

## 诱导型一氧化氮合酶在强啡肽致脊髓损伤中的作用\*

胡文辉 杨慧芬 强文安 孙秀君 刘娜 万选才 刘景生 任民峰 李芳 王国强 肖剑 廖维宏

**摘要 目的:** 探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在强啡肽致脊髓损伤中的作用。

**方法:** [ $^3\text{H}$ ] -左旋精氨酸转化法测定腹侧和背侧脊髓iNOS活性, 原位杂交法观测脊髓iNOS mRNA表达及其细胞分布。**结果:** 大鼠蛛网膜下腔注射(InI)强啡肽 $\text{A}_{1-17}$ (Dyn) 20 nmol引起持久性截瘫和迟发性神经元死亡; 在Dyn致瘫后2~3 h iNOS mRNA表达开始增多增强, 4 h达高峰, 24 h和48 h仍见广泛表达, 其分布以胶质细胞和大运动神经元为主; 腹侧脊髓iNOS活性在Dyn致瘫后4 h显著升高, 并持续至24 h和48 h; 提前10 min InI选择性iNOS抑制剂氨基胍1  $\mu\text{mol}$ 可显著对抗Dyn 20 nmol引起的持久瘫及伤后4 h腹侧脊髓iNOS活性升高。**结论:** iNOS持续性高表达与Dyn致脊髓损伤机制有关。

**主题词** 强啡肽; 一氧化氮; 脊髓损伤

## Increases of inducible nitric oxide synthase activity and mRNA expression in rat spinal cord after dynorphin neurotoxicity

HU Wen-Hui, YANG Hui-Fen, LI Fang, QIANG Wen-An, SUN Xiu-Jun, LIU Na, WAN Xuan-Cai, LIU Jing-Sheng, REN Min-Feng, WANG Guo-Qiang, XIAO Jian, LIAO Wei-Hong

*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing(100005)*

**Abstract AIM:** To explore the role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in dynorphin-induced spinal cord injury. **METHODS:** The iNOS activities in ventral and dorsal spinal cord were measured with [ $^3\text{H}$ ] -L-Arginine conversion. The iNOS mRNA expression and its cell distribution were detected with in situ hybridization. **RESULTS:** Intrathecal injection of dynorphin  $\text{A}_{1-17}$  (Dyn) 20 nmol induced permanent paraplegia and delayed neuronal death. The iNOS mRNA expression began to increase at 2~3 h, peaked at 4 h and remained extensive at 24~48 h after Dyn spinal neurotoxicity, predominantly in glia cells and large motoneurons. The iNOS activities in ventral cord significantly increased at 4 h and persisted up to 24~48 h. Intrathecal pretreatment with aminoguanidine 1  $\mu\text{mol}$ , a selective iNOS inhibitor, 10 min before Dyn 20 nmol significantly ameliorated Dyn-induced neurological outcome and antagonized the increase of iNOS activities at 4 h after Dyn neurotoxicity. **CONCLUSION:** Persistent high expression of iNOS might be involved in the pathophysiology of dynorphin-induced spinal cord injury.

## MeSH Dynorphin; Nitric oxide; Spinal cord injuries

蛛网膜下腔注射 (intrathecal injection, InI) 强啡肽 $A_{1-17}$  (dynorphin $A_{1-17}$ , Dyn), 在强烈镇痛的同时可导致正常动物的脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI), 并可加重SCI动物的损伤程度<sup>[1]</sup>。关于Dyn致SCI的机制尚不清楚。我们实验室以往工作表明N-甲基-D-门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体拮抗剂和 $Ca^{2+}$ 通道阻断剂均能对抗Dyn致瘫, 提示NMDA和 $Ca^{2+}$ 与Dyn致SCI机制有关<sup>[2]</sup>。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 在神经、免疫和心血管等多个系统中具有广泛而复杂的生理与病理作用<sup>[3]</sup>, 近来引起普遍关注。诱导型NO合酶 (inducible NO synthase, iNOS) 受基因转录调控, 一旦形成则缓慢持久产生大量NO, 在免疫、肿瘤和脑缺血等病理过程具有细胞毒性作用<sup>[3, 4]</sup>。我们曾采用NADPH-黄递酶 (NADPH-diaphorase, Nd) 组化技术首次观察到Dyn致瘫可诱导脊髓腹角细胞表达NOS<sup>[5]</sup>。本文采用<sup>3</sup>H-左旋精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 转化及iNOS原位杂交技术观测Dyn致瘫后iNOS活性和mRNA表达, 并探讨iNOS选择性抑制剂氨基胍 (aminoguanidine, AG) 对Dyn致SCI作用的影响。

## 材料与方法

(一) 动物、手术和药物引入: Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重(270±15)g, 由中日友好临床医学研究所动物室提供。按Yaksh法进行蛛网膜下腔插管<sup>[2, 6]</sup>。给

国家自然科学基金资助 (No. 39370786)

药体积10  $\mu$ L并用生理盐水10  $\mu$ L冲洗。AG用1 mol/L HCl快速溶解后用0.1 mol/L NaOH调pH至7.4。其余药物均用生理盐水配制。

(二) 后肢运动功能测定: 根据Faden 8点分级法和Behrmann 5点分级法加以改进<sup>[6]</sup>。

(三) iNOS活性测定: 采用本研究室建立的<sup>3</sup>H-L-Arg转化法试剂盒测定iNOS活性。

(四) 原位杂交:

常规灌注4%多聚甲醛并维持固定1~2 h。取出 $T_{11}$ ~ $S_3$ 脊髓于4%多聚甲醛中4℃后固定2~4 h。转至20%~30%蔗糖0.1 mol/L PBS防冻液 (原位杂交时需高压消毒) 中4℃过夜。以InI尖端为中心, 向上向下每0.5 cm为一段, 横向切取脊髓。为确保形态学的可比性, 根据实验设计, 沿脊髓双侧或单侧进行纵行切口, 将双切口、单切口和未切口脊髓合为一起进行冰冻切片, 厚度为40  $\mu$ m, 按A、B、C、D、E连续收集切片于20%~30%蔗糖液中, 4℃存放数天内使用, 或-20℃冻存数月内使用。

以Acc I酶切iNOS cDNA质粒, 回收684 bp的DNA片段, 按地高辛DNA标记与检测试剂盒说明标记探针并检测定量。按以下程序进行飘浮法原位杂交: (1) 取出-20℃保存的冰冻切片解冻后, 0.1 mol/L PBS 5 min×3~5; (2) 0.1 mol/L甘氨酸5 min; (3) 0.4% Triton X-100 15 min (增加膜通透性); (4) 0.1 mol/L PBS 5 min×1~2 (消除Triton X-100 对蛋白酶K的影响); (5) 10 g/L蛋白酶K (新鲜配制) 37℃ 20~30 min (提高探针穿透性); (6) 4%多聚甲醛4℃ 5 min (终止蛋白酶K的作用); (7) 0.1 mol/L PBS 5 min×2~3; (8) 0.2 mol/L HCl 10 min (抑制内源性碱性磷酸酶并封闭非特异性结合位点); (9) 2×SSC 10 min (清洗与过渡); (10) 预杂交液 (含50%去离子甲酰胺, 5×SSC, 10%硫酸葡聚糖, 2×Denhardt液, 0.5%SDS和0.2 g/L变性鲑精DNA) 42~45℃ 1~2 h; (11) 杂交液 (预杂交液中加入标记探针0.5 mg/L) 煮沸10 min骤冷后, 取2~3  $\mu$ L脊髓切片加入Eppendorf管中, 盖好后42~45℃ 20 h; (12) 50%甲酰胺/2×SSC 42℃ 15 min×2; (13) 50%甲酰胺/0.1×SSC 42℃ 15 min; (14) 0.1×SSC 42℃ 15 min; (15) 按试剂盒说明进行NBT呈色。(16) 水洗后0.5%铬明胶液中贴片; (17) 充分干燥后直接二甲苯透明封片。

为排除批间误差,全部切片在—批实验中完成。为排除系统误差,对照组与实验组切片在同一Eppendorff管中进行。重要标本进行重复性实验,以验证结果的可靠性。严格设立阴性对照:①杂交前用RNA酶100 U/mL 37℃预处理切片30 min;②杂交液内去除标记探针;③杂交液加入过量的(100倍以上)未标记探针;④以缓冲液II代替地高辛抗体。

(五)统计学方法:对运动功能分级资料进行Mann-Whitney U检验。对iNOS活性测定的数据进行单因素方差分析和Newman-Keuls检验以及非配对资料组间双侧t检验。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 结果

(一)Dyn对大鼠脊髓功能的影响:在Dyn 10 nmol InI后,11只大鼠中有5只出现—过性瘫(在1 h内恢复至6~7级),有2只出现持久性瘫痪,24 h内毫无恢复;20 nmol InI后19只大鼠均出现严重瘫痪,其中1只在1 h内恢复至7级,2只在4 h内恢复至6~7级,16只在24 h均无明显恢复(图1)。

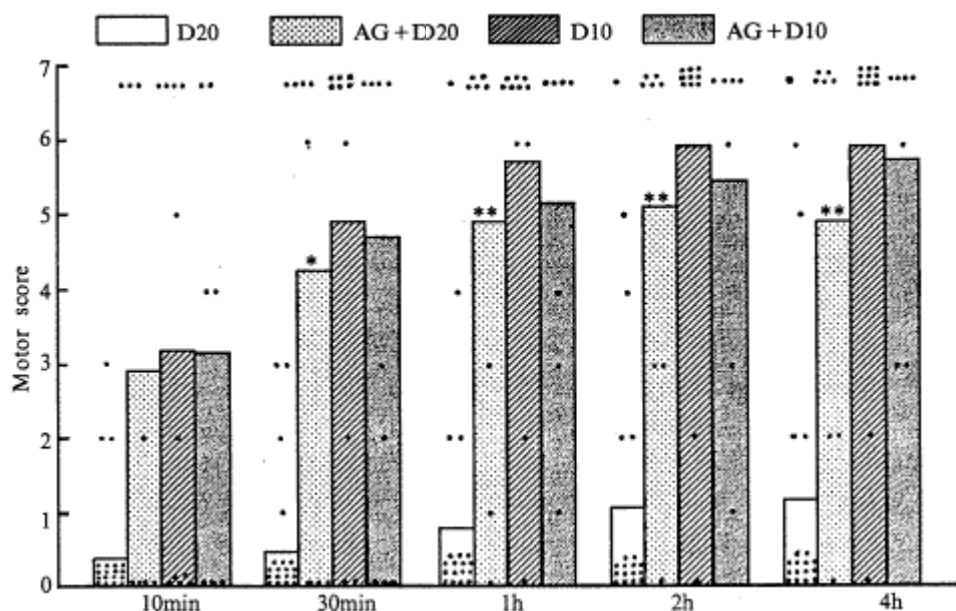


Fig1 Intrathecal pretreatment with selective iNOS inhibitor aminoguanidine (AG) 1  $\mu$ mol significantly antagonized dynorphin  $A_{1-17}$  (Dyn) 20 nmol (D20)-induced permanent paraplegia but did not aggravate Dyn 10 nmol (D10)-induced transient paralysis

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs D20. Dots represent numbers of animal

图1 选择性iNOS抑制剂氨基胍显著对抗强啡肽致瘫

(二)Dyn致瘫后不同时间背侧与腹侧脊髓iNOS活性变化:在InI对照正常大鼠,上清iNOS在背侧与腹侧间无显著差异(图2)。在Dyn 20 nmol致持久瘫后30 min~2 h,iNOS活性在腹侧脊髓均无显著性变化,但在Dyn致瘫后4、24和48 h均显著升高,而背侧的上清iNOS活性在Dyn致瘫后48 h亦显著升高(图2)。我们在预实验中初步观察了Dyn持久瘫后总脊髓的iNOS活性变化,也获得类似结果。正常总脊髓的iNOS活性为

( $16.83 \pm 2.70$ )  $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $n=5$ ); iNOS活性在2 h无显著变化( $19.30 \pm 1.47$ )  $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $n=7$ ), 在24 h显著升高至( $27.69 \pm 4.24$ )  $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $n=5$ ,  $P < 0.05$ 。

(三) 选择性iNOS抑制剂AG显著对抗Dyn致瘫: 提前10 min InI AG  $1 \mu\text{mol}$ 能明显对抗Dyn 20 nmol引起的持久瘫和神经损伤; 并不加重Dyn 10 nmol引起的过性瘫(图1)。AG  $1 \mu\text{mol}$ 不仅明显对抗Dyn 20 nmol引起的伤后4 h腹侧iNOS活性升高, 而且抑制腹侧与背侧iNOS活性, 与InI对照组相比分别低了60.3%和68.7%(图2)。

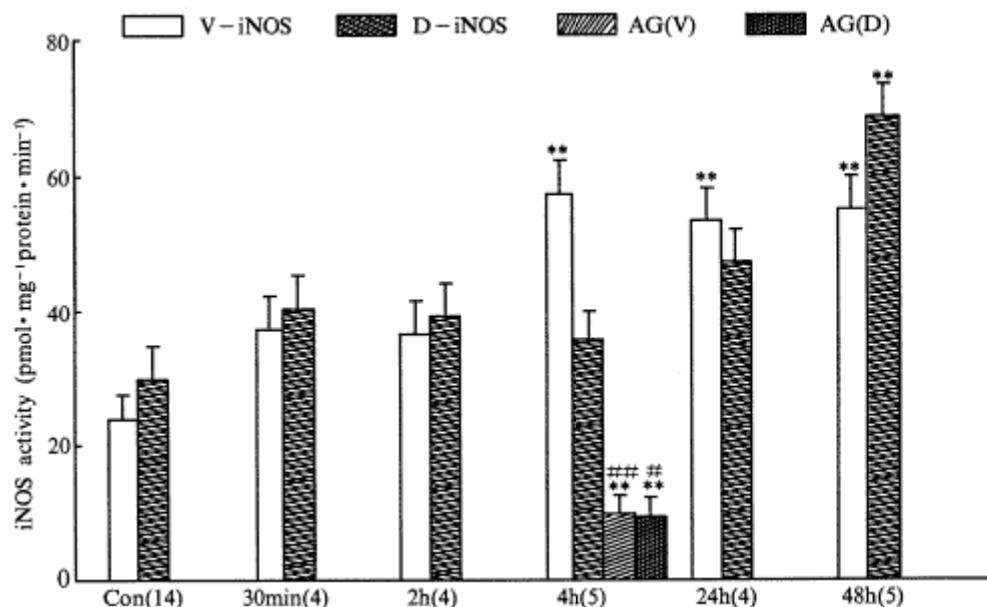


Fig2 Activities of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the supernatant of ventral (V) and dorsal (D) spinal cords after dynorphin  $A_{1-17}$  (Dyn) 20 nmol-induced spinal cord injury and effect of pretreatment with aminoguanidine (AG)  $1 \mu\text{mol}$

\*\* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , vs saline control (Con) and Dyn 4 h respectively. Numbrs of animal are shown in parenthese

图2 强啡肽致瘫后腹侧与背侧iNOS活性变化及氨基胍的影响

(四) iNOS mRNA表达的细胞定位和损伤反应: 在InI对照动物, 仅见腹角运动神经元和背核等大神经元及室管膜细胞中度表达iNOS mRNA (图3A)。在Dyn 20 nmol致瘫后5、10、20、和30min及1 h均见运动神经元和室管膜细胞明显阳性, 但与同步的相应对照组(切片放在同一染管中)比较无明显差异, 胶质细胞也未见明显阳性。在2~3 h表达开始增多增强, 4 h达高峰, 分布广泛, 以运动神经元、背核、VII层及室管膜细胞为著, 杂交信号表现典型, 胶质细胞(尤其在白质)开始表达iNOS mRNA(图3B~C)。在24 h和48 h仍见广泛性强表达, 以胶质细胞和/或小神经元(白质和灰质)为主, 弥散性分布(图3D); 在有明显中央性坏死的节段, 坏死区可见iNOS mRNA阳性细胞, 坏死边缘区也见散在的运动神经元和小细胞阳性; 在结构完整的节段, 仍见广泛性运动神经元和背核、VII层及室管膜细胞阳性, 并有较多小细胞(可能是胶质细胞)。

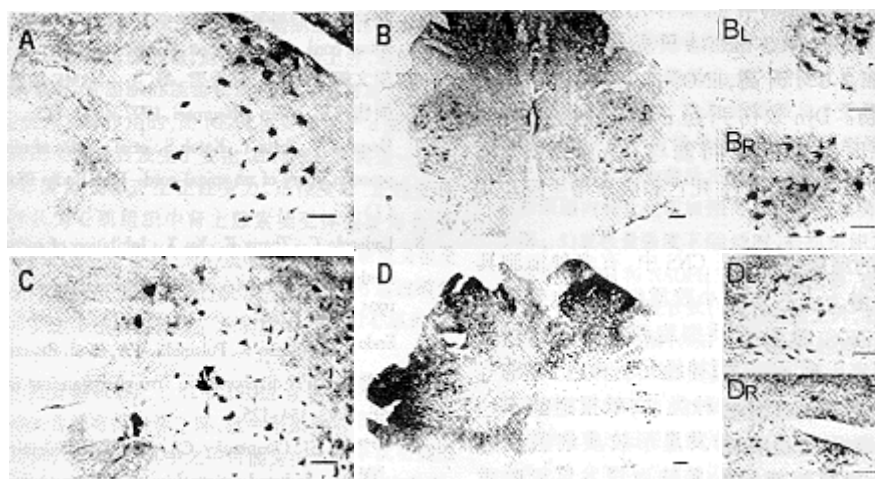


Fig 3 Paralyzing dose of dynorphin  $A_{1-17}$  apparently induced extensive expression of iNOS mRNA in rat spinal cord.

A: saline control. B: 2 h, C: 4 h, D: 24 h.  $B_L$ ,  $D_L$  and  $B_R$ ,  $D_R$  are magnified from the left and right ventral horn of B and D respectively. Small arrows indicate gliosis. scale bars=100  $\mu$ m

图3 致瘫剂量强啡肽明显诱导大鼠脊髓广泛性表达iNOS mRNA

## 讨论

(一) iNOS在Dyn致脊髓损伤中的作用: 本文观察到腹侧脊髓iNOS mRNA在Dyn致伤后2 h开始表达, iNOS活性在4 h开始显著升高, 并持续24~48 h以上, 其时相变化与迟发性神经元死亡的时间颇为一致; 联合应用iNOS抑制剂AG可明显抑制iNOS活性, 并显著对抗Dyn致瘫; 表明iNOS在Dyn致SCI中起重要作用, 也提示iNOS表达受基因调控, 需要数小时才能完成。最近Hamada等<sup>[7]</sup>报道大鼠脊髓压迫损伤后24 h脊髓iNOS mRNA表达最明显, 认为iNOS在SCI亚急性期(subacute phase)有重要作用。Iadecola等<sup>[8]</sup>发现脑缺血后12 h iNOS mRNA开始表达, 2 d达高峰, iNOS活性在2 d才升高, iNOS抑制剂AG可明显减轻脑缺血损伤。Dyn致伤引起iNOS表达的时间早于脑缺血, 其原因尚不清楚, 可能与Dyn致伤特点有关。Dyn致SCI后神经元变性死亡和胶质增生反应均较脑缺血为早。

(二) iNOS的细胞来源: 在CNS中, 有多种细胞具有表达iNOS的潜力。已发现小胶质细胞和血管平滑肌细胞只表达iNOS, 星形胶质细胞和血管内皮细胞可表达iNOS和原生型NOS, 而神经元不表达iNOS<sup>[4]</sup>。CNS损伤后表达iNOS的细胞种类, 文献报道颇不一致。Wallace发现皮层损伤诱发星形胶质细胞表达Nd。Endoh等<sup>[9]</sup>报道短暂性全脑缺血诱发星形胶质细胞表达Nd和iNOS-免疫活性。Iadecola等<sup>[8]</sup>报道持续性脑缺血后梗死边缘区多形核细胞表达iNOS-免疫活性, 2 d开始出现, 4 d最高, 而巨噬细胞、胶质细胞、平滑肌细胞均为iNOS-免疫反应阴性。Schmidt等证明喹啉酸兴奋毒性损伤后5 d的iNOS活性升高, 主要来源于活化的星形胶质细胞和小胶质/巨噬细胞。Boje和Hewett等<sup>[10]</sup>在体外神经元培养中分别证明小胶质细胞和星形胶质细胞iNOS产生的NO与神经元损伤密切相关。本文首次发现Dyn致SCI后大量胶质细胞和神经元表达iNOS mRNA, 而且正常脊髓神经元也表达iNOS mRNA。表达iNOS mRNA的胶质细胞是星形还是小胶质细胞, 以及神经元表达iNOS mRNA的原因和意义尚待进一步研究。

作者单位: 杨慧芬 强文安 孙秀君 刘娜 万选才 刘景生 任民峰 中国医学  
科学院基 础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院(北京 100005)  
胡文辉 李芳 王国强 肖剑 廖维宏 第三军医大学大坪医院野战外  
科研究所

## 参考文献

- 1 Shukla VK, Lemaire S. Non-opioid effect of dynorphins: Possible role of the NMDA receptor. *TIPS*, 1994, 15(12):420.
- 2 陈 彪, 田学峰, 任民峰. 强啡肽A<sub>(1-17)</sub>致大鼠脊髓损伤. *中国药理学与毒理学杂志*, 1995, 9(1): 30.
- 3 Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: Pathophysiological mechanism. *Annu Rev Physiol*, 1995, 57:737.
- 4 Ladecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *TINS*, 1997, 20(3):132.
- 5 Hu WH, Lee FCH, Wan XST, et al. Dynorphin neurotoxicity induced nitric oxide synthase expression in ventral horn cells of rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 1996, 203:13.
- 6 胡文辉, 刘 娜, 孙秀君, 等. L-NAME加重强啡肽致脊髓损伤作用. *Chin J Neurosci*, 1997, 4(3):115.
- 7 Hamada Y, Ikata T, Katoh S, et al. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20(1):1.
- 8 Ladecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol*, 1995, 268:R286.
- 9 Endoh M, Maiese K, Pulsinelli WA, et al. Reactive astrocytes express NADPH diaphorase in vivo after transient ischemia. *Neurosci Lett*, 1993, 154:125.
- 10 Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron*, 1994, 13:487.

1997年7月9日收稿, 1998年3月3日修回