

浸水急性冷应激对大鼠脑皮质神经元一氧化氮释放量的影响

高莉¹, 关宿东², 祝延²

[摘要]目的: 探讨浸水急性冷应激对大鼠脑皮质神经元一氧化氮(nitric oxide, NO)释放量的影响。方法: 将 27 只健康、成年、雄性 Wistar 大鼠随机分为 A、B、C 组。A 组为对照组, 不作任何处理; B 组为浸水急性冷应激 30 min 组; C 组为浸水急性冷应激 60 min 组。大脑皮质 NO 含量使用硝酸酶还原法试剂盒测定。结果: A 组大鼠脑皮质 NO 含量与 B 组差异无显著性 ($P > 0.05$), 而 C 组大鼠脑皮质 NO 含量均明显高于 A 组和 B 组 ($P < 0.01$)。结论: 一氧化氮在急性冷应激早期或许对脑皮质神经元有保护作用。

[关键词] 一氧化氮; 应激; 浸水; 大脑皮质; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 363.0613 [文献标识码] A

Effect of acute cold stress by immersing in water on the release of nitric oxide in cerebral cortex of rats

GAO LI, GUAN Sudong, ZHU Yan

(1 Department of Neurophysiology Anhui Medical University Hefei 230032

2 Department of Physiology Bengbu Medical College Bengbu 233030 China)

[Abstract] Objective: To elucidate the changes of nitric oxide production in cerebral cortex of rats under acute cold stress by immersing in water. Methods: Twenty-seven male adult rats were randomly divided into three groups. Group A was a control group and rats in which were without any treatment. Rats of group B were put into cold water for 30 minutes and rats of group C were put into cold water for 60 minutes. The level of nitric oxide in cortex of rats were detected by using NO detect kit. Results: The levels of nitric oxide in group A, B and C were (4.36 ± 1.79) nmol/g Pr, (2.79 ± 2.00) nmol/g Pr and (11.50 ± 2.34) nmol/g Pr, respectively. Conclusion: Nitric oxide may play a protective role in the early stage of acute cold stress.

[Key words] nitric oxide; stress; immerse in water; cerebral cortex; rats

应激(stress)是机体受到各种内、外环境因素刺激时所出现的非特异性全身反应,包括躯体应激和心理应激。疾病、外伤、感染、社会压力等都会造成机体不同程度应激反应。短时间的应激不会造成机体损伤,反而有利于调动机体的防御保护机制,对抗外来的侵袭。但机体如果长时间处于应激状态下,会导致内、外环境紊乱和疾病,引起循环系统、神经系统、消化系统等脏器不同程度的病理改变。近年来,一氧化氮(nitric oxide, NO)在应激中所起的作用已愈来愈引起学者们的关注。NO是一种自由基性质的气体,化学性质活泼,不稳定,是一种新发现的不同于经典的神经递质。参与神经的信息传递、突触可塑性的形成、脑血流量调节、痛觉调制等^[1]。本实验中,我们以成年健康的雄性 Wistar 大鼠作为实验动物,观察浸水急性冷应激对脑皮质神经元

NO 释放量的影响,以进一步探讨 NO 在急性应激中对脑组织的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验动物采用成年健康雄性 Wistar 大鼠,体重 250~300 g 由蚌埠医学院实验动物中心提供。总数 27 只,随机分为 A、B、C 组, A 组为对照组,不作任何处理; B 组为浸水急性冷应激 30 min 组; C 组为浸水急性冷应激 60 min 组。实验前在安静、通风、阳光充足、室温 20℃ 的饲养房内适应性饲养 1 周,以避免因环境改变对大鼠造成的应激,保证实验结果的准确性。实验前禁食 24 h。

1.2 实验仪器 Smart SpecTM 分光光度计(美国 BioRad 公司)。

1.3 应激模型的建立及脑组织的取材 把应激组大鼠从饲养房内移入室温 20℃ 的实验室,并浸入盛有 0℃ 冰水的塑料方盒中,使冰水至少没过大鼠腹部。达到浸泡时间后,取出大鼠,迅速颈椎脱臼处死,断头取脑。把分离出的整个脑组织放入充有 95% O₂、5% CO₂ 混合气的 4℃ 人工脑脊液(artificial cerebral spinal fluid, ACSF)中,10 min 后用眼科剪切

[收稿日期] 2005-06-03

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2004kj72zd)

[作者单位] 1 安徽医科大学 神经生理实验室,安徽 合肥 230032

2 蚌埠医学院 生理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 高莉(1979-),女,硕士研究生,研究方向:神经生理与临床。

取小块脑皮质,滤纸拭干,称重。装入含有匀浆介质 (Tris-HCl 0.01 mmol/L, EDTA-2Na 0.001 mmol/L, NaCl 0.8%; 蔗糖 0.01 mmol/L) 的玻璃匀浆器中,研磨 6~8 min 后,倒出匀浆液装入 1.5 ml 规格的 eppendorf 管内,3 000 r/min 低温离心 10 min,取上清待测。

1.4 对照组 对照组大鼠从饲养房移入实验室后,未作任何处理,立即处死,断头,取脑,方法同应激组。

1.5 NO 的检测 NO 的检测采用硝酸还原酶法。NO 化学性质活泼,体内代谢转化为硝酸盐 (NO_3^-) 和亚硝酸盐 (NO_2^-),血清中 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度之和代表体内 NO 水平。该法利用硝酸还原酶特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,通过显色深浅即测定 550 nm 吸光度值,根据公式计算 NO 浓度值。试剂盒购自南京建成生物工程研究所,检测步骤严格按说明书进行。计算公式:

$$\text{NO含量}(\mu\text{mol/gPr}) = \frac{(\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度})}{(\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度})} \times \text{标准品浓度} \div \text{样本的蛋白含量}(\text{gPr为克蛋白})$$

1.6 统计学方法 采用方差分析和 Q 检验。

2 结果

对照组大鼠脑皮质 NO 含量为 $(4.36 \pm 1.79) \mu\text{mol/gPr}$; 浸水急性冷应激 30 min 组大鼠脑皮质 NO 含量为 $(2.79 \pm 2.00) \mu\text{mol/gPr}$; 浸水急性冷应激 60 min 组大鼠脑皮质 NO 含量为 $(11.50 \pm 2.34) \mu\text{mol/gPr}$; 差异均有显著性 ($F=45.89$, $P<0.01$, $MS_{\text{组内}}=4.227$)。应激 30 min 后大鼠脑皮质 NO 含量与对照组差异无显著性 ($P>0.05$), 而应激 60 min 组脑皮质 NO 含量显著高于对照组和应激 30 min 组 ($P<0.01$)。

3 讨论

早在 1936 年,加拿大病理学家 Selve 就发现动物在受到各种伤害性的躯体或神经刺激时,其肾上腺增大,肾上腺皮质分泌增加, Selve 将机体的这种非特异性防御反应称为应激^[2]。应激初期,机体以交感-肾上腺髓质系统兴奋为主,加速动员其防御机制,保护机体不受伤害。但过度的应激会造成中枢神经系统、免疫系统、心血管系统、消化系统等不同程度地病理性损伤。近年来越来越多的研究人员对 NO 与应激的关系表现出强烈的兴趣。NO 是近年来研究较多的一种新的神经递质,是从 L 精氨酸经一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化产

生,血管内皮细胞、神经元、平滑肌细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、血小板、肺上皮细胞均能合成 NO。NO 通过激活鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC) 生成环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, GMP) 发挥其生理功能,如扩张血管、参与神经信息传递、减少血小板黏附与聚集及抑制巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬作用^[3]。NO 已被证实具有典型的双重作用:有利的一面是扩张血管,增加脑血流量,阻断 N-甲基-D 天门冬氨酸 (NMDA) 受体的过度兴奋,减轻神经元的兴奋性毒性损害,对神经起保护作用;另一方面,当机体受到过度刺激时,会诱导 NO 的大量产生,从而对神经细胞产生毒性作用^[4]。生理水平的 NO 浓度很低,一般为微摩尔水平,不会对机体造成损害,当 NO 被大量产生时,可与体内超氧阴离子 (superoxide anion, O_2^-) 等活性氧反应生成过氧亚硝酸盐 (peroxynitrite, ONOO^-) 介导细胞毒作用^[5]。

本实验中,浸水急性冷应激 30 min 没有引起脑皮质 NO 含量的显著变化,而应激 60 min 导致脑内 NO 的大量释放。由此可见,应激早期机体会调动其保护机制,使 NO 含量不致于升得过高,而长时间的应激会引起 NO 的大量释放,从而发挥其毒性作用,造成机体损伤。NO 兼具神经毒性和神经保护作用,我们认为应激早期 NO 对神经系统起保护作用,其可能的机制是,NO 通过刺激 cGMP 的产生,迅速增加缺血脑组织的血流量,并促使新血管的生成;阻止细胞凋亡,促进神经发生;NO 本身充当着抗氧化剂的角色,减轻氧自由基对脑组织的损伤^[6]。关于 NO 的确切作用机制还不够明确,有待于进一步的实验研究去摸索、探讨。

[参考文献]

- [1] 韩济生. 神经科学原理 [M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 555-569.
- [2] 杨明, 李庆芬. 哺乳动物冷应激的主要神经内分泌反应 [J]. 动物学研究, 2002, 23(4): 335-340.
- [3] Rubbo H, Darley-Usnar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury [J]. Chem Res Toxicol 1996, 9(5): 809-820.
- [4] Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds [J]. Nature, 1993, 364(6438): 626-636.
- [5] Gutierrez HH, Nieves B, Chumley P, et al. Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: Oxidant protective action of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide [J]. Free Radic Biol Med 1996, 21(1): 43-52.
- [6] Keynes RG, Ganthawite J. Nitric oxide and its role in ischemic brain injury [J]. Curr Mol Med 2004, 4(2): 179-191.