

· 基础研究 ·

高压氧对脑缺血再灌注大鼠的海马诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响

王国忠 赵立明 高春锦 葛环 陈瑞

【摘要】目的 观察高压氧对脑缺血再灌注大鼠的海马诱导型一氧化氮合酶信使核糖核酸(iNOS mRNA)表达的影响。**方法** 将 54 只大鼠随机分为脑缺血再灌注组(IR 组)、脑缺血再灌注加高压氧处理组(HBO 组)和对照组,建立脑缺血再灌注大鼠动物模型。应用荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测各组在再灌注 6 h、24 h、48 h、96 h 时相点大鼠的海马 iNOS mRNA 表达。**结果** 再灌注各时相点的 IR 组和 HBO 组的海马 iNOS mRNA 表达均显著高于对照组(均 $P < 0.01$);HBO 组大鼠再灌注 24 h、48 h、96 h 时海马 iNOS mRNA 表达均显著低于 IR 组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。**结论** 高压氧治疗可以显著抑制再灌注后大鼠海马 iNOS mRNA 表达,从而减少延迟性 NO 的产生,有助于减轻脑缺血再灌注损伤。

【关键词】 高压氧; 脑缺血再灌注; 诱导型一氧化氮合酶; 荧光定量 RT-PCR

Effects of hyperbaric oxygen on expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in hippocampus of rats after cerebral ischemia-reperfusion WANG Guo-zhong, ZHAO Li-ming, GAO Chun-jin, GE Huan, CHEN Rui. Department of hyperbaric Oxygen, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of hyperbaric oxygen(HBO) on expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA in hippocampus of rats after cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** The rats were randomly divided into a cerebral ischemia-reperfusion group (CIR group), a hyperbaric oxygen group (HBO group) and a sham-operation group(SO group). The cerebral ischemia-reperfusion models were established. The expression of iNOS mRNA in the hippocampus of rats was measured at 6h, 24h, 48h and 96h, respectively, after reperfusion by using fluorescent quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR). **Results** The expression of iNOS mRNA in hippocampus in CIR and HBO groups were significantly higher than those in the SO group at 6h, 24h, 48h, 96h ($P < 0.01$) after reperfusion. The expression of iNOS mRNA in hippocampus of rats in the HBO group were significantly lower than those in the CIR group at 24h, 48h, 96h after reperfusion ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, respectively). **Conclusion** HBO treatment can effectively relieve the cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibiting the expression of iNOS mRNA in hippocampus of rats after cerebral ischemia-reperfusion and decrease the production of NO.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Cerebral ischemia-reperfusion; Inducible nitric oxide synthase; Fluorescent quantitative reverse transcription PCR

缺血再灌注引起脑组织损伤的病理和生理机制较为复杂,与多种致病因素有关。一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)在脑缺血再灌注损伤中的作用愈来愈受到人们的重视。一般认为诱导型一氧化氮合酶(iNOS)持续产生的 NO 有细胞毒性作用,可以诱发一系列病理反应^[1]。本研究应用荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术从分子水平探讨高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)对脑缺血再灌注大鼠的海马 iNOS mRNA 表达的影响。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:54 只成年雄性 SD 大鼠,二级动物,体重 200 ~ 250 g,购自首都医科大学实验动物部。

2. 主要试剂和仪器:TRIzol 试剂为美国 GibcoBRL 公司产品;AMV 逆转录酶、RNA 酶蛋白抑制剂(Rnasin)、引物 oligo(dT)₁₅、dNTPmix、pGEM-T Easy Vector、JM109 感受态细胞均为美国 Promega 公司产品;DNA 玻璃奶快速纯化回收试剂盒为北京博大泰克公司产品;DWC150-300 型动物实验舱为上海 701 所产品;GeneAmp5700 型 PCR 仪为美国 PE 公司产品。

3. 引物和探针合成:引物 iNOS₁ 5'-caacacaggatgac-

基金项目:北京市教委科技发展计划基金资助项目(No.00KJ-108)

作者单位:100020 北京,首都医科大学附属北京朝阳医院高压氧科

cctaagag-3', iNOS₂ 5'-tgtgtgaagggtgtcgtg-3' (扩增片段 183 bp)、荧光探针 5' R-caagctgcattgactccat cgac-Q 3' (R 为荧光报告基团, Q 为荧光淬灭基团) 均为中山大学达安基因诊断中心设计、合成。

二、实验方法

1. 实验动物分组: 采用抽签法将 54 只大鼠随机分为 3 组。脑缺血再灌注组 (IR 组) 24 只, 按再灌注 6 h、24 h、48 h、96 h 时相点分为 4 个亚组, 每个亚组 6 只。脑缺血再灌注加高压氧处理组 (HBO 组) 24 只, 按再灌注 6 h、24 h、48 h、96 h 时相点分为 4 个亚组, 每个亚组 6 只; HBO 组的 4 个亚组分别行 1 次、2 次、3 次、5 次 HBO 处理。假手术组 (对照组) 大鼠 6 只。

2. 脑缺血再灌注动物模型的建立: 按照 Pulsinelli 等^[2]报道的四动脉阻断法建立脑缺血再灌注动物模型。用 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠 (300 mg/kg 体重), 固定, 大鼠取俯卧位, 切开颈部皮肤分离肌肉, 暴露第一颈椎, 用电灼针烧灼第一颈椎孔处的椎动脉, 然后缝合皮肤。次日再次麻醉, 大鼠取仰卧位, 切开颈部皮肤, 暴露两侧颈总动脉, 用动脉夹夹闭两侧颈总动脉, 20 min 后再通血流。对照组手术方法同上, 但不阻断动脉。

3. 实验动物的处理: ① HBO 组——大鼠置于动物实验舱内, 纯氧洗舱 5 min, 升压 5 min 至 0.2 MPa (2 ATA), 稳压吸氧 45 min, 减压 10 min。HBO 处理时持续通风, 氧流量维持 2 L/min, 舱内氧浓度在 98% 以上。HBO 6 h 组在再灌注 3 h 时行高压氧处理 1 次 (再灌注 6 h 时采集标本)。其余组在相应的时间点行高压氧处理。② IR 组和对照组——处于常压空气环境中。

4. 标本采集: 在相应的时相点将出舱后的大鼠立即断颈处死, 取出脑组织, 分离出海马, 液氮速冻后保存于 -80℃ 冰箱中。

5. 组织总 RNA 的提取: 将海马组织置于组织匀浆器中, 加 800 μl TRIzol 匀浆, 按试剂盒规定的步骤提取总 RNA, 测 A260/A280 的 OD 值, 并计算出 RNA 含量。

6. cDNA 合成: 在 0.5 ml 的离心管中加入总 RNA 1 μg、oligo (dT)₁₅ (10 pmol/μl) 5 μl、10 × 逆转录酶缓冲液 2.0 μl、RNasin 30 U、dNTPmix (10 mmol/L) 1.0 μl、AMV 逆转录酶 30 U、加 H₂O 至终体积为 20 μl。42℃ 温育 60 min, 再放在 95℃ 高温环境中 5 min, 然后置于冰上骤冷, 再于 -20℃ 保存。

7. 定量阳性标准模板的制备: 以 iNOS₁ 和 iNOS₂ 为引物, IR 组标本的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 将扩增片段 (183 bp) 与 pGEM-T Easy Vector 连接, 转化 JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 提取、纯化质粒。将重组质粒测 OD 值定量后, 稀释成 10⁵、10⁴、10³、10²、

10¹ 拷贝/μl 浓度梯度, 置于 -20℃ 保存。

8. 荧光定量 RT-PCR: 将各 cDNA 标本与各梯度的阳性标准模板在 GeneAmp5700 型 PCR 扩增仪上进行扩增。将标本 cDNA 10 μl (阳性标准模板 1 μl), iNOS₁ (10 pmol/μl) 4 μl, iNOS₂ (10 pmol/μl) 4 μl, 10 × PCR 缓冲液 5 μl, dNTPmix (10 mmol/L) 1 μl, 探针 (10 pmol/μl) 4 μl, taq 酶 3.0 U, 加 H₂O 至终体积为 50 μl。反应条件为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 50 s、55℃ 50 s、72℃ 60 s 共作 35 个循环。反应结束后用机载软件将标本与标准曲线对比, 换算后可得出 iNOS mRNA 表达的拷贝数。

三、统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件, 组间均数比较采用方差分析和 *q* 检验。

结 果

图 1A 是各梯度阳性标准模板检测结果曲线图, 各梯度均呈典型的 S 型。Rn 为荧光信号值, Ct (cycle threshold, 阈循环值) 代表在 PCR 循环过程中, 每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。Ct 值与该样品的起始拷贝数的对数值成线形关系 (图 1B)。根据标准曲线, 可以检测未知标本中起始拷贝数。

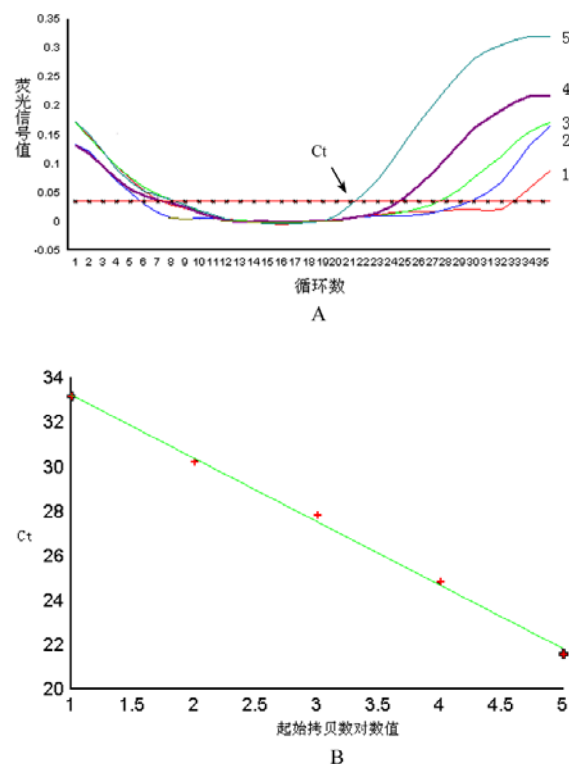


图 1 荧光定量 RT-PCR 检测海马 iNOS mRNA 表达标准曲线

注: A——1~5 分别为标准模板 10¹、10²、10³、10⁴、10⁵ 拷贝/μl 的曲线, 每个曲线都有对应的 Ct 值。B——以 Ct 值为纵坐标, Log Co (起始拷贝数对数值) 为横坐标绘出的标准曲线

表 1 再灌注各时相点各组大鼠海马 iNOS mRNA 的表达(拷贝/ μg 总 RNA, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	6 h	24 h	48 h	96 h
IR 组	24	$(1.14 \pm 0.36) \times 10^3 \Delta$	$(3.72 \pm 1.80) \times 10^3 \Delta$	$(2.60 \pm 0.67) \times 10^3 \Delta$	$(1.96 \pm 0.62) \times 10^3 \Delta$
HBO 组	24	$(0.96 \pm 0.31) \times 10^3 \Delta$	$(2.14 \pm 0.71) \times 10^3 * \Delta$	$(1.36 \pm 0.34) \times 10^3 * * \Delta$	$(1.08 \pm 0.48) \times 10^3 * * \Delta$
对照组	6	—	$(4.78 \pm 4.29) \times 10$	—	—

注:与同时相点 IR 组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$;与对照组比较, $\Delta P < 0.01$

表 1 可见,再灌注各时相点的 IR 组和 HBO 组的海马 iNOS mRNA 表达均高于对照组,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。HBO 组大鼠再灌注 24 h 时海马 iNOS mRNA 表达低于 IR 组,差异有显著性意义($P < 0.05$),再灌注 48 h、96 h 时海马 iNOS mRNA 表达均低于 IR 组,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。

讨 论

荧光定量 RT-PCR 技术融汇了 PCR 高灵敏性、DNA 探针杂交的高特异性和光谱技术的高精确定量等优点,可以实时监测 PCR 过程中的荧光信号积累,通过标准曲线对未知模板进行定量分析。整个过程在闭管状态下进行,避免了因污染而导致的假阳性,使结果准确可靠,是一种较为先进的分子生物学技术^[3]。

NO 在机体各系统中均有广泛的生物学特性,一方面起神经递质作用,另一方面又具有较强的细胞毒性。NOS 是合成 NO 的关键酶,分为三种类型,神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、内皮细胞型一氧化氮合酶(eNOS)和 iNOS。nNOS 和 eNOS 在生理状态下即有表达,合称为结构型 NOS(cNOS)^[1];iNOS 主要分布于巨噬细胞、血管内皮细胞、神经元、小胶质细胞和星型细胞等,它是非钙依赖性酶,在通常情况下活性很低,只有在缺血、缺氧和一些炎症介质的刺激下,经 4~8 h 方可诱导 iNOS mRNA 的表达,这种过量、持续产生的 NO 才可对缺血组织造成损害^[4]。一些实验表明 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,使缺血半暗带得到保护,从而减少梗死面积^[1,5,6]。

谢勉等^[7]用四动脉阻断法造成大鼠一过性全脑缺血,以辅酶 II 依赖性黄递酶(NADPH-d)组织化学方法对再灌注期间海马 NOS 阳性细胞数量的变化进行研究,发现 NOS 阳性细胞数在再灌注 2~6 h 即有增高,到 12~24 h 进一步增加,3 d 时有所减少。李金声等^[8]以 NADPH-d 组织化学方法观察了高压氧对急性大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤 NOS 细胞分布的影响,发现高压氧可明显抑制大鼠急性局灶性脑缺血/再

灌注损伤区 NOS 阳性细胞的形态改变。Kurata 等^[9]通过体外实验,发现 HBO 可以减轻脂多糖(LPS)对小鼠巨噬细胞 iNOS mRNA 表达的诱导作用。本研究显示,IR 组大鼠海马 iNOS mRNA 表达在再灌注 6 h 时已显著增高,24 h 时到达高峰,到 96 h 时仍未恢复正常水平;HBO 组大鼠海马 iNOS mRNA 表达在再灌注 6 h、48 h、96 h 时均显著低于 IR 组,结果提示高压氧治疗可以显著抑制再灌注后大鼠海马 iNOS mRNA 表达,从而减少延迟性 NO 的产生,有助于减轻脑缺血再灌注损伤。

应用 iNOS 抑制剂阻断或减轻 iNOS 介导的晚期神经损伤,已成为一种新的神经保护策略。高压氧对 iNOS 或 cNOS 表达的影响值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 张国瑾,赵增荣,主编. 国外脑血管疾病研究进展. 北京:中国医药科技出版社,2002. 25-33.
- 2 Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10: 267-272.
- 3 Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 2933-2936.
- 4 Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: regulation subserves function. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995, 196: 1-4.
- 5 Iadecola C, Zhang F, Casey R, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1996, 27: 1373-1380.
- 6 Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*, 2002, 61: 862-871.
- 7 谢勉,顾耀铭,姚志彬. 脑缺血后大鼠海马一氧化氮合酶表达的变化. *神经解剖学杂志*, 1998, 14: 8-12.
- 8 李金声,郭守一,刘立,等. 高压氧对大鼠急性局灶性脑缺血/再灌注损伤一氧化氮合酶阳性细胞分布的影响. *中华航海医学杂志*, 2002, 7: 225-226.
- 9 Kurata S, Yamashita U, Nakajima H. Hyperbaric oxygenation reduces the cytostatic activity and transcription of nitric oxide synthetase gene of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1263: 35-38.

(修回日期:2003-06-17)

(本文编辑:阮仕衡)

本刊随时恭候广大读者、作者就如何办好刊物提出批评与建议