

脑泰方对缺血再灌注沙鼠脑组织谷氨酸及其转运体功能的影响

贺运河¹, 葛金文², 郝晓元¹, 郭友林¹, 苏 莺¹

(1 湖南中医学院第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2 湖南中医学院, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的: 探讨脑泰方对脑缺血再灌注沙鼠脑组织谷氨酸及其转运体功能的影响。方法: 采用沙土鼠双侧颈总动脉阻断模型。利用脑组织突触膜颗粒对³H-L-谷氨酸摄入量及高效液相色谱仪观察脑泰方对脑组织谷氨酸含量的影响。结果: 模型组脑组织谷氨酸含量明显高于假手术组($P < 0.01$), 而其转运体功能则明显低于假手术组($P < 0.01$); 脑泰方治疗组能明显降低脑组织谷氨酸含量($P < 0.01$)及显著升高大脑皮层、海马、纹状体谷氨酸转运体功能($P < 0.01$)。结论: 脑泰方对缺血脑组织的保护作用是通过提高谷氨酸转运体功能以降低神经元突触中过多堆积的谷氨酸, 从而减轻其兴奋性毒性。

关键词: 脑缺血; 再灌注损伤; 脑泰方; 谷氨酸

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)04-0028-03

Effects of Nao Tai Fang on the Glutamate Acid and Glutamate Transporter in the Encephalon Tissue of Gerbil after Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

HE Yun-he, GE Jin-wen, HAO Xiao-yuam, GUO You-lin, SU Ying

(The First Affiliated Hospital of Hunan college of TCM, Changsha, 410007, China)

Abstract: To probe into the effects of Naotaifang on the Glutamate acid and glutamate transporter in the brain tissue of gerbil after cerebral ischemia reperfusion injury. The model of gerbil blocked double sides carotid artery was used. The contents of glutamate acid in brain tissue were higher and its transporters were significantly lower in the model group than those in the control group($P < 0.01$); the contents of glutamate acid in the brain tissue were significantly decreased($P < 0.01$) and the function of glutamate transporter on the cerebral cortex, hippocampal and striate body was significantly improved on Naotaifang group($P < 0.01$). The therapeutic effectiveness of Naotaifang group was better than that of Nimoldipine group($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Key words: Cerebral Ischemia; Reperfusion injury; Naotaifang; Glutamate acid

自 Olney 发现谷氨酸(Glu)可作为内源性兴奋毒素损伤中枢神经细胞以来^[1], 大量研究结果已证实, Glu 的大量释放及重摄取受阻是神经元损伤的重要原因^[2]。由于谷氨酸不能在突触间隙中降解, 因此, 使谷氨酸在神经系统灭活的唯一途径是通过神经细胞和神经胶质细胞的再摄取和吸收, 从中起主要作用的是谷氨酸转运体^[3]。为了探索脑梗死的有效治疗方剂—脑泰方的疗效机理, 我们用沙鼠脑缺血再灌注模型观察了该方对谷氨酸含量及其转运体功能的影响。

1 材料与仪器

1.1 药物

1.1.1 脑泰方煎剂浓缩液的制备: 脑泰方由黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao]、地龙 [*Pheretima aspergillum* (Perrier)]、川芎 [*Ligusticum chuanxiong* Hort] 等组成。饮片由湖南中医学院附一医院药剂科提供。购回后置煎煮容器内加相当于药材量 5 倍的自来水浸泡 2h, 煮沸后再以微火煎煮 30min, 过滤取汁得头煎。药渣再加 3 倍水煎煮 20min, 过滤取汁得二煎, 两煎混合, 于水浴上浓缩至 100% 浓度(每毫升药液相当于生药 1g), 置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 西药: 尼莫地平(Nimoldipine)。由正大青春宝药业有限公司生产, 批号: 0006005。

1.2 试剂 [³H]-L-谷氨酸(美国杜邦公司, 25Ci/mmol); L-谷氨酸标准品(北京邦定泰克生物技术有限公司)。

1.3 仪器 高效液相色谱仪(日本岛津 LC-6A 系统);液体闪烁计数器(瑞典 LKB 公司产品, 1209 型);低温高速离心机(日本 Tomy 公司出品, RS-20 III 型)。

2 实验方法

2.1 动物造模及给药方法 蒙古沙土鼠 45 只, 雌雄各半, 体重 70~ 80g, 由卫生部上海生物制品研究所动物中心提供, 动物购回后随机分为脑泰方大、小剂量组, 模型组, 假手术组, 尼莫地平对照组, 每组 9 只。沙鼠脑缺血再灌注模型采用 Kirino^[4] 方法, 用小动脉夹钳夹双侧颈总动脉, 阻断血流 20min 后, 去除动脉夹, 直视下观察颈总动脉血流再通后, 缝合颈部切口。假手术组仅分离双侧颈总动脉后即缝合颈部切口。各组动物手术后用灌胃方式给药或蒸馏水上、下午各一次。脑泰方大、小剂量组每天每只沙鼠灌饲量分别为 1.8ml(相当于成人剂量的 4 倍)和 0.9ml(相当于成人剂量 2 倍); 尼莫地平组剂量相当于成人剂量的 4 倍, 为 4mg/kg·d; 模型组、假手术组于相同时间内灌蒸馏水, 灌饲量相当于脑泰方大剂量组的容积。连续 5d 后, 将沙鼠断头处死取脑, 按自然分界分离皮层、海马、纹状体, 液氮冷冻, - 70℃ 保存备用。

2.2 谷氨酸转运体膜颗粒的制备

表 1 脑泰方对脑缺血再灌注损伤沙鼠脑组织谷氨酸转运体功能的影响($\bar{x} \pm s; n=9$)($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

组别	皮层	海马	纹状体
模型组	2.82 ± 0.34	6.70 ± 0.91	20.76 ± 2.05
假手术组	4.02 ± 0.43 ^{△△△*}	9.94 ± 0.69 ^{△△△*}	44.41 ± 3.66 ^{△△△*}
脑泰方大剂量组	3.68 ± 0.52 ^{△△}	8.84 ± 1.22 ^{△△*} ▲	38.34 ± 4.96 ^{△△△*} ▲
脑泰方小剂量组	3.19 ± 0.51	7.53 ± 1.09	32.56 ± 4.83 ^{△△}
尼莫地平组	3.22 ± 0.51	7.41 ± 1.04	30.92 ± 3.09 ^{△△}

注: 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$ 与尼莫地平组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 大剂量组与小剂量组比较, ▲ $P < 0.05$ 下表同。

从表 1 可见: 脑缺血再灌注损伤后皮层、海马、纹状体的谷氨酸转运体功能明显低于假手术组($P < 0.01$); 用药后各组均能明显提高纹状体的谷氨酸转运体功能($P < 0.01$), 其中脑泰方大剂量组并可同时提高皮层、海马的谷氨酸转运体功能($P < 0.01$), 而且疗效明显优于小剂量组和尼莫地平组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 脑泰方对脑缺血再灌注损伤沙鼠脑组织氨基酸含量的影响

参照 Gilia^[5] 方法分别制备皮层、海马、纹状体突触膜颗粒。

2.3 谷氨酸转运体功能的测定 取突触膜颗粒 20ul 加入膜外液(0.15mol/L NaCl 180ul, 0.25ul [³H]-L-谷氨酸)中, 置 30℃ 水浴中反应 10min, 用 2ml 冰冷 0.15mol/L NaCl 终止反应, 迅速倒在孔径为 0.45um 的滤膜上定时(40 秒)、定量(24ml)地用冰冷 NaCl 冲洗抽滤, 隔夜在液体闪烁计数器上测定。膜颗粒蛋白测定采用 Lowry^[6] 法。谷氨酸转运体的功能表达为膜颗粒对谷氨酸的摄入量($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) 表示。

2.4 脑组织氨基酸含量的测定 取相同部位的脑组织, 称湿重后, 按体积重量比为 20: 1 加入无水乙醇, 恒速匀浆 35 次左右, 取匀浆液置离心管中, 4℃, 3500r/min, 离心 30min, 收集上清液, 用高效液相色谱-荧光法测定 Glu 的含量。

2.5 统计学处理 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐性的采用方差分析, 组间比较用 q 检验; 方差不齐者采用秩和检验。

3 结果

3.1 脑泰方对脑缺血再灌注损伤沙鼠脑组织谷氨酸转运体功能的影响

表 2 脑泰方对脑缺血再灌注损伤沙鼠脑组织 Glu 含量的影响($\bar{x} \pm s; n=9$)

组别	Glu($\mu\text{mol/L}$)
模型组	748.49 ± 163.14
假手术组	339.50 ± 95.55 ^{△△*}
脑泰方大剂量组	348.35 ± 66.77 ^{△△*}
脑泰方小剂量组	474.99 ± 192.30 ^{△△}
尼莫地平组	598.76 ± 224.54

从表 2 可见: 模型组中脑组织 Glu 含量明显升高($P < 0.01$), 脑泰方治疗后则显著降低($P <$

0.01), 尤其大剂量组的疗效明显优于尼莫地平组 ($P < 0.05$)。

4 讨论

谷氨酸是中枢神经系统中一种重要的兴奋性神经递质, 生理情况下, 谷氨酸从突触前膜释入突触间隙, 继之作用于突触后膜受体, 产生神经兴奋作用。由于神经细胞和神经胶质细胞浆膜上的谷氨酸转运体, 具有主动转移细胞外的谷氨酸, 可以维持细胞外谷氨酸较低的浓度, 从而避免神经系统过度兴奋, 对谷氨酸能神经传递和神经细胞的保护具有重要的意义^[3]。

脑缺血再灌注时可出现谷氨酸在神经元突触间隙中异常积聚, 过度激活突触后膜谷氨酸受体, 由此而引起 Na^+ 、 Cl^- 和水进入神经细胞或出现细胞内钙超载而诱发脑神经细胞各种损伤性变化^[7]。有报道, 缺血时突触小体谷氨酸转运体功能降低^[8], 因此, 如果能提高谷氨酸转运体功能, 则可降低脑缺血再灌时产生过量的谷氨酸在突触间隙中积聚, 以减轻其神经毒性作用, 进而影响脑缺血神经元死亡的进程^[9]。本研究结果显示, 缺血再灌注后模型组脑组织 Glu 含量明显升高, 而皮层、海马及纹状体谷氨酸转运体的功能则降低, 由此提示: 突触间隙中谷氨酸的增多可能与谷氨酸转运体的功能降低有关。用药后各组均能明显提高纹状体谷氨酸转运体功能及降低脑组织的 Glu 含量, 其中脑泰方大剂量组在提高皮层、海马的谷氨酸转运体功能及降低 Glu 含量方面的疗效明显优于脑泰方小剂量组和尼莫地平组。表明脑泰方具有提高脑缺血再灌注损伤时脑组织的谷氨酸转运体功能来增加对谷氨酸的摄取量,

进而降低神经元突触间隙中过多堆积的谷氨酸, 以减轻其兴奋性神经毒性作用。这可能是该方抗脑缺血损伤的作用机理之一。

参考文献:

- [1] Olney JW, Hool, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic amino acids on the infant mouse central nervous system[J]. *Exp Brain Res*, 1971, 14(1): 61-76.
- [2] Leib SL, Kim YK, Ferriero DM, et al. Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis[J]. *J Infect Dis*, 1996, 173(1): 166-171.
- [3] 厦峰. 谷氨酸转运蛋白与癫痫. 卒中与神经疾病[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2000, 7(3): 187-189.
- [4] Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia[J]. *Acta Neuropathol Berl*, 1984, 62: 201-208.
- [5] Gilia P, Baruck I, Kanner BI. Counterflow of L-glutamate in plasma membrane vesicles and reconstituted preparations from rat brain[J]. *Biochemistry* 1990, 29: 11209.
- [6] 郭燕捷. 几种微量测定蛋白新方法的比较[M]. *生物化学与生物物理进展*, 1986. (4): 67.
- [7] 许永华, 景炳文, 张翔宇, 等. 选择性脑亚低温对犬心脏停搏后脑脊液谷氨酸含量的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 1999, 1(3): 142-144.
- [8] Sioverstein FS, Buchanan K, Johnston MV. Perinatal hypoxia ischemia disrupts striatal high affinity [^3H] glutamate uptake into synaptosomes[J]. *J Neurochem*, 1986, 47: 1614.
- [9] 晏义平, 孙凤艳. 谷氨酸载体在鼠脑缺血神经元死亡中的作用[J]. *中华神经科杂志*, 1998, 31(2): 106-108.