

脊髓缺血再灌注损伤时血清及脊髓组织一氧化氮水平的动态变化及意义

巩守平 王文涛 钟大林 吕健 吴锋 车金 僧志远

【摘要】 目的 观察一氧化氮(NO)在脊髓缺血再灌注损伤(SCIRI)时血清及脊髓组织中的变化,探讨其在 SCIRI 中的意义。 方法 采用 Zivin 法建立家兔 SCIRI 模型,动态观察 NO 在血清和脊髓组织中的表达。 结果 血清 NO 在缺血再灌注(IRI)组缺血末期明显上升,IRI 后 2 h 达到峰值,与缺血前比较差异有统计学意义($P<0.05$),IRI 后 6 h、12 h 明显降低,与缺血前及 Sham 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);脊髓组织中 NO 在缺血末期明显升高并达到峰值,缺血再灌注后 2 h、6 h 逐渐下降,与 Sham 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),缺血再灌注后 12 h 下降到 Sham 组水平。 结论 NO 在 SCIRI 后血清和脊髓组织中表达增高,可能在 SCIRI 病理过程神经元损伤与修复中发挥一定作用。

【关键词】 缺血再灌注损伤; 脊髓; 一氧化氮

【中图分类号】 R744.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)02-0118-03

Changes in serum and spinal cord nitric oxide levels in rabbits with spinal cord ischemia-reperfusion injury GONG Shou-ping*, WANG Wen-tao*, ZHONG Da-lin*, LÜ Jian*, WU Feng, CHE Jin, SENG Zhi-yuan*. *Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710004, China

【Abstract】 **Objective** To observe the changes in serum and spinal cord nitric oxide (NO) levels after spinal cord ischemia-reperfusion (IR) injury in rabbits. **Methods** The Zivin method was used to induce spinal cord IR injury in rabbits, in which the NO levels in the serum and spinal cord tissues were observed dynamically. **Results** In rabbits with spinal cord IR injury, the serum NO levels increased gradually after spinal cord IR injury and reached a peak level at 2 h, showing significant difference from the levels of before ischemia ($P<0.05$), and followed by obvious reduction at 6 and 12 h after the injury ($P<0.05$). In the spinal cord tissue homogenate, the NO levels increased significantly to reach the peak level at the end of the ischemia ($P<0.05$), and then decreased obviously at 2 and 6 h to the level comparable to that in the sham-operated group ($P>0.05$). **Conclusions** NO is over-expressed in the serum and spinal cord tissue in rabbits following spinal cord IR injury, and may play a role in neuronal damage and repair in the event of spinal cord IR injury.

【Key words】 Ischemia reperfusion injury; Spinal cord; Nitric oxide

脊髓损害是胸、腹主动脉手术迄今无法完全避免的严重并发症,其术后截瘫发生率为 0.4%~18.0%,甚至高达 40.0%。脊髓损伤的主要原因为主动脉阻断时的脊髓缺血损伤及开放后的脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemia reperfusion injury, SCIRI)^[1,2]。SCIRI 防治与再生修复是现代神经科学的重大难题和研究热点。近年来研究表明,一氧化氮(nitric

oxide, NO)参与了脑、肝脏、心肌、肾、肢体等组织器官缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 的病理生理过程,然而其作用机制目前尚不清楚^[3,4]。本研究旨在观察 NO 水平在家兔 SCIRI 过程血清及脊髓组织中的动态变化,并探讨其变化的意义。

材料和方法

一、试验动物

家兔 40 只,雄性,体质量 1.8~2.2 kg,由西安交通大学医学院动物试验中心提供,动物合格证号: SCXKC(陕 2008-008)。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.02.003

作者单位:710004 西安,西安交通大学医学院第二附属医院神经外科(巩守平、王文涛、钟大林、吕健、僧志远);710061 西安,西安交通大学医学院血液病实验室(吴锋、车金)

二、主要实验仪器和试剂

721分光光度计(上海光谱仪器有限公司),血清、组织 NO 酶法检测试剂盒(均由南京建成生物工程研究所提供),100 g/L 水合氯醛(西安交通大学第二医院药剂科配置)。

三、试验方法

1. 动物分组:实验动物按随机数字表法分五组:假手术组(Sham 组)8 只;缺血组(I 组)8 只;缺血再灌注 2 h 组(IRI 2 h 组)8 只,缺血再灌注 6 h 组(IRI 6 h 组)8 只,缺血再灌注 12 h 组(IRI 12 h 组)8 只。

2. 动物模型制作:参照 Zivin^[9]法建立 SCIRI 模型,具体方法如下:手术当日晨禁饮食,100 g/L 水合氯醛(2 mL/kg 体质量)耳缘静脉麻醉,仰卧位固定,于剑突下 5 cm 腹正中切口开腹,暴露腹腔脏器,探查腹腔,钝性分离暴露腹主动脉,紧靠左肾动脉分支下方约 1 cm 处用无损伤动脉夹夹闭腹主动脉,证实钳夹点以下腹主动脉搏动完全消失后开始计时,缺血 45 min 时松开动脉夹实现血流再灌注,逐层关腹。术中用温盐水纱布敷盖腹腔脏器,监测呼吸、心跳、下肢氧饱和度。Sham 组只进行手术操作,不夹闭腹主动脉。I 组缺血 45 min 时处死。术中术后肛温维持在 36~37 °C,动物苏醒后常规喂食饮水,保温。

四、标本采集及处理

1. 血液标本的采集及处理:Sham 组与 IRI 组分别于缺血前即刻、缺血 45 min、再灌注后 2 h、6 h、12 h 自耳动脉采血 2 mL,制备血浆,严格按血清 NO 检测试剂盒说明书检测并计算血浆 NO 浓度。

2. 脊髓标本的采集及处理:I 组于缺血 45 min, IRI 2 h 组于再灌注 2 h, IRI 6 h 组于再灌注 6 h, Sham 组和 IRI 12 h 组于再灌注 12 h 再次麻醉动物,打开椎板,取脊髓 L_{4,5} 段,生理盐水冲洗,吸干,-70 °C 液氮保存。用 4 °C 冰生理盐水制成 10% 匀浆,按照组织 NO 检测试剂盒说明书进行。具体如下:用硝酸还

原酶特异地将 NO³⁺ 还原为 NO²⁺,通过检测血清 NO³⁺ 和 NO²⁺ 之和反应体内 NO 水平,使用波长 540 nm 比色测定,分别读取测定管和标准管的吸光度值(A),按下式计算:测定管 A/标准管 A×100=标本 NO 含量(μmol/L)。

五、统计学处理

采用 SPSS15.0 进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用重复测量方差分析和单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、血清 NO 的变化

各组间血清 NO 含量在缺血前比较差异无统计学意义。Sham 组和 I 组在缺血 45 min 时明显升高,与缺血前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);IRI 组缺血 45 min、缺血再灌注 2 h、6 h、12 h 血清 NO 明显增高,与缺血前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且 2 h 达到高峰,6 h、12 h 逐渐下降,但与 Sham 组 12 h 时比较差异仍有统计学意义($P < 0.05$)。(表 1)

二、脊髓组织 NO 变化

各组脊髓组织 NO 含量分别为 Sham 组 (26.59±8.50) μmol/L、I 组(132.44±42.50) μmol/L、IRI 2 h 组(78.56±32.80) μmol/L、IRI 6 h 组(44.86±9.60) μmol/L、IRI 12 h 组(28.11±6.30) μmol/L,各组差异有统计学意义($F=25.702, P=0.000$),其中 I 组、IRI 2 h 组、IRI 6 h 组与 Sham 组比较,脊髓组织 NO 含量明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 IRI 12 h 组降到 Sham 组水平。

讨 论

SCIRI 是临床常见问题,其发生原因一是无灌注引起的组织缺血缺氧损伤,二是再灌注引起的继

表 1 各组不同时间点血清 NO 的变化($\bar{x} \pm s$, μmol/L)

Tab.1 Changes in serum NO levels in rabbits after the spinal cord IR injury (Mean±SD, μmol/L)

组别	例数	缺血前即刻	缺血 45 min	缺血再灌注 2 h	缺血再灌注 6 h	缺血再灌注 12 h	F 值	P 值
Sham 组	8	96.98±28.40	117.24±56.60 ^a	101.50±28.40	105.37±36.35	98.36±35.44	8.192	0.000
I 组	8	95.15±32.94	124.94±30.50 ^{ab}	-	-	-	9.753	0.000
IRI 2 h 组	8	96.96±30.92	135.17±35.31 ^{ab}	167.76±35.06 ^{ab}	-	-	12.491	0.000
IRI 6 h 组	8	97.98±31.88	139.92±34.15 ^{ab}	172.61±23.86 ^{ab}	142.86±35.36 ^{ab}	-	14.195	0.000
IRI 12 h 组	8	94.22±41.90	120.53±29.08 ^{ab}	175.50±36.57 ^{ab}	139.94±33.24 ^{ab}	135.69±25.80 ^{ab}	15.382	0.000
F 值		7.269	8.325	13.641	17.737	31.283		
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		

与缺血前即刻比较,^a $P < 0.05$,与 Sham 组比较,^b $P < 0.05$

发性损伤。越来越多研究证实 NO 与 SCIRI 有密切的关系,但其确切的效应及作用机制目前仍不清楚。

NO 即内皮源性舒张因子,为血管内皮细胞、神经元及脑、肝、心、肾、胃肠等多种组织细胞产生分泌的重要舒血管物质之一^[6]。其对组织缺血损伤 IRI 有利有弊,被称为“双刃剑”。有研究提示 NO 对 IRI 有保护作用,如 NO 可抑制细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达,从而使中性粒细胞的粘附及渗入减轻,保护组织细胞结构及功能;抑制细胞膜钙通道活性,减轻细胞内钙超载。也有研究提示 NO 加重心肌 IRI,如 NO 可使肿瘤坏死因子(TNF)升高而导致细胞损伤,血管内皮细胞释放的 NO 可产生超氧亚硝酸根离子和超氧阴离子,对组织细胞产生明显的致损作用^[7-10]。目前趋向于在病理生理状态下,未过量表达的 NO 可能具有一定的保护作用;如过量表达,产生大剂量的 NO 亦有强烈的毒性作用,高浓度的 NO 将导致细胞和组织损伤。在中枢神经系统生理情况下,适量 NO 具有神经递质和神经内分泌功能,但病理过程中过量合成的 NO 会产生神经毒性^[11]。吴宏等^[12]研究脊髓打击损伤发现在 NO 含量明显增加的同时,脊髓含水量也增加,并与其在同一时段内呈正相关,说明 NO 部分参与了脊髓损伤后水肿的发生,但 NO 的时程变化与脊髓含水量的时程变化并不十分吻合。王丹等^[13]研究发现 SCIRI 的过程中过量产生的 NO 抑制线粒体 ATP 产生,抑制线粒体呼吸,损伤 DNA,最终使细胞能量耗竭。于泽生等^[14]发现再灌注后给予一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 L-NAME,则 NOS 阳性运动神经元数量明显减少,运动神经元受损程度明显减轻,说明抑制 NOS 的异常表达可使再灌注损伤减轻,进一步显示局部 NO 产生增多可能是再灌注损伤的原因之一。

我们研究发现结扎家兔腹主动脉造成 SCIRI 后,NO 在血清及脊髓组织都高度表达,与周青山等^[15]报道的 SCIRI 后血清和脊髓组织 NO 都升高相一致。脊髓组织 NO 含量在缺血 45 min 明显升高并达到最高峰,与 Sham 组相比较,差异具有统计学意义,而血清 NO 在 IRI 2 h 达到峰值,与缺血前即刻及 Sham 组相同时间比较,差异都具有统计学意义。说明在 SCIRI 病理过程中中不仅存在由血管内皮细胞产生的 NO,恢复血流后经血液运输到脊髓造成再灌注损伤,还可能存在脊髓组织内某些组织内皮细胞在缺血阶段产生过量,直接作用于脊髓组织本身产生损伤的 NO。而再灌注后血清中大量 NO 随血流到达脊髓组织进一步加重了脊髓损伤,与 SCIRI 缺血阶段引起脊髓组织损伤,恢复血液灌注

后不但不能使其功能和结构完全恢复,反而加重其功能障碍和结构损伤的病理现象相一致。由此我们认为,缺血期脊髓组织产生过量 NO 和恢复血流再灌注后血液中 NO 运输到脊髓组织可能都参与了 SCIRI 后神经元损伤及修复的病理过程。至于在 SCIRI 病理过程中 NO 的来源,作用及具体机制,如何利用 NO 在 SCIRI 过程中的作用治疗和提高疾病的预后,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Jiang X, Shi E, Nakajima Y, et al. Postconditioning, a series of brief interruptions of early reperfusion, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia[J]. *Ann Surg*, 2006, 244(1): 148-153.
- [2] Back MR, Bandyk M, Bradner M, et al. Critical analysis of outcome determinants affecting repair of intact aneurysms involving the visceral aorta [J]. *Ann Vasc Surg*, 2005, 19 (5): 648-656.
- [3] 南菁, 杜锡林, 马庆久, 等. 大鼠肝脏缺血/再灌注损伤早期一氧化氮的变化及其作用 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26 (11): 983-986.
- [4] 张一兵, 张连元, 门秀丽, 等. 大鼠肢体缺血/再灌注后肺损伤及一氧化氮合酶的变化与意义[J]. *中国应用生理学杂志*, 2006, 22 (4): 484-487.
- [5] Zivin JA, DeGiro lani U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model[J]. *Stroke*, 1980, 11: 200.
- [6] Pagel PS, Krolikowski JG, Pratt PF Jr, et al. The mechanism of helium-induced preconditioning: a direct role for nitric oxide in rabbits [J]. *Anesth Analg*, 2008, 107(3): 762-768.
- [7] Zhu H, Wei X, Bian K, et al. Effects of nitric oxide on skin burn wound healing[J]. *J Burn Care Res*, 2008, 29(5): 804-814.
- [8] Wang Y, Guo Y, Zhang SX, et al. Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(1): 5-15.
- [9] 司良毅. NO、NOS 与缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *国外医学内科分册*, 1999, 26(5): 211-214.
- [10] Eefting F, Rensing B, Wigman J, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 414-426.
- [11] Lovett JE 3rd, Fink BF, Bernard A, et al. Analysis of nitric oxide activity in prevention of reperfusion injury [J]. *Ann Plast Surg*, 2001, 46(3): 269-274.
- [12] 吴宏. 一氧化氮与急性脊髓损伤后脊髓水肿的关系[J]. *福建医科大学学报*, 2001, 35(2): 151-153.
- [13] 王丹, 朱浩佳, 梁卓辉, 等. 阿司匹林对急性脑梗死患者血清一氧化氮及血小板颗粒膜蛋白的影响[J]. *中国实用内科杂志*, 2004, 24(12): 747-748.
- [14] 于泽生, 刘忠军, 党耕町. 一氧化氮(NO)在脊髓缺血再灌注损伤中作用[J]. *中华骨科杂志*, 2000, 20(2): 111-113.
- [15] 周青山, 解小丽, 涂仲凡, 等. 缺血预处理对兔主动脉阻断后脊髓一氧化氮、后肢神经功能和肌电图的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(11): 1352-1355.

(收稿日期:2008-12-18)

(本文编辑:薛杉)