论著

文章编号:1000-5404(2006)13-1404-03

内毒素预处理对大鼠全脑缺血再灌注脑区一氧化氮合酶的影响研究

向 强[1],文 亮[1],高强国[2],刘明华[1] (第三军医大学:[1]西南医院急救部,[2]基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨内毒素预处理对大鼠前脑缺血再灌注后脑组织诱生型一氧化氮合酶(iNOS),神经型一氧化氮合酶(nNOS)的影响及意义。**方法** 采用大鼠全脑缺血再灌注模型,动态观察大脑皮层、海马、小脑组织中 iNOS、nNOS 的活性及海马 CA1 区神经元计数的变化。**结果** 脑缺血再灌注后大脑皮层、海马、小脑组织中 iNOS 和 nNOS 活性均显著高于正常对照组,缺血前 24 h 经尾静脉注入内毒素衍化物 MPL(20 g/kg)可明显降低再灌注大脑皮层、海马、小脑组织中 iNOS、nNOS 的活性和海马 CA1 区神经元计数下降幅度。**结论** 提示脑缺血再灌注后,大脑皮层、海马、小脑组织中 iNOS、nNOS 活性发生了明显变化,内毒素预处理显著抑制了缺血再灌注后脑组织中 iNOS、nNOS 的活性。

关键词:脑缺血;预处理;内毒素;一氧化氮

中图法分类号:R-332;R345;R743.31 **文献标识码**:A

Effects of endotoxin preconditioning on NOS activity in rat brain after global brain ischemia/reperfusion

XIANG Qiang[1], WEN Liang[1], GAO Qiang-guo[2], LIU Ming-hua[1] ([1]Department of Emergency, Southwest Hospital, [2]Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the effects and significance of endotoxin preconditioning on iNOS activity, nNOS activity in rat cerebral cortex, hippocampus and cerebella region after global brain ischemia/reperfusion. **Methods** Global ischemia for 20 min was made by four-vessel occlusion model (4-vo) in 60 Wistar rats, among which 30 were injected of 20 μg/kg MPL through caudal vein 24 h before model establishment. Another 8 rats undergoing sham operation served as controls. The dynamic change of iNOS activity, nNOS activity and neuron density of the cerebral cortex, hippocampus and cerebella region were observed at 1, 4, 8 h after reperfusion. **Results** The activity of iNOS and nNOS decreased significantly after endotoxin preconditioning in the regions mentioned above, as compared with that of rats only undergoing the ischemia/reperfusion. The neuron number in rat hippocampus decreased after ischemia/reperfusion, but no significant difference was found between control and endotoxin preconditioning groups. **Conclusion** The activity of iNOS and nNOS changed significantly after global brain ischemia/reperfusion. That endotoxin preconditioning decreased iNOS and nNOS activities may be the protective mechanism.

Key words: cerebral ischemia; precohditioning; endotoxin; NOS

内毒素预处理能显著减轻脑缺血后的脑水肿和神经元损伤,新近有报道这一效应可能与中枢神经系统内 NO 的代谢有关,缺血再灌注后 NO 的生成与 NOS 活性密切相关[1,2],内毒素预处理的脑保护效应与 NOS 活性变化是否有关尚不清楚,为此我们采用 4 血管阻断造成全脑缺血再灌注模型,动态观察缺血再灌注后大鼠各脑区 iNOS、nNOS 的活性及 CA1 区神经元计数的变化,以及 MPL 预处理对它们的影响。探讨 MPL 预处理对全脑缺血再灌注后神经元的保护效应及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康成年 Wistar 大鼠 68 只(雌雄不限),体质量(200±20)g,由第三军医大学实验动物中心提供。MPL(美国 RIBI 公司),iNOS、nNOS 放免试剂盒(帮定泰克生物技术有限公司),Beckman L-9800 型液体闪烁计数仪。

1.2 动物模型制作及分组

采用四血管阻断模型,先烧灼双侧翼孔下椎动脉动,次日动物麻醉清醒后夹闭两侧颈总动脉 20 min,形成再灌注。68 只大鼠分为 3 组,缺血组(30 只);MPL 预处理组(30 只),动物全

作者简介:向 强(1972-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事颅脑伤疾病防治方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)13658305436

收稿日期:2005-01-21;修回日期:2006-11-17

脑缺血前 24 h 经尾静脉注入含 MPL 的生理盐水 1 ml（MPL 20 μg/kg），注射时间持续 1 min，24 h 后操作过程同再灌注组；对照组（8 只），模型制作除不夹闭颈总动脉和烧灼椎动脉，24 h 前经尾静静脉注入等量生理盐水外，余同缺血组。

1.3　取材及指标检测

动物达各时相点时，断头取脑，各组按相同时相点（再灌注后 1、4、8 h，每个时相点 10 只）留取大脑皮层，海马，小脑组织分别制备脑组织匀浆，-70℃保存备测。

1.3.1　脑组织 iNOS、nNOS 活性测定　　取匀浆上清液按试剂盒说明，参照 Bredt 方法测定，标本蛋白定量以 Lowry 法[3] 进行。

1.3.2　海马 CA1 区神经元记数　　动物达各时相点时，以 4% 多聚甲醛/PBS 缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.4）经左心室灌注以固定脑组织，灌注后迅速断头取脑，取海马组织作冠状切片（片厚 5 mm），组织块置于同一灌注液中 4 ℃后固定 12 h，再行石蜡包埋切片，片厚 5 μm。切片行尼氏染色，光镜下观察，参照 kirino[4] 法，计算双侧海马 CA1 区神经元数目。取其平均值。

$$\text{神经元数（个/mm）} = \frac{\text{CA1 区正常神经元数（个）}}{\text{CA1 区总长度（mm）}}$$

1.4　统计学处理

实验数据用 SPSS 统计软件包行双因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠脑缺血再灌注不同脑区 nNOS 活性的变化

对照组脑区有较低活性的 nNOS，缺血组再灌注后 1 h 大脑皮层，海马，小脑组织中 nNOS 活性升高，显著高于对照组（$P<0.01$），其中 nNOS 活性在大脑皮层于再灌注后 1 h 达高峰，在海马和小脑均于再灌注后 4 h 达高峰。MPL 预处理组大脑皮层，海马，小脑组织中 nNOS 活性升高水平显著低于缺血组（$P<0.01$），见表 1。

表 1　大鼠脑缺血再灌注不同脑区 nNOS 活性的变化
（nmol · mg^{-1} · min^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

组别	脑区		
	大脑皮层	海马	小脑
对照组（$n=8$）	0.219 ±0.051	0.216 ±0.053	0.247 ±0.038
缺血组（$n=30$）			
再灌注后 1 h	0.607 ±0.036^{a}	0.492 ±0.006^{a}	0.513 ±0.011^{a}
再灌注后 4 h	0.561 ±0.023^{a}	0.674 ±0.028^{a}	0.625 ±0.033^{a}
再灌注后 8 h	0.468 ±0.015^{a}	0.561 ±0.031^{a}	0.567 ±0.026^{a}
预处理组（$n=30$）			
再灌注后 1 h	0.378 ±0.019^{ac}	0.296 ±0.037^{bc}	0.326 ±0.01^{bc}
再灌注后 4 h	0.304 ±0.021^{ac}	0.384 ±0.016^{ac}	0.401 ±0.023^{ac}
再灌注后 8 h	0.266 ±0.048^{bc}	0.317 ±0.026^{ac}	0.375 ±0.030^{ac}

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与缺血组比较

2.2　大鼠脑缺血再灌注不同脑区 iNOS 活性的变化

对照组脑区有较低活性的 iNOS，缺血组再灌注后 1 h 大脑皮层，海马，小脑组织中 iNOS 活性升高，显著高于对照组（$P<0.01$），其中 iNOS 活性在海马和小脑于再灌注后 1 h 达高峰，在大脑皮层于再灌注后 4 h 达高峰。MPL 预处理组大脑皮层，海马，小脑组织中 iNOS 活性升高水平显著低于缺血组（$P<0.01$），见表 2。

表 2　大鼠脑缺血再灌注不同脑区 iNOS 活性的变化
（pmol · mg^{-1} · min^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

组别	脑区		
	大脑皮层	海马	小脑
对照组（$n=8$）	0.142 ±0.013	0.157 ±0.011	0.174 ±0.008
缺血组（$n=30$）			
再灌注后 1 h	0.428 ±0.014^{a}	0.508 ±0.023^{a}	0.497 ±0.018^{a}
再灌注后 4 h	0.475 ±0.016^{a}	0.451 ±0.017^{a}	0.438 ±0.013^{a}
再灌注后 8 h	0.383 ±0.009^{a}	0.396 ±0.012^{a}	0.386 ±0.010^{a}
预处理组（$n=30$）			
再灌注后 1 h	0.216 ±0.007^{ac}	0.314 ±0.013^{ac}	0.288 ±0.014^{ac}
再灌注后 4 h	0.259 ±0.012^{ac}	0.211 ±0.015^{bc}	0.207 ±0.006^{bc}
再灌注后 8 h	0.173 ±0.005^{bc}	0.161 ±0.012^{c}	0.172 ±0.005^{c}

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与缺血组比较

2.3　MPL 预处理对海马 CA1 区神经元计数的影响

对照组海马 CA1 区神经元密度为 227.5 个/mm。缺血组再灌注 168 h CA1 区正常神经元减少，神经元密度为 120.3 个/mm，与对照组差异显著（$P<0.01$）。MPL 预处理组再灌注 168 h，神经元密度为 213.8 个/mm，与对照组比差异不显著（$P>0.05$）。缺血细胞数，MPL 预处理组偶见神径元肿胀、深染固缩呈缺血改变，与缺血组比缺血细胞数显著降低（$P<0.01$）。

3　讨论

近年来研究表明 NO 参与了脑缺血的病理损伤过程，NO 是由 NOS 催化左旋精氨酸而生成的，根据组织中 NOS 活性的高低可判断 NO 的含量，已有多方面证据表明脑缺血再灌注后 nNOS 和 iNOS 产生的大量 NO 对神经细胞具有毒性作用。nNOS 是神经元和小胶质细胞在缺血急性期，NMDA 受体激活 Ca^{2+} 大量内流产生的。iNOS 主要分布于巨噬细胞、炎性中性粒细胞、小胶质细胞和星型细胞等，在缺血、缺氧等激活下诱导 iNOS mRNA 表达。脑缺血及再灌流期由 nNOS 和 iNOS 产生的大量 NO 对神经细胞的毒性作用主要在于：①NO 作为自由基与体内 SOD 竞争超氧化物（O_2^-），由于 NO 与 O_2^- 反应速度比 SOD 清除 O_2^- 的速度快 3 倍，NO 速度与 O_2^- 反应生成硝基过氧化物（$ONNN^-$），$ONOO^-$ 是一种极强的氧化剂，能直接氧化脂质，DNA 及蛋白的疏基，锌/硫中心、铁/硫中心等，造成严重的细胞损伤[5,6]。②NO 通过 NMDA-Ca-NO 通路介导谷氨基的神经毒性作用。③大量生成的 NO 作用于线粒体中含 Fe－S 蛋白的泛醌氧化还原酶，琥珀酸氧化还

原酶等，使它们失活，从而抑制线粒体呼吸功能等[7,8]。④iNOS 诱导生成的大量 NO 还可以加强缺血后脑组织中还氧化物酶-Ⅱ(COX-2)的活性，加剧神经元的损害。抑制脑缺血再灌注后 nNOS、iNOS 活性，减少 NO 的生成，是减轻缺血后神经元损伤的又一途径。本实验结果显示，大鼠全脑缺血再灌注后 3 个脑区 nNOS、iNOS 活性均显著高于正常对照组，经内毒素 MPL 预处理，各脑区 nNOS、iNOS 活性均明显降低。

内毒素 MPL 预处理能明显提高神经元对缺血缺氧的耐受性，本组实验也证实了 MPL 预处理对全脑缺血再灌注后神经元的显著保护作用，并发现 MPL 预处理后大脑皮层，海马，小脑 nNOS 和 iNOS 活性均显著降低，缺血再灌注后 NO 生成减少，这可能是 MPL 预处理脑保护效应的机制之一，但 MPL 通过何种途径降低 nNOS 和 iNOS 活性，尚不清楚。作为药物性预处理的一种新形式，正常人体对 MPL 有良好的耐受性[9]，经过更深入研究，极有可能作为临床心，脑缺血高危人群及高危手术者的预防性用药，以减轻发病后组织，器官的损害，为研究脑缺血再灌注神经元的防护提供了新的思路，但其更深层机制尚需进一步探讨。

参考文献：

[1] PUISIENX F, DEPLANQUE D, PU Q, *et al*. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 389(1): 71-78.

[2] DAWSON D A, FURUYA K, GOTOH J, *et al*. Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide-induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is associated with preservation of microvascular perfusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 19(6): 616-623.

[3] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.

[4] KIRINO T, TAMURA A, SANO K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus[J]. Stroke, 1986, 17(3): 455-459.

[5] SASAKI T, HAMADA J, SHIBATA M, *et al*. Inhibition of nitric oxide production during global ischemia ameliorates ischemic damage of pyramidal neurons in the hippocampus[J]. Keio J Med, 2003, 50(3): 182-187.

[6] GIDDAY J M, SHAH A R, MACEREN R G, *et al*. Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 19(3): 331-340.

[7] ASHWAL S, TONE B, TIAN H R, *et al*. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion[J]. Stroke, 1998, 29(5): 1037-1047.

[8] HOLTZ M L, CRADDOCK S D, PETTIGREW L C. Rapid expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases during post-ischemic reperfusion in rat brain[J]. Brain Res, 2001, 898(1): 49-60.

[9] ZIMMERMANN C, GINIS I, FURUYA K, *et al*. Lipopolysaccharide-induced ischemic tolerance is associated with increased levels of ceramide in brain and in plasma[J]. Brain Res, 2001, 895(1-2): 59-65.

(编辑 汪勤俭)

(上接 1400 页)

2 个月时 TEE 及 TEE 复查发现有 8/26 例(30.76%)左心房血栓消失，其手所有患者血栓均见血栓缩小；3 个月时复查 TTE 及 TEE 发现血栓消失有 18/26 例(69.23%)，所有患者血栓体积明显缩小；此后有 5 例患者未能再随访。6 个月时复查 TTE 及 TEE 所有患者血栓均已消失。随访患者中 3 例出现轻微皮下淤斑(碰撞后所致)，未见其他出血征象，未见动脉栓塞并发症。

3 讨论

本组病例华法林使用平均剂量偏大，以 PT-INR 值 1.5 左右为理想值较为可靠，既能达到快速溶栓的目的，又未见明显出血及其他严重并发症发生。在治疗 2 个月时发现 30% 的患者血栓消失，其手所有血栓均有缩小。3 个月时近 70% 的血栓消失，所有血栓明显缩小。6 个月时除失访的 5 例外所有血栓均消失。本组资料还显示血栓的消失速度与血栓体积大小无明确相关，未发现机化血栓者。我们认为华法林治疗随访中 TTE 检查较可靠，3 个月时大多数血栓已消失，血栓一旦消失即可行 PBMV。随访中 TTE 与 TEE 比较结果基本吻合，特别是在

室性心律者中结果几乎完全一致。此后有室性心律患者行 PBMV 时我们仅行 TTE 检查，未发现栓塞并发症。本组 24 例患者均顺利施行了 PBMV 手术。本研究样本例数偏少，失访大数偏大，其结果有待进一步观察。

关键词：华法林；血栓；球囊扩张术

中图法分类号：R973.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] VAHANIAN A, ACAR J. Mural valvuloplasty: the French experience[M]// Topol E J. Textbook of interventional cardiology. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994: 1206-1225.

[2] 马长生，刘一旭，单建增，等. 二尖瓣狭窄合并左心房血栓患者小剂量华法林口服溶栓首期评价[J]. 中华心血管病杂志，1996，24(4)：285-287.

[3] 杨新宇，黎明江，吕一凡，等. 华法林对二尖瓣狭窄并左心房血栓患者抵凝溶栓的疗效[J]. 中国综合临床，2004，20(11)：972-973.

(编辑 陈聪连)