DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.05.010

急性脑缺血时大鼠大脑皮质内血管活性肠肽含量的变化

王正品 蔡文琴（组胚教研室）

彭 英 刘兴材（新桥医院 神经内科）

提 要 本实验用阻断大鼠双侧椎动脉及双侧颈总动脉血流的方法，造成大鼠大脑完全性缺血。用放射免疫测定方法分析缺血后10min至60min各时相组动物大脑皮质内血管活性肠肽含量的变化。结果发现缺血各时相组动物皮质内血管活性肠肽明显低于对照组（$P<0.01$）。作者对血管活性肠肽在脑内的分布、代谢和在缺血时含量降低的可能机制及其意义做了讨论。

关键词 大脑皮质；脑缺血；血管活性肠肽；放射免疫测定

脑血管疾病是死亡率最高的疾病之一，其中56.6～80.0%是缺血性脑血管病[1][2]。因此，防治本病已成为各国医务工作者研究的课题。近年来已开展脑缺血时脑内神经肽的研究，成为该领域中的新课题。已有实验证实，在缺血性脑病中阿片肽含量增加，用其受体阻断剂纳络酮治疗病人，获得了一定疗效。因此推测阿片肽参与了脑缺血的神经损害机制[3][4]。血管活性肠肽（Vasoactive Intestinal Peptide；VIP）是脑内重要的血管活性物质之一[5]。在急性脑缺血时，VIP在大脑皮质中含量变化未见有报告。本文利用急性脑缺血的大鼠模型，对大脑皮质内VIP的含量做了放射免疫（RIA）的分析。以探讨大脑皮质缺血性损伤与VIP的关系。

材 料 和 方 法

一、大鼠急性脑缺血模型

取Wistar大白鼠60只，雌雄不分。体重为160～220g。随机分为对照组和缺血组（表1）。缺血组按Pulsinelli方法[6]：（1）阻断颈动脉血流：乙醚麻醉大鼠，颈部正中线切口，游离双侧颈总动脉，用手术线分别环双侧颈动脉扣一松结，线端留在伤口外，缝合伤口。动物于24h后完全清醒，再牵拉线头阻断双侧颈总动脉血流。(2)阻断椎动脉血流：麻醉动物，于枕骨下第1、2颈椎正中线切口，分离肌肉显露第一椎体，用电烙针（直径0.5 mm）插入翼孔，烧灼椎动脉，中断血流（双侧阻断）。（3）脑电图记录。另10只大鼠做假手术，为对照组。

二、样品制备

按表1动物分组取材。将大鼠快速断头，剪开顶颅，取出大脑，置于沸生理盐水中煮4 min，然后剥离双侧大脑皮质，称重。加0.1N盐酸3 ml，于玻璃匀浆器中匀浆。用1N NaOH 0.3ml，0.5mol磷酸盐缓冲液0.7ml加入匀浆液中，最后加PELH缓冲液补至5 ml。3.3×10^3g离心20min，取上清液置于-40℃冰箱中待测定。

三、RIA方法的建立[7]及样品测定

改良氯胺T法制备碘标VIP，用Sep-Pak $c1_8$柱（Waters产）纯化碘标VIP，碘标VIp的放射性强度为131μCi/μg，与VIP抗血清的最大结合率为85.2%（B/T）。VIP抗血清工作浓度1/26000，结合率40.1%（B/T），亲和常数4.52×10^9L/M。常规RIA加样，取样品100μl/管，做样品测定。2%膜包活性炭分离B与F。制做标准曲线，查出测定值，换算成每克湿组织（gwt）中VIP的含量。将对照组测定值与缺血各组测定值进行单因素方差分析，并做显著性检验。

结 果

一、脑缺血动物的表现

阻断椎动脉血流的清醒动物无异常表现。同时结扎双侧颈总动脉后，大多数动物（约75%）在15～30s内失去反应能力，安静平卧，无翻转等动作。少数动物（25%）作1、2次跳翻后，其中部分动物卧倒，处于昏睡状态，另一部分动物表现持续性单肢或四肢抽动，呼吸不平稳。缺血3 min后，动物陆续因呼吸衰竭死亡。绝大多数动物于缺血90min内死亡（室温30～33℃）。对照组动物无上述表现。

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

脑电图波幅降低，慢波增多。

二、缺血时大脑皮质内VIP含量的变化

缺血各时相组大鼠大脑皮质内VIP的含量与对照组相比较，均有非常显著的降低（$P<0.01$）。而缺血后各时相组之间VIP含量的差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表1：

表1 急性脑缺血时大鼠大脑皮质内VIP的含量变化

组别**	测定样本数（N）	$\bar{X}\pm S_{\bar{x}}$ (ng/gwt)	范围 (ng/gwt)	P值*
对照组	10	18.5±2.40	12.6～29.7	
缺血组 缺血10'组	9	9.4±1.73	2.4～16.0	P<0.01
缺血组 缺血20'组	6	8.9±0.73	6.0～11.0	P<0.01
缺血组 缺血30'组	6	5.0±1.26	3.0～ 9.8	P<0.01
缺血组 缺血60'组	9	9.2±1.58	4.2～17.5	P<0.01

* P值为缺血各时相组与对照组测定值统计检验结果。而缺血各组之间的差异无统计学意义（$P>0.05$）。

** 按统计学方法随机分组。

讨 论

本实验脑缺血动物采用Pulsinelli的方法，阻断大鼠双侧椎动脉和双侧颈总动脉，使脑部血供完全中断。缺血后动物的反应及表现与Pulsinelli的结果相一致。脑电图波幅降低，慢波增多。为全脑的完全性脑缺血表现。

对于大鼠大脑皮质内VIP的形态分布，代谢特征和作用方式，已有较多的报告[5][8][9]：免疫细胞化学证实在大鼠脑皮质各层均有丰富的VIP能神经元，Ⅱ—Ⅳ层的VIP能神经细胞数约占皮质细胞数的1%；在每1个皮质细胞柱中至少有1个以上的VIP能神经元分布，即柱状分布（Columnar Distribution）。皮质内VIP能神经元突起主要向皮质Ⅰ层投射，在Ⅱ—Ⅳ层中以末梢纤维为主。软脑膜血管周形成VIP能神经丛。电镜下观察，VIP反应物主要沉积于清亮突触小泡及大颗粒囊泡中。

放免测定及生化分析，大鼠中枢神经内VIP含量以大脑皮质为最高。并证实VIP合成于VIP能神经胞体，经轴突运至神经末梢，在突触小泡中浓度最高。在体或离体条件下，电刺激或去极化药物均可致神经末梢释放VIP。释放的VIP被脑组织中VIP-蛋白水解酶降解，半衰期1～2 min。VIP通过与特异受体结合并激活腺苷酸环化酶，使细胞内c-AMP浓度增高，从而调节该细胞的功能。

因此，VIP在中枢神经系统内为一典型的神经递质。

缺血10min以后，大鼠大脑皮质内VIP明显低于对照组，其机制和意义有待深入探讨。将VIP在大脑皮质的分布、代谢和功能特征与脑缺血后的病理变化结合分析，VIP降低可能具有两方面的原因：（1）皮质内VIP能神经元合成VIP的能力降低或丧失。脑缺血后，脑细胞代谢机能减弱，甚至死亡，此时VIP的合成减少或停止。（2）VIP的释放增加。有资料证实，脑缺血时儿茶酚胺类物质大量释放入血和脑脊液内，使血和脑脊液中含量增加，而脑组织中含量减低[10]。所以，我们初步推测脑组织中VIP的降低可能和儿茶酚胺类物质有着类似的机制。

缺血后脑组织中VIP降低可能有如下意义：（1）在大脑皮质，每一皮质细胞柱中均有VIP能神经元分布，VIP能神经元作为成分之一参与了皮质整体神经反射活动。缺

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

血后VIP能神经元代谢障碍，VIP耗竭，可出现相应的机能障碍。可能为缺血后皮质机能障碍的原因之一。（2）VIP是脑内的血管扩张递质[5]，缺血后VIP降低，可能为缺血后脑血管机能失调不可忽视的原因。（3）纳络酮治疗脑缺血，可以改善症状。其作用机制除了有阻断阿片肽受体作用外，现认为主要是纳络酮增加缺血部位脑细胞代谢活动，而改善症状[11]。不少实验已证实VIP脑内局部注射，可增加脑细胞代谢活动，增加对葡萄糖的利用率[8]。缺血后VIP含量降低，亦可能是脑细胞代谢紊乱的因素之一。

由于脑内神经递质种类繁多，明确脑缺血后脑内多种递质的变化规律和作用机制，对脑血管疾病的防治可能有重要意义。

参 考 文 献

1. Mcleod JG, et al. Introductory Neurology. 1st ed, Singapore: Richard Claypte Ltd 1983: 188
2. Chen DY, et al. In: Wang CC (ed): Neuroepidmiology Research Workshop 1986: 44
3. Hosobuchi Y, et al. Reversal of induced ischemic neurologic deficit in gerbils by the opiate antagonist naloxone. Science 1982; 215: 69
4. Baskin DS, et al. Naloxone reversal of ischemic neurological deficits in man. Lancet 1981; 2: 272
5. Said SI: Vasoactive intestinal peptide. Raven Press, New York. 1982: 149～161
6. Pulsinelli WA and Brierley JB. A new model of bilateral hemspheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke 1979; 10: 267
7. 王正品、蔡文琴。血管活性肠肽的放射免疫测定及其初步应用。第三军医大学学报 1987; 9: 287
8. Rostene WH. Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP). Progress in Neurobiology 1984; 22: 103
9. 同(5), P67; 94; 332; 356
10. Mayer IS, et al. Catacholmine concentration in CSF and plasma of patient with cerebral infarction and hemorrhage. Brain 1973; 96: 277
11. Faden AI. Neuropept ides and stroke: current status and potenial application. Stroke 1983; 14: 169

（收稿：1988.12.6；修回：1989.6.27）

The Observation on the Level of VIP in the Cerebral Cortex of Rat with Bilateral Hemispheric Ischemia

Wang Zengpin, et al. (Department of Histology & Embryology, Third Militay Medical College)

The rat's vertebral and common carotid arteries are obstructed to cause bilateral hemispheric ischemia. Vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat's cerebral cortex following 10～60 min of ischemia is analysed by radioimmunoassay (RIA). In result the level of VIP is significantly lower in the control than the ischemic ($P<0.01$). The distribution and metabolism of VIP in the cerebral cortex and probable mechanism during ischemia are discussed.

Key words: cerebral cortex/BS; cerebral ischemia/BL; vasoactive intestinal peptide/BL; radioimmunoassay

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