

家兔脑缺血再灌注损伤后边缘系统一氧化氮合酶活性的变化及血塞通对其变化的影响

赵 军, 尹逊河*, 梁京芸, 谢有莲, 郭丽红

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘 要: 为了研究家兔脑缺血再灌注损伤后边缘系统一氧化氮合酶(NOS)活性的变化及血塞通对其活性变化的影响, 探讨血塞通对全脑缺血家兔的脑保护作用。选取 3 月龄哈白兔 63 只, 体质量(1 500±150)g, 随机分为脑缺血治疗组、脑缺血未治疗组和对照组 3 组, 手术建立家兔全脑缺血模型, 应用生化检测技术测定脑缺血再灌注后不同时间边缘系统 NOS 活性变化及血塞通对其活性的影响。结果表明, 边缘系统内 NOS 活性在脑缺血再灌注 2 h 后开始升高, 6 h 达到高峰, 随后逐渐下降, 24~96 h 活性持续下降, 120 h 后恢复至正常水平; 脑缺血治疗组下降幅度大、速度快, 在 96 h 即恢复至正常水平。缺血治疗组和正常对照组 NOS 的活性极显著低于缺血未治疗组($P < 0.01$)。结果提示, 血塞通可以通过减弱 NOS 活性进而维持 NO 的生理含量, 对全脑缺血再灌注损伤家兔有明显的脑保护作用。

关键词: 血塞通; 缺血再灌注; 边缘系统; 一氧化氮合酶活性

中图分类号: S859.792

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)10-1312-05

Diversity of Total Activity of Nitric Oxidesynthase and Effect of Xuesaitong on the Diversity in Limbic System with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury of Rabbits

ZHAO Jun, YIN Xun-he*, LIANG Jing-yun, Xie You-lian, GUO Li-hong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: To research the diversity of total activity of nitric oxide synthase(NOS) and effect of Xuesaitong on that diversity in limbic system with cerebral ischemia reperfusion injury of rabbits, and to study the protection of Xuesaitong on cerebral ischemia reperfusion injury of rabbits. Sixty three 3-month-old Harbin White rabbits ((1 500±150)g) were divided in 3 groups: the cerebral ischemia treatment group, the cerebral ischemia untreated group and control group, randomly. The analog of cerebral ischemia were established by operation and the diversity of total activity of NOS and the effect of Xuesaitong on it were determined by the biochemistry technique. The results indicated that the total activity of NOS increased at 2 h after cerebral ischemia treatment reperfusion, increased to the highest at 6 h, and then decreased from 24 h to 96 h, and recovered to normal level at 120 h last. The cerebral ischemia treatment group showed bigger extent to descend, and recovered to normal level at 96 h. The cerebral ischemia treatment group and control group is obviously lower than that in cerebral ischemia untreated group($P < 0.01$). The results suggested that Xuesaitong could protect the brain tissue with cerebral ischemia reperfusion injury of rabbits by decreasing the activity of NOS and maintaining the content of NO.

收稿日期: 2010-02-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671498); 山东省自然科学基金资助项目(Y2003D04)

作者简介: 赵 军(1984-), 男, 山东潍坊人, 硕士生, 主要从事神经解剖学与神经生物学研究, E-mail: junajing1919@163.com

* 通讯作者: 尹逊河, E-mail: xhyin@sdau.edu.cn; xhyin@163.com

Key words: Xuesaitong; cerebral ischemia reperfusion; limbic system; activity of nitric oxide synthase

边缘系统(limbic system, LS)是中枢神经系统最重要的组成部分,由大脑皮质边缘叶、附近的皮质(海马等)以及有关的皮质下结构(下丘脑、丘脑前核、内侧核、中脑被盖内侧区等)组成,其解剖、生理结构都较复杂^[1]。LS内部互相连接同时与神经系统其他部分也有广泛的联系,参与感觉、内脏活动和机体内环境的调节,完成整合运动、个体生存、种族延续,并与精神、情感、睡眠与苏醒、学习、记忆特别是长期记忆等高级神经活动密切相关^[2-3]。其复杂的解剖结构与广泛的生理功能引起了神经生理学、神经病理学、精神病学、心理学等学科工作者们的高度重视,近20多年来人们对它进行了较多的研究。

一氧化氮(Nitric oxide, NO)在体内作为一种重要的信使分子和效应分子,具有强烈的舒张血管、抗血小板聚集及抑制中性白细胞聚集和黏附作用,并且在神经系统的发育,介导神经传递,特别是对于神经元突触的重塑和神经网络的建立具有重要的作用^[4]。机体内的NO是由一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化L-精氨酸(Arg)而生成的,NO的含量与NOS的活性呈正相关。NOS有3种类型:即神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS)。因此,对NOS活性的测定是深入研究NO病理生理作用的重要环节。近年研究发现,NO在脑缺血损伤中发挥重要作用^[5],而血塞通的有效成分三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)对脑缺血损伤有明显的保护作用^[6-7],但是PNS是否对脑缺血再灌注后脑组织中NOS活性有影响以及在家兔脑缺血再灌注情况下,系统、多时相的研究分析脑组织中NO含量及NOS活性变化规律均未见报道。本文在建立家兔全脑缺血模型的基础上,通过测定脑缺血再灌注不同时间后边缘系统中边缘叶、海马、下丘脑NOS活性的变化,观察血塞通对其变化的影响,揭示NO/NOS在脑缺血再灌注损伤中的变化规律,探讨血塞通对全脑缺血的脑保护作用及机制,为神经生理学、病理学等研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 选择健康哈白兔63只,3月龄左右,体质量(1 500±150)g,雌雄不拘,由泰安市

北集坡种兔场提供。

1.1.2 药物与主要试剂 血塞通注射液(主要成分三七总皂苷(PNS),由昆明兴中制药有限责任公司生产);一氧化氮合酶活性测试盒(分型),购自南京建成生物工程研究所(批号:20081114)。

1.2 动物分组及手术造模

健康哈白兔63只,随机分为脑缺血治疗组、脑缺血未治疗组、正常对照组3组,每组21只。试验家兔用20%速眠新注射液(0.2~0.3 mL·kg⁻¹)麻醉,然后将其固定于兔用手术台上,术部除毛,碘酊、酒精消毒,于颈部正中切口,分离双侧颈总动脉,用无创微动脉夹夹闭双侧颈总动脉2 h,此为缺血期;然后撤去双侧动脉夹,缝合切口,分别灌注2、6、24、48、72、96和120 h,即恢复供血形成再灌注。治疗组手术前3 d,根据试验兔体质量,每天腹腔注射血塞通注射液10 mg·kg⁻¹,术后每隔24 h注射药物1次;未治疗组采用与治疗组相同的手术,但手术前和再灌注相同时间后注射同体积的生理盐水;对照组只切开皮肤,不阻断血流。试验流程科学有序,手术时间、注射给药时间和取材时间都进行了严格的确定,保证整个手术过程的完整一致。

1.3 脑组织取材及处理

缺血再灌注完成后行颈动脉放血处死,迅速割头取出完整脑组织,分别取边缘叶、海马、下丘脑3部分,电子天平称重,低温研磨后加冰生理盐水,制备100 mg·mL⁻¹的脑组织匀浆,4℃下3 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液分装并置-20℃冷藏备用。

1.4 一氧化氮合酶活性的测定

采用南京建成生物工程研究所一氧化氮合酶活性测试盒(分型),应用UV-2800型分光光度计测定脑组织中NOS的活性。

1.5 统计学处理

所得数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SAS 9.13统计软件包进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

各组结果见下列各图。

结果显示,整体趋势为边缘系统各脑区NOS活性在脑缺血再灌注2 h后开始升高,6 h达到高

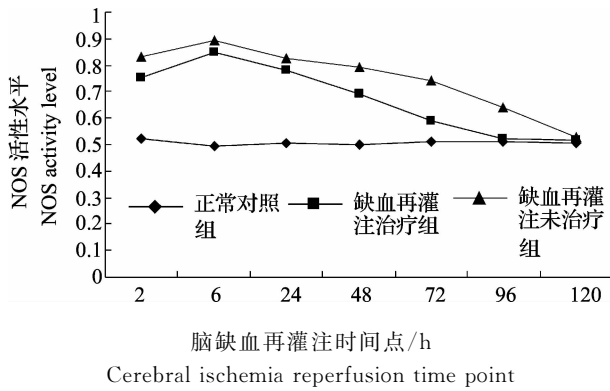


图1 血塞通对家兔脑缺血再灌注后边缘叶 NOS 活性的影响

Fig. 1 Effect of Xuesaitong on the activity of NOS in limbic lobe with cerebral ischemia reperfusion injury of rabbits

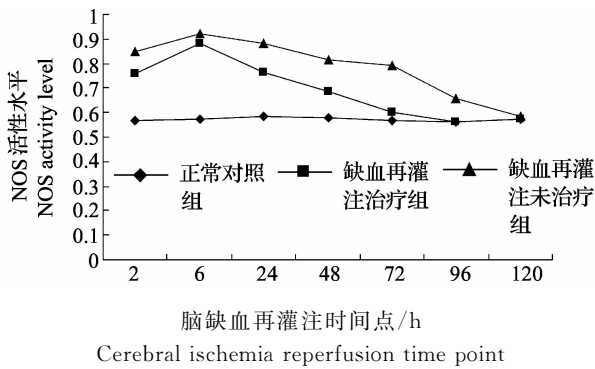


图2 血塞通对家兔脑缺血再灌注后海马 NOS 活性的影响

Fig. 2 Effect of Xuesaitong on the activity of NOS in sea-horse with cerebral ischemia reperfusion injury of rabbits

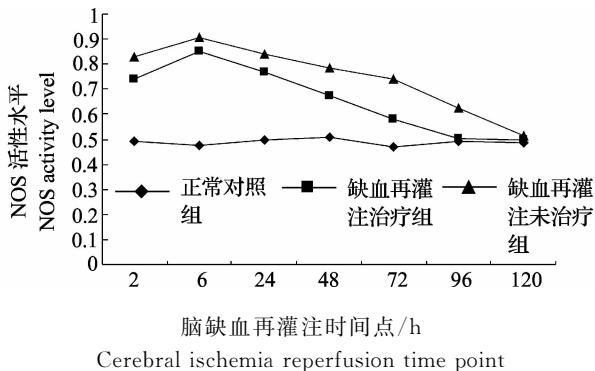


图3 血塞通对家兔脑缺血再灌注后下丘脑 NOS 活性的影响

Fig. 3 Effect of Xuesaitong on the activity of NOS in posterior hypothalamus with cerebral ischemia reperfusion injury of rabbits

比未治疗组下降幅度大、速度快,在 96 h 即恢复至正常水平。脑缺血再灌注治疗组、正常对照组的 NOS 活性与脑缺血再灌注未治疗组差异显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$)。研究表明,生理剂量的 NO 起着生理信息的传递作用和脑保护作用,高浓度的 NO 则具有极强的神经毒性作用,加重脑缺血损伤^[8]。血塞通注射液能显著降低家兔脑缺血再灌注边缘系统 NOS 的活性,对脑缺血再灌注家兔有明显的脑保护作用。未治疗组的 NOS 活性在 120 h 后恢复正常水平,原因是自身体内代谢消耗和过量 NO 本身的反馈调节,但是由于高浓度的 NO 持续时间较长,已经对神经组织造成了可逆或不可逆性的病理损害。

3 讨论

3.1 脑缺血再灌注不同时间兔脑边缘系统 NOS 的活性变化

本试验中家兔脑缺血再灌注未治疗组的 NOS 活性与帅杰等^[9]在大鼠缺血前脑组织 NOS 活性低,缺血 3 h 即有明显升高,再灌注后 NOS 活性升高更加明显,并随再灌注时间延长而逐渐升高,至再灌注 24 h 达高峰,显著高于缺血前活性水平的结果基本一致。脑缺血再灌注血塞通治疗组 NOS 活性在 6 h 后出现明显的降低,提示血塞通的治疗时间窗为 6 h 左右,这与何蔚等^[10]在大鼠的研究结果相一致。

3.2 脑缺血再灌注损伤的机制

脑缺血再灌注损伤是指脑组织经历一定时间的缺血后恢复血流供应,而出现缺血性损伤进一步加重的现象。病理切片可见动脉供血区出现梗死灶,较多神经元出现空泡样变性、坏死,动物则表现为不同程度的神经功能缺损^[11]。脑缺血再灌注后引起组织广泛的炎症反应,细胞外液兴奋性氨基酸,如谷氨酸、天冬氨酸浓度升高。谷氨酸与受体结合,引起钠离子内流,细胞膜去极化,继之开通钙离子通道,膜外钙离子大量流入细胞内;同时胞内钙发生重分布,线粒体等细胞器内钙大量释放,导致细胞内钙离子浓度显著升高,从而激活核酸内切酶和谷氨酰胺转移酶,使核酸断裂和蛋白质交联而致凋亡的发生^[12];同时脑缺血时,由于 ATP 生成减少,细胞色素氧化酶系统功能失调等原因,在再灌注期间产生大量自由基,超过组织的自我清除能力。自由基广泛攻击细胞膜脂、蛋白质、DNA、RNA,诱导 DNA 分子的交联和氧化,DNA 多核苷酸主链断裂,引起

峰,随后逐渐下降,24、48、72 和 96 h 活性持续下降,120 h 后恢复至正常水平;脑缺血再灌注治疗组

细胞凋亡,造成组织损伤^[13]。

3.3 脑缺血再灌注后 NOS 活性变化的原理

脑缺血后 NOS 活性增高可能是由于脑缺血时缺血区兴奋性氨基酸谷氨酸的分泌增多,作用于细胞膜上的丙二醛(NMDA)受体,引起细胞内钙增加,进而激活 cNOS 活性;脑缺血后组织细胞产生细胞因子如 IL-1 β 和 TNF 增多,通过激活 iNOS 活性,使 NO 的生成增加。同时,脑缺血时,由于 ATP 减少,NOS 发生去磷酸化,导致 NOS 活性增加。本次试验结果显示在脑缺血 6 h 后 NOS 活性最高,至于随后 NOS 活性下降可能是由于过量的 NO 本身的反馈调节,可直接抑制 NOS 的活性,或是由于 NOS 中的巯基发生亚硝基化,导致 NOS 失活^[14]。

3.4 NO 参与脑缺血或缺血再灌注病理损伤机理

NO 参与脑缺血或缺血再灌注病理损伤体现为早期 cNOS 作为“生理状态”低表达的神经保护作用 and 晚期 iNOS“病理状态”高表达的神经毒性作用两种不同的倾向。由 nNOS 催化所产生的 NO 参与脑缺血再灌注损伤的过程,其机制可能是 NO 有一个未成对电子,它能与 O₃²⁻ 反应生成 O₂ 和 H₂O₂,还能与 O₃²⁻ 反应生成超氧亚硝酸根离子(ONOO⁻),后者可降解为 OH· 和 NO₂· 自由基,使细胞膜发生脂质过氧化作用,引起强烈的神经毒性,甚至导致神经元死亡;NO 可通过碱基的脱氨基作用损伤 DNA,导致 PARP(聚 ADP 核糖聚合酶)活化,刺激某些死亡基因程序以及脂质过氧化,同时也有直接裂解 DNA 的作用;NO 可与某些亚铁血红素的铁原子结合形成亚硝酰铁络合物,影响到呼吸链的成分,进一步加重脑细胞能量代谢障碍^[15];NO 还可与超氧化物歧化酶结合(SOD),降低了 SOD 的活性,导致组织细胞的损伤^[16-17],由此加重脑缺血再灌注损伤。

3.5 血塞通在脑缺血及再灌注损伤中的作用机制

血塞通在脑缺血及再灌注损伤中的作用机制可能与下列因素有关:PNS 能够抑制胞外钙内流和胞内钙释放来防止细胞内钙离子超载,抑制各种因素激动钙离子所致的平滑肌收缩^[18];使脑组织中及血浆中 N-天冬氨酸(NMDA)显著减少,SOD 活性升高,对黄嘌呤氧化酶(XOD)氧化黄嘌呤产生的氧自由基具有清除作用;能够降低兴奋性氨基酸的毒性作用;改善血脑屏障通透性;改善微循环,增加脑供血,抑制血小板聚集,改善梗死区的血液供应,降低缺血脑组织的钙含量等。

4 结论

血塞通在脑缺血再灌注损伤的中、后期能显著降低边缘系统中 NOS 的活性,降低了 NO 的含量,防止高浓度的 NO 对神经细胞产生毒性作用,从而发挥脑缺血再灌注损伤的脑保护作用。我们认为血塞通注射液能用于脑梗塞、脑缺血、脑血管病后遗症等多种疾病的治疗,而用药的时间窗、最佳剂量及疗程等尚有待进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] SHU S Y, BAO X M. New component of the limbic system: Marginal division of the neostriatum that links the limbic system to the basal nucleus of meynert[J]. *J Neurosci Res*, 2003, 71: 751-757.
- [2] 周绍慈. 情绪及情绪行为研究进展[J]. *心理科学*, 1986, 3(1): 53-58.
- [3] ASTUR R S, TAYLOR L B, MAMELAK A N, et al. Humans with hip pocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual morris water task [J]. *Behav Brain Res*, 2002, 132(1): 77-84.
- [4] 周伟. 缺氧缺血性脑损伤的分子生物学研究进展[J]. *国外医学·儿科学分册*, 1998, 25(1): 33-35.
- [5] 康爱英, 王国庆. 一氧化氮及一氧化氮合酶在兔脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(18): 1721-1722.
- [6] 肖丽娜, 肖凌峰. 血塞通对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *福建中医学学报*, 2008, 18(4): 22-23.
- [7] 马丽焱. 三七总皂苷对脑缺血性损伤的保护作用及其机理的实验研究[D]. 北京: 中国医学科学院, 1997: 10-50.
- [8] FASSBENDER K, FATAR M, RAGOSCHKE A, et al. Sub-acute but not acute generation of nitric oxide in focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2000, 31: 2208-2211.
- [9] 帅杰, 董为伟. 局灶性鼠脑缺血时一氧化氮及一氧化氮合酶抑制剂的作用机制[J]. *中华神经科学杂志*, 1997, 30(4): 227-230.
- [10] 何蔚, 朱遵平. 三七总皂苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有效治疗时间窗研究[J]. *中药材*, 2004, 27(1): 25-27.
- [11] PARMENTIER S, BOHME G A, LEROUET D, et al. Selective -inhibition of inducible nitric oxide synthase prevent sischemic brain injury [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 127(2): 546-552.

- [12] 陈 斌. 缺血性脑损伤机制的研究进展[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2007, 2(3): 55-57.
- [13] 楚 冰, 邵富国. 脑缺血后迟发性神经元死亡及分子机制[J]. 国外医学·脑血管疾病分册, 1999, 7(6): 330-333.
- [14] 葛 贺, 孙 红. 大鼠急性脑缺血再灌注 NO 含量和 NOS 活性变化的实验研究[J]. 医学信息, 2005, 18(8): 957-958.
- [15] HANGAL M, YOSHIMURA N, HIROL K, et al. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Exp Eye Res*, 1996, 63(5): 501-509.
- [16] ECMN J S. The double-edged role of Nitric oxide in brain function and superoxide-mediate injure [J]. *J Dev Physiol*, 1991, 15 (1): 53-59.
- [17] CALDWELL M, ONELL M, EARLEY B, et al. NG-Nitro-L-arginine protects against ischemia-induced increases in nitric oxide and hippocampal neuro degeneration in the gerbil [J]. *Practolarmacol*, 1994, 260(23): 191-200.
- [18] 蒋祁桂, 刘赛林. 血塞通对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡影响的研究[J]. 山西中医, 2007, 2(23): 68-69.

(编辑 朱 绯)

欢迎订阅 2011 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种; 耕作栽培·生理生化; 植物保护; 土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境; 园艺; 园林; 贮藏·保鲜·加工; 畜牧·兽医等栏目。读者对象是国内外农业科研院(所)、农业大专院校的科研、教学人员。

《中国农业科学》中文版影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。1999年起连续 10 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 2001 年入选中国期刊方阵双高期刊; 1999 年获“首届国家期刊奖”, 2003、2005 年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”; 2004-2006 年连续荣获第四、五届全国农业优秀期刊特等奖; 2001 年起 6 次被中信所授予“百种中国杰出学术期刊”称号; 2008 年获中国科技信息研究所“精品科技期刊”称号及武汉大学中国科学评价中心“权威期刊”称号。

《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China)2002 年创刊, 2006 年 1 月起正式与国际著名出版集团 Elsevier 合作, 海外发行由 Elsevier 全面代理, 全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行。2010 年 Agricultural Sciences in China 被 SCIE 收录。

《中国农业科学》中文版大 16 开, 每月 1、16 日出版, 国内外公开发行。每期 224 页, 定价 49.50 元, 全年定价 1188.00 元, 国内统一刊号: CN11-1328/S, 国际标准刊号: ISSN0578-1752, 邮发代号: 2-138, 国外代号: BM43。

《中国农业科学》英文版大 16 开, 每月 20 日出版, 国内外公开发行。每期 160 页, 国内订价 36.00 元, 全年 432.00 元, 国内统一刊号: CN11-4720/S, 国际标准刊号: ISSN1671-2927, 邮发代号: 2-851, 国外代号: 1591M。

邮编: 100081; 地址: 北京 中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电话: 010-82109808, 82106279, 82106283, 82106282, 传真: 010-82106247

网址: www.ChinaAgriSci.com; E-mail: zgnykx@mail.caas.net.cn