

[文章编号] 1000-2200(2009)09-0762-03

· 基础医学 ·

硫酸镁预处理对小鼠全脑缺血再灌注损伤后 一氧化氮及一氧化氮合酶的影响

吕鸿燕, 朱旭友, 陈前芬

[摘要] 目的: 探讨硫酸镁($MgSO_4$)预处理对全脑缺血再灌注小鼠一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)活性的影响。方法: 小鼠50只随机均分为假手术组、再灌组和硫酸镁预处理低、中、高剂量组, 制作全脑缺血再灌注损伤模型。动态监测脑电图变化, 观察病理形态学变化, 检测脑组织NO含量和NOS、诱导型NOS(iNOS)活性。结果: 硫酸镁预处理各组脑组织缺血损伤病理学改变轻于再灌组。假手术组及硫酸镁预处理各组脑组织NO含量和NOS、iNOS活性均低于缺血再灌组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。结论: 硫酸镁预处理可减轻神经元损伤程度, 对缺血再灌注脑损伤具有保护作用, 其机制可能与降低NOS及iNOS活性、减少NO含量有关。

[关键词] 脑缺血; 再灌注损伤; 硫酸镁; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 小鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 743.31; R 619.9 **[文献标识码]** A

Effect of magnesium sulfate pretreatment on content of nitrous oxide and activity of nitric oxide synthase following global cerebral ischemic reperfusion injury in mice

LÜ Hong-yan, ZHU Xu-you, CHEN Qian-fen

(Department of Physiopathology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Magnesium sulfate ($MgSO_4$) pretreatment on the content of nitric oxide (NO) and the activity of nitric oxide synthase (NOS) following global cerebral ischemia reperfusion (I/R) injury in mice. **Methods:** The mice were randomly divided into sham operation group, I/R group and pretreatment groups (pretreated with low, medium and high doses of $MgSO_4$). Global cerebral ischemia-reperfusion injury model was made. The change of EEG was monitored and the pathological change in morphology was observed. The content of NO and the activity of NOS and inducible NOS (iNOS) were also detected. **Results:** The change of ischemic impairment in $MgSO_4$ pretreatment groups was lighter than that in I/R group. The contents of NO and the activities of NOS and iNOS in the sham operation group and $MgSO_4$ pretreatment groups were all significantly lower than those of I/R group ($P < 0.05 - P < 0.01$). **Conclusions:** $MgSO_4$ pretreatment may reduce the degree of neuron injury and have protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury. The mechanism may be associated with the decrease of the content of NO as well as the activities of NOS and iNOS.

[Key words] cerebral ischemia; reperfusion injuries; magnesium sulfate; nitrous oxide; nitric oxide synthase; mice

脑缺血再灌注损伤是一种复杂的病理生理过程, 许多因素参与其发生机制, 如细胞内钙超载、自由基损伤、兴奋性氨基酸释放增加、细胞酸中毒、细胞凋亡等。一氧化氮(NO)是一种不稳定的“气体型分子”, 生成NO需要一氧化氮合酶(NOS)的催化, 高浓度NO可致脑细胞代谢障碍和病理改变^[1]。在基础研究方面, 硫酸镁对心、肺血管损伤及脑缺血的保护作用有报道^[2], 但对急性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制探讨报道较少。 Mg^{2+} 是 Ca^{2+} 的天然拮抗剂, 可通过非竞争性抑制N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体来有效减少 Ca^{2+} 内流, 从而改善脑组织细胞损伤^[3]。本实验通过观察硫酸镁预

处理对脑缺血再灌注小鼠NO、NOS的影响, 探讨硫酸镁预处理对脑缺血再灌注损伤的保护作用及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 药品、试剂与仪器 硫酸镁注射液(购于扬州中宝公司), NOS及NO测定试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所)。FSH-2型高速电动匀浆器(江苏金坛医疗仪器厂产), 756-MC型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司产)。

1.2 动物与分组 健康昆明种小鼠50只, 体重(25 ± 6.5)g, 雌雄兼用, 由我院实验动物科提供。随机均分为5组, 假手术组: 仅行手术, 不实施脑缺血; 再灌组: 缺血30 min, 再灌注1 h; 硫酸镁预处理低、中、高剂量组: 分别于缺血前30 min腹腔注射25、50、100 mg/kg $MgSO_4$, 然后缺血30 min, 再灌注1 h。前两组腹腔注射等体积生理盐水。

[收稿日期] 2008-09-19

[作者单位] 蚌埠医学院 病理生理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 吕鸿燕(1983-), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 陈前芬, 研究生导师, 副教授。

1.3 皮层脑电图(EEG)描记 小鼠用 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔内注射麻醉后,俯卧于恒温手术台上,头颅正中切开头皮,暴露颅骨,分离骨膜,于右侧顶叶冠状缝与矢状缝旁各 1 mm 处钻一直径为 3 mm 圆孔,暴露顶叶皮质,安装不锈钢电极,与脑电图负极相连,将参比电极插于同侧耳后皮下,实验过程中动态监测脑电图。

1.4 全脑缺血动物模型的建立 将描记皮层脑电的小鼠仰卧于恒温手术台上,固定,颈部正中切口,分离气管并气管内插管。分离两侧颈总动脉,穿线备用。在两侧颈总动脉、颈外静脉、气管、迷走神经、交感神经下方穿线,环绕过颈后,打活结备用。待动物稳定后用动脉夹夹闭双侧颈总动脉,同时将绕颈后的备用线拉紧,颈部软组织逐渐加压,观察脑电波完全变平后,持续观察 30 min,然后松开两侧颈总动脉的动脉夹,同时解除颈部软组织的加压线,予以再灌,继续观察 1 h。

1.5 形态学观察 各组动物于观察结束后用 20% 乌拉坦过量处死,迅速断头取脑,右侧大脑浸泡于 10% 甲醛溶液中固定,石蜡包埋,连续冠状切片,厚度 5~6 μm ,HE 染色,光镜下观察大脑皮质和海马的组织学变化。

1.6 NOS 活力及 NO 含量测定 取左侧脑组织冰

浴中用预冷生理盐水制成 10% 组织匀浆,2 000 r/min,离心 10 min,取上清液。余均按试剂盒说明书操作。

1.7 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 脑电图变化 对照组脑电波的波形和幅度,在观察 90 min 内未见明显变化;再灌组和用药组动物在结扎双侧颈总动脉和颈部加压后,脑电波在数秒内变为一条直线,在缺血的 30 min 内不变,再灌 1 h 后也未见恢复。

2.2 病理检查 假手术组:外观显示小鼠脑膜无血管扩张,脑组织无肿胀。光镜下显示大脑皮层和海马结构及层次清楚,细胞形态结构清晰完整。再灌组:外观显示小鼠脑膜中度扩张,脑组织极度肿胀。高倍镜下示脑各部位结构及层次紊乱,皮层充血,间质水肿明显,大脑皮层和海马的锥体细胞固缩,胞核固缩为三角形,胞膜与周围分界清楚,胞质嗜伊红呈淡红色,尼氏小体消失。硫酸镁预处理组:外观显示小鼠脑膜轻度扩张,脑组织轻度肿胀。光镜下显示脑各部位结构及层次较再灌组清楚,间质水肿和神经细胞水肿坏死减轻。硫酸镁预处理各组之间差别不明显(见图 1~5)。

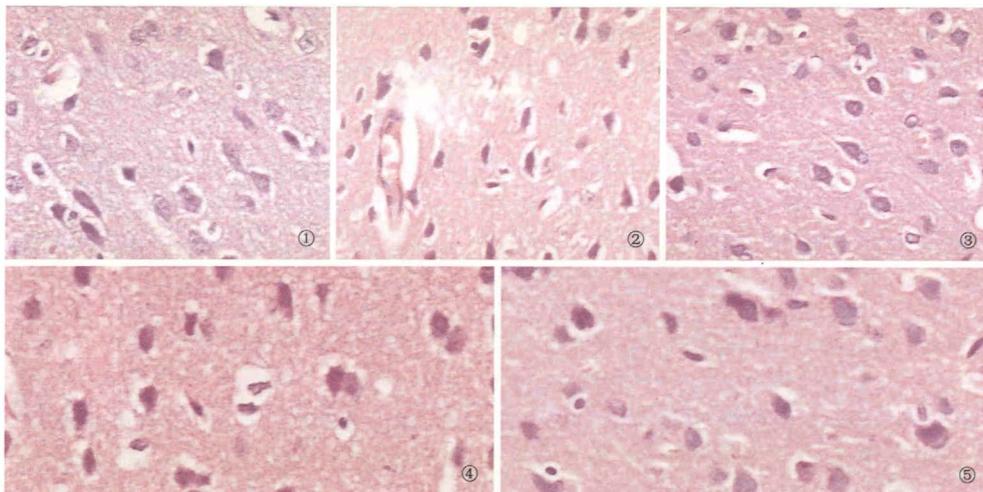


图 1 假手术组,无皮层充血及间质水肿,细胞形态结构清晰完整 图 2 再灌组,皮层充血,间质水肿明显,大量锥体细胞固缩,胞核固缩为三角形,胞质嗜伊红呈淡红色,尼氏小体消失 图 3 MgSO_4 低剂量组 图 4 MgSO_4 中剂量组 图 5 MgSO_4 高剂量组(图 3~5:皮层充血及间质水肿、神经细胞固缩坏死减轻)(图 1~5 均为 HE 染色 $\times 400$)

2.3 脑组织 NO、NOS 和 iNOS 活性 假手术组和硫酸镁预处理各组脑组织总 NOS(T-NOS)和 iNOS 活性均低于再灌组($P < 0.05 \sim P < 0.01$), MgSO_4 预处理低、中剂量组 T-NOS 活性均高于高剂量组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。假手术组和硫酸镁预处理各组脑组织 NO 含量也明显低于再灌组($P < 0.01$) (见

表 1)。

3 讨论

镁是人类的必需元素,它在调节细胞能量代谢,维持细胞内外离子的平衡,及缺血性损伤的发病机制中起重要作用。硫酸镁最早作为一种降压、抗痉

表1 各组小鼠脑组织 NO、NOS 和 iNOS 活性比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	NO 含量 ($\mu\text{mol/g prot}$) ¹	T-NOS 活性 (u/mg prot)	iNOS 活性 (u/mg prot)
假手术组	10	3.46 ± 0.36	1.55 ± 0.20	0.19 ± 0.05
再灌组	10	8.79 ± 0.84**	3.16 ± 0.22**	1.20 ± 0.04**
低剂量组	10	6.39 ± 0.99**	2.92 ± 0.20*	1.10 ± 0.05**
中剂量组	10	5.96 ± 1.05**	2.82 ± 0.33**	1.10 ± 0.07**
高剂量组	10	5.51 ± 0.80**	2.56 ± 0.06 ^{△△△}	1.08 ± 0.10**
F	—	51.39	81.39	407.40
P	—	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	0.712	0.048	0.004

q 检验:与假手术组比较** $P < 0.01$;与再灌组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$;与中剂量组比较 $\Delta P < 0.05$

挛药,临床上用于治疗妊娠高血压疾病和高血压脑病。近年研究发现在脑缺血早期应用硫酸镁可有效减轻脑组织的损害程度,减轻脑组织的炎症反应,从而发挥脑保护作用^[4]。

NO 是生物体内重要的信使分子和效应分子,具有神经介质和调质的功能,广泛参与体内生理和病理活动。近年来 NO、NOS 在脑缺血再灌注损伤中的变化及作用引起人们的广泛关注。生物体内的 NO 由 L-精氨酸和分子氧在 NOS 的作用下合成。NOS 作为 NO 合成的关键酶,可分为神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS)。前两者通称为原生型酶(cNOS),激活依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白的作用;而 iNOS 非依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白,可由炎症因子、内毒素等诱导激活^[5]。

NO 在脑缺血损伤的不同时间段、依据来源不同对脑组织具有神经保护^[6]和神经毒性^[7]双重作用。近年研究表明^[8,9],NOS 是决定 NO 双重作用的关键。eNOS 产生的 NO 局部扩张脑血管,增加脑血流,发挥脑保护作用;而 iNOS 和 nNOS 产生的 NO 主要与细胞毒作用有关。在脑缺血时 NO 大量生成并介导神经元损伤;同时神经元损伤引起炎症细胞的浸润、细胞因子高表达,进而诱导 iNOS 活化,引起 NO 合成增多,介导迟发性神经元损伤^[10]。

本实验结果显示,脑缺血 30 min,再灌 1 h 后小鼠脑组织 T-NOS 及 iNOS 活力、NO 含量均明显上升($P < 0.01$),提示 NOS 活性及 NO 含量的增加参与脑缺血再灌注损伤。而升高的 NO 与 NMDA 受体结合使大量 Ca^{2+} 通道开放,胞质内 Ca^{2+} 明显升高,引起细胞内钙超载,促发损伤级联反应^[11]。 Mg^{2+} 是 NMDA 受体的非竞争性抑制剂,当镁离子浓度提高时可明显降低 NMDA 受体的活性,减轻其渗透性损伤与钙相关损伤造成的脑水肿和神经坏死^[2]。另

外, Mg^{2+} 还参与自由基生成和清除过程中各种酶的活动,如 Mg^{2+} 能抑制脑外伤时 SOD 的降低和 NOS 的上升^[12]。本实验在缺血前 30 min 腔内注射 MgSO_4 ,增高血镁浓度,非竞争性抑制 NMDA 受体,减少 Ca^{2+} 内流,减轻钙超载引起的损伤。实验病理形态学观察证实,用硫酸镁预处理能明显减轻缺血再灌引起的脑组织间质水肿和神经细胞水肿坏死。生化检测发现,不同剂量硫酸镁预处理组小鼠脑组织内 NO 含量、T-NOS 及 iNOS 活力均明显低于缺血再灌组,说明 Mg^{2+} 能抑制脑缺血再灌注损伤时 NO 含量的上升及 NOS 活性的增高,且这种抑制作用呈剂量依赖性,剂量越高,效果越明显。

总之,硫酸镁预处理能明显减轻缺血再灌注时的组织病理损害,起到了神经保护作用,这种保护作用可能与 MgSO_4 能抑制脑组织内 iNOS 活性、降低 NO 含量、减轻钙超载有关。

[参 考 文 献]

- [1] 王启之,郑玉宝,吴炎,等.一氧化氮及内皮素在肝硬化患者肝损害中的作用及对肝门脉血流动力学的影响[J].蚌埠医学院学报,2007,32(1):7-9.
- [2] 周蕴理,王军.镁剂在急救中的应用[J].人民军医,2001,44(4):219-220.
- [3] Mclean RM. Magnesium and its therapeutical uses: a review[J]. Am J Med,1994,96(1):63-76.
- [4] 季占胜,闵连秋,王倩,等.硫酸镁抗自由基作用的量效分析[J].中国临床康复,2005,14(2):119-121.
- [5] 吕平,郭芳,张国红,等.双苯氟嗪对脑缺血再灌注损伤后脑组织及血清中 NO、NOS、iNOS 的影响[J].中国药理学通报,2005,21(11):1340-1343.
- [6] Tsai SK, Hung LM, Fu YT, et al. Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats[J]. J Vasc Surg,2007,46(2):346-353.
- [7] Xu J, He L, Ahmed SH, et al. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells[J]. Stroke,2000,31(7):1744-1751.
- [8] 聂莹雪,郭玫,禹红梅.脑缺血再灌注后 nNOS、eNOS 及 iNOS 表达的变化[J].中国血液流变学杂志,2006,16(3):332-340.
- [9] Anctil M, Poulain I, Pelletier C. Nitric oxide modulates peristaltic muscle activity associated with fluid circulation in the sea pansy *Renilla koellikeri*[J]. J Exp Biol,2005,208(10):2005-2017.
- [10] Kawase M, Kinouchi H, Kato I, et al. Inducible nitric oxide synthase following hypoxia in rat cultured gli cells[J]. Brain Res,1996,738(2):319-322.
- [11] 李浩,刘开祥,傅军林.丹参酮 II A 对鼠脑缺血再灌注损伤一氧化氮及一氧化氮合酶的影响[J].中国康复理论与实践,2008,14(5):430-432.
- [12] 杨喜民.硫酸镁对急性颅脑损伤一氧化氮合成酶活性的影响[J].西北国防医学杂志,2002,23(1):54-55.