

• 药 理 •

大鼠急性脑缺血后脑组织一氧化氮和氧自由基的变化

郑秀静, 金英, 刘婉珠, 齐志敏(辽宁省锦州医学院药理教研室, 辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 探讨脑缺血后 NO 变化时氧自由基的变化趋势。方法 使用 SD♂大鼠, 采用 Pulsinelli“四血管”阻断脑缺血模型, 利用 L-精氨酸(L-Arginine)作为 NO 的生成前体, 用一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 N^G-硝基-L-精氨酸(N^G-nitro-L-Arginine, L-NNA)抑制 NO 的生成并测定脑组织中 NO 的浓度, 超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性, 丙二醛(MDA)含量。实验数据用 SPSS 统计软件进行组间差异 *t* 检验。结果 全脑缺血时 NO 产生明显增加, SOD 及 GSH-Px 活性明显降低, MDA 含量增加。给予 NO 生成的前体 L-精氨酸后 SOD 及 GSH-Px 进一步降低, MDA 含量进一步增加, L-NNA 可对抗 L-精氨酸的作用。结论 全脑缺血时 NO 产生明显增加, NO 可能通过氧自由基在脑缺血中产生不良反应。

关键词:脑缺血; 一氧化氮; 氧自由基

The change of nitric oxide and oxygen free radicals in brain tissue in acute cerebral ischemia in rat

ZHENG Xiu-jing, JIN Ying, LIU Wan-zhu, QI Zin-min(Department of Pharmacology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE Oxygen free radicals and nitric oxide have been proposed to be involved in acute CNS injury produced by cerebral ischemia. However, controversy remains regarding how they cause injury. The present study was designed to explore the changing tendency of oxygen free radicals when nitric oxide changed in cerebral ischemia. **METHOD** In the study, L-Arginine and N^G-nitro-L-Arginine (L-NNA) served as precursor for the synthesis of nitric oxide and inhibitor of nitric oxide synthase. Male adult SD rats were used. Pulsinelli's Four-Vessel Occlusion rat model was taken. Concentration of NO, activities of SOD and GSH-Px, content of MDA in brain tissue were determined. **RESULTS** NO concentration and content of MDA increased, activities of SOD and GSH-Px decreased in cerebral ischemia rats. L-Arginine can increase the content of MDA and decrease the activities of SOD further. L-NNA can inhibit the increase of MDA and the decrease of the activities of SOD produced by L-Arginine. **CONCLUSION** These results suggest that the production of oxygen free radicals would increase accordingly when production of NO increase in cerebral ischemia rats.

KEY WORDS: cerebral ischemia; nitric oxide; oxygen free radicals

NO 是一种自由基性质的气体, 化学性质非常活泼, 为污染空气常见的有毒成分之一。近十年来, 随着对 NO 研究的深入, NO 在脑缺血损伤中作用越来越引起重视。大量研究表明脑缺血时氧自由基产生明显增加。然而, 脑缺血时 NO 的变化对氧自由基的产生是否有影响报道甚少。关于哺乳动物肝脏及肺脏中 NO 对抗氧化酶及脂质过氧化的影响, 国内学者已作了一定的工作, 有趣的是实验结果很不一致。如申兆菊^[1]等给予大鼠腹腔注射 NO 供体硝普钠可引起大鼠肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性降低, 高剂量组引起脂质过氧化的发生。杨自力等研究表明大鼠急性肺损伤后 NO 生成增多, 脂质过氧化产物丙二醛含量增加, 一氧化氮合酶抑制剂 N^G-硝基-L-精氨酸(L-NNA)使 NO 释放减少, 同时伴有 MDA 含量降低^[2]。但在脑缺血时 NO 的变化与氧自由基的关系尚不清楚。本研究利用 NO 前体 L-精氨酸结合 NOS

抑制剂 L-NNA, 通过测定大鼠缺血脑组织中 SOD, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量变化来探讨 NO 在脑缺血损伤中的作用及作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

L-精氨酸, 购于北京奥博星生物技术责任公司。L-NNA, 购于 Sigma Chemical CO. (St. Louis, Mo 63178 USA)。NO, SOD GSH-Px, MDA 试剂盒为南京聚力生物医学工程研究所产品。

1.2 实验方法

SD♂大鼠 30 只, 体重 250~300 g(锦州医学院实验动物中心提供), 随机分为 5 组, 分别为假手术组, 生理盐水组, L-精氨酸(300 mg · kg⁻¹)组, L-NNA(30 mg · kg⁻¹)组, L-精氨酸(300 mg · kg⁻¹) + L-NNA(30 mg · kg⁻¹)组。大鼠用

基金项目: 辽宁省自然科学基金课题, 编号 972033

4%水合氯醛 400 mg · kg⁻¹ 腹腔麻醉,按 Pulsinelli^[3] 方法,头背部正中切口,分离肌肉,暴露第一颈椎两侧翼小孔,用尖端 0.5 mm 直径的电烙铁烧灼凝固双侧椎动脉,电凝后缝合皮肤,24 h 后在动物清醒状态下结扎双侧颈总动脉。假手术组只分离翼小孔及颈总动脉,不电凝和结扎。实验过程中大鼠肛温控制在 35 ± 0.5 °C 范围内。L-精氨酸及 L-NNA 均给药 3 次,于电凝椎动脉前 1h,电凝椎动脉后 6h,结扎颈总动脉前 30 min 腹腔注射。结扎颈总动脉后 1h 断头取血。分别采用硝酸还原酶法^[4],黄嘌呤氧化酶法^[5],DTNB 直接法^[6],硫代巴比妥酸显色法^[7]测定脑组织中 NO 浓度,SOD 及 GSH-Px 活性,MDA 含量。

1.3 数据处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 统计软件进行组间差异 *t* 检验。

2 实验结果

2.1 脑组织中 NO 浓度的变化

如表 1 所示,生理盐水对照组的脑组织 NO 水平较假手术组的 NO 水平明显增高,说明在脑缺血时 NO 生成明显增多。给予 NO 的前体 L-精氨酸 NO 的水平进一步增高。L-NNA 可对抗单纯缺血和 L-精氨酸引起的 NO 水平的增加。

表 1

Tab 1 Effects of L-Arginine and L-NNA on NO concentration in brain tissue in cerebral ischemic rats

Groups	Doses (mg · kg ⁻¹)	<i>n</i>	NO Concentrations (μmol · L ⁻¹)
Sham		6	59 ± 11 ¹⁾
NS		6	76 ± 15
L-Arg	300	6	109 ± 21 ¹⁾
L-NNA	30	6	62 ± 6 ¹⁾
L-NNA+L-Arg		6	83 ± 14 ²⁾

Note: $\bar{x} \pm s$, ¹⁾ *P* < 0.05 compared with NS group, ²⁾ *P* < 0.05 compared with L-Arginine.

2.2 给予 L-Arginine 及 L-NNA 后脑组织中 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量的变化

如表 2 所示,生理盐水对照组脑组织中的 SOD, GSH-Px 活性明显降低。MDA 含量明显增加。说明脑缺血后脑细胞抗氧化活性降低,脂质过氧化增强。给予 NO 生成前体 L-Arginine 使缺血脑组织抗氧化酶活性进一步降低,脂质过氧化作用进一步增强。一氧化氮合酶阻断剂 L-NNA 可完全逆转 L-Arginine 所产生的作用。而 L-Arginine 和 L-NNA 二者对 GSH-Px 没有明显的影响。

表 2

Tab 2 Effects of L-Arginine and L-NNA on superoxide dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) activities, malondialdehyde(MDA) content in brain tissue in cerebral ischemia rats

Groups	Doses (mg · kg ⁻¹)	SOD (NU · mL ⁻¹)	GSH-Px (μmol · min ⁻¹ · L ⁻¹)	MDA (nmol · L ⁻¹)
sham		182 ± 8 ¹⁾	103 ± 4 ¹⁾	412 ± 25 ²⁾

Groups	Doses (mg · kg ⁻¹)	SOD (NU · mL ⁻¹)	GSH-Px (μmol · min ⁻¹ · L ⁻¹)	MDA (nmol · L ⁻¹)
NS		158 ± 17	96 ± 7	497 ± 31
L-Arg	300	131 ± 14 ¹⁾	96 ± 7	545 ± 34 ¹⁾
L-NNA	30	176 ± 6 ¹⁾	95 ± 9	369 ± 16 ²⁾
L-NNA+L-Arg		164 ± 14 ³⁾	92 ± 6	405 ± 40 ³⁾

Note: $\bar{x} \pm s$, ¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 compared with NS group; ³⁾ *P* < 0.01 compared with L-Arginine.

3 讨论

本研究采用 Pulsinelli “四血管”阻断脑缺血模型,用 NO 生成前体及 NOS 抑制剂 L-NNA 来研究大鼠脑缺血时 NO 对 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响。以进一步探讨 NO 在脑缺血中的损伤作用是否与脂质过氧化有关。

本实验研究表明给予 NO 生成前体 L-Arginine 可使缺血脑组织 SOD 活性进一步明显降低,MDA 含量较单纯缺血脑组织明显升高。NOS 抑制剂可完全逆转 L-Arginine 所引起的 SOD 活性下降及 MDA 含量升高。说明 SOD 活性与 MDA 含量的 NO 有关。当 NO 生成增多时,氧自由基增多,抗氧化酶 SOD 大量消耗,脂质过氧化产物 MDA 升高。由此推测在脑缺血时引起的 NO 增加可能会通过增加自由基的产生对脑组织产生损伤作用。本实验结果与申兆菊及杨自力等的实验结果一致。但关于 NO 引起氧自由基产生的机制尚不十分清楚。推测可能与下列因素有关:(1)通过过氧亚硝酸盐介导^[8],脑缺血后过量合成的 NO 通过与超氧阴离子反应生成过氧亚硝酸盐离子(ONOO⁻),ONOO⁻与 H⁺反应生成过氧亚硝酸,ONOO⁻与 H⁺反应生成过氧化硝酸,它可分解成羟自由基及二氧化氮,二者均可造成细胞蛋白质,核酸及脂质膜的损伤。(2)NO 还可通过引起各种非血红素 Fe-S 酶类失活及促使氧自由基的产生,线粒体中的琥珀酸氧化还原酶,顺乌头酸氧化还原酶等均为含有 Fe-S 中心的酶。NO 化学性质非常活跃,与铁有高度的亲和力,它与酶蛋白中的巯基和 Fe²⁺结合,使巯基亚硝酰化,Fe²⁺转化为 Fe³⁺,最终导致酶催化构型重排及铁释放而使酶失活,阻断细胞内能量合成^[9],导致氧自由基增多。本实验发现 NO 对 GSH-Px 的活性没有影响,可能是 GSH-Px 的活性中心上没有可供 NO 结合的位点^[1]。

参考文献

- [1] 申兆菊,肖希龙,周宗灿. 外源性一氧化氮对大鼠肝脏抗氧化酶和药物代谢酶活性的影响. 中国药理学与毒理学, 1999, 13 (2): 145.
- [2] 杨自力,王正国,吴恒义. 大鼠急性肺损伤早期肺组织一氧化氮和氧自由基的变化及其关系. 中华实验外科杂志, 1998, 15 (6): 491.
- [3] Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. Stroke, 1988, 19(7): 913.
- [4] 钟慈声,孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 上海医科大学出版社, 1997. 357.
- [5] 朱明德. 现代临床生物化学. 上海: 上海医科大学出版社,

1996,231.

- [6] 夏亦明,朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法. 卫生研究,1987,16(4):29.
- [7] 孙存普,张建中,短绍瑾. 自由基生物学导论. 合肥:中国科学技术大学出版社,1999,63.
- [8] Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, *et al.* Production

of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem*, 1992,281:419.

- [9] Sung YJ, Dietert RR. Nitric oxide(NO)-induced mitochondrial injury among chicked No-generating and target leukocytes. *J Leukocyte Biol*,1994, 56: 52.

收稿日期:2003-05-30