

一氧化氮与脑缺血的损伤及保护

浙江医科大学神经生物学实验室 蒋欣欣 陆智勇 综述 魏尔清 审核

在机体内, L-精氨酸(L-Arg)通过一氧化氮合酶(NOS)的催化, 生成一氧化氮(NO)。近年来, 随着对脑缺血损伤发病机制的深入研究, NO 及 NOS 的作用正日益受到重视。在中枢神经系统中含有 3 种 NOS, 包括神经元型 NOS (nNOS)、诱生型 NOS (iNOS) 和内皮细胞型 NOS (eNOS)。研究表明, 抑制 NO 的合成可降低 N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)对培养神经元的毒性, 并减轻小鼠大脑中动脉(MCA)梗塞所致的脑损伤; 而 NO 又可消除过氧化物介导的对大鼠中脑神经元细胞的毒性作用, 提示 NO 作用的复杂性。作者就 NO 在脑缺血中的有利和有害作用作一综述。

1 脑缺血时的病理生理

MCA 梗塞后, 受影响的脑区域血流量显著下降。缺血中心区血流下降最显著, 迅速导致能量衰竭和细胞死亡; 缺血区周边, 由于侧枝循环的存在, 血流下降逐步减轻, 这些区域被称为缺血阴暗区, 该区的神经元保持电生理静默, 如果血流重建或采取神经保护措施, 它们将获救。目前的研究主要集中在如何缩小缺血阴暗区的损伤方面。

分子生物学研究表明, 脑缺血后, 早期反应为基因 *c-fos*、*c-jun* 和 *zif286* 等表达, 受损细胞表达热休克蛋白; 随后, 由于细胞因子和粘附分子表达, 引发炎症反应^[1], 中性粒细胞粘附于血管内皮并侵入缺血部位, 血小板活性和血液粘滞度增大; 大约 24 ~ 48 h 后, 巨噬细胞聚集并取代了中性粒细胞, 星形胶质细胞过度表达胶质纤维样酸性蛋白, 小胶质细胞增殖。数天后, 微血管开始增生。

缺血后数分钟, 缺血边缘区的 NO 水平急剧升高 200 倍, 随后缓慢下降, 于再灌注期再次并持续地升高。此外, 脑缺血后脑血管的 eNOS 活性在 24 h 内进行性上升^[2]。

2 在脑缺血发病中 NO 可能的作用

2.1 神经保护作用

NO 激活鸟苷酸环化酶(GC), 增加 cGMP 合成, 从而舒张脑血管平滑肌, 增加缺血区的侧枝循环; 并可通过化学修饰钙依赖钾通道上的巯基, 直接激活该通道, 使血管扩张^[3]。NO 抑制血小板聚集、限制血管平滑肌细胞增生、抑制白细胞粘附, 并阻止单核细胞的趋化作用, 从而改善微循环。这些作用可能与激活 GC、抑制 12-脂氧合酶、粘附分子及 CD11-CD18 复合物表达的作用有关^[4]。

NO 能抑制 NMDA 的神经毒性。有人认为, NO 使 NMDA 受体调控位点的巯基亚硝基化而生成二硫键, 抑制了钙内流, 从而降低了 NMDA 介导的神经毒; 另一些人则推测, 可能是一种 NO-金属复合物有变构作用, 从而抑制了受体。

在许多情况下, NO 能对抗活性氧族的有害作用。实验发现, NO 能阻止 H₂O₂ 对膜的破坏, 并且是 Fenton 反应的一种抗氧化剂; NO 与烷氧基等反应而使脂质膜的自由基链式反应终止; 此外, NO 还能清除羟自由基(OH[·]), 减少氧化损伤^[5]。

2.2 神经毒性作用

NO 与超氧阴离子生成过氧亚硝酸根离子, 并进一步生成过氧亚硝酸或降解成 OH[·]及二氧化氮, 这些产物, 尤其是 OH[·], 可造成细胞蛋白、核酸及脂质膜的损伤。NO 与铁反应成份结合蛋白

(IRE-BP)的 4Fe/4S 簇结合,形成含 3Fe/4S 的 IRE-BP 形式,触发了细胞内铁的丢失。细胞外铁的增加使 Fenton 反应生成的自由基大大增加,从而促进脂质过氧化^[6]。

NO 能抑制线粒体呼吸和能量代谢。NO 抑制乌头酸酶和线粒体电子传递链的复合物 I 和 II^[7],该作用与 4Fe/4S 簇铁的丢失有关。NO 通过 S-亚硝酰化作用,抑制糖酵解酶 GADPH 和肌酸激酶,从而限制 ATP 的生成^[8]。

NO 抑制 DNA 合成限速酶-核糖核苷酸还原酶,抑制 DNA 的复制。iNOS 激活产生的高浓度 NO,使该酶 R₂ 亚基的铁-酪氨酰基丢失而产生作用^[6]。NO 使碱基去氨基化导致 DNA 破坏^[9],激活多聚 ADP-核糖合成酶(PARS),使该蛋白 ADP-核糖化,引起蛋白质结构和功能的改变,并迅速导致细胞内能量衰竭^[10]。

3 脑缺血中 NO 作用的相关因素

3.1 组织的氧化还原状态 NO 通常以还原型(NO[·])和氧化型(NO⁺)两种形式存在。Lipton^[11]等证实,当培养基的状态有利于 NO[·]的形成时,NO 生成剂可通过产生硝基过氧化物及 OH[·],表现为神经毒性作用;而有利于 NO⁺生成时,NO 生成剂则通过亚硝基化 NMDA 受体的巯基,降低 NMDA 受体的活性而发挥神经保护作用。

3.2 NOS 的类型 分布于不同细胞的 NOS 在脑缺血中有不同作用。一般情况下,血管内皮细胞中的 eNOS 主要表现有利神经保护的作用;而分布于神经元及炎症细胞的 nNOS 和 iNOS 则主要表现神经毒性作用。

3.2.1 nNOS: nNOS 起源的 NO 介导包括兴奋性氨基酸、癫痫在内的各种刺激,此外,在 L-Arg 不足的情况下,可合成过氧化物和氢过氧化物,产生神经毒性作用^[12]; nNOS 敲除(knockout, Kn)的小鼠有正常的脑血管形态和反应性,但 MCA 阻塞后梗死面积与

正常对照组相比,下降了 40%^[13];而且,Kn 小鼠的神经元对谷氨酸介导的神经毒和低氧、低糖造成的损害更有抵抗力。

3.2.2 eNOS: eNOS 合成的 NO 可引起血管舒张,抑制血小板、白细胞的聚集而保护脑血管内皮;与正常小鼠相比, eNOS Kn 小鼠 MCA 阻塞可造成更大范围的脑梗死,这与降低缺血阴暗区血流量有关^[14]; nNOS Kn 小鼠在抑制 eNOS 后,它们的脑梗死面积^[13]扩大了,表明内皮细胞合成的 NO 产生有益的血流动力学作用,对脑缺血起保护作用。

3.2.3 iNOS: Kn 小鼠的实验显示,脑缺血后此种小鼠不表达 iNOS, 并比正常小鼠的梗死范围小得多^[15]。表明 iNOS 的表达对缺血后的脑是有害的。

3.3 脑缺血的进程 主要与 NOS 的类型有关。nNOS 在局灶性脑缺血后 10 min 增加并在 60 min 后恢复正常; eNOS 在缺血诱导后短时间内,其蛋白表达和酶活性也增加;与 nNOS 和 eNOS 不同, iNOS 在 MCA 阻塞后 6~12 h 才开始表达^[16]。在迟发相时(> 24 h),组织坏死进一步发展,含 NOS 的神经元丢失, nNOS 活性下降。总之,缺血初期, nNOS 和 eNOS 上调,促进间质和血管过量合成 NO,其后 NO 主要由 iNOS 合成。

4 影响 NO 的药物在脑缺血中的作用

4.1 促进 NO 生成的药物 包括 NO 的前体 L-Arg, 及 NO 的供体,如硝普钠、3-吗啡-斯德酮亚胺(SIN-1)及斯德酮亚胺类的衍生物 CAS-754 等。缺血后即刻,血管内注射 L-Arg 或硝普钠和 SIN-1 可减少梗死范围^[17, 18]。该作用与增加缺血阴暗区血流有关。缺血后 30 min 以上使用 L-Arg 无效,而缺血 2 h 以上则给予 NO 供体亦失去效能^[18, 19];且使用 L-Arg 可加重脑梗死^[20],因此,促进 NO 的合成只在脑缺血极早期有保护作用。

4.2 非选择性 NOS 抑制剂 L-硝基精氨酸

(L-NA)、N^G-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、L-甲基精氨酸(L-NMMA)、和N^G-硝基-L-精氨酸(L-NNA)等均为非选择性NOS抑制剂。

使用这些非选择性NOS抑制剂的研究结果并不一致。Ashwa^[21]等发现,L-NNA和L-NAME分别能减小颈动脉结扎和MCA栓塞引起的脑梗死面积;Yamamoto^[22]则发现L-NNA反而增加MCA阻塞引起的脑梗死面积;而Dawson^[23]的实验表明,L-NAME对MCA引起的脑梗死无明显作用。这些结果提示NO作用的复杂性。

4.3 选择性NO抑制剂 主要包括nNOS抑制剂7-硝基吡唑(7-NI)、FPL17477、CHU-29、L-MIN和iNOS抑制剂氨基胍等。相对选择性NOS抑制剂在脑缺血模型实验中的使用取得了较为一致的结果。在MCA阻塞后2h时,给予L-MIN,可降低脑梗死的面积;7-NI、FPL17477和CHU-29也可减轻脑缺血损伤。缺血后1~3d腹腔注射氨基胍(100mg/kg),可降低缺血后iNOS活性,并减小MCA阻塞后的梗死面积,实验中,氨基胍不影响nNOS活性、动脉压力和脑血流,说明药物不作用于nNOS和eNOS^[20,24]。这些实验结果表明,nNOS和iNOS的活性对脑缺血局部有毒性作用。

5 以NO为基础的神保护策略

NO对脑缺血损伤的病理过程有作用,因此,如何控制NO和NOS系统将为中风的治疗提供一个重要的方向。对症状明显的病人,在缺血的最初几小时内,NO供体可能有效;在缺血早期,nNOS抑制剂可与谷氨酸受体拮抗剂结合使用以增大神经保护作用。在缺血6h以后,可用iNOS抑制剂以对抗iNOS合成NO的有害作用。考虑到大多数缺血中风病人都是在症状发生数小时后赶到医院的,iNOS抑制剂的价值就更显著了。

选择性NOS抑制剂目前尚面临许多关

键问题亟待解决:①NO在缺血损害中的作用具有阶段依赖性,必须准确掌握缺血发生时间及其进展程度;②由于iNOS参与损害的迟发阶段,必须明确病人脑中中风后iNOS表达是否依然上调,又是发生在何种细胞;③尚未发现适用于人类的选择性nNOS和iNOS抑制剂^[25];④脑缺血损伤涉及到多种病理过程,NO是其中的一个重要因素,仅当NO的异常占主导地位时,调控NO和NOS系统才能起到保护作用。

参 考 文 献

1. Li Y, Chopp M, Zhang ZG, et al. p53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1994, 25(3):849
2. Kader A, Frazzini VJ, Solomon RA, et al. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1993, 24(11):1709
3. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 1994, 368(6474):850
4. De Caterin R, Libby P, Pong HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. *J Clin Invest*, 1995, 96(1):60
5. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, et al. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(21):9813
6. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev physiol*, 1995, 57:737
7. Hibbs JB, et al. Nitric Oxide from L-arginine: A cellular Bioregulatory System. 1st ed. Amsterdam; Elsevier Sci, 1990:189~223
8. Gross WL, Bak MI, Ingwall JS, et al. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(11):5604
9. Nguyen T, Qrunson D, Crespi CL, et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(7):3030
10. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, et al. Nitric oxide activation of poly (ADP-Ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, 1994, 263(5147):687
11. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive

- effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 1993, 364(6438) :626
12. Klatt P, Schmidt K, Uray G, et al. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1993, 268(20) :14781
 13. Huang ZH, Huang PL, Panahian N, et al. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1994, 265(5180) :1883
 14. Huang PL, Huang ZH, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995, 377(6546) :239
 15. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*, 1995, 81(4) :641
 16. Iadecola C, Zheng F, Casey R, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1996, 27(8) :1373
 17. Morikawa E, Huang Z, Moskowitz MA, et al. L-arginine decreases infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR. *Am J Physiol*, 1992, 263(5P2) :H1632
 18. Zhang F, Iadecola C. Reduction of focal cerebral ischemic damage by delayed treatment with nitric oxide donors. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14(4) :547
 19. Dalkara T, Morikawa E, Panahian N, et al. Blood flow-dependent functional recovery in a rat model of focal cerebral ischemia. *Am J Physiol*, 1994, 267(2P2) :H678
 20. Zhang F, Casey RM, Ross ME, et al. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1996, 27(2) :317
 21. Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, et al. L-NAME reduces infarct volume in a filament model of transient middle cerebral artery occlusion in the rat pup. *Pediatr Res* 1995, 38(5) :652
 22. Yamamoto S, Golanov EV, Borger SB, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis increases focal ischemic infarction in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1992, 12(5) :717
 23. Dawson DA, Kusamoto K, Graham DT, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis does not reduce infarct volume in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett*, 1992, 142(2) :151
 24. Iadecola C, Zhang F, Xu X, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 1995, 268(1P2) :R286
 25. diener HC, Hacke W, Hennerici M, et al. Lubeluzole in acute ischemic stroke: a double-blind placebo-controlled phase II trial. *Stroke* 1996, 27(1) :76

(1998年1月7日收稿, 同年3月18日修回。)

(上接第140页)

14. Noah EM, Williams A, Jorgenson C, et al. End-to-side neurotrophic sprouting: a histologic and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve graft. *J Reconstr Microsurg*, 1997, 13(2) :99
15. Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, et al. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis. *J Hand Surg Br* 1994, 19(3) :277
16. Ross DA, Matsuda H, Zuker RM. End-to-side nerve coaptation for muscle reinnervation. In: Harii K, ed. Transactions of the 11th Congress of the International Confederation of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery. Japan Yokohama 1995
17. Bertelli JA, dos-Santos AR, Calixto JB. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layer of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis? *J Reconstr Microsurg*, 1996, 12(8) :559
18. Krivoltzkaia EG, Chumasov EI, Matina VN, et al. End-to-side type of plastic repair of the facial nerve branches. *Stomatologia Mosk*, 1989, 68(8) :35
19. Sawamura Y, Hiroshi A. Hypoglossal-facial nerve side-to-end anastomosis for preservation of hypoglossal function: results of delayed treatment with a new technique. *J Neurosurg*, 1997, 86(2) :203
20. Viterbo F, Franciosi LF, Palhares N. Nerve grafting and end-to-side anastomosis for neurotrophic connections of the phrenic nerve to the brachial plexus. *Plast Reconstr Surg*, 1995, 96(2) :494

(1998年3月26日收稿, 同年4月30日修回)