DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.06.015

大鼠全脑缺血脑组织钙、镁及钙调素含量变化及尼莫地平的影响

陈康宁 李露斯 郑彩梅（第三军医大学西南医院 神经内科）630038

提 要 本实验用大鼠全脑缺血模型测定了缺血再灌流中脑组织、线粒体钙镁含量变化及皮层、海马钙调素含量变化及尼莫地平对上述的影响。结果发现在缺血、再灌期镁含量明显减低，钙调素含量明显增高，再灌期钙含量明显增加。钙含量增加主要发生在再灌期，推测再灌流损伤与钙跨膜内流有关。尼莫地平能阻滞上述变化，从而对缺血再灌流损伤有保护作用。

关键词 脑缺血；再灌注；脑；线粒体；钙；镁；钙调素；尼莫地平

钙、镁及钙调素在组织缺血损伤中起重要作用[1][2]。本实验测定了大鼠全脑缺血再灌流损伤中脑组织和线粒体钙、镁含量变化及皮层、海马钙调素含量变化，同时观察了尼莫地平对上述的影响，为进一步认识钙、镁及钙调素在缺血损伤中的作用及尼莫地平的治疗作用。

1 材 料 方 法

动物分组及缺血模型：健康 Wistar 大鼠70只，雌雄不限，体重150～250g。随机分成假手术组、缺血30min组、缺血30min再灌流60、180min 组及尼莫地平治疗组。共7组。缺血再灌流模型采用 Pullsinelli 法[3]。

脑组织及线粒体钙、镁含量测定：动物按要求时间迅速开胸，经左心室冰La^{3+}液灌注，迅速断头取脑，按La^{3+}技术测得脑组织钙、镁含量[4]。用低温差速离心分得线粒体[5]，经盐酸硝化，用原子吸收分光光度计测得线粒体钙、镁含量。

皮层及海马钙调素（CaM）测定：分离脑组织皮层与海马，用磷酸二酯酶（PDE）系统，按刘景生法测及CaM含量。

治疗组：缺血前15min及缺血后10min（再灌流组为再灌流时），按1mg/kg腹腔内注射尼莫地平[6]。

资料处理：资料以“均数±标准差”表示。依程序包中“PDA-2”进行显著差异性检验。

2 结 果

缺血及再灌流钙、镁及钙调素含量变化及尼莫地平的影响见附表。

缺血期脑组织及线粒体钙含量与假手术组比较无明显增高（$P>0.05$），脑组织及线粒体镁含量明显低于假手术组（$P<0.001$）；钙调素含量明显高于假手术组（$P<0.001$）。

再灌流以后脑组织、线粒体钙含量以及皮层、海马CaM含量明显高于假手术组、缺血组（$P<0.001$）。随再灌流时延长，二者增高更加明显；而镁含量明显低于假手术组及缺血组（$P<0.001$），且再灌流180min镁含量明显低于再灌流60min组（$P<0.001$）。

经尼莫地平治疗以后，再灌流期脑组织及线粒体钙含量明显低于同期未治疗组（$P<0.001$）；同时尼莫地平能阻滞缺血及再灌流期镁及CaM的变化。

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

附表 尼莫地平对脑缺血后B_{Ca}、B_{Mg}、M_{Ca}、M_{Mg}、$H_{CaM}C_{CaM}$及含量的影响

Tab. Changes of B_{Ca}, B_{Mg}, M_{Ca}, M_{Mg}, H_{CaM} and C_{CaM} and effect of Nimodipine

	Control Group	Ischemia 30 min		Ischemia 30 min with 60 min Reflow		Ischemia 30 min with 180 min Reflow	
		Untreated Group	Treated Group	Untreated Group	Treated Group	Untreated Group	Treated Group
Bc_a	129.65 ±4.60	136.85 ±19.75	130.23 ±21.91	187.70 ±28.70$^{\Delta\#}$	135.91 ±7.11*	215.72 ±17.80$^{\#+}$	134.97 ±13.31*
B_{Mg}	640.02 ±31.55	449.34 ±21.36$^{\Delta}$	569.12 ±43.53*	69.93 ±39.67$^{\Delta}$	690.56 ±87.60*	320.32 ±35..50$^{\Delta\#+}$	713.60 ±40.84*
Mc_a	27.63 ±6.89	28.22 ±2.50	28.65 ±3.99	36.44 ±4.93$^{\Delta\#}$	28.33 ±7.22*	47.64 ±14.42$^{\#+}$	35.45 ±8.40*
M_{Mg}	46.12 ±5.65	31.64 ±5.84	35.41 ±5.73	28.97 ±6.11$^{\Delta}$	44.95 ±8.52*	32.41 ±4.91$^{\Delta}$	38.78 ±7.91*
H_{CaM}	22.45 ±1.30	36.95 ±4.09$^{\Delta}$	2.34 ±1.89$^{*\Delta}$	40.17 ±5.96$^{\Delta}$	7.71 ±4.32$^{*\Delta}$	54.22 ±6.35$^{\Delta\#+}$	16.02 ±1.40$^{\Delta*}$
C_{CaM}	20.31 ±2.07	30.80 ±4.00$^{*\Delta}$	5.78 ±3.04$^{*\Delta}$	31.42 ±3.38$^{\Delta}$	6.82 ±4.37$^{*\Delta}$	36.65 ±5.57	10.34 ±5.87*

Notes: Bca: Brain tissue calciom content (μg/g dry wt); B_{Mg}: Brain tissue Magnesium content (μg/g dry wt); M_{Ca}: Mitochondria calcium content (μg/100mg Protein); M_{Mg}: Mitochondria Magnesium content (μg/100mg Protein); H_{CaM}: Hippocampus calmodulin Content (μmol/kg); C_{CaM}: Cortex calmodulin content (μmol/kg).

$^{\Delta}P<0.001$ Compared with Control group

$^{\#}P<0.001$ Compared with Iochemia group

$^{+}P<0.001$ Compared with ischemia 30 min with 60 min reflow group

$^{*}P<0.001$ Compared with Untreated group

3 讨 论

正常情况下，细胞外钙浓度远高于细胞内钙浓度，而镁主要存于细胞内，正常情况下细胞内低钙、高镁是依赖于胞膜对其的相对无通透性和主动转运来维持的，如通过Na^+-Ca^{2+}交换及$Ca^{2+}-Mg^{2+}$ATPase。所以细胞能量代谢的正常进行和膜结构完整对维持细胞内钙镁稳定是非常重要的[7][8]。细胞内的CaM在无钙条件下是无生物活性的，只有结合钙形成钙、钙调素复合物(Ca•CaM)才能与靶蛋白结合形成活性全酶。所以，细胞内钙平衡对于CaM活性变化起重要作用。

缺血条件下，细胞能量代谢障碍，细胞排钙、摄镁能力降低，出现细胞内钙、镁稳态破坏。我们实验发现缺血期脑组织及线粒体钙含量增加，但与假手术组比较增高不明显，而缺血期脑组织及线粒体镁含量明显低于假手术组。这除与缺血引起ATP生成减少有关外，还与缺血期线粒体功能障碍所致的浆膜漏 (Leakiness of plasma membrane)[9]有关。这一结果与Widdener用肾缺血模型报道的钙镁含量变化一致[2]。缺血期皮层、海马CaM含量分别是假手组的1.52和1.65倍，明显高于假手术组，在钙含量增加不明显情况CaM含量明显增加，这除与CaM对钙变化非常敏感外，可能还与所测的CaM是对缺血敏感部位的CaM有关。

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

实验结果提示：缺血期镁及CaM含量变化出现早，CaM对钙含量变化非常敏感，所以测定镁和/或CaM含量变化或许能更灵敏反应细胞损伤。

再灌流以后钙及CaM含量进一步增加，而镁含量进一步降低。这些变化推测可能与以下因素有关：

（1）细胞内钙镁含量变化诱导的一系列病理生理变化加速了膜损伤和能量代谢障碍。这些变化主要包括：1）钙镁含量变化影响线粒体结构和功能，使ATP生成减少[10]；2）钙激活磷脂酶和蛋白酶，使膜磷脂降解，促进花生四烯酸代谢，TXA_2合成增加，加重缺血缺氧[11]；3）钙激活非选择阳离子通道，加重钙镁离子紊乱[12]；4）钙引起CaM含量、构象变化，加重能量代谢紊乱[1]。

（2）再灌流时经黄嘌呤途径及膜磷脂降解生成前列腺素过程中产生大量自由基[11][12]，自由基破坏细胞膜结构。

此外，再灌流提供了高钙、低镁环境，加重钙、镁紊乱。

由此可见，钙含量变化主要发生在再灌流期，再灌流损伤与钙跨膜内流引起一系列病生变化有关，包括激活CaM；镁丢失也参与了细胞损伤。

本实验发现，用钙拮抗剂尼莫地平治疗后，明显阻滞再灌期钙含量增加，防止镁丢失，降低钙调素活性。尼莫地平系二氢吡啶类衍生物，属脂溶性，易通过血脑屏障，阻滞血管及神经元上L-型钙通道，从而阻滞钙内流。尼莫地平阻滞钙内流防止细胞内钙超载，从而防止CaM被激活。尼莫地平防止镁丢失可能是继发于其阻滞钙内流，从而防止钙过载引起的膜损伤、ATP生成障碍及$Ca^{2+}-Mg^{2+}$ ATPase的激活[2]。

参 考 文 献

1. 刘忠奇　郑建中　陈志敏。Ca^{2+}在脑缺血再灌流损伤中的作用。中风与神经疾病杂志　1990；7：131～132
2. Widdener LL, Mela Riker LM. Verapamil pretreatment preserve mitochondria function and tissue magnesium in the ischemic kidney. Circ Shock 1984; 13:27～37
3. 赵卫东。大鼠再灌流综合征模型初探。中华神经精神病学杂志。1987；13:193～195
4. Breemen VC. Excitation-contraction conpling in rabbit aorta; by the Lanthanum method for measure cellular calcium influx. Circ Res 1979; 30:44～54
5. Vitorica J, Machado A, Satrustehui J. Age-dependent variations in peroxide-utilizing enzymods from rat brain mitochondria and cytoplasm. J Neurochem 1984; 42:351～356
6. 刘景生。钙调蛋白的制备及活性测定。中国医学科学院学报　1985；7:453
7. 魏文汉。病理生理学。上海：上海科技出版社，　1984；183～184
8. Joes A. Qua ntitative election microscopic study of calcium accumulation in cerebral ischemia mitochondria. Surg Neurol 1985; 24:68～72
9. Mela L, Bacalzo LV, Miller LD. Defective prodative metablism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. AM J Physiol 1971; 220:571～577
10. Rappaport ZH, Young W, Flamm ES. Regional brain calcium changes in the rat middle ceregral artery occlusion model of ischemic. Stroke 1987; 18:760～764
11. Chan PH, Fishman RA. Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. J Neurochem 1980; 35:1004～1007
12. Siesjo BK, Bengtsson E. Calcium fluxes, calcium antagonist, and calcium-related pathology brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression; A unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab 1989; 9:127～140

（收稿：1991-05-13；修回：1991-09-17）

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

Effects of nimodipine on the changes of calcium, magnesium and calmodulin contents after cerebral ischemia in rats

Chen Kangning, Li Lushi, Zhen Caimei (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The changes of calcium and magnesium content in brain tissue (B_{Ca}, B_{Mg}) and in the mitochondria (M_{Ca}, M_{Mg}) and calmodulin content in the cortex and hippocampus (C_{CaM}, H_{CaM}) were determined in the rats with 4-vessel-ligation cerebral ischemia. And then the therapeutic effects of nimodipine were observed during ischemic and reperfusion stages of the brain. It was found that B_{Mg} and B_{Mg} were decreased and C_{CaM} H_{CaM} increased during both the ischemic and reperfusion stages and B_{Ca} and M_{Ca} were increased during the reperfusion stage. The fact that calcium content was only increased during the reperfusion stage indicates that the influx of calcium plays an important role to precipitate injury during the reperfusion stage. Adminstration of nimodipine could prevent the increase of calcium and calmodulin and the decrease of magnesium after cerebral ischemia.

Key words cerebral ischemia; reperfusion; brain; mitochondrium; calcium; magnesium; calmodulin; nimodipine

（上接559页）

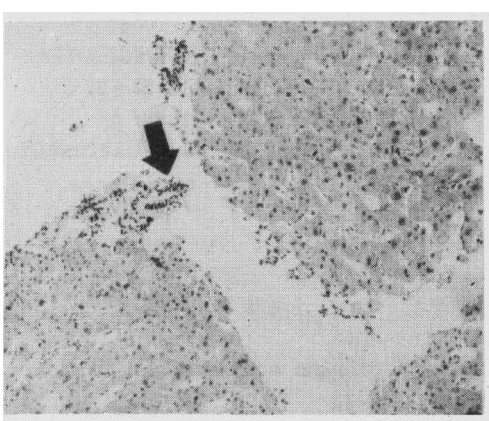


图1 腺泡型肝细胞癌
癌细胞呈腺泡样结构。箭头所示。HE×100

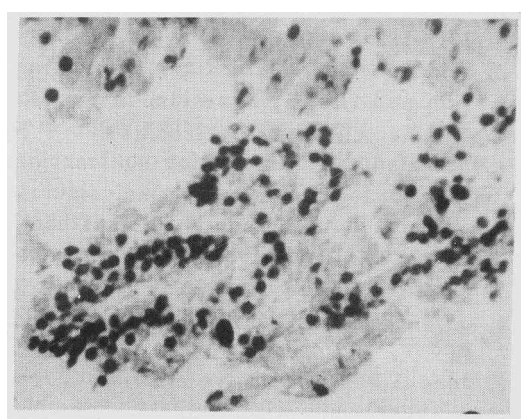


图2 腺泡型肝细胞癌
癌细胞体积较小，核圆形，浓染。HE×450稿

组240例肝细胞癌的病理组织类型中仅见1例〔Tumor 1987; 73(5):507～12〕。其病理组织学特点是以小型腺样结构为主。癌细胞体积较小，境界清楚，核圆形稍大，浓染，核仁不明显。腺泡样或菊花样结构主要由癌细胞围绕扩张毛细胆管排列而构成。本例临床经过险恶，肝增大显著，剧痛而不破，腹水不显。此与病理改变有何联系尚不清楚。

（收稿：1990-07-07；修回：1991-09-27）

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