

不同类型脑血管狭窄患者血清中的 NO 含量及 NOS 活性

梁建涛 王振宇

摘要 目的 研究不同脑血管患者血清中血管活性因子 NO 含量及 TNOS/iNOS 活性的变化,分析这几种因素在脑血管狭窄中的可能作用机制。方法 通过生化分析检测血清中一氧化氮(NO)的含量及组织型一氧化氮合酶(TNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性。结果 血清 NO 及 TNOS 和 iNOS 的检测发现,混合组($P=0.000$)和 MCA 组($P=0.001$)血清总的 NO 含量显著增高;颅内组($P=0.004$)和 MCA 组($P=0.002$)血清 iNOS 活性显著增加;颅内组血清 TNOS 活性显著减弱($P=0.032$),混合组($P=0.011$)和 MCA 组($P=0.018$)TNOS 活性显著增加。结论 多种相关因子的参与是目标人群某些类型脑血管狭窄发生机制的重要组成部分。这为寻找脑血管狭窄的多因素多环节作用机制提供了坚实的理论基础。

关键词 脑血管狭窄 动脉粥样硬化 一氧化氮 一氧化氮合酶

Serum NO and NOS in Different Kinds of Cerebral Vascular Stenosis. Liang Jiantao, Wang Zhenyu. The Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China

Abstract Objective To search for the mechanism of NO and TNOS/iNOS in cerebral vascular stenosis, the changes of these serum factors in different kinds of cerebral vascular stenosis were studied. **Methods** Biochemistry assays were adopted, to analyze serum NO and TNOS/iNOS in different vascular stenosis group. **Results** Serum NO contents of 'Mix' ($P=0.000$) or 'MCA' ($P=0.001$) significantly increased. iNOS activity of 'In' ($P=0.004$) and 'MCA' ($P=0.002$) markedly increased. And TNOS activity of 'In' group significantly weakened ($P=0.032$), but the TNOS activity of 'Mix' ($P=0.011$) and 'MCA' ($P=0.018$) group markedly intensified. **Conclusion** NO and TNOS/iNOS partly participate in the occurrence mechanism of cerebral vascular stenosis. And the study provided theory basis for studying multiple factors of cerebral vascular stenosis.

Key words Cerebral vascular stenosis; Atherosclerosis; NO; NOS

脑血管狭窄与动脉粥样硬化患者体内有严重的炎症水平,而炎症反应则有多种炎性因子的共同参与。过去 10 年的研究结果指出神经元的信息交流、血管调节和免疫反应均可受到一氧化氮(nitrogen monoxidum, NO)这一简单化学分子的调节。NO 的生物学效应也早已引起医学界的关注^[1],它是内皮源性松弛因子(endothelin-derived relaxing factor, EDRF),此外,一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)是其生成的主要限速因素。在人体内有两大类 3 种 NOS:组织型 NOS(TNOS),包括内皮型 NOS(eNOS)和神经元型 NOS(nNOS);诱导型 NOS(iNOS)。NOS 广泛分布于多种细胞、组织和器官,影响到几乎所有重要生理功能^[2],同样也可参与炎症反应的发生并影响疾病过程中的细胞状态。

已知在大脑中,NO 作为神经递质可介导多方面的学习和记忆功能。而在自主神经系统中,NO 是一种主要的非胆碱能非肾上腺素能(non-adrenergic non-cholinergic, NANC)的神经递质^[3],可以使得脑血液循环中血管平滑肌细胞松弛。如果 TNOS 的活性显著下降就会导致多种病理生理过程的发生。既然 NO 正常情况下是一生理性神经递质,那么由 nNOS 过度活化产生的过量 NO 会间接的损害到脑组织。作为一种自由基,NO 本身可通过损害关键酶并和超氧化物共同作用来介导细胞毒性,甚至形成潜在的氧化剂——过氧化亚硝酸盐。为了探寻脑血管狭窄患者体内 NO 及 NOS 的含量并分析它们是否参与相应疾病的发生过程,我们采用生化方法对不同类型的脑血管狭窄患者血清进行了检测。

材料与方 法

1. 研究对象:2008 年 7 月 19 日~10 月 31 日期间,从宣武医院神经外科缺血组共取得经 DSA 证实的脑血管狭窄患者

作者单位:100083 北京大学第三医院神经外科(梁建涛、王振宇);北京,首都医科大学宣武医院神经外科(梁建涛)

通讯作者:王振宇,电子邮箱:byxwl@yahoo.cn

血样 123 份,按血管狭窄部位分为:颅内狭窄(In)、颅外狭窄(Out)、颅内、外混合狭窄组(Mix)及单纯大脑中动脉狭窄组(MCA)^[4]。同期从宣武医院根据 DSA、MRA、TCD 及颈部血管超声排除颅内外动脉狭窄的对照人群(Control)的血样 38 份,年龄在 44~67 岁之间。对各组间的年龄、性别比例、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病进行组间匹配后剔除部分样本,以消除这些因素带来的误差。

2. 取材:室温无菌采集 4ml 肝素抗凝血 1000r/min。室温离心 10min;EP 管中加入 Cocktail 蛋白酶抑制剂(1.25mmol/L)5 微升/支;取上清 1ml 分两支(500 微升/支)冻存于 -80℃。

3. NO 及 NOS 测定:试剂盒购自南京建成生物制品公司。NO 测定:采用硝酸酶还原法——NO 化学性质活泼,体内代谢很快转为 NO₂⁻ 和 NO₃⁻,而 NO₂⁻ 又进一步转化为 NO₃⁻,利用硝酸还原酶特异性将 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻,通过显色深浅测定其浓度的高低。NOS 测试:化学比色法——NOS 催化 L-

Arg 和分子氧反应生成 NO,NO 与亲和性物质生成有色化合物,在 530nm 波长下测定吸光度,根据吸光度的大小可计算出 NOS 活力。另外根据对钙的依赖与否可分型。步骤严格按说明书进行。

4. 统计分析:所有统计资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计分析。统计方法:各组之间先进行 Oneway - ANOVA 分析,观察是否存在组间差异,之后在软件中再选择 LSD 检验。所有资料在分析之前进行方差齐性检验。

结 果

1. 血清 NO 含量统计分析:各组血清 NO 含量数据统计结果见表 1,对血清 NO 含量进行 SPSS11.5 Oneway - ANOVA(单因素方差分析)分析后,再进行组间两两分析比较。

表 1 血清 NO 含量(μmol/L)

项目	对照组(CONTROL)	颅内组(IN)	颅外组(OUT)	混合组*(MIX)	MCA 组*(MCA)
样本数	33	26	30	27	25
$\bar{x} \pm s$	72.34 ± 12.343	69.51 ± 14.795	70.26 ± 15.695	87.78 ± 19.204	86.56 ± 20.435

*表示相应狭窄组与对照组相比有显著性差异,混合组与对照组间比较 $P=0.000$;MCA 组与对照组间比较 $P=0.001$ 。另外,混合组与 MCA 组显著高于对照组、颅内及颅外组($P=0.000$)

2. 血清 TNOS 活性统计分析:各组血清 TNOS 活性数据统计结果见表 2,分析同前。

表 2 血清 TNOS 活性(U/ml)

项目	对照组(CONTROL)	颅内组*(IN)	颅外组(OUT)	混合组*(MIX)	MCA 组*(MCA)
样本数	33	26	30	27	25
$\bar{x} \pm s$	17.251 ± 2.446	15.778 ± 2.928	17.253 ± 2.510	18.987 ± 2.678	18.884 ± 2.334

*表示对应狭窄组与对照组相比有显著性差异,颅内组与对照组间比较 $P=0.030$;混合组与对照组间比较 $P=0.011$;MCA 组与对照组间比较 $P=0.018$,经两两比较后,对照组与颅外组无差异,但颅内组显著低于其他组,而 MCA 组、混合组均显著高于颅外组($P<0.05$)

3. 血清 iNOS 活性统计分析:各组血清 iNOS 含量数据统计结果见表 3,分析同前。

表 3 血清 iNOS 含量(U/ml)

项目	对照组(CONTROL)	颅内组*(IN)	颅外组(OUT)	混合组(MIX)	MCA 组*(MCA)
样本数	33	26	30	27	25
$\bar{x} \pm s$	12.23 ± 2.299	14.12 ± 2.977	12.15 ± 2.122	12.19 ± 2.207	14.29 ± 2.742

*表示相应狭窄组与对照组相比有显著性差异,颅内组与对照组间比较 $P=0.004$;MCA 组与对照组间比较 $P=0.002$ 。另外,经两两比较后,对照组与颅外组及混合组无差异,但颅内组和 MCA 组显著高于对照组($P<0.05$)

4. 血清 NO 含量及不同亚型 NOS 活性的比较:以对照组血清 NO 含量和 NOS 活性为 1 时,其他组与对照组相比的相对含量如图 1 所示,从图中可见对照组与颅内外组的血清 NO 含量无显著性差异($P>0.05$),而混合组和 MCA 组均显著高于其他 3 组(P

<0.05)。颅外组的组成型及诱导型 NOS 活性与对照相比均无显著性差异($P>0.05$);而颅内组的 TNOS 显著低于对照组,iNOS 活性却显著强于对照组。混合组的 iNOS 无变化,TNOS 显著增高,而 MCA 组两种 NOS 活性均显著增强。

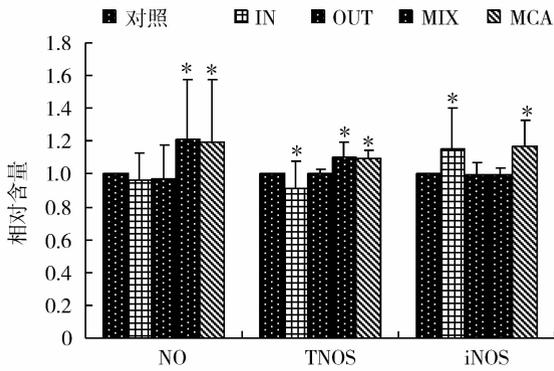


图1 各组间血清NO含量及不同亚型NOS活性比较
*与对照组相比, P < 0.05

讨 论

实验中我们对不同血管狭窄组血清中NO含量及NOS活性进行了生化分析。已知正常含量的eNOS(组成型)可起到抗炎作用,抑制血小板黏附、聚集,并且阻止平滑肌细胞的扩增和迁移^[5]。如果局部血管内皮受到损伤,降低了对NO的生物利用率,相对多余的NO则可能会参与到动脉粥样硬化等血管性疾病的发病机制中。研究中发现,NO及NOS没有因为颅外血管狭窄而发生显著变化,提示NO可能不参与颅外血管狭窄的病理过程。但是MCA组中,不论组成型还是诱导型NOS的含量均表现出显著增高的结果,从而使得NO含量也显著增加。提示脑组织可能会受到两种来源过量NO分子的双重损害作用。也就是一方面可能会间接引起脑缺血发作,另一方面MCA组中的炎症反应也较为强烈。如果患者感染了细菌或病毒,这些病原微生物的产物如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可诱导iNOS的合成,反过来iNOS会促发产生大量的NO,这样的NO不仅对细菌病毒有害,而且会损伤到宿主细胞^[6,7]。

炎症反应中炎性细胞因子与NOS之间也可能存在某种联系,影响着动脉粥样硬化的发生发展^[8]。混合组中TNOS血清含量增高显著,而iNOS没有显著性改变,因此提示显著增高的NO主要来自TNOS参与的酶促反应过程。颅内组虽然TNOS和iNOS的含量均发生变化,但是由于它们是不同的方向的改变,因而虽然从结果中看不出NO的显著变化,但也提示由iNOS酶促产生的NO增加,可能会导致炎症反应增强。有研究表明少量不对称的二甲基精氨酸(ADMA)可通过抑制iNOS,在动脉粥样硬化炎症反应发生中起到一定保护作用,但过度的iNOS促使产生的NO在炎症中起到了细胞毒性作用^[9]。而且,ADMA

还可抑制eNOS在动脉粥样硬化中担任重要的角色,使得血管持续处于舒张状态,影响血流的灌注。颅内组由TNOS酶促产生的NO降低,导致结果中看不到NO总量的变化。这也提示虽然NO检测结果的无变化,但颅内组会受到多种不良的影响分别可能来自于TNOS活性减弱或iNOS活性增强而引起的相应NO的变化。氧化应激反应在粥样硬化病变中增强而且在粥样斑块的进展及钙化中担任重要角色,狭窄血管的超氧化物水平可通过抑制NOS而显著降低,提示该酶可能发生了解偶联^[10]。

内皮细胞层在动脉粥样硬化的发生和进展中具有重要的功能。由eNOS催化产生的NO可迅速对活性氧簇作出反应而形成过氧化亚硝酸盐,从而使NO的有效性减弱,血管舒张受损,调节促发前炎症反应和血栓形成过程如白细胞黏附和血小板聚集。活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是动脉粥样硬化血管炎症信号转导途径的关键介质,从脂纹的发展起始,通过损伤过程直到斑块破裂^[11]。在血管壁,特异性的NAD(P)H氧化酶复合物是ROS的主要来源,这些NAD(P)H可通过细胞膜将电子转移给氧产生超氧阴离子(O²⁻)。这些短期存在的超氧阴离子迅速歧化过氧化氢,过氧化氢可进一步增加ROS的产量。这就导致NO到超氧化物产生的eNOS发生解偶联失去活性。影响血管NO和O²⁻平衡的机制对血管性疾病治疗策略具有指导作用^[12]。有研究还发现如果对全身NOS进行普遍抑制可改善有显著狭窄患者的动脉血流储备^[13],但是觉得应该考虑到不同部位的狭窄,比如MCA组TNOS和iNOS均增高,如果将此方法用于MCA狭窄,也许对患者血流灌注量的改善有一定的参考价值。

总之,脑血管狭窄是多因素、多基因交互作用导致的结果。寻找其发病的原因并改善由于狭窄而造成的不良后果尚需要多方面多角度考虑。

参 考 文 献

- 1 Anggård E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*, 1994, 343 (8907): 1199 - 1206
- 2 Pei DS, Song YJ, Yu HM, et al. Exogenous nitric oxide negatively regulates c - Jun N - terminal kinase activation via inhibiting endogenous NO - induced S - nitrosylation during cerebral ischemia and reperfusion in rat hippocampus. *J Neurochem*, 2008, 106(4): 1952 - 1963
- 3 Lefebvre RA. Nitric oxide in the peripheral nervous system. *Ann Med*, 1995, 27 (3): 379 - 388
- 4 范常锋, 黄一宁. 2711例社区居民脑血管狭窄的流行病学调查. *中华老年心脑血管病杂志*, 2007, 9 (1): 36 - 38

5 Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide - dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg*, 2006, 61 (6): 326 - 334

6 McCann SM, Mastrorandi C, de Laurentiis A, *et al.* The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1057: 64 - 84

7 Heo SK, Yun HJ, Noh EK, *et al.* LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll - like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunol Lett*, 2008, 120 (1 - 2): 57 - 64

8 Florian M, Florianova L, Hussain S, *et al.* Interaction of estrogen and tumor necrosis factor alpha in endothelial cell migration and early stage of angiogenesis. *Endothelium*, 2008, 15 (5 - 6): 265 - 275

9 Zsuga J, Torok J, Magyar MT, *et al.* Serum asymmetric dimethylarginine negatively correlates with intima - media thickness in early - onset atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis*, 2007, 23 (5 - 6): 388 - 394

10 Miller JD, Chu Y, Brooks RM, *et al.* Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52 (10): 843 - 850

11 Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, *et al.* Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*, 2008, 23 (3): 381 - 390

12 Muller G, Morawietz H. Nitric Oxide, NAD(P)H Oxidase and Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(7): 1711 - 1731

13 Kaufmann PA, Rimoldi OE, Gnecci - Ruscone T, *et al.* Systemic nitric oxide synthase inhibition improves coronary flow reserve to adenosine in patients with significant stenoses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293 (4): H2178 - H2182

(收稿:2010 - 01 - 04)

(修回:2010 - 03 - 14)

234 例局限性小细胞肺癌综合治疗结果分析

周宗玫 陈东福 王绿化 梁 军 王 凯 张世平 肖泽芬
张红星 冯勤付 欧广飞 张湘茹 殷蔚伯

摘要 **目的** 回顾性分析局限性小细胞肺癌的治疗情况,并评价不同治疗方式的疗效和预后因素。**方法** 经病理和组织学证实的局限性小细胞肺癌 234 例,行化疗或化放疗的综合治疗,其中单纯化疗组 22 例,化疗 + 放疗组 39 例,化疗 + 放疗 + 化疗组 173 例。化疗以 CE(PE)、CAP、CAV 方案为主,一般疗程为 4~6 周期。放疗采用 6MV - X 线直线加速器,照射范围包括原发灶、肺门及同侧纵隔。先行前后对穿照射 4 周,然后改斜野避开脊髓补量 2 周,使总量达 56~60Gy/5~6 周。**结果** 全组总的中位生存时间为 19 个月,1 年生存率为 76.5%,2 年生存率为 38.2%,3 年生存率为 25.3%,5 年生存率为 15.6%。化疗 + 放疗 + 化疗组的生存率明显高于化疗 + 放疗组和单纯化疗组,具有显著差异 ($P < 0.001$)。治疗方式和临床分期对预后产生明显影响 (分别为 $P < 0.001$, $P = 0.001$)。**结论** 化疗 + 放疗 + 化疗的综合治疗对局限性小细胞肺癌的治疗取得较好的效果,临床分期及治疗方式对预后产生明显影响。

关键词 癌 小细胞肺/放射疗法 癌 小细胞肺/化学疗法 综合治疗

A Retrospective Study for the Limited - stage Small Cell Lung Cancer Patients with Combined Modality Treatment: An Analysis of 234 Patients. Zhou Zongmei, Chen Dongfu, Wang Lühua, Liang Jun, Wang Kai, Zhang Shiping, Xiao Zefen, Zhang Hongxin, Feng Qinfu, Ou Guangfei, Zhang Xiangru, Yin Weibo. Department of Radiotherapy, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Abstract Objective To evaluate the treatment effects of chemotherapy comparing with chemotherapy and radiotherapy in the limited - stage small cell lung cancer (SCLC). **Methods** 234 patients were cyto - pathologically diagnosed and staged as limited small cell lung cancer. The patients were treated with combined chemotherapy and radiotherapy, in which 22 cases were treated by alone chemotherapy (C), 39 patients by chemotherapy plus radiotherapy (C + R), and 173 cases by combined chemotherapy and radiotherapy + chemotherapy (C + R + C). The chemotherapy regimen included CE (or PE), CAP or CAV for 4~6 cycles. Irradiation treatment covering the primary tumor, the ipsilateral hilar nodes and mediastinum was delivered once daily with 6 megavoltage X - ray beam to a median irradiation dose of 56 Gy being given in 5~6 weeks. **Results** The 1 - , 2 - , 3 - , and 5 - year overall survival rates were 76.5%, 38.2%, 25.3%, 15.6% respectively, and the median survival time (MST) was 19 months. There was a significantly difference on the survival rate between C + R + C group and C + R group or C group ($P < 0.001$). Clinical stage and treatment model were the affective factor of