

外源性氧自由基所致脑基底动脉痉挛的机制

陈剑雄 唐小卿 朱炳阳 廖端芳

(衡阳医学院心肺药理研究室 衡阳 421001)

The Mechanism of Exogenous Oxygen Free Radicals Induced Vasospasm of Isolated Basilar Artery

CHEN Jian-Xiong, TANG Xiao-Qing, ZHU Bing-Yang and LIAO Daun-Fang

(Department of Cardiopulmonary Pharmacology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, Hunan China)

ABSTRACT This study was to investigate the effect of exogenous oxygen free radicals (OFR) on the rabbit basilar artery. Exogenous OFR were generated by electrolysis of Krebs' solution. The perfusion pressure and malonyldialdehyde content in basilar artery were increased, meanwhile release of endothelium derived relaxing factor, nitrite content and superoxide dismutase activity decreased after OFR damage. These data indicated that OFR induced cerebral vasospasm is mainly mediated by cerebral vascular endothelial damage and lipid peroxide formation.

KEY WORDS Basilar artery; Endothelium derived relaxing factor; Lipid peroxide; Superoxide dismutase; Nitric oxide; Oxygen free radicals.

摘要 氧自由基引起兔脑基底动脉收缩, 灌注压明显增高, 脑基底动脉内皮源性舒张因子释放明显减少, 血管壁组织中亚硝酸盐含量及超氧化物歧化酶活性明显降低, 丙二醛含量明显升高。提示氧自由基损伤脑血管作用可能与其损伤血管内皮及促进脂质过氧化产物的生成有关。

关键词 基底动脉; 内皮源性舒张因子; 一氧化氮; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 氧自由基

氧自由基在蛛网膜下腔出血引起脑基底动脉痉挛的发病过程中起着十分重要的作用^[1]。蛛网膜下腔出血后, 脑基底动脉内皮源性舒张因子 (endothelium derived relaxing factor, EDRF) 释放明显减少, 从而易引起脑血管痉挛^[2]。近年研究证明, EDRF 的主要成分是一氧化氮 (nitric oxide, NO)。本文采用电解灌流液产生自由氧的方法, 探讨电解性氧自由基对兔脑基底动脉的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 药品

乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh; 上海生物化学研究所产品); 磷酸组织胺 (上海生物化学研究所产品); 氧化型细胞色素 C (Sigma 产品)。

1.2 方法及观察指标

1.2.1 离体兔脑基底动脉电解灌流液损伤内皮模型 取兔脑基底动脉 1.5~2 cm, 按血流方向以 $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率灌注含 95% O_2 + 5% CO_2 气体的克氏液, 并通过压力换能器记录灌注压, 维持基础灌注压 $2.46 \pm 0.4 \text{ kPa}$, 平衡 30 min, 将两铂金丝电极置于流经脑基底动脉前的灌流管内, 用 10 mA 恒定直流电将克氏液电解 1 min。

1.2.2 脑基底动脉 ACh 内皮源性舒张因子的检测

在灌流液中加入组织胺 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 预收缩血管, 待达到稳定状态再加入 ACh $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 观察 ACh 舒张血管引起灌注压下降的变化, 以反映内皮源性舒张因子释放量。

1.2.3 电解灌流液中氧自由基含量测定 采用细胞色素 C 还原法^[3]对电解克氏液中产生的氧自由基进行定量测定, 将 10 mA 电流电解的灌流液立即加入含有 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 细胞色素 C 1 ml 的比色杯中, 混匀比色, 测定 550 nm 处吸光度, 以证实自由基的产生。

1.2.4 脑基底动脉一氧化氮产物 NO_2^- 含量的测定

取 20~40 mg 基底动脉加入 0.5 ml 冰甲醇制成匀浆, 置 4℃ 冰箱中放置 18~20 h, 然后 0℃ 下离

心 (10 000×g, 10 min) 取上清液 100 μ l 加入等量 Griess 试剂 (1% 对氨基苯磺酰胺, 0.1% N-萘基乙二胺, 5% 磷酸)。室温放置 15 min, 显色后, 应用酶联免疫仪 (华东电子管厂) 在 550 nm 波长下测定样品的吸光度, 用亚硝酸钠作为标准品对照。

1.2.5 兔脑基底动脉过氧化脂质测定 按硫代巴比妥酸法测定^[4], 结果以丙二醛含量表示。

1.2.6 兔脑基底动脉超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性按邻苯三酚法^[5]测定。

1.3 扫描电镜观察血管受电解产生自由基 1 min 后内皮细胞形态改变。

2 结果

2.1 电解灌流液中氧自由基的产生

随着电解时间延长, 细胞色素 C 在 550 nm 波长处的吸光度相应增加 (Figure 1), 表明电解性氧自由基的产生亦逐渐增多。

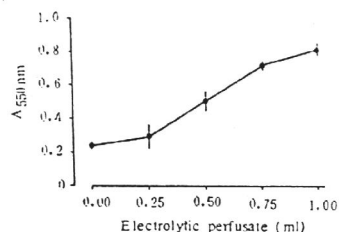


Figure 1. Dose-absorbance relationship between added electrolyte and cytochrome C absorption at 550 nm. $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

2.2 电解灌流液对兔脑基底动脉的作用及其对 EDRF 释放的影响

电解克氏液使脑基底动脉收缩, 灌注压明显升高, 并随着电解时间延长而逐渐升高。电解前基础灌注压为 2.46 ± 0.4 kPa, 电解 30 s 灌注压为 5.20 ± 0.4 kPa, 1 min 时灌注压为 8.40 ± 1.0 kPa ($n=7$, $P<0.01$)。羟自由基清除剂二甲亚砜 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 明显抑制电解灌液引起的基底动脉灌注压升高作用。电解 30 s 及 1 min 时灌注压分别为 3.58 ± 0.28 kPa 及 4.08 ± 0.73 kPa, 与电解组比较具有明显差异 ($n=3$, $P<0.01$)。电解前

ACh 诱导的脑血管灌注压下降值为 1.50 ± 0.54 kPa ($n=4$), 电解损伤后, ACh 不诱导任何舒张反应, 灌注压下降值为 0, 二甲亚砜 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能明显保护内皮免受电解损伤, ACh 舒张脑血管引起灌注压下降值为 1.44 ± 0.57 kPa ($n=4$)。

2.3 氧自由基损伤脑基底动脉后 NO_2^- 、丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性改变

电解性氧自由基损伤脑基底动脉后, 动脉壁中 NO_2^- 含量及超氧化物歧化酶活性显著降低 ($P<0.01$)。脂质过氧化产物丙二醛含量显著升高 ($P<0.01$, Table)。

Table. Changes of superoxide dismutase activity (SOD), malonyldialdehyde (MDA) and nitrite content in rabbit basilar artery after electrolysis.

groups	SOD ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	MDA ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	nitrite ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
control	$0.79 \pm 0.04 (6)$	$0.28 \pm 0.03 (5)$	$3.48 \pm 0.17 (7)$
electrolysis	$0.36 \pm 0.04 (6)^*$	$0.76 \pm 0.07 (6)^*$	$0.72 \pm 0.22 (4)^*$

The number of experiments is shown in brackets.

$\bar{x} \pm s$; * $P<0.01$, compared with control.

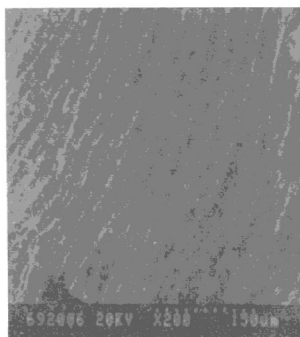


Figure 2. Scanning electron microscope of the basilar artery of rabbit before electrolysis. $\times 200$.

2.4 扫描电镜观察

血管受电解产生自由基损伤 1 min 后,

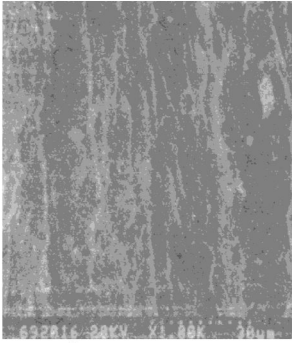


Figure 3. Crateriform and erose are appeared in some area after electrolysis, $\times 1\ 000$.

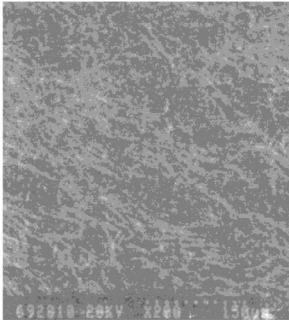


Figure 4. Loss of endothelial integrity, widening of intercellular space after electrolysis under scanning electron microscope, $\times 200$.

内皮细胞破坏严重, 细胞排列紊乱, 内皮细胞形态大小不一, 胞膜破裂、凹陷。内皮表面散在有虫蚀样及火山口样改变, 细胞间隙明显增宽, 部分区域内皮细胞呈网状或缺失 (Figure 2~4)。

3 讨论

近年研究发现氧化血红蛋白为蛛网膜下腔出血引起脑血管平滑肌痉挛的重要因素之一, 而氧化血红蛋白引起脑血管收缩作用是由于其释放 $\text{OH}\cdot$ 的结果^[9]。本研究表明电

解灌流液产生氧自由基可引起脑基底动脉剧烈收缩, 羟自由基清除剂二甲亚砜具有明显阻断作用, 结果提示氧自由基参与脑血管痉挛, 其主要成分可能为 $\text{OH}\cdot$ 。

氧自由基在蛛网膜下腔出血所致脑血管痉挛发病过程中起着十分重要作用, 但其产生机制尚不清楚。Sano 等^[10]将 H_2O_2 及 15-HpAA 注入动物蛛网膜下腔后, 发现引起严重的基底动脉痉挛, 认为脂质过氧化产物可能在脑血管痉挛中起着重要作用。本实验表明氧自由基在引起脑血管痉挛的同时还可明显增加基底动脉脂质过氧化产物丙二醛含量, 降低超氧化物歧化酶的活性。

EDRF 是引起血管舒张, 防止血小板聚集的一种生理性介质, Gryglerwshikk 等^[11]认为 EDRF 可能是一种不稳定的自由基, 可能是一种过氧化物或花生四烯酸衍生物自由基, 后来 Palmer 等^[12]证明 EDRF 就是内皮释放的 NO。EDRF 的产生依赖于血管内皮的正常功能, 一旦内皮细胞受损或缺失, 便可引起 EDRF 减少, 同时使一些内源性舒血管物质如 5-羟色胺, ADP 等舒血管效应转变为缩血管作用。本实验研究用氧自由基损伤离体灌注的基底动脉后, 血管内皮明显受损, EDRF 释放减少, 基底动脉中 NO_2 含量明显减少, 说明氧自由基可引起内皮损伤, 使内皮 EDRF 合成释放减少, 从而导致血管调节失调, 引起脑血管痉挛。

参考文献

- 1 Lo WD, Betz AL. Oxygen free radical reduction of brain capillary rubidium uptake. *J Neurochem*, 1986, 46: 394
- 2 Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, et al. Impairment of endothelium dependent vasodilation induced by acetylcholine and adenosine triphosphate following experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 1987, 18: 482
- 3 McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969, 244: 6049
- 4 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid perox-

- ides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351
- 5 Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974, 47: 469
- 6 Steele JA. Free radicals mediated actions of oxyhemoglobin cerebrovascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1991, 65: 416
- 7 Sano K, Assano T, Tanishima T, et al. Lipid peroxidation as a cause of cerebral vasospasm. *Neurol Res*, 1986, 2: 253
- 8 Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor. *Nature*, 1986, 320: 454
- 9 Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327: 524
- (本文 1994-07-26 收到)

名词术语的汉英对照及缩写 (II)

一氧化氮	nitric oxide, NO
人类白细胞抗原	human leukocyte antigen, HLA
化学促动作用	chemokinesis, CK
动脉粥样硬化	atherosclerosis, As
动脉硬化	arteriosclerosis, AS
次黄嘌呤	heteroxanthine, HX
血管内皮细胞	vascular endothelial cell, VEC
血管平滑肌细胞	vascular smooth muscle cell, VSMC
血管通透因子	vascular permeability factor, VPF
低密度脂蛋白胆固醇	low density lipoprotein cholesterol, LDLC
免疫组织化学	immunohistochemistry, IHC
条件培养基	conditioned media, CM
非条件培养基	unconditioned media, UCM. non-conditioned media, NCM
肽生长因子	peptide growth factor, PGF
巨细胞病毒	cytomegalovirus, CMV
巨噬细胞克隆刺激因子	macrophage colony stimulating factor, MCSF
清道夫受体	scavenger receptor, SR
总胆固醇	total cholesterol, TC
前内皮素原	preproendothelin, PPET
氧化低密度脂蛋白	oxidized low density lipoprotein, LDL
氧化血红蛋白	oxidized hemoglobin, OHb
脂质过氧化物	lipid peroxide, LPO
超氧化物歧化酶	superoxide dismutase, SOD
硫代巴比妥酸反应	thiobarbituric acid reaction, TBAR
硫代巴比妥酸反应物质	thiobarbituric acid reactive substance, TBARS
血管细胞粘附分子	vascular cell adhesion molecule, VCAM
血管附着素	vascular addressin, VA
极晚期抗原	very late antigen, VLA

(胡必利编写)