

· 论 著 ·

颅脑创伤后神经细胞钙通道的变化及其机制

曹 英¹, 曹 勇^{2△}

(1. 第三军医大学第一附属医院急救部, 重庆 400038; 2. 云南省昭通市第一人民医院骨科 657000)

摘要:目的 探讨颅脑损伤后神经细胞钙离子(Ca²⁺)通道出现的变化,分析 Ca²⁺浓度变化与颅脑损伤及治疗的相关性。方法 制备颅脑损伤大鼠 48 只,采用激光共聚焦显微镜分组测定大鼠受伤前后及治疗前后神经细胞内外游离钙离子[Ca²⁺]_i浓度的变化。结果 大鼠受伤后脑皮质细胞内[Ca²⁺]_i迅速升高,24 h 后达到高峰,经亚低温和注射尼莫地平治疗后[Ca²⁺]_i浓度逐渐下降至正常水平。结论 颅脑外伤后 Ca²⁺通道开放,胞浆游离 Ca²⁺浓度显著升高,亚低温及钙拮抗剂等药物治疗能减缓胞外 Ca²⁺移入胞内,减轻脑水肿程度,注意选好治疗的最佳时间窗。

关键词:颅脑损伤; 钙通道; 激光扫描共聚焦显微技术; 钙超载; 亚低温

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.025 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)14-2073-03

Changes and mechanisms of calcium channels in nerve cells after traumatic brain injury

CAO Ying¹, CAO Yong^{2△}

(1. The First Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Orthopaedic, the First People's Hospital of Zhaotong, Zhaotong, Yunnan 657000, China)

Abstract: **Objective** To observe the changes of calcium channels in nerve cells after traumatic brain injury, and to explore the relationship between the changes of calcium ion concentration and brain injury and treatment. **Methods** 48 brain injured rats were prepared by laser scanning confocal microscope to determine the changes of [Ca²⁺]_i concentration of free calcium ion in the nerve cell and the nerve cells before and after the injury. **Results** The [Ca²⁺]_i in rat cerebral cortex increased rapidly after injury and reached the peak at 24 h, and the concentration of [Ca²⁺]_i gradually decreased to normal level after mild hypothermia and injection of nimodipine. **Conclusion** After traumatic brain injury Ca²⁺ channels open, cytosolic free Ca²⁺ concentration increased significantly, mild hypothermia and calcium antagonist and other drugs can reduce extracellular calcium into intracellular, relieve cerebral edema, should pay attention to choose the optimal time window of treatment.

Key words: brain injury; calcium channel; laser scanning confocal microscopy; calcium overload; mild hypothermia

颅脑遭遇外部打击而受到创伤后致残、致死的原因并不全是暴力对颅脑机体本身的伤害,很大程度是颅脑创伤后继发的内源性脑损伤^[1]。诱发机体产生继发性脑损伤的内源性因子很多,如氧自由基、儿茶酚胺、5-羟色胺、兴奋性氨基酸、阿片肽等,其中最主要的因子是细胞内游离钙([Ca²⁺]_i)。最新研究发现,细胞内钙超载是众多病理过程中危害性较大的细胞毒性反应^[2]。为了解脑创伤后神经细胞钙通道的变化,探索钙超载对脑创伤及其预后的影响机制,现通过激光扫描共聚焦显微镜技术测定大鼠颅脑损伤后及经过相应治疗后脑细胞内钙离子(Ca²⁺)浓度变化的研究实验,报道如下。

1 材料与与方法

1.1 一般材料 选用体质量 220~250 g SD 大鼠(购自南京君科生物工程有限公司)48 只,雌雄不限,按 30 mg/kg 的剂量腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉后,选其中 42 只以自由落体装置撞击其硬脑膜,冲击压力 2.5 kPa,冲击时间约 20~30 m/s,以造成左顶叶局限性脑挫裂伤为准。42 只脑挫裂伤大鼠随机分为 7 组,每组 6 只,其中,第 1~5 组分别在脑挫裂伤后 0 min、30 min、2 h、12 h、24 h 和 48 h 断头处死,第 6 组在打击后 2 h 内,立即给予腹部冰袋降温 10~15 min,让大鼠的肛温控制在(32±0.5)℃,3 h 后让其在 2 h 左右的时间内自然复温然后断头处死,第 7 组在打击后 2 h 内注射尼莫地平(Nimodipine,德国拜耳公司生产)2 μmol,2 h 后断头处死,以剩余 6 只脑部未受挫裂伤的大鼠为对照组,直接断头处死。

1.2 [Ca²⁺]_i的测定 所有参与实验的大鼠处死后均参照文

献^[3]进行脑细胞的分离、贴壁、荧光染色等,即以距脑挫裂伤边缘 4 mm 为标准取材,以低温高速梯度离心法分离出脑突触体,经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次后,每两只鼠脑样品为一检测管,37℃加入荧光染料 Fluo-3/AM(乙酰羟甲基酯,浓度 10 μmol/L,美国 Bio-Rad 公司生产),使用激光共聚焦显微镜(TSCM, ACASULTIMA312 型,美国 Meridian 公司生产)40 倍镜下扫描检测突触体胞浆中[Ca²⁺]_i,激发光选用 488 nm 氩激光,激光强度 463 mW,扫描速度 10 mm/s,扫描步距 0.3 μm。参照文献^[4],[Ca²⁺]_i以 nmol/L 表示。计算公式如下:[Ca²⁺]_i=Kd[(F-Fmin)/(Fmax-F)],式中 Kd 为 400 nmol/L, F 为测量的相对荧光值, Fmax 和 Fmin 分别为加入 10 μmol L4-Br-A23187 高钙液(美国 Bio-Rad 公司生产)后获得最大、最小荧光值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 *t* 检验;计数资料以例数或百分比表示,应用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 创伤后神经细胞内[Ca²⁺]_i的变化 大鼠脑创伤后细胞内胞浆[Ca²⁺]_i浓度急骤升高,达(1 016.5±52.3)nmol/L,此后直至 12 h 一直持续缓慢增长,12 h 后又快速增长,24 h 后达(2 671.2±261.6)nmol/L,随后不久便开始急骤下降,至 18 h [Ca²⁺]_i已降至(382.6±56.4)nmol/L,甚至低于正常值。见图 1。

2.2 Ca²⁺通道变化 反映未创伤大鼠(对照组)脑细胞内胞

浆[Ca²⁺]_i为(429.37±7.85)nmol/L,无论采取亚低温方式,还是注射尼莫地平药物治疗,都在伤后 2 h 内进行,伤后大鼠脑细胞内胞浆[Ca²⁺]_i急骤升高,开始治疗时已显著高于对照组,此后包括治疗过程和恢复、观察过程,共用时约 3~5 h,直至处死提取脑细胞时,第 1~4 组均未超过 12 h,这一时期大鼠脑细胞内胞浆[Ca²⁺]_i虽在继续增长,但增长缓慢,而经过治疗后的大鼠(第 6、7 组)脑细胞内胞浆[Ca²⁺]_i已明显下降。见表 1。

表 1 各组不同时段[Ca²⁺]_i变化结果比较(±s,nmol/L)

项目	1~3 组伤后 0~2 h	第 4 组伤后 12 h	第 6 组伤后 12 h	第 7 组伤后 12 h
[Ca ²⁺] _i 浓度	1 386.37±124.14	1 179.78±128.32*	596.21±74.91*	604.05±81.91*

注: * 与 1~3 组比较, *t*=1.387, *P*>0.05; *t*=-8.614, *P*<0.05; *t*=-6.347, *P*<0.05

3 讨 论

既往研究表明,Ca²⁺在神经科学中占据非常重要的地位,称 Ca²⁺为神经细胞信息的传递者,还有研究认为是神经生理学的“DNA”,这是因为 Ca²⁺不仅直接反映神经递质的合成与释放及神经兴奋性的维持状况,还参与突触的可塑性及多种酶活动^[5-6]。正常生理状态下,神经细胞内外 Ca²⁺存在约 10 000 倍的浓度差^[7]。所谓 Ca²⁺通道,是指细胞外 Ca²⁺进入胞质的渠道,包括电压依赖性通道(VDCC)和受体操纵性通道(ROCC)。颅脑创伤后,神经细胞受刺激似乎“通道”被打开了,细胞外钙大量流入胞内,造成神经细胞 Ca²⁺超载,而神经细胞的钙超载又激活蛋白酶和磷脂酶 A2,启动膜脂质过氧化,加剧氧自由基形成,钙调蛋白结合,在细胞内触发一系列的反应,导致神经丝降解,微管解聚,阻断线粒体电子传递,破坏神经元骨架,形成恶性循环,加剧神经元的损伤,揭示神经细胞 Ca²⁺通道的变化最直接的方法就是检测细胞内游离 Ca²⁺([Ca²⁺]_i)^[8]。

Ca²⁺的测定方法较多,常用的有标记示踪法、焦磷酸盐电极组化法和原子吸收光谱法等^[9]。本研究采用标记示踪法,应用激光扫描共聚焦显微镜系统(LSCM),以荧光染料 Fluo-3 与 Ca²⁺络合后被激发而产生荧光来进行检测,一是检测方法较简单,对检测设施要求不高,非常适宜基层临床研究;二是反映 Ca²⁺浓度较准确,而不受细胞外 Ca²⁺的影响。本研究结果表明,大鼠颅脑外伤后,神经细胞存在 Ca²⁺严重超载,第 1 组约在伤后 15 min 内脑细胞内胞浆[Ca²⁺]_i升高至(1 016.5±52.3) nmol/L,比对照组[(429.37±7.85)nmol/L]高出近 1 倍,24 h 达高峰,48 h 后又趋于下降,与文献^[10]报道的研究结果一致。[Ca²⁺]_i升高的原因目前尚未完全明确,可能是一种损伤所导致的病理反应,主要是颅脑创伤后受损和应激反应刺激了肾上腺素、凝血酶、转变生长因子等增多,激活脑细胞 Ca²⁺通道,导致 Ca²⁺大量内流。而脑细胞 Ca²⁺通道激活、Ca²⁺大量内流,Ca²⁺超载进一步加剧对神经细胞的损害,主要表现在干扰神经细胞蛋白质代谢,使细胞骨架蛋白(MAP2, tau)降解;激活核酸内切酶,使细胞核 DNA 片段化;增加自由基形成,刺激一氧化氮合成酶形成,进一步加重细胞损伤^[11]。因此,检测脑细胞内胞浆[Ca²⁺]_i浓度,观察神经细胞 Ca²⁺通道的变化,对了解颅脑创伤的机制,诊断颅脑创伤后的病情进展,观察治疗效果及预后,具有重要的临床指导意义。

本研究还发现经亚低温和尼莫地平治疗后,大鼠神经元细胞内[Ca²⁺]_i明显下降,与未接受治疗的各组比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05),与对照组差异无统计学意义(*P*>

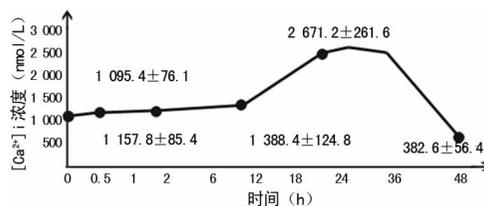


图 1 大鼠脑创伤后 48 h 内[Ca²⁺]_i变化

0.05)。说明亚低温和尼莫地平治疗颅脑创伤疗效显著,也证实 30~33 ℃低温可以防止继发性颅内高压形成,降低脑细胞内胞浆[Ca²⁺]_i浓度,减轻颅脑伤后脑组织病理形态损伤,促进脑外伤后运动神经功能恢复^[12]。本实验无论是采取亚低温方式,还是注射尼莫地平药物治疗,都在伤后 2 h 内进行,限于研究条件,未对伤后不同时间段的治疗效果进行观察,但这一结果也基本说明脑损伤后早期治疗效果最佳^[13]。药物治疗颅脑创伤的效果,本研究只观察了尼莫地平,结果证实尼莫地平能阻断 Ca²⁺通道开放,恢复 Ca²⁺ATPase 活性,使细胞内外 Ca²⁺交换的紊乱现象趋于正常。近年来研究报道,还有许多其他药物,尤其是一些中成药也有此功效,有待于做进一步的探讨^[14]。

综上所述,大鼠受伤后神经元细胞 Ca²⁺通道开放,脑皮层细胞内[Ca²⁺]_i会迅速升高,24 h 后达高峰,48 h 后降至正常,经亚低温和注射尼莫地平治疗后,[Ca²⁺]_i浓度也会迅速下降,亚低温及钙拮抗剂等药物治疗能减缓胞外钙离子移入胞内,减轻脑水肿程度,保护脑细胞不受继发性损伤,临床实践中要注意选好各自作用的最佳时间窗。

参考文献

- [1] 喻安孝,李毅,刘慧芝. 颅脑损伤致死的法医学分析[J]. 重庆医学,2013,42(27):3326-3327.
- [2] 张翼,赵子进,李光亮,等. 颅脑创伤后并发低钠血症 118 例诊疗分析[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2014,41(4):327-331.
- [3] 刘文新,谢小东,吴荧荧,等. 成年大鼠脑膜原代组织干细胞特性细胞的分离及神经诱导分化研究[J]. 现代医药卫生,2014,30(2):164-166.
- [4] 马定军,李忠,刘佰运,等. 颅脑创伤数据库建立方法的探讨[J]. 中国病案,2013,14(12):21-22.
- [5] 崔越,周敏,周静文,等. 海马神经元钙离子通道的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2012,32(3):643-645.
- [6] 马红,于海云,于燕,等. H₂S 抑制 Ang II 引起的神经元活性氧水平升高的机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(5):865-869.
- [7] 江基尧. 中国颅脑创伤研究的现状与未来[J]. 中华医学杂志,2013,93(23):1761-1762.
- [8] 司舒杰,刘天龙,刘小雷. 电压门控钙离子通道的研究进展[J]. 北方药学,2012,9(1):33-35.
- [9] 李艳红. 钙离子的检测及应用[J]. 科技(下转第 2077 页)

生成。正常情况下,除代谢旺盛与血供丰富的组织,如胚胎组织、增殖期子宫内膜,以及血管内皮细胞中 VEGF 表达呈高水平,其他组织 VEGF 表达较低,但恶性肿瘤细胞通常增生活跃、代谢相对旺盛,VEGF 表达水平较高,且其表达程度与肿瘤恶性程度具有正相关性^[11]。两者对恶性肿瘤复发、转移具有一定的促进作用($P < 0.05$)。本研究数据显示,肺癌肿瘤组织 MMP-9 与 VEGF 表达阳性率显著高于正常组织, MMP-9 与 VEGF 表达阳性的患者 MVD 显著高于阴性患者,且两者相关性分析证实具有正相关性,与国内外学者研究数据基本一致,提示 MMP-9 与 VEGF 对肺癌的发生、发展具有一定影响,且在肿瘤血管生成中可能发挥一定作用。

本研究表明,癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性对预后的影响, MMP-9 和 VEGF 均表达阳性的患者术后 3 年内复发率与病死率最高,单纯 MMP-9 或 VEGF 表达阳性者其次,两者表达均阴性者最低,提示两者是肺癌术后复发、转移发生的危险因素。Stapley 等^[12] 研究报道食管癌患者肿瘤组织 VEGF 表达阳性患者,淋巴结转移发生率较高,两者具有相关性,VEGF 不仅可促进肿瘤血管生长,同时对淋巴管的形成也有一定促进作用,两者均对肿瘤复发构成影响。顾咸庆等^[13] 研究显示,VEGF 在非小细胞肺癌组织中呈高表达,有助于肿瘤血管、淋巴管的生成,是术后复发及淋巴结转移的独立危险因素。还有研究报道, MMP-9 能降解细胞外基质中的 IV、V 型胶原及明胶,促进恶性肿瘤细胞的侵袭转移。同时在降解 ECM 的同时, MMP-9 还参与血管内皮细胞穿透基底膜,逐步形成毛细血管出芽的过程,可为新生血管的生长提供空间,加速肿瘤扩散^[14-15]。

综上所述,肺癌组织中 MMP-9 和 VEGF 表达阳性率较高,高表达对肺癌血管生成具有一定促进作用,对术后复发及病死率具有一定影响,两者可作为评估术后预后效果的客观指标。

参考文献

[1] 钱海红. 非小细胞肺癌化疗前后血清 VEGF 和 MMP-9 水平的对照观察[J]. 河北医药, 2013, 35(4): 496-497.
 [2] Feng Y, Hu J, Ma J, et al. RNAi-mediated silencing of VEGF-C inhibits non-small cell lung cancer progression by simultaneously down-regulating the CXCR4, CCR7, VEGFR-2 and VEGFR-3-dependent axes-induced ERK, p38 and AKT signalling pathways[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(15): 2353-2363.
 [3] Wang C, Ma HX, Jin MS, et al. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and-9 expression with extra-gastrointestinal stromal tumor metastasis[J]. Asian Pacific J Cancer Prevent, 2014, 15(10): 4187-4192.

[4] Fanelli MF, Chinen LT, Begnami MD, et al. The influence of transforming growth factor, cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase(MMP)-7, MMP-9 and CXCR4 proteins involved in epithelial-mesenchymal transition on overall survival of patients with gastric cancer[J]. Histopathology, 2012, 61(2): 153-161.
 [5] Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9 [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2012, 21(6): 797-805.
 [6] Hwang BM, Chae HS, Jeong YJ, et al. Protein tyrosine phosphatase controls breast cancer invasion through the expression of matrix metalloproteinase-9[J]. BMB Rep, 2013, 46(11): 533-538.
 [7] Reck M, Heigener DF, Mok T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments [J]. Lancet, 2013, 382(93): 709-719.
 [8] Hu Y, Hu MM, Shi GL, et al. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin correlates with the prognosis of operable non-small cell lung cancer [J]. Eur J Surg Oncol, 2014, 40(9): 1136-1142.
 [9] Liu X, Zhang H, Yu X, et al. The correlation of expression of VEGF and EGFR with SUV of (18)FDG-PET-CT in non-small cell lung cancer [J]. Contemporary Oncology (Poznań, Poland), 2014, 18(5): 334-339.
 [10] Aresu L, Arico A, Comazzi S, et al. VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma [J]. Vet Comp Oncol, 2014, 12(1): 29-36.
 [11] Takala H, Saamio J, Wiik H, et al. HIF-1 α and VEGF are associated with disease progression in esophageal carcinoma [J]. J Surg Res, 2011, 167(1): 41-48.
 [12] Stapley S, Peters TJ, Neal RD, et al. The risk of oesophago-gastric cancer in symptomatic patients in primary care: a large casecontrol study using electronic records [J]. Br J Cancer, 2013, 108(1): 25-31.
 [13] 顾咸庆, 杨雪琴, 杨宇馨, 等. APE1 和 VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成和预后的关系 [J]. 重庆医学, 2012, 41(11): 1047-1050.
 [14] 唐成佳, 余天雾. NGAL 及 MMP9 在原发性肝癌患者血清中表达及意义 [J]. 重庆医学, 2016, 45(17): 2357-2359.
 [15] 梁乃超. VEGF 和 MMP-9 检测对非小细胞肺癌患者疗效和预后评估的价值 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(17): 2529-2531.

(收稿日期: 2017-02-21 修回日期: 2017-04-29)

(上接第 2074 页)

经济市场, 2015, 12(4): 146-147.
 [10] 石咏梅. 脑缺血/再灌注神经元钙离子通道的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(14): 2507-2509.
 [11] 赵滨, 白新宇, 董兴有, 等. 钙库调控的钙离子通道对大鼠膀胱平滑肌收缩性调控的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(11): 1178-1182.
 [12] 杜春奇, 王岭梅, 赵卫兵. 颅内压监测在重型颅脑创伤手术中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(17): 2550-

2551.
 [13] 陶宁, 汪翼, 杜柯君, 等. 亚低温治疗对重型颅脑损伤患者颅内压及脑液生化学指标的影响 [J]. 海南医学院学报, 2015, 21(7): 933-935.
 [14] 朱小丽, 刘砚星, 钟宝贵, 等. 水杨酸钠对大鼠海马神经元电压门控性钙离子通道的影响 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(9): 1266-1270.

(收稿日期: 2017-03-13 修回日期: 2017-05-19)