

本文引用: 石计朋,唐成和,尚云,等. 诱导型一氧化氮合酶和胱硫醚- β -合酶在新生大鼠缺氧缺血脑组织中的表达[J]. 新乡医学院学报,2014,31(3):174-178.

【基础研究】

诱导型一氧化氮合酶和胱硫醚- β -合酶在新生大鼠缺氧缺血脑组织中的表达

石计朋, 唐成和, 尚云, 曹银利, 高俊, 杨卫红

(新乡医学院第一附属医院新生儿科, 河南 卫辉 453100)

摘要: **目的** 研究缺氧缺血(HI)对新生大鼠脑白质细胞诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及胱硫醚- β -合酶(CBS)表达的影响及二者的相关性,以及它们在新生大鼠脑白质损伤(WMD)发病机制中的作用。**方法** 将80只3日龄大鼠随机分为实验组和对照组,每组40只。建立新生大鼠WMD模型,分别于HI后12、24、48、72 h及7 d处死,取大鼠脑组织应用免疫组织化学法检测iNOS及CBS的表达水平。**结果** 实验组大鼠脑白质和胼胝体中iNOS于HI后12 h表达开始增加,72 h达高峰,7 d仍有表达;CBS于HI后12 h表达开始增加,24 h达高峰,7 d仍有表达。实验组大鼠HI后12、24、48、72 h及7 d iNOS和CBS在胼胝体和脑室周围白质的表达均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。iNOS和CBS在大鼠脑室周围白质和胼胝体的表达呈正相关($r_s = 0.66, 0.68, P < 0.05$)。**结论** HI可导致新生大鼠脑白质iNOS及CBS表达水平增高,iNOS和CBS可能参与新生大鼠WMD的病理生理过程。

关键词: 新生大鼠;缺氧缺血;脑室周围白质软化;诱导型一氧化氮合酶;胱硫醚- β -合酶

中图分类号: R363 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)03-0174-05

Expressions of inducible nitric oxide synthase and cystathionine beta-synthase in brain tissue of neonate rats with hypoxia-ischemia

SHI Ji-peng, TANG Cheng-he, SHANG Yun, CAO Yin-Li, GAO Jun, YANG Wei-hong

(Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To observe the expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cystathionine beta synthase (CBS) and their correlation in brain tissue of neonate rats with hypoxia-ischemia (HI), in order to explore possible pathogenesis in white matter damage (WMD). **Methods** Eighty 3-day-old rats were randomly divided into experimental group and control group, forty rats in each group. The WMD model of neonate rats was established. The rats were sacrificed to get the brain tissue of rats at 12, 24, 48, 72 h and 7 days after HI. Immunohistochemical technic was applied to detect the expression of iNOS and CBS in brain tissue of rats. **Results** In the experimental group, the expression of iNOS in periventricular white matter and corpus callosum started to increase at 12 h and reached the peak at 72 h, it also could be found at 7 days after HI. The expression of CBS started to increase at 12 h and reached the peak at 24 h, it also could be found at 7 days after HI. In experimental group, the expressions of iNOS and CBS in periventricular white matter and corpus callosum of rats at 12, 24, 48, 72 h and 7 days after HI were higher than those in control group ($P < 0.001$). The correlation analysis between the expression of iNOS and CBS illustrated that there was positive correlation ($r_s = 0.66, 0.68, P < 0.05$). **Conclusions** HI can induce the prominent increase in the expressions of iNOS and CBS in alba of the neonatal rats' brain. iNOS and CBS may be involved in the pathophysiological process in the WMD.

Key words: neonate rat; hypoxia-ischemia; periventricular leukomacia; inducible nitric oxide synthase; cystathionine beta synthase

缺氧缺血(hypoxia-ischemia, HI)导致的脑室周

围白质软化(periventricular leukomacia, PVL)是早产儿较常见的大脑白质病变(white matter damage, WMD),对中枢神经系统功能可产生危害,遗留神经系统后遗症如痉挛性脑性瘫痪、认知及行为学异常等。一氧化氮(nitric oxide, NO)是神经传递、血管扩张及调节神经功能的内源性介质,与神经系统的生理和病理过程有着密切的关系。诱导型一氧化氮合

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.03.004

收稿日期:2013-12-30

基金项目:河南省卫生厅资助项目(编号:200804053)

作者简介:石计朋(1981-),男,河南太康人,硕士,住院医师,研究方向:新生儿疾病。

通信作者:唐成和(1968-),男,河南安阳人,硕士,硕士研究生导师,主任医师,研究方向:新生儿疾病。

酶(nitric-oxide synthase, iNOS)是合成NO的主要限速酶,在脑缺血性损伤晚期产生的NO可加剧谷氨酸毒性,导致迟发性神经损伤^[1]。内源性H₂S主要由胱硫醚- β -合酶(cystathionine-beta-synthase, CBS)参与合成,已有研究结果证实,在众多神经系统疾病中均可发现CBS/H₂S体系的参与,如CBS/H₂S体系在脑缺血再灌注损伤中被激活,产生抗损伤作用^[2]。本研究以3日龄大鼠HI脑白质损伤模型为研究对象,观察大鼠HI过程中不同时间点脑白质区iNOS和CBS蛋白质的表达,探讨二者在新生大鼠HI脑白质损伤病理生理过程中的表达变化规律及其相关性,为早产儿脑白质损伤的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 3日龄清洁级Sprague-Dawley (SD)大鼠80只,体质量6.5~10.5 g,雌雄不限,新乡医学院实验动物中心提供,兔抗CBS购自英国Abcam公司,兔抗iNOS、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶(strept avidin-biotin complex, SABC)试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 WMD模型建立和实验分组 SD大鼠按照随机数字表随机分为实验组和对照组,每组40只,建立新生大鼠WMD模型。实验组大鼠乙醚麻醉后行颈正中切口,分离并双线结扎右侧颈总动脉,随后将大鼠置于37℃水浴箱中恢复2 h,然后送入透明密封箱内,输入含体积分数6%氧气、体积分数94%氮气的混合气体,气体流量1.5 L·min⁻¹,设置氧仪监测得箱内O₂体积分数为6%。4 h后取出大鼠,放回原饲养环境中继续母乳喂养。对照组大鼠同样分离颈总动脉,将手术线从右侧颈总动脉穿过而不予结扎,即不予缺氧处理。整个手术及缺氧过程中,保持周围环境温度为30℃以上。分别于HI后12、24、48、72 h及7 d处死各组大鼠,每组各时间点8只。

1.2.2 标本取材和制备 新生大鼠吸入乙醚麻醉,开胸暴露心脏,经左心室灌注肝素化生理盐水20 mL,同时在右心耳处剪一切口,至流出液体变清为止。给予质量分数4%冰多聚甲醛30 mL灌注,至肝脏明显变白及肺脏明显水肿、四肢完全僵直后,亚甲蓝标记前囟位置,立即开颅取脑组织,将标本于质量分数4%冰多聚甲醛固定12 h,从亚甲蓝标记的前囟标本处,根据大鼠脑立体定位图谱将固定的

鼠脑以视交叉为中心前后3 mm取材,再固定24 h。制作病理切片。

1.2.3 iNOS和CBS免疫组织化学检测 采用SABC方法检测脑组织内iNOS和CBS的表达,具体步骤:切片常规脱蜡,枸橼酸缓冲液修复,体积分数10%正常山羊血清工作液封闭抗原,37℃温箱、湿箱内孵育30 min;弃去羊血清,不冲洗。加入适当稀释的一抗(iNOS 1:50, CBS 1:100),4℃冰箱孵育过夜,加入生物素标记的山羊抗兔IgG,37℃温箱、湿箱内孵育30 min;加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃温箱、湿箱内孵育30 min;DAB显色。阴性对照用PBS代替一抗,剩余步骤同上。

1.3 阳性结果的判定及分析方法 iNOS显色定位于细胞质(膜),有棕黄色染色为阳性细胞;CBS显色主要在细胞质,有明确棕色或棕黄色染色为阳性细胞。每组每个时间点观察8只大鼠,每只大鼠取相邻切片2张,光镜下观察组织切片呈棕黄色阳性部分,每张切片在10×40倍下脑室旁白质和胼胝体部位分别随机取2个不重叠视野,利用Image pro plus 5.0图像分析软件测量阳性细胞的iNOS和CBS平均光密度值,取平均数以表示各切片的平均光密度值。

1.4 统计学处理 应用SPSS 18.0软件包进行分析,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间同一时间点的比较采用成组设计两样本均数比较的 t 检验,同组内不同时间点的比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。iNOS与CBS相关性分析应用Spearman秩相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 iNOS在HI大鼠脑白质损伤过程中的表达

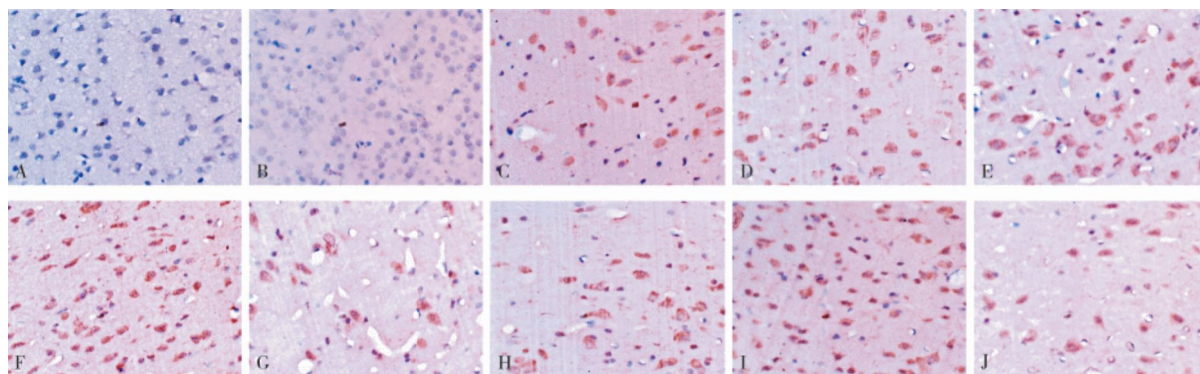
结果见图1和表1、2。实验组大鼠免疫阳性细胞的细胞质(膜)呈棕黄色,着色深。对照组大鼠胼胝体、脑室周围白质各时间点均无iNOS蛋白的免疫阳性表达。实验组大鼠HI 12 h在胼胝体和脑室周围白质iNOS表达开始增加,24、48 h持续升高,72 h达峰值,7 d仍有表达,组内各时间点间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组大鼠HI后12、24、48、72 h及7 d iNOS在胼胝体和脑室周围白质的表达均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.2 CBS在HI大鼠脑白质损伤过程中的表达

结果见图2和表3、4。实验组大鼠脑室周围白质和胼胝体区CBS于缺氧缺血12 h表达开始增加,24 h

达高峰,7 d 时仍有表达,组内各时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组大鼠脑室周围白质

和胼胝体在 HI 后 12、24、48、72 h 和 7 d CBS 的表达均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。



A: 阴性对照; B: 对照组大鼠脑室周围白质 iNOS 表达; C: 实验组大鼠 HI 12 h 脑室周围白质 iNOS 表达; D: 实验组大鼠 HI 24 h 脑室周围白质 iNOS 表达; E: 实验组大鼠 HI 48 h 脑室周围白质 iNOS 表达; F: 实验组大鼠 HI 72 h 脑室周围白质 iNOS 表达; G: 实验组大鼠 HI 7 d 脑室周围白质 iNOS 表达; H: 实验组大鼠 HI 12 h 胼胝体区 iNOS 表达; I: 实验组大鼠 HI 72 h 胼胝体区 iNOS 表达; J: 实验组大鼠 HI 7 d 胼胝体区 iNOS 表达。

图 1 2 组大鼠 HI 后脑室周围白质和胼胝体区 iNOS 的表达 (SABC, $\times 400$)

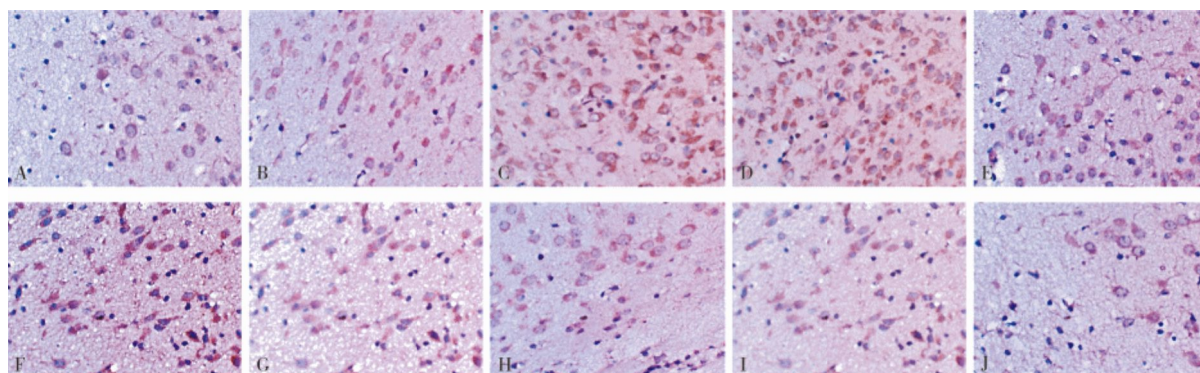
Fig.1 Expression of the iNOS at corpus callosum and periventricular white matter of neonate rat after HI in the two groups (SABC, $\times 400$)

表 1 2 组大鼠 HI 后脑室周围白质 iNOS 表达的比较

组别	n	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d	F	P
对照组	8	21.25 \pm 1.25	22.00 \pm 1.48	22.64 \pm 1.38	22.83 \pm 1.34	23.19 \pm 2.06	1.997	>0.05
实验组	8	52.65 \pm 4.53	66.13 \pm 7.41	88.13 \pm 5.51	133.50 \pm 4.60	41.13 \pm 3.72	376.991	<0.05
t		18.869	16.502	32.585	65.355	11.918		
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		

表 2 2 组大鼠 HI 后胼胝体区 iNOS 表达的比较

组别	n	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d	F	P
对照组	8	21.04 \pm 1.30	22.58 \pm 1.41	20.59 \pm 2.09	24.02 \pm 1.78	23.14 \pm 2.03	2.980	>0.05
实验组	8	52.32 \pm 7.04	66.90 \pm 8.08	88.59 \pm 7.32	123.55 \pm 9.06	42.41 \pm 7.92	31.320	<0.05
t		12.351	8.690	5.470	13.611	7.122		
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		



A: 对照组; B: 实验组大鼠 HI 12 h 脑室周围白质 CBS 表达; C: 实验组大鼠 HI 24 h 脑室周围白质 CBS 表达; D: 实验组大鼠 HI 24 h 胼胝体 CBS 表达; E: 实验组大鼠 HI 48 h 脑室周围白质 CBS 表达; F: 实验组大鼠 HI 48 h 胼胝体 CBS 表达; G: 实验组大鼠 HI 72 h 脑室周围白质 CBS 表达; H: 实验组大鼠 HI 72 h 胼胝体 CBS 表达; I: 实验组大鼠 HI 7 d 脑室周围白质 CBS 表达; J: 实验组大鼠 HI 7 d 胼胝体 CBS 表达。

图 2 2 组大鼠 HI 后 CBS 在胼胝体和脑室周围白质的表达 (SABC, $\times 400$)

Fig.2 Expression of CBS at corpus callosum and periventricular white matter of neonate rats after HI in the two groups (SABC, $\times 400$)

表3 2组大鼠 HI 后脑室周围白质 CBS 表达的比较

Tab.3 Comparison of the expression of CBS at periventricular white matter of neonate rats after HI between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d	F	P
对照组	8	43.87 ± 8.38	44.83 ± 10.84	40.23 ± 8.85	42.18 ± 9.32	42.37 ± 8.80	4.030	>0.05
实验组	8	64.53 ± 9.23	122.89 ± 11.34	92.79 ± 9.24	51.98 ± 10.02	53.37 ± 11.36	16.732	<0.05
t		5.911	13.432	11.582	2.233	2.161		
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05		

表4 2组大鼠胼胝体区 CBS 表达的比较

Tab.4 Comparison of the expression of CBS at corpus callosum of neonate rats after HI between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d	F	P
对照组	8	42.62 ± 9.40	39.83 ± 12.08	38.83 ± 11.17	39.68 ± 10.76	38.62 ± 12.38	1.781	>0.05
实验组	8	62.03 ± 8.50	114.39 ± 11.21	88.42 ± 11.54	51.98 ± 8.65	50.87 ± 8.12	9.052	<0.05
t		4.331	12.792	8.723	2.511	2.330		
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05		

2.3 相关性分析 经 Spearman 秩相关性分析发现,iNOS 和 CBS 在大鼠脑室周围白质和胼胝体的表达呈正相关($r_s=0.66,0.68,P<0.05$)。

3 讨论

早产儿脑损伤主要是 WMD,其中包括 PVL、胚胎生发层基质-脑室内出血 (intraventricular hemorrhage,IVH)、出血后脑积水及其他一些脑损伤。NO 是一种新的细胞信号分子,在中枢神经系统中具有“双刃剑”双重作用,一方面具有神经介质传递信息和血管扩张作用,另一方面具有神经毒性作用。内源性 NO 由 L-精氨酸在一氧化氮合酶催化作用下产生,其亚型 iNOS 是一种可溶性酶,在生理状态下不表达,脑 HI 后巨噬细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞及神经细胞等均能诱导产生 iNOS,其表达呈非 Ca^{2+} 依赖性^[3]。有实验证实,当脑缺血再灌注后大鼠海马组织中 iNOS-mRNA 表达增加,NO 生成增加,同时超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性降低,丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量增加^[4]。本实验发现实验组大鼠在各个时间点 iNOS 在脑室周围白质和胼胝体 12 h 表达开始增加,24 ~ 48 h 持续上升,72 h 达峰值,7 d 时表达明显下降,与覃琳等^[5]在新生大鼠脑白质损伤时神经胶质细胞凋亡中结果相一致,其实验组 HI 后 4、12 h 和 1、3、7 d 凋亡细胞增多,且以 3 d 最多,与本实验 iNOS 表达的动态变化的时间窗相一致,可能在 HI 后脑白质损伤过程中大鼠受 HI、应激和炎性因子等刺激后诱导 iNOS 产生,持续产生大量 NO,引起神经组织的损伤,参与了神经胶质细胞的凋亡^[6]。iNOS 过度

表达产生的 NO 通过自由基损伤、介导谷氨酸的兴奋毒性作用、损伤 DNA、线粒体功能障碍、使凋亡诱导因子从线粒体移入细胞核内和影响凋亡相关基因的表达等方式,诱导未成熟的晚期少突胶质前体细胞发生凋亡,导致早产儿脑白质损伤的发生^[7]。

内源性 H_2S 是继 NO 和一氧化碳之后新近发现的第 3 类气体信号分子,在中枢神经系统中发挥着重要的生理作用^[8]。 H_2S 具有舒张血管平滑肌、降低血压、抑制平滑肌细胞增殖和调节心肌细胞收缩力等多种心血管效应,同时也参与了过敏性紫癜、肺动脉高压、休克及应激等^[9-12]有关的病理生理过程。动物实验证实,CBS/ H_2S 体系对组织缺血再灌注损伤具有拮抗作用^[13]。 H_2S 可明显降低氧化应激导致的细胞死亡率,在缺血再灌注损伤时对神经元有保护作用^[14];Zhu 等^[13]证实,CBS/ H_2S 体系对缺血再灌注损伤有拮抗作用。CBS 是一种血红素蛋白,在人和动物正常生理条件下表达水平较低,试验表明,在全脑缺血再灌注损伤中前脑皮质中 CBS mRNA 表达呈动态变化^[15],参与了全脑缺血再灌注损伤的病理生理过程。

本实验首次检测了脑白质损伤过程中脑室周围白质和胼胝体不同时间点 CBS 表达水平的变化。实验组大鼠脑室周围白质及胼胝体 CBS 蛋白的表达均于 12 h 开始增加,24 h 达峰值,48 h 表达有所下降,72 h 和 7 d 仍高于对照组的表达水平。同时研究表明,脑 HI 损伤后细胞外半胱氨酸升高^[16],半胱氨酸为合成内源性 H_2S 的底物,而 CBS 为脑组织内合成 H_2S 的酶,此时生成的 H_2S 可能参与了脑白

质损伤的保护作用;脑缺血损伤后内源性 H_2S 可发挥清除自由基和减轻兴奋性氨基酸的毒性损伤作用^[17]。

王燕飞等^[18]研究证实,内源性 NOS/NO 体系和 CBS/ H_2S 体系在低氧性肺动脉高压形成中存在相互的负性调节作用。本实验发现对缺氧缺血性脑白质损伤后 iNOS 和 CBS 表达呈正相关,分析其原因可能与以下 2 个方面有关,一是 NOS/NO 体系和 CBS/ H_2S 体系在 HI 脑白质损伤的过程中存在正性调节作用;二是同时受到 HI 损伤因素的影响,二者在损伤过程中表达规律有相关性,其具体机制有待于进一步实验证实。

参考文献:

- [1] Kawase M, Kiuchi H, Kato I, *et al*. Inducible nitric oxide synthase following hypoxia in rat cultured glia cells [J]. *Brain Res*, 1996, 738 (2): 319.
- [2] Ren C, Du A, Li D, *et al*. Dynamic change of hydrogen sulfide during global cerebral ischemia-reperfusion and its effect in rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1245: 197-205.
- [3] Kaur C, Sivakumar V, Ling E A. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia [J]. *J Pineal Res*, 2010, 48 (3): 185-193.
- [4] 周银燕, 邵建林, 赵国良, 等. 内源性 CO 和 NO 在大鼠脑缺血-再灌注损伤中的作用 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2011, 27 (4): 404-407.
- [5] 覃琳, 熊英, 卓平辉, 等. 新生大鼠脑白质损伤时神经胶质细胞凋亡与 Fas、caspase-3 蛋白的表达变化 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2007, 28 (3): 289-292.
- [6] Steinert J R, Chemva T, Forsythe I D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia [J]. *Neuroscientist*, 2010, 16 (4): 435-452.
- [7] 王慧卿, 熊英, 郭文俊. 新生大鼠脑白质损伤时神经胶质细胞凋亡与 iNOS 的表达 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13 (4): 309-312.
- [8] Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H_2S): the third gas of interest for pharmacologists [J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59 (1): 4-24.
- [9] 李晓慧, 杜军保, 金红芳, 等. 过敏性紫癜患儿血浆硫化氢、一氧化氮变化的意义 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2008, 23 (9): 651-653.
- [10] 魏红玲, 杜军保, 唐朝枢, 等. 硫化氢对低氧性肺动脉高压中氧化应激的调节作用 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2007, 39 (6): 565-569.
- [11] Li X, Du J, Jin H, *et al*. The regulatory effect of endogenous hydrogen sulfide on pulmonary vascular structure and gasotransmitters in rats with high pulmonary blood flow [J]. *Life Sci*, 2007, 81 (10): 841-849.
- [12] Lou L X, Geng B, Du J B, *et al*. Hydrogen sulphide-induced hypothermia attenuates stress-related ulceration in rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35 (2): 223-228.
- [13] 朱俊超, 邵建林, 马虹, 等. 心肌缺血再灌注损伤大鼠胱硫醚 β -合酶/硫化氢和血红素氧合酶-1/一氧化碳的相互作用 [J]. *中华医学杂志*, 2008, 88 (45): 3222-3225.
- [14] Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12 (1): 1-13.
- [15] 任彩丽, 李东亮, 赵红岗, 等. 全脑缺血-再灌注大鼠脑组织内源性硫化氢的动态变化 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2008, 5 (4): 177-181.
- [16] Slivka A, Cohen G. Brain ischemia markedly elevates levels of the neurotoxic amino acid cysteine [J]. *Brain Res*, 1993, 608 (1): 33-37.
- [17] Chen C Q, Xin H, Zhu Y Z, *et al*. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28 (11): 1709-1716.
- [18] 王燕飞, 金红芳, 唐朝枢, 等. 气体信号分子在肺动脉高压发病中的作用 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2006, 38 (3): 326-331.

(本文编辑: 杨 博 英文编辑: 杨 博)