

基础研究

抑肽酶预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤的影响

李锋涛¹, 程斌², 贺西京¹

(1 西安交通大学医学院第二附属医院骨二科; 2 骨三科 710004 西安市)

【摘要】目的:观察抑肽酶预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤的影响,为临床应用抑肽酶治疗脊髓缺血再灌注损伤提供实验依据。**方法:**6 月龄国产大耳白兔 39 只,随机分为 A 组(15 只)、B 组(15 只)和 C 组(9 只)。A、B 组动物于左肾动脉下用主动脉环扎器环扎腹主动脉,缺血 60min 后开放,再灌注 24h。A 组于缺血前 10min 静脉注射抑肽酶 3×10^7 IU/kg,继而用 Graseby 3500 微量泵持续注入抑肽酶 1×10^7 IU/(kg·h)至处死动物时;B 组用生理盐水代替 A 组的抑肽酶,其余同 A 组;C 组只暴露不夹闭腹主动脉,不给药。A、B 组缺血前,缺血 5、10、20、60min 及再灌注后 8h、24h, C 组相应时间点,测定各组皮层体感诱发电位(CSEP)。A、B 组缺血前,缺血再灌注后 8h、24h, C 组相应时间点,处死动物,取 L2~L4 脊髓行一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)测定,取 L3~L4 脊髓灰质切片进行组织学检查,观察神经元形态变化。**结果:**A、B 两组缺血 5min 时 CSEP 的 P1 波和 N1 波潜伏期较缺血前延长、波幅降低($P < 0.05$),缺血 20min 时两波潜伏期及波幅消失,缺血再灌注后 8h 两波潜伏期及波幅有所恢复,但较缺血前及缺血后 5min、10min 时明显延长和降低($P < 0.01$),缺血再灌注后 24h 两波潜伏期及波幅较前面各时间点延长和降低($P < 0.01$);缺血再灌注后 8h、24h, A 组较 B 组 P1 波和 N1 波潜伏期短、波峰高($P < 0.05$),而 C 组较 A、B 组潜伏期短、波峰高($P < 0.01$)。A、B 两组 NO、总 NOS 及诱导型 NOS(iNOS)在缺血再灌注后 8h 明显升高,24h 时更高($P < 0.05$),在缺血再灌注后 8h、24h 时 A 组的 NO、总 NOS 及 iNOS 较 B 组低($P < 0.01$)。各时间点 C 组 P1 波和 N1 波潜伏期及波幅不变,NO、总 NOS 及 iNOS 量均不变($P > 0.05$)。A、B 组脊髓缺血再灌注后神经元均有损伤,但在再灌注后 8h、24h 时 A 组神经元损伤程度均较 B 组为轻;C 组神经元正常。**结论:**抑肽酶预处理可以改善脊髓缺血再灌注早期的 CSEP,减少 NO 含量,从而减少缺血再灌注损伤。

【关键词】脊髓损伤;缺血再灌注;抑肽酶;一氧化氮;一氧化氮合酶;皮层体感诱发电位

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.09.11

中图分类号:R453.9,R364.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-09-0682-07

Effect of aprotinin pretreating on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits/LI Fengtao, CHENG Bin, HE Xijing/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(9): 682~688

【Abstract】Objective: To observe the effect of aprotinin pretreating on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits, and to provide experimental theory for treating spinal cord ischemia-reperfusion injury by aprotinin. **Method:** Thirty-nine rabbits were randomly divided into group A (15 rabbits) and group B (15 rabbits) and group C (9 rabbits). The abdominal aorta under the left infrarenal segment was clamped for 60min to construct the model of lumbosacral spinal cord ischemia in rabbits. Reperfusion was followed and kept on for twenty-four hours until the blood flow regained normal. Aprotinin was given 3×10^7 IU/kg as a short time intravenous injection for 10min before ischemia, and then was drilled with micro pump by 1×10^7 IU/kg/(kg·h). Normal saline was used in control group, the ischemia-reperfusion duration between group A and group B remained same. Animals in group C was only exposed abdominal aorta which were not clamped. Before the spinal cord ischemia and after the ischemia 5, 10, 20 and 60min, and after the reperfusion 8h and 24h, cortical somatosensory evoked potential (CSEP) were measured. Then the rabbits were killed before ischemia and at 8h, 24h after ischemia-reperfusion respectively, the L2-L4 segment spinal cord were harvested to detect content of nitric oxid (NO) and nitric oxide synthase (NOS) histopathologically. The gray matter from L3-4 spinal cord were sliced and tested histologically to evaluate the status of neurons. **Result:** In group A and group B, the P1 and N1 waves amplitudes of CSEP obviously lowered and the latent periods were longer at 5min after the ischemia which disappeared at 20min after the ischemia ($P < 0.05$). After 8h of reperfusion, the amplitudes and the

第一作者简介:男(1980-),在读博士,研究方向:脊柱外科

电话:(029)87679584 E-mail:lft369@sina.com

latent periods of the P1 and N1 waves slightly raised, however, they were lower or more length of latency than they were before the ischemia and after the ischemia 5min, 10min ($P<0.01$) respectively. After 24h of reperfusion, they became lower or more length than they were at every time-point before. After 8h and 24h of reperfusion, P1 wave and N1 wave in group A had shorter latency and lower wave amplitudes than those in group B ($P<0.05$), while group C had shorter latent period and higher amplitudes than group A and B ($P<0.05$). In group A and group B, the content of NO, NOS obviously became high after reperfusion of 8 hours, and they reached peak after the reperfusion of 24 hours ($P<0.05$). At two time-point, the content of NO, NOS in group A were lower than they were in group B ($P<0.01$). The P1 and N1 waves amplitudes, latency periods and the content of NO, NOS remained unchanged at every time-point in group C ($P>0.05$). After spinal cord ischemia-reperfusion, the spinal cord neurons were injured with the degree of injured neurons slighter in group A than in group B after the reperfusion 8h and 24hs. The neurons in group C were normal. **Conclusion:** Aprotinin pre-treatment can improve wave amplitude and latency period of CSEP of rabbits' spinal cord during spinal cord ischemia-reperfusion, which can decrease the content of NO and apoptosis of nerve cell.

[Key words] Spinal cord injury; Ischemia-reperfusion; Aprotinin; Nitric oxid; Nitric oxide synthase; Cortical somatosensory evoked potential

[Author's address] Department of the Second Orthopedics, 2nd Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an, Shanxi, 710004, China

脊髓缺血损伤是由于脊髓局部缺血引起兴奋性氨基酸中毒、大量氧自由基生成、脂质过氧化, 从而激活白细胞以及释放多种炎性介质, 导致神经细胞变性、坏死和程序性凋亡的复杂过程^[1]。抑肽酶是从牛肺或胰腺中提取的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 它具有多种活性, 如保护血小板功能、减少纤维蛋白的溶解、抑制中性粒细胞的激活, 已在减少体外循环手术后的出血, 心脑肾肺等缺血再灌注损伤得到广泛的应用^[2], 它还具有防止脑细胞水肿的作用^[3], 但在脊髓损伤方面的应用报道较少。本研究主要目的是探讨抑肽酶预处理对兔脊髓缺血损伤在病理生理方面的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备

注射用抑肽酶 (兰州大得利生物化学制药有限公司, 5×10^8 IU/支); 一氧化氮(NO)测试盒(硝酸还原酶法, 50T)、NOS 测试盒(50T)、总蛋白定量测试盒(双缩脲法, 100T), 均由南京建成生物工程研究所提供。照相显微镜(OLYMPUS CH21-3, 日本), 四导联诱发电位肌电图仪(Dantec Keypoin 型, 丹麦), 紫外可见分光光度计(752S 型, 中国), 透射电镜(H-600, 日本)。

1.2 实验动物分组

1 级清洁级国产大耳白兔 39 只(西安交通大学动物实验中心提供), 雌雄不限, 6 月龄, 体重 1.5~2.3kg, 平均 1.8kg。随机分为脊髓缺血再灌注

抑肽酶预处理实验组(A 组, 15 只)、脊髓缺血再灌注生理盐水对照组(B 组, 15 只)和假手术空白组(C 组, 9 只)。

1.3 动物模型建立

术前禁食过夜, 自由饮水。参照 Zivin 等^[4]方法, 氯胺酮(50mg/kg)肌肉注射麻醉, 取腹正中切口, 暴露腹主动脉, 于左肾动脉下方置一细聚乙烯管, 管的两端各穿 1 枚塑料扣, 细管外再套一内径 3.8mm 的粗管, 细管内引入细丝线形成腹主动脉环扎器, 缝合伤口。待动物清醒后 A、B 组收紧环扎线, 缺血 60min 后开放, 再灌注 24h。A 组缺血前 10min 静脉注射抑肽酶 3×10^7 IU/kg^[5], 继而用 Graseby 3500 微量泵持续注入抑肽酶 1×10^7 IU/(kg·h)直至处死动物时。B 组缺血前 10min 静脉注射等量生理盐水, 继而用 Graseby 3500 微量泵持续静脉注入等量生理盐水直至处死动物时。C 组只暴露但不夹闭腹主动脉, 不给药。夹闭前经耳缘静脉注射 500U/kg 肝素抗凝。A、B 组动物双下肢不能负重、感觉消失(针刺后肢无疼痛反应视为感觉消失)视为建模成功。

1.4 皮层体感诱发电位(CSEP)的观察

A、B 组分别于缺血前和缺血 5、10、20、60min 及再灌注后 8h、24h 和 C 组相应时间点测定各组 CSEP(C 组在与缺血再灌注后 24h 相对应的时间点为 3 只, 其他各时间点每组 5 只)。双根银针电极间距 1.0cm, 银针直径 0.5mm, 插入兔后肢腓窝下胫后神经附近实施电脉冲刺激, 刺激参数: 强度

4mA, 频率 3Hz, 波宽 1.0ms 单方波, 信号叠加 500 次。在颅骨正中央矢状线旁开 4.0mm、冠状线下 2.5mm 处紧贴颅骨放置记录电极, 与另一侧相同位置紧贴颅骨放置参考电极, 保持电极位置良好, 并固定之。记录电极安放于颅骨表面相对于后肢皮层感觉区, 参考电极安放于皮下, 灵敏度为 5 μ V, 滤波范围 10~3000Hz。

1.5 NO 和 NOS 的测定

A、B 组缺血前及 C 组相应时间点经耳缘静脉空气注射法各处死 2 只动物; 缺血再灌注后 8h、24h A 组和 B 组每个时间点各处死 3 只动物, C 组每个时间点各处死 2 只动物, 取 L2~L4 脊髓保存于 -20℃ 冰箱, 待用。

1.5.1 NO 的测定(硝酸还原酶法) 从 -20℃ 冰箱取出样本, 称重约 0.2g, 4℃ 条件下在组织匀浆器中研磨组织, 按照重量体积比 1:9 加生理盐水制成 10% 的组织匀浆。然后 1000~2000 转/min 离心 5~8min, 取 100 μ l 上清液待测。按照 NO 试剂盒说明书加样。所得样本试剂在波长 550nm 条件下, 用分光光度计进行比色, 测各试管吸光度(OD)值并记录。根据总蛋白定量测试盒的说明测定样本的蛋白含量。NO 含量(μ mol/g $\cdot$ prot)=[(测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度)] $\times$ 标准品浓度(20 μ mol/L) $\div$ 样本的蛋白含量(g $\cdot$ prot/L)。

1.5.2 NOS 的测定 从 -20℃ 冰箱中取出样本, 常温下融化, 研磨组织成为匀浆后, 以 3000 转/min 离心 10min, 取上清液 100 μ l 待测。按照 NOS 试剂盒说明书加样。所得样本试剂在波长 530nm 条件下, 用分光光度计进行比色, 测各试管吸光度(OD)值并记录。按照以下公式计算出总 NOS 及 iNOS 活力。总 NOS 活力 (U/mg $\cdot$ prot)=[(总 NOS 测定管 OD 值-空白管 OD 值)/呈色物纳摩尔消光系数] $\times$ (反应液总体积/取样量) $\times$ [1/(比色光径 $\times$ 反应时间)] $\div$ 蛋白含量 (mg $\cdot$ prot/L)=[(总 NOS 测定管 OD 值-空白管 OD 值)/38.6 $\times$ 10 $^{-6}$] $\times$ [(2.51+a)/a] $\times$ [1/(15 $\times$ 1)] $\div$ 蛋白含量 (mg $\cdot$ prot/L); 诱导型 NOS (iNOS) 活力 (U/mg $\cdot$ prot)=[(iNOS 测定管 OD 值-空白管 OD 值)/呈色物纳摩尔消光系数] $\times$ (反应液总体积/取样量) $\times$ [1/(比色光径 $\times$ 反应时间)] $\div$ 蛋白含量 (mg $\cdot$ prot/L)=[(iNOS 测定管 OD 值-空白管 OD 值)/38.6 $\times$ 10 $^{-6}$] $\times$ [(2.51+a)/a] $\times$ [1/(15 $\times$ 1)] $\div$ 蛋白含量 (mg $\cdot$ prot/L), a 为参考取样量以及补充双蒸

水的量。

1.6 组织学检查

于缺血前及缺血再灌注后 8h、24h 每个时间点 A 组和 B 组各随机处死 2 只动物, C 组每个时间点处死 1 只, 用 4% 多聚甲醛与 1% 戊二醛混合液 (0.2M 缓冲液) 进行体内固定约 2h, 取 L3~L4 段脊髓灰质 (1 $\times$ 1 $\times$ 8mm), 切成 1mm³ 小块, 一部分放入 4% 多聚甲醛溶液中, 每个样本以中央管为中心向周围切片 5 张, 厚度 5 μ m, 行 HE 染色, 光镜下观察每组家兔脊髓神经元形态; 另一部分放入 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛混合液 (0.1M 缓冲液) 中, 切片送电镜检查, 观察神经元受损及凋亡情况。

1.7 数据处理

所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用 *t* 检验 (成组及配对 *t* 检验), $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

A、B 组各有 1 只因出血过多致失血性休克死亡, 进入结果分析为 3 组共 37 只。

2.1 CSEP 检测

兔麻醉后, 刺激胫后神经在脑皮层记录到的 M 型波, 第一波为向下的 P1 波, 第二波为向上的 N1 波, 3 组不同时间点 CSEP 的 P1 波和 N1 波的潜伏期和波幅见表 1、2。3 组缺血前的 P1 与 N1 波的潜伏期、波幅无显著性差异 ($P>0.05$); A、B 两组缺血 5min 时 CSEP 的 P1 波和 N1 波潜伏期较缺血前延长、波幅降低 ($P<0.05$), 直至缺血 20min 时两波潜伏期及波幅消失, 脊髓缺血再灌注后 8h 两波潜伏期及波幅有所恢复, 但较缺血前及缺血后 5min、10min 时明显延长和降低 ($P<0.01$), 脊髓缺血再灌注后 24h 时两波潜伏期及波幅较前面各时点延长和降低 ($P<0.01$)。缺血再灌注 8h、24h 后, A 组 P1 波和 N1 波潜伏期较 B 组短、波幅较 B 组高 ($P<0.05$), 而 A、B 组较 C 组潜伏期长、波幅低 ($P<0.01$)。整个实验过程中, C 组 P1 波和 N1 波潜伏期及波幅不变 ($P>0.05$)。

2.2 缺血再灌注前后家兔脊髓中 NO 含量、NOS 活力变化

缺血前及缺血再灌注后 8h、24h 时 3 组动物缺血节段脊髓组织中总 NOS、iNOS 和 NO 的结果见表 3、4。缺血前 3 组总 NOS、iNOS 和 NO 无显

表 1 3 组兔不同时间点 CSEP 检测 P1 波的波幅与潜伏期

($\bar{x} \pm s$)

	潜伏期(ms)			波幅(μV)		
	实验组	对照组	空白组	实验组	对照组	空白组
缺血前或术前	18.6 $\pm$ 1.3	18.0 $\pm$ 1.1	19.3 $\pm$ 1.5	7.5 $\pm$ 0.7	7.9 $\pm$ 1.3	8.4 $\pm$ 0.8
缺血或术后						
5min	22.0 $\pm$ 0.7 ^{①③}	21.5 $\pm$ 2.3 ^{①③}	18.7 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 0.7 ^{①③}	5.7 $\pm$ 0.8 ^{①③}	8.0 $\pm$ 0.5
10min	23.4 $\pm$ 1.1 ^③	24.1 $\pm$ 1.0 ^{①③}	17.7 $\pm$ 1.4	2.4 $\pm$ 0.5 ^{①③}	2.1 $\pm$ 0.3 ^{①③}	8.8 $\pm$ 1.1
20min	—	—	18.3 $\pm$ 0.6	—	—	8.5 $\pm$ 0.7
60min	—	—	18.9 $\pm$ 0.5	—	—	8.7 $\pm$ 0.4
再灌注后或相应时间点						
8h	38.7 $\pm$ 1.4 ^{①②③}	41.1 $\pm$ 1.7 ^{①③}	19.4 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 0.8 ^{①②③}	3.1 $\pm$ 0.6 ^{①③}	8.1 $\pm$ 0.5
24h	40.9 $\pm$ 1.0 ^{①②③}	43.7 $\pm$ 1.9 ^③	19.1 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.4 ^{①②③}	1.6 $\pm$ 0.6 ^{①③}	8.9 $\pm$ 1.4

注:①与同组前一时间点比较 $P<0.05$;②与同时时间点对照组比较 $P<0.05$;③与同时时间点空白组比较 $P<0.01$

表 2 3 组兔不同时间点 CSEP 检测 N1 波的波幅、潜伏期

($\bar{x} \pm s$)

	潜伏期(ms)			波幅(μV)		
	实验组	对照组	空白组	实验组	对照组	空白组
缺血前或术前	21.7 $\pm$ 1.5	21.1 $\pm$ 1.6	22.6 $\pm$ 1.7	6.9 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.8
缺血或术后						
5min	25.5 $\pm$ 1.1 ^{①②}	26.3 $\pm$ 1.3 ^{①②}	20.8 $\pm$ 1.5	5.2 $\pm$ 0.6 ^{①②}	4.9 $\pm$ 0.5 ^{①②}	7.7 $\pm$ 0.7
10min	26.6 $\pm$ 1.3 ^②	27.2 $\pm$ 2.1 ^②	22.0 $\pm$ 1.2	2.7 $\pm$ 0.7 ^{①②}	2.5 $\pm$ 0.3 ^{①②}	7.2 $\pm$ 0.5
20min	—	—	21.6 $\pm$ 1.3	—	—	7.9 $\pm$ 0.7
60min	—	—	21.1 $\pm$ 1.7	—	—	8.0 $\pm$ 0.6
再灌注后或相应时间点						
8h	45.7 $\pm$ 2.5 ^{①②③}	49.5 $\pm$ 2.2 ^{①②}	21.9 $\pm$ 1.3	3.9 $\pm$ 0.5 ^{①②③}	2.5 $\pm$ 0.9 ^②	7.4 $\pm$ 1.5
24h	51.8 $\pm$ 2.8 ^{①②③}	55.9 $\pm$ 1.7 ^{①②}	21.3 $\pm$ 1.1	2.3 $\pm$ 0.5 ^{①②③}	1.6 $\pm$ 0.3 ^{①②}	7.0 $\pm$ 0.9

注:①与同组前一时间点比较 $P<0.05$;②与同时时间点空白组比较 $P<0.05$;③与同时时间点对照组比较 $P<0.01$

表 3 3 组兔不同时间点缺血节段脊髓组织中 NOS 活力

($\bar{x} \pm s$, U/mgprot)

	总 NOS 活力			iNOS 活力		
	缺血前 或术前	再灌注后 8h 或相应时间点	再灌注后 24h 或相应时间点	缺血前 或术前	再灌注后 8h 或相应时间点	再灌注后 24h 或相应时间点
对照组	1.373 $\pm$ 0.234	2.875 $\pm$ 0.328 ^{①②③}	3.517 $\pm$ 0.431 ^{①②③}	0	0.684 $\pm$ 0.217 ^{①②③}	1.703 $\pm$ 0.312 ^{①②③}
实验组	1.558 $\pm$ 0.276	2.235 $\pm$ 0.394 ^{①③}	2.867 $\pm$ 0.341 ^{①③}	0	0.353 $\pm$ 0.148 ^{①③}	1.163 $\pm$ 0.231 ^{①③}
空白组	1.426 $\pm$ 0.253	1.483 $\pm$ 0.316	1.512 $\pm$ 0.279	0	0	0

注:①与同组前一时间点比较 $P<0.01$;②与同时时间点实验组比较 $P<0.01$;③与同时时间点空白组比较 $P<0.01$

表 4 3 组兔不同时间点缺血节段脊髓组织中 NO 含量

($\mu\text{mol/gprot}$)

	缺血前 或术前	再灌注后 8h 或相应时间点	再灌注后 24h 或相应时间点
对照组	0.267 $\pm$ 0.089	0.732 $\pm$ 0.103 ^{①②③}	1.169 $\pm$ 0.124 ^{①②③}
实验组	0.241 $\pm$ 0.067	0.484 $\pm$ 0.085 ^{①③}	0.878 $\pm$ 0.095 ^{①③}
空白组	0.261 $\pm$ 0.075	0.257 $\pm$ 0.076	0.238 $\pm$ 0.093

注:①与同组前一时间点比较 $P<0.01$;②与同时时间点实验组 $P<0.01$;③与同时时间点空白组比较 $P<0.01$

著性差异 ($P>0.05$);再灌注后 8h、24h 时, A、B 组每组总 NOS、iNOS 和 NO 较缺血前明显升高 ($P<0.01$), 相同时间点 A 组明显低于 B 组 ($P<0.01$),

A、B 组明显高于 C 组 ($P<0.01$)。

2.3 组织学检查

2.3.1 HE 染色 A、B 组缺血再灌注前及 C 组各时间点脊髓神经元轮廓清楚, 呈多极形, 细胞核大多位于中央, 核仁清晰可见, 尼氏体均匀分布于核周, 胞浆均匀, 周围有少量的透亮区 (图 1)。B 组缺血再灌注后 8h, 神经元固缩变形, 细胞核深染, 核仁、尼氏体模糊不清 (图 2a); 24h 时神经元进一步变性, 细胞核深染, 核仁、尼氏体消失溶解, 胞浆浓缩 (图 2b)。A 组再灌注后 8h, 神经元轮廓清楚, 细胞核位于中央, 核仁尚清楚, 尼氏体较模糊, 胞浆均匀, 轻度肿胀 (图 3a); 24h 时细胞核深染,

稍有浓缩,核仁、尼氏体模糊,胞浆稍有浓缩(图 3b)。

2.3.2 电镜观察 A、B 组缺血再灌注前及 C 组各时间点脊髓细胞核圆形,核膜完整均匀,染色质分布均匀、无边聚现象,核仁清楚,核周细胞器分布均匀,未见电子致密团块(图 4)。B 组再灌注后 8h,细胞核呈椭圆形,核膜有电子致密物聚集,染色质边聚,分布不均,核仁尚清楚,电子密度增高,核周电子密度增高,细胞器分布不均、模糊(图 5a);24h 时细胞核膜溶解,核仁、染色质溶解,有电子致密物质大量聚集,胞浆出现空泡样改变,细胞器溶解、不清(图 5b)。A 组再灌注后 8h 细胞核

呈圆形,稍有肿胀,核膜较均匀、光滑,有少量电子致密物,染色质分布较均匀,核周细胞器肿胀,分布均匀(图 6a);24h 时细胞核膜较光滑,有电子致密物附着其上,染色质边聚,分布不均,与其再灌注后 8h 时比较电子密度增高(图 6b)。

3 讨论

脊髓缺血再灌注损伤是由一系列因素共同参与、互相作用而最终引起的脊髓不可逆性损伤。缺血再灌注后,谷氨酸等兴奋性氨基酸(EAA)释放增加,其与脊髓上 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体结合,导致钙离子大量进入细胞内,形成钙超

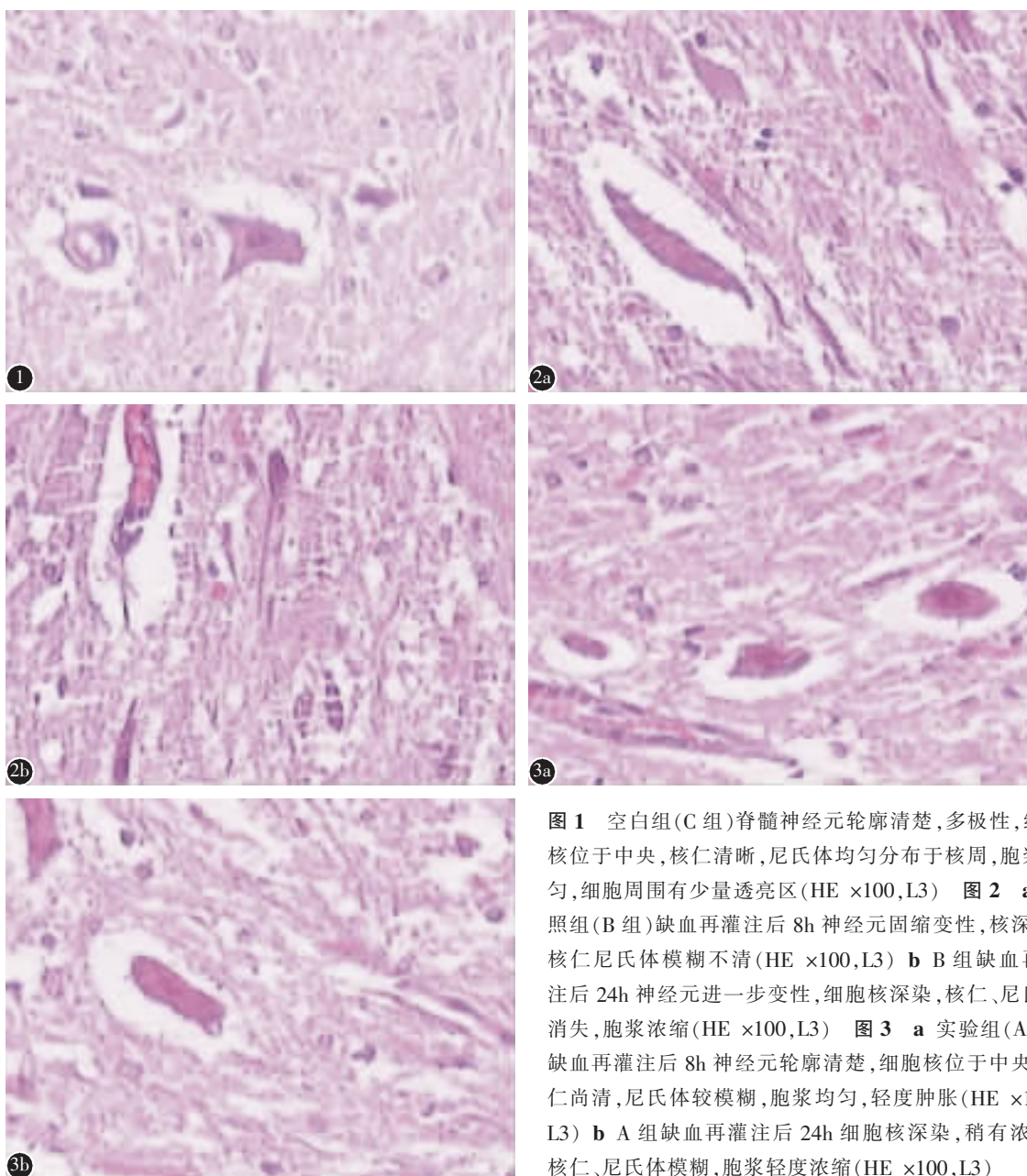


图 1 空白组(C 组)脊髓神经元轮廓清楚,多极性,细胞核位于中央,核仁清晰,尼氏体均匀分布于核周,胞浆均匀,细胞周围有少量透亮区(HE $\times 100$, L3) 图 2 a 对照组(B 组)缺血再灌注后 8h 神经元固缩变性,核深染,核仁尼氏体模糊不清(HE $\times 100$, L3) b B 组缺血再灌注后 24h 神经元进一步变性,细胞核深染,核仁、尼氏体消失,胞浆浓缩(HE $\times 100$, L3) 图 3 a 实验组(A 组)缺血再灌注后 8h 神经元轮廓清楚,细胞核位于中央,核仁尚清,尼氏体较模糊,胞浆均匀,轻度肿胀(HE $\times 100$, L3) b A 组缺血再灌注后 24h 细胞核深染,稍有浓缩,核仁、尼氏体模糊,胞浆轻度浓缩(HE $\times 100$, L3)

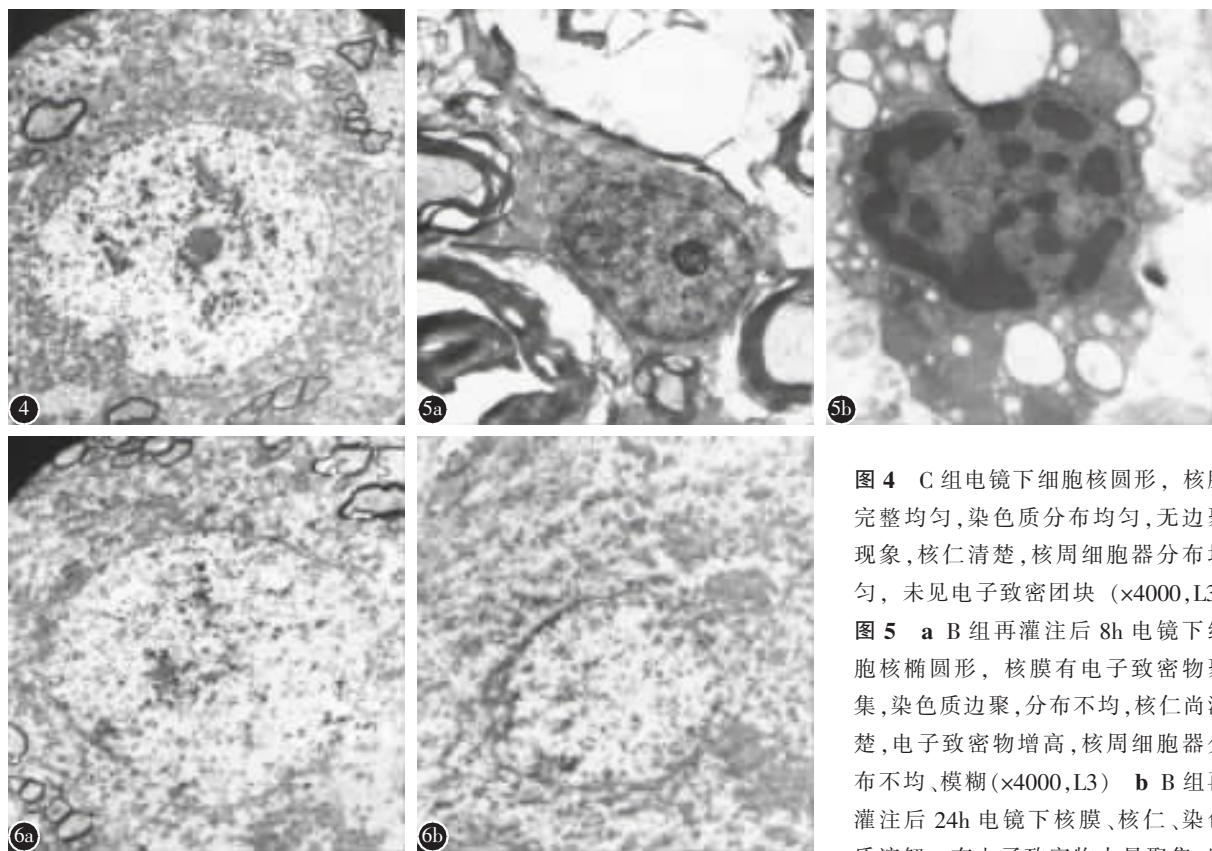


图 4 C 组电镜下细胞核圆形, 核膜完整均匀, 染色质分布均匀, 无边聚现象, 核仁清楚, 核周细胞器分布均匀, 未见电子致密团块 (x4000, L3)

图 5 a B 组再灌注后 8h 电镜下细胞核椭圆形, 核膜有电子致密物聚集, 染色质边聚, 分布不均, 核仁尚清楚, 电子致密物增高, 核周细胞器分布不均、模糊 (x4000, L3) b B 组再灌注后 24h 电镜下核膜、核仁、染色质溶解, 有电子致密物大量聚集, 胞

浆出现空泡样改变, 细胞器溶解, 不清 (x4000, L3) 图 6 a A 组缺血再灌注后 8h 电镜下细胞核圆形, 轻度肿胀, 核膜较均匀, 有少量电子致密物, 染色质分布较均匀, 核周细胞器肿胀, 分布均匀 (x4000, L3) b A 组缺血再灌注后 24h 电镜下细胞核膜较光滑, 有电子致密物附着其上, 染色质边聚, 分布不均, 与其再灌注后 8h 时比较电子密度增高 (x4000, L3)

载, 激活多种酶类, 致 DNA 分子、蛋白质和磷脂降解, 大量自由基形成, 线粒体水肿、溶解, 加重细胞缺氧^[6]。同时诱导 iNOS 产生, 其不依赖钙及钙调蛋白, 一旦产生便可持续大量生成 NO。而 NO 通过介导兴奋性氨基酸神经毒、参与氧自由基形成、抑制细胞氧化呼吸, 直接使 DNA 分子断裂, 加重神经细胞的继发性损伤^[7]。缺血再灌注后黄嘌呤和次黄嘌呤 ATP 代谢产物、黄嘌呤氧化酶(XO)大量生成, 磷脂降解产生的花生四烯酸(AA)在代谢过程中产生大量氧自由基, 引起严重的炎症反应^[8], 破坏生物膜, 广泛损害细胞器与膜结构, 最终导致细胞自溶, 神经细胞坏死变性。组织水肿、破坏, 血管阻塞或痉挛, 进一步加重组织缺血再灌注损伤, 造成细胞自溶, 神经细胞坏死变性。

抑肽酶是从动物脏器中提取的一种碱性多肽, 是广谱丝氨酸蛋白酶抑制剂, 有抑制胰蛋白酶、激肽释放酶、纤溶酶、白细胞水解酶和血小板聚集、粘附等作用, 减少脑组织水肿^[9], 广泛用于体外循环的心血管手术和多种疾病治疗^[10]。缺血

再灌注后损伤的脊髓血管内皮细胞及进入损伤区的巨噬细胞合成肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 前体, 然后在丝氨酸蛋白酶的作用下水解成成熟的 TNF- α 。TNF- α 进一步激活中性粒细胞, 刺激其粘附于内皮细胞表面, 脱颗粒, 增加中性粒细胞过氧化产物生成和吞噬作用, 损伤神经细胞。抑肽酶通过抑制丝氨酸蛋白酶减少炎性介质的合成与释放^[11-13], 抑制不成熟的 TNF- α 转化为成熟的 TNF- α , 减少白细胞介素 8 (IL-8) 分泌, 同时抑制白细胞介素 6 (IL-6) 的释放, 改善中性粒细胞的趋化性, 减轻中性粒细胞聚集, 预防细胞因子级联反应, 减少氧自由基生成, 提高超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 增强氧自由基清除能力^[9], 减轻脊髓组织进一步损伤。抑肽酶阻碍 TNF- α 的成熟, 可以减少 TNF- α 诱导细胞产生 iNOS, 减少内源性 NO 的生成, 减少兴奋性氨基酸的毒性作用, 减少 Ca^{2+} 的内流, 减少再灌注时神经细胞的凋亡。脑、脊髓缺血时, 血液及组织中的缓激肽 (BK) 水平升高, 且 BK 水平与组织水肿的严重程度相关。BK

激活磷酸脂酶 A2(PLA2),加速了 AA 释放。AA 及其产物血栓烷 A2 或白三烯增多,引起瀑布效应,加重脑、脊髓组织水肿。抑肽酶通过抑制激肽释放酶,减少缓激肽生成,从而减少 AA 释放,抑制脑、脊髓水肿。抑肽酶还可抑制黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶,减少氧自由基生成,稳定溶酶体膜,减少溶酶体酶的释放。

大量研究^[14-16]发现,抑肽酶对于肺脏、脑、心脏、肝脏、肾脏等的缺血再灌注损伤具有保护作用,而对于脊髓缺血再灌注损伤的保护方面研究较少。本实验应用 Zivin 等^[4]的方法建立脊髓缺血损伤模型,观察抑肽酶预处理缺血再灌注兔脊髓后脊髓病理生理变化。结果示缺血再灌注后 8h、24h,实验组与对照组比较,CSEP 的 P1、N1 波幅增高、潜伏期较短($P<0.05$);在相同时点,两组相比,实验组 iNOS 活力和 NO 的含量降低($P<0.01$);在光镜和电镜下,实验组神经元形态较对照组有明显改善。提示抑肽酶预处理能改善脊髓缺血再灌注损伤后的 CSEP 波幅和潜伏期,减少 NO 的生成,保护损伤区脊髓神经细胞。其可能机制为通过抑制丝氨酸蛋白酶,减少缺血再灌注后脊髓炎症反应,减少兴奋性氨基酸毒性作用及 Ca^{2+} 的内流,减少氧自由基生成,稳定细胞膜,抑制神经元水肿,减少细胞凋亡等发挥作用^[15]。但本研究结果显示,实验组与空白组比较有显著性差异,说明抑肽酶预处理还不能完全保护缺血再灌注所引起的脊髓损伤。这可能是因为脊髓损伤是一系列复杂的病理过程,而抑肽酶仅对其中的一些损伤因素起了阻碍作用,而不能阻止所有的损伤因素。其保护作用的具体机制以及如何最大限度地保护脊髓组织,有待进一步研究。

4 参考文献

1. 朱庆三,尹飞,郭丽,等.脊髓缺血再灌注损伤中即早基因表达及细胞凋亡的研究[J].中国临床康复,2003,7(17):2390-2391
2. Mössinger H,Dietrich W,Braun SL,et al. High-dose aprotinin reduces activation of hemostasis,allogeneic blood requirement, and duration of postoperative ventilation in pediatric cardiac surgery[J].Ann Thorac Surg,2003,75(2):430-437.
3. Sodha NR,Boodhwani M,Bianchi C,et al.Aprotinin in cardiac surgery[J].Expert Rev Cardiovasc Ther,2006,4(2):151-160.
4. Zivin JA,DeGirolami U,Hurwitz EL. Spectrum of neurological deficits in experimental CNS ischemia[J].Arch Neurol,1982,39(7):408-412.
5. 夏瑞,杨光,卢娟,等.抑肽酶对家兔全脑缺血再灌注期白细胞介素-8 基因的影响[J].中华实验外科杂志,2001,18(2):167-168.
6. 张秋林,李明,赵杰,等.腺苷受体激动剂对大鼠脊髓损伤后细胞外液兴奋性氨基酸的影响 [J]. 第二军医大学学报,2000,21(1):71-73.
7. Osuka K,Watanabe Y,Usuda N, et al. Modification of endothelial NO synthase through protein phosphorylation after forebrain cerebral ischemia reperfusion[J].Stroke,2004,35(11):2582-2586.
8. Tetik O,Yagdi T,Islamoglu F,et al.The effects of L-carnitine on spinal cord ischemia/ reperfusion injury in rabbits[J].Thorac Cardiovasc Surg,2002,50(1):11-15.
9. 周春奎,吴江,孟令秋.抑肽酶佐治脑出血脑水肿作用机制的探讨[J].中华神经科杂志,2005,38(1):22-24.
10. Turkoz A,Cigli A,But K, et al. The effects of aprotinin and steroids on generation of cytokines during coronary artery surgery[J].J Cardiothorac Vasc Anesth,2001,15(5):603-610.
11. Landis RC,Asimakopoulos G,Poullis M,et al. The antithrombotic and antiinflammatory mechanisms of action of aprotinin [J].Ann Thorac Surg,2001,72(6):2169-2175.
12. 闵心平,胡志伟,张凯伦,等.抑肽酶抑制凝血酶诱导的人脐静脉内皮细胞 IL28 的表达 [J]. 华中科技大学学报(医学版),2008,37(3):302-305.
13. Ulker S,McKeown PP,Bayraktutan U.Aprotinin impairs coronary endothelial function and down-regulates endothelial NOS in rat coronary microvascular endothelial cells[J].Cardiovasc Res,2002,55(4):830-837.
14. 曹士奇,陈明智,刘尊涛.依达拉奉与抑肽酶对兔急性肺损伤的保护作用比较 [J]. 江苏大学学报(医学版),2008,18(5):413-415.
15. 田力,申明惠,王佳贺,等.抑肽酶对大鼠实验性脑出血后 AQP4 mRNA 表达及脑水肿的作用[J].中国医学工程,2008,16(3):161-163.
16. 杨雁灵,徐小平,窦科峰,等.抑肽酶和肿瘤坏死因子-抗体对大鼠肝缺血-α 再灌注损伤的保护作用[J].医学研究生学报,2004,17(7):594-597.

(收稿日期:2008-11-12 修回日期:2009-05-08)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)