

基于 GABA-CEST 成像新生猪缺血缺氧脑损伤后 GABA 代谢的相关研究

张 琴, 赵思嘉, 郑 阳

(中国医科大学附属盛京医院放射科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的:联合 7.0T GABA-CEST 成像研究新生猪缺血缺氧脑损伤(HIBI)后基底节区 γ -氨基丁酸(GABA)含量的动态变化及其相关蛋白的表达,以期进一步明确 GABA 代谢的自我调节及其在 HIBI 中的作用机制。方法:选用出生 3~5 d 的健康新生猪,对照组 4 头, HIBI 模型组 24 头,将模型组分为以下 6 个亚组(n=4):0~2 h、2~6 h、6~12 h、12~24 h、24~48 h。通过 GABA-CEST 成像检测 HIBI 后不同时间点基底节区 GABA 的变化,并对受体(GABRG2)、合成酶(GAD65、GAD67)及转运体(GAT1、GAT3)进行蛋白印迹分析。结果:HIBI 后 GABA、GABRG2 表达均呈先升高后降低的趋势,GABA 的峰值出现在 24~48 h,GABRG2 在 0~2 h 达到最高。在 HIBI 后早期(0~2 h)GAD 表达趋势相反,GAD65 表达升高而 GAD67 表达降低,二者后期在 12~24 h、24~48 h 表达均先升高后下降,与此期间 GABA 变化趋势一致。GAT1 仅在 2~6 h、6~12 h、24~48 h 与对照组比较有统计学意义,相较于对照组表达下降,GAT3 表达总体呈先增高后降低的趋势,其峰值出现在 6~12 h,早于 GABA。结论:结果表明 7.0T GABA-CEST 成像能够无创性定量反映新生猪 HIBI 后基底节区 GABA 浓度变化;HIBI 后 GABRG2、GAT、GAD 的表达变化提示 GABA 早期可能作为神经递质拮抗兴奋毒性作用,后期可能作为能量底物支持神经元活动。

[关键词] 缺氧缺血,脑;脑损伤;磁共振成像

[中图分类号] R743.31;R445.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-1062(2025)03-0158-04

DOI:10.12117/jccmi.2025.03.002

Expression changes in GABA metabolism after hypoxic-ischemic brain injury: evidence of 7.0T GABA-CEST imaging

ZHANG Qin, ZHAO Si-jia, ZHENG Yang

(Department of Radiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: Objective: To investigate the dynamic changes and metabolism of GABA in the basal ganglia of a neonatal pig model of hypoxic-ischemic brain injury (HIBI) using 7.0T GABA-CEST imaging, aiming to clarify the self-regulation of GABA metabolism and its mechanisms in HIBI. **Methods:** Healthy neonatal pigs aged 3 to 5 days were selected, with 5 pigs in the control group and 24 pigs in the HIBI model group. The model group was further divided into 6 subgroups(n=4): 0~2 h, 2~6 h, 6~12 h, 12~24 h, and 24~48 h. GABA-CEST imaging was performed to detect changes in GABA levels in the basal ganglia at different time points following HIBI. Western blot analysis was conducted to assess the expression of receptors (GABRG2), synthesizing enzymes (GAD65, GAD67), and transporters (GAT1, GAT3). **Results:** After HIBI, the expressions of GABA and GABRG2 showed an initial increase followed by a decrease, with GABA peaking at 24~48 h and GABRG2 reaching its highest level at 0~2 h. In the early phase (0~2 h) following HIBI, the patterns of GAD expression were opposite; GAD65 increased while GAD67 decreased. Both GAD65 and GAD67 subsequently increased before declining between 12~24 h and 24~48 h, aligning with the changes observed in GABA. The expression of GAT1 differed from the control group only at 2~6 h, 6~12 h, and 24~48 h, showing a decrease compared to the control group. In contrast, GAT3 demonstrated an overall trend of first rising and then falling, peaking at 6~12 h, earlier than GABA. **Conclusion:** The results indicate that the 7.0T GABA-CEST imaging technique can non-invasively and quantitatively reflect changes in GABA concentration in the basal ganglia of newborn pigs following HIBI. The observed changes in the expression of GABRG2, GAT, and GAD suggest that GABA may initially act as a neurotransmitter to counteract excitotoxicity and may later serve as an energy substrate to support neuronal activity.

Key words: Hypoxia-Ischemia, Brain; Brain Injuries; Magnetic Resonance Imaging

缺氧缺血性脑损伤 (Hypoxic-ischemic brain injury, HIBI) 是导致新生儿认知、运动、神经功能障碍及死亡的主要原因^[1]。基底节是 HIBI 患儿大脑中

受到选择性严重影响的主要核团之一,既往研究发现,在 HIBI 后从纹状体投射到苍白球和黑质的 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能棘突神经元约

[收稿日期] 2024-12-17

[作者简介] 张琴(1999-),女,重庆人,在读硕士研究生。E-mail: zhangqin199712@163.com

[通信作者] 郑阳,中国医科大学附属盛京医院放射科,110004。E-mail: zhengyang19871114@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81801658);辽宁省科技计划联合计划项目(No. 2024-MSLH-565)。

95%受到严重的影响^[2],而 GABA 是大脑内主要的抑制性神经递质,几乎参与中枢神经系统所有信号的处理,对于维持兴奋性和抑制性的动态平衡与大脑正常功能至关重要^[3]。GABA 合成是调节 GABA 活动状态的主要因素,主要由限速酶谷氨酸脱氢酶(Glutamic acid decarboxylase,GAD)合成^[4],在发挥生理作用后,大多 GABA 从突触间隙中被 GABA 转运体(GABA transport,GAT)重吸收以维持脑内 GABA 平衡^[5]。

化学交换饱和和转移(Chemical exchange saturation transfer,CEST)成像是一种基于各种饱和化合物分子中的不稳定氢原子核与水分子发生化学交换的新型无创体内 MRI 检查方法^[6],打破了磁共振波谱成像难以精准评估深层脑结构代谢变化及 GABA 与谷氨酸(Glutamate,Glu)、N-乙酰天冬氨酸、肌酐等共振峰谱重叠的局限性,且具有良好的信噪比与时空分辨率^[7],目前已应用于恶性肿瘤的评估、肿瘤进展与坏死的鉴别及癫痫的 Glu-CEST 成像等,而鲜见关于新生儿 HIBI 后 GABA-CEST 成像价值的研究。

本研究拟通过新生猪 HIBI 模型探讨 GABA 的动态变化及相关代谢,以期进一步理解不良神经发育结局的潜在机制及寻找 HIBI 治疗的新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

采用中国医科大学动物室提供的 34 头新生约克夏猪(3~5 日龄,体质量 1~1.5 kg),排除运动伪影、造模失败的 6 头,将剩下 28 头随机分至对照组(n=4)和 HIBI 模型组(n=24)。根据造模完成后的存活时间将模型组分为 0~2 h、2~6 h、6~12 h、12~24 h、24~48 h、48~72 h 6 个亚组(n=4)。实验动物饲养在湿度 40%~70%的环境中,室温控制在 28℃~30℃,并进行 12 h 的明暗循环。本研究通过我院伦理委员会审批(批号:2023PS197K),严格遵守《实验动物管理条例》和《实验动物许可证管理办法》。

1.2 动物模型制作

模型组使用速眠新(0.6 mL/kg,长春军事医学院兽医研究所)肌肉注射。待角膜反射消失后行气管插管(直径 2.5 mm),在呼吸比(I/E)1:1.5、呼吸频率 30 次/min、0.05~0.06 Mpa 的压力条件下通入 100%纯氧辅助呼吸(TKR-200C,江西特力麻醉呼吸设备中国有限公司)。消毒后沿颈部正中切开并钝性分离颈总动脉与迷走神经。待恒温箱保温 30 min 后,夹闭双侧颈总动脉同时通入含氧 6%的氮氧混合气,40 min 后移除动脉夹并恢复 100%氧气机械通气,氧流量为 2~4 L/min,潮气量为 5 mL/kg,使最终吸入氧浓度维持在 30%~40%间。最后缝合手术切口,自主呼吸

后撤除呼吸机。对照组不夹闭双侧颈总动脉及通入混合气,仅进行假手术操作。

1.3 GABA-CEST 扫描及数据处理

采用 7.0T Time Medical 小动物 MR 扫描仪(TM7T310LS)按照每组指定的缺氧缺血时间进行扫描,使用收发一体线圈,在 T₂WI 上将所有新生猪定位在基底节水平,GABA-CEST 成像使用 FSE 序列,并在每次扫描前校正水的中心频率,采集偏置频率范围-5.00 ppm 到+5.00 ppm 的图像,间隔约为 0.25 ppm,其它扫描参数:TR 5 000 ms,TE 11.65 ms,矩阵 64×64,层厚 3 mm,平均采集次数(Averages)为 1,扫描时间为 630 s。选择双侧基底节区作为感兴趣区(ROI)(图 1)。将采集的数据导入 IDL 进行后处理。选择±2.75 ppm 处的数据点进行非对称分析。

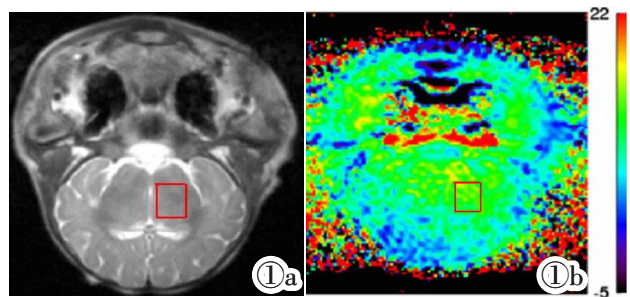


图 1 GABA-CEST 成像 ROI 的选择。

Figure 1. Selection of GABA-CEST imaging ROI.

1.4 蛋白印迹

取 100 mg 基底节组织加入 RIPA 裂解液提取总蛋白裂解物,按照 BCA 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)说明书测定蛋白浓度。将等体积配平的 20 μg 蛋白在 4%~20%凝胶梯度中电泳分离(M42015C,GenScript 公司,USA),条件为 80 V 30 min、120 V 60 min,随后 100 V 恒压 60 min 转印到聚偏二氟乙烯膜上。脱脂牛奶常温封闭 2 h,TBST 洗膜 10 min,共 3 次。一抗 4℃孵育过夜,洗涤,二抗室温孵育 4 h,洗涤,最后使用凝胶成像系统(上海 Tanon 公司,4600)自动模式曝光,采用 Image J 软件进行定量分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,采用独立样本 *t* 检验分析左右基底神经节之间 GABA 值的差异,采用 ANOVA 方差分析比较各组在不同时间点的统计学差异,并进一步使用 LSD-*t* 检验进行两组间比较,*P*<0.05 为差异具有统计学意义。使用 Graphpad Prism 9.5 绘图,其中 * 表示 *P*<0.05,** 表示 *P*<0.01,*** 表示 *P*<0.001。

2 结果

2.1 GABA 的 CEST 效应

左右基底神经节之间 GABA 值的差异无统计学意义 ($P<0.05$), 因此取双侧基底神经节 GABA 的平均值。GABA 呈现先升高后降低的趋势, 在 24~48 h 达到峰值, 与各组比较均有统计学意义 ($P<0.05$), 在 48~72 h 时恢复至对照组水平。对照组除与 48~72 h

组比较无统计学差异外 ($P=0.257$), 与 0~6 h、6~12 h、12~24 h、24~48 h 组比较均有统计学差异 ($P=0.002$ 、 $P=0.006$ 、 $P=0.014$ 、 $P=0.000$)。对照组和模型组中 GABA 不同时间节点的变化如图 2 所示。

2.2 HIBI 后基底节区 GABRG2 的变化趋势

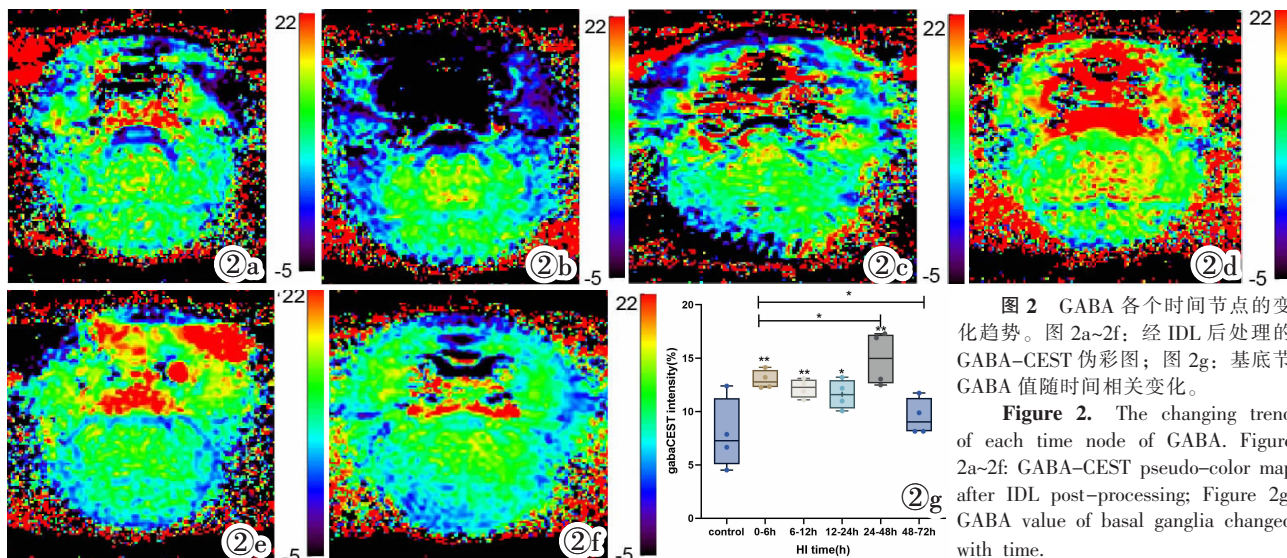


图 2 GABA 各个时间节点的变化趋势。图 2a~2f: 经 IDL 后处理的 GABA-CEST 伪彩图; 图 2g: 基底节 GABA 值随时间相关变化。

Figure 2. The changing trend of each time node of GABA. Figure 2a~2f: GABA-CEST pseudo-color map after IDL post-processing; Figure 2g: GABA value of basal ganglia changed with time.

HIBI 后 GABRG2 在 0~2 h 表达升高, 与各组均有统计学意义 ($P<0.05$), 后逐渐降低。对照组与 0~2 h、24~48 h、48~72 h 组比较有统计学意义 ($P=0.023$ 、 $P=0.022$ 、 $P=0.008$), 与 2~6 h、6~12 h、12~24 h 组比较无统计学意义 ($P=0.601$ 、 $P=0.787$ 、 $P=0.205$) (图 3)。

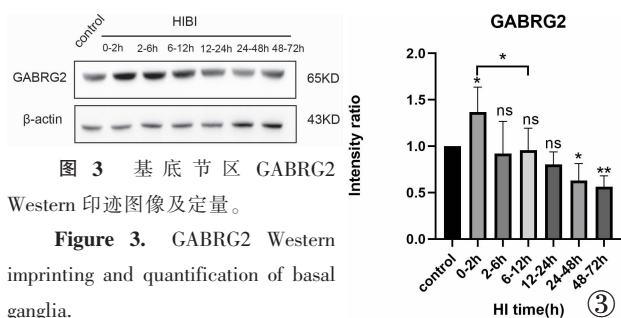


图 3 基底节区 GABRG2 Western 印迹图像及定量。

Figure 3. GABRG2 Western imprinting and quantification of basal ganglia.

2.3 HIBI 后基底节区 GAD65、GAD67 的变化趋势

GAD65 表达在 HIBI 后 0~2 h 升高, 在 2~6 h 降低, 在 12~24 h 再次升高, 于 24~48 h 达到最高值, 并在 48~72 h 再次降低。对照组除与 0~2 h、12~24 h、24~48 h 组比较有统计学意义外 ($P=0.024$ 、 $P=0.016$ 、 $P=0.010$), 与 2~6 h、6~12 h、48~72 h 组比较无统计学意义 ($P=0.865$ 、 $P=0.384$ 、 $P=0.698$)。GAD67 表达在 0~2 h 下降, 在 2~6 h 升高, 在 12~24 h 达到最高, 在 48~72 h 显著降低至对照组水平以下。对照组与各组比较均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 4)。

2.4 HIBI 后基底节区 GAT1、GAT3 的变化趋势

GAT1 表达在 HIBI 后 2~6 h 下降, 在 12~24 h 升高, 在 24~48 h 再次减低。对照组除与 2~6 h、6~12 h、24~48 h 组比较有统计学意义外 ($P=0.002$ 、 $P=0.011$ 、

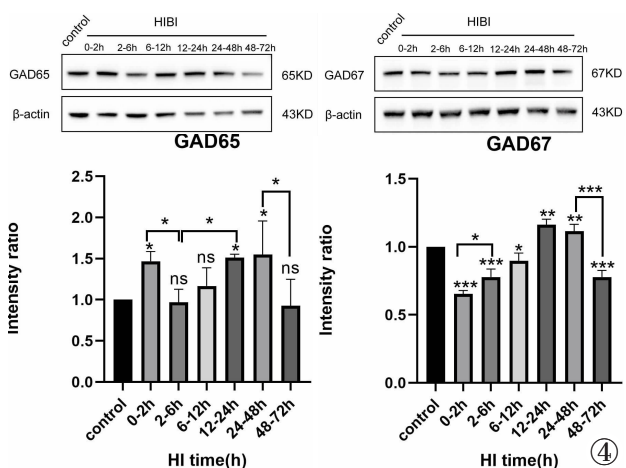


图 4 基底节区 GAD65、GAD67 Western 印迹图像及定量。

Figure 4. GAD65 and GAD67 Western imprinting images and quantification of basal ganglia.

$P=0.044$), 与其余各组比较均无统计学意义 ($P<0.05$)。GAT3 表达在 2~6 h、6~12 h 和 12~24 h 显著升高, 在 24~48 h 下降至对照组水平。对照组除与 0~2 h、24~48 h、48~72 h 组比较无统计学意义外 ($P<0.05$), 与其余各组比较均有统计学意义 ($P<0.01$) (图 5)。

3 讨论

GABA 在脑缺氧时期起关键作用^[8], 大脑中葡萄糖氧化代谢减少时, GABA 以琥珀酸盐的形式进入三羧酸循环 (TCA) 补充能量代谢底物^[9]。此外, 其作为中枢神经递质, 对维持神经元和星形胶质细胞间的神经递质稳态亦至关重要。神经元 Glu 和 GABA 及星形胶质细胞谷氨酰胺 (Gln) 的跨细胞转运构成了神经递质循环, 即 Glu/GABA-Gln 循环^[10]。GABA 从突触前

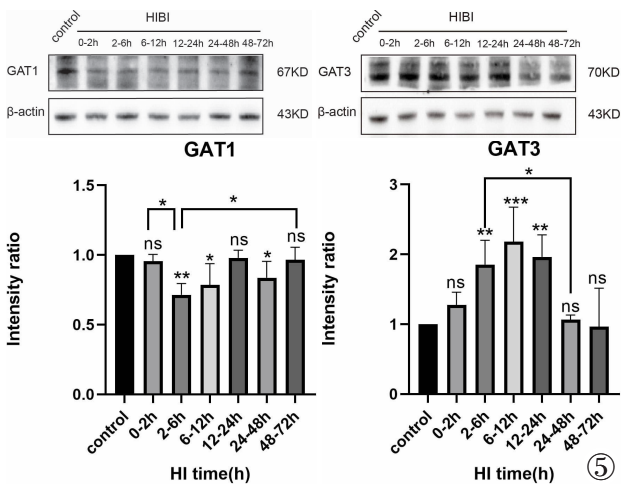


图5 基底节区 GAT1、GAT3 Western 印迹图像及定量。

Figure 5. GAT1 and GAT3 Western imprinting images and quantification of basal ganglia.

神经元释放后与突触后神经元的 GABA_A 受体结合,促进氯离子内流发生超极化,抑制神经元活动^[11],在发挥作用后主要通过位于突触前神经元和星形胶质细胞中的特异性 GAT 重摄取从突触中去除,其中 GAT1 在神经元中广泛表达,而 GAT3 主要在星形胶质细胞中表达。突触前神经元再摄取的 GABA 可重新包装在囊泡中备用,也可进入 TCA 中代谢,而星形胶质细胞吸收的 GABA 只能进入 TCA 代谢,并为神经元提供 Gln 作为合成 GABA 的前体^[12]。

本研究中 HIBI 后早期即出现 GABA 升高,与之前的相关研究一致^[13],在 24~48 h 达最高峰后下降至对照组水平。Glu 和 GABA 共释放是大脑中一种广泛的神经传递方式^[14]。在我们之前的研究中,Glu 早期即释放增加,在 6~12 h、24~48 h 含量最高^[15],在缺氧的初始阶段,Glu 的释放可促进 GABA 增加以拮抗兴奋毒性作用,发挥神经保护作用^[8],主要通过激活 GABA_A 受体起作用^[16]。缺氧后钙离子超载^[17],而后触发囊泡 GABA 的胞吐作用导致其释放增加^[18]。关于其后期下降的原因可能为:①随着缺氧缺血时间延长,GABA 能中间神经元亚结构受损^[18];②GABA 的合成与释放下降;③为了适应缺氧及葡萄糖缺乏的状态,GABA 能中间神经元改变能量代谢途径,消耗 GABA 作为能量底物^[8]。

尽管突触前神经元释放了足够的 GABA,但 GABA 能神经元的信号转导仍存在显著障碍^[18],与本研究结果一致,本研究中 GABA_A 受体(GABRG2)表达在 0~2 h 达到峰值,后显著降低。可能是由于缺氧后 GABA_A 受体活性减低^[16]、GABA_A 受体与配体的结合能力下降所致^[18]。此外,Lan 等^[19]研究发现在兴奋毒性作用的驱动下还可导致 GABA_A 受体解聚及 GABA 能突触位点消除,亦能支持本研究结果。

GAD 是 GABA 合成的关键酶,可作为 GABA 能

神经元的标志物^[12]。GAD65 位于神经末梢,产生用于经典强直神经传递的 GABA,而 GAD67 产生的 GABA 主要在神经元胞体中表达,充当非神经递质在能量代谢中发挥作用,有助于突触发生及氧化还原调节^[3]。本研究中,GAD65 表达在 0~2 h 升高,而 GAD67 在 HIBI 早期低表达,推测这是由于早期 GABA 主要作为神经递质而非能量底物起作用。在 HIBI 后 12~24 h、24~48 h 二者均显著增高,于 48~72 h 恢复至对照组水平,与所观察到的 GABA 后期变化一致。

HIBI 后,GAT 在维持大脑 GABA 稳态中起着至关重要的作用,有助于去除从突触间隙释放的过量 GABA。在中枢神经系统中,GAT1 在新皮质、海马、基底神经节、脑干、小脑、嗅球和视网膜的 GABA 能神经元中高度表达^[20],其信号传导占 GABA 摄取的 75%~80%^[21]。星形胶质细胞表达的 GAT3 对于细胞外间隙 GABA 水平的调控至关重要^[22],在生理条件下 GAT3 以摄取模式工作从而减少细胞外 GABA,然而在某些病理条件下细胞内钠离子浓度升高,GAT 的功能可发生反转从而释放 GABA^[23]。本研究中 GAT1 表达在 2~6 h、6~12 h、24~48 h 下降,而 GABA 的浓度升高,提示 GAT1 未发生功能反转;GAT3 总体呈先上升后降低的趋势,其峰值在 6~12 h,早于 GABA 峰值,推测 GAT3 功能可能发生了反转,导致 GABA 释放增加,这可能是由于神经元中钠离子静息电位较低^[24],而神经胶质细胞钠离子静息电位相对较高的缘故^[25]。在 HIBI 后,Glu 升高并与钠离子共转运,导致细胞内钠离子内流增加从而逆转 GAT3 功能^[23]。

本研究是一项初步观察性研究,在 7.0T 高场强下使用 CEST 成像分析 GABA 动态变化,并结合其受体、合成酶及相关转运体的表达情况,分析 HIBI 后部分能量代谢调节的机制。HIBI 后 GABA 释放增加,而 GABRG2 表达早期即出现下降,说明 HIBI 后 GABA 能信号转导障碍;HIBI 后 GAT3 功能反转与 GAT1 作用相反,提示星形胶质细胞和神经元之间可以通过 GAT 转运和摄取 GABA 为神经元活动提供能量代谢的底物。

[参考文献]

- [1]Chen X, Song Y, Song W, et al. Multi-omics reveal neuroprotection of Acer truncatum Bunge Seed extract on hypoxic-ischemia encephalopathy rats under high-altitude[J]. Commun Biol, 2023, 6 (1): 1001.
- [2]Ji X, Zhou Y, Gao Q, et al. Functional reconstruction of the basal ganglia neural circuit by human striatal neurons in hypoxic-ischaemic injured brain[J]. Brain, 2023, 146(2): 612-628.
- [3]Sears SM, Hewett SJ. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2021, 246(9): 1069-1083.

(下转 167 页)