DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.020
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
1168 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)13-1168-04

大鼠缺血性脑损伤早期一氧化氮含量的变化及其细胞来源的研究

李红丽[1],蔡文琴[2],赵士福[3],孙 榆[1] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室;[2]基础医学部神经生物学教研室,重庆 400038;[3]附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 观察缺血性损伤后脑内一氧化氮(Nitric oxide, NO)含量的变化并确定NO的细胞来源。方法 采用短暂性全脑缺血再灌注模型,运用NO生化检测、NADPH-黄递酶组化、免疫荧光双标技术及图像分析等方法。结果 ①脑内NO的浓度于缺血再灌注后12 h后即升高,1~3 d达高峰并持续至第5天,此后逐步下降。②NDP阳性细胞数在缺血再灌注后1 d即达高峰,以颞叶皮质、海马与室周区明显;再灌注14 d后阳性细胞减少或消失。③脑缺血早期(1~3 d)NDP阳性细胞与GFAP免疫荧光阳性细胞少数有共存,仅占10%~15%。结论 缺血性脑损伤早期NO的浓度增高,合成NO的细胞以神经元为主。

关键词:脑缺血再灌注;一氧化氮(NO);胶质纤维酸性蛋白(GFAP);大鼠
中图法分类号:Q592.5;R329.2+6;R743.310.2 文献标识码:A

Changes of NO content and its cell source in rat brain at the early period following ischemic injury

LI Hong-li, CAI Wen-qin, ZHAO Shi-fu, SUN Yu (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the change of nitric oxide(NO) content and explore its cell source following brain ischemic injury. Methods We established the model of transient global brain ischemia/reperfusion (IR) in rat. The concentration of NO and its cell source were investigated by detection of NO content, NDP histochemical staining, double-label technique of immunofluorescence and stereological analysis after brain ischemia. Results (1)The content of NO increased at 12 h and peaked on days 1~3 after IR. The content of NO decreased gradually on the 5th day after IR. (2)The density of NDP positive cells increased and peaked on the 1st day after IR. The positive cells distributed mainly in the temporal cortex, hippocampus and periventricular zone after IR. The positive cells were found to reduce gradually or disappear on the 14th day after IR. (3)Few NDP positive and GFAP immunofluorescence positive cells were found to coexist at the early period of IR(1~3 d). The percentage of coexisting cells was 10%~15%. Conclusion The content of NO increases at the early period after ischemic brain injury. The main cell type to produce NO is neuron.

Key words: cerebral ischemia/reperfusion; nitric oxide; glial fibrillary acidic protein; rats

近年的研究表明神经系统在各种损伤情况下一氧化氮(Nitric oxide, NO)的合成和多种细胞中一氧化氮合酶(NOS)的表达均增加。大多数学者认为参与神经损伤的NO主要通过诱生型NOS(iNOS)催化而来[1],并主要由反应性星形胶质细胞(Astrocyte, AST)表达[2];也有报道认为其来源于损伤局部的炎性细胞中。至今关于脑损伤后NO的细胞来源仍存在很多争论。本实验采用短暂性全脑缺血再灌注模型,运用生化检测、NADPH-黄递酶(NDP)组化染色及NDP组化与胶质原纤维酸性蛋白(GFAP,一种AST特异的识别物)的免疫荧光双标染色等技术,观察缺血性脑损伤早期NO的时空表达规律并确定其可能的细胞来源,为认识缺血性脑损伤的发生机制及其临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 模型建立和标本制备

成年Wistar大鼠35只,雌雄不拘,体质量200~250 g,由本校实验动物中心提供,分为实验组30只,正常对照5只。实验组短暂性全脑缺血再灌注模型按Pulsinelli[3]方法,四血管阻塞

作者简介:李红丽(1968-),女,云南省昆明市人,博士研究生,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail:wenpin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-12-27;修回日期:2003-04-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(阻断双侧颈总动脉、椎动脉), 30 min 后恢复灌流。动物分别在伤后 12 h、1、3、5、7、14 d(每个时相点 5 只)连同正常对照组动物, 麻醉后经心脏灌注生理盐水 150 ml, 再灌注 4% 多聚甲醛 300~400 ml, 取脑, 后固定 4~6 h, 转入 20% 蔗糖磷酸缓冲液(pH 7.4)内 4 ℃过夜, 次日恒冷箱切片, 片厚 25 μm。

1.2　NO 的测定

取正常及伤后各时相点动物, 活取脑, 称重。按 1∶5 加入 0.1 mol/L 冰醋酸钾缓冲液(含 1 mmol/L EDTA), 冰浴匀浆, 超声细胞破碎仪破碎细胞(100 W, 15 s), 4 ℃ 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液检测 NO 的含量。NO 测定按 NO 试剂盒(北京邦定公司)标准操作。以亚硝酸钠为标准品, 制作标准曲线, 按标准曲线所对应方程计算 NO 含量。

1.3　NDP 组化染色

参照伦敦大学 Burnstock 实验室的方法并加以改进, 配制作用液: 0.2 g/L 硝基四氮唑蓝(NBT), 2.7 g/L L-苹果酸, 1.0 g/L β-NADPH(以上购于 Boehringer Mannheim 公司), 0.1% Triton X-100, 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 7.4~7.8)。切片用 TBS 充分漂洗后入作用液中, 于 37 ℃孵育 20~30 min, 用 TBS 漂洗终止反应, 裱片, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片。NDP 组化染色对照实验于作用液中不加 β-NADPH。

1.4　NDP 组化/GFAP 免疫荧光双标染色

GFAP 抗体、免疫荧光组化试剂盒购自博士德(BOSTER)公司, 工作浓度 1∶100。①先行 NDP 组化染色: 切片用 PBS 充分漂洗后入 NDP 作用液中, 37 ℃孵育 20~30 min, 适时终止反应。②切片入 0.01 mol/L 柠檬酸钠溶液(pH 6.0)进行微波修复抗原。入 1%BSA-0.3%TritonX-100, 37 ℃30 min。③一抗(GFAP)孵育, 37 ℃ 2 min, 再转入 4℃ 36 min; 异硫氰酸荧光素标记二抗(IgG/FITC), 37 ℃ 30 min; 甘油封片, 荧光显微镜观察。对照实验用 PBS 代替 GFAP 一抗, 结果为阴性。

1.5　统计学处理

将各时相点皮质(Cortex)、海马(Hip)、室周区(PVZ)的阳性细胞摄入图像分析仪, 用"MDIO 型彩色图像分析系统"软件, 求出单位面积中 NDP 阳性细胞的数目(密度)。结果进行参数估计及单因素方差分析。

2　结果

2.1　脑内 NO 的含量

缺血再灌注术后 12 h, 脑内 NO 的含量[(32.5±6.4) pmol/L] 即升高, 术后 1 d 和 3 d NO 浓度[(54.9±8.4) pmol/mg, (56.7±4.3) pmol/mg] 明显上升, 与正常对照组[(18.9±5.2) pmol/L] 比较差异显著($P<0.01$), 并持续至第 5 天, 之后下降至对照水平。

2.2　NADPH-d 染色结果

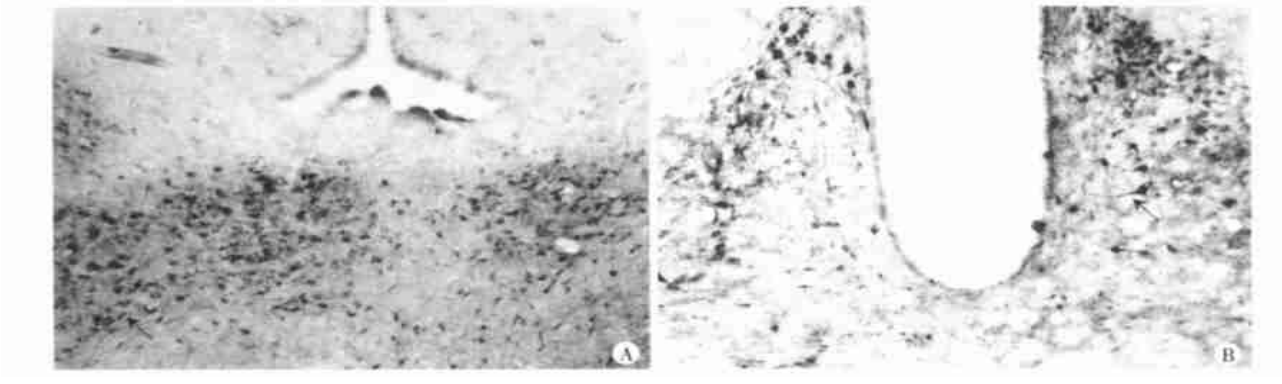
正常大鼠脑皮质 NDP 阳性细胞数目较少, 阳性产物沉淀于胞质中, 突起明显, 海马 CA3 区亦可见少数阳性细胞, 中等大小、深染、突起较长, 室周区及附近区域阳性细胞少而染色浅。缺血再灌注术后 1~3 d, 颞叶皮质、海马 CA3 区 NDP 阳性细胞数目即明显增多, 伴有长突起; 室周区及附近区域增多尤为显著($P<0.01$), 见表 1。阳性细胞多数体积小, 呈圆形或卵圆形, 胞质染色较浅、无突起或仅有一条短突起, 见图 1, 术后 14 d, 室周区及附近区域阳性细胞减少甚至消失。

表 1　脑缺血后不同时相 NDP 阳性细胞图像分析结果(/mm³, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Image analysis results of NDP positive cells at different time points after IR(/mm³, $\bar{x}\pm s$)

Group	Cortex	Hip	Pvz
Control	3.4±1.1	7.8±3.1	29.0±6.7
1 d	10.5±2.1 *	19.4±4.4 **	104.5±21.3 *
3 d	11.0±1.8 *	19.3±2.5 **	101.5±20.9 *
5 d	5.7±8.3	13.7±1.3	60.5±17.8
7 d	4.8±2.7	13.0±1.8	59.2±16.4
14 d	4.4±2.3	11.6±2.7	43.8±10.2

**: $P<0.01$; *: $P<0.05$ *vs* control



A: NDP positive cells around PVZ are found to increase obviously. These cells are stained lightly with only one short processes(↑) (×100);
B: NDP positive cells of paraventricular nucleus increase obviously and long processes can be seen (↑) (×200)

图 1　脑缺血/再灌注早期, NDP 组化染色结果

Fig 1　Results by using NDP histochemistry staining at the early stage following brain ischemia/reperfusion(IR)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 NDP 组化/GFAP 免疫荧光双标染色的结果

NDP 阳性细胞多数体积较大，有短突起形似神经元样；GFAP 荧光阳性细胞呈典型的纤维型或原浆型 AST 状。在脑缺血再灌注后 1、3 d，海马、室周区及附近区域有少数 NDP 组化产物与 GFAP 免疫荧光产物有共存，约占细胞总数 10% ~ 15%；大部分 NDP 阳性细胞不与 GFAP 免疫荧光阳性细胞重叠，见图 2。

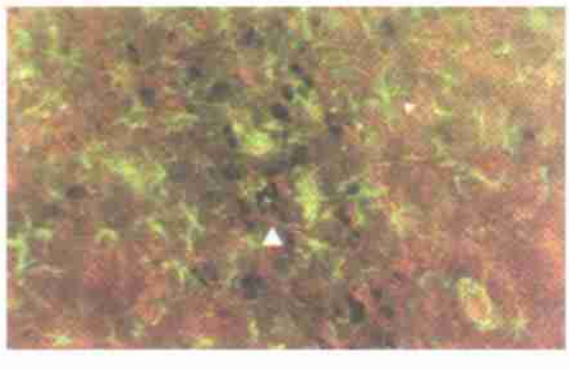


图 2 脑缺血再灌注后 1 天，室周区 NDP 组化阳性细胞(△)与 GFAP 免疫荧光细胞(↑)大部分无共存 (NDP/GFAP 双标染色×400)

Fig 2 One day after IR, few NDP and GFAP immunofluorescence positive cells are found to coexist (NDP/GFAP double-labelling×400)

3 讨论

近年研究表明，短暂性脑缺血可能导致迟发性神经元坏死(Delayed neuronal death，DND)，DND 是造成神经功能缺失，使脑复苏难以成功的主要原因之一。NOS 是 NO 合成的关键酶，自 NDP 被证明即是 NOS 后，NDP 染色便被作为 NOS 阳性细胞的组化标志[4]。目前认为，大量 NO 的产生与释放所引起的神经毒性是导致 DND 的关键[5,6]。Tominage 等运用电子顺磁共振自旋捕捉法直接测定了大鼠局灶性脑缺血区域的 NO，发现缺血 5 min 后 NO 即增加，对照组的 NO 远比缺血组的要低。本实验也显示 NO 在缺血早期(12 h)即增高，很快达高峰，NDP 阳性细胞主要位于海马、室周区及附近区域；持续一段时间后 NO 逐步下降至正常水平，这一结果与文献[7,8]报道相似。

关于神经损伤时 NO 过量产生的具体机制尚不清楚，但多数学者均公认其作用既有益也有害。目前的研究证实，脑缺血早期 NO 合成增加，主要是由于脑缺血导致兴奋性氨基酸的释放，通过激活结构型 NOS，使 NO 生成增加。并通过 NO/cGMP 途径使脑血管扩张、增加脑血流、抗血小板凝集，使缺血局部得到缓解，而对抗缺血性脑损伤，故认为早期 NO 的增多主要起保护作用。此外，缺血组织分泌白介素-1 和肿瘤坏死因子增加，又可激活 iNOS 使其表达增加，生成过量的 NO。NO 通过抑制含铁酶，生成毒性过氧化亚硝酰基离子或羟自由基，介导巯基失活以及影响 DNA 的合成而导致细胞死亡。同时，NO 生成后很快氧化生成 NO_2 和 NO_3，作用于细胞膜上的鸟苷酸环化酶(GC)，使 GC 构象改变，催化 GTP 生成 cGMP。而 cGMP 的大量生成还可导致多巴胺的大量释放，引起强烈的神经毒性，加快神经元的坏死[9]。因此，有效的控制 NO 的产生，则可在一定程度上防治脑缺血或减轻脑缺血损伤的程度。

目前已知 NOS 亚型有 3 大类，即神经元型(nNOS/NOS1)、内皮细胞型(eNOS/NOS3)和巨噬细胞型(mNOS/NOS2)，nNOS 和 eNOS 在正常生理条件下即有表达，因此被称为固有型(cNOS)，而 mNOS 的合成需外界刺激的作用，又称为 iNOS。而 iNOS 一旦生成即连续催化产生 NO 而不受胞内 Ca^{2+} 浓度的影响，因此被认为是病理情况下 NO 的主要来源。近年来已有研究显示某些刺激特别是神经元的受损可引起新的 nNOS 的合成，如大鼠神经轴索横断以后脑内的 nNOS 表达持久上调，可持续 159 d 之久，因此 nNOS 被认为是固有型并不十分确切。本实验中我们运用双标染色技术观察到仅有少数 NDP 组化产物与 GFAP 免疫荧光产物有共存，NDP 阳性细胞多数体积较大，有短突起形似神经元样；GFAP 荧光阳性细胞呈典型的纤维型或原浆型 AST 状，提示脑缺血早期 NO 主要由神经元自身分泌而来，少数由 AST 产生。有学者采用大鼠大脑中动脉阻塞模型研究也发现缺血后可引起脑内 nNOS 表达上调，且 24 ~ 48 h 内为高峰期[10,11]；新生鼠脑缺血再灌注时 NO 的代谢的变化，发现有两个波峰，一个在缺血期，一个在再灌注期，故认为 NO 诱导的神经损伤是一种连锁反应，早期由 nNOS 诱发，以后由 iNOS 引起。当应用 nNOS 抑制剂(如 7-硝基吲唑类)后可减轻神经细胞的损伤、死亡，缩小坏死面积[12]。而敲除 nNOS 基因的小鼠对大脑中动脉阻塞引起的缺血损伤有耐受性，水肿减轻，脑梗死的体积比对照组(野生型鼠)明显减少。这些结果均证实了损伤后神经元自身也是 NO 的重要来源，进一步支持了本实验的结果。总之，病理性 NO 不单是由 iNOS 催化产生，nNOS 作为另一重要的催化酶，在缺血性脑损伤过程中起着不可忽视的作用。

参考文献：

[1] Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury [J]. Trends Neurosci, 1997, 20(3): 132－139.

[2] Endoh M, Maiese K, Wagner J, *et al*. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[J]. Brain Res, 1994, 651(1—2): 92—100
[3] Pulsinelli W A, Buchan A M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation[J]. Stroke, 1988, 19(7): 913—914.
[4] Hope B T, Michael G J, Knigge D M, *et al*. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(7): 2811—2814
[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, 2001, 50(3): 182—187.
[6] 尹昌林, 熊建琼, 张远军, 等. 一氧化氮在全脑缺血再灌注大鼠脑损害中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(7): 670—672.
[7] Kumura E, Yoshimine T, Iwatsuki K I, *et al*. Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats[J]. Am J Physiol, 1996, 270(3): 748—752
[8] Malinski T, Bailey F, Zhang Z G, *et al*. Nitric oxide measured by aporphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1993, 13(3): 355—358.
[9] Lipton S A, Singel D J, Stamber J S. Neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and redox congeners[J]. Ann N Y Acad Sci, 1994, 738(17): 382—387.
[10] Yang C H, Lai H W, Zhan C L, *et al*. nNOS expression of hippocampal neurons in aged rats after brain ischemia/reperfusion and its role in DND development[J]. Chin J Traumatol, 2002, 5(4): 232—236.
[11] Leker R R, Teichner A, Ovadia H, *et al*. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor[J]. Brain Res, 2001, 909(1—2): 1—7.
[12] 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, 2001, 50(3): 182—187.

（编辑 张大春）

文章编号: 1000-5404(2003)13-1171-01

个案与短篇

颅内双原发肿瘤 1 例

A case report of intracranial double originating tumor

童建国[1], 肖 觉[2] （重庆市肿瘤医院: [1] 脑外科; [2] 病理科, 重庆 400035）

患者, 男, 32 岁, 因头疼 1 个月余, 加重伴呕吐 1 周入院, 院前头部 CT 平扫见右额部有一 4.5 cm×4.0 cm 均匀高密度影, 边界清, 其后上内方有 4.0 cm×5.0 cm 不规则混杂密度影, 右额、顶、颞叶大片水肿带, 右侧脑室受压, 中线左偏, 左侧脑室扩大。入院查体见患者一般情况较差, 意识淡漠, 双侧视乳头边界不清。余无明显阳性体征。术前诊断为右额叶胶质细胞瘤。术中见 CT 所示高密度影为右额部与硬脑膜粘连紧密、密度均匀、边界清楚、质地中等、血供来源于硬脑膜的包块, 混杂密度部分为含不成熟血管, 质地不均、无明显边界、大部呈鱼肉状的暗灰色病变组织, 并分别予以切除。术后病理证实所送检标本分别为血管外皮型脑膜瘤和二级星形胶质细胞瘤, 并经免疫组化证实。手术顺利, 术后给以脱水、止血、预防感染及癫痫, 对症处理。恢复顺利, 拆线后行局部放疗, 总剂量 50 Gy。出院时未留任何功能障碍。随防 1 年患者生存质量良好, 未再发作癫痫。

讨论

双原发或多原发肿瘤是指同时发生的起源于不同组织且性质相异的肿瘤, 多出现在腹、胸腔, 尚未见报道发生于颅内者。星形胶质细胞瘤属于神经上皮性肿瘤, 是一种发生在脑或脊髓内的恶性肿瘤一般预后不良[1], 而脑膜瘤是起源于脑膜及脑膜间隙的, 属于良性肿瘤, 完整切除后可治愈。二者的起源、部位、性质、预后均完全不同, 高发年龄也有差异。虽然颅内发生率都较高, 但同时相邻发生在同一患者颅内却甚为罕见[2]。该患者为青年男性, 以颅内压增高表现起病, 病程短, 进展快, 头颅 CT 表现为混杂密度占位, 周围水肿明显。因故未行进一步检查, 术前诊断为胶质瘤, 其中高密度影曾考虑为出血(肿瘤卒中)。我们体会是: ①对不能用一种性质病变解释的颅内占位应考虑双原发或多原发病变可能; ②术前检查尽可能全面, 如增强 CT、MRI、DSA 以鉴别诊断; ③对此类占位的手术方案须考虑周全; ④手术后续治疗(如放疗、化疗)应顾全不同性质病变的需要[3]。至于双原发或多原发肿瘤在病理、病程、临床表现及预后方面的相互作用和影响尚待进一步研究。

关键词: 颅; 双原发肿瘤; 胶质瘤
中图法分类号: R739.41 文献标识码: B

参考文献:

[1] 黄 强, 陈忠平, 兰 青. 胶质瘤[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000. 146—154.
[2] 华积德. 肿瘤外科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995. 1039—1046.
[3] Vokes E E, Golomb H M 著. 张小东 译. 肿瘤治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 627—652.

（编辑 栾 嘉）

作者简介: 童建国(1965—), 男, 湖北省罗田县人, 主治医师, 主要从事颅内肿瘤及颅脑损伤方面的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023)65404554
收稿日期: 2003-02-26; 修回日期: 2003-04-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net