

· 实验研究 ·

一氧化碳对热性惊厥大鼠海马 一氧化氮合酶/一氧化氮体系的影响

杨志仙, 秦炯, 杜军保, 常杏芝, 韩颖

(北京大学第一医院儿科, 北京 100034)

[摘要] 目的 反复热性惊厥(FS)后血红素氧合酶(HO)/一氧化碳(CO)系统和一氧化氮合酶(nNOS)/一氧化氮(NO)系统上调,但二者相互关系不清。本研究观察HO抑制剂锌原卟啉IX(ZnPP-IX)对FS大鼠海马神经元型NOS(nNOS) mRNA和蛋白表达及NO含量的影响,以探讨CO对NOS/NO体系的调节作用。方法 采用热水浴诱导大鼠FS,隔日诱导1次,共诱导10次。发育期大鼠随机分为3组:对照组,FS组,FS+ZnPP-IX组(均 $n=16$)。分光光度计间接测定血浆CO和NO含量;核酸原位杂交法检测海马nNOS mRNA表达;Western-blot方法检测海马nNOS蛋白含量。结果 反复FS后海马nNOS mRNA和蛋白表达增高。用ZnPP-IX进行干预后,血浆CO含量下降,海马nNOS mRNA和蛋白表达及血浆NO含量呈现一致性的显著。结论 反复FS时,外源性给予HO抑制剂ZnPP-IX可抑制HO/CO系统,降低血浆CO,增加神经元NOS的基因表达及NO含量,提示CO可能下调NOS/NO系统活性。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(4):341-344]

[关键词] 惊厥, 发热性; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 一氧化碳; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)04-0341-04

Effect of carbon monoxide on nitric oxide synthase / nitric oxide system in hippocampus of rats with febrile seizures

Zhi-Xian YANG, Jiong QIN, Jun-Bao DU, Xing-Zhi CHANG, Ying HAN. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Qin J, Email: qinjiong@263.net)

Abstract: Objective Heme oxygenase(HO)/carbon monoxide(CO) system and nitric oxide synthase(NOS)/nitric oxide(NO) system are up-regulated after recurrent febrile seizures(FS). The relationship between HO/CO and NOS/NO systems is unknown. This study examined the effect of the HO inhibitor zinc protoporphyrin IX (ZnPP-IX) on the expression of neuronal NOS (nNOS) mRNA and protein and also the plasma NO content in rats with recurrent FS. The goal was to study the effect of CO on the NOS/NO system. **Methods** Forty-eight developing rats were randomly assigned into three groups: Control group, FS group, and ZnPP-IX-treated FS group ($n=16$ each). FS were induced in rats by exposure to warm water bath, once every 2 days, 10 times in all. Plasma levels of NO and CO were detected by spectrophotometry. The expression of nNOS mRNA was detected in hippocampal neurons by in situ hybridization. nNOS protein expression in hippocampal neurons was examined by Western blot analysis. **Results** Recurrent FS induced an increased expression of nNOS mRNA and protein in hippocampal neurons. ZnPP-IX treatment decreased the concentrations of CO in plasma and increased the expression of nNOS mRNA and protein in hippocampal neurons and the NO content in plasma. **Conclusions** Exogenously administering the HO inhibitor ZnPP-IX may increase the nNOS gene expression and NO production in recurrent FS, suggesting that CO might down-regulate the activity of NOS/NO system.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(4):341-344]

Key words: Seizures, febrile; Nitric-oxide synthase; Nitric oxide; Carbon monoxide; Rats

热性惊厥(febrile seizures, FS)是小儿时期最常见的惊厥性疾病,在6个月到6岁儿童中发病率约为2%~5%^[1]。一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧

化碳(carbon monoxide, CO)是两种新型的气体信号分子,在神经系统多种生理和病理生理过程中发挥着重要的作用。反复FS后内源性血红素氧合酶

[收稿日期] 2004-10-11; [修回日期] 2005-02-28

[基金项目] 卫生部临床学科重点项目基金(编号 20010912)

[作者简介] 杨志仙(1970-),女,博士研究生,主治医师。主攻方向:气体分子与热性惊厥脑损伤。

[通讯作者] 秦炯,北京市西城区西安门大街1号,北京大学第一医院儿科,邮政编码 100034。

(heme oxygenase, HO)/CO 系统明显上调^[2],同时还发现 FS 时一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)/NO 系统有改变^[3],目前还不清楚二者在 FS 中的相互影响。本研究通过应用 HO 的抑制剂 Zn-PP-IX,探讨 CO 对 NOS/NO 系统的调节作用,以期在气体信号调节网络上对反复 FS 的病理机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 反复 FS 动物模型建立和实验分组

实验动物为 SD 大鼠(购自中国医学科学院动物研究所),日龄 21 d,体重 50~80 g,随机分为对照组(37.0℃ 水浴, $n=16$),FS 组(45.2℃ 水浴, $n=16$),FS + ZnPP-IX 组(45.2℃ 水浴, $n=16$)。采用热水浴诱导大鼠 FS^[4,5],每次诱导时间不超过 5 min,隔日诱导 1 次,共诱导 10 次。每次水浴处理前 30 min 予 FS + ZnPP-IX 组大鼠腹腔注射 ZnPP-IX (45 $\mu\text{mol/kg}$),对照组及 FS 组大鼠予腹腔注射相同容积的生理盐水,3 组大鼠的饲养条件相同。

1.2 标本的取材和制备

所有大鼠于最后一次水浴处理后 24 h 取材。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,经腹主动脉留取大鼠肝素化抗凝血 3 mL 左右,离心后取血浆,置-70℃ 冰箱保存以备测 CO 和 NO 含量。实验大鼠每组中半数打开胸腔,经左心室快速灌注生理盐水 10~30 mL,继而以含 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L 磷酸缓冲液进行内固定,断头取脑,置上述缓冲液中后固定 18~20 h,液态氮速冻,冰冻冠状切片,切片厚度 10 μm ,用于组织原位杂交。半数大鼠不需灌注,直接断头取脑,剥离海马,-70℃ 冰箱保存,用于 Western blot 检测。

1.3 血浆 CO 含量的间接测定

根据碳氧血红蛋白(HbCO)和氧合血红蛋白(HbO₂)吸收光谱的差异,选择 HbCO 吸光度之差最大而 HbO₂ 吸光度之差为零的两个波长(564 nm 和 582 nm),应用双波长分光光度计测定血浆在这两个波长下的吸光度之差(ΔD),而后将 ΔD 代入由标准曲线得出的公式中,求出 HbCO 的百分比。标准曲线是将 100% HbCO 和 100% HbO₂ 按不同比例配制,在 564 nm 和 582 nm 下求得的 HbCO% 与 ΔD 的相关曲线。参考 Chalmers 公式计算 CO 含量^[6]:

$$\text{血浆 CO } (\mu\text{mol/L}) = \text{HbCO } (\%) \times \text{Hb } (\text{mg/L}) \times 4\,000 / (64\,456 \times 100 \times X)$$

式中 X 为所测血浆的容积(mL),64 456 为 Hb

分子量。

1.4 血浆 NO 含量的间接测定

NO 试剂盒购自北京邦定生物制品公司。应用硝酸还原酶法,按照试剂盒提供的测定步骤,以国产 721 分光光度计测定血浆中 NO²⁻/NO³⁻ 含量,反映血浆 NO 水平。

1.5 NOS 原位杂交检测

神经元型 NOS(nNOS)原位杂交试剂盒购自天津博士德公司。试剂盒中含地高辛标记的 nNOS 寡核苷酸探针。冰冻切片用 H₂O₂ 室温处理 30 min 以灭活内源性过氧化物酶,复合消化液 37℃ 消化 2 min,滴加 20 μL 原位杂交液,37℃ 杂交 2 h,探针稳定液 37℃ 稳定 20 min,洗涤后依次滴加兔抗地高辛、生物素化羊抗兔 IgG、SABC、DAB 显色。组织不加探针为阴性对照。光镜下检测原位杂交阳性信号为细胞浆内棕黄色颗粒。

1.6 Western blot 检测 nNOS 蛋白表达

海马组织加入组织裂解液,超声匀浆,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,Bradford 法测定蛋白浓度,取样品(100 μg 蛋白)进行 SDS-PAGE 电泳,转入硝酸纤维素膜,封闭,兔抗大鼠 nNOS (1:1 000 稀释)杂交过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:10 000 稀释) 37℃ 反应 1 h,利用化学发光法进行显色,计算机灰度扫描处理。对照组的值设定为 1。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 10.0 进行统计学处理。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间比较用单因素方差分析(F 检验)及 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热水浴诱导大鼠 FS

所有暴露于 37.0℃ 水浴中的大鼠均未发生惊厥,而暴露于 45.2℃ 热水浴中的大鼠,每次均在 5 min 内发展为惊厥。大鼠的惊厥级别多为 4-5 级,占总惊厥的 90% 以上。FS 组和 FS + ZnPP-IX 组的惊厥强度无明显区别。

2.2 ZnPP-IX 对血浆 CO 含量的影响

FS 组大鼠血浆 CO 含量较对照组高,差异有显著性;FS + ZnPP-IX 组大鼠血浆 CO 含量较 FS 组低,差异有显著性,而与对照组比较差异无显著性。(表 1)

2.3 ZnPP-IX 对血浆 NO 含量的影响

反复 FS 后 24 h 血浆 NO 含量与对照组比较略

有升高,但无统计学意义;用 ZnPP-IX 对反复 FS 进行干预后,血浆 NO 含量较 FS 组和对照组增高,差异具有显著性。(表 1)

表 1 三组大鼠血浆 NO 和 CO 含量及海马 nNOS 蛋白含量的比较
($n = 16, \bar{x} \pm s$)

组别	CO (mmol / L)	NO (mmol / L)	nNOS
对照组	2.6 ± 0.4	66.8 ± 5.6	1.0 ± 0.0
FS 组	5.0 ± 0.3^a	72.0 ± 8.4	1.4 ± 0.3^a
FS + ZnPP-IX 组	3.0 ± 0.4^b	$91.2 \pm 10.2^{a,b}$	$1.8 \pm 0.3^{a,b}$

a 与对照组比较 $P < 0.01$; b 与 FS 组比较 $P < 0.01$

2.4 ZnPP-IX 对海马 nNOS mRNA 表达的影响

反复 FS 组大鼠海马 nNOS mRNA 表达强度均对照组明显增强;ZnPP-IX 的干预使 nNOS mRNA 表达强度较 FS 组进一步增加(图 1)。

2.5 ZnPP-IX 对海马 nNOS 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,三组大鼠均有 nNOS 蛋白(分子量 160 KD)表达。应用灰度扫描分析表明,FS 组大鼠海马 nNOS 蛋白含量比对照高,差异有显著性;FS + ZnPP-IX 组大鼠海马 nNOS 蛋白含量较 FS 组和对照组增高,差异均有显著性(表 1)。

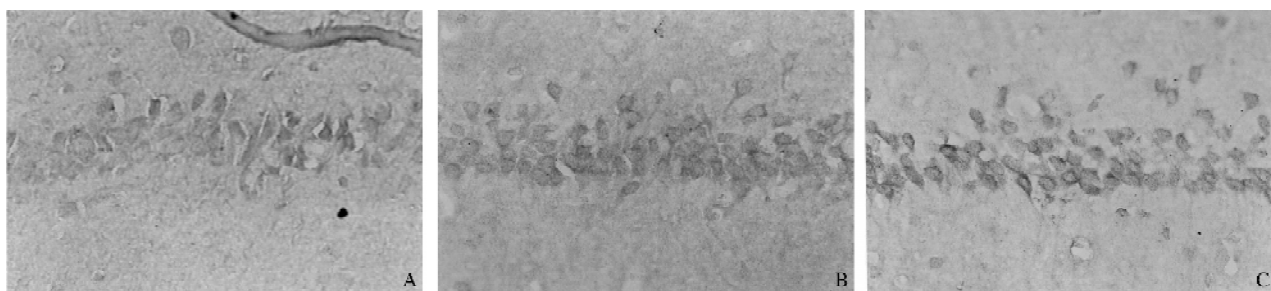


图 1 海马 nNOS mRNA 的表达(原位杂交 $\times 400$)

A: 对照组; B: FS 组; C: FS + ZnPP-IX 组

3 讨论

FS 是儿童时期最常见的惊厥性疾病,短期内长时程发作或反复发作可造成脑损伤,影响患儿的认知、学习和记忆能力,并可能成为后期发生癫痫的病理基础。虽然热性惊厥的发生机制尚未完全清楚,但兴奋性氨基酸的兴奋毒性及抑制性氨基酸的水平降低在 FS 惊厥发病机制中的作用已被广泛认识。气体信号分子 CO 和 NO 是近年来发现的两种新型的神经递质,两者都能自由通过各种生物膜,激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC),增加细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)水平,从而实现复杂的调节功能。研究发现 CO 和 NO 均可调节兴奋性氨基酸的释放^[7,8],同时在 FS 中存在着两者的变化^[2,3],因此推测 CO 和 NO 之间的调节网络与 FS 的发生和发展存在着一定的因果关系。

本实验发现反复 FS 后 24 h nNOS mRNA 和蛋白表达增高,但此时 NO 水平仅轻度升高,且与对照组比较无统计学意义,这与国内外一些学者的研究相似^[9,10]。由于 NO 具有不配对电子,故它为自由基,分子结构不稳定,NO 与靶分子反应快而短。推测惊厥后 NO 短暂升高,在 24 h 可能已降到接近正

常,只参与惊厥发作的始动环节,对惊厥的维持作用并不重要。设立 24 h 以内的时间点将更易于探讨 NO 的变化。应用 HO 的抑制剂 ZnPP-IX 对 FS 进行长期干预后,ZnPP-IX 对 HO/CO 系统成功的进行了抑制,即通过抑制 HO 活性而导致了 CO 含量降低,ZnPP-IX 使 FS 时升高的 nNOS mRNA 和蛋白表达进一步升高,NO 含量也出现了显著性的升高,表明 ZnPP-IX 上调 NOS/NO 系统,提示 CO 可能抑制了 NOS/NO 系统。

HO 介导的血红素代谢是内源性 CO 的主要来源,同时还生成铁和胆红素。FS 为一种应激反应,应激后诱导的 HO-1 及其催化产物可通过许多途径调节 NO:(1)由于 NOS 属于血红素蛋白,当诱导 HO-1 活性增高时,可加速细胞内新合成的血红素的降解,使得含有血红素成分的血红素合成受到影响;(2)由于 NOS 为 P450 型的血红素蛋白,而细胞色素 P450 为 HO-1 的底物,HO 活性的增加可以加速 NOS 的转换率。(3)HO-1 活化产生的 CO 可与现存的 NOS 结合并使之灭活。(4)血红素降解时产生的铁离子可通过抑制核酸转录而抑制 NOS 产物^[11];(5)HO 和 NOS 系统均需要 NADPH 作为辅助因子,由于在脑细胞中 HO 占优势,同时由于胆红素降解酶催化胆红素降解为胆红素需要利用 NADPH,而且

胆红素降解酶的反应动力快,这有利于血红素降解系统即 HO 系统竞争 NADPH 中的电子,因此 HO 系统可抑制 NO 的产生。此外 HO 系统还可通过调节 NOS 和 NO 之间的负反馈来间接调节 NOS 活性。

总之,在反复 FS 过程中,脑组织内源性 HO/CO 系统和内源性 NOS/NO 系统出现了变化,且 HO/CO 系统对 NOS/NO 系统具有抑制性调节作用,深入研究 HO/CO 及 NOS/NO 体系的交互作用,将有助于进一步开展对 FS 脑损伤治疗的实验研究^[12]。

[参 考 文 献]

- [1] Nelson KB, Ellenberg JH. Prognosis in children with febrile seizures [J]. *Pediatrics*. 1978, 61: 720-727.
- [2] 杨志仙,秦炯,杜军保,常杏芝. 高热惊厥大鼠血红素氧合酶 1/一氧化碳体系的变化 [J]. *北京大学学报*, 2002, 34(6): 696-699.
- [3] Klyueva YA, Bashkatova VG, Vitskova GY, Narkevich VB, Mikoyan VD, Vanin AF, et al. Role of nitric oxide and lipid peroxidation in mechanisms of febrile convulsions in Wistar rat pups [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2001, 131(1): 47-49.
- [4] Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat [J]. *Epilepsia*, 1999, 40(1): 5-

- 19.
- [5] 杨志仙,秦炯,周国平,常杏芝. 发育期大鼠高热惊厥脑损伤模型的建立 [J]. *北京大学学报*, 2002, 34(3): 225-228.
- [6] Chalmers AH. Simple, sensitive measurement of carbon monoxide in plasma [J]. *Clin chem*, 1991, 37(8): 1442-1445.
- [7] Taskiran D, Kutay FZ, Pogun S. Effect of carbon monoxide on dopamine and glutamate uptake and cGMP levels in rat brain [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28(6): 1176-1181.
- [8] Paul V, Subramanian EH. Evidence for an involvement of nitric oxide and gamma aminobutyric acid in the anticonvulsant action of L-arginine on picrotoxin-induced convulsions in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 72(3): 515-519.
- [9] 赵秀鹤,迟兆富,邓小梅,卜宏磊. 癫痫发作后脑内一氧化氮、一氧化氮合酶及相应氨基酸的变化 [J]. *中国神经精神病杂志*, 2000, 26(2): 101-102.
- [10] Paul V. Evidence for the involvement of L-citrulline but not nitric oxide in the proconvulsant action of the precursor L-arginine on picrotoxin-induced convulsions in rats [J]. *Biochemical Pharmacol*, 2002, 63(11): 2019-2023.
- [11] Weiss G, Werner-Felmayer G, Werner ER, Grunewald K, Wachtler H, Hentze MW. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription [J]. *J Exp Med*, 1994, 180(3): 969-976.
- [12] 常杏芝,秦炯,吴希如. 幼年大鼠反复热性惊厥脑损伤的研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2002, 4(6): 439-442.

(本文编辑:王霞)

· 消息 ·

书 讯

由张宝林、虞佩兰、冯泽康编著的《虞张冯中医儿科手册》一书,于 2005 年 5 月由中南大学出版社出版。全书 56 万字。分为基础篇、临床篇及附篇计 14 章。书末附有 500 多个药名索引、600 多个方剂索引及 700 多个病证(症)名称索引。本书原名《实用中医儿科手册》,曾于 1980 年出版,此次增修后,将这本耄耋之著更名为《虞张冯中医儿科手册》。全书内容科学、新颖、实用,突出中西医结合。可供各级西学中儿科医师和中医儿科医师临床参阅。全国各地新华书店发行,每册定价 38 元,邮购每册 40 元。邮购地址:410078(邮编)湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 15 号信箱谢新元、张碧金。联系电话:0731-4805372(白天),13007414822。邮购优惠价:购 8 册(整包装)按定价 9 折优惠并免收邮寄费。