

## · 药理 ·

## 二乙基二硫代氨基甲酸钠对沙土鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

李 飒\* 李万亥 陶学斌 陈东明\* 陈 洁

(第二军医大学药学院中西药研究室 上海 200433)

**摘要** 蒙古沙土鼠脑缺血 60min 后,脑组织能量物质 ATP、ADP 明显下降,且有可检测的次黄嘌呤(HX)产生;氧自由基含量有上升趋势。再灌注 5min 时,氧自由基(OFR)含量显著增加;灌注 30min 时,ATP、ADP 有所回升,HX 降至无法检测,OFR 降至缺血组水平。脑缺血 180min 再灌注 60min,神经细胞坏死,组织肿胀,动物死亡率达 85%。缺血前 15 min iv DTC  $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,ATP 恢复较再灌注组更明显;神经细胞及组织肿胀均有明显改善;动物死亡率降至 50%。提示黄嘌呤氧化酶途径可能是脑内氧自由基产生的重要途径,而 DTC 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

**关键词** 二乙基二硫代氨基甲酸;三磷酸腺苷;氧自由基;沙土鼠;脑缺血再灌注损伤

### Protective effects of sodium diethyldithiocarbamate on ischemia-reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbil

Li Sa, Li Wanhai, Tao Xuebin, Chen Dongming, Chen Jie

(Department of Natural and Synthetic Drug Research,

College of Pharmacy, Second Military Medical University Shanghai 200433)

**ABSTRACT** Brain injury in Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) was induced by occluding bilateral common carotid arteries followed by reperfusion. Levels of ATP, ADP and HX in gerbil brain measured by HPLC method were decreased and increased significantly respectively after 60 min cerebral ischemia. The level of oxygen free radicals (OFR) measured by electron spin resonance (ESR) were increased significantly only at 5-min reperfusion. DTC, iv  $50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  15 min before occlusion, increased level of ATP and ADP in brain, reduced edema of neuron and tissue of brain and decreased the level of OFR in 5-min reperfusion group and the mortality of gerbil to 50% as dexame thasone did in the reperfusion group. The results suggested that DTC had protective effects on ischemia-reperfusion induced gerbil brain injury. The OFR in gerbil brain may be formed mainly by the route of xanthine oxidase.

**KEY WORDS** diethyldithiocarbamate, adenosine triphosphate, oxygen free radicals, Mongolian gerbil, ischemia-reperfusion-induced brain injury

动物脑缺血再灌注期脑功能的恢复必须以能量代谢至少部分恢复为前提<sup>[1]</sup>。本室以

\* 广州市第一军医大学南方科研药厂,510515

往的工作<sup>[2]</sup>提示: diethyldithiocarbamate (DTC)在体内能清除氧自由基,保护 Mn-SOD 的活性,减少丙二醛(MDA)产生。本文以能量代谢物质、动物死亡率和形态学检查为指标,进一步探讨 DTC 对脑缺血再灌注损伤的保护作用及机理。

### 一、材料与方法

(一)试药 DTC 系本院中西药研究室合成( $mp 94\sim 96^{\circ}C$ ),临用前配成所需浓度;地塞米松,上海第九制药厂产品;ATP,ADP 及 HX,美国 Sigma 公司产品;其余试剂全部为国产 AR 级。

(二)缺血再灌注模型 蒙古沙土鼠,雌雄不拘,体重  $56\pm 7g$ 。乙醚吸入麻醉后,ip10%乌拉坦  $1.25g/kg$ ,5~10min 后,分离双侧颈总动脉,气管插管,并用动脉夹夹闭双侧颈总动脉,造成脑缺血 60min,打开动脉夹灌注 30min。动物分为对照组,缺血组,再灌注组和给药组。给药组在缺血前 15min iv DTC  $50mg\cdot kg^{-1}$ ,缺血 60min,再灌注 60min。

(三)ATP、ADP 及 HX 的测定<sup>[3-5]</sup> 称取标本  $50mg$  加入  $0.3mol\cdot L^{-1}$  高氯酸  $0.5ml$  在冰浴中研磨 3min,吸出并追加高氯酸至标本量的二倍,冰浴中放置 7min,  $0\sim 4^{\circ}C$  下 3000 rpm 离心 10min,吸出上清液,加入  $0.2mol\cdot L^{-1}KOH$  与  $HClO_4$  等量,调 pH 至 7.4,  $0\sim 4^{\circ}C$  下 3000rpm 离心 15min,取上清液经过  $0.45\mu m$  过滤器过滤,然后依 HPLC 法测定,外标法定量。分析柱  $15cm\times 0.5cmID$ ,内装 Lichrosorb RP-185 $\mu m$ ;流动相为甲醇-磷酸缓冲液(pH 6.5),流速  $1ml\cdot min^{-1}$ ;检测波长 254nm;灵敏度 1.0aufs;进样量  $20\mu l$ 。

(四)OFR 的测定<sup>[6]</sup> 取脑组织  $300mg$ ,迅速装入内径 3mm,长 30mm 的塑料吸管中,并立即置液  $N_2$  中保存待测。测定时,取

样品立即放入装有液  $N_2$  的石英杜瓦瓶(真空保温瓶)里,用 Bruker ER 200D-SRC 型电子自旋共振 ESR 仪记录样品 77K 温度下的电子自旋共振谱。微波功率为 10mW;微波频率为 9.30Hz;磁场扫描为 50G;磁场调制 5G;时间放大  $8\times 10^5$ ;时间常数 200ms。

(五)动物死亡率 实验用沙土鼠分为三组,缺血再灌注组,地塞米松组和 DTC 组。缺血时间为 3h,再灌注时间为 1h。地塞米松和 DTC 的剂量分别为  $5mg\cdot kg^{-1}$  和  $50mg\cdot kg^{-1}$ ,观察沙土鼠在缺血再灌注期间的死亡率。

(六)形态学检查 沙土鼠分三组,正常对照组,缺血再灌注组和 DTC( $50mg\cdot kg^{-1}$ )组。缺血时间 3h,再灌注时间 1h。实验结束后,取全脑,左右半球分开,磷酸盐缓冲溶液(PBS)漂洗,放入 10%中性福尔马林溶液固定 6~8h,脱水后石蜡包埋,切片厚 5mm,苏木精和曙红(HE)染色,光镜观察。

### 二、结果

(一)DTC 对 ATP,ADP 及 HX 的影响 脑缺血 60min 后,脑组织能量物质 ATP 和 ADP 显著降低( $P<0.01$ ),同时出现可检测的 HX。再灌注 30min 后,ATP 和 ADP 有所回升( $P<0.01$ ),而 HX 则降至不能检出。iv DTC  $50mg\cdot kg^{-1}$ ,ATP 回升较再灌注组更为明显( $P<0.05$ ),ADP 则无明显变化,HX 同样不能检出,见表 1。

(二)DTC 对 OFR 的影响 脑缺血 60min 后,OFR 有上升趋势,但无统计学意义。再灌注 5min 后,OFR 含量显著增加( $P<0.01$ ),近正常组织二倍。再灌注 30min 时,OFR 含量又降至接近缺血组。缺血前 15min iv DTC  $50mg\cdot kg^{-1}$ ,再灌注 5min 时,OFR 含量较对照再灌注组显著降低( $P<0.01$ ),见表 2。

表 1 DTC 对缺血再灌注脑组织 ATP,ADP 及 HX 水平的影响( $\bar{X}\pm S$ )

Group	n	ATP( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )	ADP( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )	HX( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Control	8	0.7568 $\pm$ 0.1463	0.7330 $\pm$ 0.086	N
Ischemia	8	0.1694 $\pm$ 0.0495**	0.2687 $\pm$ 0.1124**	0.1596 $\pm$ 0.1127**
Reperfusion 30-min	9	0.5570 $\pm$ 0.1120**	0.5908 $\pm$ 0.1308**	N
DTC( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )50	8	0.6809 $\pm$ 0.1184 <sup>§</sup>	0.5635 $\pm$ 0.2086	N

\*\*  $P < 0.01$  vs control group. \*\*  $P < 0.01$  vs ischemia group. <sup>§</sup>  $P < 0.05$  vs reperfusion group. N=No detectable

表 2 DTC 对缺血再灌注脑组织 OFR 的影响( $\bar{X}\pm S$ )

Group	n	ESR signal intensity ( $\text{cm}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Control	7	7.2 $\pm$ 1.4
Ischemia	8	8.4 $\pm$ 1.3
Reperfusion		
5min	7	12.9 $\pm$ 1.9**
30min	7	8.4 $\pm$ 1.8
DTC/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		
50(5 min)	6	5.6 $\pm$ 0.8**

\*\*  $P < 0.01$  vs ischemia group. \*\*  $P < 0.01$  vs reperfusion group.

(三)DTC 对沙土鼠死亡率的影响 动物缺血 3h 再灌注 1h 期间的死亡率为 85%，给予 DTC ( $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 或地塞米松 ( $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 后，死亡率均降为 50% ( $P < 0.05$ )，如图 1。

(四)DTC 对组织形态的影响 对照组 ( $n=8$ ) 脑组织结构正常，大脑皮层锥体细胞分层清楚，排列较整齐，神经细胞多呈锥形或三角形，突起细长且明显，胞浆中尼氏小体密集，色深，中心器小。实质内毛细血管与小静脉周围间隙较窄 ( $D \leq 10\text{mm}$ )。缺血再灌注组 ( $n=10$ ) 脑皮层锥体细胞分布欠均匀，部分细胞肿胀，变圆，突起变短或消失，中心尼氏小体大部分溶解消失，毛细血管与小静脉充血 ( $5/10^{++}$ ,  $5/10^{+}$ )。血管周围间隙较正常组宽 ( $4/10 > 30\text{mm}$ ;  $4/10 > 15\text{mm}$ ;  $2/10 \leq 15\text{mm}$ )，少数并见有灶性脱髓鞘现象。DTC 组 ( $n=10$ ) 大脑皮层锥体细胞的改变较缺血再灌注组稍有改善，毛细血管和小静脉扩张

充血程度以及血管周围间隙有一定的改善，水肿程度亦较缺血再灌注组轻 ( $3/10 > 15\text{mm}$ ;  $7/10 \leq 15\text{mm}$ )。

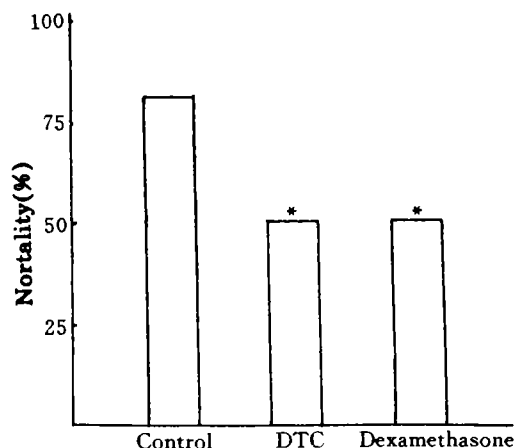


图 1 DTC 对缺血再灌注期沙土鼠死亡率的影响

动物数:对照组 13, DTC 组 10, 地塞米松组 10

与对照组比较: \*  $P < 0.05$

### 三、讨论

脑缺血再灌注损伤的确切机理比较复杂，活性氧自由基体系的氧化对该损伤的发生发展可能起着最重要的作用<sup>[7,8]</sup>。脑内氧自由基产生的途径较多，线粒体呼吸链机制为其中之一<sup>[9]</sup>。线粒体内的  $O_2$  由于不能被迅速清除而增多，致使线粒体功能结构受损伤，这可能是线粒体呼吸链在再灌注过程中不能有效恢复 ATP 合成的原因之一。另外，黄嘌呤氧化酶途径也是体内氧自由基生成的一个重要来源<sup>[10]</sup>。本研究发现，缺血时，脑组织内生成了可检测的 HX，OFR 有上升趋势，尤其是再灌注 5min 时，OFR 含量显著升高。再灌注

30min 后, HX 又降至难以检测, OFR 降至接近缺血组。这种 HX 浓度与 OFR 含量的相关性变化证明了脑血管内皮细胞内黄嘌呤氧化酶催化次黄嘌呤生成氧自由基的途径可能是脑内氧自由基产生的一条重要途径。

本研究证明, DTC 在体内具有清除自由基作用, 使缺血脑组织内能量物质得到进一步恢复, 延缓缺血脑组织由可逆转化为不可逆损伤的病理过程, 减轻线粒体的损伤程度, 降低脑缺血再灌注损伤引起的动物死亡率, 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

(本文中的脑组织形态观察研究, 得到基础部病生教研室戴益民教授的协助和指导, 特致谢意)。

参考文献

[1] Hossmann KA, Kleihues P. Reversibility of ischemic brain damage. Arch Neurol, 1973, 29: 375  
 [2] Chen DM, Li WH, Xu BX, Tao XB, C. sm J, Effects of sodium diethyldi-thiocarbamate on ischemia-reperfusion-induced injury in Mongolian gerbil, Acta Pharmacol Sin, 1994, 15(5): 469  
 [3] 胡天喜, 陈杞, 陈克明, 徐馥本著. 发光分析与医学. 上海: 华东师范大学出版社, 1990: 144

[4] 韩庆宏, 张乃忠, 王风茹等. 反相高效液相色谱法测定肿瘤细胞腺苷酸. 色谱, 1989, 7(6): 377  
 [5] Cunha RA, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Separation of adenosine triphosphate and its degradation products in innervated muscle of the frog by reverse phase high-performance liquid chromatography. Chromatographia, 1989, 28(11/12): 610  
 [6] Swartz HM. Cells and tissues. In: Swarta HM, Bolton JR, Borg DC, editors. Biological application of electron spin resonance. New York: Wiley-interscience, 1972: 155-95.  
 [7] McCord JM. "Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury." New Engl J Med, 1985; 312: 159  
 [8] Helmut S. Biochemistry of oxidative stree. 自由基生物学与医学学术会议资料. 中国生物物理学会 1988; P26-40  
 [9] Denopules HB. In: Popp AJ, editor. Neurol Trauma. New York: Raven, 1979: 63  
 [10] Abd-Elfattah AS, Jessen ME, Lekven J, Doherty NE, Brunsting LA, Wechsler AS. Myocardial reperfusion injury: Role of myocardial hypoxanthine and xanthine in free radical-mediated reperfusion injury. Circulation, 1988; 78(suppl 1): 1-224-1-235

## 应用 Fura-2/AM 测定大鼠肝细胞内钙离子浓度

吴笑春 崔海影

(广州军区武汉总医院 武汉 430070)

钙是人体含量最丰富的元素之一, 广泛分布于细胞和体液中, 它在生命活动的各种生理、生化反应和疾病的发生、发展中起着极其重要的作用。欲确切地分析  $Ca^{2+}$  在生命活动中的作用, 就必须准确地测量细胞内  $Ca^{2+}$  的浓度 ( $[Ca^{2+}]^*$ )。

本文介绍应用国广 Fura-2/AM 测定大鼠肝细胞  $[Ca^{2+}]^*$  的方法。

Fura-2 测定  $[Ca^{2+}]^*$  的原理是 Fura-2 的结构(图 1)类似于四羧酸的  $Ca^{2+}$  螯合剂

EGTA, 能以 1:1 的比例特异性地与  $Ca^{2+}$  结

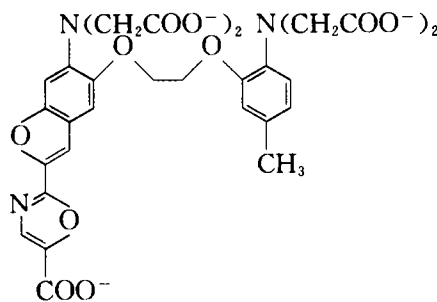


图 1 Fura-2 的结构

合, 与 EGTA 不同的是 Fura-2 可发出荧光,