

· 论 著 ·

## 环孢霉素 A 对局部脑缺血海马细胞外液氨基酸及微环境变化的影响

孙 帅

(云南省第一人民医院心内科,昆明 650032)

**摘要:**目的 观察环孢霉素 A(CsA)对局部脑缺血时海马细胞外液氨基酸及微环境的影响,并探讨可能的神经元保护机制。方法 将实验动物(树鼯)分为 3 组:假手术组于舌下静脉注射孟加拉红生理盐水,不照射;脑缺血组注射孟加拉红生理盐水循环 15 min 后进行光化学反应形成局部脑缺血;实验治疗组于缺血后 6 h 一次性舌下静脉注射 CsA(40 mg/kg),上述各组于 24 h 时间点测量氨基酸及微环境指标。结果 给 CsA 后,天冬氨酸、谷氨酸及甘氨酸均降低,而  $\gamma$ -氨基丁酸升高,与脑缺血组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。而 pH、 $PO_2$  及  $HCO_3^-$  均增高,与脑缺血组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), $PCO_2$  变化不明显。脑缺血后,海马组织有明显的缺血坏死表现,给 CsA 后,缺血坏死明显减轻。结论 选择缺血后 6 h“治疗时间窗”注射 CsA,可有效改善海马细胞外液兴奋性与抑制性氨基酸比例和微环境,保护神经元功能。

**关键词:**树鼯;脑缺血;氨基酸;微环境;环孢霉素 A

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.013

中图分类号:R365.743

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)21-2881-03

Effect of CsA on amino acid contents and microenvironment of hippocampal extracellular fluid after local cerebral ischemia in tree shrews

SUN Shuai

(Department of Cardiology, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of cyclosporin A(CsA) on amino acid and micro environment, and to explore the possible mechanisms of neuron protection. **Methods** To establish three groups: sham, ischemia and treatment groups. The experimental animals were pretreated by CsA (40 mg/kg) at 6 h after occlusion. The focal thrombotic cerebral ischemia was formed by photochemistry-induced technology in tree shrews. Amino acids and pH,  $PCO_2$ ,  $PO_2$  and  $HCO_3^-$  of the above groups were detected by blood gas analyzer and HPLC-PITC technology respectively. **Results** In CsA group, the contents of Asp, Glu and Gly was decreased, but GABA increased, and there were notable difference compared with the ischemic group ( $P < 0.01$ ). The most hippocampal neurons were normal; few was defective after pretreatment with CsA. **Conclusion** CsA could improve contents of amino acid and microenvironment after occlusion in choosing the 6 h “therapy window”. CsA probably protect neuron by changing contents of excitatory amino acid or inhibitory amino acid through different mechanisms.

**Key words:** tree shrew; cerebral ischemia; amino acid; microenvironment; cyclosporin A

许多研究证实,缺血缺氧引起的离子稳态及膜电位变化能导致脑内神经元坏死并伴有多种氨基酸含量的变化,提示氨基酸参与了神经元的损伤过程。因损伤而坏死的神经元中有大量的  $Ca^{2+}$  超载现象,并发现  $Ca^{2+}$  可通过神经元线粒体膜上的渗透性转换孔(mitochondrial permeability transition port, MPTP)进入线粒体内而引起神经元死亡。Zieminska 等<sup>[1]</sup> 研究发现,环孢霉素 A(cyclosporin A, CsA)能抑制 NMDA 诱导的  $Ca^{2+}$  内流和海马 CA1 神经元线粒体肿胀,并且能部分阻止神经元锥体细胞的坏死,其保护机制系由于阻断 MPT 的开放而发挥作用的。CsA 能维持细胞膜跨膜电位,阻断细胞的凋亡和坏死。在  $Ca^{2+}$  的转运及膜去极化的过程中,伴随着氨基酸含量的变化,CsA 的神经保护效应中是否有氨基酸含量改变及平衡关系的变化值得探讨。为此,结合当前国内外脑缺血治疗“时间窗”的选择,采用与灵长类动物亲缘关系很近的低等灵长类动物——树鼯复制脑缺血模型,于脑缺血后 6 h 分别一次性静脉注射 CsA,观察缺血后 24 h 海马细胞外液氨基酸、pH、 $PCO_2$ 、 $PO_2$  及  $HCO_3^-$  的变化,为脑血管病伴发痴呆的治

疗提供实验依据。

### 1 材料与方

**1.1 实验动物及分组** 健康树鼯 24 只,雌雄不拘,体质量(130±20)g,由本院动物中心提供。将实验动物分为 3 组:假手术组、脑缺血组及实验治疗组。

**1.2 实验仪器** SQ-III 型局部脑血栓形成装置(本室研制)、双泵同步推挽式微量灌流系统(参考宋锦秋等<sup>[2]</sup>方法并加以改进)、高效液相色谱仪 510 系列(美国 Waters 公司产品)、KW-II 型脑立体定位仪(国营西北仪器厂产品)、SCR20BA 型高速离心机(日本 HITACHI 公司生产)、IL-1306 型血气分析仪(美国远东公司产品)等。

**1.3 试剂与材料** 孟加拉红为瑞士 Fluka 公司产品,以 0.9% 的 NaCl 溶液溶解,浓度为 15 g/L,避光保存;谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)和天冬氨酸(Asp)标准品均为 Sigma 公司产品;CsA(Sandimmun,山地明,瑞士诺化制药有限公司产品)浓度为 50 mg/L;异硫氰酸苯酯(PITC)为美国 Pierce 公司生产;人工脑脊液(ACSF)按赵刚和李树清<sup>[3]</sup>的方

法制备;其余均为国产色谱纯级或化学纯级试剂。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 树鼩局灶性脑缺血模型的建立** 按照光化学诱导血栓形成方法<sup>[4]</sup>,以 2.5% 硫喷妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉动物,卧位固定。消毒后矢状切开右顶叶头皮,暴露颅骨约 1 cm,分离颅骨表面软组织。于切口处皮下嵌入一外径为 1 cm × 2.5 cm 的消毒铜片,其中心含一直径为 0.5 cm 的圆孔,以便光束通过该窗孔直接照射颅骨表面。铜片以外的组织用避光纸遮盖。于舌下静脉一次性注射孟加拉红生理盐水溶液(1.33 mL/kg),对照组只注射等量孟加拉红而不照射,15 min 后,将动物置局部脑血栓形成实验装置下,立体定位使右侧顶区颅骨对准光源照射 15 min 制作成为脑缺血组。颅骨表面温度维持(36.5±1)℃(与颅肌温度接近)。照毕,取下铜片,消毒并缝合皮肤,待动物清醒后放回饲养笼内观察。缺血 6 h 后,治疗组一次性舌下静脉注射 CsA(40 mg/kg),然后放回饲养笼内观察。所有实验动物中假手术组均存活,术后当时脑缺血组死亡 1 只,治疗组给药后 8 h 死亡 1 只,但均在同等条件下进行了补充实验,保证了样本的一致性。

**1.4.2 树鼩海马微灌流及样品收集** 至 24 h 时,将树鼩麻醉并固定于脑立体定位仪上,在人字缝交点前 6 mm、矢状缝右侧 3 mm 钻一直径为 1 mm 小孔,勿破坏硬脑膜。灌流探针垂直向下深入颅腔 9 mm 达海马 CA1 区,保持匀速按 2.0 μL/min 灌流;平衡 1 h 后在冰浴中收集样品,收集样品时严格避免与空气接触。

**1.4.3 微灌流部位的确定** 待灌流结束后,对实验动物脑组织进行组织学检查,确定探针插入的毁损灶中心灌流位置是否在海马。

**1.4.4 微环境指标检测** 取样品 0.5 mL 立即用 IL-1306 型血气分析仪进行 pH、PO<sub>2</sub>、PCO<sub>2</sub> 及 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 水平测定。

**1.4.5 氨基酸含量测定** 用异硫氰酸苯酯(PITC)法,结合反相高效液相色谱紫外检测技术测定微灌流液中的氨基酸含量,用 Waters Novapak C18 柱分离,梯度洗脱。用各标准品氨基酸的色谱峰保留时间与海马细胞外液的色谱峰保留时间对照定性,用外标法定量。

**1.4.6 形态学观察** 上述各组均于微灌流结束后,打开胸腔,夹闭降主动脉,自心尖部插入一聚乙烯管至升主动脉起始部并结扎固定,剪开右心耳的同时,在 120 mm Hg 压力下注入固定液(4%多聚甲醛+1%戊二醛)50 mL 行内固定,随后取海马组织置 10%甲醛溶液内保存,HE 染色作光镜检查。

**1.5 统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS10.0 统计软件进行方差齐性分析和单因素方差分析。组间比较用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 CsA 对脑缺血后海马细胞外液兴奋性及抑制性氨基酸含量的影响** 当脑缺血注射 CsA 后,Asp、Glu 及 Gly 均明显降低,而 GABA 却显著升高,与脑缺血组比较差异有统计学意义(*P* < 0.01),见表 1。

**2.2 CsA 对树鼩脑缺血时海马细胞外液 pH、PCO<sub>2</sub>、PO<sub>2</sub> 及 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的影响** 治疗组 pH、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 均升高,接近假手术组水平,与脑缺血组相比差异有统计学意义(*P* < 0.05);PCO<sub>2</sub> 变化

不明显,但已接近正常水平,PO<sub>2</sub> 升高与脑缺血组相比差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。

**2.3 CsA 对树鼩局部脑缺血时脑组织形态学改变的影响** 注射 CsA 后可见海马神经元坏死减轻,仅见少许坏死神经元,与脑缺血组比较,改善明显,见图 1~6。

表 1 CsA 对树鼩脑缺血 24 h 时海马细胞外液氨基酸变化的影响( $\bar{x} \pm s$ )

指标	对照组	脑缺血组	治疗组
Asp	0.862±0.037	4.637±0.126*	0.793±0.024 <sup>#</sup>
Glu	2.507±0.025	8.748±0.076*	6.597±0.033 <sup>#</sup>
Gly	1.563±0.035	5.447±0.053*	2.860±0.032 <sup>#</sup>
GABA	0.726±0.015	2.776±0.048*	5.512±0.067 <sup>#</sup>

\*:与对照组比较,*P* < 0.01;#:与脑缺血组比较,*P* < 0.01。

表 2 CsA 对树鼩脑缺血 24 h 时海马细胞外液微环境变化的影响

指标	对照组	脑缺血组	治疗组
pH	7.312±0.025	7.092±0.013*	7.328±0.019*
PCO <sub>2</sub> (mm Hg)	11.280±0.13	10.100±0.17	9.567±0.31
PO <sub>2</sub> (mm Hg)	202.830±2.41	146.500±0.99*	192.000±1.79 <sup>#</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	10.370±0.25	3.750±0.12*	11.550±0.19*

\*:与对照组比较,*P* < 0.01;#:与脑缺血组比较,*P* < 0.05。

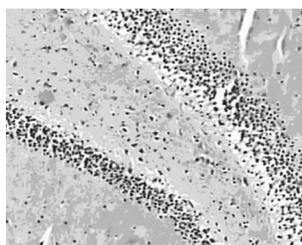


图 1 正常海马组织 (HE×40)

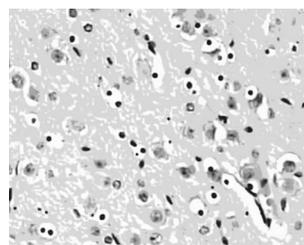


图 2 正常海马组织 (HE×100)

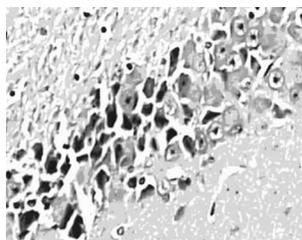


图 3 缺血 24 h 后海马神经元坏死改变 (HE×200)

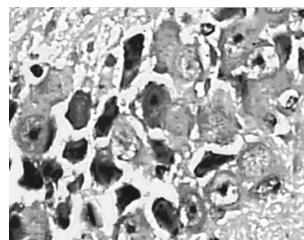


图 4 缺血 24 h 后海马神经元坏死改变 (HE×400)

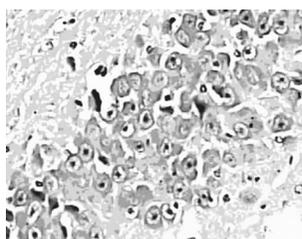


图 5 注射 CSA 后海马仅少量神经元坏死 (HE×100)

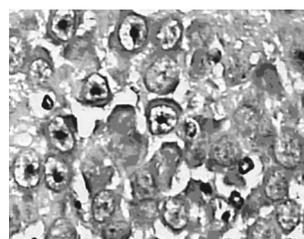


图 6 注射 CSA 后海马仅少量神经元坏死 (HE×200)

### 3 讨 论

树鼩局灶性脑缺血模型是按照光化学诱导血栓形成方法并加以改进建立的,方法正确,结果可靠<sup>[3]</sup>。本实验结果显示,脑缺血后 6 h 一次性静脉注射 CsA 后,Asp、Glu、Gly 的含量均降低,而 GABA 的含量却持续升高;缺血后海马细胞外液的 pH、PO<sub>2</sub> 及 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 均下降,出现代谢性酸中毒;PCO<sub>2</sub> 升高,形成混合性酸中毒表现,给予 CsA 治疗后,海马细胞外液中 pH、PO<sub>2</sub>、PCO<sub>2</sub> 及 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 已恢复到正常水平。病理切片提示注射 CsA 后,海马神经元坏死明显减少,表明 CsA 可有效改善海马细胞外液兴奋性与抑制性氨基酸比例和微环境,保护神经元功能。

CsA 可能通过以下机制保护神经元免受缺血缺氧性损伤<sup>[1,5-11]</sup>:(1)抑制 NMDA 诱导的突触小体递质释放;(2)维持细胞膜跨膜电位,保证离子的平衡,从而阻断细胞的凋亡和坏死;(3)抑制 Ca<sup>2+</sup> 诱导的轻度去极化过程,减少 Glu 的突触前释放;(4)抑制 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 向细胞内转移从而减少 Glu 的产生;(5)抑制线粒体内膜促凋亡因子、细胞色素 C(cytC)的释放。Steiner 等<sup>[7]</sup>研究表明,CsA 能抑制 NMDA 诱导的突触小体的递质释放,而且能扩大去极化诱导的突触体神经递质释放。提示 CsA 可能通过降低兴奋性氨基酸,升高抑制性氨基酸即改变二者的比例以保护脑缺血后神经元损伤,并阻止兴奋性神经毒性,改善脑细胞功能。GABA 的持续升高可能与 CsA 扩大去极化诱导的突触体神经递质的释放增加有关;此外,本实验治疗“时间窗”的选择为缺血后 6 h 的 Glu 和 GABA 均显著升高,给予 CsA 后的一段时间内,升高的 Glu 在谷氨酸脱羧酶的作用下生成 GABA,使其含量进一步升高。GABA 升高后可以发挥对脑损伤的保护作用,这是否为机体的一种保护机制尚待进一步深入研究。

CsA 可通过抑制线粒体 MPTP 功能而减轻了 Ca<sup>2+</sup> 内流等离子平衡的紊乱<sup>[5]</sup>,维持了细胞内外微环境的正常,使因缺血造成的海马神经元损伤得到一定程度的恢复。

#### 参考文献:

[1] Ziemska EM, Atyja E, Nalecz M, et al. In vivo brain microdialysis as a tool in studies of neuroprotective effects of cyclosporin A in acute excitotoxicity[J]. Acta Pol Pharm,

2000,57 Suppl:129.

- [2] 宋锦秋,陈晓春,张静,等. 人参皂苷 Rb1 通过 JNK/p38 MAPK 途径减轻 Aβ-(25-35)诱导的胎鼠皮层神经元 tau 蛋白过度磷酸化[J]. 药学学报,2008,(1):400.
- [3] 赵刚,李树清. 树鼩皮层局部脑缺血时海马细胞微环境及氨基酸含量动态变化的研究[J]. 中国病理生理杂志,2005,30(4):186.
- [4] 包飞. 产银杏内酯 B 内生真菌的筛选及培养条件优化[D]. 西安:西北农林科技大学,2008.
- [5] Dohmen C, Kumura E, Rosner G, et al. Extracellular correlates of glutamate toxicity in short-term cerebral ischemia and reperfusion; a direct in vivo comparison between white and gray matter[J]. Brain Res,2005,1037(2):43.
- [6] Matsumoto S, Isshiki A, Watanabe Y. Restricted clinical efficacy of Cyclosporin A on rat transient middle cerebral artery occlusion[J]. Life Sci,2002,72(4):591.
- [7] Steiner J, Dawson T, Fotuhi M, et al. Effects of minocycline on apoptosis and neuronal changes in retinal ganglion cells from experimental optic neuritis rats[J]. Neural Regen Res,2008,(12):325.
- [8] Qiu LY, Li Y, Fan HB, et al. Changes in neuronal apoptosis and apoptosis modulatory factors in cerebral ischemia/reperfusion[J]. Neural Regen Res,2007,18(8):321.
- [9] Ishii M, Shimizu S, Shiota K, et al. Stimulation of tetrahydrobiopterin synthesis by cyclosporin A in mouse brain microvascular endothelial cells[J]. Int J Biochem Cell Biol,2002,34(9):1134.
- [10] Brustoretsky N, Dubinsky J. Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria[J]. J Neurosci,2000,20(22):8229.
- [11] Kobayashi T, Kuroda S, Tada M, et al. Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome C release in the brain; its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury[J]. Brain Res,2003,960(1-2):62.

(收稿日期:2009-11-28 修回日期:2010-04-14)

## 医学论文中讨论内容的写法

讨论是结果逻辑的延伸,是从理论上对实验和观察结果进行分析与综合,从广度和深度两方面来丰富和提高对实验结果的认识,为文章的结论提供理论依据。同时对研究中的例外和相反结果进行解释和说明,提出论文中存在的问题和今后的设想。讨论要从以下方面撰写:(1)当前本课题国内外研究概况在观点和结论上与本文的异同,进行比较分析,以说明本文研究结果的价值和意义;(2)对各项研究指标和实验结果的误差、阴性、阳性以及一些新现象加以说明和解释;(3)实验结果需要在原理上进一步分析和判断,并预见某种可能性;(4)其他领域的研究成果能说明和支持本文的观点和结果;(5)研究过程中还存在的问题,有待解决之处。