文章编号:1000-5404(2013)07-0653-04

论著

载脂蛋白E与蛛网膜下腔出血后脑组织中内皮型一氧化氮合成酶表达的关系

曾 春,周 帅,唐 爽,孙晓川 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 探讨载脂蛋白E(apolipoprotein E, apoE)与蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后脑组织中内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)表达的关系。**方法** 采用枕大池注血法构建小鼠蛛网膜下腔出血模型。将30只apoE基因敲除(apoE knock out, apoE KO)鼠和30只apoE基因野生(apoE wild type, apoE WT)鼠均随机抽签分为对照组、蛛血组、干预组,每组10只;对照组为枕大池注射40 μL的生理盐水,蛛血组为枕大池注射40 μL自体尾动脉血,干预组在枕大池注血前6周,每天胃内灌注促进apoE蛋白表达的肝X受体激动剂T0901317 10 mg/(kg·d);RT-PCR和Western blot法分别检测术后12 h各组脑组织中eNOS的mRNA和蛋白表达情况。**结果** 对照组apoE KO鼠及apoE WT鼠eNOS mRNA[(0.823±0.015) *vs* (0.811±0.021)]和蛋白[(0.902±0.038) *vs* (0.875±0.041)]之间的表达无明显差异($P>0.05$);与对照组相比,蛛血组eNOS mRNA和蛋白表达明显降低,且蛛血组内apoE KO鼠eNOS mRNA[(0.411±0.022) *vs* (0.613±0.036)]和蛋白[(0.578±0.061) *vs* (0.694±0.026)]表达较apoE WT鼠更降低($P<0.05$);与apoE WT蛛血组相比,apoE WT干预组eNOS的mRNA(0.796±0.052)和蛋白(0.775±0.062)表达明显增加($P<0.05$),但apoE KO干预组eNOS的表达与apoE KO蛛血组相比无明显差异($P>0.05$)。**结论** apoE与SAH后脑组织中eNOS的表达有关;增加脑组织中apoE的表达能明显促进eNOS的表达增加。

[关键词] 载脂蛋白E;内皮型一氧化氮合成酶;蛛网膜下腔出血
[中图法分类号] R345.9; R394.2; R743.35 [文献标志码] A

Correlation of apoE with cerebral endothelial nitric oxide synthase after subarachnoid hemorrhage in mice

Zeng Chun, Zhou Shuai, Tang Shuang, Sun Xiaochuan (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the association between apolipoprotein E (apoE) and cerebral endothelial nitric oxide synthase (eNOS) after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Thirty apoE knock-out (apoE KO) mice and 30 apoE wild type (apoE WT) mice were randomly and equally divided into 3 groups, control, SAH group and intervention group. Mouse model of SAH were inflicted with injecting 40 μL autologous fresh blood taken from tail arterial blood into magna cysterna, while control group with only normal saline. Intervention group was preconditioned by orally taking of liver X receptor (LXR) agonist T0901317 at dose of 10 mg/(kg·d) in 6 weeks before operation. Expression of eNOS at mRNA and protein levels was detected in the brain tissue by RT-PCR and Western blotting respectively. **Results** There was no significant difference in expression of eNOS mRNA and protein in the control groups of apoE KO and WT mice (mRNA: 0.823±0.015 *vs* 0.811±0.021; protein: 0.902±0.038 *vs* 0.875±0.041, $P>0.05$). Compared with the control groups, the expression of eNOS at mRNA and protein levels was significantly reduced in SAH groups nor matter of KO or WT mice ($P<0.05$), and more significant reduce was found in apoE KO mice (mRNA: 0.411±0.022 *vs* 0.613±0.036, protein: 0.578±0.061 *vs* 0.694±0.026, $P<0.05$). The expression of eNOS at mRNA and protein levels was significantly higher in apoE WT intervention group than apoE WT SAH group (mRNA: 0.796±0.052 *vs* 0.613±0.036, protein: 0.775±0.062 *vs* 0.694±0.026, $P<0.05$), but there was no significant difference between apoE KO intervention group and apoE KO SAH group ($P>0.05$). **Conclusion** apoE is involved in the expression of cerebral eNOS after SAH. Enhancing cerebral apoE

[基金项目] 国家自然科学基金(30973087)
[通信作者] 孙晓川,电话:(023)89011151,E-mail: sunxch1445@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130305.1419.003.html(2013-03-05)

expression significantly promotes the expression of eNOS and thus leads to alleviate cerebral vasospasm after SAH.

[**Key words**] apolipoprotein E; endothelial nitric oxide synthase; subarachnoid hemorrhage

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973087). Corresponding author: Sun Xiaochuan, Tel: 86-23-89011151, E-mail: sunxch1445@gmail.com

脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)严重的并发症之一,但至今对SAH后CVS的分子机制仍未完全阐明。目前大多研究认为SAH后内皮型一氧化氮合酶(endothclialnitric oxide synthase, eNOS)及eNOS源NO分泌减少,是SAH后CVS发生的重要因素之一[1]。近年来个体遗传背景,如载脂蛋白E(apolipoprotein E, apoE)基因与SAH患者预后的相关性研究及其在CVS发生发展中的作用,受到了国内外学者的广泛关注[2-3]。本研究通过构建小鼠蛛网膜下腔出血模型,探讨apoE与脑组织中eNOS表达的关系,旨在为临床防治SAH后CVS提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

apoE基因敲除鼠(apoE knock out, apoE KO,重庆医科大学实验动物中心提供)30只和apoE基因野生鼠(apoE wild type, apoE WT,C57鼠,重庆医科大学实验动物中心提供)30只,体质量45~50 g,均随机抽签分为对照组、蛛血组、干预组,每组10只。若实验时程内有动物死亡,即另补充。实验操作均通过重庆医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

T0901317购自Cayman公司,一抗兔抗鼠eNOS多克隆抗体购自Biovision公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG、Western blot试剂盒购自碧云天公司,RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.3 小鼠SAH模型制作

参照文献[4]的方法,经改良后制作小鼠SAH模型,主要步骤为:10%的水合氯醛腹腔注射麻醉后,小鼠取俯卧位,颈枕交界区备皮、消毒后,注射器取尾动脉60 μL经肝素抗凝的自体血,于颈枕交界区三角形凹陷处穿刺,回抽见脑脊液后,缓慢(约3 min)注射动脉血40 μL,按压注血部位并保持头低位30 min,以使血液广泛分布于蛛网膜池中。对照组仅向枕大池中注射40 μL生理盐水;干预组在注血前6周,参照文献[5]每天胃内灌注促进apoE蛋白表达的肝X受体激动剂T0901317 10 mg/(kg·d),余步骤同蛛血组。

1.4 标本采集

12 h后再次麻醉迅速断头,手术切取枕大池周围1 cm脑组织,用4 ℃ PBS缓冲液100 mL冲洗3次,将标本装入冻存管,编号后置于-80 ℃冰箱保存,用于RT-PCR和Western blot检测。

1.5 RT-PCR检测eNOS mRNA的表达

按照TaKaRa公司总RNA提取试剂盒说明书提取脑组织mRNA,逆转录反应采用ReverTra Dash™ RT-PCR Kit。eNOS引物序列上游:5′-AGCTGGATGAAGCCGGTGAC-3′,下游:5′-CCTCGTGGTAGCGTTGCTGA-3′,产物长度为847 bp;β-actin引物序列上游:5′-GGTCCACACCCGCCACCAGTTC-3′,下游:5′-GGATGCCACAGGATTCCATACCC-3′,产物长度为245 bp。反应产物于1%琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad凝胶成像系统采集图片,Quantity One软件分析计算电泳条带光密度值。

1.6 Western blot检测eNOS蛋白表达

将各组标本依次进行蛋白质提取,定量,取20 μg上样进行SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜。5%脱脂牛奶TBST缓冲液37 ℃封闭1 h,一抗兔抗小鼠eNOS多克隆抗体(1∶300)4 ℃过夜,二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(1∶2 000)37 ℃孵育1 h,加入ECL试剂显色,β-actin表达水平作为内参照。

1.7 统计学处理

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件行t检验。

2 结果

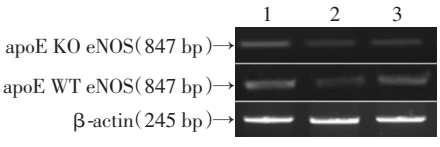
2.1 各组脑组织中eNOS mRNA的表达

对照组apoE KO鼠及apoE WT鼠eNOS mRNA之间的表达无明显差异($P>0.05$);与对照组相比,蛛血组eNOS mRNA表达明显降低($P<0.05$),且蛛血组内apoE KO鼠eNOS mRNA表达较apoE WT鼠降低($P<0.05$);与apoE WT蛛血组相比,apoE WT干预组eNOS mRNA表达明显增加($P<0.05$),但apoE KO干预组eNOS的表达与apoE KO蛛血组相比无明显差异($P>0.05$)。见表1,图1。

表1 各组小鼠脑组织中eNOS mRNA的表达($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

小鼠类型	对照组	蛛血组	干预组
apoE KO	0.823±0.015	0.411±0.022[ab]	0.432±0.077
apoE WT	0.811±0.021	0.613±0.036[a]	0.796±0.052[c]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与apoE WT比较;c: $P<0.05$,与蛛血组比较



1:对照组;2:蛛血组;3:干预组

图1 RT-PCR检测各组小鼠脑组织中eNOS mRNA的表达

2.2 各组脑组织中eNOS蛋白的表达

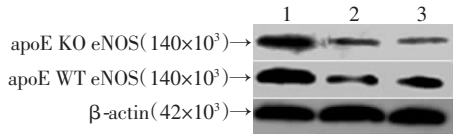
对照组apoE KO鼠及apoE WT鼠eNOS的蛋白之间的表达无明显差异($P>0.05$);与对照组相比,蛛血组eNOS的蛋白表达明显降低($P<0.05$),且蛛血组内apoE KO鼠eNOS的蛋

白表达较 apoE WT 鼠降低($P<0.05$);与 apoE WT 蛛血组相比,apoE WT 干预组 eNOS 的蛋白表达明显增加($P<0.05$),但 apoE KO 干预组 eNOS 的表达与 apoE KO 蛛血组相比无明显差异($P>0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 各组小鼠脑组织中 eNOS 蛋白的表达($n=3, \bar{x}\pm s$)

小鼠类型	对照组	蛛血组	干预组
apoE KO	0.902 ± 0.038	0.578 ± 0.061[ab]	0.541 ± 0.079
apoE WT	0.875 ± 0.041	0.694 ± 0.026[a]	0.775 ± 0.062[c]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 apoE WT 比较;c: $P<0.05$,与蛛血组比较



1:对照组;2:蛛血组;3:干预组

图 2 Western blot 检测各组小鼠脑组织中 eNOS 蛋白的表达

3 讨论

在中枢神经系统内,eNOS 主要分布于神经细胞,血管内皮细胞和血小板,其催化产生的 NO 可使血管平滑肌处于舒张状态。生理情况下,eNOS 和其催化产生的 NO,对于维持血管中等度舒张,抑制血小板聚集等具有重要的作用。一系列国内外研究发现,SAH 后脑内 eNOS 表达异常与 CVS 的发生密切相关。Jung 等[6]通过猕猴 SAH 模型发现,脑脊液中二甲基精氨酸的水平与 CVS 严重程度呈正相关,而二甲基精氨酸是 eNOS 的抑制剂;研究者认为 SAH 后,二甲基精氨酸导致脑组织中 eNOS 合成减少,是 CVS 发生的重要机制之一。本研究发现,小鼠 SAH 蛛血组脑内 eNOS 的表达较对照组明显降低。Khurana 等[7]向犬 SAH 模型脑池中注入编码 eNOS 基因的腺病毒载体后发现,与对照组相比,脑组织中 eNOS 表达增加,CVS 程度减轻。以上研究均表明,eNOS 表达降低是 SAH 后 CVS 发生的重要机制之一。

载脂蛋白 E 是中枢神经系统内最重要的载脂蛋白,主要负责脑内脂质的转运。编码人类 apoE 的基因具有 3 个等位基因,分别是 ε2、ε3 及 ε4,其多态性导致人群中存在 6 种不同的遗传表型。新近研究发现,apoE 在神经系统的生长发育及损伤后的修复过程中发挥了重要作用[8]。不仅如此,研究者们发现 apoE 基因多态性与 SAH 患者预后相关[9-11]。本课题组的前期研究[12]发现, apoE4 等位基因携带者,SAH 后 CVS 更严重,且预后较非 apoE4 等基因携带者差。但是出现这种差异的原因目前仍不甚清楚。

本研究选用 apoE 基因敲除鼠和含有 apoE 基因的野生鼠构建小鼠 SAH 模型,从 apoE 与 eNOS 表达的相关性来探讨 CVS 发生的可能机制。实验结果显示,小鼠发生 SAH 后 12 h,apoE 基因敲除鼠脑组织内表达的 eNOS 明显低于野生鼠,提示 apoE 与 eNOS 的表达密切相关。为了进一步说明 apoE 与 eNOS 的表达的相关性,我们采用能促进 apoE 表达增加的肝 X 受体激动剂 T0901317 进行提前干预。结果显示,预处理后,apoE 野生鼠 SAH 后脑组织内表达的 eNOS 较蛛血组明显增加,但是 T0901317 对 SAH 后 apoE 敲除鼠脑内 eNOS 的表达无明显效应,进一步证实脑内 apoE 含量能影响 eNOS 表达。以上结果进一步提示,促进脑内 apoE 的表达能明显增加 SAH 后脑组织内 eNOS 的表达,这为通过增加脑内 apoE 表达来防治 CVS 的发生、发展提供了实验依据。

新近研究发现,在阿尔茨海默病患者脑组织内,apoE 的表达与同一部位 eNOS 的表达呈正相关,研究者认为这可能是机体的一种保护机制[13],但是这两种蛋白之间的相互调节机制,目前仍不清楚。Yang 等[14]研究发现,缺血再灌注导致 eNOS 合成受阻与 ERK 信号通路受抑制密切关联;我们前期研究发现,神经细胞 apoE 蛋白的合成与 ERK 信号通路密切相关[15-16]。apoE 与 eNOS 之间的相互作用及调控机制是否与 ERK 信号通路有关,以及这两者在 SAH 后脑组织中的动态表达规律,需要进一步研究证实。

参考文献:

[1] 骆杨, 徐善水. 内皮型一氧化氮合成酶与蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛关系的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2012, 17(2): 126-128.

[2] Martinez-Gonzalez N A, Sudlow C L. Effects of apolipoprotein E genotype on outcome after ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006, 77(12): 1329-1335.

[3] Lanterna L A, Ruigrok Y, Alexander S, *et al*. Meta-analysis of APOE genotype and subarachnoid hemorrhage: clinical outcome and delayed ischemia[J]. Neurology, 2007, 69(8): 766-775.

[4] 范议方, 韩如泉. 大鼠蛛网膜下隙出血脑血管痉挛模型的建立[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10(4): 468-472.

[5] 胡厚源, 颜伟, 周林. 肝 x 受体激动剂对高脂载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉壁一氧化氮合酶、增殖细胞核抗原和纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(6): 511-513.

[6] Jung C S, Iuliano B A, Harvey-White J, *et al*. Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg, 2004, 101(5): 836-842.

[7] Khurana V G, Smith L A, Baker T A, *et al*. Protective vasomotor effects of *in vivo* recombinant endothelial nitric oxide synthase gene expression in a canine model of cerebral vasospasm[J]. Stroke, 2002, 33(3): 782-789.

[8] Huang Y, Weisgraber K H, Mucke L, *et al*. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and

effects in Alzheimer's disease[J]. J Mol Neurosci, 2004, 23(3): 189-204.
[9] Lin B, Dan W, Jiang L, *et al*. Association of APOE polymorphism with the change of the brain function in the early stage of aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 110(Pt 1): 39-42.
[10] Tang J, Zhao J, Zhao Y, *et al*. Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of unfavorable outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Surg Neural, 2003, 60(5): 391-396.
[11] Gallek M J, Conley Y P, Sherwood P R, *et al*. APOE genotype and functional outcome following aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Biol Res Nurs, 2009, 10(3): 205-212.
[12] Wu H T, Zhang X D, Su H, *et al*. Association of apolipoprotein E polymorphisms with cerebral vasospasm after spontaneous subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 110(Pt 1): 141-144.
[13] Provias J, Jeynes B. Correlation analysis of capillary APOE, VEGF and eNOS expression in Alzheimer brains[J]. Curr Alzheimer Res, 2011, 8(2): 197-202.
[14] Yang D, Xie P, Liu Z. Ischemia/reperfusion-induced MKP-3 impairs endothelial NO formation *via* inactivation of ERK1/2 pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e42076.
[15] 周帅, 蒋理, 程崇杰, 等. 载脂蛋白E对星形胶质细胞缺氧性损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(20): 2067-2069.
[16] Yin C, Zhou S, Jiang L, *et al*. Mechanical injured neurons stimulate astrocytes to express apolipoprotein E through ERK pathway [J]. Neurosci Lett, 2012, 515(1): 77-81.

(**收稿**:2013-01-17;**修回**:2013-02-04)
(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2013)07-0656-01

肾脏留置输尿管支架缠结的处理

梁高照,汪 清,倪泽称,张 宇 (830000 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院泌尿外二科)

[**关键词**] 输尿管支架;缠结
[**中图法分类号**] R619 [**文献标志码**] B

1 临床资料

2012年3-4月本科治疗了3例肾脏留置单J管体内缠结患者。病例1:男性,25岁,身高165 cm。5年前行左肾切开取石术。2012年3月因"左腰痛发现左肾结石复发"收住我院。行经皮肾镜取石术,碎石顺利。术后单J管同肾盂引流管同时留置于左肾内,放置深度约21 cm。见单J管及肾盂引流管引出清亮尿液后,用丝线固定。术后2周患者入院复查发现固定丝线脱落;肾造瘘管引流通畅,单J管引流欠佳;肾造瘘管顺利拔出,单J管拔出时阻力较大。故急诊行腹部X线片。尝试插入导丝拔除失败,用力拔除阻力较大患者诉剧烈疼痛,给予局麻,切开约0.5 cm切口,食指探查,钝性拔除双J管。

病例2:男性,72岁,身高162 cm。2007年因膀胱癌于我院行腹腔镜下全膀胱根治性切除加输尿管皮肤造瘘术,2012年4月于我院门诊更换双侧单J管,其中左侧置入双J管深度约30 cm,双侧单J管引出清亮尿液。半日后患者因左侧腰区胀痛入院,考虑单J管置入深度过长引起。给予调整左侧单J管长度,拔出约8 cm,随即发现左单J管尿液引出较前缓慢,试探性牵拉感阻力。行透视见单J管缠结。用导丝导入单J管,导入25 cm后遇到阻力,反复推送尝试后,导丝顺利进入5 cm,延导丝调整单J管置入长度,约20 cm。拔出导丝,单J管引流通畅,透视见单J管置入满意。半小时后患者腰区胀痛感消失。

[**通信作者**] 汪 清,电话:(0991)8563851,E-mail:wangqing1570@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130115.1727.008.html(2013-01-15)

病例3:男性,65岁,身高158 cm,2012年4月因膀胱癌行腹腔镜下全膀胱根治性切除加输尿管皮肤造瘘术,术后送ICU留观,12 h后发现右侧单J管引流量明显低于左侧,体检发现右侧单J管固定线撕脱,行床边B超发现:右侧单J管于肾盂内缠结,尝试导丝导入失败,遂入手术室,切开输尿管皮肤吻合口,用输尿管镜探查见单J管缠结于肾盂开口处。在可视下,利用取石钳解开缠结,调整适当导入长度后,左右两侧尿流量正常。

2 讨论

输尿管支架管缠结是较为罕见的并发症,目前报道较少,国外可查到的文献显示仅有13例报道[1]。国内史济洲[2]报道了1例双J管缠。国外报道的缠结位置多分布在上段(11例),其次为中段(1例)和下段(1例);国内报道的缠结位置在上端。国外报道中8例是使用了一种两端设计有多重卷曲可用于身高范围较大患者的输尿管支架管,在肾盂内过长的多重卷曲容易出现缠绕而造成缠结;另外3例,可能的原因是双J管相对过长导致其在肾盂内打卷从而形成缠结或在拔管的运动过程中形成缠结。史济洲[2]报道的1例认为是因为放置过长在拔出的过程中缠绕。本组3例患者缠结都发生在输尿管上端,拔出后测量实际放置的长度分别为21、36、28 cm。若按照常用的双J管长度计算公式:长度=0.125×身高(cm)+0.5 cm[3]计算,本组3例患者理想的双J管长度应该分别为21.125、20.75、20.25 cm。但本组3例患者均为单J管置入,其放置的长度应根据出口位置与输尿管全程的关系作进一步地调整,我们根据患者X线片的比例换算出患者肾盂与皮肤出口间的

(下转687页)