

内源性一氧化氮对大鼠胃黏膜缺血/再灌注损伤的保护作用^①

乔伟丽¹, 王琳², 张建福^{1*}, 张咏梅¹

(1. 徐州医学院生理学教研室, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院组织与胚胎学教研室)

摘要:目的 研究内源性一氧化氮(nitric oxide, NO)对大鼠胃黏膜缺血/再灌注损伤的保护作用。方法 采用大鼠胃缺血/再灌注(gastric ischemia/reperfusion, GI/R)模型(夹闭腹腔动脉 30 min 后再灌注), 通过组织学、免疫组化等方法, 研究 NO 的前体物质左旋-精氨酸(L-arg)和 NO 合成酶抑制剂 L-NG-一硝基精氨酸甲酯(L-NAME)对缺血/再灌注后大鼠胃黏膜细胞坏死、凋亡和增殖的影响。结果 与 GI/R 组相比, L-arg 组胃黏膜损伤明显减轻, 胃黏膜损伤面积明显缩小, 凋亡细胞减少, 增殖细胞增加 ($P < 0.05$); L-NAME 组与 GI/R 组相比胃黏膜损伤明显加重, 胃黏膜损伤面积明显增加, 凋亡细胞增加, 增殖细胞减少 ($P < 0.05$)。结论 内源性 NO 对胃黏膜缺血/再灌注损伤具有保护作用。

关键词:缺血/再灌注损伤; 胃; 一氧化氮; 凋亡; 增殖; 大鼠

中图分类号: R573; R363.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2006)04-0283-04

The protective role of endogenous nitric oxide in rat gastric ischemia/reperfusion injury

QIAO Wei-li, WANG Lin, ZHANG Jian-fu, et al

(Department of Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the protective role of endogenous nitric oxide (NO) in gastric ischemia/reperfusion (GI/R) injury of rats. **Methods** The GI/R model was established by clamping the celiac artery for 30 min and allowing reperfusion for 3 h. The effects of L-arginine (NO synthesis precursor) and N-nitro-L-arginine (L-NAME, NO synthetase blocker) on gastric mucosal cellular injury, apoptosis and proliferation were observed by using histological and immunohistochemical methods in SD rats. **Results** In the L-arginine group, the gastric mucosal cellular injury induced by GI/R was significantly alleviated, with the gastric mucosal injury area and apoptotic cells decreased and the proliferative cells increased ($P < 0.05$). However, in the L-NAME group, the gastric mucosal cellular injury was significantly aggravated, showing increase of gastric mucosal injury area and number of apoptotic cells and decrease of proliferative cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The endogenous nitric oxide plays a protective role against gastric ischemia/reperfusion injury in rats

Key words: ischemia/reperfusion injury; stomach; nitric oxide; apoptosis; proliferation; rats

胃缺血/再灌注(gastric ischemia/reperfusion, GI/R)后可引起胃黏膜组织一系列病理生理改变, 造成胃黏膜组织功能和形态学的病理性改变。缺血/再灌注损伤的机制目前主要认为是氧自由基损伤、ATP 酶水解及细胞凋亡等^[1~3]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是近年来发现的一种生物活性物质, 能舒张毛细血管, 改善微循环灌注, 降低血管通透性, 减轻组织水肿, 抑制白细胞与血管内皮黏附等作用, 可参与介导体内多种生理和病理反应过程。目前有报道表明该物质具有胃黏膜保护功能^[4], 但对于 GI/R 造

成的胃黏膜损伤是否具有保护作用尚不明确。

目前虽然对 GI/R 引起的胃黏膜细胞损伤的研究资料较多, 但绝大多数的研究者对 GI/R 仍局限在对其组织学的观察(如胃黏膜损伤面积、损伤程度等), 而对 GI/R 引起的胃黏膜细胞的凋亡和增殖研究较少^[5~7]。

本次实验, 我们通过研究 NO 的前体物质 L-精氨酸(L-arg)和 NO 合成酶抑制剂 L-NG-一硝基精氨酸甲酯(L-NAME)对缺血/再灌注后大鼠胃黏膜细胞坏死、凋亡和增殖的影响, 以期阐明内源性 NO

① 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370533)、江苏省高校自然科学研究指导性计划项目(02KJD310008)、徐州医学院科研课题资助项目(04KJ17)

* 通讯作者, E-mail: jfzhang@xzm.c.edu.cn

对胃黏膜的缺血/再灌注损伤是否具有保护作用。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 M³⁰ CytoDEATH 小鼠单克隆抗体, 来自 Roche 公司; 小鼠抗大鼠增殖细胞核抗原 (PCNA) 单克隆抗体、PowerVision™ 二步法免疫组化检测系统、联苯二胺 (DAB) 显色试剂盒, 来自北京中山生物技术有限公司; L-NAME、L-arg 来自 Sigma 公司。

1.2 实验动物和分组 成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重(250±25) g, 雌雄不拘, 由徐州医学院实验动物中心提供。实验前禁食 24 h、自由饮水。大鼠随机分为 3 组 (n=6): GI/R 组、L-NAME 组 (L-NAME + GI/R)、L-arg 组 (L-arg + GI/R)。L-NAME 和 L-arg 用生理盐水配制, 分别按 L-NAME 12 mg/kg、L-arg 200 mg/kg (参考有关文献及预实验结果), 于手术前 20 min 一次性腹腔注射。

1.3 GI/R 模型的制备 按 Zhang 等^[8] 方法。实验时用戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉。麻醉完全后将动物仰卧固定于手术台上, 剪毛, 开腹, 分离并夹闭腹腔动脉 30 min, 去除动脉夹恢复血流。于再灌注后 3 h 快速取胃。

1.4 胃黏膜损伤程度测定 参照闫长栋等^[9] 方法。胃取出后沿大弯侧剪开, 用冰冷的 0.1 mol/L PBS 冲洗, 在冰盘上展平, 置方格计数板 (每一方格面积为 1 mm²) 快速测量损伤情况。以腺胃区局限于胃上皮的点状、片状、条索状糜烂、溃疡、出血灶的面积占腺胃区黏膜总面积的百分数作为胃黏膜损伤程度的指标。

1.5 苏木精-伊红染色观察胃黏膜的损伤 测量完损伤程度的胃组织固定在 Bouin 固定液中固定 4 h, 常规脱水, 透明, 石蜡包埋, 5 μm 切片, 间隔

45 μm 贴片于用多聚赖氨酸处理的载玻片上, 常规苏木精-伊红染色, 在 Olympus 光学显微镜下观察 GI/R 后胃黏膜的损伤和修复。

1.6 免疫组织化学染色法观察胃黏膜细胞的凋亡和增殖 M³⁰ CytoDEATH 染色步骤严格按照 Roche 公司提供的说明书进行; PCNA 染色步骤按照北京中山生物技术有限公司提供的 PowerVision™ 二步法免疫组化检测系统进行。DAB 显色, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片。光镜下观察到胞质或胞核内有棕色颗粒者, 即为阳性细胞。用 Leica Qwin 图像分析系统对阳性细胞数进行半定量分析。以高倍或低倍视野下阳性细胞数占整个视野细胞总数的百分比作为分析指标。对照实验以 PBS 缓冲液代替一抗。每例 3 张间断切片, 每张切片随机选取 10 个视野, 取平均值。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 成组设计的 2 组间均数比较采用 *t* 检验, 多组均数与同一均数的比较采用方差分析 (ANOVA), *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 L-arg 和 L-NAME 对胃黏膜损伤程度的影响 GI/R 组胃黏膜损伤面积百分比为 (21.00 ± 5.63) %。L-arg 组胃黏膜损伤面积百分比降为 (12.46 ± 2.32) %, 与 GI/R 组相比有显著性差异 (*P* < 0.05); L-NAME 组为 (27.75 ± 5.32) %, 较 GI/R 组明显增加 (*P* < 0.05)。

2.2 光镜下观察胃黏膜损伤程度 GI/R 组黏膜下层水肿, 黏膜层糜烂、出血, 细胞脱落; L-arg 组有明显的黏膜及黏膜下层水肿, 但糜烂仅限于黏膜上层, 出血较少; L-NAME 组黏膜及黏膜下层充血水肿, 出现深达黏膜中下层的糜烂、出血 (图 1)。

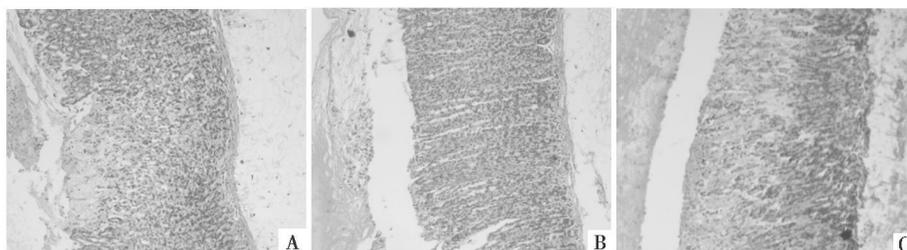


图 1 苏木精-伊红染色光镜下 3 组胃黏膜损伤程度的比较 (×100)
A: GI/R 组; B: L-arg 组; C: L-NAME 组

2.3 免疫组化染色观察 L-arg 和 L-NAME 对胃 M³⁰ CytoDEATH 阳性细胞 (即凋亡阳性细胞) 主要散在表达于黏膜中上层, 黏膜层基底部也有少量表达。L-NAME 对胃黏膜凋亡阳性细胞的影响 各组胃黏膜的 M³⁰ Cy-

arg 组凋亡阳性细胞百分比为 $(3.24 \pm 0.89)\%$, L-NAME 组为 $(8.38 \pm 1.47)\%$, 分别是 GI/R 组的 0.56 倍和 1.44 倍, 与 GI/R 组相比有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.4 免疫组化染色观察 L-arg 和 L-NAME 对胃黏膜增殖阳性细胞的影响 各组胃黏膜 PCNA 阳性

细胞(即增殖阳性细胞)均表达在黏膜层上中 1/3 交界处附近。GI/R 组增殖阳性细胞百分比为 $(8.64 \pm 1.46)\%$, L-arg 使增殖阳性细胞百分比增加至 $(13.28 \pm 2.74)\%$, 而 L-NAME 组增殖阳性细胞百分比降为 $(5.93 \pm 1.83)\%$, 与 GI/R 组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 3)。

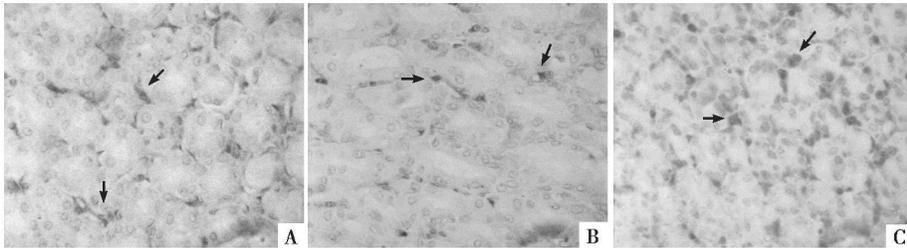


图 2 免疫组化染色观察 L-arg 和 L-NAME 对胃黏膜 M30 cytoDEATH 阳性细胞(即凋亡阳性细胞)的影响($\times 400$)

A: GI/R 组; B: L-arg 组; C: L-NAME 组

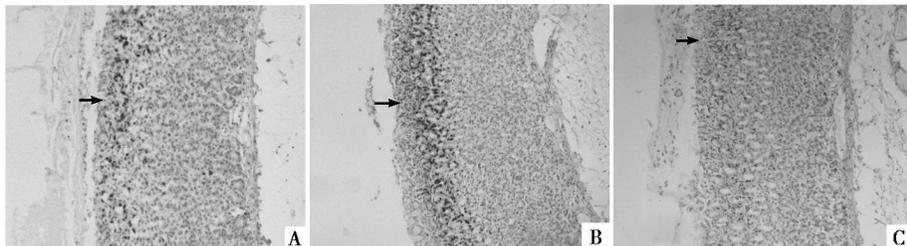


图 3 免疫组化染色观察 L-arg 和 L-NAME 对胃黏膜 PCNA 阳性细胞(即增殖阳性细胞)的影响($\times 100$)

A: GI/R 组; B: L-arg 组; C: L-NAME 组

3 讨论

NO 是目前研究最多, 舒张血管作用最强的一种内皮舒张因子, 具有扩张血管、抑制平滑肌细胞增殖及抗血小板凝集的作用, 并在调节胃肠道黏膜的血流量及保持黏膜完整的屏障作用中具有重要意义^[10-11]。NO 由 NO 合成酶分解其特异性底物 L-arg 产生。本实验发现, 给予 NO 合成前体 L-arg 可以明显减轻缺血/再灌注引起的胃黏膜损伤, 胃黏膜损伤面积明显减小, 增殖细胞增加, 凋亡细胞减少; 相反的, 给予 NO 合成酶抑制剂 L-NAME 使胃黏膜损伤加重, 增殖细胞减少, 凋亡细胞增加, 表明内源性 NO 对胃黏膜缺血/再灌注损伤具有保护作用。

关于 NO 的胃黏膜保护机制, Kim 等发现缺血/再灌注能增加胃黏膜脂质过氧化物的产生, 并且使胃黏膜谷胱甘肽、cGMP 和黏液量减少, 同时谷胱甘肽过氧化物酶和 NO 合成酶活性降低, 表明 NO 对胃黏膜具有抗氧化的防御作用^[12]。另外, 胃黏膜血流的影响也是 NO 胃黏膜保护机制的重要因素之一^[13], 这是因

为人体内 90% 的 NO 来源于血管内皮, 研究发现内皮细胞产生的 NO 可通过血管平滑肌细胞膜, 激活细胞内可溶性鸟苷酸环化酶, 合成 cGMP, 后者通过调节蛋白激酶、磷酸二酯酶舒张血管平滑肌, 扩张血管^[14]。由于静脉平滑肌对 NO 敏感性高于动脉, 因此最终导致微循环阻力下降, 局部血供增加, 加速毒性物质的清除, 增强胃黏膜对损伤因子的抵抗能力。至于内源性 NO 在 GI/R 中是如何发挥保护作用的, 其细胞分子机制如何, 我们将做进一步的研究。

参考文献:

- [1] Kunduzova OR, Bianchi P, Pizzinat N, et al. Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue regeneration by monoamine oxidases after renal ischemia-reperfusion[J]. FASEB J, 2002, 16(9): 1129-1131.
- [2] Kwicien S, Bizzowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury[J]. J Physiol Pharmacol, 2002, 53(1): 39-50.
- [3] Mizushima Y, Iwamoto A, Aki T, et al. ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation[J]. J Biol Chem, 2004, 279

(48); 50120-50131.

[4] Calatayud S, Barrachina D, Esplugues JV. Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa [J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 53 (5): 325-335.

[5] Kyoi T, Kitazawa S, Tajima K, et al. Phosphodiesterase type IV inhibitors prevent ischemia-reperfusion-induced gastric injury in rats[J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 95(3): 321-328.

[6] Wada K, Nakajima A, Takahashi H, et al. Protective effect of endogenous PPARgamma against acute gastric mucosal lesions associated with ischemia-reperfusion [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(2): G452-G458.

[7] Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, et al. Importance of brain-gut axis in the gastroprotection induced by gastric and remote preconditioning [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2004, 55(1 Pt 2): 165-177.

[8] Zhang JF, Zhang YM, Yan CD, et al. Neuroregulative mechanism of hypothalamic paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Life Sci*, 2002, 71(13): 1501-1510.

[9] 闫长栋, 顾洛, 田苏平, 等. 胃黏膜血流量对大鼠胃黏膜适应性细胞保护作用的影响[J]. *生理学报*, 1996, 48(5): 469-476.

[10] Tanaka J, Yuda Y, Inouye S, et al. The role of nitric oxide in the gastric acid secretion induced by ischemia-reperfusion in the pylorus-ligated rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 424(1): 69-74.

[11] Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(Suppl 5): 33-55.

[12] Kim H, Hwan Kim K. Role of nitric oxide and mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats[J]. *Pharmacology*, 2001, 62(4): 200-207.

[13] Cho CH. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders[J]. *J Physiol Paris*, 2001, 95(1-6): 253-256.

[14] 刘劲松, 侯晓华. 一氧化氮对胃黏膜保护机制的实验研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2004, 33(5): 592-595.

收稿日期:2006-04-17 修回日期:2006-06-15

本文编辑:吴进

离体培养神经干细胞中 NMDA 受体亚单位 NR2B 的表达^①

胡忠浩, 王珊珊, 徐铁军*

(徐州医学院人体解剖和神经生物学教研室, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 研究离体培养的大鼠神经干细胞(NSCs)中 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚单位 NR2B 的表达。方法 从孕 18~19 天胎鼠海马中分离、培养、传代、鉴定 NSCs, 用免疫细胞化学、Western blot 免疫印迹检测传代 1 次 NSCs 中 NMDA 受体亚单位 NR2B 的表达。结果 源自孕 18~19 天胎鼠海马的 NSCs, 即可以表达 NMDA 受体亚单位 NR2B。结论 体外培养的 NSCs 能表达 NMDA 受体亚单位 NR2B。

关键词:神经干细胞;NMDA 受体亚单位 2B;Western blot

中图分类号:Q189 文献标识码:A 文章编号:1000-2065(2006)04-0286-04

The expression of NMDA receptor subunit 2B in neural stem cells in vitro

HU Zhong-hao, WANG Shan-shan, XU Tie-jun

(Department of Anatomy and Neurobiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of NMDA receptor subunit 2B in the cultured neural stem cells (NSCs). **Methods** NSCs from the hippocampus of rats at embryonic day 18-19 were isolated, cultured, passaged and identified. The expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 2B in the passaged NSCs was determined by immunocytochemistry and Western blot. **Results** It was found that NSCs derived from the hippocampus of rats at embryonic day 18-19 could express NMDA receptor subunit 2B. **Conclusion** NSCs can express NMDA receptor subunit 2B in vitro.

Key words: neural stem cells;NMDA receptor subunit 2B;Western blot

自 20 世纪 90 年代以来,人们相继从哺乳动物中枢神经系统内,特别是成年人脑脑室周围的室管膜下层、齿状回颗粒下层、纹状体等部位分离培养出

神经干细胞^[1] (neural stem cells, NSCs)。NSCs 的生长及分化与多种神经生长因子和神经营养因子有关,其中谷氨酸及其受体起着重要的作用。谷氨酸

① 基金项目:江苏省高等学校研究生创新计划资助项目、徐州医学院留学归国人员科研启动基金资助项目

* 通讯作者, E-mail: xztjxu@163.com