

用于我国及东亚人群还需要国内大规模的多中心随机临床对照研究加以证实。目前国内一些研究者也开始注重此方面的研究,但研究结果存在一定的差异^[9,10]。我们对 2006 年 6 月~2008 年 7 月笔者医院收治并行 PTA 术的 ASO 患者 46 例进行分析,患者平均随访时间为 28.4 ± 8.6 个月,40 例 PTA 术后患者完成 12 个月随访,术后 12 个月累计通畅率为 87.5% 与既往的研究结果相似。TASC II C 与 TASC II D 两组患者比较随访期间再发动脉闭塞风险差异无统计学意义($HR = 1.13, P = 0.85$)。在该组患者中 TASC II C 与 TASC II D 术后的早期通畅率较高,患者术后 6 个月进行了再次 Rutherford 分级,3 例患者手术 6 个月后较术前症状无明显改善,其余患者术后 6 个月临床症状均有不同程度的减轻,提示 PTA 术对于 TASC II C 和 TASC II D 型 ASO 患者早期临床效果较为满意。但该研究为一回顾性分析,研究结果容易收到各种偏倚的影响,其证据强度受到一定的限制。因此,在 TASC II C 与 TASC II D 型下肢动脉硬化闭塞症治疗方法存在一定争议的前提下,有必要进行更多的设计优良的多中心的前瞻性随机临床对照研究,对该问题加以进一步的探讨,从而从循证医学的角度积累更多可靠的临床证据,使患者得到更好的医疗服务。

参考文献

1 吴庆华,杨培.论 TASC 分型与下肢动脉硬化闭塞症的治疗选择

- [J]. 中华普通外科杂志,2009,24(6):433-435
- 2 吴昌伟,吴巍巍.下肢动脉硬化性闭塞症的治疗进展[J].临床外科杂志,2008,16(5):291-292
- 3 Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II) [J]. J Vasc Surg, 2007,45 (Suppl):5-67
- 4 Diehl C, Schuster A, Allenberg JR, et al. High prevalence of peripheral arterial disease and comorbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study [J]. J Atherosclerosis, 2004, 175(6):95-105
- 5 陈佳伦,施娅雪,叶猛,等.泛大西洋协作组织共识 C 和 D 型股腘动脉病变患者腔内治疗的疗效分析[J].中华医学杂志,2010,90(35):2486-2490
- 6 Voyt NT, Wolfson SK, Kuller LH. Lower extremity arterial disease and the aging process: a review [J]. J Clin Epidemiol, 1992, 45(5):529-542
- 7 Clement DL. Medical treatment of peripheral artery occlusive disease (PROD) [J]. Acta Chir Bel, 2000, 100:190
- 8 Surowiec SM, Davies MG, Eberly SW, et al. Percutaneous angioplasty and stenting of the superficial femoral artery [J]. J Vase Surg, 2005, 41(2):269-278
- 9 秦健,李长勤,卢川,等.下肢动脉硬化闭塞症的血管介入治疗研究[J].医学影像学杂志,2010,20(12):1883
- 10 胡何节,邓福生,王晓天,等.血管腔内介入治疗长段下肢动脉硬化闭塞症[J].医学研究杂志,2011,39(1):106-108

(收稿:2011-11-22)

(修回:2011-12-05)

急性暴饮性饮酒对小鼠脑损伤生物标志物的影响

赵美清 冯利东

摘要 **目的** 研究急性暴饮性饮酒对小鼠脑组织中氧自由基相关生物学标志物的影响。**方法** 首先建立急性暴饮性饮酒的小鼠动物模型,检测其血液中乙醇的浓度,进行大脑病理解剖学检查,并与正常对照组比较;然后测定该动物模型以及正常动物脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性以及丙二醛(MDA)的含量水平。**结果** 在单次乙醇胃灌注小鼠大脑并没有观察到明显的显微镜下病理学变化,然而单次乙醇胃灌注可以使小鼠脑组织中 SOD 的活力显著降低($P < 0.01$);而使 MDA 含量水平显著升高($P < 0.01$)。**结论** 一次性大量饮酒可以导致小鼠大脑氧自由基相关生物学标志物水平的变化,表现为降低降解自由基酶的活力和升高氧自由基的水平,从而可能造成脑损伤。

关键词 急性酒精性脑损伤 小鼠 动物模型 生物标志物

Biomarkers of Alcohol Binge - drinking Induced Brain Damage in Mice. Zhao Meiqing, Feng Lidong. Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Neimenggu 014010, China

Abstract Objective To study oxyradical-related biomarkers for binge-drinking inducing alcohol-induced brain damage

作者单位:014010 包头,内蒙古医学院第三附属医院(赵美清);包钢第三职工医院(冯利东)

通讯作者:赵美清,病理生理学硕士学位,副主任医师,电子信箱:zmq815@126.com

in mice. **Methods** A binge drinking model was created with a single dose of alcohol that was administered by gavage to mice. Blood alcohol levels were monitored and the brain biopsy was performed for the pathological examination, and compared with the normal control group. The activity of SOD and the level of MDA in the mice brain were measured between the two groups of animals. **Results** There was no observable microscopic change in the brain after a single dose of alcohol exposure. However, the activity of SOD in the mice brain decreased and the level of MDA increased dramatically ($P < 0.01$). **Conclusion** A single dose of alcohol binge - drinking can cause oxyradical - related biomarkers change in brain which expressed as increased oxygen radicals and decreased degradation enzymes of peroxides, resulting in brain damage.

Key words Acute binge - drinking brain damage; Mouse; Animal model; Biomarkers

酒精(乙醇)是一种亲神经的麻醉剂,慢性酗酒和暴饮性饮酒均可引起脑损伤,过去几十年有关酒精导致脑损伤的研究多集中在慢性酗酒引起酒精中毒,比如酒精滥用和酒精依赖等。近年来,一次大量饮酒导致急性酒精中毒引起国内外研究者的注意,其导致的急性脑损伤具有独特的生物化学和中枢神经系统变化。乙醇的致神经毒性的机制被认为与氧自由基的神经毒性以及线粒体细胞色素氧化酶的活性低下有关^[1]。正常情况下,在细胞线粒体内产生的氧自由基可以被超氧化物歧化酶(SOD)灭活清除,即SOD可歧化过氧化物为氧和过氧化氢,从而保护细胞膜免受氧自由基的伤害,具有抗过氧化的作用^[2]。丙二醛(MDA)是不饱和脂肪酸的过氧化物,由氧自由基降解细胞膜中不饱和脂肪酸而形成,可与蛋白形成共价化合物进而导致细胞的毒性损伤^[3]。MDA的水平可以间接反映机体内氧自由基的水平。以上两种酶的水平或活性的高低与氧自由基导致的脑损伤相关。因此,研究在急性暴饮性饮酒小鼠脑组织中这些酶活性或水平的变化将有助于明确一次大量饮酒对中枢神经系统的损伤作用。

材料与方法

1. 实验动物:昆明种小鼠,均为雄性,体重18~24g,由内蒙古大学实验动物中心提供,为清洁级动物。合格证书:SCXK(蒙)2002-0001。

2. 实验主要试剂:红星二锅头酒(50%乙醇),批号2009-11-24,北京红星股份有限公司。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)。检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,生产批号20110121。

3. 实验方法:分组及急性暴饮性饮酒动物模型的建立:随机选择20只健康昆明种雄性小鼠随机分为两组,一组进行酒精胃灌注[50%乙醇,12ml/kg(体重)]1次;另一组作为对照仅胃灌注相同容积的蒸馏水。然后在酒精胃灌注3小时后从小鼠尾部取血约3ml,静置凝固后离心血清,应用青岛SP-2100检测血液中酒精含量专用气相色谱仪进行酒精含量检测,以确定动物模型成功确立。

4. 脑组织处理及病理学检查:24h后将两组小鼠处死,手

术取出脑组织编号,10%甲醛溶液容器中固定,将固定好的标本延其长轴切取最大纵切面置于包埋盒中,包埋盒置于LEI-CATP1020全自动脱水机中进行组织脱水,用BMJ-3包埋机包埋并冷冻凝固于蜡块中,对蜡块进行切片,用HE染色后置于载玻片进行固定,光镜下观察脑组织病理形态学改变。

5. 脑组织匀浆的制备及生物标志物的测定:两组小鼠处死后,迅速打开颅腔取出脑组织,在冰盘上用冷生理盐水冲洗,除去血液,滤纸拭干,放在小烧杯中加入冷生理盐水,然后用眼科小剪刀尽快剪碎组织,放入玻璃匀浆管,补足冷生理盐水制成组织匀浆。组织匀浆用低温离心机离心10min(2500r/min),取适量上清液进行超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量水平测定,具体操作方法均按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行。

6. 统计学方法:利用EXCEL数据库软件录入数据,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。利用统计软件GRAPHPAD进行统计分析。本研究数据资料应用非配对样本 t 检验(*unpaired t-test*)比较组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 急性暴饮性饮酒的小鼠动物模型的建立:在酒精胃灌注3h后取动脉血进行血液酒精浓度检测,发现酒精胃灌注组血液中酒精水平平均高于80mg%,而对照组(蒸馏水胃灌注组)血液中没有发现任何酒精存在。说明急性暴饮性饮酒的小鼠动物模型成功确立。

2. 两组小鼠脑的病理学变化:在对酒精胃灌注组和蒸馏水胃灌注组小鼠大脑进行病理解剖学检查。没有发现明显的大脑皮质萎缩,大脑周围空间以及脑室增大,显微镜下也没有发现明显的神经元细胞的变性和坏死,神经元细胞胞体萎缩、缺失,神经元细胞轴突和树突的数目减少,也没有神经胶质细胞的增生、水肿和脱髓鞘等继发性病理改变(图1)。

3. 急性暴饮性饮酒脑组织相关生物学标志物活力/水平的变化:单次大剂量胃灌注酒精后第2天,测定脑组织中SOD的活力和MDA的含量水平。结果表明,与空白对照组相比单次大量酒精胃灌注可以显著性降低脑组织中SOD的活力($P < 0.01$);显著升高脑组织中MDA的含量水平($P < 0.01$,表1)。

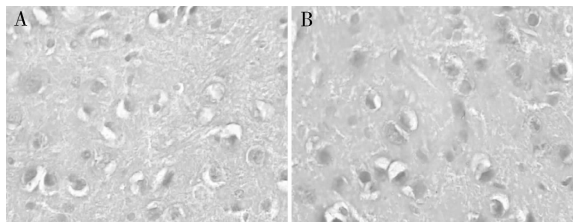


图 1 急性暴饮性饮酒动物模型——
小鼠脑的病理学检查 (HE, ×200)
A. 正常对照组;B. 酒精灌注组

表 1 单次酒精灌注后小鼠脑内相关生物标志
物活力/水平的变化

组别	SOD 活力	MDA 含量
空白对照组 (U/mgprot)	139.9 ± 1.6	3.7 ± 0.12
酒精组 (nmol/mgprot)	124.2 ± 3.7 [#]	4.3 ± 0.14 [#]

与空白对照组比较, [#]*P* < 0.01

讨 论

本研究的实施建立在急性暴饮性饮酒小鼠动物模型的基础上。过去几十年国内外的研究者发展建立了一系列的酒精中毒、酒精滥用和酒精戒断的动物模型,因为在欧美国家暴饮性饮酒比较普遍,尤其在年青的人群中。所以暴饮性饮酒动物模型的发展比较完善。已经发表的暴饮性饮酒动物模型大多选用啮齿目动物,比如大白鼠或小白鼠,也有用灵长类或果蝇。暴饮性饮酒定义为在较短时间内(一般为2h)摄入大量酒精使血液中的酒精浓度 ≥ 80mg%^[4]。为了使血液中的酒精浓度达到或超过80mg%,研究者们选择了不同的酒精投与路径,比如经口胃灌注、腹膜下注射等^[5-8];也选择了不同剂量和次数的酒精投与,比如单次大量酒精胃灌注(最高剂量达到7g/kg)或反复多次酒精胃灌注(8g/kg 每天,共4天)^[5,6,8]。本研究采用小白鼠单次大量酒精胃灌注(50%乙醇,12ml/kg 体重)作为急性暴饮性饮酒的动物模型,经检测此动物模型血液中的酒精浓度 >80mg%,说明此动物模型建立成功。笔者选用此动物模型除了其在操作上简单易行外,单次大量酒精胃灌注更与现实生活中人们偶尔饮酒过量的情况相似,而大多数人认为偶尔醉酒不会对身体健康有大的影响,尤其是不会对中枢神经系统造成大的影响。这正是本研究要强调的即使是一次过量饮酒也会对大脑造成损害。

酒精可以快速通过血脑屏障进入脑组织中进行氧化和非氧化代谢,因为大脑有很高的氧代谢率,其对于由酒精引起的氧化应激损伤更为敏感。此过程

产生的活性氧(ROS),特别是超氧阴离子和过氧化氢会启动脂质的过氧化和蛋白质及DNA的氧化,进而会导致细胞的氧化性损伤^[9,10]。MDA是脂质的氧化的稳定产物,被认为能反映ROS介导的细胞膜损伤的程度^[11]。内源性抗氧化剂如SOD在预防氧化损伤中起关键的作用,此酶可歧化超氧阴离子成为氧和过氧化氢,是一种重要的氧自由基清除剂,间接反映机体清除氧自由基的能力。本实验结果显示:单次大量酒精摄入虽未造成大脑明显的病理学变化,但能显著降低脑组织中SOD的活性和升高MDA的含量水平,使脑组织中氧自由基生成增多、清除减少,引起脑组织内氧自由基堆积,最终导致脑组织缺血缺氧改变,这就意味着仅仅一次大量饮酒就会诱发脑组织的氧化应激性损伤。为急性暴饮性饮酒所致脑损伤的预防和治疗提供理论依据。

参考文献

1 Brooks PJ. Brain atrophy and neuronal loss in alcoholism: a role for DNA damage? [J]. *Neurochem Int*,2000,37(5-6):403-412

2 Batinic-Haberle I, Rebouças JS, Spasojevic I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential [J]. *Antioxid Redox Signal*,2010,13(6):877-918

3 Farmer EE, Davoine C. Reactive electrophile species. [J]. *Curr Opin Plant Biol*,2007,10(4):380-386

4 Crabbe JC, Harris RA, Koob GF. Preclinical studies of alcohol binge drinking[J]. *Ann NY Acad Sci*,2011,1216(1):24-40

5 Carson EJ, and Pruett SB. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol [J]. *Alcohol Clin Exp Res*,1996,20(1):132-138

6 Bell RL, Rodd ZA, Lumeng L, et al. The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking [J]. *Addict Biol*, 2006,11(3-4):270-288

7 李爽,徐春阳,李东亮,等.急性乙醇中毒大鼠学习记忆行为的改变与脑组织中NO和nNOS含量的变化[J]. *中国病理生理学杂志*,2008,24(1):32-35

8 Zahr NM, Mayer D, Rohlfing T, et al. Brain injury and recovery following binge ethanol: evidence from in vivo magnetic resonance spectroscopy[J]. *Biol Psychiatry*,2010,67(9):846-854

9 Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, et al. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain [J]. *Alcohol Clin Exp Res*,2006,30(9):1500-1505

10 Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders [J]. *Neurosci Res*,2010,68(4):261-275

11 Long J, Liu C, Sun L, et al. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria[J]. *Neurochem Res*,2009,34(4):786-794

(收稿:2011-09-19)

(修回:2011-10-28)