DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.023
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
670 2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0670-03

论著

一氧化氮在全脑缺血再灌注大鼠脑损害中的作用

尹昌林[1],熊健琼[1],张远军[2],文 亮[1] ([1]第三军医大学附属西南医院急救部ICU,重庆 400038;[2]第一军医大学附属南方医院麻醉科,广州 510516)

提 要:目的 探讨一氧化氮在全脑缺血20 min后再灌注大鼠脑损害中的作用。方法 雄性Wistar大鼠84只,体重(220±20)g,随机分为对照组(12只)和缺血组(72只),后者设8、24、48、72、96、168 h 6个时相点。参照Pulsinelli等的方法制作大鼠全脑缺血20 min再灌注模型,于再灌注后8、24、48、72、96、168 h活杀取血及海马组织,对照组施行麻醉及手术,但不缺血,观察72 h后取血及海马组织,测定血清NSE、海马NO含量及海马CA1区锥体神经元(Pyramidal neuron,PN)密度。结果 ①海马NO含量于缺血再灌注后48 h明显升高,72 h达峰值(与对照组比较P均<0.01),以后逐渐下降(96 h仍明显高于对照组水平,$P<0.05$),168 h降至接近对照组;②缺血组各时相点血清NSE含量均显著高于对照组(P均<0.01);③缺血组海马CA1区PN密度呈明显的逐渐减少趋势,自48 h后均明显低于对照组(P均<0.01),再灌注后168 h仅为对照组水平的22.8%;④缺血再灌注后海马NO含量与血清NSE水平的变化呈显著的线性正相关($r=0.9022$,$P<0.01$)。结论 NO在全脑缺血再灌注损伤中起着重要作用,是引起海马CA1区锥体神经元DND发生的主要因素之一。

关键词:一氧化氮;缺血再灌注;脑损害
中图法分类号:R743.31;R619.9 文献标识码:A

Role of nitric oxide in cerebral ischemia reperfusion injury in rats

YIN Chang-lin, XIONG Jian-qong, ZHANG Yuan-jun, WEN Liang (Department of Emergency Service, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the role of nitric oxide (NO) in the brain injury in the rat model of reperfusion 20 min after cerebral ischemia. Methods Eighty-four male Wistar rats (weight 220±20 g) were randomized into control group ($n=12$) and ischemia group ($n=72$). The rats of ischemia group were established with Pulsinelli's method and killed at the time points of 8, 24, 48, 72, 96, 168 h after reperfusion. The neuron specific enolase (NSE) level in serum, the NO content and the pyramidal neuron (PN) density of CA1 area in the hippocampus were determined respectively. Results ①The NO content in the hippocampus increased significantly at the 48th h ($P<0.01$), reached a peak at the 72nd h ($P<0.01$), decreased gradually from the 96th h ($P<0.05$) and fell to the level of control group at the 168th h after reperfusion. ②The NSE level in serum was significantly higher in ischemia group at every time points than in control group ($P<0.01$). ③The PN density in CA1 area of the hippocampus decreased in ischemia group and was significantly lower in this group than in the control ($P<0.01$). It was only 22.8% of that of the control at the 168th h after reperfusion. ④In ischemia group, the NO content in the hippocampus had linear correlation with the change of the serum NSE level ($r=0.9022$, $P<0.01$). Conclusion NO plays an important role in cerebral ischemia reperfusion and is an important factor which contributing to delayed neuronal death in CA1 area of the hippocampus.

Key words: nitric oxide; cerebral ischemia reperfusion; brain injury

全脑缺血再灌注损伤可能与多方面的原因有关[2]。近来研究表明,短暂性脑缺血等打击后多将发生迟发性神经元坏死(Delayed neuronal death, DND)[1],而一氧化氮(Nitric oxide, NO)在脑长时间大量产生与DND的发生密切相关[3],但具体机制尚未阐明。本实验采用Pulsinelli全脑缺血大鼠模型[4],通过检测脑海

作者简介:尹昌林(1970-),男,四川省彭州市人,硕士,医师,助教,主要从事心肺脑复苏方面的研究。电话:(023)65318301-73042

收稿日期:1999-03-28;修回日期:1999-10-15

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

马中 NO 含量、海马 CA1 区 PN 密度及血清中神经元特异性烯醇化酶(Neuron specific enolase, NSE)含量, 探讨全脑缺血再灌注后脑损害的发生与 NO 的关系。

1　材料与方法

1.1　动物模型的复制

雄性 Wistar 大鼠 84 只(第三军医大学动物所提供), 体重(220±20)g, 随机分为对照组(12 只)和缺血组(72 只), 后者设立缺血后 8、24、48、72、96、168 h 6 个时相点, 每点动物 12 只。按 Pulsinelli 等[1] 的方法复制大鼠全脑缺血模型。缺血组于各时相点活杀取血及海马组织; 对照组除不缺血外, 其它处理同缺血组, 观察 72 h 后活杀取血及海马组织。

1.2　指标测定

NSE 的测定: 所获血标本置干燥管中, 2 000× g 离心 10 min, 取血清于干净的 Eppendof 管中, −40 °C保存。NSE 的测定按 NSE 试剂盒(北京邦定公司提供)标准操作, 以 ELISA 法测定。NO 的测定: 随机抽取各时相点达成功标准的动物 6 只, 活杀取脑, 冰浴分离海马, 称重, 按 1∶5 加入 0.1 mol/L 冰磷酸钾缓冲液(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 °C 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液检测 NO 含量。NO 测定按 NO 试剂盒(北京邦定公司提供)标准操作。

1.3　光镜观察

达成功标准的各时相点动物(3～6 只)固定, 4% 多聚甲醛-磷酸盐缓冲液(pH 7.3)经心灌注固定, 取出脑组织置同固定液中 24 h, 石蜡包埋, 于视交叉后 1 mm 冠状切片, 尼氏染色, 光镜下观察海马组织病理变化, 按 Kirino 等[5] 的方法确定海马 CA1 区 PN 密度。

1.4　统计学处理

所有结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 Microsoft Excel 进行方差分析。

2　结果

2.1　海马 NO 含量的变化

缺血组 8、24 h 海马 NO 含量无明显升高, 48～96 h 显著升高, 以 72 h 最明显, 与对照组比较差别显著(48 h 和 72 h $P<0.01$, 96 h $P<0.05$), 之后逐渐降至对照组水平。

2.2　血清 NSE 的变化

缺血组 8 h 后血清 NSE 水平即明显上升, 72 h 达到峰值, 之后逐渐下降, 直到 168 h 仍明显高于对照组水平($P<0.01$)。

2.3　光镜观察结果

对照组海马 CA1 区 PN 排列有序, 密度正常, 无异常的形态学变化; 缺血组 8、24 h 海马 CA1 区 PN 出现轻度细胞肿胀, 其密度与对照组无显著差别($P>0.05$); 48 h 海马 CA1 区 PN 出现明显细胞肿胀和核偏移, 其密度明显下降($P<0.01$), 之后各时相点仍呈继续下降, 到 96 h 后仅残留少数散在的正常 PN 并伴有反应性的胶质细胞出现, 至 168 h CA1 区正常 PN 进一步减少, 仅为对照组水平的 22.8%, 结果见表 1。

表 1　缺血后脑海马 NO 含量、血清 NSE 含量和海马 CA1 区 PN 密度的变化

Tab 1　Changes of the content of NO in hippocampus, plasma NSE level and hippocampal PN density of CA1 subfield in brain after cerebral ischemia-reperfusion

Group	Control	Time after 20 min cerebral ischemia-reperfusion (h)					
		8	24	48	72	96	168
Content of NO (pmol/mg)	19.5±3.7	21.2±2.5	22.5±5.4	52.2±8.1 **	54.5±5.9 **	32.3±6.9 *	19.4±3.7
Plasma NSE level (ng/ml)	6.87±1.8	42.3±11.5 **	69.3±19.7 **	138.3±32.4 **	144.1±32.2 **	87.5±15.2 **	37.8±15.2 **
PN desity of CA1 subfield (mm^{-1})	212±10.5	204.2±7.1	194.3±14.1	140.3±12.5 **	125±15.3 **	62.2±12.3 **	46.5±14.1 **

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

3　讨论

NSE 特异定位于神经元和神经内分泌细胞胞浆内的可溶性蛋白, 分子量约 78 000, 其功能与糖代谢有关。脑缺血后, 缺血区神经元胞膜通透性增加及血脑屏障破坏使血清 NSE 增高, 其增高的程度与脑损害程度呈正相关。

全脑缺血再灌注损伤后 DND 的发生是脑复苏难以成功的主要原因之一。近来有报道大量 NO 的产生与释放所引起的神经毒性是导致 DND 的关键[4]。本实验采用大鼠全脑缺血再灌注模型进行的研究表明: 全脑缺血 20 min-再灌注后 8 h, 反映脑损害发生的 NSE 明显升高, 但到再灌注后 48 h 才出现海马 NO 含量的明显升高及海马 CA1 区 PN 密度显著降低, 说明 NO 并不参与全脑缺血后的早期脑损伤; 但随着再灌注后 48 h 海马 NO 含量明显升高, 海马 CA1 区 PN 密度显著降低, 而血清 NSE 水平也显著升高并达到峰值, 表明 NO 大量而长时间产生引起的神经毒性可能在缺血再灌注损伤后海马 CA1 区锥体神经元 DND 的发生中起重要作用。本实验中全脑缺血后海马 CA1 区锥体细胞的典型 DNA 出现于再灌注后 48～96 h, 与以往的报道一致[2], 而海马 NO 含量升高也出现于 48～96 h, 二者发

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

生的时相同步，说明NO的产生及释放的确与缺血后海马CA1区锥体神经元DND的发生密切相关。

关于NO引起神经元损伤的具体机制目前尚未完全阐明。已有的研究提示NO可能从下述几个方面引起神经元损伤：①抑制线粒体呼吸链导致细胞氧化磷酸化障碍，影响ATP的合成[6]；同时过度激活多二磷酸腺苷核糖合成酶，耗竭细胞能量，最终导致细胞死亡；②扩大NMDA受体介导的神经毒性[7]，同时介导非MDA受体的神经毒性[8]；③作用于转铁核糖核酸还原酶，使ADP核糖化，抑制DNA合成，引起基因毒性[4]；④通过自由基链式反应导致巯基蛋白和脂质过氧化，影响细胞内多种酶和生物膜的功能，使细胞最终死亡。

参考文献：

[1] Pulsinelli W A, Brierley J B, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of trasient forebrain ischemia[J]. Ann Neurol, 1982, 11(4): 491—493.

[2] Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury[J]. Crit Care Med, 1988, 16(9): 947—948.

[3] Dawson V L, Brahmbhatt H P, Mong J A. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures[J]. Neuropharmacology, 1994, 33(11): 1 425—1 426.

[4] Pulsinelli W, Brierley J. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3): 267—269.

[5] Kirino T, Tamura A, Sano K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus[J]. Stroke, 1986, 17(5): 455—457.

[6] Bolanos P, Simon J R, John M, *et al*. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain, differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary culture[J]. J Neurochem, 1995, 64(5): 1 965—1 966.

[7] Sandra J, Judith K, Doug L, *et al*. Potentiation of oxygen-glucose deprivation induced neuronal death after induction of iNOS [J]. Stroke, 1996, 27(9): 1 586—1 588.

[8] Schmidt W, Wolf G, Calka J, *et al*. Evidence for bidirectional changes in nitric oxide synthase activity in the rat striatum after excitotoxically (quinolinic acid) induced degeneration [J]. Neurosci, 1995, 6 712(7): 345—346.

（编辑 冷怀明）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)07-0672-01

^{99m}Tc-热变性红细胞脾显像诊断副脾1例

A case report of spleen imaging with ^{99m}Tc-heat denaturation RBCs in the diagnosis accessary spleen

刘开元，李前伟 （第三军医大学附属西南医院核医学科，重庆 400038）

陈某，女，24岁，1996年因“肝硬化、脾大”行脾摘除，1999年4月再次入院时B超发现左上腹有一5.0 cm×3.7 cm的实质回声。由于患者有不明原因的高血压，因而考虑为：①嗜铬细胞瘤；②副脾。MRI示左肾上极有一5.2 cm×4.2 cm×3.8 cm的软组织块影，疑为副脾，软组织肿瘤待排。体检：一般情况较差，血压20/13 kPa，肝肋下1 cm扪及，质中，无其他阳性体征。实验室检查支持肝硬化诊断，余无其他特殊。行^{99m}Tc-DTPA肾显像，可见左肾外上方有一血供丰富组织，其动态曲线呈高水平线，左肾无受压征象。行^{99m}Tc-DRBC脾显像可见该处有一约6.7 cm×4.3 cm×4.0 cm的强放射性浓聚区，其边缘光滑、规整、核素分布均匀，未见明显肝影显示，故核素显像诊断为副脾。病人出院诊断为：①肝硬化；②脾切除门体分流术后，副脾；③阵发性高血压。

讨论

脾显像分胶体和热变性红细胞两类，因胶体颗粒较小，脾摄取仅5%～10%，用^{99m}Tc-DRBC行脾显像，由于脾可选择性自循环系统清除衰老、变性的红细胞，因而脾脏对其摄取率可达50%～90%[1]，可达到选择性脾显像的目的，对了解脾脏大小、形态及占位情况，以及确定少量的脾组织如移植再生脾、副脾、脾植入，是特别有效的方法，其中自体脾移植术后由于要经过

作者简介：刘开元(1970—)，男，四川省宜宾市人，医师，主要从事临床核医学方面的研究。电话：(023)68754176

收稿日期：1999-09-29；修回日期：2000-02-18

（下转675页）

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