

亚低温对心肺复苏大鼠大脑海马神经元内 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 1 表达的影响

孙志扬 李光 孙庆文 黄兴华 刘娜

【摘要】 目的 探讨亚低温对心肺复苏模型大鼠大脑海马神经元内 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 1 (NMDAR1) 表达的影响。**方法** 24 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、常温组和亚低温组, 每组 8 只。常温组和亚低温组大鼠用水封瓶密闭法制备心肺复苏后脑水肿动物模型, 常温组制模后置于室温环境, 亚低温组制模后立即给予亚低温治疗。应用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测各组大鼠大脑海马神经元内 NMDAR1 表达。**结果** 亚低温组大鼠脑组织水肿明显减轻, 大脑海马神经元内 NMDAR1 mRNA 和蛋白表达明显降低, 与常温组比较差异有显著性(NMDAR1 mRNA: 80.48 ± 0.03 比 80.64 ± 0.18 , $P < 0.05$)。**结论** 亚低温能够减轻心肺复苏后脑水肿, 其机制可能为: 亚低温通过减少 NMDAR1 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 降低阳离子通道通透性的作用, 而减轻脑水肿的形成, 起到治疗心肺复苏后脑水肿的作用。

【关键词】 亚低温; 心肺复苏术; 海马神经元; N-甲基-D-天门冬氨酸受体 1

Effects of mild hypothermia on expression of N-methyl-D-aspartate receptor-1 in hippocampus neurons after cardiopulmonary resuscitation in rats SUN Zhi-yang*, LI Guang, SUN Qing-wen, HUANG Xing-hua, LIU Na. * Department of Emergency Traumatic Center, The Affiliated Dongfang Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of mild hypothermia on expression of N-methyl-D-aspartate receptor-1 (NMDAR1) in hippocampus neurons after cardiopulmonary resuscitation (CPR) in rats. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into normal control group, normal temperature group, and mild hypothermia group, with 8 rats in each group. The cerebral edema model after CPR was replicated by the sealed bottle method in rats in both normal temperature group and mild hypothermia group. The rats in the mild hypothermia group were treated with mild hypothermia after the model was established. The change in expression of NMDAR1 in hippocampus neurons in rat was determined with semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and pathologic changes in brain tissue were observed in both groups. **Results** The cerebral edema was ameliorated, NMDAR1 mRNA and protein in cerebral hippocampus neurons were significantly lower in hypothermia group than control group with significant difference (NMDAR1 mRNA: 80.48 ± 0.03 vs. 80.64 ± 0.18 , $P < 0.05$). **Conclusion** Mild hypothermia can down-regulate the expression of NMDAR1 mRNA and protein level, lower positive ion concentration and thus decrease cerebral edema, so mild hypothermia can serve as a treatment measure for cerebral edema after CPR.

【Key words】 mild hypothermia; cardiopulmonary resuscitation; hippocampus neuron; N-methyl-D-aspartate receptor-1

亚低温技术对脑细胞保护作用已引起人们的关注。对心肺复苏后脑复苏一直没有有效的方法, 完整的心、肺、脑复苏成功率很低。本实验中通过观察亚低温对心搏骤停、心肺复苏成功后大鼠大脑额叶皮质和海马神经元内 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 1 (NMDAR1) 表达的影响, 进一步探讨亚低温减轻心肺复苏后脑水肿的机制。

基金项目: 上海市浦东新区科技专项基金资助(PKJ2002-31)

作者单位: 200120 上海, 同济大学附属东方医院急诊创伤中心(孙志扬, 李光, 刘娜); 200433 复旦大学遗传工程国家重点实验室, 教育部基因技术工程研究中心(孙庆文, 黄兴华)

作者简介: 孙志扬(1963-), 男(汉族), 山东人, 副教授, 副主任医师(E-mail: xuibiliuna@163.com)。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料: 健康雄性 SD 大鼠(第二军医大学实验动物中心提供)24 只, 体重 200~250 g。Trizol、反转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 酶、dNTP 等试剂均购自华美生物试剂公司; PTC-200 型聚合酶链反应(PCR)扩增仪由美国 MJ Research 公司生产; 紫外监测仪由上海复日公司生产; GDS-800 型凝胶成像系统由美国 Bio-Rad 公司生产; PCR 扩增引物由博彩生物公司合成。

1.2 实验分组: 24 只大鼠随机分为 3 组, 每组 8 只: ①正常对照组; ②常温组, 制备心肺复苏动物模型并置于室温环境中; ③亚低温组, 制备心肺复苏动物模型并立即给予亚低温治疗。

1.3 心肺复苏后脑水肿动物模型的制备:采用水封瓶密闭法。用 1 个托盘盛自来水,再用 1 个 1 700 ml 的玻璃瓶将大鼠倒扣于其中,为防止大鼠溺水死亡,玻璃罩内加垫一个小玻璃缸将大鼠与水隔开。在实验中为防止负压造成大鼠脑损伤,采取瓶外补水的方法保证密封瓶内外的水柱等高。因玻璃瓶密闭,大鼠在瓶中逐渐缺氧,50 min 时出现意识模糊,随后出现抽泣样呼吸,数秒钟后大鼠呼吸运动停止;立即行胸外按摩,10 s 后大鼠恢复微弱呼吸运动。

1.4 亚低温预处理:取一 50 cm×30 cm 泡沫塑料盒,盛以碎冰;将大鼠用体积分数为 8% 的水合氯醛 1.5 ml/kg 腹腔注射麻醉后,埋入碎冰盒中,覆盖冰厚度为 2 cm,不影响呼吸,室温度 4℃。30~37 min 后大鼠肛温可降到 (33.0±1.5)℃,保持亚低温状态 150 min,然后将大鼠从冰盒中取出,置于 (25.0±2.5)℃ 室温中逐渐复温。平均 45 min 后大鼠苏醒,活动自如。本实验中采用深部肛温(以距肛门 7 cm 深处为标准)测定代替脑温测定^[1]。

1.5 脑组织含水量测定:大鼠断头处死后,取出全脑,于大鼠右侧额叶、海马各取一块脑组织,用电子分析天平测脑组织湿重,然后放于 110℃ 烤箱烘烤 24 h 至衡重,取出称干重,用干重法计算其含水量。

1.6 脑组织病理学观察

1.6.1 肉眼观察:大鼠直接断头处死,立即开颅,观察脑膜、脑表面及剖面脑组织的形态结构变化。

1.6.2 光镜观察:取心肺复苏 20 min 后存活的大鼠,以 8% 水合氯醛 (1.5 ml/kg) 行腹腔麻醉成功后,用 37℃ 肝素化生理盐水 (500 U/kg) 及 4℃、4% 多氯甲醛 (pH 7.4) 经心灌注 40 min 后固定,开颅取脑,置入同一固定液内继续固定 24 h。根据图谱,冠状切取一块海马组织,切片厚度 4 μm,石蜡包埋固定,苏木素-伊红 (HE) 染色,光镜下观察。

1.7 半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测亚低温时心肺复苏大鼠大脑海马神经元内 NMDAR1 表达变化:按引物设计原则设计引物^[2],由上海复旦遗传工程实验室完成。上游引物:ACGTCAGCAGAACTGCGAGCTGTGTCAGGTCTGTTCTGACGCTCGAC (5'→3'),下游引物:CTTGATTCTAAGTCTTAGCTGCTGAAGTAA-GATTCAAGATCGACGA (5'→3'); NMDAR1 片段长度 554 bp。第 1 链扩增反应体系:1.0 μl 寡核苷酸-DT, 1.0 μl 10 mmol/L dNTP 混合物,组织总 RNA 1.0 μl,焦磷酸二乙酯 (DEPC) H₂O 9.5 μl, 65℃ 孵育 5 min;迅速置冰上 5 min,离心 15 s;加入

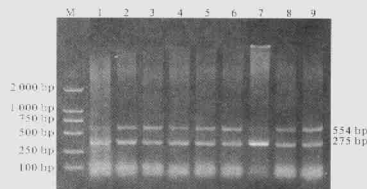
5×反转录缓冲液 4.0 μl, 0.1 mol 二硫苏糖醇 (DTT) 2.0 μl,混匀,42℃ 孵育 2 min;每管内加入反转录酶 1.0 μl,42℃ 孵育 50 min;迅速在 72℃ 下灭活 15 min,完成反转录。第 2 链反应:取第 1 链反转录产物 1.0 μl,加入上、下游引物各 0.5 μl, dNTP 1.0 μl, Taq 酶 0.2 μl, 10×缓冲液 2.0 μl, H₂O 14.8 μl,混匀后离心;94℃ 5 min 预变性,94℃ 30 s, 56℃ 50 s, 72℃ 50 s; 35 个循环,置 72℃ 10 min 充分延伸。扩增产物用质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外透射分析仪观察,有 554 bp 扩增条带为 NMDAR1-DNA 阳性,反之为阴性。每批实验设阳性质粒对照及无模板阴性对照。

1.8 统计学分析:数据以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Excel 软件进行数据处理,两样本均数比较用 *t* 检验,多样本均数间比较用方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理学观察:正常对照组切片显示正常脑组织 (彩色插页图 1A)。常温组脑组织水肿明显,结构疏松,组织间隙增宽,并有红细胞溢出及吞噬细胞浸润,脑内小动脉壁外膜可见半月形或不规则形间隙,其间充满水肿液 (彩色插页图 1B)。亚低温组脑组织水肿明显减轻 (彩色插页图 1C)。

2.2 半定量 RT-PCR 检测亚低温对大鼠大脑海马神经元内 NMDAR1 mRNA 表达的影响:正常对照组大鼠大脑海马神经元内 NMDAR1 mRNA 表达量为 0.35±0.06,常温组为 80.64±0.18,亚低温组为 80.48±0.03,亚低温组明显低于常温组 (*P* < 0.05)。RT-PCR 蛋白电泳结果见图 2。



注: M 为 DNA Marker DL2000; 554 bp 为 NMDAR1 阳性条带; 1, 4, 7 泳道为正常对照组 NMDAR1 mRNA; 2, 3, 5, 8 泳道为亚低温组 NMDAR1 mRNA; 3, 6, 9 泳道为常温组 NMDAR1 mRNA

图 2 半定量 RT-PCR 检测大鼠大脑海马神经元内 NMDAR1 mRNA 表达

Figure 2 Expression of NMDAR1 mRNA in hippocampus neurons of rats detected by semi-quantitative RT-PCR

2.3 大鼠大脑海马含水量变化:正常对照组脑组织含水量为 $(864.32 \pm 0.13)\%$,常温组为 $(880.55 \pm 0.37)\%$,亚低温组为 $(876.21 \pm 0.56)\%$;亚低温组脑组织含水量明显低于常温组($P < 0.05$)。

3 讨论

研究表明,亚低温技术保护脑细胞和改善脑功能预后的机制可能为:①抑制谷氨酰胺的“瀑布效应”;②阻止钙离子内流;③抑制谷氨酰胺受体活性;④阻止过氧化反应;⑤促进小胶质神经细胞的恢复^[3];⑥保护血脑屏障^[4];⑦抑制脑损伤缺血、缺氧后的炎症反应^[5];⑧降低颅内压、改善脑代谢,抑制酶促反应,从而减少氧自由基产生^[6]。此外,亚低温脑保护的分子生物学机制研究热点还包括:亚低温对热休克蛋白基因表达的影响^[7];p53 及相关基因^[8];增殖细胞核抗原基因^[9];神经营养因子及其受体基因^[10];Bcl-2 蛋白家族与亚低温^[11]等。但是,亚低温对心肺复苏后脑水肿的影响未见报道。本实验中通过建立心肺复苏后大鼠脑水肿模型,对大鼠行亚低温处理,同时建立对照组和常温组作对照。病理切片显示:心肺复苏后 20 min 大鼠脑组织水肿明显,亚低温处理后,脑组织水肿明显减轻,由此推测,亚低温对临床心肺复苏后脑水肿患者有治疗作用,对神经功能恢复具有积极意义,有一定的推广应用价值。

谷氨酸作为中枢神经系统一种主要的兴奋性神经递质,在神经元发生和神经元毒性作用中起着重要作用,其多样性功能通过不同的受体体现出来。谷氨酸受体分为 NMDA 受体、海人藻酸(KA)受体、使君子酸盐(QA)受体、L-2-氨基-4-磷丁酸(L-AP4)受体和亲代谢型受体 5 类^[12]。NMDA 受体分为 NMDAR1、NMDAR2 两型。本实验中以半定量 RT-PCR 方法检测心肺复苏后 NMDAR1 表达,发现心肺复苏后常温组 NMDAR1 在 mRNA 与蛋白水平表达上调,亚低温处理后 NMDAR1 表达下降,与常温组比较差异有显著性。当 NMDAR1 在 mRNA 与蛋白水平表达上调时,大鼠脑水肿明显;当 NMDAR1 表达下调时,脑水肿减轻。由此可以推测,心肺复苏后大鼠脑水肿形成与 NMDAR1 表达上调有关。

心肺复苏后脑水肿发生机制为:心肺复苏后大鼠脑内 NMDAR1 表达上调,谷氨酸与 NMDAR1 结合,使 NMDAR1 活化。而 NMDAR1 是一种直接与阳离子通道相耦联的受体-离子-通道复合体,

NMDAR1 活化后, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 通透性增加,就会引起细胞内 Na^{+} 浓度增加,而导致细胞内渗透压增大,从而引起细胞毒性脑水肿, Ca^{2+} 通过 NMDAR1 受体内流入细胞内引起“钙超载”,而钙超载是多种因素引起神经细胞水肿甚至死亡的共同途径。经亚低温处理后,心肺复苏后大鼠脑水肿减轻,其机制可能为亚低温使大鼠脑内 NMDAR1 下调所致。

综上所述:亚低温对心肺复苏后脑水肿的减轻作用可能涉及到级联反应中的各个事件,从各个环节影响基因表达以及转录因子活性。本实验中通过对 NMDAR1 在 mRNA 及蛋白水平表达变化的研究,推测亚低温减轻脑水肿机制与 NMDAR1 表达下调有关,具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

- 1 尹卫东,郝贯一,宋来君,等.亚低温治疗大鼠脑外伤时脑温测量技术[J].河南医科大学学报,1999,34:19-20.
- 2 林菊生,冯作化,孙明,等.现代细胞分子生物学技术[M].北京:科学技术出版社,2004:360-362.
- 3 Kataoka K, Yanase H. Mild hypothermia: a revived countermeasure against ischemic neuronal damages[J]. Neurosci Res, 1998, 32:103-117.
- 4 王永谦,王维平,张健生.亚低温治疗对急性重型颅脑损伤患者局部脑氧饱和度及脑脊液乳酸的影响[J].中国危重病急救医学,2002,14:160-162.
- 5 潘仁龙.亚低温在重型颅脑损伤患者中的应用[J].中国危重病急救医学,2004,16:650.
- 6 王卫民,姜启周,程军,等.选择性脑亚低温治疗重型颅脑损伤疗效的研究[J].中国危重病急救医学,2002,14:35-37.
- 7 Nakamura M, Tanno H, Fukuda K, et al. The effects of mild hypothermia on expression of stress protein (HSP 72) after experimental brain injury[J]. No To Shinkei, 1995, 47:484-490.
- 8 Tomasevic G, Kamme F, Stubberod P, et al. The tumor suppressor p53 and its response gene p21 WAF1/Cip1 are not markers of neuronal death following transient global cerebral ischemia [J]. Neuroscience, 1999, 90:781-792.
- 9 Tomasevic G, Kamme F, Wieloch T. Changes in proliferating cell nuclear antigen, a protein involved in DNA repair, in vulnerable hippocampal neurons following global cerebral ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 60:168-176.
- 10 Boris-Moller F, Kamme F, Wieloch T. The effect of hypothermia on the expression of neurotrophin mRNA in the hippocampus following transient cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 63:163-173.
- 11 Slikker W 3rd, Desai V G, Duhart H, et al. Hypothermia enhances bcl-2 expression and protects against oxidative stress-induced cell death in Chinese hamster ovary cells[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31:405-411.
- 12 罗成义,王清华,徐如祥.大鼠大脑损伤后皮质 NMDA 受体活性变化与脑水肿的关系[J].中华创伤杂志,1998,14:203-205.

(收稿日期:2006-03-10)

(本文编辑:李银平)

脑缺血后体感诱发电位和脑电图波谱特征变化及其与细胞凋亡的关系

(正文见268页)



A: 正常组; B: 假手术组; C: I/R 24 h 组

图4 大鼠海马细胞凋亡情况 (TUNEL, $\times 100$)

Figure 4 Apoptosis of hippocampus of rats (TUNEL, $\times 100$)

亚低温对心肺复苏大鼠大脑海马神经元 N-甲基-D-天门冬氨酸受体1表达的影响

(正文见275页)



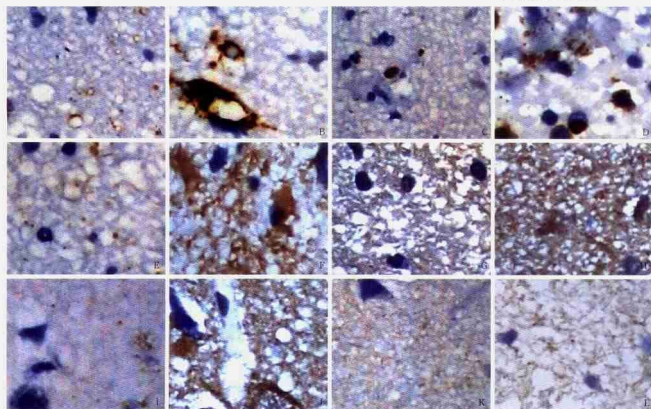
A: 正常对照组; B: 常温组; C: 亚低温组

图1 各组脑组织病理学变化 (HE, $\times 400$)

Figure 1 Pathological changes of cerebral tissue in each group (HE, $\times 400$)

脑出血患者血肿周围组织炎症反应与细胞凋亡的相关性研究

(正文见290页)



A为对照组(CD45免疫组化); B为试验组24-72 h(CD45免疫组化); C为对照组(CD68免疫组化); D为试验组24-72 h(CD68免疫组化); E为对照组(GFAP免疫组化); F为试验组24-72 h(GFAP免疫组化); G为对照组凋亡细胞(TUNEL); H为试验组12-24 h凋亡细胞(TUNEL); I为对照组(Bax免疫组化); J为试验组12-24 h(Bax免疫组化); K为对照组(Bcl-2免疫组化); L为试验组12-24 h(Bcl-2免疫组化)

图1 脑出血患者血肿周围组织炎症反应与细胞凋亡的变化 ($\times 400$)

Figure 1 Changes of inflammatory response and apoptosis in perihematomal region in patients with intra cerebral hemorrhage ($\times 400$)