

一氧化氮与缺血性脑血管病

赵志鸿 综述; 资晓宏, 宋治 审校

(中南大学湘雅三医院神经内科, 湖南省长沙市 410013)

[主题词] 一氧化氮; 缺血性脑血管病; 一氧化氮合酶

[摘要] 近年来, 国内外对一氧化氮与缺血性脑血管病之间的关系研究较多, 发现一氧化氮广泛参与缺血性脑血管病各个阶段的生理和病理过程。本文介绍了一氧化氮的特性和代谢, 一氧化氮在缺血性脑血管病中的作用, 某些药物对它的影响以及三种不同一氧化氮合酶的作用。

[中图分类号] R743.32

[文献标识码] A

1980年, Furchgott等^[1]发现, 血管内皮细胞可释放一种使血管平滑肌松弛和血管扩张的物质, 该物质称为内皮源性舒张因子(endothelium derived relaxing factor, EDRF), 并对EDRF的生物学特性、功能等进行了大量的研究。1987年, Palmer等^[2]通过药理学、化学发光等方法证明了EDRF即为一氧化氮(nitric oxide, NO)。最近的研究发现, NO在中枢神经系统中重要的作用。本文拟对NO在缺血性脑血管病中的生理和病理作用作一综述。

1 一氧化氮的生物化学及生物学特性

在体内, NO是由左旋精氨酸和氧气经一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化而生成的, 同时产生瓜氨酸(citrulline, Cit)。此反应过程由两步组成: 第一步, L-精氨酸中的两个电子被氧化, 生成N^ω-羟基-L-精氨酸(N^ω-hydroxy-L-arginine, NHA); 第二步NHA的三个电子被氧化生成NO和L-瓜氨酸。NO是一个不带电荷的分子, 相当不稳定, 半衰期很短, 仅约5~30 s^[3]。因其水溶性及脂溶性较好, 极易通过细胞膜, 故可在细胞内外及组织中自由扩散。NO可与细胞膜上鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)中亚铁血红素的Fe²⁺结合, 使GC的构象发生改变, 导致该酶的活性中心暴露, 进而使三磷酸鸟嘌呤(guanosine triphosphate, GTP)生成环磷酸鸟苷(cGMP), 再激活蛋白激酶G(protein kinase G, PKG), 使靶蛋白发生磷酸化, 从而引起平滑肌扩张, 导致血流增加。检测体内NO含量, 可用硝酸还原酶特异性地将NO₃⁻还原为NO₂⁻, NO₂⁻与显色剂作用生成有色物质, 通过显色深浅测定其浓度的高低。

2 一氧化氮合酶的生物学特性

[收稿日期] 2002-05-09 [修回日期] 2002-09-16

[作者简介] 赵志鸿, 男, 生于1976年10月, 湖南湘潭人, 硕士, 主要研究脑血管疾病。资晓宏, 男, 生于1962年3月, 湖南耒阳人, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要研究脑血管疾病, 在国家核心期刊上发表论文多篇。宋治, 男, 生于1965年9月, 湖南沅陵人, 副教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要研究脑血管疾病, 发表论文多篇。

到目前为止, 已发现体内有三种NOS。根据其钙离子的依赖性不同, 分为非钙依赖性的诱导型NOS(inducible NO synthase, iNOS)和钙依赖性的构建型NOS(constitutive NO synthase, cNOS), 而后者又可以分为神经原型NOS(neuronal NO synthase, nNOS)和内皮细胞型NOS(endothelial NO synthase, eNOS), 其中nNOS主要分布于神经元和肌肉细胞内。cNOS在生理状态下即具有活性, 主要由细胞内钙离子浓度升高来调节, 因此称之为“生理状态”的酶。iNOS是在某些病理情况下, 当细胞受某些物质如干扰素(interferon, IFN)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1(interleukin 1, IL-1)、内毒素和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等的作用下, 经基因转录、翻译合成蛋白质而形成的, 主要由基因转录、翻译、翻译后来调节, 产生大量的NO, 故称之为“病理生理性”的酶。

3 一氧化氮与脑缺血性疾病

3.1 缺血性脑血管病中一氧化氮合酶的作用及其调节

用大鼠作一个永久性大脑中动脉梗死模型, 用免疫组织化学方法分别测定梗死1、2、3、5、7及14天后的大鼠eNOS、nNOS, 并用原位杂交方法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。结果发现, nNOS表达在梗死后24~48 h达高峰, 主要在神经元的细胞浆, 3天后即消失; 而eNOS的表达一直到梗死后第7天才增高, 主要在半暗带的细胞浆和细胞膜, 在梗死后14天消失。VEGF在半暗带的表达显著增高, 与eNOS的分布相似。eNOS在缺血性脑血管病中可能起着保护作用, 避免缺血加剧的作用^[4]。

有学者作了更细致的研究, 在大鼠大脑中动脉梗死后分别在0、6、24、72及168 h处死, 用免疫组织化学法分别检测eNOS、nNOS和iNOS的表达。结果发现, nNOS大脑中动脉梗死后6 h的缺血半球升高, 尤其在边缘带区, 72 h和168 h后逐渐下降。大脑中动脉梗死后6 h在主要血管的内皮细胞内可见到eNOS的微弱染色, 此后免疫染色逐渐增浓。大脑中动脉梗死后6 h在微血管内可见微弱的iNOS免疫反应。缺血中心的巨噬细胞和边缘带的星形胶质细胞分别在大脑

中动脉梗死 72 h 和 168 h 后出现对 iNOS 的免疫反应。上述结果表明三种不同类型的 NOS 与脑缺血损害的不同时期有关: nNOS 在缺血早期有神经毒性, 而 iNOS 的神经毒性出现在缺血后期^[5,6], eNOS 在缺血全过程均起着神经保护作用。这些观察结果说明在缺血性中风不同时期对 NOS 亚型治疗干预是非常必要的^[7]。

为了验证 nNOS 抑制剂对脑缺血性梗死的体积是否有减少的作用, 有学者用一种有效的 nNOS 抑制剂 AR-R17477 治疗永久性脑局部梗死的大鼠, 未发现它有减少脑梗死程度的作用, 推测严重的缺血损害使特异性 nNOS 抑制剂治疗效果受限^[8]。看来, 选择更合适的 nNOS 抑制剂及何时应用以减轻脑梗死的损害有待进一步研究。

iNOS 在脑缺血后期有神经毒性, 它的神经毒性是通过产生何种物质来体现的呢? 主要产生部位又在哪里呢? 研究发现, NO 和超氧化物反应可产生过氧化亚硝酸盐, 该过氧化亚硝酸盐的毒性作用包括氧化巯基、脂质过氧化和氨基酸残基的硝化^[5]。但它的半衰期很短, 无法在脑缺血区检测出来。硝化酪氨酸被认为是过氧化亚硝酸盐的代谢产物, 由 NO 介导的反应所产生的硝化酪氨酸可能是脑缺血毒性的标记^[6]。在脑缺血 15 天后, 硝化酪氨酸仅可在野生型大鼠中检出, 而在 iNOS 敲除鼠中未检测到。硝化酪氨酸的免疫组织化学反应部位主要在缺血 15 天后的野生型大鼠的脑皮质梗死周边区的血管壁, 但未出现在 iNOS 敲除鼠中。这表明 iNOS 在缺血后期的再灌注中产生硝化酪氨酸, 血管内皮是主要的产生部位^[5,6,9]。

3.2 一氧化氮与脑缺血再灌注损伤

研究正常血压的大鼠和有中风倾向的自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 在缺血再灌注损伤中 NO 的作用, 发现在脑缺血再灌注期间自发性高血压大鼠的氧自由基水平和梗死体积均高于正常血压大鼠, 而自发性高血压大鼠的 NO 浓度显著低于正常血压大鼠, 表明 NO 在缺血再灌注过程中起脑保护作用。自发性高血压大鼠的 NO 不足是由于氧自由基产生过量, 说明 NO 浓度不足与脑缺血再灌注损伤的增加呈正相关^[10]。Mason 等^[11] 研究发现, 在再灌注期间, NO 针对氧自由基而提供细胞保护作用。在人星形胶质细胞和脑血管内皮细胞内给予 NO 供体二乙醇胺一氧化氮, 氧自由基的量比缺血高峰期降低了五分之一。

应用血栓溶解剂恢复脑循环可改善脑梗死的预后。然而, 由氧自由基 (即活性氧族, ROS) 介导的再灌注损伤可能限制重组的组织型纤溶酶原激活物 (recombined tissue-type plasminogen activator, rt-PA) 的应用。Pluta 等^[12] 假设在再灌注期间应用外源性 NO, 通过猝灭 ROS 来减少中风体积, 用兔和大鼠分别制成脑缺血一再灌注模型, 然后在颈内动脉内注入 NO 供体脯氨酸 NO, 发现兔在再灌注期间氧自由基水平显著下降, 而大鼠的脑梗死体积亦显著减小。在这两个实验组的颈内动脉内注入脯氨酸 NO 并不影响局部脑血流、平均动脉压和体温。上述研究结果表明, 在脑缺血一再灌注期间, 通过颈内动脉注入脯氨酸 NO, 使脑循环早期恢复的有益作用得到提高, 很可能是因为 ROS 被 NO 清除所致, 提示应用 NO

供体来防治再灌注损伤成为可能^[11,12]。

3.3 一氧化氮供体在脑缺血中的作用

Zhang 等^[13] 用 NO 供体 DETA/NO₂Oate 治疗刚成年的大鼠, 发现它能显著增加脑室下区域和齿状回的细胞增殖和移行, 也能增加齿状回的神经发生。用它来治疗大脑中动脉梗死后的鼠, 同样能显著增加脑室下区域和齿状回的细胞增殖和移行, 而且在脑梗死区恢复血流后大鼠的神经功能显著改善。它能明显增加缺血和非缺血大鼠大脑皮质的鸟苷酸水平, 这一点支持 NO 起着促进细胞增殖和神经发生的角色, 表明 NO 涉及成年大鼠脑的远祖细胞增殖和神经发生的调节。上述说明 NO 对缺血性中风的的治疗有益。

在大鼠短暂性局部脑缺血后, 应用两个 NO 供体: 经典的硝基血管扩张剂硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 和 NO-亲核复合体精胺/NO, 发现它们能减少脑梗死体积。与对照组相比, 在脑缺血期间应用精胺/NO 能保持皮质较高的灌注水平, 证明由短暂性局部脑缺血诱发的脑损害可通过静脉注射 NO 供体而减轻。精胺/NO 的神经保护作用至少部分是由于改善了脑灌注, 而硝普钠肯定是提供了直接的细胞保护作用。这些结果进一步支持 NO 在脑缺血早期有神经保护作用, 应用 NO-亲核复合体治疗脑缺血损害是可行的^[14]。

3.4 神经保护剂在脑缺血中的应用

Huang 等^[15] 在 Long-Evans 鼠体内应用自由基清除剂 FC4S, 观察 FC4S 对脑局部缺血损伤引起的梗死体积的影响, 发现脑梗死体积显著减少, 而该清除剂不影响酸碱度、血气、心律和平均动脉压。另外, 在应用 FC4S 治疗后, 血浆中 NO 含量上升, LDH 水平下降, 因而推测 FC4S 使 NO 浓度提高和 FC4S 的抗氧化剂特性是该药的主要作用机理, 支持 NO 在脑缺血中起保护作用的观点^[10]。有人用其它神经保护剂, 如 Lubeluzole (NOS 通道调节剂), 早期 (6 h 内) 治疗因光化学诱导的皮质梗死大鼠, 也得出了相似的结论^[16], 即能减轻缺血损害的程度, 但作用机理尚不清楚, 有待进一步研究。

尼莫地平有抑制细胞内钙超载和扩张颅内血管的作用, 广泛用于脑缺血性疾病、SAH 等疾病的治疗。最近, 人们发现尼莫地平除具有脑血管舒张作用之外, 尚能通过抑制非钙离子依赖性 NOS (即“病理性”的酶) 的活性来保护缺血区的脑神经元^[17]。

他汀类药物治疗高脂血症, 通过降低低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和升高高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 来防治动脉硬化, 进而减少心脑血管事件, 这一点已得到共识。有人用阿伐他汀治疗胆固醇正常的脑梗死大鼠, 研究他汀类是否有助于中风后脑保护。Laufs 等^[18] 用阿伐他汀治疗 129/SO 野生型大鼠和 eNOS 敲除鼠, 用药 14 天后对两组大鼠行大脑中动脉短暂性缺血及再通术。研究发现, 阿伐他汀治疗能降低脑缺血的野生型大鼠血小板活性, 但并不显著改变胆固醇水平。因此, 血小板聚集下降与他汀类的降脂特性无关。令人奇怪的是, 阿伐他汀对 eNOS 敲除鼠的血小板聚集没有作用。这就证明了他汀类治疗的潜在机制实际上是提高 eNOS 的活性。进一步研究发

现,用他汀类治疗的野生型大鼠,其主动脉和血小板内的 eNOS mRNA 以剂量依赖方式显著上升,而血小板活性,如 PF4 和 β -TG 血浆水平呈剂量依赖性下降。有学者在应用细丝模型使大脑中动脉梗死 2 h 之前,用 mevastatin [2 mg/(kg·d) 或 20 mg/(kg·d)] 治疗 18~22 g 雄性大鼠 7、14 和 28 天,然后在 24 h 后评估神经功能缺损和脑梗死体积。结果发现,mevastatin 增加 eNOS mRNA 和蛋白水平,减少梗死体积,并且以剂量和时间依赖方式改善神经功能缺损。最大的神经保护作用出现于大剂量治疗 14 天和 28 天后,梗死体积分别减少 26% 和 37%。胆固醇水平在治疗 28 天后才下降,且与梗死体积的减少无相关性。说明长期预防性应用 mevastatin 可提高 eNOS 活性并增加脑血流量^[19]。而 Vaughan 等^[20]认为他汀类不但提升 eNOS 活性,且抑制 iNOS 的活性。上述结果说明他汀类的抗血栓和中风保护作用部分是由提升 eNOS 和抑制 iNOS 的活性来介导的。这一结论为治疗脑缺血事件提供了新的线索。

[参考文献]

- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, **288**: 373
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, **327**: 524
- Calotta E, Koshland DE. NO news is good news. *Science*, 1992, **258**: 1862
- Leker RR, Teichner A, Ovadia H, et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor. *Brain Res*, 2001, **909** (1-2): 1-7
- Takizawa S, Hirabayashi H, Fukuyama N, et al. Peroxynitrite production in cerebral ischemia. *Rinsho Shinkeigaku*, 1999, **39** (12): 1295-297
- Hirabayashi H, Takizawa S, Fukuyama N, et al. Nitrotyrosine generation via inducible nitric oxide synthase in vascular wall in focal ischemia reperfusion. *Brain Res*, 2000, **852** (2): 319-325
- Niwa M, Inao S, Takayasu M, et al. Time course of expression of three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Med Chir*, 2001, **41** (2): 63-72
- Harukuni I, Traystman RJ, Kirsch JR. Effect of AR-R 17477, a potent neuronal nitric oxide synthase inhibitor, on infarction volume resulting from permanent focal ischemia in rats. *Crit Care Med*, 1999, **27** (11): 2508-5011
- Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Saribas O, et al. Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2000, **31** (8): 1974-980
- Dobrucki LW, Kalinowski L, Uracz W, et al. The protective role of nitric oxide in the brain ischemia. *J Physiol Pharmacol*, 2000, **51** (4): 695-703
- Mason RB, Pluta RM, Walbridge S, et al. Production of reactive oxygen species after reperfusion in vitro and in vivo: protective effect of nitric oxide. *J Neurosurg*, 2000, **93** (1): 99-107
- Pluta RM, Rak R, Wink DA, et al. Effects of nitric oxide on reactive oxygen species production and infarction size after brain reperfusion injury. *Neurosurgery*, 2001, **48** (4): 884-892
- Zhang R, Zhang L, Zhang Z, et al. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann Neurol*, 2001, **50** (5): 602-611
- Salom JB, Orti M, Centeno JM, et al. Reduction of infarct size by the NO donors sodium nitroprusside and spermine/NO after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 2000, **865** (2): 149-156
- Huang SS, Tsai SK, Chih CL, et al. Neuroprotective effect of hexa-sulfobutylated C60 on rats subjected to focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*, 2001, **30** (6): 643-649
- De Ryck M, Verhoye M, Van der Linden AM. Diffusion-weighted MRI of infarct growth in a rat photochemical stroke model: effect of lubeluzole. *Neuropharmacology*, 2000, **39** (4): 691-702
- Zhu D, Li R, Liu G, et al. Nimodipine inhibits calcium-independent nitric oxide synthase activity in transient focal cerebral ischemia rats and cultured mouse astroglial cells. *Life Sci*, 1999, **65** (15): 221-231
- Laufs U, Gertz K, Huang P, et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke*, 2000, **31** (10): 2442-449
- Amir-Hanjani S, Stagliano NE, Yamada M, et al. Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke*, 2001, **32** (4): 980-986
- Vaughan CJ, Delanty N. Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. *Stroke*, 1999, **30** (9): 1969-973

(此文编辑 文玉珊)

•征订•

欢迎订阅全国唯一的高血压专业杂志

你知道?

全国有 1 亿以上的高血压病患者
每年新增加 300 万人以上
现有脑卒中患者 500 万人以上
年新发病 150 万人,死亡 20 万人
76% 脑卒中者有高血压病史
冠心病患者 1000 万人,65% 有高血压病史

《高血压杂志》告诉您:

最新最可靠的防治措施
世界与我国最新的研究动向
医师可能从中提高自己的医学实践能力为病人服务
病人可以直接了解自己的病情轻重

双月刊 全国各地邮局订阅,邮发代号:34-65 每年 6 元,全年价:36 元

地址:福州市茶中路 20 号 邮编:350005

电话:0591-3357199-2216 传真:0591-3574968

E-mail: zggxyzz@fjmu.edu.cn