

寒冷应激对小鼠脑内一氧化氮及一氧化氮合酶的影响研究

刘光雄, 杨来启, 王晓峰, 杨喜民, 张彦, 马文涛, 吴兴曲, 王蓉蓉

(解放军第三医院精神科, 陕西 宝鸡 721004)

【摘要】 目的: 探讨寒冷应激(-10℃, 10h)对小鼠脑内一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)的影响及意义。方法: 将40只雄性昆明品系小鼠随机分为对照组和实验组, 每组20只。寒冷应激实验结束后取脑组织检测一氧化氮含量及一氧化氮合酶活性。结果: 对照组NO及NOS分别为 $21.12 \pm 8.68 \mu\text{mol/gprot}$ 、 $2.21 \pm 0.57 \text{U/mgprot}$ 。实验组为 $16.03 \pm 6.98 \mu\text{mol/gprot}$ 、 $2.84 \pm 0.79 \text{U/mgprot}$ 。寒冷应激后NO水平降低并有统计学意义($t=2.58, P<0.05$), NOS活性增高并有统计学意义($t=-2.72, P<0.05$)。应激后NO与NOS呈显著性负相关($r=-0.461, P<0.05$)。结论: 神经递质NO及NOS参与了中枢神经寒冷应激反应, 且NO水平降低、NOS活性增高, 可能对中枢神经细胞主要起保护作用。在寒冷应激后期吸入适量NO可能增强脑神经元对寒冷应激的耐受性。

【关键词】 寒冷; 应激; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 动物

中图分类号: R395.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2001)04-0248-02

The Effect of Cold Stress on Nitric Oxide (NO) and Nitric Oxide Synthase (NOS) in Mice's Brain

LIU Guang-xiong, YANG Lai-qi, WANG Xiao-feng, et al

Department of Psychiatry, The Third Hospital of PLA Baoji 721004, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of cold stress (-10℃, 10h) on NO and NOS in brain of mice. **Methods:** Forty mice were assigned into two groups randomly; The experimental group was the stress group and the other was the control group. The levels of NO and NOS activity were determined after cold stress. **Results:** The level of NO in stress group was significant lower than that in control group ($t=2.67, P<0.05$). NOS activity in stress group was higher than that in control group ($t=-2.65, P<0.05$). Correlation analysis showed that there was a negative relation between NO and NOS ($r=-0.461, P<0.05$). **Conclusion:** The increase of NOS and reduction of NO were possible factors that protected brain in cold stress. It may help to enhance the tolerance of brain to inhale NO in anaphase of cold stress.

【Key words】 Cold; Stress; Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Animals

NO是一种新发现的神经递质。已被证实, NO具有典型的双重作用^[1], 其有利的一面是扩张血管, 增加脑血流量, 阻断N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体的过度兴奋, 进而减轻神经元的兴奋性毒性损害, 对神经元起保护作用, 但过量NO则对神经细胞产生毒性作用。目前, 大多数学者认为, 应激反应是机体受到强烈或有害刺激以后产生的非特异性适应性反应, 其主要特征是交感-肾上腺髓质及垂体-肾上腺皮质功能增强。应激对机体影响十分复杂, 尤其对于神经系统的影响, 已逐渐为人们所认识。在应激状态下, 中枢神经递质也参与反应。有关应激对周围神经NO含量及NOS活性的影响已有文献报道^[2-3], 且结果不一致。寒冷应激对脑内NO影响的报道则较少见。我们以小鼠为实验动物, 测定冷暴露后小鼠脑内NO水平及NOS活性, 探讨寒冷状态下NO对脑神经元所起作用及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物采用雄性昆明品系小鼠, 体重18~24g, 由第四军医大学动物实验中心提供, 共40只, 采用染色法编号, 然后应用随机数字分为实验组、对照组, 每组20只。所有昆明品系小鼠均饲养在实验动物室内, 光照时间8Am~8Pm, 室温20℃, 喂以全价营养饲料, 小鼠自由进食、饮水, 室内通风良好, 无不良刺激。持续饲养7天, 以排除实验前不良刺激可能致体内观察指标变化。

1.2 方法

1.2.1 实验性应激模型 小鼠白天活动较少, 夜间却十分活跃, 互相追逐配种, 忙于觅食饮水^[4], 为排除食物限制致体内观察指标的变化, 实验安排在白天进行。将实验组动物从20℃动物室立即移入-10℃实验环境下, 持续10h。冷暴露时, 限制进食、饮水。对照组同时限制进食, 实验结束后即将两组动物在另一间房断头杀死。由于断颈速度很快, 不会导致强烈的应激反应, 立即分离脑组织, 使用分析天平称重后将其放置于试管中(内含0.9%

的生理盐水), 95℃水浴 10min, 然后再用玻璃匀浆器制成匀浆 4℃条件下 3000r/s 离心 30min。取上清液冷藏待测。

1.2.2 观指指标 NO 的测定方法为比色法, 药盒由第三军医大学临床微生物研究室提供, NOS 的测定方法为酶法, 药盒由南京建成生物工程研究所提供。按说明书同批检测。

1.2.3 统计分析 采用 SPSS 10.0 软件包对数据进行分析。行 t 检验及相关分析。

2 结 果

2.1 对照组与实验组 NO 水平和 NOS 活性比较

由表 1 可见, 应激组 NO 含量低于对照组, 而 NOS 活性则高于对照组, 差异均有显著性 ($P < 0.05$)。

表 1 实验组与对照组 NO 水平及 NOS 活性比较

| | NO ($\mu\text{mol/gprot}$) | NOS (U/mgprot) |
|-----|------------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 21.12 ± 8.68 | 2.21 ± 0.57 |
| 实验组 | 16.03 ± 6.98* | 2.84 ± 0.79* |

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 NO 含量与 NOS 活性相关分析

将实验组 NO 水平与 NOS 活性作相关分析, 结果显示 NO 含量与 NOS 活性呈显著性负相关 ($r = -0.461$, $P < 0.05$)。

3 讨 论

根据 NOS 的功能不同可将其分为固有型 (cNOS) 和诱导型 (iNOS)。通常认为 cNOS 在生理状态下即有活性, 机体通过 Ca^{2+} 水平的控制调节其活性。而 iNOS 则是在病理情况下, 细胞受到某些免疫因子或炎症因子等作用诱导生成。L-Arg 是 NO 的前体物质, 可在 NOS 的作用下产生内源性 NO^[9]。大量实验表明细胞活化时, 细胞外的精氨酸主动向细胞内转移, 以补充细胞内精氨酸的消耗。由于 L-Arg 从细胞外进入细胞内属于主动转运, 所以必然要消耗钠泵 ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 依赖式 ATP 酶) 活动形成的势能储备, 在寒冷应激状态下, 机体能量被大量消耗, 致脑组织细胞内 ATP 减少甚至缺乏, 钠泵活性降低, 导致细胞内 L-Arg 因被消耗而逐步减少, NO

生成量亦减少。据此推测, 在寒冷应激初期可能出现 NO 生成量急增现象, 随后因底物被消耗逐渐减少, 本研究结果提示在寒冷应激 10h 后 NO 生成量已显著减少。在应激状态下, 兴奋性氨基酸及 NMDA 受体也参与反应^[6]。从突触前部释放的兴奋性氨基酸, 结合到突触后膜的 NMDA 受体和其他受体上, 引起膜上的去极化和紧接着 Ca^{2+} 的内流, 使 cNOS 的活性增高。另外, 寒冷应激具有较强的躯体性刺激, 如同水浸、烧伤等可使小鼠体内内毒素、白介素及肿瘤坏死因子明显增高并持续较长时间, 在其不断刺激下 iNOS 活性持续增高。本研究提示寒冷应激 10h 后 NOS 活性显著增高。NO 的生物学作用之一为 NO 通过自身 NOS 的负反馈抑制作用和对 NMDA 受体阻断, 使细胞内钙含量降低, 进而降低 NOS 的活性^[7], 当 NO 生成量减少时, 这种作用减弱, 也是导致小鼠脑内 NOS 活性增高的原因之一。本研究相关分析结果显示 NO 与 NOS 呈现显著性负相关。提示, 在寒冷应激状态下, 神经递质 NO 可能主要起保护脑神经细胞作用。NO 属小分子物质, 可以自由扩散的方式通过血脑屏障进入中枢神经系统发挥其生理作用, 因而在寒冷应激后期吸入适量 NO, 可能会增强脑对寒冷应激的耐受性

参 考 文 献

- 1 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, 12: 626-632
- 2 万军利, 王昌留. 维拉帕米对大鼠浸水应激性胃溃疡的影响. *中国应用生理学杂志*, 2001, 16(1): 79-82
- 3 崔忠敏, 李兆中, 湛先保, 等. 内源性 NO 在应激状态下胃粘膜耐受性细胞保护中的作用. *第二军医大学学报*, 2000, 21(1): 7-9
- 4 施新猷. *医用实验动物学*. 西安: 陕西科技出版社, 1989. 34
- 5 McCall T, Vallance P. Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trends Pharmacol Sci*, 1992, 13: 1
- 6 吴馥梅, 郑元林. 应激对脑功能的影响. *中国神经科学杂志*, 2000, 16(3): 279-281
- 7 张 宏. 一氧化氮与神经系统疾病. *临床神经病学杂志*, 2000, 13(2): 124

(收稿日期: 2001-03-20)

欢 迎 订 阅 《 中 国 临 床 心 理 学 杂 志 》