

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00452

• 短篇论著 •

# 重型脑挫裂伤患者伤后脑组织诱导型一氧化氮合酶表达的变化

## Expression of iNOS in human brain after severe traumatic brain injury

韩 靛<sup>1</sup>, 何志贤<sup>2</sup>, 倪兰春<sup>3</sup>, 施 炜<sup>3</sup>, 施金龙<sup>3</sup>, 陈 建<sup>3\*</sup>, 黄剑飞<sup>4</sup>, 殷 昊<sup>3</sup>

- 1. 南通大学附属肿瘤医院外科, 南通市肿瘤医院外科, 南通 226361
- 2. 南通大学外总教研室, 南通 226001
- 3. 南通大学附属医院神经外科, 南通 226001
- 4. 南通大学附属医院病理科, 南通 226001

**[摘要]** **目的:**探讨重型脑挫裂伤后诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)在脑组织中的表达变化及意义。**方法:**根据损伤后就诊时间将38例重型脑挫裂伤患者分为6组(0~6 h 7例, 6~12 h 8例, 12~24 h 9例, 24~36 h 5例, 36~72 h 6例, 72 h以上3例),以4例良性脑肿瘤患者手术切除的部分正常脑组织为对照组。尼氏染色法观察重型脑挫裂伤后神经细胞病理变化过程,RT-PCR检测iNOS mRNA的变化,免疫组织化学染色方法观察iNOS阳性细胞的表达变化。**结果:**尼氏法染色发现损伤区神经细胞减少;RT-PCR结果发现,与正常对照组相比,重型脑挫裂伤后0~6 h创伤区周围iNOS mRNA表达量开始上升,12~24 h达到高峰,随后渐下降,72 h以后仍有表达;免疫组化结果发现iNOS阳性细胞表达增加在伤后12~24 h达到高峰;相关性分析结果显示iNOS mRNA相对灰度值与iNOS阳性细胞数呈高度正相关( $r=0.956, P=0.003$ )。**结论:**重型脑挫裂伤损伤区及周边皮质iNOS的表达增加,iNOS mRNA的表达与iNOS阳性细胞数呈正相关。

**[关键词]** 脑损伤;脑;一氧化氮;诱导型一氧化氮合酶

**[中图分类号]** R 651.15      **[文献标志码]** B      **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0452-04

创伤性脑损伤后诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)的合成释放是个复杂过程。冯海龙等<sup>[1]</sup>在大鼠重型脑外伤后NO/iNOS神经细胞毒性的作用机制的研究中发现,重型脑外伤后iNOS活性明显升高,伤后12 h活性即出现增高现象,伤后1~3 d活性达到高峰,持续时间长达1周,伤后2周iNOS活性降至对照组水平。Gahm等<sup>[2]</sup>检测了8例脑外伤后3 h至5 d手术患者的脑挫伤组织的iNOS,结果发现iNOS在神经细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞中表达,并在伤后6 h出现,于伤后8~23 h达高峰。后续的进一步研究<sup>[3]</sup>发现,脑损伤早期血管内皮细胞可以产生一定量iNOS,通过iNOS合成NO扩张血管,改善受伤区的血供<sup>[3]</sup>。但目前关于NO/iNOS在脑损伤中的确切作用机制仍不清楚,本研究观察重型脑挫裂伤后不同时相神经细胞形态变化,用RT-PCR及免疫组织化学染色方法来观察重型脑挫裂伤后不同时相创伤区及周边皮质iNOS mRNA及iNOS阳性细胞的表达变化,为今后重型脑挫裂伤的临床治疗提供实验资料。

### 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 iNOS PCR引物由上海生工生物技术有限公司合成;TRIzol Reagent、MMLV First Strand cDNA Synthesis Kit、Ready-to-Use PCR Kit购自Chemicon

公司;抗iNOS多克隆抗体购自Chemicon公司;生物素结合的羊抗兔IgG和3,3'-二甲基联苯胺DAB购自Sigma公司;ABC试剂购自Vector公司。

1.2 研究对象及分组 重型脑挫裂伤组织取自2005年9月至2006年8月南通大学附属医院神经外科收治的38例急诊行开颅挫裂伤组织清除术的患者,其中男25例、女13例,术前GCS评分3~8分,车祸29例、高处坠落5例、跌倒2例、打伤2例。38例脑损伤组织按不同的受伤时间分为6个时相组:0~6 h 7例,6~12 h 8例,12~24 h 9例,24~36 h 5例,36~72 h 6例,72 h以上3例。正常对照脑组织取自同期4例良性脑肿瘤患者,年龄35~64岁,既往无精神类疾病情况,为暴露瘤体切除部分正常脑组织。所有研究均征得患者本人或家属知情同意并在南通大学伦理委员会备案并获得通过。

1.3 脑组织尼氏染色观察 取脑组织放入4%多聚甲醛中固定4~6 h,再先后转入20%、30%蔗糖中,待脑组织下沉后,即可在脑组织损伤区行冠状位连续切片(Leica CM1900恒冷箱冰冻切片),片厚8 μm,直接贴于预先涂有明胶的载玻片上。取一套切片置室温下晾干后,用焦油紫行尼氏染色观察神经元形态的变化。

1.4 RT-PCR测定脑组织中iNOS mRNA的表达 将脑组织取出后迅速浸入-196℃液氮罐中冻存备用。由上海生工

**[收稿日期]** 2007-07-14      **[接受日期]** 2008-01-20

**[作者简介]** 韩 靛, 硕士, 主治医师, E-mail: hl61697@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0513-85052362, E-mail: chenjian9079@163.com

生物工程技术服务有限公司合成引物,引物序列如下:GAP-DH Forward 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',Reverse 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3';iNOS Forward 5'-CTC TAT GTT TGC GGG GAT GT-3',Reverse 5'-TTC TTC GCC TCG TAA GGA AA-3',行甲醛变性胶电泳检测RNA完整性,PCR反应经过预变性 94℃ 3 min、循环变性 94℃ 1 min、复性 60℃ 45 s、延伸 72℃ 1 min、循环 35次、延伸 72℃ 10 min,然后进行DNA琼脂糖凝胶电泳。

1.5 免疫组织化学染色测定脑组织中 iNOS 的表达 将脑组织立即放入至少是标本体积 20 倍以上的 4%多聚甲醛中保存 12 h,再将固定后的脑组织进行常规脱水、二甲苯透明后用石蜡包埋,连续切片。采用 DAB 染色,ABC 法检测。观察 iNOS 阳性神经元,iNOS 阳性神经元胞质染色呈棕黄色,每组取 5 个病例,每个病例取 3 张切片采用捷达 801 系列形态学分析系统软件计算平均 iNOS 阳性细胞数。

1.6 统计学处理 iNOS mRNA 相对灰度值及 iNOS 阳性细胞数均以  $\bar{x} \pm s$  表示,各时相点脑损伤组标本采用捷达 801 系列形态学分析系统软件计算平均 iNOS 阳性细胞数,尼氏染色神经细胞计数采用完全随机设计的两样本均数比较的方差分析,iNOS mRNA 表达与 iNOS 阳性细胞数之间关系采用定量资料相关回归分析。统计学处理采用 SPSS 10.0 统计软件, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 尼氏染色结果 对照组尼氏染色见神经元排列规则,胞体形态正常,核周尼氏小体丰富,细胞突起明显。创伤性脑损伤组各时相点均可见尼氏染色创腔内神经元减少,创伤

区周边有较多神经元皱缩变形,胞质浓染,尼氏小体减少或消失(图 1)。对照组尼氏染色神经元计数  $89.74 \pm 7.82$ ,创伤组尼氏染色神经元计数损伤后 0~6 h 为  $52.25 \pm 6.15$ 、损伤后 6~12 h 为  $41.21 \pm 5.52$ 、损伤后 12~24 h 为  $29.42 \pm 3.15$ 、损伤后 24~36 h 为  $38.89 \pm 4.45$ 、损伤后 36~72 h 为  $35.75 \pm 3.79$ 、损伤后大于 72 h 为  $33.12 \pm 3.45$ 。创伤组尼氏染色神经元明显少于对照组( $P < 0.05$ )。

2.2 脑组织中 iNOS mRNA 的表达 对照组皮质中 iNOS mRNA 表达量较低(灰度值为  $0.03 \pm 0.01$ ),脑损伤后创伤区及周边皮质 iNOS mRNA 表达量逐渐增高(0~6 h 和 6~12 h 分别为  $0.62 \pm 0.05$ 、 $0.74 \pm 0.08$ ),伤后 12~24 h ( $0.92 \pm 0.04$ ) 达到高峰,组间有统计学差异( $P < 0.05$ ,图 2)。

2.3 脑组织 iNOS 蛋白表达 iNOS 阳性细胞呈棕黄色,iNOS 在生理状态下很少表达或不表达。脑损伤后 0~6 h 创伤区及周边 iNOS 阳性细胞表达增多;6~12 h 进一步增多;12~24 h 达到高峰,创腔内尤为明显;24~36 h 仍较多;36~72 h 较前减少;72 h 以后进一步减少(图 3)。各时相点脑损伤组标本,正常对照、0~6 h、6~12 h、12~24 h、24~36 h、36~72 h、大于 72 h 组 iNOS 阳性细胞数分别为  $0.23 \pm 0.05$ 、 $12.13 \pm 1.05$ 、 $29.32 \pm 3.62$ 、 $52.73 \pm 3.15$ 、 $36.89 \pm 3.45$ 、 $15.75 \pm 1.79$ 、 $9.32 \pm 1.08$ 。12~24 h 中与其他各组比较 iNOS 阳性细胞数最高( $P < 0.05$ )。

2.4 脑组织中 iNOS mRNA、蛋白表达的相关性分析 统计分析结果表明,创伤脑组织 iNOS mRNA 相对灰度值与 iNOS 阳性细胞数高度相关( $r = 0.956$ , $P = 0.003$ ),表明 iNOS 在分子水平和蛋白水平表达有密切关系。

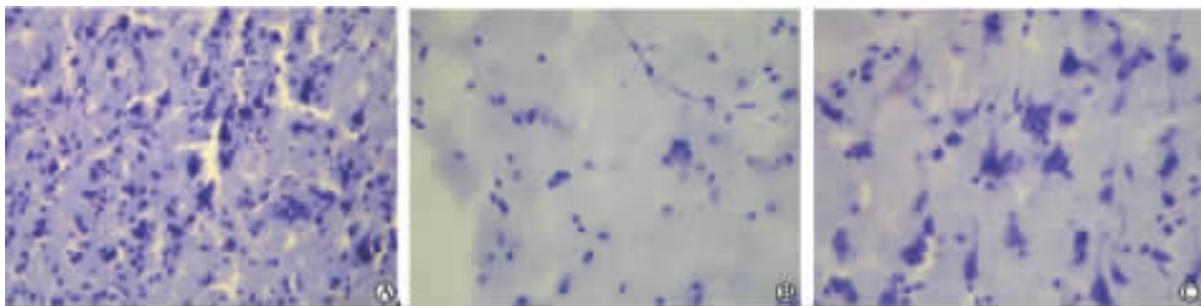


图 1 正常对照组(A)、脑损伤组创伤区(B)及创伤边缘区(C)尼氏染色结果

Original magnification:  $\times 400$

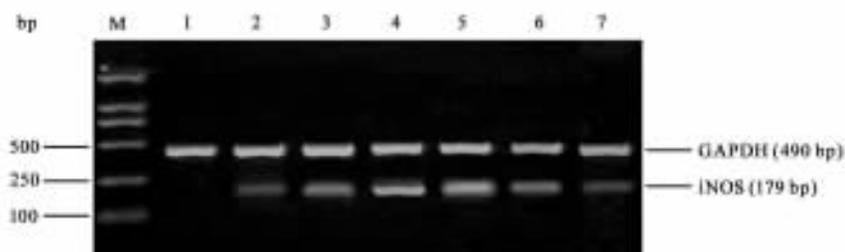


图 2 损伤区及周边皮质 iNOS mRNA 表达变化

M: Marker; 1: 空白组; 2: 伤后 0~6 h 组; 3: 伤后 6~12 h 组; 4: 伤后 12~24 h 组; 5: 伤后 24~36 h 组; 6: 伤后 36~72 h 组; 7: 伤后 72 h 以后



图3 正常对照组(A)、损伤后12~24 h组(B)及损伤后72 h以上组脑组织 iNOS 免疫组织化学染色

Original magnification: ×200

### 3 讨论

目前国内外研究<sup>[4-6]</sup>表明在动物脑损伤模型中以及在脑外伤死亡的死者脑中存在大量表达 iNOS 的巨噬细胞、中性粒细胞; Orihara<sup>[7]</sup>指出 iNOS 在人类脑损伤后的继发性脑损伤中起着重要作用。本实验用尼氏染色法检测了神经元的形态变化, RT-PCR、免疫组织化学染色方法在基因及蛋白质水平观察 iNOS mRNA 和 iNOS 阳性细胞的表达。尼氏染色结果提示创伤组尼氏染色神经元明显少于对照组。在常规的 H-E 染色中也可以看到神经元的充血、水肿、变性、坏死以及神经元减少也证实了尼氏染色的结果。在正常人 iNOS 表达量几乎没有, 脑损伤后 0~6 h 损伤区及周边皮质 iNOS mRNA 和 iNOS 阳性细胞增加, 但量较低, 伤后 12 h 起, 损伤区及周边皮质 iNOS mRNA 和 iNOS 阳性细胞增加明显, 24 h 达到高峰, 至伤后 72 h 仍明显高于对照组。iNOS mRNA 相对灰度值与 iNOS 阳性细胞数高度相关 ( $P=0.003$ )。本研究结果表明 iNOS 在人脑损伤后会出现 iNOS 的表达, 且表达的数量与伤后时程有一定的关系。

在本实验中, 由于未对阳性细胞的种类作特异性的检测, 故脑损伤后何种细胞表达 iNOS, 以及它们之间的比例和变化规律尚不明确。此外, 脑损伤后损伤区及周边皮质也未见中性粒细胞、血管平滑肌细胞及血管内皮细胞表达 iNOS, 但发现在脑损伤后 3、6 及 12 h, 在损伤区同一冠状层面的下丘脑部位可见 iNOS 阳性血管内皮细胞, 以伤侧居多, 可能是创伤产生的疼痛、缺血缺氧、炎症因子等因素引起中枢兴奋性神经递质释放或直接作用于下丘脑而导致的创伤应激反应。

颅脑创伤仍然是全球性主要的公共健康问题, 本研究结

果进一步深入了解了 NO/iNOS 在中枢创伤性病变中的变化规律及意义, 将为脑组织疾病治疗开辟新途径。

### [参考文献]

- [1] 冯海龙, 高立达, 黄光富, 谭海斌, 廖晓灵, 陈勇. 大鼠重型脑损伤后一氧化氮/诱生型一氧化氮合酶神经细胞毒性的作用机制[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16: 416-418.
- [2] Gahm C, Holmin S, Mathiesen T. Temporal profiles and cellular sources of three nitric oxide synthase isoforms in the brain after experimental contusion[J]. Neurosurgery, 2000, 46: 169-177.
- [3] Gahm C, Holmin S, Wiklund P N, Brundin L, Mathiesen T. Neuroprotection by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase after experimental brain contusion[J]. J Neurotrauma, 2006, 23: 1343-1354.
- [4] 廖维宏, 王国强, 沈岳, 李芳, 张微微, 焦辉. 腺病毒介导源性神经营养因子基因转移对大鼠创伤性脑损伤后诱导型一氧化氮合酶表达及细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 3-8.
- [5] Louin G, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, Plotkine M, Jafari-an-Fehrani M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury[J]. Neuropharmacology, 2006, 50: 182-190.
- [6] Petrov T, Rafols J A. Acute alterations of endothelin-1 and iNOS expression and control of the brain microcirculation after head trauma[J]. Neurol Res, 2001, 23(2-3): 139-143.
- [7] Orihara Y. Forensic pathological significance of iNOS with regard to brain and myocardial damage [J]. Nihon Hoigaku Zasshi, 2000, 54: 361-366.

[本文编辑] 尹茶