

·论著·

结构型一氧化氮合酶基因表达在 新生鼠缺氧性脑损伤中的作用

郑大同 李述庭 吴中国 高雁翎 陈舜年

[摘要] 目的 探讨结构型一氧化氮合酶(cNOS) mRNA表达在新生鼠缺氧性脑损伤发病中的作用。方法 取新生SD大鼠25只随机分组制作模型并行病理鉴定;采用RT-PCR测定脑缺氧1 h、4 h和对照组脑组织细胞内cNOS mRNA表达的变化,辉度扫描获取数值。结果 鼠缺氧1 h后脑组织中cNOS mRNA表达显著上升($P < 0.01$),4 h组较1 h组下降($P < 0.01$),但仍显著高于对照组($P < 0.01$)。结论 脑缺氧早期cNOS mRNA表达增加,由其合成的NO对受损脑组织可能起保护作用。

[关键词] 缺氧性脑损伤;一氧化氮合酶;新生鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)01-0021-03

The Role of Intracellular cNOS mRNA Expression in Neonatal Rats with Hypoxic Brain Damage

ZHENG Da-Tong, LI Shu-Ting, WU Zhong-Kuang, et al.

Department of Prediatric, Second Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210011

Abstract: **Objective** To elucidate the role of cNOS mRNA expression in the pathogenesis of hypoxic brain injury after neonatal hypoxia. **Methods** RT-PCR was used to measure cNOS mRNA gene expression in brain cells obtained from a neonatal rat model of hypoxia ($n = 25$). **Results** The expression of cNOS mRNA in both 1 and 4 hour hypoxic groups was both increased compared with that in the control group ($P < 0.01$), but it was decreased in the 4 hour group compared with the 1 hour group ($P < 0.01$). **Conclusions** NO synthesized by cNOS mRNA in the early hypoxic phase might have some protective effect on hypoxic brain tissues.

Key words: Hypoxic brain injury; Nitric oxide synthase; Neonatal rat

新生儿缺氧性脑病(hypoxic encephalopathy)是围产期新生儿窒息的主要病理变化,可导致永久性神经功能损害,是围产期新生儿脑损伤的主要原因。近年来,人们注意到一氧化氮(nitric oxide, NO)在神经系统的生理活动中起着重要作用,由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化合成。NOS有3种同工酶,其中神经型(nNOS)和内皮细胞型(eNOS)同属于结构型NOS(constitutive NOS, cNOS),第三种是诱生型NOS(iNOS)^[1]。

人们发现,病理性刺激可导致NO过度生成并起神经毒性作用。研究显示脑损伤时能产生大量的NO。Malinski^[2]用微电极探针发现鼠脑缺血后NO迅速升高。Kader^[3]在局灶脑缺血后数分钟发现亚

硝酸离子,cGMP及NOS活性增加。本课题拟在建立新生鼠缺氧性脑病模型的基础上,采用半定量RT-PCR技术测定损伤脑组织内cNOS mRNA表达变化,观察其对脑损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型 取纯种新生SD大鼠25只,雌雄不限,重量12~14 g,随机分成缺氧1 h组(7只)、缺氧4 h组(7只)及对照组(11只)。按Rice^[4]的方法将新生SD鼠置于8%O₂+92%N₂(V/V)的缺氧箱内建立新生鼠缺氧模型,取左半内侧0.5 cm厚脑

[作者简介] 郑大同,男,1965出生,学士,在职硕士,主治医师。

[作者单位] 210011 南京医科大学第二附属医院儿科(郑大同,李述庭,吴中国); 200025 上海第二医科大学瑞金医院儿科,上海瑞金二路197号(高雁翎,陈舜年)

组织制作匀浆进行测定。根据临床表现与脑组织光镜和电镜检查鉴定模型。

- 1.1.2 仪器 DNA 扩增仪、荧光辉度扫描仪。
- 1.1.3 试剂 变性溶液、Taq 酶及其缓冲液系统，AMV 逆转录酶系统。引物序列如下：

cNOS：
5'CCGGATCCTCCAGGAGGGTGTCCACCCCATG 3'
5'CCGGAATTCGAATACCA CCTGATCCATGAA 3'
该引物扩增的 cDNA 产物长度为 614bp。

对照物 β -actin
5' GGA TCCA GCCTCAAA GA GCTTAC 3'
5' GAATTCCAAGA GCCTTGA GCAATGGA 3'
该引物扩增产物长度为 280bp。

1.2 实验方法

按 Chomczynski^[5]介绍的一步法抽提 RNA ,测定浓度及纯度后逆转录生成 cDNA ,经 DNA 扩增反应 ,产物上样于 1.5 %琼脂糖凝胶电泳 ,Polaroid 成像 ,照片光密度扫描 ,半定量计算 cNOS 的含量。

1.3 统计学分析

采用方差分析。先进行方差的齐性检验 ,然后在各组份间用 q 检验进行多重比较。

2 结果

2.1 模型检验

光镜 1 h 组变化轻微 ,脑组织有轻度水肿 ,细胞

体积轻度增大 ,毛细血管周围间隙扩张不明显。4 h 组脑细胞明显水肿 ,组织疏松 ,毛细血管周围空隙明显。电镜可见线粒体结构破坏。见图 1。

2.2 cNOS mRNA 的表达

大鼠 1 h 和 4 h 组的 cNOS mRNA 表达均较对照组显著上升 ($P < 0.01$) ,4 h 组较 1 h 组明显下降 ($P < 0.01$)。见表 1 ,图 2。

表 1 cNOS mRNA 表达半定量值

Table 1. Relative value of cNOS mRNA expression in each group

组别	n	半定量值
对照组	11	0.74 $\pm$ 0.03
1 h 组	7	0.91 $\pm$ 0.02 *
4 h 组	7	0.87 $\pm$ 0.02 *

*与对照组相比 , $P < 0.01$

3 讨论

NO 是一种重要的信使分子 ,它在血管、免疫尤其神经系统有广泛的生物学作用。生理条件下 ,NO 是不典型递质或细胞信使 ,在脑缺血或脑缺血再灌注损伤中具有神经保护和神经毒性两种倾向 ,过量生成或在病理性刺激时能产生神经毒性^[1,6,7]。NOS 以 L - 精氨酸 (L - Arg) 为底物 ,在 NADPH ,FMN ,FAD 及 BH4 等因子辅助下催化合成 NO 和 L - 瓜氨酸。NO 性质活泼半衰期极短。对 NOS 及其基因表达变化的研究是对 NO 进行深入探讨的重要环节。

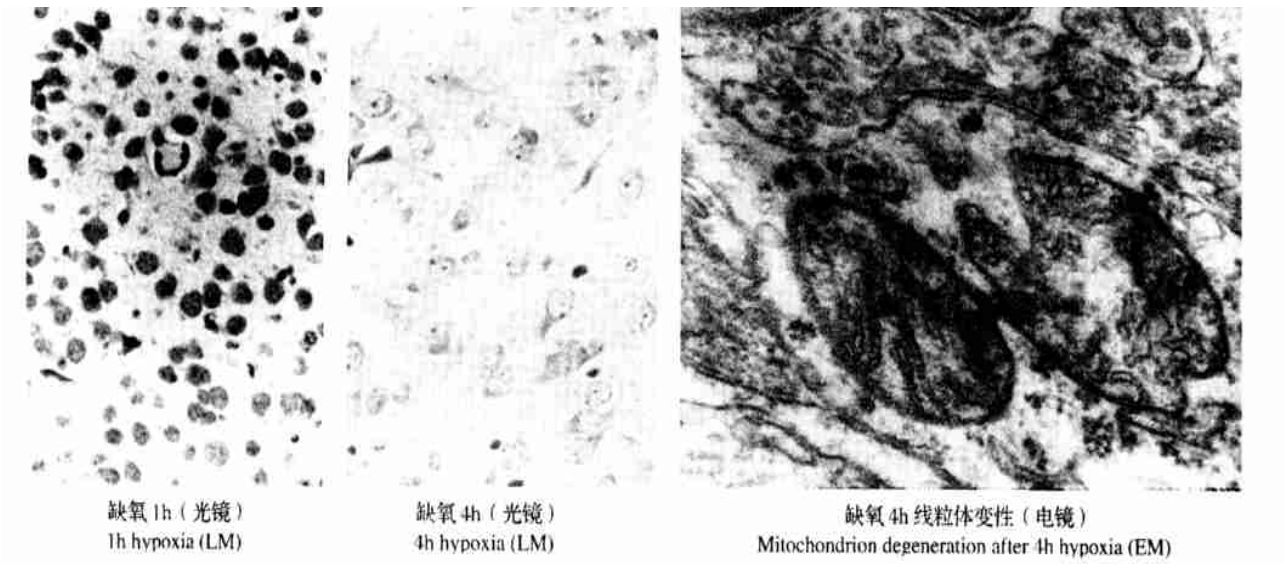


图 1 缺氧 1 h、4 h 病理照片
Fig 1. Pathological photo of 1 h , 4 h hypoxia

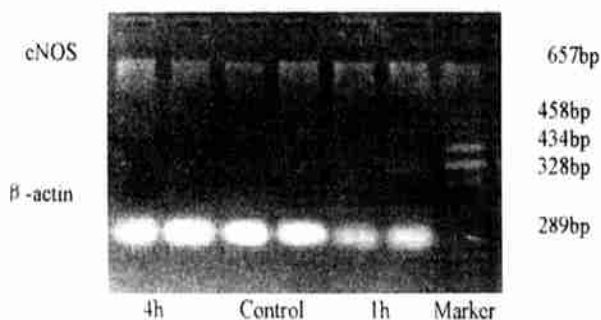


图 2 cNOS 扩增电泳图

Fig 2. Electrophoresis of cNOS PCR product

cNOS 以非活性形式存在于某些细胞中,可被相应的激动剂迅速激活,激活后酶活力持续时间很短。cNOS 的活力完全依赖钙及钙调蛋白的作用,引起 NO 短暂释放。cNOS 每次激活合成少量 NO,钙离子浓度下降,cNOS 失活;钙浓度再次升高,cNOS 也可被再度激活,生物效应以细胞间信息传递为主^[1]。

NO 对脑缺氧的影响是脑损伤研究的一个重点,本实验组织学变化显示缺氧 1 h 的病理改变轻微而 4 h 的病理改变极为显著。相应的缺氧后脑组织中 cNOS mRNA 在 1 h,4 h 时表达均较对照组增加 ($P < 0.01$),但 4 h 组较 1 h 组明显下降 ($P < 0.01$)。可见缺氧早期脑组织中 cNOS mRNA 表达迅速上升对缺氧脑组织可能起保护作用。这也与以往报道相似^[7]。

研究发现脑损伤早期脑组织中 NO 急剧上升^[8,9],由于从 cNOS mRNA 表达达到其所至的 cNOS 发挥作用尚有一段时间,故损伤早期(10~20 min)脑组织中的 NO 生成是通过脑细胞内 Ca^{2+} 内流增加达到一定浓度激活了胞内静态的 cNOS,和通过磷酸酶使磷酸化的 NOS 脱磷酸而间接激活 NOS。随后 cNOS 基因表达大量增加,共同导致损伤后早期的 NO 大量生成。早期生成的 NO 由于其短暂的特性,产生神经毒性作用的可能性较小;相反,它通过 NO/cGMP 途径使脑血管扩张,增加脑血流,抗血小板聚集,以及抑制多形核白细胞粘附^[7,9,10],从而起对抗缺氧脑损伤的保护作用^[9,11]。另外,在神经元培养试验

中发现,NO 供体如果有利于 NO^+ 的生成则可能使 NMDA 受体巯基亚硝酸化,从而使该受体下调,减轻 NMDA 受体介导的神经毒性^[6],由此发挥神经保护作用。随着缺氧后脑组织受损,表达 cNOS 的神经元减少,可使 cNOS 表达下降。这与晚期 cNOS mRNA 表达下降相符。

[参 考 文 献]

- [1] 张利群,刘敬忠. 一氧化氮合成酶研究进展. 国外医学分子生物学分册,1996, 18: 34~38.
- [2] Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, et al. Nitric oxide measured by a prophic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab, 1993, 13: 355~358.
- [3] Kader A, et al. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia. Stroke, 1993, 24: 4.
- [4] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic - ischemic brain damage in the rat. Annals of Neurology, 1981, 9: 131.
- [5] Chomczynski P, Nicoletta S. Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987, 162: 157~159.
- [6] Lipton SA, et al. A redox based mechanism for the neuro - protective and neurodestructive effects of nitric oxide and elated nitroso - compounds. Nature, 1993; 364: 626~629.
- [7] 张天锡,赵卫国,田恒力. NO 对兔急性局灶性脑缺血后早期脑水肿和缺血灶的保护作用. 急症医学,1995, 4: 133~135.
- [8] 张登海. 诱导型一氧化氮合成酶分子生物学进展. 国外医学分子生物学分册,1995, 17: 55.
- [9] Zhang F, Wight JG, Iadecola C. Nitric oxide donors increase blood flow and reduce brain damage in focal ischemia: evidence that nitric oxide is beneficial in the early stages of cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14: 217~226.
- [10] Iadecola C, Xu X, Zhang FY, et al. Marked induction of Calcium independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15: 52~57.
- [11] Morikawa E, Moskowitz M, Huang Z, et al. L - Arginine infusion promotes nitric oxide - dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction in rat. Stroke, 1994, 25: 429~435.

(收稿日期:1999 - 08 - 23 修回日期:1999 - 11 - 15)

(本文编辑:黄志强)