

钩藤碱对缺血 - 再灌注大鼠脑 NOS 变化的作用

开 丽 王中峰¹ 薛春生²(重庆 400038 第三军医大学药理教研室; ¹重庆 400038 第三军医大学生理教研室; ²重庆 400046 重庆医科大学药理教研室)

摘要 目的:研究钩藤碱(Rhy)对大鼠脑缺血-再灌注皮层和海马一氧化氮合酶(NOS)变化的作用。方法:阻断大鼠双侧颈总动脉15 min和再灌注24h建立脑缺血-再灌注损伤模型,用NADPH-d组化技术检测脑NOS阳性细胞数目的变化和Rhy的影响。结果:脑缺血-再灌注24h后,皮层和海马NOS阳性细胞数目显著增多,Rhy(12.5和25 mg/kg)缺血前30 min腹腔注射,可显著抑制此增多,与NOS拮抗剂L-NAME 10 mg/kg的作用相似。结论:Rhy能降低脑内NOS的活性,对脑缺血可能产生保护作用。

关键词 缺血-再灌注;脑;一氧化氮合酶;组织化学;钩藤碱

Effect of rhynchophylline on the change of NOS in cerebral ischemia - reperfusion rats

Kai Li(Kai L), Wang Zhongfeng(Wang ZF), Xue Chunsheng(Xue CS) (*Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing 400038*)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effect of rhynchophylline(Rhy) on the change of NOS activity in cortex and hippocampus in a rat ischemia - reperfusion model. **METHOD:** Cerebral ischemia - reperfusion of rats was induced by bilaterally occlusion of common carotid arteries for 15 min and reperfusion for 24h. NADPH - diaphorase histochemical

staining was used to detecte the NOS - positive cells .**RESULTS:**The numbers of NOS - positive cells in cortex and hippocampus increased significantly in ischemia - reperfusion rats ,which was inhibited by Rhy(12.5 and 25mg/kg ip , 30min befor ischemia) .The effect of Rhy was similar to that of L - NAME ,a inhibitor of NOS .**CONCLUSION:**Rhy may protect brain from ischemic injury by inhibition of NOS druing cerebral ischemia - reperfusion .

KEY WORDS ische mia - reperfusion ,brain ,NOS ,histoche mistry ,rhynchophylline

钩藤碱(rhynchophylline ,Rhy)为中药钩藤的主要活性成份,具有降压、抗心律失常等多种药理作用。以钩藤为主要组成成分的中草药合剂可明显改善高原缺氧性脑代谢障碍。本室也研究发现,钩藤碱对大鼠脑缺血损伤皮层神经元内钙超载有抑制作用,可能对脑缺血缺氧产生保护作用。近年文献报道,脑缺血-再灌注损伤过程中,一氧化氮(NO)生成增多,尤其是再灌注过程中产生的NO可产生明显的神经毒作用,在缺血性脑损伤中起重要作用。但NO因半衰期短,不易直接测定,主要通过对其合酶(NOS)水平的测定来推测NO的变化,因为NOS在大鼠脑内的分布与NADPH-d的分布是一致的,通过NADPH-d组织化学方法可了解NOS在脑内的变化情况^[1]。本实验采用此组织化学方法,检测Rhy对脑缺血-再灌注过程中NOS阳性细胞数目的影响,研究Rhy对脑内NO水平的作用。

1 材料与方法

1.1 药品

Rhy(遵义医学院药理教研室);N-亚硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME,Sigma);NADPH(德国宝灵曼公司),其余均为国产分析纯。

1.2 溶液配制

按参考文献^[2]配制PB液,PBS液,蔗糖溶液,4%多聚甲醛和显色液等。

1.3 动物及分组

Wistar大鼠(体重200~250g,第三军医大学实验动物中心)30只,♂♀不拘,随机分为对照组、缺血组、L-NAME(10mg/kg)组、Rhy大剂量(25mg/kg)组和小剂量(12.5mg/kg)组。

1.4 缺血模型及切片制备

大鼠用25%氨基甲酸乙酯(4mg/kg)腹腔注射麻醉,分离双侧颈总动脉,用丝线阻断双侧颈总动脉15min,后放松丝线再灌注24h,建立脑缺血-再灌注模型。Rhy和L-NAME在缺血前30min分别腹腔注射给药。再灌注结束后,用4%多聚甲醛灌注固定,分离顶叶皮层和海马,常规切片、染色、铺片、脱水、封片。

1.5 结果分析处理

为避免误差,每一动物的取材部位尽可能相同,在每一大鼠脑切片上,随机抽样,皮层8片,海马15片,在

显微镜下作NOS阳性细胞计数,在同样视野下比较各实验组NOS阳性细胞数目,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析进行统计学处理。

2 结果

正常大鼠皮层和海马均有一定的NOS基础表达,NOS阳性细胞数分别为 49.3 ± 16.3 和 27.4 ± 0.6 ,缺血-再灌注后,皮层和海马阳性细胞数目分别达到 80.1 ± 22.2 和 61.6 ± 7.1 ,与对照组相比均显著增加($P < 0.01$)。缺血前30min腹腔注射Rhy 12.5和25mg/kg,皮层阳性细胞数降低到 61.5 ± 10.4 和 54.7 ± 8.6 ,海马降低到 24.7 ± 5.6 和 13.5 ± 2.1 ,与缺血组相比,均显著降低($P < 0.01$)。NOS抑制剂L-NAME 10mg/kg也可使皮层和海马阳性细胞数目减少到 67.4 ± 12.4 和 38.4 ± 17.6 ($P < 0.01$)。

3 讨论

目前认为,脑缺血-再灌注损伤与多种因素有关,其中脑内NO生成增多与之密切相关^[3,4]。但因NO的半衰期很短,直接测定十分困难,多利用其合成过程中所需的NOS的测定来间接反映NO的生成情况。由于脑内NOS的分布与NADPH的分布是一致的,故本实验采用NADPH-d组织化学技术检测大鼠脑内NOS活性,依此推测脑内NO的含量。在大鼠脑缺血-再灌注模型中,NOS阳性细胞数的增加在缺血-再灌注的1~3h达高峰^[5]。高浓度的NO可致脑细胞代谢障碍和病理改变。它能促进脑缺血诱导的谷氨酸释放,改变多巴胺的代谢^[6,7],也可参与缺血性脑水肿和脑梗塞^[8],以及缺血后神经元死亡^[9]。

本实验阻断大鼠双侧颈总动脉15min和再灌注24h,和正常对照组相比,缺血组大脑皮层和海马NOS阳性细胞数目显著增多,其中,海马主要集中在CA3和CA4区,说明缺血导致脑内NO大量产生,高浓度的NO参与了脑缺血损伤。Rhy缺血前30min腹腔给药,可显著抑制NOS阳性细胞数目的增多,其作用与NO合成抑制剂L-NAME的作用相似。说明Rhy可减少脑缺血-再灌注损伤中皮层和海马NO的生成,降低NO的损害作用,从而对脑缺血产生保护作用。

参考文献

- 1 Vincent SR, Ki mura H. Histochemical mapping of nitric oxide

- synthase in the rat brain .Neurosci,1992,46(4): 755 .
- 2 蔡文琴,王伯云.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.第一版.成都:四川科学技术出版社,1994: 510 .
 - 3 Sato S, Tominaga T, Ohnishi T, *et al* . Electron paramagnetic resonance study on nitric oxide production during brain focal ischemia and reperfusion in the rat .Brain Res ,1994 ,647(1): 91 .
 - 4 Tominagi T, Sato S, Ohnishi T, *et al* . Electron paramagnetic resonance (EPR) detection of nitric oxide production during forebrain ischemia of the rat .J Cereb Blood flow Metab,1994 , 14(5): 715 .
 - 5 Li HL, Cai WQ, Zhao SF, *et al* . Changes of neuronal nitric oxide synthase (NOS) after the trauma and ischemia/ reperfusion in rat brain . Advances of Histochemistry and Cytochemistry ,Chongqing ,Chongqing Publishing House ,1996: 300 .
 - 6 Kahn RA, Weinberger J, Brannan T, *et al* . Nitric oxide modulates dopamine release during global temporary cerebral ischemia .Anesth Analg ,1995 ,80(6): 1116 .
 - 7 Strasser A, Yasuma Y, McCarron RM, *et al* . Effect of nitric oxide - L - arginine on cerebral blood flow and dopamine metabolism during ischemia/ reperfusion in the mongolian gerbil .Brain Res , 1994 ,664(1 - 2): 197 .
 - 8 Nagafuji T, Matsui T, Koide T, *et al* . Blockade of nitric oxide formation by N - omega - L - arginine mitigates ischemic brain edema and subsequent cerebral infarction in rats . Neurosci Lett ,1992 ,147(2): 159 .
 - 9 Nagafuji T, Sugiyama M, Matsui T, *et al* . A narrow therapeutic window of a nitric oxide synthase inhibitor against transient ischemic brain injury .Eur J Pharmacol ,1993 ,248(4) : 325 .

收稿日期:1998 - 01 - 16