DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.009
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0119-04

大鼠局部脑缺血后 NADPH-d 神经元的变化

史树贵,邵淑琴,陈康宁 (第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要 目的:观察缺血性脑损害中一氧化氮合酶(NOS)神经元的变化规律,探讨一氧化氮(NO)参与缺血性脑损害的机制。方法:采用组织化学染色方法观察大鼠局灶性脑缺血后尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸黄递酶(NADPH-d)阳性神经元的变化规律。结果:大鼠局灶性脑缺血后 NADPH-d 阳性神经元明显增加,缺血 2 h 后出现形态学改变,且以细胞皱缩、胞浆致密为主要死亡方式。结论:NADPH-d 阳性神经元对缺血性损害相对耐受,细胞凋亡可能为其主要死亡方式。

关键词 脑缺血;一氧化氮;一氧化氮合酶;NADPH 黄递酶;大鼠
中图法分类号 R743.31 文献标识码 A

Changes of NADPHd neurons after focal cerebral ischemia in rats

SHI Shu-gui, SHAO Shu-qin, CHEN Kang-nin (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To investigate the changes of NOS-positive neurons following focal cerebral ischemia. Methods: Focal cerebral ischemia was induced in adult Wistar rats with occlusion of right middle cerebral artery. NADPH-diaphorase histochemistry was used to observe the changes of NOS-positive neurons. Results: After ischemia, the number of NOS-positive neurons in the foci was significantly increased and the neurons began to present morphological changes in 2 h after the ischemia. Conclusion: NOS-positive cells are relatively tolerate to ischemic damage and apoptosis is the major manner of their death.

Key words cerebral ischemia; NO; rat

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是具有广泛生物活性的生物介质,由一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸氧化生成,参与调节神经元传递、血管扩张和免疫系统中细胞之间的相互作用。NOS 由神经元性 NOS(nNOS)、内皮性 NOS(eNOS)、诱生性 NOS(iNOS)3 种存在方式,其表达生成的 NO 在神经系统中发挥不同作用。全脑和局部脑缺血后 NOS 活性增加并参与缺血性脑损伤已被公认[1,2],但表达 NOS 的神经元对缺血性损伤的反应如何,目前少有文献报道。本研究通过观察大鼠局部脑缺血后尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸黄递酶(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase, NADPH-d)阳性神经元形态学改变,对此进行了研究。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

雄性 Wistar 大鼠,体重 280~300 g,右侧大脑中动脉闭塞脑缺血模型和入组标准均按我们既往的方法进行[3],设假手术组(分离大鼠右侧颈总、颈内及颈外动脉,结扎颈外动脉并剪断,自颈外动脉残端放入线栓 5 mm,不堵塞大脑中动脉起始部)、缺血 30 min、2 h、6 h、24 h、4 d 组。

1.2 NADPH-d 组化染色

动物经 4%多聚甲醛灌注固定,取脑,20%蔗糖浸泡过夜,冰冻切片厚 20 μm,0.1 mol/L PBS 漂洗,0.3%TritonX-100 的 PBS 孵育后取出加入含 0.1 mg/ml NBT 和 1.0 mg/ml NADPH-d 的作用液中,37℃孵育 45 min,终止染色。

1.3 常规病理切片

脑组织灌注固定后石蜡包埋,切片厚 7 μm,HE 染色。

2 结果

对照组:缺血对侧及假手术组均可见少量 NADPH-d 阳性神经元,这些神经元随机分布于皮层区,可见一些神经元的突触末梢与血管壁紧密相连。NADPH-d 神经元为非锥体的双极或多极神经元,胞膜平滑,带有较长的突起,连续性好;由于 NOS 主要在胞浆表达,因此可见中心淡染区或透亮区,见图 1。在海马,NADPH-d 阳性神经元为一些较小的中间神经元,有多个突起,主要位于齿状回颗粒细胞层的内带,在纹状体区为大的多极细胞,其密度超过皮层的阳性细胞。

缺血 30 min:缺血区 NADPH-d 阳性神经元表达明显增多,细胞形态变化不明显,HE 染色可见细胞轻度水肿,血管周隙改变

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670269)
作者简介:史树贵(1968.11),男,云南省陆良县人,硕士,主治医师,主要从事脑血管疾病及局限性肌张力障碍方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68753786
收稿日期:1999-05-25;修回日期:1999-12-28

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

不明显。

缺血 2 h：病灶区 NADPH-d 阳性细胞皱缩，胞浆浓缩致密，部分细胞中心淡染区消失，胞膜失去其平滑的外形而变得隆凸不平，神经突起断裂、卷曲、螺旋状改变，突触小体扩张，碎裂，上述变化主要发生于纹状体外侧及前额叶皮层，海马神经元无明显受累。HE 染色可见细胞水肿加重，血管周围间隙增大。

缺血 6 h：病灶中心 NADPH-d 阳性神经元明显致密，绝大多数神经元突起断裂，部分突起球形肿胀，神经末梢呈雾状，病灶周边区神经元胞浆轻度致密，突起断裂，见图 2；HE 染色示病灶中心重度水肿，血管周围间隙明显增大，其中可见白细胞浸润、红细胞漏出。

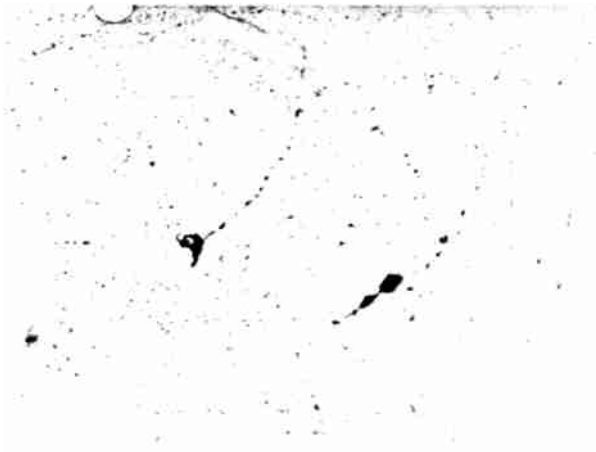


图 1 假手术组，皮层区 **NADPH-d** 神经元胞膜光滑，中心有淡染区，突起连续性好 （×200）

Fig 1 NADPH-d positive neurons with smooth cytomembrane, central light staining and consecutive processes in the cortex of control （×200）



图 2 缺血 **6 h**，病灶中心 **NADPH-d** 阳性神经元胞浆凝集，胞膜隆凸，突起卷曲断裂 （×200）

Fig 2 Post-ischemia 6 h: NADPH-d positive cells with knobby perikaryon, prominent cytomembrane and twist fragment dendrites （×200）

缺血 24 h：NADPH-d 阳性神经元胞浆进一步致密，突起断裂甚至完全消失，个别视野可见 NADPH-d 阳性神经元正在解体，见图 3。HE 染色可见病灶中心坏死，细胞结构模糊不清。

缺血 4 d：病灶中心明显坏死，在病灶周边区域可见胶质细胞反应性增生，毛细血管扩张，内皮细胞、小胶质细胞均可见 NADPH-d 阳性反应，见图 4。

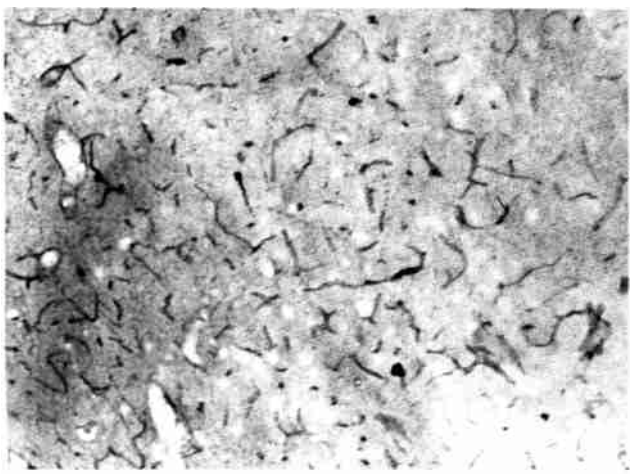


图 3 缺血 **24 h**，**NADPH-d** 阳性细胞胞浆进一步致密，突起消失，其中可见细胞正在解体 （×400）

Fig 3 Post-ischemia 24 h: NADPH-d positive cells with more densed perikaryon and without processes, cells are vanishing （×400）

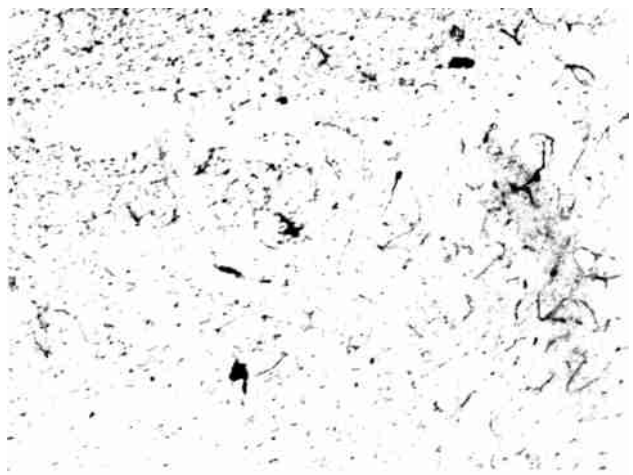


图 4 缺血 **4 d**，病灶周围 **NADPH-d** 阳性细胞胞浆致密，突起卷曲断裂，血管壁染色大量增加 （×100）

Fig 4 Post-ischemia 4 d: NADPH-d positive cells with cornpacted perikaryon and twist fragment dendrites, heavy staining for uessel wall around ischemic center （× 100）

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

3　讨论

3.1　NO 参与缺血性神经元死亡

全脑和局部脑缺血 NOS 表达和 NO 生成增加已有许多文献报道，nNOS 表达所生成的 NO 激活 NMDA 受体从而引起兴奋毒性，是导致缺血早期细胞死亡的主要原因，eNOS 表达产生的 NO 通过增加 rCBF 而减轻缺血性脑损害，具有脑保护作用；iNOS 表达生成的 NO 引起迟发性细胞死亡[4]。此外，我们早期的研究还发现，NOS 表达与脑缺血后细胞凋亡密切相关[3]。各种 NOS 的抑制剂或供体目前已被用于治疗缺血性中风患者。但是，NOS 阳性神经元对缺血的反应直接影响到上述药物的应用。例如，表达 nNOS 和 iNOS 的神经元所生成的 NO 具有细胞毒性作用，但这种作用将持续多久，其本身是否受损及以何种方式死亡；eNOS 表达具有脑保护作用，但表达 eNOS 的细胞本身可能因缺血性损害而死亡等，目前未见系统报道[5]。由于 NOS 与 NADPH-d 活性在 CNS 中 100%共存，且 NADPH-d 组织化学方法能清楚显示细胞形态，因此，我们采用 NADPH-d 组织化学方法代表中枢神经系统中 NOS 活性具有良好的可行性。

3.2　NADPH-d 阳性神经元对缺血的耐受性

脑缺血后 NOS 表达上调，生成 NO 大量增加，由于 NO 脂溶性极强，因此迅速扩散到临近细胞，通过激活 NMDA 受体产生兴奋毒性使细胞死亡，但 NOS 神经元本身对缺血性损害具有耐受性。NO 在损伤临近细胞之前为什么不损伤 NOS 自身细胞，以及 NOS 神经元的耐受性能持续多久，目前尚不明了。本研究发现，大鼠局部脑缺血后 NADPH-d 神经元除数量上增加外，在形态学上随着缺血时间延长发生了改变，主要表现为胞浆逐渐致密，胞膜逐渐失去其平滑的外形而变得凸凹不平，随着缺血进一步加重，胞浆进一步致密、细胞突起断裂、解体，最终整个细胞皱缩消失。这些细胞的死亡高峰在缺血后 24 h 为甚，在病灶中心和周边区均可见。说明 NOS 神经元对缺血易损，这种易损性迟发于细胞坏死，因为缺血 6 h 时病灶中心已有细胞坏死，但 NADPH-d 阳性细胞形态学上仅表现为细胞皱缩，突起卷曲断裂。说明 NOS 神经元对缺血性损伤的耐受性是相对的，可能属于迟发性神经元死亡(DND)。

文献报道脑缺血后细胞死亡有坏死和凋亡 2 种方式。我们以前的研究中亦发现相似的现象，其中细胞坏死的主要表现为早期细胞肿胀，逐渐出现胞膜破裂，整个细胞溶解，坏死，最终被吞噬细胞吞噬；细胞凋亡的主要表现为：胞浆致密，皱缩，逐渐消失即细胞容积的逐渐缩小，辅以其它生化指标或药理学指标如 DNA 梯等[6]。但我们观察局部脑缺血后 30 min 至 4 d，均未发现有 NADPH-d 阳性细胞的水肿、破裂等现象，相反，所有 NADPH-d 阳性细胞均以逐渐皱缩最终消失。说明 NOS 阳性细胞的死亡方式有其独特性，尽管目前细胞凋亡的标准尚不统一，但我们推测 NADPH-d 阳性细胞的死亡方式是以细胞凋亡为主。Lei 等[7]在观察局部注射海人酸(Kainic acid)对 NOS 表达的影响时亦发现了相似的现象。局部脑缺血与脑组织中局部注射海人酸的损伤方式不同，但 NADPH-d 细胞的形态学改变具有惊人的相似之处，NADPH-d 细胞的上述死亡是否为各种损伤方式的最后共同表现尚需进一步研究。细胞坏死早期细胞肿胀的主要原因为缺血缺氧致细胞膜通透性增加引起细胞内钠水潴留所致。NOS 阳性神经元在缺血时不发生细胞肿胀，说明这些细胞内不存在钠、水潴留现象，也即这些细胞在缺血缺氧早期膜的通透性不增加，这可能是 NOS 神经元对兴奋毒性相对耐受的主要原因。

NOS 阳性神经元对缺血耐受的原因可能有：①NOS 细胞本身对缺血缺氧不敏感，其细胞膜对 Ca^{2+} 超载所致的兴奋毒性具有抵抗能力；②NOS 神经元细胞膜上不存在 NMDA 受体；③由于 NOS 表达产生 NO 引发一系列继发事件导致细胞产生耐受能力。线粒体中 Mn-SOD 是 nNOS 神经元对毒性损伤具有选择性抵抗力的主要原因，但研究发现线粒体 Mn-SOD 为 NO 毒性产物 $ONOO^-$ 攻击的主要对象[8]，可能需在 $ONOO^-$ 使 Mn-SOD 完全失活后方可启动 NOS 细胞的自身伤害。NOS 细胞与非 NOS 细胞在线粒体 Mn-SOD 含量上是否存在差异目前未见报道。

参考文献

[1] Matsui T, Nagafuji T, Kumanishi T, *et al*. Role of nitric oxide in pathogenesis underlying ischemia cerebral damage[J]. Cell Mol Neurobiol, 1999, 19(1): 177—189.

[2] Strijbos P J. Nitric oxide in cerebral ischemic neurodegeneration and excitotoxicity[J]. Crit Rev Neurobiol, 1998, 12(3): 223—243.

[3] 史树贵，邵淑琴，陈康宁．大鼠局灶性脑缺血后一氧化氮与细胞凋亡关系的研究[J]．第三军医大学学报，1999，21(4)：249—252.

[4] Amer F S, Dawson T M, Dawson V L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia[J]. Stroke, 1997, 28(6): 1283—1288.

[5] Rosenblum W I. A review of vasomotor responses on the surface

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

of the mouse brain: The necessary prelude to studies using genetically manipulated mice[J]. Microcirculation, 1998, 5(2—3):129—138.

[6] Hockenbery D. Defining apoptosis [comment] [see comments] [J]. Am J Pathol, 1995, 146(1):16—19.

[7] Lei D L, Yang D L, Liu H M. Local injection of kainic acid causes widespread degeneration of NADPH-d neurons and induction of NADPH-d in neurons, endothelial cells and reactive astrocytes[J]. Brain Res, 1996, 730(1):199—206.

[8] MacMillan Crow L A, Crow J P, Kerby J D, *et al*. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic injection of human renal allografts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21):11 853—11 858.

(编辑 刘 鹏)

(上接118页)

在276例患者中,43.1%(119/276)的患者术后能达到完全腭咽闭合, Ⅱ度腭裂患者术后腭咽闭合完全率高于单侧Ⅲ度腭裂患者, 而单侧Ⅲ度腭裂患者术后腭咽闭合完全率高于双侧Ⅲ度腭裂患者,差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。

表3 术后语音状况

	单侧Ⅲ度	双侧Ⅲ度	Ⅱ度	合计
完全腭咽闭合	54	8	59	119
轻度腭咽闭合不全伴轻度鼻漏气	31	7	25	63
明显腭咽闭合不全伴明显鼻漏气	59	24	11	94
合计	142	39	95	276

在发音测验中发现几乎所有的患者都有代偿性不良发音习惯,在发爆破音变为喉闭塞音代偿,发磨擦音和塞擦音时变为由咽磨擦音等代偿,同时把气流漏入鼻腔,使这种代偿性发音听起来仍为一种典型的腭裂过度鼻音。在语音测验时, 我们测验除zh、ch、sh外的所有元音和辅音,因为所有的患者都是四川人,在四川话中的zh、sh、ch是由z、s、c代替的。119例正常腭咽闭合患者发爆破音的平均正常率为31.8%, 代偿性发音的平均出现率为52.3%,发磨、塞擦音的平均正常率为12.7%,低于爆破音的平均正常率,差异有显著性($P<0.01$),而其代偿性发音的平均发生率为83.1%, 高于爆破音的平均发生率(52.3%), 差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

腭裂手术的目的是为了恢复患者的正常语音功能。而正常语音的获得,首先要有完善的腭咽闭合功能,同时配合术后有效的语音训练,纠正代偿性不良语音习惯才能实现。因此,应尽一切努力恢复患者的正常语音功能, 不应将治疗只停留在做手术封闭腭部裂隙上。

从本研究结果可以看出, 所有腭裂患者手术后均有不同程度的语音问题, 近99%的患者都有代偿性不良发音习惯。这种不良语音习惯一旦形成,纠正起来特别困难,造成这么高比例的发音障碍的根本原因是手术年龄太晚[1,2]。虽然有些学者对此观点有不同认识,但大多数学者的研究支持这个观点[3~5]。

手术后能达到完全腭咽闭合的患者只有43.1%, 较国外的一些资料低(60%~80%),原因可能是评价标准略有不同,另外本研究中有22.8%的轻度腭咽闭合不全的患者中不排除有部分患者由于只在术后不久接受过一次语音评价, 而随着生长发育和软腭功能的恢复, 最终也能达到完全腭咽闭合。降低手术年龄除能减少代偿性不良发音习惯的发生外, 是否也能促进术后腭咽功能的恢复和发育从而提高术后完全腭咽闭合的比例,这有待进一步研究证实。

在119例能达到完全腭咽闭合患者的发音测验时发现, 较容易发的爆破音正常率高于较难发的磨、塞音,而代偿性发音率则相反。在患者进行语音治疗的过程中也发现类似规律, 大多数患者学习爆破音较磨、塞擦音容易得多。

4 结论

腭咽闭合是否完全是获得正常语音的基本条件, 再加上专业的语音治疗以及患者和家属的良好合作, 帮助患者恢复正常语音是可能的。由于我国语音病理学尚不健全, 绝大多数患者不能获得专业语音病理学医生的帮助,提早手术年龄,则患者获得正常发音的基本条件就显得更为重要。

关键词 腭裂;语音评价;腭咽闭合

中图法分类号 R782.22 文献标识码 B

参考文献

[1] 夏 田. 唇腭裂语音异常的诊断和处理原则[J]. 华西口腔医学杂志, 1994, 12(4): 266—267.

[2] 王光和 主编. 唇腭裂的序列治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.8—10.

[3] Bardach, Morris H. Multidisciplinary management of cleft lip and palate[M]. Philadelpnia: WB Saundens, 1990. 86—88.

[4] Dorf D, Curtin J. Early cleft palate repair and speech outcome [J]. Plast Reconsr Surg, 1982, 70(1):74—76.

[5] Blijdorp D, Muller H. The influence of the age at which the palate is closed on speech in about cleft palate[J]. J Maxillo-Facial Surg, 1984, 12(4):239—241.

(编辑 冷怀明)

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