DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.04.017

脑缺血再灌流后多胺与兴奋性氨基酸的释放

郑彩梅 黎红华* 吕智勇 (第三军医大学西南医院神经内科) 630038

提 要 本实验观察全脑缺血大鼠缺血期与再灌流期海马组织多胺与 EAA 的含量变化,结果发现再灌流期腐胺含量增高,EAA 释放增加,采用 EAA 的 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 可使增高的腐胺降低,表明多胺代谢紊乱与 EAA 释放密切相关,多胺代谢又受 MNDA 受体的调节,多胺与 EAA 在缺血性脑损伤中共同起着重要的作用。

关键词 聚胺;氨基酸类;再灌流损伤;MK-801

近 10 余年来兴奋性氨基酸(EAA, excitatory amino acid)的毒性在缺血缺氧性脑损伤中的作用颇受关注,近几年多胺在缺血性脑损伤中作用的研究也有了起端,后者国内至今尚未见有关报道,文献提出脑缺血时脑组织多胺的变化可能与触发 EAA 的释放有关,但两者确切的关系还不十分清楚,本研究动态测定全脑缺血大鼠海马组织中多胺与 EAA 含量的变化,并观察 EAA 的 N-甲基-D 天门冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂 MK-801 对多胺的影响,通过阐明多胺代谢紊乱与 EAA 释放的关系,进一步探讨缺血性脑损伤的机理。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

采用改良式 Pulsinelli 法,将大鼠在乙醚浅麻醉下暴露第一颈椎横突孔,热灼凝闭双侧椎动脉,再暴露双侧颈总动脉,穿线备用,24 h 后,以微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 20min 造成全脑缺血,此为缺血 20min 组;以后松开动脉夹则为再灌流期,分别作再灌流 1 h、6 h、2 d 与 4 d 组;对照组手术步骤同前,仅不闭塞动脉;此外,重复再灌流 4 d 组,采用 MK-801 治疗,以作对比研究,该组用美国 Merch Sharp 公司提供的 MK-801 原粉,以灭菌生理盐水配成 0.2mg/ml溶液,按1mg/kg腹腔注射,缺血前20min与缺血后 20min 各给药 1 次。本实验共分 7 组,每组大鼠 6~7 只。

1.2 海马组织多胺测定

按实验要求时间,将大鼠断头取脑,冰盘上分离一侧海马置液氮中保存待测。测定时将组织加入一定比例的甲醇制成匀浆,再加 0.6mol/L 高氯酸 500μl 在 4℃下放置 40min,置 4℃下离心(20000rpm/min)30min,取上清液以 3mol/L KOH 中和,同上条件下再离心,取上清液进行色谱分析,分别测定腐胺、精脒、精胺含量。流动相:0.2mol/L 磷酸、0.1mol/L 三乙胺的60%甲醇溶液等量组成,流速0.8ml/min,479荧光测检器,激发波345nm,发射波长445nm, 色谱柱为美国 Water Nava-Pak C_{18} 3.9×150min,外标法定量,日本岛津 C-RIB 色谱数据。 回收率腐胺 99.36%、精脒 95.33%、精胺 96.17%。

1.3 海马组织 EAA 测定

按实验要求时间,将大鼠断头取脑,分离一侧海马,称湿重,按一定比例加磺基水杨酸制成匀浆,以 1.5×10⁴rpm/min 离心15min,取上清液用121-MB 型氨基酸分析仪测定 EAA 含量。对丙氨酸以前出峰的氨基酸,以 pH2.20柠檬酸锂3:1稀释样本后上机分析。

2 结果

2.1 脑缺血期与再灌流期海马组织多胺含量变化(参见表1)

* 现在广州军区武汉总医院

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1 海马组织多胺含量(nmol/mg 蛋白)

Tab 1 The content of polyamine in hippocampus (nmol/mg protein)

	Putrescine	Spermidine	Spermine
Control Group	1.132±0.760	61.377±24.485	57.745±14.781
I 20min	1.517±0.363	58.026± 6.939	64.370± 9.191
I 20min R 6 h	3.170±0.412**	63.770±10.810	70.060± 7.950
I 20min R 2 d	2.410±0.812**	42.274±25.479	56.850±26.262
I 20min R 4 d	4.726±2.010**	24.156± 8.410	79.266±27.690

$n=6$ *$P<0.05$ **$P<0.01$ Compared with Control Value; I—Ischemia, R—Reperfusion

上表可见,腐胺含量於再灌流期显著增高,至再灌流4 d,仍维持较高水平。

2.2 海马组织 EAA 含量变化(参见表2)

表2 海马组织 EAA 含量 (nmol/mg)

Tab 2 The content of EAA in hippolampus (nmol/mg)

	Control Group	I 20min	I 20min			
			R 1 h	R 6 h	R 2 d	R 4 d
Glu	10.35±1.71	9.12±1.84	7.12±1.26**	8.40±2.09	10.30±1.57	9.05±1.02
Asp	3.86±0.75	2.86±0.30*	2.63±0.74*	3.53±1.35	2.72±0.77*	3.30±0.78

$n=7$ *$P<0.05$ **$P<0.01$ Compared with Control Value; I—Ischemia, R—Reperfusion

上表可见,缺血20min,天门冬氨酸(Asp)显著降低,再灌1 h,Asp 与谷氨酸(Glu)均显著降低,再灌6 h 逐渐恢复至对照组水平。

2.3 MK-801治疗对海马组织多胺含量的影响(参见表3)

表3 MK-801治疗组与未治疗组海马组织多胺含量比较

Tab 3 Comparision of the content of polyamine in Hippocampus in no treatment and MK-801 treatment group

I 20min R 4 d	No	Putrescine (nmol/mg protein)	Spermidine (nmol/mg protein)	Spermine (nmol/mg protein)
No treatment	6	4.726±2.010	77.266±27.090	24.156± 8.140
MK-801 treatment	6	2.299±0.656*	84.080±27.017	49.176±12.365*

*$P<0.01$ Compared with no treatment; I—ischemia, R—reperfusion

3 讨论

EAA 在缺血性脑损伤中的神经毒性作用业已肯定,本实验观察了脑缺血大鼠海马组织两种主要的内源性 EAA—Glu 与 Asp 的变化,当缺血20min 时,Asp 含量显著降低,再灌流1 h,Asp 与 Glu 均显著降低,再灌流6 h 后渐恢复至对照组水平。以往脑透析法研究发现缺血后即可导致透析液中 Glu 增高,持续至再灌流10～20min[1]。我们曾作体外海马片缺血孵育,其孵育介质液中 Glu 与 Asp 显著增高,因此提示缺血与再灌流

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时，组织 Glu、Asp 降低，而细胞外液 Glu 与 Asp 均显著增高。本实验海马组织 Glu 与 Asp 含量降低，可能主要由于这两种 EAA 释放增多的原故。

本实验同时观察了脑缺血与再灌流期海马组织多胺含量变化，在3种多胺成份中，再灌流期腐胺的改变较为突出，该期由于鸟氨酸脱羧酸(ODC)的活性迅速增高，由鸟氨酸合成的腐胺亦明显增高[2]；精脒与精胺的改变不显著，可能由于腐胺进一步合成精脒与精胺的过程较缓慢之故。

脑缺血时多胺与 EAA 释放两者内在联系如何？至今尚不十分清楚，晚近在鸡胚视网膜体外研究中证明多胺影响急性 N—甲基—D 天门冬氨酸(NMDA)受体介导的神经毒性[2]。Komulainen 等[3]发现腐胺可使高 K^+ 去极化的突触小体内 Ca^{2+} 含量增高，从以上事实推断多胺充当信使调节 NMDA 受体离子通道活力，在高 K^+ 去极化介导下，触发 Ca^{2+} 内流及突触小体神经递质释放，包括 EAA 释放，其中重要的是 Glu 与 Asp 释放，释放至细胞外高浓度的 EAA 作用于竞争性与非竞争性 NMDA 受体，打开受体启动的离子通道引起 Na^+ 内流和膜去极化，为 Ca^{2+} 内流提供了“孔道”，同时由于膜去极化，打开电压敏感的 Ca^{2+} 通道，致使 Ca^{2+} 内流引起缺血性脑损伤的瀑布效应[4]。

多胺与 EAA 之间的相互作用较为复杂，不仅多胺可促进 EAA 释放，在 NMDA 受体传递中起着重要作用，而且多胺的代谢还受 NMDA 受体的调节，现已证实 NMDA 受体上存在特殊的多胺位点，在 L-Glu 及甘氨酸有效浓度下，多胺可增加 NMDA 受体与[^{3}H]MK-801的亲和力，L-Glu、甘氨酸与多胺分别通过其在 NMDA 受体识别位点结合，促进受体—离子通道复合体变构，暴露拮抗剂结合位点，加快 NMDA 受体拮抗剂结合。MK-801是一种非竞争性 NMDA 受体拮抗剂，能有效地阻滞 EAA 与突触后受体结合[5,6,7]。缺血与再灌流期，脑内 ODC 与腐胺迅速增高反映了 NMDA 受体介导的神经膜或其附近潜在的 ODC 激活—灭活循环，缺血再灌早期，NMDA 受体激活，引起 ODC 活性增高，使腐胺合成增加[2]。本实验采用 MK-801后能使再灌4 d 组大鼠海马组织腐胺含量明显降低，精胺明显增高，表明多胺代谢确实受到 NMDA 受体的调节。

综上所述，我们推断脑缺血再灌流期脑内 EAA 与多胺含量的变化并非各自单纯同属缺血的后果，而是密切相关的。我们所获结果中脑缺血与再灌流期脑组织 EAA 的改变早于腐胺，EAA 改变持续时间短暂，而腐胺的改变持续时间较长，表明脑缺血时 EAA 大量释放并非完全依赖于腐胺的调节，还有其固有的独特规律，多胺可能为促进释放的重要因素。虽然 EAA 的改变持续时间短暂，对神经元的毒性损伤却是很大的，它作用于突触后受体，直接改变膜离子通透性，产生急性毒性神经元肿胀[8]；还激活 NMDA 受体，介导受体依赖性 Ca^{2+} 内流[9]，又使脑内 ODC 增高，腐胺积蓄以及一系列的病理生理改变，造成晚发性神经元损伤。因此，多胺与 EAA 释放的密切关系中，Ca^{2+} 内流为重要环节，它们在缺血性脑损伤中共同起着重要的作用。

参考文献

1. Benveniste H, Drejer J, Schonsboe A, et al. Elevatation of the extracellular concentration of Glutamate and Aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J Neurochem, 1984; 43:1369

2. Koenig H, Trout JJ, Goldstone AD, et al. Polyamines as mediators of NMDA receptor excitoxicity in chick retina: Protection by a α-difluoromethylornithine. Neurol, 1989; 39:216

3. Komulainen H, Bondy SC. Transient elevation of

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

intrasynaptosomal free calcium by putrescine. Brain Res, 1987; 401: 50

4. Macdermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, et al. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. Nature, 1986; 321: 519
5. Richard W, Ransom, Stec NL. Cooperative modulation of (^{3}H) MK-801 binding to the N-methyl-D-asparate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. J Neurochem, 1988; 51: 830
6. Williams K, Romano C, Molinoff PB. Effects of polyamines on the binding of (^{3}H) MK-801 to the N-methyl-D-asparate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamines recognition site. Molecular Pharmacol, 1989; 36: 575
7. Reynolds IJ, Miller RT. Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-asparate receptor antagonist: interaction with polyamines. Molecular Pharmacol, 1989; 36: 758
8. Chol DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxity. J Neurosci, 1987; 7: 369
9. Cotman CW. Excitatory amino acid in the brain focas on NMDA receptors. TINS, 1987; 58: 293

(收稿: 1992-11-02; 修回: 1993-05-14)

The release of polyamines and excitatory amino acid during cerebral ischemia and reperfusion

Zheng Caimei, Li Honghua, Lu Zhiyong (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The dynamic changes of the contents of polyamines and excitatory amino acid in the hippocampus during cerebral ischemia and reperfusion were observed in rats. It was found that the content of putrescine was increased and the release of excitatory amino acid elevated during reperfusion, and the increase of putrescine could be stopped when the antagonist of NMDA receptor of excitatory amino acid, that is, MK-801, was administered.

These facts suggest that the metabolic disturbance of polyamines in closely related to the release of excitatory amino acid and modulated by NMDA receptors. The combination of polyamines with excitatory amino acid may play an important role in the ischemic damage of the brain.

Key words polyamines; amino acids; reperfusion injury; MK-801

(上接 328 页)

活体 SCN 的轴向本构方程(在 $\sigma=0\sim36$kPa)基本服从虎克定律,半活体和离体的轴向本构方程为指数函数关系,但材料常数 X_3 之间有显著性差异。以兔肠系膜上静脉(SMV)为实验对象,进行活体和离体的不同状态力学试验,提出了确定管道状器官应力应变计算的初始内压和初始直径的标准,和容变(ω)-张力(T)关系的新概念。结果表明,正常活体组和腹腔神经丛阻滞组的本构方程(在 $\sigma=0\sim75$kPa)基本上服从虎克定律,但材料常数之间均有显著性差异;离体不同条件下的本构关系均为指数函数关系,但至少有一个材料常数之间有显著性差异,X_1 为温度敏感因素,X_2 为平滑肌活性因素。ω-T 关系表明活体组为直线相关,而离体组为对数相关。急性门脉阻塞后,压力(P)-时间(t)之间的关系均为指数函数。但正常活体组和腹腔神经丛阻滞组系数相比较,有显著性差异,达到压力峰值(Pm)的总时程(Tm)的均值相比较,有显著性差异,而两组 Pm 均值的比较,无显著性差异。表明腹腔神经丛的纤维,对门脉血流动力学有调节作用。基于上述结果本文提出了条件力学行为和综合力学行为的新概念。

关键词 活体;生物力学特性;形态学;坐骨神经;肠系膜上静脉

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net