报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料

20名健康献血者,按单采操作规程,每人取400 ml新鲜血浆,混匀,留取2 ml作为对照组标本。余下分装成2袋,约200 ml/袋,分为甲、乙2组,每组20袋。低温酒精浴预冷后,置-30℃冰箱中,6 h内冰冻成固态,即为FFP。

1.2 方法

取出-30℃保存48 h的FFP,甲组37℃水浴法(WB)融化,乙组MWO法融化[1,2]。分别取出对照组、甲组、乙组等量血浆样本检测。

1.3 观察项目

IgG、IgA、IgM、补体C_3含量(单向免疫扩散法,免疫扩散检测板由重庆医学检验试剂研究所提供);血浆抗-A、抗-B效价测定[3]。

(下转 177 页)

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