

敲除诱导性一氧化氮合成酶治疗骨骼肌缺血再灌注损伤的实验研究

张俐 Long-en Chen Anthony V. Seaber James R. Urbaniak
(美国杜克大学医学中心显微骨科实验室)

【摘要】 目的 研究敲除诱导性一氧化氮合成酶治疗骨骼肌缺血再灌注损伤的机制和作用。方法 本实验采用敲除一氧化氮合成酶的小鼠(治疗组)及正常小鼠(对照组)各 21 只,造成去神经游离提睾肌皮瓣完全缺血 3 小时,在荧光显微镜下,活体动态观察该肌肉在恢复血液灌注前后 90 分钟过程中平均微动脉管径的一系列变化,测量灌注前后肌肉的血恢复率,重量比率,并观察其病理变化。结果 (1)在灌注后 10 和 90 分钟,对照组小鼠肌肉的再灌注率分别为(38.7 ±18) %和(63.8 ±50.3) %;而治疗组已达(92.9 ±17.2) %和(108.7 ±25.0) % ($P < 0.001$)。 (2)再灌注 10 分钟时,对照组的平均微动脉管径始终维持在未缺血时的 51.5 %至 57.5 %之间,90 分钟后分别达到(71.6 ±10.9) % (10~20um), (71.2 ±15.1) % (21~40um), (63.4 ±11.2) % (41~70um)。而治疗组再灌注 10 分钟时的平均微动脉的管径即为缺血前的 72 %,90 分钟以后,分别达到(91.8 ±7.8) % (10~20um), (88.2 ±7.6) % (21~40um), (85.4 ±6.6) % (41~70um) ($P < 0.001$)。 (3)缺血 3 小时再灌注 90 分钟后,左、右两侧提睾肌的重量比,对照组为(173.3 ±44.5) %,而治疗组为(116.2 ±7.7) % ($P < 0.01$)。结论 诱导型一氧化氮合成酶的敲除能有效地改善骨骼肌的缺血再灌注损伤,其作用机理可能主要是通过调节血管张力,骨骼肌的血流量,抑制白细胞粘附于内皮细胞表面从而抑制血管壁内皮下细胞增殖及调控缺血后的代谢产物。

【关键词】 一氧化氮; 酶诱导; 再灌注损伤

NOS-2 knockout attenuates ischemia reperfusion injury in mice model ZHANG Li, Long-en Chen, Anthony V. Seaber, et al. Division of Orthopaedic Surgery, Duke University of Medicine

【Abstract】 Objective To evaluate the function of NOS-2 knockout in ischemia/ reperfusion (I/R) injury **Methods** The left cremaster muscles of male mice weighting 20g were isolated and opened on the ventral side via an incision of the scrotum. Three hours of ischemia was achieved by clamping the main vascular pedicle of the isolated muscle and denervation by resecting a 3mm segment of the genitofemoral nerve. Vessel diameter changes in a selected arterial tree containing vessel sizes of 10-70um during reperfusion were measured by using an intravital microscope that connected to a recording and measuring system. Overall blood flow of the muscle was measured by using a laser Doppler flowmetry. Measurements were recorded at 10min intervals a 90min reperfusion period. Weight ratio (% of normal), pathologic features of the cremaster muscle and analysis the difference of the protein components by SDS-PAGE were documented as indexes. **Results** 1) At 10min of reperfusion, the mean blood flow was (38.7 ±18) % of baseline in the control group and (92.9 ±17.2) % in the NOS-2 knockout group ($P < 0.001$). The blood flow increased to (63.8 ±50.3) % in the control group at 90min. In the NOS-2 knockout group, it increased to (108.7 ±25.0) % at 90min of reperfusion ($P < 0.001$). 2) The average diameters of three vessel diameter categories (10-20, 21-40, and 41-70um) in the controls were between 51.5 % to 57.5 % of baseline at 10min of reperfusion ($P < 0.001$) and gradually increased to the maximum level of 71.6 % in 10-20um, 71.2 % in 21-40um, 63.4 % in 41-70um vessels at 90min of reperfusion. In contrast, the diameter in the iNOS gene group sharply increased to 72 % of baseline level at 10min of reperfusion and reached their maximum level to 91.8 %, 88.2 %, 85.4 % (10-20, 21-40 and 41-70um) throughout 90min of observation ($P < 0.001$). 3) The weigh ratio of the muscles differed significantly between these two groups ($P < 0.001$). 4) Pathology slides show that NOS-2 knockout can signifi-

cantly reduce inflammation and neutrophil extravasation. **Conclusion** The data from this study suggest that

- 1) Ischemia/ reperfusion results in an increase of NOS-2 activity and/or production in the reperfused tissues.
- 2) iNOS gene knockout improved microcirculation in the reperfused tissue, thereby reducing reperfusion injury and improving the "no-reflow" phenomenon.

【Key words】 Nitric oxide; Enzyme induction; Reperfusion injury

缺血再灌注损伤常见于器官移植、肢体置换、心梗、筋膜间隔区综合征及中风等。该损伤引起细胞缺血,从而导致组织损伤,此外,灌注必然导致急性炎症引发氧自由基形成,微血管损害及血管内皮渗透性增加等,反过来又进一步导致组织损伤^[1,2]。缺血再灌注损伤中涉及许多免疫组织病理生理过程,诸如代谢反应^[3-5],毛细血管通透性改变^[6-10],中性粒细胞浸润^[11-14],自由基产物堆积^[11,12,15,16],缺氧^[17]和微循环改变等。

最近,一氧化氮作为缺血再灌注损伤的潜在介质已引起普遍关注。一氧化氮由一氧化氮合成酶催化 L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原反应而生成。在组织中,主要有三种酶诱导一氧化氮生成,即:神经型一氧化氮合成酶(nNOS),诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)及内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)。在小鼠、大鼠及人类的神经及成熟的骨骼肌均可表达神经型一氧化氮合成酶^[5,18,19]。而内皮型一氧化氮合成酶主要由内皮细胞表达,已发现大鼠的骨骼肌细胞能够表达该酶^[20]。在急、慢性炎症阶段,诱导型一氧化氮合成酶产生高水平的一氧化氮,但在正常细胞的生理状态下,它的活性显然极低^[21-23]。因此,在许多疾病状态下,包括缺血再灌注损伤,诱导型一氧化氮合成酶在其中起有害的作用。我们前期的研究使用诱导型一氧化氮合成酶的抑制剂证明能够减轻骨骼肌的缺血再灌注损伤^[24],故本研究通过完全敲除一氧化氮合成酶(NOS²⁻),进一步探讨该酶在骨骼肌缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物的选择及模型的建立 实验采用 42 只体重 20~25g 的小鼠,其中 21 只敲除诱导型一氧化氮合成酶(治疗组),21 只为对照组。小鼠来源于 Jackson Laboratory,Bar Harbor, USA,标准饮食及活动。小鼠随机分为三组:第一组 10 只(其中 5 只为 NOS²⁻小鼠,5 只为对照小鼠)用于连续 5 小时测量血压、呼吸、脉搏的变化;第二组 16 只(其中 8 只为 NOS²⁻小鼠,8 只为对照小鼠)用于荧光显微镜下测量肌肉微动脉血管管径的改变;第三组 16 只(其中 8 只为 NOS²⁻小鼠,8 只为对照小鼠)用于激光多普勒测量肌肉的血流恢复率。

1.2 显微手术 无论治疗组还是对照组,显微手术在腹腔注射巴比妥钠全麻醉状态下进行(50mg/kg 体重,来源 Abbott Laboratories,芝加哥)。左侧提睾肌的暴露方法如同先前的研究^[25],将主滋养动脉相伴行的神经切除 3mm 并连续用 33 的林格氏液(来源:Abbott Laboratories)湿润及保鲜膜覆盖以保持肌肉的水份及避免肌表面氧化。另外,加热灯以维持实验动物的体温 37℃ 恒定不变,显微手术结束后 30 分钟方可进行各项血液动力学指标的测定。提睾肌游离皮瓣的完全缺血通过微血管夹夹住唯一的主滋养动脉 3 小时取得。3 小时以后,取出微血管夹开始长达 90 分钟的再灌注。

1.3 观测项目

1.3.1 血压、呼吸、心率的连续观察 第一组 10 只小鼠采用右颈动脉插管连续监测小鼠提睾肌模型建立过程中小鼠的血压、呼吸、心率的变化(监测仪:MR-1300, Mennen Medical, Inc, USA)。

1.3.2 微动脉管径的测量 应用荧光显微镜(Zeiss binocular microscope, Model 473028)及摄录系统(索尼录像机 Model PVM-1343 MD,成像系统,Model EDW-30F)连续动态观察微动脉管径变化。第二组小鼠提睾肌的微动脉管径分别选取三种不同类型(10~20μm, 21~40μm, 41~70μm),每种类型的微动脉摄取 10~20 幅不同图像。缺血前拍摄基础状态,缺血 3 小时后,再灌注 90 分钟过程中每 10 分钟拍摄一次相同位置的图像,以供动态连续分析微动脉管径全过程的变化。

1.3.3 血流的测定 第三组小鼠提睾肌的主滋养动脉血流以激光彩色多普勒方法监测。激光彩色多普勒的探针以固定支架固定(MM33 Dual Holder Tiltbase, Wood Daoc IL),探针以刚好触及观测动脉标记点为准,严防压迫该动脉或距离较远信号丧失。首先监测缺血前的基础血流,同上,缺血 3 小时后,连续灌注的 90 分钟内,每 10 分钟记录一次灌注后血流,以供分析。

1.3.4 病理组织切片 观察结果后,迅速切取各组小鼠的左、右提睾肌(每组取 2 只小鼠),HE 染色,组织切片。

1.3.5 肌肉的湿重比率评估 为观察缺血再灌注损伤引起的骨骼肌水肿情况,血液动力学测试完毕后迅速切取双侧提睾肌,称重,计算左/右肌肉湿重比率。

1.4 动物保护 动物实验的程度严格执行实验动物管理条例及实验规定(National Institutes of Health, NIH publication No. 80~23, revised 1985)。

1.5 统计学处理 所有的统计数据均采用均数±标准差,以配对 t 检验及双因素 ANOVA 统计软件进行。P 值小于 0.05 视为有统计学差异。

2 结果

2.1 血压、呼吸、心率(第一组小鼠) 无论实验组及对照组,整个实验过程的血压、呼吸、心率三大生命体征始终恒定。血压维持在 80~120 毫米汞柱,心率 300~350 次/分。

2.2 微动脉管径的测定及微循环观察(第二组小鼠)

2.2.1 微动脉管径 灌注 10 分钟以后,对照组的平均微动脉管径为基础值的 51.5%~57.5%;90 分钟灌注结束后,平均微动脉管径分别为基础的(71.6±10.9)% (10~20μm), (71.2±15.1)% (21~40μm), (63.4±11.2)% (41~70μm)。而治疗组的平均微动脉管径在灌注 10 分钟以后即为基础值的 72%,90 分钟灌注结束后则更达到(91.8±7.8)% (10~20μm), (88.2±7.6)% (21~40μm), (85.4±6.6)% (41~70μm)。对照组与治疗组经统计学处理,差异十分显著(P<

0.001)。(图 1)

2.2.2 微循环观察 当缺血 3 小时取开血管夹后,对照组小鼠的肌肉比治疗组充血现象严重得多,瘀斑甚至血块形成明显,整个肌肉的颜色为暗红色,无光泽,50%的对照组小鼠在灌流前 30 分钟即出现血流缓慢甚至凝滞不动,而治疗组的所小鼠均完成 90 分钟的再灌注。

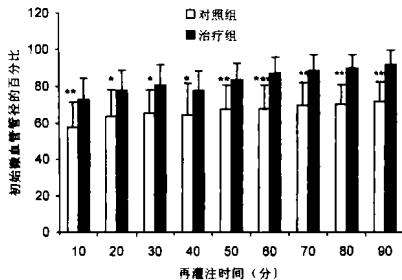


图 1 缺血再灌注后分级血管管径的变化

2.4 肌肉湿重比率评估 缺血 3 小时再灌注 90 分钟后,对照组左右两侧提睾肌的湿重比率为(173.3 ±44.5)%,而治疗组则为(116.2 ±7.7)%(P<0.001)。

2.5 病理组织切片观察 对照组肌肉组织水肿明显,细胞间隙加大,细胞形态压缩、破裂,肌肉坏死明显,中性粒细胞浸润均比治疗组显著。治疗组病理组织切片均见正常的骨骼肌细胞,血管间隙无血栓形成。

3 讨论

本研究主要探讨缺血再灌注过程中诱导型一氧化氮合成酶在去神经骨骼肌中的作用。与对照组比较,治疗组结果提示在缺血再灌注过程中,肌肉的微动脉管径血流、组织坏死程度及水肿情况改善显著。在荧光显微镜下,亦可见诱导型一氧化氮合成酶敲除能显著减轻微血管再灌注损伤,故游离肌肉皮瓣光亮度明显改善,即提示缺血再灌注损伤减轻,进而预示诱导型一氧化氮合成酶可能易诱发微血管的功能性或机械性损害。

实验结果亦提示,缺血再灌注损伤在灌注后 20~30min 尤为明显,50%的对照组小鼠甚至出现“无复流”现象^[1]。

一些文献报道,骨骼肌缺血再灌注损伤的病理生理过程与许多因素直接相关,目前提出的最新学说为由于一氧化氮代谢产物增高导致微循环水平血管通透性增大所致。3 小时的缺血损害导致骨骼肌再灌注过程中肌肉水肿、出血和血管受压^[10],另外,局部组织高浓度的一氧化氮亦可引起离子通道改变,肌浆膜电位破坏,细胞膜泵功能及酶的活性抑制,同时诱 DNA 受损^[11,26],这些过程使已经发生水肿的组织损伤更为严重,因此,在炎症过程中,可见高浓度的一氧化氮^[22,23],从而提示一氧化氮代谢产物是决定炎症情况关键的一步。

综上所述,一氧化氮形成中起关键作用的诱导性一氧化氮的合成酶是众多炎症病症的潜在致病酶,本研究提示其在缺血再灌注损伤中的媒介作用。另一些研究通过阻断一氧化氮合成酶蛋白在荧光显微镜下成功地看到组织损伤的减轻^[26],氧化酶的出现与中性粒细胞浸润相关^[27]。因此,本研究提示阻断一氧化氮合成酶能够减轻白细胞聚集^[28];进一步

2.3 血流测定(第三组小鼠) 在缺血再灌注 10 分钟以后,对照组提睾肌滋养动脉血流为基础值的(38.7 ±18)%,而治疗组则达到基础值的(92.9 ±17.2) %。缺血再灌注 90 分钟以后,对照组的血流逐渐增至(63.8 ±50.3) %,而治疗组则在 20 分钟即恢复至基础水平(108.7 ±25.0) %直至灌注结束(P<0.001)。(图 2)

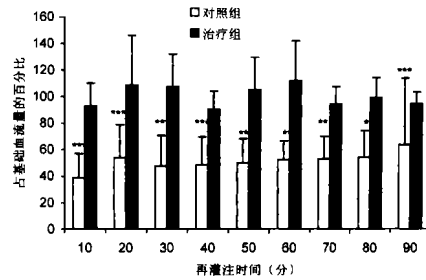


图 2 缺血再灌注后的血流量的变化

提示诱导型一氧化氮合成酶亦是白细胞聚集的自身反应调节机制。

另外,诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)蛋白成分,能够充分激活细胞,比结构型一氧化氮合成酶(cNOS)含量高,这样,细胞毒性通常与 iNOS 相关,而与其它两种 cNOS 关系不大(可能在大脑损伤中例外)^[29]。前期的研究工作我们所使用失神经及留神经骨骼肌模型,发现高效选择性的 iNOS 抑制剂 1400W 能够显著改善缺血再灌注过程中的血流,减轻血管痉挛和肌肉水肿^[24]。但 1400W 是一种 iNOS 高效抑制剂,亦作用于 cNOS。目前的研究使用 iNOS 敲除的小鼠,排除了同时作用于其它 NOS 的可能性,使研究结果更加单一,作为对照组的 C57BL/67 小鼠与基因敲除的小鼠有相同的基因背景,因此,该研究的设计更加科学及严密。

因为缺血再灌注损伤的异型性及部分逆转性,目前尚未有理想的方法精密地估算这个过程及所需的时间。本实验使用荧光显微镜直接动态观测此过程微动脉的管径及用激光彩色多谱勒经典间接测定整个肌肉的血液情况,两监测系统互为补充为的是更为精确地反映损害的程度及诱导型一氧化氮合成酶蛋白的介入影响。两种测试方法各有长短,荧光显微镜测量微动脉管径使我们能够观察整个缺血再灌注过程中微循环的血液动力学改变,但所观察的区域仍有局限,所以我们选取一定数的不同直径的微动脉进行测量旨在于此。使用激光彩色多谱勒测试法的好处在于它能及时反映整个肌肉在再灌注过程中的血运情况,然而,由于该方法间接测量血细胞的移动,外界因素常可影响测量结果。因此,要求接受测试的对象全麻、完全静止不动,激光探头与测试血管的位置在整个监视过程中不变,测试位置须标记等等。

总之,临床经验告诉我们,缺血局部血液的迅速回流、灌注滋养能够减少缺血再灌注损伤,然而,回流的血液及伴随的再灌注损伤可能导致进一步的细胞损害和继发的缺血,更严重地造成危害。在缺血再灌注过程中,若修改再灌注的成分,包括抗氧化原、足够的氧分压、特别的长、短效单克隆抗体、合适温度、渗透性和 pH 值都可以提供好处,减轻该损伤。使用诱导型一氧化氮合成酶敲除的小鼠,我们从另外一个意义证

实诱导型一氧化氮合成酶导致骨骼肌缺血再灌注损伤及作用机理。

(致谢:感谢美国医学生 Colin Looney 及 Richard R Glisson 博士的大力支持与帮助。)

参考文献

- Allen D, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Pathophysiology and related studies of the no reflow phenomenon in skeletal muscle. Clin Orthop Rel Res, 1995, 314:122-133.
- Haimovici H. Metabolic complications of acute arterial occlusions and skeletal muscle ischemia: myonephropathicmetabolic syndrome. In: Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, et al. Haimovici's Vascular Surgery. chap 40. Cambridge:Blackwell Science, 1996. 509-530.
- Chen LE, Gu YD, Wu MM, et al. Effects of ischemia on metabolism and biochemistry of the striated muscle in rabbit (experimental study). Chin J Orthop, 1987, 7:56-59.
- Chen LE, Zhong CH, Gu YD, et al. Ultrastructural changes of striated muscle after ischemia (experimental study). Chin J Microsurg, 1986, 9:36-38.
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, et al. Nitric oxide in skeletal muscle. Nature, 1994, 372:546-548.
- Gidl A, Lewis DH. The relation of the post-ischemic reperfusion impairment to the severity of ischemia in the tibialis anterior. Int J Microcirc Clin Exp. 1990, 9:187-203.
- Rosen HM, Slivjak MJ, McBrearty FX. The role of reperfusion washout in limb revascularization procedures. Plast Reconstr Surg, 1987, 80:595-605.
- Suval WD, Hobson RW, Boric MP, et al. Assessment of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle by macromolecular clearance. J Surg Res, 1987, 42:550-559.
- Grossfeld S, Firrel JC. The effect of deferamine on ischemic changes in rat skeletal muscle a preliminary study. J Invest Surg, 1992, 5:375-381.
- Urbaniak JR, Seaber AV, Chen LE. Assessment of ischemia/reperfusion injury. Clin Orthop Res, 1997, 334:30-36.
- Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, et al. Accumulation of Polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental myocardial ischemia. Am J Physiol, 1986, 251:93-100.
- Smity JK, Grisham MB, Granger DN, et al. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol, 1989, 256:789-793.
- Walden DL, McCutchan HJ, Enquist EG, et al. Neutrophils accumulate and contribute to skeletal muscle dysfunction after ischemia-reperfusion. Am J Physiol, 1990, 259:1809-1812.
- Akimitsu T, Gute DC, Korhuis RJ. Leukocyte adhesion induced by inhibition of nitric oxide production in skeletal muscle. J Appl Physiol, 1995, 78:1725-32.
- Lindsay T, Walker PM, Mickle DAG, Romaschin AD: Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia-reperfusion in canine skeletal muscle. Am J Physiol, 1988, 254:578-583.
- Walker PM, Lindsay TF, Labbe R, et al. Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers. J Vasc Surg, 1987, 5:68-75.
- Wright JG, Fox D, Kerr JC, et al. Regional hypothermia protects against ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis muscle. J Trauma, 1988, 28:1026-1031.
- Frandsen U, Lopez-Figueroa M, Hellsten Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 227:88-93.
- Tews DS, Goebel HH, Schneider I, et al. Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. J Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56:1283-1289.
- Lester K, Bradley S, Jean-Luc B, et al. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 211:65-66.
- El-Dwairi Q, Comtois A, Guo Y, et al. Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. Am J Physiol, 1998, 770:779.
- Boczkowski J, Lanone S, Ungureanu-Longrois D, et al. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. J Clin Invest, 1996, 98:1550-1559.
- Thompson M, Becker L, Bryant D, et al. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. J Appl Physiol, 1996, 81:2415-2420.
- Zhang L, Chen LE, Seaber AV, et al. iNOS inhibitor 1400W improves microcirculation of denervated cremaster muscle following ischemia/reperfusion. Surgical Forum Abstract. CODE # XI576. 86th Clinical Congress of Surgeons. Chicago, IL, October, 2000. 22-27.
- Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Vasodilator action of prostaglandin E1 on microcirculation of rat cremaster muscle. Microsurg, 1990, 11:204-208.
- Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free Radic Res, 1999, 31:577-596.
- Formigli L, Lombardo LD, Adembri C, et al. Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia reperfusion syndrome. Hum pathol, 1992, 23:627-634.
- Parrino PE, Laubach VE, Gaughen JR, et al: Inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial ischemia increases coronary flow. Ann Thorac Surg, 1998, 66:733-739.
- Klaus D, Kroncke, Karin Fehsel, Victoria Kolb-bachofen. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? Biology and Chemistry, 1997, 1:107-120.

(收稿:2001-11-06 编辑:房世源)

中国中医研究院望京医院骨伤科进修招生通知

中国中医研究院望京医院(中国中医研究院骨伤科研究所)为国家中医药管理局批准的全国中医骨伤专科医疗中心,全院共有骨伤科床位近 300 张,开设创伤、脊柱、骨关节、矫形及推拿等专科;骨伤科高级专业技术职称人员 40 余名,其中博士生导师 8 名,硕士生导师 15 名,具有雄厚的骨伤科临床、教学与科研能力,是全国中医骨伤科培训基地。我院骨伤科每年招收两期进修生,每期半年或一年,每周均有专科或知名专家授课。欢迎全国各地中医骨伤科医师来我院进修学习。

地址:北京市朝阳区花家地街中国中医研究院望京医院 医务处

邮编:100102 电话:(010)64721263 传真:(010)64725425 联系人:苏霞