

积于肾小球, 激活补体后续反应, 造成组织损伤有关。而原发性肾病综合征, 除轻微病变型肾小球肾炎外, 其余均与免疫因素参与有关, 尤其是膜性肾小球肾炎(MGN)<sup>[4]</sup>。目前的研究表明, MGN 的损伤由补体 C5b-9 直接损伤所致<sup>[5]</sup>。本实验测定结果显示, 慢性肾炎综合征组血浆 SC5b-9 升高幅度较小, 检出率略低于肾病综合征组, 但 CH50 活性则下降明显。而肾病综合征组血浆 SC5b-9 升高幅度较大, 检出率较高, 但 CH50 活性下降不如慢性肾炎综合征组显著。鉴于 MGN 的发病机制与肾小球内免疫复合物(IC)原位形成有关, 加上 IC 定位于肾小球基底膜(GBM)上皮侧, 故肾内补体 C5b-9 形成后因受超滤梯度等因素的影响可排入尿囊腔, 尿液中可测出微量的 C5b-9<sup>[4]</sup>。

值得一提的是, 肾炎与肾病患者中有些病例血清 CH50 检测结果属正常范围, 但 SC5b-9 的含量却异常升高。结合其他检查及临床观察发现, 上述患者病情并未完全缓解。因此, 作者认为, 血浆 SC5b-9 浓度可作为反映肾炎及肾病患者预后的敏感指标之一。

就自身抗体而言, 肾炎综合征患者 ANA、AdsDNA 阳性率明显高于肾病综合征患者, 因为肾炎综合

征患者中部分属于狼疮性肾炎。已知 ANA、AdsDNA 的检出率及滴度的升高与自身免疫性疾病的活动呈正相关, 故检测 ANA、AdsDNA 两项指标, 配合临床其他项目的检查, 对于临床初步区分肾炎综合征和肾病综合征、了解病情和判断预后等均有一定的参考价值。

**参考文献:**

[1] 王迎伟, 杜文平. SLE 患者血液 SC5b-9、ANA、AdsDNA 浓度的测定及其意义[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 18(3): 188-191.  
 [2] Liu YS, Du WP, Chen M, et al. Comparative study of dot-immunogold silver staining and dot-ELISA for the detection of serum antibodies against *Wuchereria bancrofti*[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1994, 25(4): 724-727.  
 [3] Ogrodowski JL, Hebert LA, Sedmak D, et al. Measurement of SC5b-9 in urine in patients with the nephrotic syndrome[J]. Kidney Int, 1991, 40(6): 1141-1147.  
 [4] Nangaku M, Alpers CE, Pippin J, et al. Renal microvascular injury induced by antibody to glomerular endothelial cells is mediated by C5b-9[J]. Kidney Int, 1997, 52(6): 1570-1578.  
 [5] Kerjaszki D. Pathogenetic concepts of membranous glomerulopathy (MGN)[J]. J Nephrol, 2000, 13(suppl 3): s96-s100.

收稿日期: 2001-06-11 修回日期: 2001-09-17  
 本文编辑: 吴进

## 低温对脑缺血再灌注期间微管相关蛋白-2 免疫活性的影响\*

顾卫东<sup>1</sup>, 陈群<sup>2</sup>, 曾因明<sup>2</sup>, 丁浩中<sup>1</sup>

(1. 无锡市第四人民医院麻醉科, 江苏 无锡 214062; 2. 徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 江苏 徐州 221002)

**摘要:**目的 观察低温对脑缺血再灌注期间海马 CA1 区微管相关蛋白-2 免疫活性的影响。方法 沙土鼠前脑缺血再灌注模型。动物随机分为假手术组、常温再灌注组和低温再灌注组, 后两组又各分为再灌注 6 h、48 h、96 h 3 个亚组, 每组 10 只。采用免疫组织化学方法结合计算机图像分析测定微管相关蛋白-2 活性, 观察再灌注 48 h、96 h 海马 CA1 区细胞膜、核膜完整, 核仁清楚的锥体神经元数目。结果 常温再灌注 6 h、48 h、96 h 海马 CA1 区微管相关蛋白-2 免疫活性分别为假手术组的 81%、69% 和 51% ( $P < 0.01$ )。低温再灌注 6 h、48 h、96 h 海马 CA1 区微管相关蛋白-2 免疫活性分别为假手术组的 93%、86% 和 71%, 均明显高于常温再灌注组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。再灌注 96 h 时, 常温再灌注组海马 CA1 区细胞膜、核膜完整, 核仁清楚的锥体细胞数目仅为假手术组的 5% ( $P < 0.01$ ), 低温再灌注组为假手术组的 47%, 明显多于常温再灌注组 ( $P < 0.01$ )。结论 低温减轻脑缺血后延迟性神经元死亡的作用可能与其抑制微管相关蛋白-2 的活性降解有关。

**关键词:** 脑; 延迟性神经元死亡; 低温; 微管相关蛋白-2

中图分类号: R743.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-2065(2002)01-0014-04

### Effect of hypothermia on the immunoreactivity of microtubule associated protein 2 during cerebral ischemia/reperfusion

\* 基金项目: 江苏省青年科技基金资助课题(BQ98009)

作者简介: 顾卫东(1970-), 男, 江苏无锡人, 主治医师, 硕士

GU Wei-dong, CHEN Qun, ZENG Yin-ming, et al

(Department of Anesthesiology, Wuxi No.4 People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214062, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of hypothermia on the immunoreactivity of microtubule associated protein 2 (MAP2) during cerebral ischemia/reperfusion. **Methods** The cerebral ischemia models of gerbils were achieved by occluding bilateral carotid arteries, and the insult time was 10 min. The gerbils were randomly divided into sham-operation group, normothermia reperfusion group and hypothermia reperfusion group. The normothermia and hypothermia reperfusion groups were further divided into subgroups according to the reperfusion time (6 h, 48 h and 96 h). The immunoreactivity of MAP2 was determined by using immunohistochemical staining and computer image analysis system. The survival neurons in hippocampal CA1 were counted 48 h and 96 h after reperfusion. **Results** The immunoreactivity of MAP2 in hippocampal CA1 6 h, 48 h and 96 h after reperfusion in normothermia reperfusion group were decreased to 81%, 69% and 51% that in sham-operation group ( $P < 0.01$ ). The immunoreactivities of MAP2 in hippocampal CA1 in hypothermia reperfusion group were 93%, 86% and 71% that in sham-operation group, much higher than that in normothermia reperfusion group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The number of survival neurons in hippocampal CA1 96 h after reperfusion in normothermia reperfusion group was only 5% that in sham-operation group ( $P < 0.01$ ), while the number of survival neurons 96 h after reperfusion in hypothermia reperfusion group was 47%, much more than that in normothermia reperfusion group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Hypothermia could attenuate neuronal damage through inhibition of MAP2 degradation during cerebral ischemia/reperfusion.

**Key words:** brain; delayed neuronal death; hypothermia; microtubule associated protein 2

低温可减轻脑缺血后延迟性神经元死亡(delayed neuronal death, DND)的发生<sup>[1]</sup>,但其机制仍不清楚。脑缺血再灌注可引起细胞骨架成分,如微管相关蛋白-2(microtubule associated protein 2, MAP2)的降解,从而导致细胞损伤<sup>[2]</sup>。低温减少DND的机制是否与其保护细胞骨架成分的作用有关,目前仍未见报道。我们采用沙土鼠前脑缺血再灌注模型,观察了低温对脑缺血再灌注期间海马CA1区MAP2免疫活性的影响,以探讨低温减轻脑缺血再灌注损伤的机制。

## 1 材料和方法

1.1 试剂 MAP2单克隆抗体为Sigma公司产品,生物素结合的马抗鼠IgG和AB液为Vector公司产品。

1.2 动物分组 蒙古沙土鼠(徐州医学院实验动物中心提供),50~70 g,雌雄不拘。根据再灌注期间脑部温度将动物随机分为假手术组、常温再灌注组和低温再灌注组,后两组又各分为再灌注6 h、48 h、96 h 3个亚组。共7组,每组10只。其中5只用于MAP2免疫活性测定,另5只用于病理检查(因DND主要发生在再灌注48 h后,故再灌注6 h组未做病理检查)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制作 制作沙土鼠前脑缺血再灌注模型<sup>[3]</sup>。腹腔注射0.4%戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg)麻醉,仔细分离沙土鼠双侧颈总动脉,应用无创

动脉夹阻断颈总动脉血流造成脑缺血,松开动脉夹恢复脑血流即为再灌注。脑缺血时间10 min,缺血期间脑温维持在(38±0.2)℃。假手术组仅游离双侧颈总动脉但不予阻断。

1.3.2 脑温的测定和调控 采用热敏电阻探头,连续监测鼓膜温度以反映脑温<sup>[4]</sup>。低温再灌注组恢复再灌注后迅速将脑温降至(30±0.2)℃,维持6 h后复温至(38±0.2)℃,常温再灌注组再灌注6 h内控制脑温在(38±0.2)℃。脑温控制期间将动物置于空气浴箱中,采用60 W和100 W白炽灯泡照射加温、冰袋头部重点降温的方法维持脑温,期间通过间断腹腔注射戊巴比妥钠维持麻醉,并记录各组戊巴比妥钠的用量。

1.3.3 病理检查 用0.4%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉,开胸,经主动脉插管灌注生理盐水60 ml,继以4%多聚甲醛100 ml,然后断头取脑,4%多聚甲醛浸泡固定,在海马齿状回互包平面作石蜡切片,厚5 μm,行常规苏木精-伊红染色。低倍镜(4×10)观察海马CA1区锥体细胞带的厚度,高倍镜(40×10)计数海马CA1区内细胞膜和核膜完整、核仁清楚的锥体细胞数目。

1.3.4 MAP2免疫活性测定<sup>[5]</sup> 用0.4%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉,开胸,经升主动脉用生理盐水60 ml冲净血液,4%多聚甲醛磷酸缓冲液(PB, pH 7.4)180 ml灌注固定。取脑,后固定4 h(4℃),浸入含15%蔗糖的PB中4 h,在含30%蔗糖的PB中过夜(4℃)。在海马齿状回互包平面行冰冻切片,片厚

40  $\mu\text{m}$ , 切片按常规免疫组织化学 ABC 法处理及显色。主要染色步骤如下: ①MAP2 单克隆抗体(1:500)于 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育切片 48 h; ②生物素结合的马抗鼠 IgG(1:200)37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h; ③AB 液 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; ④DAB 呈色反应。阴性对照实验: 用 PBS 代替 MAP2 单克隆抗体作上述操作处理, 结果为阴性。用 Olympus 显微镜观察海马 CA1 区, 用 MD-20 图像分析系统测定 MAP2 阳性反应灰度值, 灰度值的大小代表 MAP2 免疫活性的高低。

1.4 统计学处理 所有数据均以均数士标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组间比较采用成组设计  $t$  检验,  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 戊巴比妥钠用量 常温再灌组和低温再灌组戊巴比妥钠用量分别为(73 $\pm$ 20)  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和(77 $\pm$ 19)  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 两组间无显著性差异。

2.2 海马 CA1 区细胞结构正常的锥体神经元数 假手术组海马 CA1 区核膜完整、核仁清楚的锥体细胞数为(96 $\pm$ 12)个/100  $\mu\text{m}^2$ , 常温再灌注 48 h 和低温再灌注 48 h 海马 CA1 区核膜完整、核仁清楚的锥

体细胞数目与假手术组相比均无显著差异。但再灌注 96 h 时, 常温再灌组海马 CA1 区上述锥体细胞数目仅为假手术组的 5% ( $P < 0.01$ ), 低温再灌组为假手术组的 47%, 明显多于常温再灌组 ( $P < 0.01$ ), 但少于假手术组 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 各组海马 CA1 区锥体神经元数目 (个/100  $\mu\text{m}^2$ ,  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分 组	基础值	再灌注 48 h	再灌注 96 h
假手术组	96 $\pm$ 12	—	—
常温再灌组	—	92 $\pm$ 10	5 $\pm$ 2**
低温再灌组	—	94 $\pm$ 5	45 $\pm$ 13***##

与假手术组比: \*\*  $P < 0.01$ ; 与常温再灌组比: ##  $P < 0.01$

2.3 海马 CA1 区 MAP2 免疫活性的变化 常温再灌注 6 h, 海马 CA1 区 MAP2 免疫活性降至假手术组的 81% ( $P < 0.01$ ), 随着再灌注时间的延长, MAP2 免疫活性呈进行性下降的趋势, 常温再灌注 48 h 和 96 h 时仅为假手术组的 69% 和 51% ( $P < 0.01$ )。低温再灌注 6 h、48 h、96 h 海马 CA1 区 MAP2 免疫活性分别为假手术组的 93%、86% 和 71%, 均明显高于常温再灌组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 各组海马 CA1 区 MAP2 阳性反应灰度值 ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分 组	基础值	再灌注 6 h	再灌注 48 h	再灌注 96 h
假手术组	0.70 $\pm$ 0.05	—	—	—
常温再灌组	—	0.57 $\pm$ 0.03**	0.48 $\pm$ 0.03**	0.36 $\pm$ 0.04**
低温再灌组	—	0.65 $\pm$ 0.06#	0.60 $\pm$ 0.06##	0.50 $\pm$ 0.05***##

与假手术组比: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与常温再灌组比: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

## 3 讨论

文献<sup>[6,7]</sup>中, 沙土鼠常温脑缺血模型脑温多控制在 37~37.5  $^{\circ}\text{C}$ , 本实验测定了 50 只正常清醒沙土鼠的脑温, 发现正常沙土鼠脑温的 95% 可信区间为(37.9 $\pm$ 1.1)  $^{\circ}\text{C}$ 。因此, 本实验以 38  $^{\circ}\text{C}$  作为沙土鼠的正常脑温, 沙土鼠脑缺血期间及常温再灌注 6 h 内脑温均控制在(38 $\pm$ 0.2)  $^{\circ}\text{C}$ 。

有研究<sup>[8]</sup>认为, 巴比妥类麻醉药可降低脑缺血时脑组织的氧耗、减少钙内流及抑制自由基的生成, 因而对脑缺血具有一定的保护作用。本实验脑温控制期间采用戊巴比妥钠维持麻醉, 因而有可能加强低温的保护作用。统计结果表明, 常温再灌组和低温再灌组戊巴比妥钠用量无明显差别, 因而可排除戊巴比妥钠的影响。

海马 CA1 区锥体细胞对脑缺血最为敏感, 因此选择海马 CA1 区锥体细胞作为研究对象。实验发现, 沙土鼠脑缺血 10 min 常温再灌注 48 h 海马 CA1 区无明显的锥体细胞死亡, 而常温再灌注 96 h 海马 CA1 区出现了大量的锥体细胞死亡, 且低温再灌注 96 h 海马 CA1 区胞膜完整、核仁清楚的锥体细胞数目明显多于常温再灌组。上述结果表明 DND 的发生主要在脑缺血 48 h 之后, 而低温再灌注可明显减少 DND 的发生, 这与文献<sup>[1,9]</sup>报道的结果一致。

微管是一种重要的细胞骨架蛋白, 它对细胞结构的维持和线粒体的轴突转运具有重要意义; 但微管的组装具有动力学不稳定性, 极易发生解聚。MAP2 作为微管的辅助蛋白, 可促进微管组装, 稳定微管的结构<sup>[10]</sup>。研究发现, MAP2 活性下降可造成微管变性堆积, 影响细胞骨架的完整; 并可使线粒体的轴突转运发生障碍, 最终导致神经元死亡。本实

不同的神经细胞对缺血的敏感性存在差异, 海

验结果表明,沙土鼠脑缺血再灌注 6 h, 海马 CA1 区 MAP2 免疫活性已明显降低, 随着再灌注时间的延长, MAP2 免疫活性呈进行性下降的趋势, 而低温可减轻 MAP2 免疫活性下降的程度, 这与病理检查的结果相一致。上述结果提示, 低温减轻脑缺血后 DND 的作用可能与其抑制 MAP2 的降解有关。

#### 参考文献:

- [1] Coimbra C, Drake M, Boris-Moller F, et al. Long-lasting neuroprotective effect of ostischemic hypothermia and treatment with an anti-inflammatory/antipyretic drug [J]. Stroke, 1996, 27(9): 1578-1585.
- [2] Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, et al. Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage-immunohistochemical investigation of dendritic damage [J]. Neuroscience, 1989, 31(2): 401-411.
- [3] 陈群, 曾因明, 王士雷, 等. 巴曲霉对脑缺血后沙土鼠海马锥体细胞延迟性死亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 1998, 14(6): 522-524.
- [4] Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY, et al. Therapeutic modulation of brain temperature relevance to ischemic brain injury [J]. Cerebrovasc

Brain Metab Rev, 1992, 4(3): 189-205.

- [5] Nakajima Y, Fujimiya M, Maeda Y, et al. Morphological investigation of the neuroprotective effects of graded hypothermia after diverse periods of global cerebral ischemia in gerbils [J]. Brain Res, 1997, 765(1): 113-121.
- [6] Colbourne F, Corbett D. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil [J]. Brain Res, 1994, 654(2): 265-272.
- [7] Yamaguchi S, Ogata H, Hamaguchi S, et al. Superoxide radical generation and histopathological changes in hippocampal CA1 after ischemia/reperfusion in gerbils [J]. Can J Anaesth, 1998, 45(3): 226-232.
- [8] 刘俊杰, 赵俊主编. 现代麻醉学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 28.
- [9] 陈群, 曾因明, 张林, 等. 脑缺血再灌注期间脑电功率谱的变化及亚低温对其的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 1999, 19(3): 175-177.
- [10] Macrae TH. Microtubule organization by cross-linking and bundling propeins [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1160(2): 145-155.

收稿日期: 2001-06-02 修回日期: 2001-12-24

本文编辑: 李昕

## 亚低温复合山莨菪碱对沙土鼠脑缺血再灌注损伤的影响\*

张艳荣, 曾因明, 范建伟, 许鹏程

(徐州医学院附属医院麻醉科, 江苏 徐州 221002)

**摘要:** 目的 观察亚低温复合山莨菪碱对沙土鼠脑缺血再灌注组织的保护作用。方法 采用沙土鼠前脑缺血再灌注模型。双侧颈总动脉阻断 10 min 造成前脑缺血, 恢复脑血流 60 min 为再灌注。84 只沙土鼠分为假手术组(SH)、缺血组(IS)、缺血再灌注组(IR)、亚低温组(MH)、山莨菪碱组(AN)和亚低温+山莨菪碱组(MH+AN)。20 mg·kg<sup>-1</sup>山莨菪碱在脑缺血后由腹腔(i.p)给予。缺血和再灌注后分别行 ATP 含量、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的测定和病理检查。结果 脑缺血再灌注可引起海马 CA1 区锥体细胞大量死亡, ATP 含量、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性处于较低水平。亚低温和东莨菪碱均可显著减少海马 CA1 区锥体细胞死亡, ATP 耗竭, 促进 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的恢复 (P < 0.05)。亚低温复合东莨菪碱的作用与单纯亚低温的作用相比无显著性差异 (P > 0.05)。结论 亚低温和东莨菪碱 (20 mg·kg<sup>-1</sup>) 均具有脑保护作用, 但两者协同作用不明显。

**关键词:** 脑缺血再灌注; 低温; 东莨菪碱

**中图分类号:** R364.12; R971.92; Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2002)01-0017-03

近年来, 国内外已进行了大量的临床和动物实验研究, 证实低温在脑复苏治疗中是一种有效的脑保护措施; 但它也存在着一些不利影响, 如收缩血管导致脑血流减少等。莨菪类药物有减轻和改善脑缺血再灌注损伤的作用<sup>[1]</sup>。本实验采用沙土鼠脑缺血再灌注模型观察亚低温复合山莨菪碱对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

### 1 材料和方法

1.1 前脑缺血再灌注模型 戊巴比妥钠 45 mg·kg<sup>-1</sup>腹腔注射麻醉, 分离双侧颈总动脉, 用无创动脉夹阻断脑血流 10 min 造成前脑缺血, 松开动脉夹恢复脑血流 60 min 为再灌注。

1.2 分组 84 只沙土鼠分为假手术组(sham-oper-

\* 作者简介: 张艳荣 (1963-), 女, 江苏沛县人, 技师。