

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.18.006

GLT-1 在高压氧致中枢神经系统氧中毒发生中的作用研究 *

陈宇亮¹ 张亚楠² 张 婷² 徐伟刚² 李润平^{2△}

(1 北京市海军总医院航海航空医学中心 北京 100048; 2 上海第二军医大学潜水医学教研室 上海 200433)

摘要 目的: 探讨谷氨酸及其转运体在高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)致中枢神经系统氧中毒(central nervous system oxygen toxicity, CNS-OT)发生中的作用。**方法:** (1) 大鼠侧脑室注射谷氨酸转运体(Glutamate Transporter-1, GLT-1)选择性激动剂Ceftriaxone后观察氧惊厥潜伏期。采用随机数字法将大鼠分为对照组和50 μg、100 μg以及200 μg Ceftriaxone给药组。采用侧脑室注射方法分别给予生理盐水和不同剂量Ceftriaxone后,进行0.6 MPa HBO暴露,记录大鼠的惊厥潜伏期。(2) 大鼠侧脑室注射GLT-1选择性抑制剂DHL后观察氧惊厥潜伏期。采用随机数字法将大鼠分为对照组和5 μg、10 μg以及20 μg DHL给药组。采用脑室注射方法分别给予生理盐水和不同剂量DHL后,进行0.6 MPa HBO暴露,记录大鼠的惊厥潜伏期。**结果:** 脑室注射100 μg Ceftriaxone组(33分4.2秒4分12.4秒)和200 μg Ceftriaxone组(47分4.2秒5分5.2秒)惊厥潜伏期显著延长,差异有统计学意义(P 0.05),并存在一定量效关系。脑室注射5 μg DHL组(16分44.4秒±2分4.7秒)、10 μg DHL组(12分51秒±1分23.3秒)和20 μg DHL组(7分31.1秒±53秒)惊厥潜伏期显著缩短,差异有统计学意义(P 0.05),并存在一定量效关系。**结论:** 中枢局部给予GLT-1激动剂可以有效延长CNS-OT的潜伏期;中枢局部给予GLT-1抑制剂可以有效缩短CNS-OT的潜伏期。

关键词: 高压氧; 中枢神经系统氧中毒; 谷氨酸; 谷氨酸转运体

中图分类号: Q95-3; R595.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)18-3422-04

Effects of Glutamate Transporter GLT-1 in Central Nervous System Oxygen Toxicity Caused by Hyperbaric Oxygen Exposure*

CHEN Yu-liang¹, ZHANG Ya-nan², ZHANG Ting², XU Wei-gang², LI Run-ping^{2△}

(1 Nautical and Aviation Medicine Center, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China;

2 Department of Diving Medicine, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of glutamate and glutamate transporter (GLT-1) in central nervous system oxygen toxicity caused by hyperbaric oxygen exposure. **Methods:** 1. The changes of the latency of central nervous system oxygen toxicity after intracerebroventricularly injecting GLT-1 agonist Ceftriaxone. 24 sprague-dawley rats were randomly divided into 4 groups, each consisting of 6 animals: the saline group (the animals were intracerebroventricularly injected 20 μL saline), 50 μg Ceftriaxone group (the animals were intracerebroventricularly injected 50 μg Ceftriaxone), 100 μg Ceftriaxone group (the animals were intracerebroventricularly injected 100 μg Ceftriaxone), 200 μg Ceftriaxone group (the animals were intracerebroventricularly injected 200 μg Ceftriaxone). The latency of central nervous system oxygen toxicity was observed and recorded during the exposure of 6 ATA hyperbaric oxygen. 2. The changes of the latency of central nervous system oxygen toxicity after intracerebroventricularly injecting GLT-1 antagonist DHL. 24 sprague-dawley rats were randomly divided into 4 groups, each consisting of 6 animals: the saline group (the animals were intracerebroventricularly injected 20 μL saline), 5 μg DHL group (the animals were intracerebroventricularly injected 5 μg DHL), 10 μg DHL group (the animals were intracerebroventricularly injected 10 μg DHL), and 20 μg DHL group (the animals were intracerebroventricularly injected 20 μg DHL). The latency of central nervous system oxygen toxicity was observed and recorded during the exposure of 6 ATA hyperbaric oxygen. **Results:** The latency of central nervous system oxygen toxicity of 100 μg Ceftriaxone group (33 min 4.2 sec 4 min 12.4 sec) and 200 μg Ceftriaxone group (47 min 4.2 sec 5 min 5.2 sec) were significantly longer than that of saline group and there was dose-response relationship between the two groups. The latency of central nervous system oxygen toxicity of 5 μg DHL group (16 min 44.4 sec 2 min 4.7 sec), 10 μg DHL group (12 min 51 sec 1 min 23.3 sec) and 20 μg DHL group (7 min 31.1 sec 53 sec) were significantly longer than that of the saline group and there was dose-response relationship among the three groups. **Conclusion:** The latency of central nervous system oxygen toxicity could be prolonged after intracerebroventricularly injecting GLT-1 agonist Ceftriaxone or shortened after intracerebroventricularly injecting GLT-1 antagonist DHL.

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81272179); 第二军医大学军事医学专项课题(2011JS02)

作者简介: 陈宇亮(1979-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: ①航空、潜水特殊环境对人体生理心理健康的影响及其防护;

②航空、潜水特殊疾病的诊疗; ③老年心脑血管疾病的诊疗; ④高压氧临床治疗

△ 通讯作者: 李润平, E-mail: smartpili@hotmail.com

(收稿日期: 2014-12-08 接受日期: 2014-12-31)

Key words: Hyperbaric oxygen; Central nervous system oxygen toxicity; Glutamate; GLT-1

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R595.1 **Document code :** A

Article ID: 1673-6273(2015)18-3422-04

前言

高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)在潜艇脱险、潜水作业和临床疾病治疗中有着广泛的用途^[1]。然而机体长时间吸入氧分压过高的气体时,会出现毒性反应。当氧分压超过 280 kPa 时,这种毒性反应会在较短时间内发生,并以中枢神经系统(central nervous system, CNS)功能紊乱为主要表现,如眩晕、恶心、视力障碍等,称之为中枢神经系统氧中毒(central nervous system oxygen toxicity, CNS-OT),其最典型、最剧烈的表现是类似于癫痫大发作样的全身强直性痉挛,即惊厥大发作,称为“氧惊厥”^[2]。目前对于氧惊厥发病机制的认识还很有限,使所能采取的预防措施也很被动,主要是限制吸氧的压力(潜水深度)和时间^[3-4]。

近年的研究表明,星形胶质细胞在癫痫的形成和发展中具有非常重要的作用^[5];通过对这种细胞内的各信号通路上相关的靶点进行干预,有望找到能够有效防治各种原因诱发的癫痫,特别是难治性癫痫的措施。其中,星形胶质细胞对腺苷(adenosine)和谷氨酸(glutamate)的代谢被认为是控制 CNS 中兴奋性产生与传播的一个非常重要的环节^[6-10]。我们前期的研究探讨了腺苷在 HBO 致 CNS-OT 发生中的作用,结果表明, HBO 暴露可引起大脑皮质中腺苷含量升高,且中枢局部给予腺苷可以有效延长 CNS-OT 的潜伏期。

谷氨酸是 CNS 内含量最高的氨基酸,是效用明确的兴奋性氨基酸之一。关于 CNS 中谷氨酸代谢的研究^[11]表明,突触前膜释放的谷氨酸主要通过分布在星形胶质细胞膜上的谷氨酸转运体-1 (Glutamate Transporter-1, GLT-1)转移进入星形胶质细胞,经谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase, GS)转化生成谷氨酰胺,随后再释放进入突触末梢重新生成谷氨酸。在 CNS 中,GS 仅存在于星形胶质细胞中,因此,以星形胶质细胞为中心的谷氨酸-谷氨酰胺循环对于维持突触内谷氨酸含量的稳定具有决定性意义。GS 活性降低和 GLT-1 功能下降都会导致突触内谷氨酸含量的升高,从而增强中枢兴奋性^[12-15]。基于星形胶质细胞对谷氨酸的代谢是其影响癫痫发作的一个重要环节以及谷氨酸在 CNS 的兴奋效应,本研究将通过侧脑室注射 GLT-1 选择性激动剂(Ceftriaxone)和选择性抑制剂(dihydrokainate, DHK),观察它们对 CNS-OT 潜伏期的影响,探讨谷氨酸及其转运体与 CNS-OT 的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

SD(Sprague-Dawley)大鼠,雄性,体质量 180~220 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。Ceftriaxone 和 DHK 由 Tocris 公司提供。

1.2 侧脑室注射不同药物后观察 CNS-OT 潜伏期方法

(1)实验动物分组:1)侧脑室注射 Ceftriaxone 组:采用随机数字法将大鼠分为 4 组,每组 6 只,分为生理盐水对照组和

50 μ g、100 μ g 以及 200 μ g Ceftriaxone 给药组。2)侧脑室注射 DHK 组:采用随机数字法将大鼠分为 4 组,每组 6 只,分为生理盐水对照组和 5 μ g、10 μ g 以及 20 μ g DHK 给药组。

(2)侧脑室注射给药及 HBO 暴露方法:用腹腔注射(30 mg/kg)10%水合氯醛法将大鼠麻醉后,固定于脑立体定位仪上。保持头顶部水平,去毛,用 75%酒精棉球消毒皮肤后,沿前正中中线剪开头顶部皮肤,分离皮下组织,剥离刮掉骨膜,暴露前囟。取前囟后 2 mm,中线右侧旁开 1.5 mm 为侧脑室注射点,用颅骨钻在该点钻开 1 个直径为 0.5 mm 的小孔,将固定在侧脑室定位仪垂直臂的侧脑室注射外管插入此孔中,深度为 2 mm,用牙科水泥将其固定于颅骨,缝合皮肤。全部过程均无菌操作。术后将大鼠继续饲养,恢复 3 d 后进行 HBO 暴露。暴露前,用乙醚将大鼠麻醉,用注射内管将事先配制好的不同浓度的药物以及生理盐水 20 μ L 沿预置的注射外管缓慢注入侧脑室。10 min 后,将大鼠置于加压舱内,每次 1 只。用纯氧洗舱(1 L/min),待测氧仪显示舱内氧浓度达到 99%以上时,开始以 0.1 MPa/min 的速度匀速加压至 0.6 MPa,保持压力稳定,持续暴露至发生惊厥,舱内温度维持在 22~24 $^{\circ}$ C。暴露结束后,以 0.1 MPa/min 的速率匀速减压至常压,出舱。当舱内压力达到 0.6 MPa 时开始记录时间,出现惊厥大发作时停止记录时间,该段时间记为氧惊厥潜伏期。

1.3 统计学处理

实验结果用 SPSS17.0 统计软件分析,所得数据以均数+标准差($\bar{x} \pm s$)表示,差异用非配对 t 检验、方差分析 F 检验及 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 侧脑室注射 GLT-1 选择性激动剂 Ceftriaxone 对 CNS-OT 潜伏期的影响

侧脑室注射 50 μ g 的 Ceftriaxone, CNS-OT 潜伏期与对照组相比未见显著性差异($P > 0.05$),侧脑室注射 100 μ g Ceftriaxone 组(33 分 4.2 秒 4 分 12.4 秒)和 200 μ g Ceftriaxone 组(47 分 4.2 秒 5 分 5.2 秒)惊厥潜伏期显著延长,差异有统计学意义($P < 0.05$),并存在一定量效关系(见图 1)。

2.2 侧脑室注射 GLT-1 选择性抑制剂 DHK 对 CNS-OT 潜伏期的影响

侧脑室注射 5 μ g DHK 组(16 分 44.4 秒 $\pm$ 2 分 4.7 秒)、10 μ g DHK 组(12 分 51 秒 $\pm$ 1 分 23.3 秒)和 20 μ g DHK 组(7 分 31.1 秒 $\pm$ 53 秒)惊厥潜伏期显著缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$),并存在一定量效关系(见图 2)。

3 讨论

谷氨酸是效用明确的兴奋性氨基酸之一,它对中枢神经系统,尤其是对大脑皮层有广泛而强烈的兴奋作用,并与癫痫样放电的触发和扩散有密切关系^[16]。谷氨酸在细胞内和突触内的转运是通过谷氨酸转运体实现的,真核生物高亲和力谷氨酸转

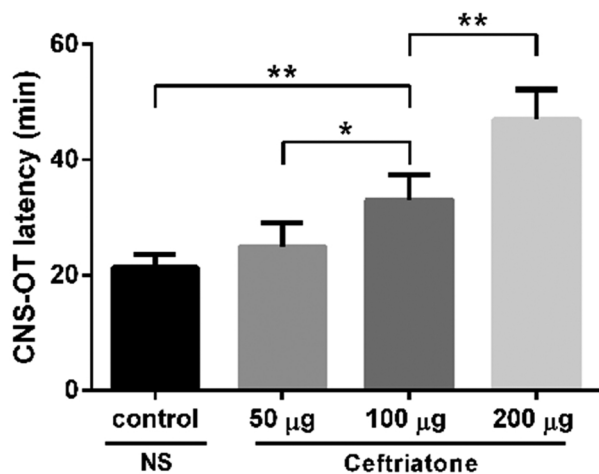


图1 侧脑室注射不同剂量 Ceftriaxone 对 CNS-OT 潜伏期的影响

Fig. 1 The changes of the latency of CNS-OT after intracerebroventricularly injecting different doses of Ceftriaxone
注: n=6, * 两组间比较, P<0.05; ** 两组间比较, P<0.01。

Note: n=6, * P<0.05 in comparison with two groups; ** P<0.01 in comparison with two groups.

运体(excitatory amino acid transporters, EAATs)主要在神经元和神经胶质细胞膜上表达,其可摄取突触间隙内的谷氨酸。GLT-1 是 EAATs 中的一个亚型,在 CNS 中广泛分布,主要位于前脑、大脑皮质、海马等部位的星形胶质细胞膜上,负责清除 90 %左右的谷氨酸^[1]。突触内的谷氨酸若不能被及时清除,则会导致细胞外谷氨酸过度蓄积,从而产生兴奋性神经毒性^[17, 18]。GLT-1 能迅速清除突触释放出来的谷氨酸,有效维持了细胞外谷氨酸的低浓度,防止兴奋性扩散,同时也限制了潜在的兴奋性神经毒性的发生。头孢曲松(Ceftriaxone)是 β 内酰胺类抗生素,且同时具有 GLT-1 激动剂的作用,可以增加 GLT-1 的活性^[19],因此 Ceftriaxone 可以增加谷氨酸的摄取,降低神经兴奋性。有研究表明,Ceftriaxone 可以降低黑质纹状体神经元的兴奋性^[20]。此外,其他的研究也表明,在肌萎缩性脊髓侧索硬化症的动物疾病模型中,Ceftriaxone 可以减轻运动神经元的降解,起到保护神经元的作用。我们的实验中采用侧脑室注射不同剂量的 Ceftriaxone,观察其对 CNS-OT 潜伏期的影响。结果表明,50 μ g 的 Ceftriaxone 时 CNS-OT 潜伏期与对照组相比虽有延长趋势,但未见统计学显著性差异,考虑可能为剂量不足导致。加大剂量后,我们采用注射 100、200 μ g 的 Ceftriaxone 均可使 CNS-OT 潜伏期显著地延长,结果具有统计学意义,且存在一定的量效关系。上述结果说明,给予侧脑室注射 Ceftriaxone 可以增强 GLT-1 发挥其摄取谷氨酸的功能,降低突触内谷氨酸含量,从而降低神经兴奋性,延长 CNS-OT 潜伏期。为了进一步验证 GLT-1 的作用,我们还应用了 GLT-1 的选择性抑制剂 DHK 进行研究^[21],结果表明,与对照组相比,5、10、20 μ g 的 DHK 均可使 CNS-OT 潜伏期显著地缩短,且存在一定的量效关系。说明外源性 DHK 可以抑制 GLT-1 的活性,导致突触内谷氨酸积聚过多,增加神经的兴奋性,从而缩短 CNS-OT 潜伏期。

本研究表明,中枢局部给予 GLT-1 激动剂可以有效延长 CNS-OT 的潜伏期;中枢局部给予 GLT-1 抑制剂可以有效缩短

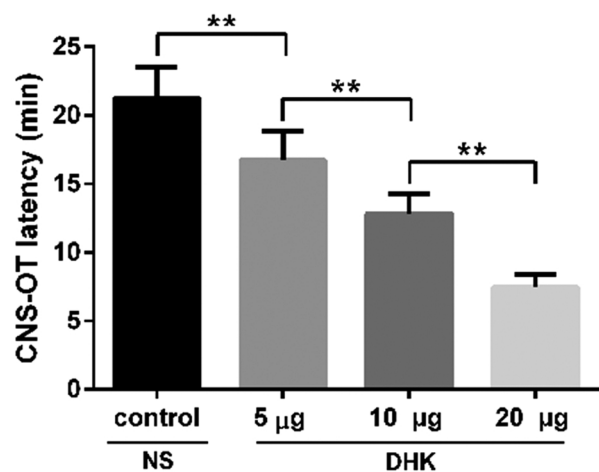


图2 侧脑室注射不同剂量 DHK 对 CNS-OT 潜伏期的影响

Fig. 2 The changes of the latency of CNS-OT after intracerebroventricularly injecting different doses of DHK
注: n=6, * 两组间比较, P<0.05; ** 两组间比较, P<0.01。

Note: n=6, * P<0.05 in comparison with two groups; ** P<0.01 in comparison with two groups.

CNS-OT 的潜伏期。因此笔者认为,以星形胶质细胞为核心的对 CNS 中谷氨酸的调节与 CNS-OT 的发作有着密切联系,其对 CNS-OT 发作有非常重要的调控作用。以此为靶点进行适当的干预,将有望找到防治 CNS-OT 的新措施。

参考文献(References)

- [1] 张锦程,傅敏.减压病的治疗进展[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2011,18(1): 61-64
Zhang Jin-cheng, Fu Min. The progress on treatment of Decompression Sickness [J]. Chinese Journal of Nautical Medicine and Hyperbaric Medicine, 2011, 18(1): 61-64
- [2] 郝军超,薛连璧.氧气对中枢神经系统的毒性及氦气对其的拮抗作用研究进展[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2012,19(4): 255-256
Yu Jun-chao, Xue Lian-bi. The research development of the toxicity of oxygen on the central nervous system and antagonism of hydrogen [J]. Chinese Journal of Nautical Medicine and Hyperbaric Medicine, 2012, 19(4): 255-256
- [3] 肖翔,李润平.间歇性吸氧延缓氧中毒发生的相关问题研究进展[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2007,14(4): F3-F4
Xiao Xiang, Li Run-ping. The research development of intermittent oxygen delay oxygen toxicity [J]. Chinese Journal of Nautical Medicine and Hyperbaric Medicine, 2007, 14(4): F3-F4
- [4] Seckin M, Gurgor N, Beckmann YY, et al. Focal status epilepticus induced by hyperbaric oxygen therapy [J]. Neurologist, 2011, 17(1): 31-33
- [5] Dulla C, Masino S. Physiologic and Metabolic Regulation of Adenosine: Mechanisms[M]. Adenosine, 2013: 87-107
- [6] Seifert G, Carmignoto G, Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in epilepsy[J]. Brain Res Rev, 2010, 63(1-2): 212-221
- [7] de Lanerolle NC, Lee TS, Spencer DD. Astrocytes and epilepsy[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(4): 424-438
- [8] Seifert G, Steinhauser C. Neuron-astrocyte signaling and epilepsy[J]. Exp Neurol, 2013, 244: 4-10

- [9] Boison D. The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis[J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 84(3): 249-262
- [10] Boison D. Adenosine dysfunction and adenosine kinase in epileptogenesis[J]. *Open Neurosci J*, 2010, 4: 93-101
- [11] Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain[J]. *Neurochem*, 1984, 42(1): 1-11
- [12] Torbati D, Parolla D, Lavy S. Blood flow in rat brain during exposure to high oxygen pressure [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1978, 49(8): 963-967
- [13] Ouml B, G W, Tyssebotn I. Cerebral blood flow distribution during exposure to 5 bar oxygen in awake rats [J]. *Undersea Biomed Res*, 1992, 19(5): 339-354
- [14] Stadler J, Billiar TR, Curran RD, et al. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes[J]. *Am J Physiol*, 1991, 260(5 Pt 1): C910-C916
- [15] Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(14): 6368-6371
- [16] Tani H, Dulla CG, Farzampour Z, et al. A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release [J]. *Neuron*, 2014, 81(4): 888-900
- [17] Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate [J]. *Neuron*, 1996, 16(3): 675-686
- [18] Rao VL, Dogan A, Bowen KK, et al. Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain [J]. *Eur J Neurosci*, 2001, 13(1): 119-128
- [19] Rothstein D, Patel S, Regan MR, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression [J]. *Nature*, 2005, 433(7021): 73-77
- [20] Leung TC, Lui CN, Chen LW, et al. Ceftriaxone ameliorates motor deficits and protects dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3(1): 22-30
- [21] Munoz MD, Herreras O, Herranz AS, et al. Effects of dihydrokainic acid on extracellular amino acids and neuronal excitability in the in vivo rat hippocampus[J]. *Neuropharmacology*, 1987, 26(1): 1-8

(上接第 3525 页)

- [12] Ismaeel AY, Al Khaja KA, Damanhori AH. Management of acute diarrhoea in primary care in Bahrain: self-reported practices of doctors [J]. *Journal of health, population, and nutrition*, 2013, 25(2): 205-211
- [13] Salazar-Lindo E, Figueroa-Quintanilla D, Cacicano MI. Effectiveness and safety of Lactobacillus LB in the treatment of mild acute diarrhea in children [J]. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2012, 44(5): 571-576
- [14] Yang DF, Guo W, Tian DY. Efficacy and safety of reduced osmolarity oral rehydration salts in treatment of dehydration in children with acute diarrhea--a multicenter, randomized, double blind clinical trial[J]. *Chinese journal of pediatrics*, 2010, 45(4): 252-255
- [15] Pulungsih SP, Punjabi NH, Rafli K. Standard WHO-ORS versus reduced-osmolarity ORS in the management of cholera patients[J]. *Journal of health, population, and nutrition*, 2011, 24(1): 107-112
- [16] Boonstra E, Lindbaek M, Ngome E. Adherence to management guidelines in acute respiratory infections and diarrhoea in children under 5 years old in primary health care in Botswana[J]. *International journal for quality in health care*, 2012, 17(3): 221-227
- [17] Karim R, Ramdahin P, Boodoo JR. Community pharmacists' knowledge and dispensing recommendations for treatment of acute diarrhoea in Trinidad, West Indies[J]. *International journal of clinical practice*, 2013, 58(3): 264-267
- [18] Alam NH, Ashraf H. Treatment of infectious diarrhea in children[J]. *Paediatric drugs*, 2008, 5(3): 151-65
- [19] Fontaine O. Update on oral rehydration salt solutions used for treatment of childhood diarrhea [J]. *Médecine tropicale*, 2009, 63(4-5): 486-490
- [20] Bahl R, Bhandari N, Saksena M. Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6- to 35-month-old children with acute diarrhea[J]. *The Journal of pediatrics*, 2012, 141(5): 677-682