

论著·实验研究

新生大鼠脑白质损伤时神经胶质细胞 凋亡与 iNOS 的表达

王慧卿 熊英 郭文俊

(四川大学华西第二医院新生儿科,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)是缺氧缺血(HI)后引起一氧化氮过量产生的主要限速酶,该研究通过观察 HI 后神经胶质细胞凋亡及 iNOS 表达的变化,探讨新生大鼠脑白质损伤(WMD)的发病机制。方法 将 112 只 2 日龄未成熟大鼠随机分为 WMD 组和假手术(对照)组,建立新生大鼠 WMD 模型,分别于 HI 后 1 h、3 h、6 h、12 h、1 d、3 d 及 7 d 处死,采用免疫组织化学法检测脑组织 iNOS 的表达,TUNEL 法测定胶质细胞凋亡。结果 与对照组比较,WMD 组 iNOS 于 HI 后 1 h 表达开始上升,1 d 达到高峰;神经胶质细胞凋亡于 HI 后 1 h 显著增多,在 HI 后 1 d 达到高峰。结论 WMD 新生大鼠中 iNOS 的表达显著增高可能导致神经胶质细胞的凋亡,参与 HI 后 WMD 的病理生理过程。 [中国当代儿科杂志,2011,13(4):309-312]

[关键词] 脑白质损伤;诱导型一氧化氮合酶;凋亡;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0309-04

Expression of iNOS protein and gliocyte apoptosis in neonatal rats with white matter damage

WANG Hui-Qing, XIONG Ying, GUO Wen-Jun. Department of Neonatology, West China Second University Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China (Xiong Y, Email: xiongying246@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a main rate-limiting enzyme resulting in overproduction of nitric oxide following hypoxia-ischemia (HI). The aim of this study was to observe the expression of iNOS protein and gliocyte apoptosis in the brains of premature rats after HI, in order to explore possible relationships of iNOS with white matter damage (WMD). **Methods** One hundred and twelve 2-day-old premature rats were randomly subjected to right carotid ligation followed by 4 hrs hypoxic stress (WMD group) or sham operation (control group). The pups were sacrificed at 1, 3, 6, 12 hrs, and 1, 3 and 7 days after HI. Immunohistochemical technique was applied to determine the iNOS expression in periventricular white matter tissues. Gliocyte apoptosis was detected in these tissues by TUNEL. **Results** Compared with the control group, iNOS expression began to increase 1 hr after HI and reached the peak 1 day after HI in the WMD group. Gliocyte apoptosis increased 1 hr after HI and peaked 1 day after HI in the WMD group compared with the control group. **Conclusions** In the neonatal rats with WMD, the expression of iNOS may be involved in the ischemic cellular events including apoptosis, and plays a role in the pathophysiological process of WMD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):309-312]

Key words: White matter damage; Inducible nitric oxide synthase; Apoptosis; Neonatal rats

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是早产儿最常见的一种脑白质损伤(white matter damage, WMD),可对中枢神经系统的整体功能造成严重影响,引起痉挛性脑性瘫痪、认知及行为学异常等后遗症^[1-2]。脑白质神经胶质细胞中数量最多的是少突胶质细胞,而早产儿胎龄越小,其脑白质中少突胶质细胞的前体细胞含量越多。未成熟的晚期少突胶质(oligodendrocyte, OL)前体细胞具有缺

氧缺血易损性,是 PVL 病变的主要靶细胞,其缺氧缺血损伤后死亡方式主要为凋亡^[3]。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)是脑缺氧缺血后引起一氧化氮(NO)过量产生的主要限速酶,其在早产儿 WMD 中的作用机制尚不明确。因此本研究观察了新生大鼠 WMD 后神经胶质细胞凋亡和 iNOS 的表达变化,以期对早产儿 WMD 的临床干预提供一定的理论依据。

[收稿日期]2010-06-05; [修回日期]2010-08-27

[作者简介]王慧卿,女,硕士研究生。

[通信作者]熊英,教授。

1 材料与方法

1.1 材料

2日龄清洁级 Sprague-Dawley (SD) 未成熟鼠 112只(由四川省医学科学院实验动物中心提供); iNOS 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Roche 公司)、SP 试剂盒(北京中山生物技术公司)、DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术公司)均购自成都精博生物技术有限公司; OLYMPUS DIGITAL CAMERA DP70 数码相机 Viewfinder 4.0 图像采集系统。

1.2 动物模型建立和实验分组

SD 新生大鼠随机分为 WMD 组和假手术组(对照组)。参照 Back 等^[3]的方法建立新生大鼠 WMD 模型:分离并双线结扎右侧颈总动脉,缝合消毒后置于自制常压缺氧舱内,输入含氧气 6%、氮气 94% 的混合气体(流量 1.5 L/min)。4 h 后取出置于常氧母鼠笼中。对照组仅分离右侧颈总动脉而不予结扎和缺氧处理。各组又根据缺氧后处死时间分为 1 h、3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、7 d 等 7 个亚组($n=8$)。

1.3 标本取材和制备

动物吸入乙醚麻醉,开胸后经左心室灌注 0.9% 生理盐水 100 mL,4℃ 4% 多聚甲醛溶液(0.1M PBS 配制,pH7.4)100 mL,至肝脏明显变白及肺脏明显水肿后开颅取脑组织,置于 4% 多聚甲醛溶液固定 12 h,经梯度酒精脱水、二甲苯透明后石蜡包埋,自视交叉向后行连续冠状切片(5~6 μm)。

1.4 脑组织苏木精-伊红染色

石蜡切片二甲苯常规脱蜡处理后,依次入 100% 乙醇 5 min、95% 乙醇 5 min、80% 乙醇 5 min、蒸馏水 5 min,苏木精染色 8 min,自来水冲洗玻片,1% 盐酸酒精分化 20 s,流水冲洗反蓝 15 min,0.5% 水溶性伊红染液染色 30 s,分别经 70%、85%、95%、100% 乙醇脱水,各级为 5 min,常规透明、封片。

1.5 脑组织 iNOS 免疫组织化学

采用 SP 法,石蜡切片经常规脱蜡处理后 3% H_2O_2 避光浸泡 30 min,枸橼酸缓冲液行抗原修复,10% 山羊血清 37℃ 孵育 30 min 后加入 iNOS 兔多克隆抗体(1:100) 37℃ 孵育 30 min 后 4℃ 过夜;加入生物素标记的羊抗兔 IgG 37℃ 孵育 30 min,辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液中 37℃ 孵育 30 min 后 DAB 显色试剂盒显色,苏木精复染,常规

脱水、透明、封片。阴性对照:以 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行免疫组织化学反应。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡

切片常规脱蜡,复水,加蛋白酶 K 液(20 mg/L) 37℃ 30 min,3% H_2O_2 阻断内源性辣根过氧化物酶,加入 TdT 反应液 37℃ 孵育 90 min,加入 TB 缓冲液室温 15 min 终止反应;HRP 标记的链霉卵白素工作液孵育 37℃ 1 h 后 DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片。阴性对照以 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行反应。

1.7 图像分析

OLYMPUS DP70 数码相机 Viewfinder 4.0 图像采集系统采图,Image pro plus 6.0 软件对图像进行分析。每张切片于放大 400 倍镜下同一部位随机选取 5 个不同的视野采图,免疫组化检测测量阳性细胞的积分光密度(IOD),求其平均数作为最后的阳性结果;凋亡检测随机选择 5 个高倍视野(400 倍)并计数阳性细胞,记录凋亡细胞数。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据比较采用 F 检验及 Post Hoc (q) 检验,两组之间比较采用两独立样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理改变

对照组脑室周围白质结构致密,神经胶质细胞排列整齐,胞核大,胞浆少。WMD 组缺氧缺血后 1 d 可见白质区胶质细胞胞体肿胀、细胞稀疏、排列紊乱、结构不清;3 d 可见侧脑室旁白质出现疏松及筛网状坏死(图 1)。7 d 可见脑白质广泛疏松及泡沫状巨嗜细胞增多。

2.2 脑室周围白质区 iNOS 的表达变化

iNOS 免疫阳性细胞胞浆为棕黄色,着色浅,少部分位于胞核,细胞核大多为蓝色。对照组的 iNOS 在脑室周围白质区有微弱表达,随日龄增加无明显变化。WMD 组的 iNOS 于缺氧缺血后 1 h 表达开始升高,于 1 d 表达达到高峰,随后逐渐下降,各组间差异有统计学意义($P < 0.001$)(图 2)。WMD 组 iNOS 表达在各时间点均高于对照组($P < 0.001$),见表 1、图 4。

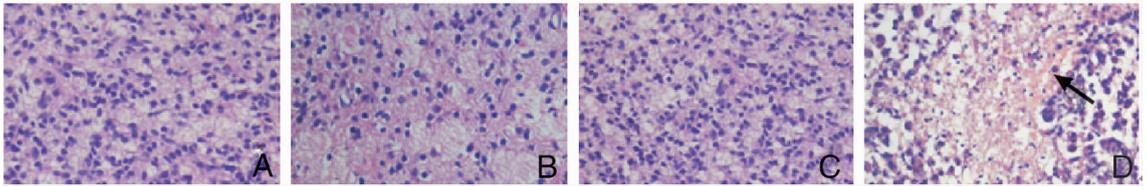


图1 脑组织苏木精-伊红染色(×200) A:对照组1 d,脑室周围白质结构致密;B:WMD组1 d,脑室周围白质疏松;C:对照组3 d,神经胶质细胞排列整齐,结构致密;D:WMD组3 d,白质筛网状坏死。箭头指向为筛网状坏死。

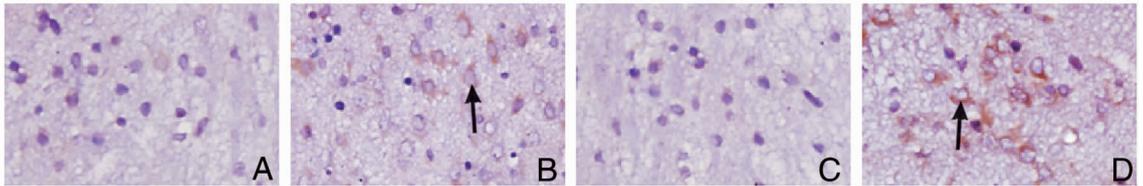


图2 脑组织iNOS免疫组化染色(×400) A、C分别为对照组1 d和3 d脑组织iNOS表达,可见少量阳性细胞;B、D为WMD组1 d和3 d脑组织,可见较多阳性细胞。箭头指向为阳性细胞。

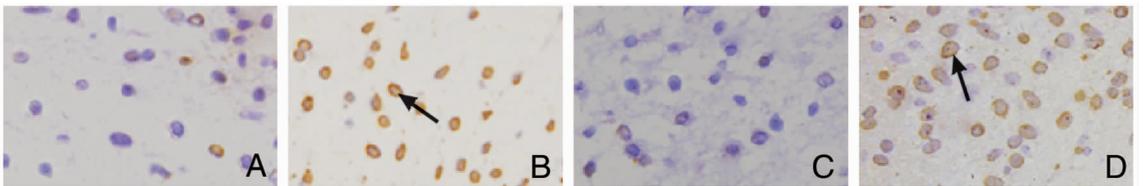


图3 脑组织TUNEL法染色(×400) A、C分别为对照组1 d和3 d脑室周围白质区,可见少量凋亡细胞;B、D分别为WMD组1 d和3 d,可见较多凋亡细胞。箭头指向为凋亡细胞。

表1 两组大鼠各时间点iNOS的IOD值比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 1 d | 3 d | 7 d | F 值 | P 值 |
|-------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|--------|
| 对照组 | 8 | 22.7 ± 1.9 | 21.7 ± 1.2 | 21.9 ± 1.0 | 21.7 ± 1.3 | 22.7 ± 1.5 | 21.1 ± 1.1 | 20.8 ± 1.6 | 1.32 | 0.061 |
| WMD 组 | 8 | 25.4 ± 1.7 ^{a,b} | 37.9 ± 1.9 ^{a,b} | 53.3 ± 2.1 ^{a,b} | 61.9 ± 1.7 ^{a,b} | 74.0 ± 2.2 ^{a,b} | 57.3 ± 2.2 ^{a,b} | 26.3 ± 2.5 ^{a,b} | 433.199 | <0.001 |
| t 值 | | 47.3 | 355.1 | 739.8 | 714.7 | 1330.5 | 1014.0 | 131.0 | | |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | | |

a: 与同时点对照组比较, $P < 0.001$; b: 与同组内其他时间点比较, $P < 0.001$

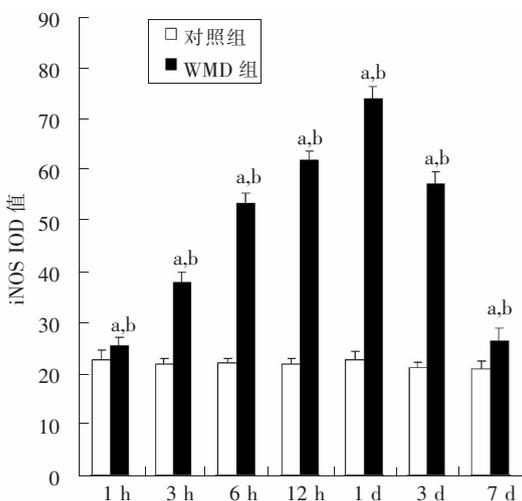


图4 两组大鼠各时间点iNOS的IOD值比较 a: 与同时点对照组比较, $P < 0.001$; b: 与同组内其他时间点比较, $P < 0.001$

2.3 脑室周围白质区神经胶质细胞凋亡的变化

TUNEL法检测的凋亡阳性细胞表现为细胞核呈棕黄色,胞体缩小,染色质浓集、核裂解以及核周新月体样浓集染色质,细胞内可见深色凋亡小体。本研究发现对照组各时间点只有少量阳性细胞数,WMD组凋亡阳性细胞数在缺氧缺血后1 h开始增加,1 d达到高峰,随后逐渐下降,各组间差异有统计学意义($P < 0.001$),而且WMD组各时间的凋亡细胞数明显高于对照组($P < 0.001$),见表2、图3、图5。

2.4 WMD组TUNEL阳性细胞数与iNOS表达的相关性分析

WMD组脑室周围白质区TUNEL阳性细胞数与iNOS表达相关分析发现,相关系数 $r = 0.961$, $P < 0.001$,提示二者之间为正性直线相关关系。

表2 两组大鼠各时间点凋亡阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 1 d | 3 d | 7 d | F 值 | P 值 |
|-----|----|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------|--------|
| 对照组 | 8 | 42.2 ± 2.7 | 41.5 ± 2.7 | 40.0 ± 2.7 | 39.5 ± 2.9 | 40.8 ± 3.0 | 39.6 ± 3.0 | 38.8 ± 2.8 | 2.04 | 0.052 |
| 实验组 | 8 | 45.3 ± 3.5 ^{a,b} | 110.6 ± 3.7 ^{a,b} | 142.9 ± 3.7 ^{a,b} | 160.7 ± 4.0 ^{a,b} | 190.2 ± 5.6 ^{a,b} | 122.7 ± 4.5 ^{a,b} | 70.2 ± 4.6 ^{a,b} | 365777 | <0.001 |
| t 值 | | 67.4 | 518.1 | 896.1 | 713.2 | 785.6 | 698.4 | 290.6 | | |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | | |

a: 与同时点对对照组比较, $P < 0.001$; b: 与同组内其他时间点比较, $P < 0.001$

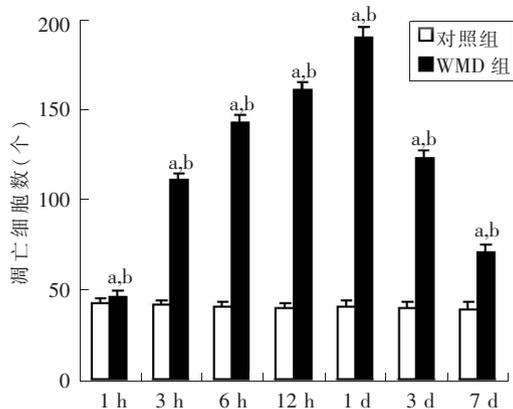


图5 两组大鼠各时间点凋亡阳性细胞数比较 a: 与同时点对对照组比较, $P < 0.001$; b: 与同组内其他时间点比较, $P < 0.001$

3 讨论

本研究发现 WMD 组脑白质神经胶质细胞凋亡在缺氧缺血后 1 h 开始增多, 在 1 d 达到高峰, 并持续至 7 d, 推测脑室周围白质神经胶质细胞的凋亡与缺失会造成髓鞘形成障碍, 进而造成新生大鼠 WMD。

内源性 NO 由 L-精氨酸在一氧化氮合酶 (NOS) 的作用下氧化生成。目前已经发现 3 种 NOS 亚型: 神经元型 NOS (nNOS)、内皮型 NOS (eNOS) 和诱导型 NOS (iNOS)。iNOS 在生理状态下不表达, 在病理状态下 (如缺氧缺血和神经损伤后) 表达明显增加, 其表达为非 Ca^{2+} 依赖性^[4]。Kaur 等^[5] 发现, 新生大鼠缺氧性脑损伤时 NO 表达增加。使用 iNOS 抑制剂可以阻断 NO 的脑损伤作用, 减轻血脑屏障的破坏、脑组织和血管内皮的损伤, 从而减少梗死面积^[6]。本研究中 WMD 组 HI 后 1 h 在脑室周围白质内的神经胶质细胞出现 iNOS 阳性表达并持续至 7 d, 推测组织损伤和免疫反应诱导合成 iNOS, 导致大量 NO 生成, 高浓度 NO 则具有极强的神经毒性作用^[7], 可导致迟发性神经胶质细胞死亡。

本研究中 WMD 组缺氧缺血后 1 d iNOS 的表达达到高峰, 随后逐渐下降。脑缺氧缺血后 TUNEL 阳性细胞的高峰时相也位于 1 d 左右, 这与 iNOS 的表达高峰时相基本吻合, 且 TUNEL 阳性细胞数与 iNOS 表达的变化趋势一致。提示 iNOS/NO 参与缺氧缺血后新生鼠脑白质神经胶质细胞的凋亡, 以过量的 NO 促进神经胶质细胞凋亡, 其机制可能包括以下几个方面^[8-10]: (1) NO 反应生成超氧自由基,

造成膜脂质过氧化及蛋白质酪氨酸硝基化反应, 可诱导 DNA 损伤; (2) NO 极易与 Fe 结合形成 Fe-NO, 使含铁、硫的酶失活, 从而抑制线粒体呼吸, 阻断细胞内能量合成及 DNA 的复制; (3) NO 能直接作用于线粒体, 改变线粒体通透跃迁孔的性能, 抑制线粒体功能而致神经胶质细胞凋亡; (4) 缺氧缺血损伤谷氨酸盐转运系统, 导致细胞外谷氨酸盐大量堆积, 胞外大量谷氨酸可造成钙超载, 从而激活 iNOS 过表达, 生成过量 NO, 损伤 OL 前体细胞; (5) NO 作为氧自由基启动 p53 基因, 使之堆积并阻止细胞进入 DNA 合成期, 同时降低 Bcl-2 和上调 Bax, 促使 Bcl-2/Bax 比例失调, 激活 caspase 酶家族, 尤其是 caspase-3, 促进 OL 前体细胞凋亡。

综上所述, 神经胶质细胞凋亡和 iNOS/NO 在早产儿 WMD 损伤的发生和发展中起着重要作用, 同时两者之间还存在着复杂的相互作用, 随着对两者生物学效应和病理生理学意义的深入研究, 可能为临床治疗早产儿 WMD 提供一条新的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Deng W, Pleasure J, Pleasure D. Progress in periventricular leukomalacia[J]. Arch Neurol, 2008, 65(10): 1291-1295.
- [2] 李晋辉, 母得志. 早产儿缺氧缺血性脑白质损伤的神经病理学[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 94-96.
- [3] Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia[J]. J Neurosci, 2002, 22(2): 455-463.
- [4] Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications[J]. Nitric Oxide, 2009, 20(4): 223-230.
- [5] Kaur C, Sivakumar V, Ling EA. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia[J]. J Pineal Res, 2010, 48(3): 185-193.
- [6] Mark LA, Robinson AV, Schlak JA. Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2005, 129(2): 236-241.
- [7] Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia[J]. Neuroscientist, 2010, 16(4): 435-452.
- [8] Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain[J]. Prog Neurobiol, 2005, 76(2): 126-152.
- [9] 杨志仙, 秦炯, 常杏芝. 一氧化碳和一氧化氮对热性惊厥大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(8): 231-234.
- [10] Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease[J]. Prog Neurobiol, 2005, 75(3): 207-246.

(本文编辑: 王庆红)