DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.018

大鼠脑挫伤后脑不同部位细胞和线粒体内的钙含量变化

隋建峰* 熊德佐 张可成 (第三军医大学新桥医院脑外科) 630037

提 要 用原子吸收分光光度法(AAS)及比色法分别测定了脑挫伤后8 h大鼠各脑区细胞内钙(Cai)、组织总磷(Pt)、线粒体钙(Camt)、线粒体(Pmt)的含量变化,结果表明原发损伤可使多数脑区的细胞受到影响并发生Ca^{2+}内流,局部伤情影响着Ca^{2+}内流程度;内流Ca^{2+}多是以结合形式沉积于胞浆等部位以维持胞内Ca^{2+}浓度($[Ca^{2+}]i$)稳定,蛋白质是可能的主要结合剂;但严重的Ca^{2+}内流将造成线粒体钙储积及$[Ca^{2+}]i$失衡并引发组织细胞继发性破坏,导致Pt下降。

关键词 脑损伤;钙;线粒体;磷
中图法分类号 R651.15

Ca^{2+}内流对脑缺血、脊髓挫伤后神经细胞的损伤作用受到广泛重视[1~3],但对于脑挫伤后的Ca^{2+}内流及其作用研究较少。本实验以AAS及比色法检测了脑挫伤后8 h大鼠各脑区Cai、Pt、Camt、Pmt含量变化,旨在为澄清脑损伤后的Ca^{2+}内流及作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

采用体重230~300 g雄性Wistar大鼠28只,随机分为Cai、Pt对照组及外伤组,Camt、Pmt对照组及外伤组,每组7只。

1.2 脑挫伤模型建立

以1%戊巴比妥钠35 mg/kg腹腔注射,动物麻醉后开颅暴露左顶硬脑膜,采用重20g、底面直径0.5cm的重物从10 cm高度垂直坠落至硬脑膜制成大鼠脑挫伤模型,对照组只开颅不致伤。

1.3 取材与测定

1.3.1 Cai、Pt含量测定:术后8 h用去离子水250 ml行颈总动脉灌流1 h,以冲洗脑内积血并冲洗胞外Ca^{2+},然后开颅取出全脑在去离子水中荡洗3次并剔除脑膜及淤血点,从挫伤区中心、挫伤区边缘、挫伤区对应的健侧皮层相应区(以下简称对侧)、脑干四区各留取80 mg左右湿组织备用。对照组同样取上述4个相应区域的脑组织备用。测定:Pt的测定按比色法[1],Cai的测定方法如下:将标本置于37℃ La^{-3}溶液[其组成(mmol/L):NaCl 122,KCl 5.9,$MgCl_2$ 1.25,Glucose 11,$LaCl_3$ 50,Tris 15,pH7.4]中温育30 min,此法可以将大部分胞外Ca^{2+}置换掉[5]。然后取出用去离子水冲洗3次,置于72℃烤箱烘烤3 d后称重。将干燥脑组织溶入1∶1(体积比)硝酸溶液中消化24 h,常温下离心(500 g)30 min,取其上清液以0.5% $LaCl_3$-0.1 nmol/L HCl溶液1∶5稀释后在IL-951型原子吸收分光光度计上测定Cai含量,结果以每克干组织(G.D.W)中Cai的μg量、Pt的mg量表示。

1.3.2 Camt,Pmt含量测定:术后8h迅速用0℃去离子水15 ml行颈总动脉灌流然后迅速取出全脑置于0℃线粒体(Mt)液[其成分:0.32 mol/L sucrose,1 mmol/L EDTA,10 mmol/L Tris-HCl,pH7.4)][6]中,荡洗并剔出脑膜及淤血点,对照组及外伤组同样取上述四区湿组织80 mg左右迅速置于0℃ Mt液中并在0℃水浴中匀浆,用差速离心法分离线粒体[6]。线粒体分离出后加入少量去离子水振荡5 min制成Mt悬液(其蛋白浓度:1 mg·prt/ml),取0.2 ml定量稀释后用Lowry's法测定蛋白质含量,其余以2 nmol/L HCl消化24 h,离心(800 g)30 min,取其上清液一部分用于Pmt测定,按比色法,一部分以0.5% $LaCl_3$-0.1 nmol/L HCl溶液定量稀释后同样用AAS法测定Camt水平,结果用每毫克蛋白质(mg·prt)中Camt的ng量、Pmt的μg量表示。

2 结果

2.1 外伤后8 h各脑区Cai、Pt含量变化

如表1所示,伤后各脑区Cai含量均有升高,尤以伤灶、灶缘为著并伴有Pt降低;而对侧、脑干Cai变化相对缓和且不伴有Pt下降。

表1 脑挫伤后8 h各脑区Cai、Pt含量变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The contents of calcium inside cells and phosphorus in tissues in various brain regions of rats 8 hours after cerebral contuion ($\bar{x}\pm s$)

Group	Cai (μg/g·DW)				Pt (mg/g·DW)			
	Impact site	The edge	Opposite site	Brain stem	Impact site	The edge	Oppsite site	Brain stem
Control	398.1±37.5	408.2±26.3	387.5±31.0	434.7±37.2	11.1±1.4	12.4±2.2	10.3±1.5	12.8±2.3
Trauma	1324.3±44.2**	930.4±54.1**	480.2±43.2**	498.6±44.8**	8.4±1.8*	9.0±1.2*	10.8±1.9	13.2±2.0

※※: $P<0.01$ vs control; ※: $P<0.1$ vs control

* 现在学校生理学教研室室工作

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

2.2 外伤后8 h 各脑区 Camt、Pmt 含量变化

如表2所示，伤后8 h Camt 仅在伤灶、灶缘两区出现升高，对侧、脑干变化不显著；Pmt 在各脑区均无变化。

表2 脑挫伤后8 h 各脑区 Camt、Pmt 含量变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 The contents of mitochondrial calcium and phosphorus in various brain regions of rats 8 hours after cerebral contusion ($\bar{x} \pm s$)

Group	Cai (ng/mg·prt)				Pt (μg/mg·prt)			
	Impact site	The edge	Opposite site	Brain stem	Impact site	The edge	Oppsite site	Brain stem
Control	241.2±32.5	246.7±27.6	234.3±31.7	260.8±37.4	8.9±1.4	9.8±2.1	9.2±1.1	11.5±1.7
Trauma	510.2±43.8※※	382.7±40.3※※	228.6±28.8	267.3±30.1	10.2±1.8	8.8±1.7	10.7±2.3	12.0±2.0

※※：$P < 0.01$ vs control

3 讨论

一般认为，Ca^{2-} 内流可以诱发一系列损伤细胞的有害反应，许多作者通过测定脑组织总钙(Cat)及胞外游离钙($[Ca^{2-}]e$)水平，在脑缺血、脊髓挫伤动物模型上也发现这一点[1~3]。鉴于 Cai 测定有困难，以往未曾见到测定神经细胞 Cai 的报导。本实验尝试将 La^{-3} 技术[5]应用于神经组织 Cai 的测定，在大鼠脑挫伤动物模型上进行了研究。实验发现脑挫伤后全部所测脑区均出现 Cai 升高，以伤灶、灶缘为著，对侧、脑干较轻。这提示原发损伤可使多数脑区受到不同程度的影响并导致 Ca^{2-} 内流，局部伤情影响着 Ca^{2-} 内流的严重程度。Chen[7]发现脑缺血后 Cat 出现升高，其程度与梗塞范围有关，范围越大，Cat 增高越显著；Young[8]观察到脊髓损伤后伤灶 $[Ca^{2-}]e$ 迅速下降且不易恢复，而远离伤灶区域的 $[Ca^{2-}]e$ 下降很快恢复。上述发现与本实验结果有类似意义。

一般认为，神经细胞损伤后 Ca^{2-} 内流的主要途径是非特异性膜渗漏[3,7,8]。无论缺血或机械原因造成的细胞器质性或功能性损伤都可表现出膜通透性增加，由于正常的 $[Ca^{2-}]e$ 是 $[Ca^{2-}]i$ 的 $10^{3\sim5}$ 倍，故伤后不可避免发生 Ca^{2-} 的平稳性移动——内流。而细胞 ATP 的产生和供应障碍又可导致能量依赖的膜离子转运机制失去效能，内流 Ca^{2-} 不能及时泵出胞外，导致 Cai 升高。最近的研究表明，脑缺血后兴奋性神经递质谷氨酸在胞外异常增多，它既可以使细胞发生去极化，打开电压依赖性钙通道，又可以直接作用于胞膜谷氨酸受体物质——N-甲基-D 型天门冬氨酸(NMDA)受体，开放受体依赖性钙通道，从而在诱导 Ca^{2-} 内流过程中发挥重要作用[9,10]。

大量证据表明，内流 Ca^{2-} 多是以结合形式存在[3,7]，这可能是组织损伤后 Ca^{2-} 泵暂时失去效能时细胞维持 $[Ca^{2-}]i$ 稳定的有效途径，但对其沉陷部位及结合剂问题不甚明确。本实验发现，伤后8 h 伤灶、灶缘出现 Camt 增高，而对侧、脑干变化不显著，这提示在 Ca^{2-} 内流严重时将出现线粒体钙储积，但在 Ca^{2-} 内流较轻时则不然。推测在 Ca^{2-} 内流较轻时通过胞浆对 Ca^{2-} 的沉陷（此时胞膜对 Ca^{2-} 的主动转运活动暂时出现障碍）已足以调控 $[Ca^{2-}]i$ 在稳定范围，不需动用需耗能转运 Ca^{2-} 的线粒体钙库；但在 Ca^{2+} 内流严重时，线粒体钙储积必然发生。

关于 Ca^{2-} 的结合剂问题，一般认为正常时主要是钙结合蛋白，在组织损伤时，可能是磷酸盐。有作者发现细胞的坏死和破坏可释放大量过剩的磷酸盐[8]。本实验发现伤后各脑区 Pmt 均无变化，即使在 Camt 出现增高的脑区亦是如此，这显然不支持上述观点。推测在细胞损伤时，钙结合蛋白依然是 Ca^{2-} 的主要结合剂。

大量体外实验表明 $[Ca^{2-}]i$ 增高对细胞有破坏作用，其损伤途径有[1~3,7,8]：①过量 Ca^{2-} 沉积于线粒体内导致能量代谢障碍；②$[Ca^{2-}]i$ 增高可以激活蛋白酶、磷脂酶，导致膜结构破坏；③Ca^{2-} 内流可提高膜对其它离子的通透性，加重受损细胞内外的离子失衡。在脑缺血、脊髓挫伤后的神经细胞损伤机制研究中，这一理论已被多数学者接受[2,3]。本实验注意到，在 Ca^{2-} 内流严重的脑区（伤灶、灶缘），Pt 明显下降，而在 Ca^{2-} 内流较轻的脑区（对侧、脑干），Pt 变化不显著。表明前者有细胞的继发性破坏发生而后者则不然。对于 $[Ca^{2-}]i$ 增至何种水平将会导致细胞损害有待于进一步研究。本实验提示，一旦 Ca^{2-} 内流引起线粒体钙储积，则将发生细胞的继发性破坏，并导致 Pt 下降。

目前在脑缺血、脊髓挫伤治疗研究中，Ca^{2-} 通道阻滞剂、谷氨酸受体拮抗剂倍受重视，实验与临床试用均已取得肯定疗效[10]。本研究为应用 Ca^{2-} 通道阻滞剂治疗颅脑外伤提供了理论依据。

参考文献

1 Kwo S, Young W, Decrescito V. Spinal Cord sodium,

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

potassium, calcium, and water concentration changes in rats after graded contusion injury. J Neurotrauma, 1989, 6(1): 13
2 Rappaport ZH, Young W, Flamm ES. Regional brain calcium changes in the rat middle cerebral artery occulusion model of ischemia. Stroke, 1987, 18(4): 760
3 Young W, Koreh I. Potassium and calcium changes in injured spinal cord. Brain Research, 1986, 365: 42
4 上海市医学化验所. 临床生化检验(上册). 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 224～227
5 Weiss GB. Calcium kinetics in vascular smooth muscle. Chest, 1985, 88(Suppl 4): 220S
6 Vitorica J, Machado A, Satrustegui J. Age-depecdent variations in peroxide-utilizing enzymes from rat brain mitochondria and cytoplasm. J Neurochem, 1984, 42(2): 351
7 Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, et al. Brain calcium content in ischemic infarction. Neurology, 1987, 37: 1227
8 Young W, Yen V, Blight A. Extracellular calcium ionic activity in experimental spinal cord contusion. Brain Research, 1982, 253: 105
9 Manev H, Favaron M, Guidotti A, et al. Delayed increase of Ca^{2-} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. Molecular Pharmacology, 1989, 36: 106
10 耿东进. 钙及谷氨酸受体拮抗剂治疗缺血性中风的研究进展. 国外医学: 神经病学与神经外科学分册, 1991, 18(2): 63

(收稿: 1993-08-27, 修回: 1993-12-11)

Study of the effects of cerebral contusion on cellular and mitochondrial calcium level of different regions of the brain in rats

Sui Jianfeng, Xiong Dezuo, Zhang Kecheng (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630037)

Abstract The cellular and mitochondrial level of calcium, the total phosphorus in brain tissue and mitochondrial phosphorus in different regions of the brain were determined with absorption spectroscopy and chromometry in rats 8 hours after they were inflicted with cerebral contusion. It was found that primary cerebral contusion could induce Ca^{++} influx of the cells in most of the brain regions and the intensity of Ca^{++} influx was correlated with the severity of local brain damage. Most of the influx Ca^{++} existed in the cytoplasm in bound forms to maintain a stable level of intracellular calcium ions, and protein was the main substance to bind with Ca^{++}. Massive Ca^{++} influx could lead to sequestration of Ca^{++} in the mitochondria and disturbed intracellular calcium level, which in turn brought about secondary damages on the tissue cells and a decrease of tissue phosphorus.

Key words brain injuries; calcium; mitochondria; phosphorus

小鼠白细胞介素-3 cDNA 逆转录病毒载体的构建及其转化细胞对小鼠造血功能的影响

刘 昕 朱锡华 (第三军医大学基础部分子遗传学教研室) 630038

为研究供细胞因子基因治疗的可能性，构建了载有小鼠IL-3 cDNA的逆转录病毒载体pSNIL$_3$。将此载体和作为对照的空载体用电穿孔法和磷酸钙DNA共沉淀法分别导入病毒包装细胞PA317，用G418筛选，获得稳定的转染子。经检测，这些细胞的培养上清中含有重组病毒。用此重组病毒感染、转化NIH/3T3细胞，经G418筛选，获得了稳定的转化细胞"3T3-IL$_3$"和"3T3-SN"。它们分别是用重组载体和空载体重组病毒转化的。用小鼠骨髓有核细胞增殖和CFU-GM的方法检测转化细胞培养上清的CSF活性，发现3T3-IL$_3$细胞培养上清有很强的CSF活性，用抗小鼠IL-3的单克隆抗体8F8可以中和这种活性，说明3T3-IL$_3$细胞分泌的CSF是IL-3。3T3-IL$_3$细胞分泌IL-3的性状在去掉选择压力6个月，传代约60代时仍无明显改变。将此分泌IL-3的3T3细胞用细胞胶原混合液的方式，注射到BALB/c小鼠腹部皮下，发现小鼠的造血功能受到了明显的刺激，出现了白细胞数目增加，肝、脾肿大，肝脏内出现了灶性分布的造血细胞，脾脏内各种分化阶段的造血细胞数目增加等现象。在放射损伤小鼠这些现象表现得尤其明显，并在其血清中检测出IL-3的活性。这些结果表明：类似IL-3这样的细胞因子，有可能通过采用基因治疗的技术在体内表达，达到治疗疾病的目的。

关键词 基因疗法；白细胞介素-3；逆转录病毒科
中图法分类号 R392.12

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