DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.018
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
656 2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)07-0656-04

大鼠不同类型脑损伤后NO表达变化的比较研究

李红丽,蔡文琴,邓晓林,赵士福 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究不同类型脑损伤后NO的表达变化。方法 建立大鼠3种脑损伤模型:脑皮质针刺伤、短暂性全脑缺血/再灌注与模拟低压性脑缺氧(海拔5 000 m),运用NADPH-d组化(NDP)、原位分子杂交、图像分析等方法对3种脑损伤后NO的表达及其细胞来源进行对比观察。结果 ①NDP阳性细胞数在脑皮质针刺伤后第5~7 d达高峰,且主要分布于海马、室周区等处;全脑缺血再灌注后1~3 d即达高峰,以颞叶皮质、海马与室周区明显;高原缺氧仅2 d有一过性增高。②表达NO的细胞以神经元样细胞、胶质细胞样细胞为主,有少数内皮细胞样细胞。结论 3种不同类型脑损伤后NO表达的时空分布存在差异;NO的细胞来源可能有多种。

关键词:一氧化氮;星形胶质细胞;皮质针刺伤;脑缺血;脑缺氧;大鼠
中图法分类号:R651.15 文献标识码:A

Comparative study of NO expressions with different types of brain injury in rats

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

Abstract: Objective To study the changes of NO expression in rats after brain injury. Methods Three types brain injury model were established in rat including cerebral cortex stab wounds, transient global brain ischemia/reperfusion (IR) and brain hypoxia (5 000 m above sea level). The expression of NO and its cell sources were studied with NADPH-d (NDP) histochemistory, iNOS with *in situ* hybridization and image analyzer after the brain injuries. Results NDP positive cells mainly distributed in the hippocampus, the PVZ and increased to its peak in number on 5~7 d after the stab, while in IR group, they mostly located in the temporal cortex, the hippocampus and the PVZ with the peak on 1~3 d after injury. In hypoxia group, a transient increase of the positive cells was found at 2nd d after the injury and then returned to the control level. Most NO was expressed in neuron-like cells, astrocyte-like cells and less in endothelium-like cells. Conclusion After brain injuries, the temporal and spatial distribution of NO were expression are different in different types of injury and the cell type expressing NO might vary.

Key words: nitric oxide; astrocyte; cerebral cortex stab wound; brain ischemia; brain hypoxia; rat

关于一氧化氮(Nitric oxide, NO)在神经损害机制中所扮演的角色,一直存在很多争论,多数学者认为NO的作用是多方面的。最近对局灶性脑缺血的研究表明NO的作用与缺血过程的时段有关,脑缺血早期NO可以扩张血管改善血流,而后期则主要起毒性作用[1]。研究已证实神经系统在各种损伤条件下NO的表达或多种细胞中一氧化氮合酶(NOS)的表达均增加。然而,NO表达是否在不同的脑损伤后均一致或各有差异?文献报道尚少。参与神经损伤的NO一般认为主要由诱生型NOS(iNOS)催化而来[2],主要由反应性星形胶质细胞表达[3],也有报道认为其定位于损伤局部的炎性细胞中,最近则认为多种细胞均可产生。在不同方式脑损伤后表达NO的细胞种类有否不同?也有待进一步研究。本实验建立3种有代表性的脑损伤模型,运用电镜技术、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

作者简介:李红丽(1968—),女,云南省昆明市人,硕士,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68752231

收稿日期:1999-06-25;修回日期:1999-12-08

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

黄递酶(NADPHd)组织化学法和地高辛(Dig)标记 cDNA探针原位分子杂交免疫细胞化学法(ISHI)观察并比较 3 种类型脑损伤后皮质、海马、室周区等处 NO 的表达, NDP 阳性细胞的变化差异及其可能的细胞来源, 为全面认识 NO 在神经损伤中的作用提供实验依据。

1　材料和方法

1.1　模型制备及取材

健康成年 Wistar 大鼠 120 只(雌雄不拘), 体重 200~250 g, 分 4 个组。Ⅰ组(脑皮质针刺损伤组): 用直径 2 mm 去尖端的腰穿针, 以前囟为"0"点, 损伤坐标为 AP= 3.5 mm; L= 2.5 mm; H= 3.5 mm, 留针 5 min。Ⅱ组(短暂性全脑缺血再灌注组): 使用 4 血管阻塞模型, 阻断 30 min 后恢复灌流。Ⅲ组(模拟海拔 5 000 m 低压性脑缺氧组): 动物喂养于持续减压达海拔 5 000 m 的低压舱, 每天 8 h。Ⅳ组(正常对照组)。大鼠伤后均存活 1、3、7、14、30 d 后经心脏灌注生理盐水 150 ml 后再灌注 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 30 μm。

1.2　电镜样本制备

组织块经 3%戊二醛固定后, 1%锇酸后固定(4 ℃ 2 h), 丙酮逐级脱水, 醋酸铀染色, 包埋, 超薄切片行铅染色, JTEM-2000EX 电子显微镜观察。

1.3　NADPH-d 组化染色

参照伦敦大学 Bumstock 实验室的方法配制作用液: 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　原位杂交免疫细胞化学染色

用 Dig 标记的 iNOS 的 cDNA 探针(807 bp) 参照蔡文琴等[4]的步骤进行杂交前、杂交、杂交后处理。抗 Dig 抗体 Fab 段(Boehringer Mannheim 公司产品)的最终工作浓度为 1∶1 000, 以 NBT/BCIP(400 $\mu g \cdot ml^{-1}$/200 $\mu g \cdot ml^{-1}$)反应液显色。原位杂交染色对照实验用不含探针杂交液, 结果均为阴性。

1.5　图像分析及统计学处理

将 4 组中各时相点皮质、海马、室周区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)。结果用医用数理统计程序进行参数估计及单因素方差分析。

2　结果

2.1　电镜观察

脑皮质针刺伤后 1~3 d, 针道周围神经元内可见线粒体嵴不清, 纤维间间隙增大。术后 5~14 d 针道周围神经元内可见线粒体嵴断裂, 呈空泡状; 神经毡内间隙进一步扩大, 出现空泡。全脑缺血再灌注术后 1~3 d, 神经元内线粒体肿胀, 嵴模糊; 多数神经毡肿大, 线粒体消失, 见图 1。术后 5~14 d, 与脑皮质针刺伤后的改变类似。高原脑缺氧 1~3 d 后, 可见少数神经元核固缩, 纤维间间隙增大。高原缺氧 7 d 后则未见显著改变。

2.2　NADPH-d 组化染色, 见表 1

表 1　各组不同时相 NDP 阳性细胞数图像分析结果(n= 120, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Number of NDP positive cell of different groups and time in rat(n= 120, $\bar{x} \pm s$)

Type of wound	Group	1~3 d	5~7 d	10~14 d	30 d	Control
Stab wound	Cortex	4.8±1.8	6.8±1.3 **	6.4±1.5 **	4.8±1.4	3.4±1.1
	Hip	6.0±3.9	14.2±1.9 **	10.8±3.2	8.6±5.3	7.8±3.1
	PVZ	34.2±9.2	91.8±7.3 *	67.0±16.3 *	59.2±16.1 *	29.0±6.7
IR	Cortex	11.0±2.1 **	4.8±2.3	4.4±2.3	5.2±2.4	
	Hip	19.5±5.3	13.4±1.3 **	11.6±2.7	12.0±3.8	
	PVZ	104.7±20.9 *	59.2±16.4 *	43.8±10.2	34.2±6.6	
Hypoxia	Cortex	4.4±2.9	2.6±1.1	3.0±2.4		
	Hip	9.0±2.1	5.8±1.9	6.9±2.6		
	PVZ	38.8±3.2	12.0±4.7	28.2±2.1		

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

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 CA_3 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。脑皮质针刺伤后 1~3 d 上述区域阳性细胞数目及形态与正常对照无显著差别。术后 5~14 d, 海马与室周区内 NDP 阳性细胞数明显增多($P < 0.01$), 染色深浅不一, 突起长短不等, 见图 2。术后 30 d 后仍可见增多的阳性细胞, 数目较 7 d 时有所下降、甚至消失。全脑缺血再灌注组术后 1~3 d, 颞叶皮质、海

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

马 CA_3 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（$P<0.01$），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3，术后 14～30 d，室周区及附近区域阳性细胞减少甚至消失。高原脑缺氧组仅在缺氧 1～2 d 皮质、海马有一过性的阳性细胞增多，多数细胞体积大、分支多、着色深，其余时段与正常对照无显著差异。

2.3 原位分子杂交组织化学染色

脑皮质针刺伤组术后 1～3 d，在伤道周边皮质和室周区有散在的大小不等的阳性细胞，见图4。全脑缺血再灌注组术后 1～3 d 皮质、海马、室周区及附近区域见大小不等，胞浆染为紫蓝色的 iNOS 阳性细胞，大者数目少，核浅染，小者数目较多呈点状，偶见突起。血管内皮细胞也见 iNOS mRNA 的表达。正常组及原位杂交染色对照实验结果均呈阴性。

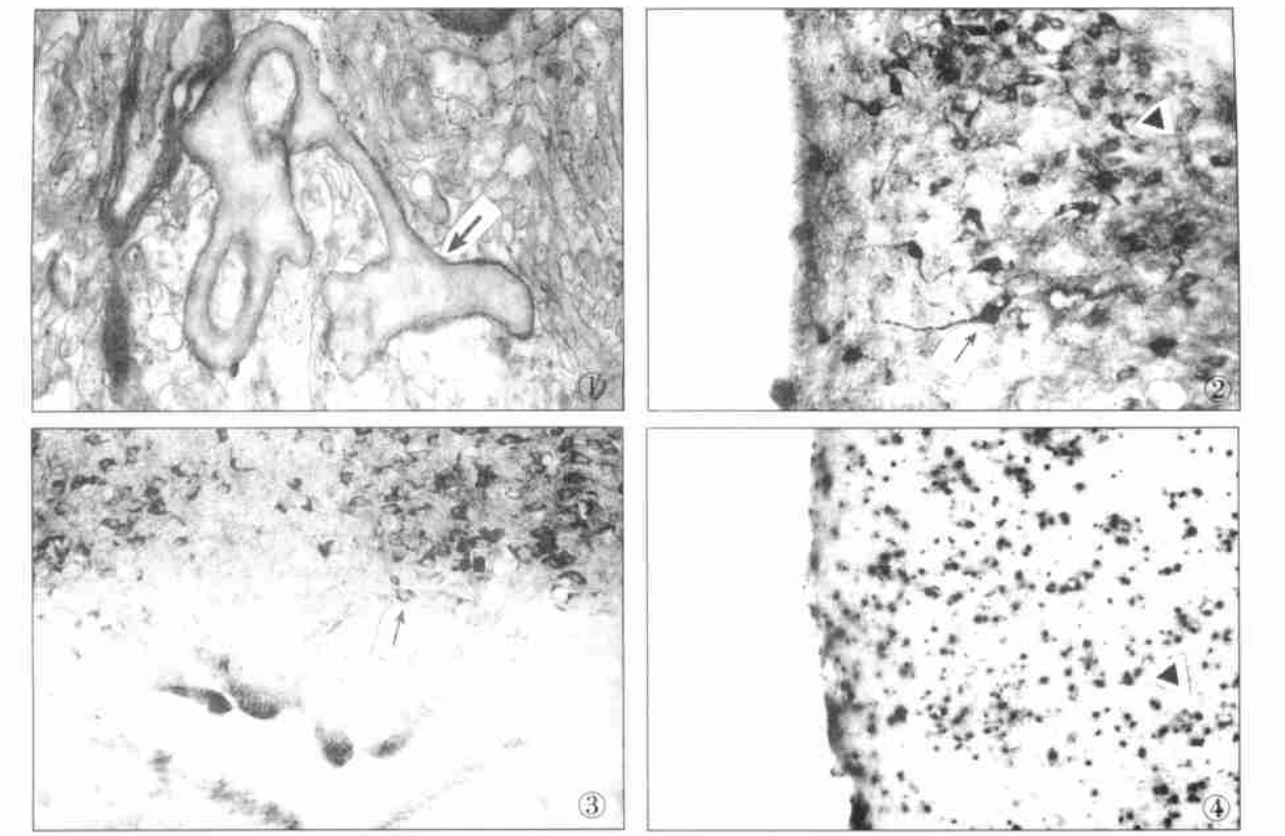


图 1 全脑缺血/再灌注 1 d，神经毡肿大（↑）（TEM× 8 900）

Fig 1 Neuropils swelled and enlarged 1 d after IR（↑）（TEM× 8 900）

图 2 脑皮质针刺伤后 5 d 室周区 NDP 阳性细胞数目增多，突起长（↑）短（▲）不等（NADPH-d× 200）

Fig 2 NDP positive cells of PVZ increased and with long（↑）or short（▲）processes 5 d after stab（NADPH-d× 200）

图 3 全脑缺血/再灌注 3 d 室周区及附近区域 NDP 阳性细胞数目明显增多，胞质浅染，无突起或仅有 1 条短突起（↑）（NADPH-d× 200）

Fig 3 NDP positive cells around PVZ increased obviously 3 d after IR, cells stained lightly with no process or only one short process（↑）（NADPH-d× 200）

图 4 脑皮质针刺伤后 5 d，室周区 NDP 阳性细胞数目增多，突起长（↑）短（▲）不等（ISH× 200）

Fig 4 NDP positive cells of PVZ increased with long（↑）or short（▲）processes 5 d after stab（ISH× 200）

3 讨论

3 种类型脑损伤后，NO 表达的时空分布呈现明显差异。这一现象提示在不同类型脑损伤时 NO 的作用可能是不同的。在脑皮质针刺伤时造成神经元的坏死主要发生在术后早期（1～3 d），且多局限于伤道局部；而 NO 的表达高峰即 NDP 阳性细胞增多则出现在伤后 5～7 d，健侧皮质、海马等也有表达。在相似的脑针刺损伤模型中 Regidor 等[5] 的实验也发现单侧某一部分皮质损伤后早期，同侧及对侧海马、室周区等处有 NDP 阳性细胞的增多，故我们推测此时 NO 的表达并非引起神经元死亡的原因而可能是对损伤的一种反应，生

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

成的 NO 将作为一种内源性的神经保护剂参与后续系列的生物效应如生长轴突的导向[6], 生长因子的产生与创伤的修复等[7]。脑缺血性损伤后, 神经元死亡多是发生在缺血后几天的迟发性死亡, 高峰在 3～7 d, 常是对缺血敏感的区域最为明显, 如海马等处。近年的研究已证实短暂性全脑缺血引起的迟发性神经元死亡主要为一种编程性细胞死亡[8]。这种神经元的凋亡可被肿瘤坏死因子(TNF)诱导抗凋亡蛋白 bcl-2、bcl-x 的合成增多而被抑制[9]。本实验观察到缺血后 1～3 d, 在海马 CA_3 区、室周区等处 NDP 阳性细胞最密集, NO 的增多除了自身的扩血管作用, 还通过抑制血小板凝聚与白细胞粘附改善局部血液循环, 但同时高浓度的 NO 作为一种细胞毒素, 通过多条途径构成对神经组织的损害, 因此推测脑缺血早期表达增多的 NO 可能是造成缺血后神经元迟发性死亡的重要原因之一。是否 NO 还参与脑缺血后其它适应性、保护性反应, 目前文献尚少。在高原(模拟低压性高原 5 000 m)脑缺氧时, 组织中仅发生单个细胞的水肿和死亡, NDP 阳性细胞数目仅在早期有一过性增多, 提示 NO 可能参与了中枢神经系统对外界环境改变的生理调节。如缺氧后脑血管张力的调节等[10]。其确切的功能意义如何, 尚有待研究。

关于脑损伤后 iNOS 的细胞定位目前存在很多争论。iNOS 催化产生 NO 较慢, 且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。本实验采用原位分子杂交染色观察到多数阳性细胞较小呈点状, 偶见突起, 形态上与胶质细胞类似。离体及在体的实验均证实, 由反应性星形胶质细胞产生的 NO 主要参与引起延迟性神经元死亡[3]。故表明脑损伤后胶质细胞参与了 NO 的产生。同时, 也不排除有小胶质细胞存在的可能性。

本实验中我们也观察到, NDP 阳性细胞体积较大, 突起长; 少数为浅染, 胞体小, 无突起或短突起的细胞。原位杂交染色也显示, 同一部位阳性细胞有少数大者, 核区浅染, 形态上似神经元。故推测 3 类脑损伤后均有神经元来源的 NO。最近也有报道[11]认为某些刺激特别是神经元的受损可引起新的神经元型 NOS 的合成, 故损伤后神经元自身也是 NO 的重要来源。此外, 对局灶性脑缺血的研究提示, 由内皮细胞型 NOS(eNOS)催化而来的 NO 在脑缺血早期可迅速扩张脑血管, 对改善脑缺血起到积极的作用。应用分子杂交及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)等检测手段发现, 缺血后 1 h eNOS 的表达增加, 24 h 后则逐步下降。这一结果与我们在脑缺血 1～3 d 后室周区附近少数血管观察到典型的内皮样 eNOS 阳性细胞的结果一致。综上所述, 我们推测本实验中表达 NO 的细胞可能包括了多种类型, 主要有神经元、星形胶质细胞、内皮细胞及小胶质细胞等。但不同类型脑损伤后表达 NO 的细胞的比例如何, 细胞间的相互关系怎样, 均有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 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.

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

[3] Endoh M, Maiese K, Wagner J, *et al*. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia[J]. Brain Res, 1994, 651(1-2): 92－100.

[4] 蔡文琴, 王伯云 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 394－540.

[5] Regidor J, Montesdeoca J, Ramirez-Gonzalez J A, *et al*. Bilateral induction of NADPH-diaphorase activity in neocortical and hippocampal neurons by unilateral injury[J]. Brain Res, 1993, 631(1): 171－174.

[6] Sinz E H, Kochanek P M, Dixon C E, *et al*. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice[J]. J Clin Invest, 1999, 104(5): 647－656.

[7] Wu W. Expression of nitric oxide synthase(NOS) in injury CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry[J]. Exp Neurol, 1993, 120(2): 153－159.

[8] Beilharz E J, Williams C E, Dragunow M, *et al*. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidece for apoptosis during selective neuronal loss[J]. Mol Brain Res, 1995, 29(1): 1－14.

[9] Tamatani M, Che Y H, Matsuzaki H, *et al*. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappa B activation in primary hippocampal neurons[J]. J Biol Chem, 1999, 274(13): 8 531－8 538.

[10] Kumar M, Liu G J, Floyd R A, *et al*. Anoxic injury of endothelial cells increases production of nitric oxide and hydroxyl radicals[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 219(2): 497－501.

[11] Zhang J, Snyder S H. Nitric oxide in the nervous system[J]. Annu Rev Pharmacol, 1995, 35: 213－233.

(编辑　冷怀明)

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