

## NO含量和 NOS 活性在兔软骨终板退变过程中的变化

刘斌<sup>1</sup>, 瞿东滨<sup>1</sup>, 金大地<sup>1</sup>, 陆地<sup>2</sup>, 谭军<sup>3</sup> (第一军医大学<sup>1</sup> 南方医院脊柱骨病外科, <sup>2</sup> 细胞生物学教研室, <sup>3</sup> 实验管理中心, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 研究一氧化氮(NO)和一氧化氮合成酶(NOS)在软骨终板退变中的作用。方法 将24只新西兰白兔分为实验组( $n=12$ )和对照组( $n=12$ ),实验组通过切除兔腰椎棘上、棘间韧带,咬除部分关节突关节,分离椎旁肌造成腰椎软骨终板退变模型,分别于术后12、24、36周对腰椎摄X线片,并检测不同时间段的软骨终板中NO含量和NOS活性。结果 X线片示软骨终板随时间的延长而逐渐钙化,且实验组较对照组钙化明显;实验组各组的NO含量及NOS活性较对照组增多( $P<0.05$ ),而24周与36周实验组间NO含量及NOS活性差异不明显( $P>0.05$ )。结论 NO和NOS在软骨终板退变过程中,其含量相应增加,提示NO可能在软骨终板退变的形成和发展中起重要作用。

**关键词:** 软骨疾病 / 放射摄影术; 软骨疾病 / 酶学; 一氧化氮; 一氧化氮合成酶

中图分类号: R681.3; R-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)03-0278-04

## Changes of nitric oxide content and nitric oxide synthase activity during rabbit cartilage endplate degeneration

LIU Bin<sup>1</sup>, QU Dong-bin<sup>1</sup>, JIN Da-di<sup>1</sup>, LU Di<sup>2</sup>, TAN Jun<sup>3</sup>

Department of Orthopedics and Spinal Surgery, Nanfang Hospital<sup>1</sup>, Department of Cell Biology<sup>2</sup>, Experimental Center<sup>3</sup>, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** **Objective** To study the role of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in the degeneration of rabbit cartilage endplate (CEP). **Methods** Twenty-four New Zealand rabbits were divided into experiment ( $n=12$ ) and control ( $n=12$ ) groups, and in the former group rabbit models of lumbar CEP degeneration was established by resection of all the lumbar supraspinous and interspinous ligaments and excision of part of the zygapophyseal joints followed by detachment of the posterior paravertebral muscles from the lumbar vertebrae. Lumbar X-ray was performed in both groups 12, 24 and 36 weeks after operation, respectively. The content of NO and NOS activity in the CEP were also measured. **Results** X-ray of the CEP reveal gradual calcification of the cartilage endplate with the elapse of time, which was more obvious in the experiment group. The content of NO and NOS activity was significantly increased in the experiment group after the operation ( $P<0.05$ ), but their difference between the measurements at 24 and 36 weeks postoperatively was not obvious ( $P>0.05$ ). **Conclusion** NO may play an important role in the development and progression of rabbit cartilage endplate degeneration.

**Key words:** cartilage diseases/radiography; cartilage diseases/enzymology; nitric oxide; nitric oxide synthase

椎间盘退变可导致下腰痛、颈神经根病、脊髓型颈椎病、腰椎管狭窄等临床综合征,严重影响人们的身心健康。虽然椎间盘退变的病因及病理变化还有许多未明了之处,但有证据显示椎间盘的退变源于软骨终板退变<sup>[1-3]</sup>。一氧化氮(NO)作为一活跃的生物小分子,是由一氧化氮合成酶(NOS)作用于L-精氨酸产生的,它在关节炎形成的过程中起着重要的作用,现已证实,NOS在退变的椎间盘中有表达<sup>[4]</sup>。但有关其在软骨终板退变中的作用则未见报道。本研究通

过对退变的软骨终板进行NO和NOS的检测,探讨其在软骨终板退变中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

24只6~8月龄雄性清洁级新西兰白兔,体质量2.5~3.0 kg(南方医院动物实验中心提供)。

#### 1.2 试剂及仪器

NO和NOS检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);722型-分光光度计。

#### 1.3 动物模型及分组

10%水合氯醛20 mg/kg·b.w.静脉麻醉后,将动物俯卧固定于手术台上,备皮,碘酒、酒精消毒,铺巾。动物均分为实验组和对照组。

实验组动物沿L<sub>1</sub>~L<sub>7</sub>棘突做后正中切口,长约10 cm,贴棘突两侧切断椎旁肌,将附着于棘突、椎板及小关节的肌肉全部分离,暴露棘突、椎板和关节突;然后

收稿日期:2003-12-30

基金项目:国家自然科学基金(30000168);广东省自然科学基金(001105)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30000168);

National Natural Science Foundation of Guangdong Province(001105)

作者简介:刘斌(1973-),男,第一军医大学在读博士研究生,主要研究方向为脊柱外科,E-mail: johnliu2001@sina.com

通讯作者:瞿东滨(1966-),男,博士,副教授,主要研究方向为椎间盘退变,E-mail: dong-bin@fimmu.com

依次切除 L<sub>1</sub>~L<sub>7</sub> 的棘上、棘间韧带及两侧关节突关节后外 1/2, 依次缝合各层组织, 术后动物在笼中自由活动。实验组分别于术后 12、24 和 36 周各随机处死 4 只动物。

对照组动物切开皮肤后不作肌肉分离及韧带切除, 也分别于术后 12、24 和 36 周各随机处死 4 只动物。

#### 1.4 X 线摄片观察

各组动物分别于处死前, 各随机取 3 只进行 X 线摄片, 观察软骨终板变化情况。

#### 1.5 NO 和 NOS 检测

实验组和对照组动物处死后, 立即在无菌操作下取出 L<sub>4-5</sub> 椎间盘。切开椎间盘, 刮除髓核、切除纤维环及软骨终板下骨组织, 软骨终板称重。将软骨终板置于 24 孔培养板内, 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养, 72 h 后取上清液, 按试

剂盒说明书操作, 用硝酸还原酶将 NO<sup>3-</sup> 还原为 NO<sup>2-</sup>, 根据分光光度计显色深浅决定其浓度的高低, 反映软骨终板中 NO 的水平。NO 结果以 mmol·L<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> 表示。NOS 活性以 U·ml<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> 表示。

#### 1.6 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS10.0 软件包进行统计学分析, 样本均数间比较使用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 X 线摄片观察

从 X 线摄片可知, 术后 12 周对照组的软骨终板无明显钙化 (图 1), 而实验组软骨终板钙化较明显 (图 2); 术后 36 周实验组软骨终板钙化明显, 密度增高 (图 3), 而 36 周对照组的软骨终板虽然也发生钙化, 但不如实验组的明显 (图 4)。

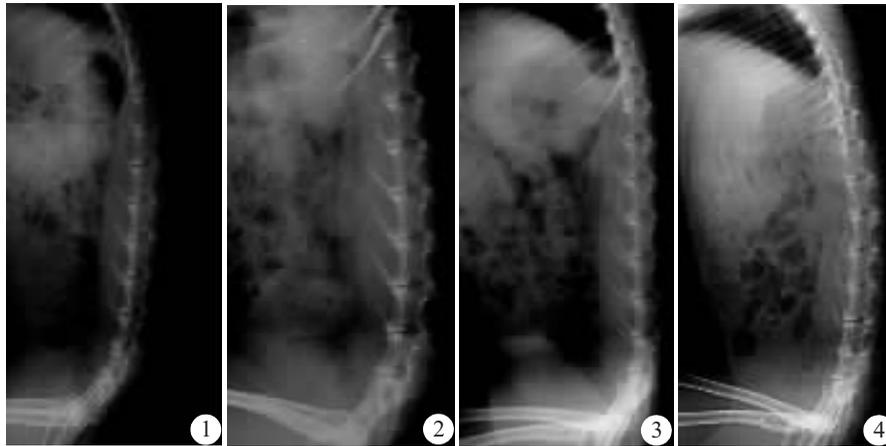


图 1 术后 12 周对照组 X 线摄片

Fig.1 Lumbar X-ray of a rabbit in the control group 12 weeks after operation

图 2 术后 12 周实验组 X 线摄片

Fig.2 Lumbar X-ray of a rabbit in the experiment group 12 weeks after operation

图 3 术后 36 周对照组 X 线摄片

Fig.3 Lumbar X-ray of a rabbit in the control group 36 weeks after operation

图 4 术后 36 周实验组 X 线摄片

Fig.4 Lumbar X-ray of a rabbit in the experiment group 36 weeks after operation

### 2.2 软骨终板中 NO 含量的变化

随着时间的延长, 实验组与对照组中 NO 含量均升高, 且两组间差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 对照组组内各时间段的 NO 含量亦有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 而实验组中 24 和 36 周之间 NO 含量则无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

### 2.3 软骨终板中 NOS 活性的变化

实验组与对照组中 NOS 活性随着时间的延长而升高, 两组间差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 对照组组内各时间段的 NOS 活性亦有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 而实验组中 24 和 36 周之间 NOS 活性则无显著性差异

( $P > 0.05$ , 表 2)。

表 1 软骨终板中 NO 含量比较 ( $n=4$ , mmol·L<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 NO content in the rabbit cartilage endplate after operation ( $n=4$ , mmol·L<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>, Mean±SD)

Group	Time		
	12 weeks post-operation	24 weeks post-operation	36 week post-operation
Control <sup>#</sup>	26.38±3.97	52.55±7.91	81.61±8.94
Experiment <sup>*</sup>	134.14±15.71	383.44±21.53 <sup>Δ</sup>	403.09±23.18 <sup>▲</sup>

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  within the control group;

<sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs the experiment group 12 weeks post-operation;

<sup>▲</sup> $P > 0.05$  vs the experiment group 24 weeks post-operation

表 2 软骨终板中 NOS 活性比较 ( $n=4$ ,  $U \cdot ml^{-1} \cdot mg^{-1}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Time		
	12 weeks	24 weeks	36 weeks
	post-operation	post-operation	post-operation
Control <sup>f</sup>	0.79±0.15	1.10±0.14	1.40±0.15
Experiment <sup>*</sup>	1.36±0.17	2.22±0.21 <sup>Δ</sup>	2.36±0.24 <sup>Δ▲</sup>

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>f</sup> $P < 0.05$  within control group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs the experiment group 12 weeks post-operation; <sup>Δ▲</sup> $P > 0.05$  vs the experiment group 24 weeks post-operation

### 3 讨论

腰椎间盘突出退行性变为引起腰腿痛的主要原因目前仍不清楚<sup>[5]</sup>,只有在全面了解了椎间盘退变机制的基础上,才可能进一步研究延缓甚或阻止其退变的方法。目前,许多学者认为椎间盘退变是多种环境因素共同作用的结果,其发病机制大致可归结于软骨终板的退变,营养供应减少,细胞老化,椎间盘内部降解酶活性的升高,以及基质疲劳衰竭等,而上述机理中最重要的是椎间盘软骨终板的退变<sup>[6]</sup>。这是因为椎间盘的生物化学构成成分包括水、胶原、蛋白多糖等,它们是椎间盘发挥生理机能的物质基础,而软骨终板是供应椎间盘营养的主要通道,因此如果软骨终板发生退变,造成椎间盘营养供应的障碍,则使其生化成分发生变化,从而导致椎间盘退变。

人类椎体终板与鼠、兔等爬行动物的主要区别是人类椎体没有骨骺。但动物与人类的椎体生长发育过程是基本相似的,即都是通过椎体骺软骨不断钙化和骨化来增加椎体的高度<sup>[7]</sup>。从这一点来看,爬行动物与直立动物椎体的应力传导结构和方向是基本相同的。因此,对爬行动物的实验研究,其结果是有一定比较意义的<sup>[8]</sup>。

椎骨、椎间盘和脊柱韧带维持椎间关节稳定和平衡的作用为静力平衡,而脊柱周围肌肉、肌腱及内压维护椎间关节稳定和平衡的作用为动力平衡。本实验即通过改变稳定脊柱的动、静力平衡,造成椎间失稳,从而引发软骨终板退变。结果中 X 线片示,随着时间的增长,实验组的软骨终板钙化程度逐渐加重,且与对照组相比较钙化明显。因此,可以认为,本实验所采用的造模方法可造成软骨终板退变。

NO 是带有不配对电子的小分子自由基。它的结构简单,性质活泼,极易扩散通过生物膜的特性,这使得 NO 在体内成为极为重要的生物信使分子<sup>[9]</sup>。NOS 是合成 NO 的限速酶,是调节 NO 的最重要成分。因此,本文通过对 NO 的稳定代谢产物亚硝酸盐及总 NOS 活性的测定,研究它们在软骨终板退变中的作用。

本实验研究表明,随着时间的增加,实验组与对照组的 NO 含量和 NOS 活性均增加;12、24 和 36 周实验组与对照组间的 NO 含量和 NOS 活性均有显著

性差异( $P < 0.05$ ),各组组间差异显著( $P < 0.05$ )。但 24 周和 36 周实验组间无显著性差异( $P > 0.05$ ),提示 24 周后实验组 NO 含量和 NOS 活性将不再增加或增加不大。由于本实验未对 36 周以后实验组继续进行观察,因此,此后的 NO 含量和 NOS 活性的变化趋势有待于进一步研究。通过以上结果可知,NO 在软骨终板退变过程中发挥着重要促进作用。

软骨终板为透明软骨,其基质主要由 II 型胶原和蛋白多糖(PG)组成,而由基质所维持的正常分解和合成代谢对于其生物学功能至关重要<sup>[10]</sup>。推测 NO 作为一种信号分子,可能通过调节基质代谢而在软骨退变中发挥作用。它主要通过抑制  $SO_4^{2-}$  结合到氨基葡聚糖(GAG)上,影响新生成的 GAG 硫酸化,并且阻断 Fn 和粘素素  $\alpha 5 \beta 1$  结合引起的信息传递,干扰软骨细胞、基质间信息传递,降低软骨细胞中的某些生长因子,从而抑制蛋白多糖的合成;通过抑制 II 型胶原的合成及软骨细胞增殖,激活金属蛋白酶和环氧合酶,促进胶原降解并使前列腺素  $E_2$  上升,从而造成对软骨的破坏。

从本实验可知,NO 在软骨终板退变中起着重要作用,因此如何通过调控退变软骨终板中 NO 的含量来达到预防和延缓椎间盘退变,是摆在我们面前的新课题。已有报道表明 NOS 或 NO 的抑制因子明显地改变动物关节炎模型中关节的损伤程度和关节炎病程,抑制炎症及组织损害。这提示我们可用特异性抑制 NOS 或 NO 的药物阻止或延缓腰椎软骨终板的退变过程,从而为临床上预防和治疗椎间盘退行性疾病开辟一条新的途径。

### 参考文献:

- [1] 彭宝淦,贾连顺,施 杞,等. 软骨终板在椎间盘退变过程中的作用机理[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(2): 147-50.  
Peng BG, Jia LS, Shi Q, et al. Study on the mechanism of cartilage end-plate calcification on disc degeneration [J]. Orthop J chin, 2000, 7(2): 147-50.
- [2] Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs[J]. Spine, 1997, 22(24): 2781-95.
- [3] Peng BG, Hou SX, Shi Q, et al. The relationship between cartilage end plate calcification and disc degeneration: an experimental study [J]. Chin Med J, 2001, 114: 308-12.
- [4] Furusawa N, Baba H, Miyoshi N, et al. Herniation of cervical intervertebral disc: immunohistochemical examination and measurement of nitric oxide production[J]. Spine, 2001, 26(10): 1110-6.
- [5] Borenstein DG. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain[J]. Curr Opin Rheumatol, 2001, 13(2): 128-34.
- [6] Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin  $E_2$ [J]. Spine, 1995,

- 20(22): 2373-8.
- [7] Revel M, Andre Deshays C, Roudier R, *et al.* Effects of repetitives train on vertebral endplates in young rats[J]. Clin Orthop, 1992, (279): 303-9.
- [8] 彭宝淦, 施纪, 沈培芝, 等. 软骨终板钙化与椎间盘退变关系的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1999, 37(10): 613-6.
- Peng BG, Shi Q, Shen PZ, *et al.* The relationship between cartilage end-plate calcification and disc degeneration: an experimental study [J]. Chin J Surg, 1999, 37(10): 613-6.
- [9] 张新宇, 靳安民, 史占军, 等. 一氧化氮对骨肉瘤细胞体外跨膜侵袭能力的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 134-6.
- Zhang XY, Jin AM, Shi ZJ, *et al.* Effect of nitric oxide on the invasive ability of human osteosarcoma through a filter membrane: an *in vitro* study[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 134-6.
- [10] 王吉兴, 姚军. SV40LTA<sub>g</sub> 基因永生化软骨细胞体外培养的生物特性[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(12): 1338-40.
- Wang JX, Yao J. Observation of the biological behavior of *in vitro* cultured immortalized chondrocytes induced by SV40LTA<sub>g</sub> gene transfection [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(12): 1338-40.

## 成功抢救大面积脑梗死伴特高血糖等多种严重并发症 1 例报告

### Successful rescue of extensive cerebral infarction with severe hyperglycemia and other severe complications: report of one case

邵合队<sup>1</sup>, 彭玉平<sup>2</sup>(<sup>1</sup>厦门市同安医院神经外科, 福建 厦门 361100; 第一军医大学南方医院神经外科, 广东 广州 510515)

关键词: 脑梗死; 高血糖症; 急症处理

中图分类号: R587.102; R743.330 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588(2004)03-0281-01

#### 1 临床资料

患者男, 62 岁, 因意识障碍、右侧肢体偏瘫 3 d 入院, 在神经内科诊断为: (1) 左额叶、颞叶大面积脑梗死(左侧大脑前动脉、大脑中动脉闭塞); (2) 肺部感染。经保守治疗 3 d, 病情仍逐渐加重, 左侧瞳孔散大, 光反射消失, 深昏迷, 考虑脑疝形成, 转神经外科急诊。在全麻下行左侧额颞部去大骨瓣减压术, 骨窗大小 12 cm×14 cm。术中见脑肿胀明显, 脑膨出, 行额极、颞极切除内减压, 剥除脑表面蛛网膜, 直接颞肌缝合。既往无高血压病、糖尿病病史, 有高血脂病史。术前血糖 5.1 mmol/L, 尿糖(-)。术后第 1 天, 意识障碍改善, 浅昏迷, 双侧瞳孔等大等圆, 直径约 2.5 mm, 光反射存在。给予吸氧、抗感染、脱水、激素、小剂量胰岛素、预防癫痫发作等处理。术后第 7 天, 高热、痰多, 行气管切开, 痰细菌培养出铜绿色假单胞菌, 血糖偏高(12~15 mmol/L), 血钠高(156 mmol/L)。按药敏予抗感染, 并采用经胃管补白开水和胰岛素治疗。术后第 2 周, 高热 40.1℃, 意识障碍再次加重, 呼吸急促, 尿量突然增多, 血压下降, 1 d 内多次血糖检查为 46.1~73.8 mmol/L, 血钠 162 mmol/L, 血氯 119 mmol/L, 血浆渗透压 550 mmol/L, 肌酐 352 mmol/L, 尿素氮 41.8 mmol/L。尿糖(++++) , 尿酮体(-), 尿潜血(+++), 血气分析提示代谢性酸中毒, 考虑并发高渗性昏迷、急性呼吸衰竭、肾功能损害。立即给予如下处理: (1) 停用含糖液体; (2) 鼻饲白开水, 200 ml/2 h; (3) 加大胰岛素用量(每日用量多达 172 U), 0.5~1 h 测血糖 1 次, 查电解质 4 次/d, 根据血糖及电解质情况随时调整胰岛素用量及纠正水电解质紊乱; (4) 停用甘露

醇, 减少激素用量; (5) 呼吸机辅助呼吸, 定期查血气分析; (6) 多巴胺控制血压。经积极抢救治疗 2 d 后, 血糖控制在 10~17 mmol/L, 电解质逐渐恢复正常, 血压稳定, 呼吸平稳, 停用呼吸机; 7 d 后, 血糖正常。综合治疗, 住院 51 d, 患者呈浅昏迷, 血糖控制在正常范围, 生命征平稳, 回当地医院继续康复治疗。

#### 2 讨论

常规内科治疗是治疗脑梗死的主要方法。但对一部分脑梗死病人, 经积极内科治疗, 病情继续加重, 若不行减压手术, 病人死亡率极高。据报道, 完全大脑中动脉或颈内动脉闭塞后, 10% 以上的脑梗死患者将产生具有占位效应的脑水肿; 尽管加强脱水治疗, 仍有 80% 病人死于脑疝, 及时手术可使死亡率下降至 20%<sup>[1]</sup>。Falco 等<sup>[2]</sup>研究发现急性期梗死灶的大小与高血糖显著相关。脑梗死并脑疝手术的死亡率高, 影响预后的因素有梗死部位、梗死灶大小、患者年龄、有否系统疾病以及行减压手术的早晚。许多学者将此时进行的减压性手术称“救命性”手术, 是常规内科治疗的必要补充<sup>[3]</sup>。手术强调三点: (1) 手术时机的掌握, 有人认为进行手术最晚不能超过的时间是瞳孔已有改变并对脱水等治疗无反应<sup>[3]</sup>; (2) 骨窗范围要大, 一般直径约 12~14 cm, 而且要尽量咬除颞窝平中颅窝底; (3) 脑表面蛛网膜剥除, 近中线侧的硬脑膜与其下方的颞肌对位行减张缝合, 起到“颞肌填敷”治疗缺血脑组织的作用<sup>[4]</sup>。这样, 一方面扩大了颅腔容积, 降低了颅内压, 改善脑的缺血供氧, 使患者度过了危险期; 另一方面, 用血运丰富的颞肌直接贴敷在缺血缺氧的脑组织表面, 可促进脑组织侧支循环的建立。

术后血糖升高是神经及内分泌引起的一种应激反应, 可

(下转 285 页)

收稿日期: 2003-08-12

作者简介: 邵合队(1970-), 男, 1991 年毕业于福建医学院, 主治医师