

· 基础研究 ·

大鼠脑缺血再灌注损伤后血浆内皮素、一氧化氮含量变化及通心络对其影响*

尹瑞雪¹ 卢昌均¹ 陆兵勋¹ 王立新² 刘忆星¹

摘要 目的:探讨大鼠脑缺血再灌注损伤后血浆一氧化氮(NO)、内皮素(ET)含量变化及通心络对其的作用。方法:采用大鼠 MCAO 模型,应用放免方法观察缺血后第 3、5、14 及 30d NO、ET 含量变化。结果:MCAO 后血浆 ET 浓度显著升高($P<0.05$),而 NO 浓度显著下降($P<0.05$);通心络能升高血浆 NO 浓度,降低 ET 浓度。结论:MCAO 缺血损伤时,NO、ET 起着重要作用,通心络则具有防治脑缺血性损害的作用。

关键词 脑缺血;内皮素;一氧化氮;大鼠;通心络

中图分类号:R493,R741,R28 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-07-0586-03

Experimental study of the changes of endothelin and nitric oxide after middle cerebral artery occlusion in rats and treatment with Tongxinluo/YIN Ruixue, LU Changjun, LU Bingxun, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(7):586—588

Abstract Objective:To investigate the changes of endothelin(ET) and nitric oxide(NO) after middle cerebral artery occlusion in rats and treatment with Tongxinluo.**Method:**Ischemia was induced by temporary middle cerebral artery occlusion (MCAO). At the 3rd, 5th, 14th and 30th d after MCAO, the level of ET and NO were detected. **Result:** Compared with sham operation group, ET increased significantly after MCAO on the day 5, 14 and 30 ($P<0.05$); while NO decreased significantly after MCAO ($P<0.05$). After treatment of Tongxinluo, NO increased significantly as compared with MCAO group ($P<0.05$); while ET decreased significantly. **Conclusion:**NO and ET may play an important role in cerebral ischemic injury. Tongxinluo has preventive and therapeutic effect on cerebral ischemic injury.

Author's address Dept. of Neurology, Nanfang Hospital. Southern Medical University, Guangzhou, 510515

Key words cerebral ischemia; endothelin; nitric oxide; rat; Tongxinluo

缺血性脑血管病的治疗主要以超早期溶栓和神经保护为主,目的在于恢复缺血区脑组织的血液供应以及神经结构重塑。而神经功能的重建仍是脑缺血治疗的难题。近年的研究发现:神经干细胞在一定病理条件下,如肾上腺皮质激素、应激、缺血缺氧等因素作用下可以增殖,并分化为神经元和神经胶质细胞,参与修复缺失的神经功能^[1-3]。我们应用放免方法检测大鼠脑缺血再灌注损伤(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后,不同时间点内皮素(endothelin, ET)、氧化亚氮(nitric oxide, NO)同时变化的情况及其相关性变化,以及通心络对脑缺血损伤后 ET、NO 的影响。

1 材料和方法

1.1 栓线的制备

取 3—0 号尼龙线,用酒精灯将其头端烫成球形,在需要长度处折弯作标记,将此线浸泡消毒,然后将栓线头端浸入 0.1%多聚赖氨酸溶液中过夜,置 60℃烤箱中 1h 后取出,浸入 1.25 万 U/ml 肝素盐水

中备用。

1.2 动物模型

健康雄性 SD 大鼠 192 只,体重 250±20g,南方医科大学实验动物中心提供(动物质量合格证号 2004A067)。随机分为缺血再灌注 3、5、14、30 天共四批进行,每批随机分为通心络大剂量组、通心络小剂量组、缺血再灌注模型对照组(等量的生理盐水)和假手术组,每组 12 只。参照 Koizumi 法^[4],结合我们实验室的改良法进行。复制大鼠右侧大脑中动脉阻塞及再灌注模型。将大鼠称重后,按 0.4ml/kg 以 10%水合氯醛腹腔麻醉,分离并结扎右侧颈总动脉、颈外动脉,手术中避免刺激迷走神经。在颈总动脉近颈内、外动脉分叉处以动脉夹夹闭,取带有处理过的 3—0 号尼龙线的 4.5 号头皮针自结扎处远端刺入颈

* 基金项目:国家自然科学基金资助(30400612)

1 南方医科大学南方医院神经内科,广州,510515

2 通讯作者:王立新(广东省中医院神经三科,广州,510120, e-mail: plawlx@126.com)

作者简介:尹瑞雪,女,在读博士,副主任医师

收稿日期:2005-09-28

总动脉, 松开动脉夹, 以针头将尼龙线导入颈内动脉, 深度为距颈总动脉分叉处约 $19.5 \pm 0.5 \text{ mm}$ 。90min 后拔出丝线进行缺血再灌注。按经典的 Zea Longa 神经功能评分法评分(5 级 4 分法)^[9], 即 0 分: 无神经功能缺损症状; 1 分: 轻微神经功能缺损, 不能完全伸展左侧前爪; 2 分: 中度局灶性神经功能缺损, 向左侧转圈; 3 分: 重度局灶性神经功能缺损, 向左侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识水平下降。除假手术组外, 各组选取造模后 6h 神经功能缺损评分在 2 分以上的大鼠纳入研究, 症状轻微的大鼠剔除。假手术组也插入丝线, 但深度为 10mm 左右, 不阻塞大脑中动脉。术后在约 20℃ 的空调环境下单笼饲养, 自由进食、进水。

1.3 给药方法

先将通心络胶囊内容物溶于蒸馏水中配成溶液, 大剂量组浓度为 15g/100ml, 小剂量组浓度为 7.5g/100ml, 通心络大剂量组给药量按每只 $1 \text{ g/kg} \cdot \text{d}$ 给药, 通心络小剂量组按每只 $0.5 \text{ g/kg} \cdot \text{d}$ 给药, MCAO 模型组、假手术组以等量蒸馏水分别灌胃, 各组大鼠在再灌注清醒后即给药, 每日 2 次, 分别给药 3、5、14、30 天。

1.4 指标测定

各组大鼠腹主动脉取血, 用放免方法测定血浆 ET (采用 C18 层析柱法提取)。分光光度计测定 NO 浓度。

1.5 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验并进行相关分析。

2 结果

2.1 MCAO 血浆 ET 浓度的变化

见表 1。大鼠脑缺血再灌注后各个时间段活动较假手术组减少, 体重减轻; 血浆 ET 浓度含量升高, MCAO 模型组与假手术组(1.65 ± 0.13)比较, 有显著性差异($P < 0.05$)。实验观察到, 给予通心络治疗后第 3 天 ET 浓度与 MCAO 模型组相比较无显著差异; 通心络治疗后第 5、14、30 天时 ET 浓度均低于 MCAO 模型组, 统计学处理差异有显著性意义($P < 0.05$); 其中通心络治疗组随时间延长, ET 浓度减少, 统计学处理差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 MCAO 血浆 NO 浓度的变化

见表 2。大鼠脑缺血再灌注后各个时间段血浆 NO 浓度含量降低, MCAO 模型组与假手术组(0.65 ± 0.05)比较, 有显著性差异($P < 0.05$)。实验观察到, 给予通心络治疗后第 3 天 NO 浓度与 MCAO 模型组相比

较无显著差异; 通心络治疗后第 5、14、30 天时 NO 浓度均高于 MCAO 模型组, 统计学处理有显著差异($P < 0.05$); 其中通心络治疗组随时间延长, NO 浓度增加, 统计学处理差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表 1 各组不同时间点 MCAO 后

组别	例数	血浆 ET 浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)			
		3d	5d	14d	30d
MCAO 模型组	12	3.75 ± 0.77	5.42 ± 0.52	6.33 ± 0.28	5.52 ± 0.47
通心络小剂量组	10	3.55 ± 0.54	$2.34 \pm 0.91^{\text{①}}$	$1.90 \pm 0.37^{\text{①}}$	$1.30 \pm 0.45^{\text{①}}$
通心络大剂量组	10	4.45 ± 0.82	$2.90 \pm 0.53^{\text{①}}$	$2.60 \pm 0.28^{\text{①}}$	$1.70 \pm 0.23^{\text{①}}$

①与假手术组比较 $P < 0.05$; 与 MCAO 模型组比较 $P < 0.05$

表 2 各组不同时间点 MCAO 后

组别	例数	血浆 NO 浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)			
		3d	5d	14d	30d
MCAO 模型组	12	0.25 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.30 ± 0.08	0.28 ± 0.07
通心络小剂量组	10	0.28 ± 0.04	$0.39 \pm 0.01^{\text{①}}$	$0.50 \pm 0.07^{\text{①}}$	$0.49 \pm 0.05^{\text{①}}$
通心络大剂量组	10	0.27 ± 0.02	$0.40 \pm 0.03^{\text{①}}$	$0.58 \pm 0.08^{\text{①}}$	$0.55 \pm 0.03^{\text{①}}$

①与假手术组比较 $P < 0.05$; 与 MCAO 模型组比较 $P < 0.05$

2.3 MCAO 血浆 ET、NO 浓度相关性变化

大鼠脑缺血再灌注后各个时间段 MCAO 模型组血浆 ET 浓度与 NO 浓度具有显著性负相关 ($r = -0.978$, $P < 0.001$)。

3 讨论

近来越来越多的证据表明, 神经再生出现在成年脑内不连续的区域, 主要包括海马齿状回颗粒下层(Hippocampus dentate gyrus zone, SGZ)、侧脑室室管膜及室管膜下区(subependymal zone, SVZ)两个主要聚集区域, SVZ 区新生的神经元可通过嘴侧迁徙流移至嗅球和皮质; SGZ 新生的神经元可移至海马颗粒层。因此, 寻找诱导和影响内源性神经干细胞的实验成为研究热点, 也为神经细胞功能重建带来了新的希望。

ET 是迄今发现作用最强的缩血管物质, 其参与脑梗死缺血中心区和缺血半暗带区的神经元及胶质细胞损伤。NO 具有扩张血管、增加脑血流量、参与脑梗死时神经细胞的保护作用。有报道 NO 能抑制内皮细胞释放 ET 而抑制血管收缩, 防止 ET 加重脑梗死缺血中心区及半暗带区的缺血和组织损伤, 同时 NO 作用于血管平滑肌细胞, 阻断细胞钙离子通道, 激活钾离子通道, 从而维持平滑肌的正常舒缩功能, 如果 NO 水平下降, 血管狭窄的抑制作用也下降, ET 升高, 脑梗死发生率就增加^[9]。实验研究结果亦显示: MCAO 模型组 NO 水平明显低于假手术对照组, ET 水平明显高于假手术组, 这是因为 NO 浓度下降, 导致血管内皮细胞释放大量 ET。提示 NO 与 ET 可能是影响 MCAO 模型组的主要因素。通心络通过升高 NO 浓度, 抑制 ET 分泌, 使 ET 水平下

降,达到减轻或防止脑缺血时神经细胞的损伤,增加脑缺血后成熟神经元及神经胶质细胞数量。

此外,在生理条件下,内皮细胞持续释放 NO,保持血管中等程度的扩张。MCAO 模型组血管内皮细胞的结构与功能发生改变,NO 合成或分泌不足。以往研究发现:MCAO 模型组 NO 浓度比假手术组显著降低,提示血清 NO 浓度的下降可能参与了缺损神经功能的损伤。而通心络高、低剂量组血清 NO 浓度较 MCAO 模型组显著升高($P<0.05$),说明通心络可能参与修复,保护血管内皮细胞,清除氧自由基或激活 NO 合成酶。提示:通心络高、低剂量组 NO 合成释放增加。同时本实验也观察到:MCAO 模型组血浆 ET 升高而 NO 浓度降低,两者具有显著负相关。通心络具有使血浆 NO 浓度升高的作用,升高的 NO 又抑制 ET 的释放,从而促使 ET 与 NO 达到新的平衡。因此 ET 和 NO 在脑梗死的形成中起着重要作用,其详细机制尚需进一步探讨。

参考文献

- [1] 郭家松, 曾园山, 李海标, 等. 神经干细胞与 NT-3 基因修饰雪旺细胞联合移植促进全横断脊髓损伤大鼠功能修复的实验研究[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(5): 323—326.
- [2] Gago N, Avellana—adali V, Evercooren AB, et al. Control of cell survival and proliferation of postnatal PSA—NCAM (+) progenitors[J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 22(1): 162—178.
- [3] 高唱, 吴伟康, 王景周, 等. HD02 对慢性前脑缺血大鼠神经干细胞增殖分化的影响[J]. 中国临床康复, 2003, 7(28): 3796—3797.
- [4] Tamura A, Nakayama H, Narita K, et al. Rat middle cerebral artery occlusion models[J]. CVD Grand Round Series, 2001, 4(1): 75—90.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without Craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [6] 彭永权. 高血压病患者血浆内皮素变化与非洛地平对其影响[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(1): 68—68.
- [7] Klintsova AY, Greenough WT. Synaptic plasticity in cortical systems[J]. Current opinion in Neurobiology, 1999, 9: 203.
- [8] O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, et al. Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent[J]. Neuroscience, 2000, 99(2): 229.
- [9] Mizuno M, Yamada K, Olariu A, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats[J]. Neuroscience, 2000, 20: 2122.
- [10] Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472.
- [11] Menei P, Pean JM, Nerriere—Daguin V, et al. Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage[J]. Exp Neurol, 2000, 161(1): 259.
- [12] Schmidt—Kstner R, Truettner J, Lin B, et al. Transient change of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 92: 157.
- [13] Lindvall O, Kokaia Z, Bengtzen J, et al. Neurotrophins and brain insults[J]. Trends Neurosci, 1994, 17: 490.
- [14] Bin Cheng, Mark P. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults[J]. Brain Res, 1994, 640: 56.
- [15] Kiprianova I, Sandkuhler J, Schwab S, et al. Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat [J]. Exp Neurol, 1999, 159(2): 511.
- [16] Han BH, D'Costa A, Back SA, et al. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2000, 7(1): 38.
- [17] Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2000, 31: 2212.
- [18] Li RZ, Anette R, Aleksandra W, et al. Enriched environment influences brain-derived neurotrophic factor levels in rat forebrain after focal stroke [J]. Neuroscience Letters, 2001, 305: 169—172.
- [19] Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning[J]. Nature Neuro Science, 2000, 3: 533.
- [20] 贾子善, 李阔, 槐雅萍, 等. 不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7): 578—580.
- [21] 李阔, 高俊淑, 李娜, 等. 不同环境对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 GFAP、GAP-43 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7): 581—583.

(上接 585 页)

参考文献