

单胺氧化酶单克隆抗体对大鼠血管源性脑水肿的保护作用

李 强 陆兵勋 袁心宇 第一军医大学南方医院神经内科 广东 广州 510515 宛

摘要 目的 观察单胺氧化酶单克隆抗体(MAO mAb)对大鼠血管源性脑水肿(VBE)的治疗作用。方法 75只Wistar大鼠随机分为无脑水肿组、脑水肿未治疗组、脑水肿生理盐水组、甘露醇组与脑水肿 MAO mAb 组。用腹腔注射苯肾上腺素的方法制成 VBE 模型。然后分别注射生理盐水、甘露醇或 MAO mAb 到大鼠腹腔。通过远红外线水分分析仪分别测定各组脑灰质、白质水分含量百分比。用 Evans blue (EB)测定血脑屏障(BBB)的通透性。结果 MAO mAb 对减少 VBE 大鼠脑灰质、白质水分含量、降低 BBB 通透性均有显著效果($P<0.01$)。其对白质的脱水作用更显著($P<0.01$)。而与无脑水肿组相比无显著差异($P>0.05$)。甘露醇组也可降低灰质、白质水分含量,但对灰质、白质无特异性差异。降低 BBB 通透性。结论 VBE 中 BBB 的通透性改变与单胺氧化酶活性有关。MAO mAb 对 VBE 尤其对脑白质水肿有选择性治疗作用。

关键词 血管源性脑水肿 / 治疗 / 单胺氧化酶单克隆抗体 / 酶屏障 / 血脑屏障

中图分类号 R741.05 文献标识码 A 文章编号 000-2588-2004-01-0053-04

Neuroprotective effect of monoamine oxidase monoclonal antibody against vasogenic brain edema in rats

LI Qiang, LU Bing-xun, WANG Xin-yu

Department of Neurology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the therapeutic effect of monoamine oxidase (MAO) monoclonal antibody (mAb) for vasogenic brain edema (VBE) in rats. Methods A total of 75 Wistar rats were randomized into non-edema, non-treated edema, saline-treated edema, mannitol-treated edema and MAO mAb-treated groups. Rat models of VBE were established by intraperitoneal injection of phenylephrine in the latter 4 groups. Brain water content in the gray and white matter was measured respectively with a moisture analyzer, and the permeability of the blood-brain barrier (BBB) determined by Evan's blue (EB) extravasation method. Results MAO mAb administration significantly reduced the brain water content in the gray and white matter as well as the permeability of BBB ($P<0.01$). Which was especially effective for the white matter, producing results comparable with those of the non-edema group ($P>0.05$). MAO mAb markedly alleviated brain edema, with better dehydrating effect on the white matter than mannitol ($P<0.01$), which reduced the water content of the brain gray and white matter indiscriminatingly and showed poor effect on the permeability of BBB. Conclusion The pathogenesis of BBB permeability changes in VBE is related to the activity of monoamine oxidase, and MAO mAb has selective therapeutic effect on VBE, which is especially obvious on brain white matter.

Key words: vasogenic brain edema/therapy; monoclonal antibody of monoamine oxidase; enzyme barrier; blood-brain barrier

血管源性脑水肿(vasogenic brain edema, VBE)是一种在脑血管病、炎症、外伤、脑肿瘤等病变基础上发生的严重并发症。它是以上疾病引起死亡最常见的原因。其发病机制是血脑屏障(BBB)通透性增高造成毛细血管内血浆蛋白、水及电解质等向血管外漏出,致脑组织细胞外液含量增高。其特点是白质明显重于灰质。BBB 受损的病理生理基础有自由基损伤、 Ca^{2+} 通道开放、细胞因子和血管活性物质的作用、一氧化氮的影响、酶屏障受损等多种学说。本研究从酶屏障的角度观察单胺氧化酶单克隆抗体 MAO mAb 对

大鼠 VBE 的保护作用,旨在为临床治疗 VBE 提供一条新的途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 75 只,体重 200~250 g,由第一军医大学实验动物中心提供。将其中 50 只随机分为 5 组:①无脑水肿组;②脑水肿未治疗组;③脑水肿生理盐水组;④脑水肿甘露醇组;⑤脑水肿 MAO mAb 组。每组 10 只,进行脑含水量测定。另 25 只分组同上,每组 5 只,进行脑毛细血管通透性的检测。

1.2 实验试剂及仪器

苯肾上腺素(上海禾丰制药)、MAO mAb (Serotec)、甲酰胺、Cros Organics、Evans blue、B 染料、盐酸

收稿日期 2003-02-27

作者简介 李强(1968-)男,袁心宇 1991 年毕业于河南医科大学,现为第一军医大学在读硕士研究生,主治医师。电话 20-61641965

酪胺酶、硝基蓝四唑盐 BT 上海前进试剂厂、色胺-HCl、三羟甲基氨基甲烷、辣根过氧化物酶、horseradish 袁华美公司提供、BA-4HCL (Amresco) 遥 UVIKON923 紫外分光光度计 (美国 Bio-Tek Kontron) 袁红外线水分分析仪 (美国 Denver) 袁 M1850 恒冷切片机 美国 Ieica 袁

1.3 VBE 动物模型的制备

用苯肾上腺素法 遥先用 SY-1 型大鼠血压测定仪 天津产 测定大鼠左后肢血压 袁量 3 次 袁取中间值 遥测压后将大鼠腹腔注射苯肾上腺素 5 mg/kg b.w. 袁 10 min 后血压升高到 5.3~6.7 kPa 袁出现四肢抖动 袁毛竖立 袁呼吸急促 袁鼻血色泡沫等 遥注射 30 min 后通过测定脑血管通透性及脑灰质水分含量 袁显示 BBE 模型制作成功 遥

1.4 检测方法

无脑水肿组不注射苯肾上腺素及治疗药物 袁直接断头取脑 曰脑水肿未治疗组在制成 BBE 模型后不用治疗药物 袁断头取脑 曰脑水肿生理盐水组在制成模型后由腹腔注入 0.9% 生理盐水 袁 0 min 后快速断头取脑 曰脑水肿甘露醇组在制成模型后由股动脉注入 20% 甘露醇 5 g/kg b.w. 袁 0 min 后快速断头取脑 曰脑水肿 MCA-MAO 组在制成模型后腹腔注射 MAO mAb 0.01 g/kg b.w. 袁 0 min 后断头取脑 遥各组动物取脑后 袁去除硬膜 袁脑干和嗅球 袁用滤纸拭去表面血迹和液体 遥分别取 0.015~0.030 g 脑额部灰质 袁用红外线水分分析仪 袁参数设计 温度 180 袁益袁时间 5 min 袁倾斜度 0.05% 袁测量各组灰质水分含量 袁取平均值 遥

脑毛细血管通透性的测定参照 Cole 等 的方法 袁并略作改动 遥分组及处理同上 袁处理完毕后各组大鼠从尾静脉注入 1% EB 5 ml/kg b.w. 袁 h 后断头取脑 遥取脑时为清除血液中染料 袁用 37 益生理盐水 100 ml 左心室灌注至右心耳流出清亮液体为止 遥取脑称质量后置入存有 5 ml 甲酰胺的试管中 37 益水浴 48 h 遥收集浸泡过组织的甲酰胺溶液 袁恒温 56 益水浴过滤后用 UVIKON 923 紫外分光光度计在 632 nm 处测定其 D 值 袁以蒸馏水作为对比 袁测量 3 次 袁取平均值作记录 遥再与脑组织质量相除 袁得到 EB 通透分值 袁结果用 D/g 表示 遥用倍比稀释法制作标准曲线 袁称取 4 mg EB 于容量瓶中 袁加生理盐水至总体积为 25 ml 遥以甲酰胺稀释至浓度依次为 0.800 尧 0.400 尧 0.200 尧 0.100 尧 0.050 尧 0.025 兹/ml 袁 7 益水浴孵育 48 h 后比色 袁作出标准曲线 遥

1.5 统计学处理

数据用均数 尧标准差表示 袁用 SPSS10.0 软件行单因素方差分析 袁组间多重比较采用 SNK 法 遥

2 结果

2.1 脑水分含量

用红外线水分分析仪所测各组脑灰质水分含量百分比如表 1 所示 遥脑水肿甘露醇组和脑水肿 MAO mAb 组脑灰质水分含量百分比与脑水肿未治疗组相比有显著性下降 (P<0.01) 袁说明甘露醇和 MAO mAb 均有较好的抗脑水肿作用 遥脑水肿甘露醇组与脑水肿 MAO mAb 组脑灰质水分含量相比 袁 P>0.05 袁说明甘露醇与 MAO mAb 对灰质的作用无显著性差异 曰但 MAO mAb 组与甘露醇组的脑白质水分含量百分比相比 袁 P<0.01 袁说明 MAO mAb 对脑白质的脱水作用比甘露醇强 遥

表 1 各组大鼠脑灰质水分含量 袁 n=10 袁
Tab.1 Brain water content in the gray and white matter 袁 n=10 袁

Group	Brain water content	
	Gray matter	White matter
Non-edema	66.64 依 3.06	61.71 依 0.74
Non-treated edema	78.28 依 0.53	76.35 依 0.14
Saline-treated edema	75.35 依 0.31	74.76 依 0.12
Mannitol-treated edema	65.38 依 0.01*	67.15 依 0.85*
mAb-treated edema	68.15 依 0.21* ^Δ	62.37 依 0.23* [#]

*P<0.01 vs non-treated edema group; [#]P<0.01, ^ΔP>0.05 vs mannitol-treated group

2.2 血管通透性

各组脑毛细血管 EB 渗出量见表 2 遥脑水肿未治疗组的 EB 渗出量与无脑水肿组相比 袁 P<0.05 曰脑水肿 MAO mAb 组与脑水肿未治疗组相比有显著性差异 袁 P<0.05 袁但脑水肿甘露醇组与脑水肿未治疗组相比无显著性差异 袁 P>0.05 袁说明甘露醇改善脑毛细血管通透性效果差 袁而 MAO mAb 可降低脑毛细血管通透性 遥

表 2 各组大鼠脑毛细血管 EB 渗出量 [D(g/g) 袁 n=5]
Tab.2 EB extravasation of the brain blood capillary in each group [D(g/g), n=5]

Group	EB extravasation
Non-edema	0.026 3 依 0.001 3
Non-treated edema	0.071 1 依 0.001 0*
Saline-treated edema	0.065 8 依 0.003 4
Mannitol-treated edema	0.064 8 依 0.004 2 ^Δ
MCA-treated edema	0.043 3 依 0.003 [#]

*P<0.05 vs non-edema group; [#]P<0.05, ^ΔP>0.05 vs non treated edema group

3 讨论

近年来 袁研究脑水肿的发病机制以及探讨其药物治疗已愈来愈被重视 袁尤其是对 VBE 的研究 遥因为 VBE 的解决将大大降低脑卒中 尧脑外伤等疾病的病死率和致残率 袁提高人类生存和生活质量 遥对 VBE 发病机制的研究有多种学说 袁曰血脑屏障开放 尧微循

障碍,由基损伤,超载,酶屏障受损学说等。

VBE 是脑外伤、脑瘤、脑血管病、脑炎等许多疾病常见的伴发症,是由于 BBB 通透性增高造成脑毛细血管内血浆蛋白及水分渗出,使脑白质明显水肿。由于水肿液富含蛋白质,吸收缓慢,故脑水肿持续时间长,直接影响预后,是神经科学亟需解决的重大问题。以往认为 VBE 的发病机制是由于血管内皮细胞紧密连接的开放导致血管内大分子物质及水分渗出至细胞外间隙而产生 VBE。近年来免疫电镜发现 VBE 时脑毛细血管内皮细胞紧密连接处仍完好无损,而且即使紧密连接开放脑水肿也不会发生。摇了多年来认为 BBB 紧密连接开放导致 VBE 的经典观念,对 BBB 机械屏障的变化在脑水肿发生中的作用提出了质疑。

我们在对实验性 VBE 的系列研究中,对脑毛细血管内皮细胞和脉络丛上皮细胞的 12 种酶活性进行了组织化学研究,发现 VBE 时脑毛细血管和脉络丛上有多种酶活性增高,其中包括单胺氧化酶、碱性磷酸酶等。同时伴随 BBB 通透性的变化,提示 VBE 的形成与酶屏障上酶活性改变有关,并提出了酶屏障机制。即脑毛细血管内皮细胞和脉络丛上皮细胞上有能把相应底物降解的独特酶系统,这些酶构成一道屏障,阻止相应底物进入脑组织,对脑起保护作用。酶系统除了有屏障功能外,还在跨毛细血管膜的主动转运中具有重要作用,对氨基酸和蛋白质等大分子物质的转运起调节作用。

目前 VBE 的治疗主要以渗透性脱水剂和利尿剂为主,如甘露醇、速尿、白蛋白等。但甘露醇只能在短期内应用,且有潜在的肾毒性。在本实验中观察到甘露醇虽可降低脑灰质白质水分,但对灰质白质降低的程度无明显差异。同时也发现甘露醇改善 BBB 通透性的作用有限,说明甘露醇虽然对 VBE 的脑水分增多有治疗作用,但不能减低 BBB 的通透性,不能解决 VBE 的根本问题。要解决 BBB 通透性增高,其对 VBE 的治疗也是治标不治本。

单胺类神经递质与许多基本的生命活动密切相关,包括摄食、饮水、体温和心血管调节、睡眠与清醒、疼痛与镇痛、运动调节和生殖行为等。脑损伤后单胺类递质去甲肾上腺素、NE、肾上腺素、NE 过度释放和聚集可以对脑组织产生病理损害作用。惠国栋等^[1]在外伤性脑水肿模型中观察到,在脑外伤早期 5-羟色胺、NE、多巴胺、DA、NE 明显升高,NE 可兴奋神经细胞,使机体处于高代谢状态,组织耗氧增加,能量耗竭,维持脑细胞代谢活动的酶类如 Na^+ - K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶活性降低,TP 生成减少,细胞内外离子紊乱,同时也使脑微血管舒缩功能严重紊乱,脑

局部血流量下降,血管内皮细胞受损,BB 通透性增高,NE、HT 升高,尚可与细胞膜上的特异性受体结合而激活 Ca^{2+} 通道,使 Ca^{2+} 内流增加,进一步加重脑水肿。另外,经 MAO-B 作用生成高香草酸和二羟苯乙酸的过程中生成大量的过氧化氢,超氧阴离子和羟自由基,这些自由基能氧化细胞膜和细胞器膜系统,导致多巴胺能神经元等的变性坏死,而导致神经元的损伤。因此,临床上如何在早期控制中枢单胺递质代谢和释放紊乱引起的脑水肿,保护神经系统功能,值得进一步探讨。

单胺氧化酶广泛分布于几乎所有哺乳动物的组织内,主要存在于细胞内线粒体外膜上,其生理功能主要是催化内源性和外源性单胺类物质的代谢,如 DA、NE、HT 及苯丙胺等的代谢酶。MAO 存在 A、B 两种亚型,MAO-A 和 MAO-B 是由不同的基因调控,这两种蛋白质初级结构不同,但有高度同源性,同源部分占 70%。在脑内,MAO-A 主要分布在肾上腺素能神经元内,主要以极性芳香胺为底物,如 5-HT、NE 等。MAO-B 主要分布在 5-HT 能神经元和神经胶质细胞,主要以非极性芳香胺为底物,如苯乙胺、苯乙醇胺等。MAO-A 和 MAO-B 的共同底物有色胺、酪胺、A。研究证明,MAO 活性增高与 Alzheimer 病、Parkinson 病、帕金森氏综合征、老年精神分裂症、抑郁症的发病密切相关,而且单胺氧化酶抑制剂治疗 Alzheimer 病、帕金森氏综合征、老年性痴呆及焦虑性精神病患者的疗效是肯定的。^[2-14] 有报道,在急性脑缺血早期,应用单胺氧化酶抑制剂治疗可以减轻神经元损伤和卒中症状。^[15]

VBE 早期,大分子物质及水分通过 BBB 的途径很可能是由酶介导的转运。研究表明,在脑卒中、脑瘤、脑外伤伴发的脑水肿早期,可见脑脊液和脑组织中单胺氧化酶、碱性磷酸酶、谷氨酸转氨酶、乳酸脱氢酶等明显升高。细胞膜的脂质双分子层中镶嵌有大量蛋白质,其中大多为酶类,这些酶与物质的交换和转运是密切相关的。酶活性的增加,意味着物质交换转运增加,一定程度上反映了 BBB 通透性的改变。我们设想抑制这些酶活性,减少 BBB 通透性,而减少脑水分含量。本实验中,我们应用 MAO mAb 治疗 VBE 后,脑白质平均水分含量为 62.37%,脑灰质水分含量为 68.15%,白质水分比脑水肿未治疗组减少了 13.98%,而灰质只减少了 10.13%。可见 MAO mAb 对白质水分的减少作用更明显,与甘露醇相比,脑灰质水分含量无差异, $P > 0.05$,但对脑白质水分含量的减少,甘露醇只减少了 9.20%,而 MAO mAb 则减少了 13.98% ($P < 0.01$)。另外,通过测定 EB 的渗出量发现,应用 MAO mAb 后对降低 BBB 通透性有统计学意

义($P<0.05$)说明 MCA-MAO 可明显降低脑毛细血管通透性。MCA-MAO 与 MAO 特异性结合后部分抑制酶的活性,既维持 MAO 一定的活性,又不致于使 MAO 过高而达到减轻脑水肿、保护血脑屏障的目的。又可减轻因 DA 等过分降低导致的副作用。起到脑保护作用。我们的实验结果显示,MAO-MCA 对 VBE 的脑白质水肿有明显的选择性治疗作用。是治疗血 VBE 的有效方法。同时也证明了酶屏障在 VBE 中的作用。

参考文献

- 陆兵勋, 宁群, 王心宇. 一种新型血管源性脑水肿模型的建立. 中华神经病学杂志, 1999, 16(5): 273-4.
- Lu BX, Ning Q, Wang XY. Made a new animal model of vasogenic brain edema. *J Apople Nerv Dis*, 1999, 16(5): 273-4.
- Cole DJ, Matsumura JS, Drummond JC, et al. Time- and pressure-dependent changes in blood-brain barrier permeability after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1991, 82(4): 266-73.
- Kondo T, Reaume AG, Huang T, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 1997, 17(11): 4180-9.
- Lee KR, Kawal N, Kin S, et al. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability and cerebral in a rat model. *J Neurosurg*, 1997, 86 (2): 272-8.
- Lu BX, Tang XD. A new vasogenic brain edema model and relation to enzymatic barrier. *Society Neurosci*, 1995, 21(23): 1750-2.
- Banks WA, Kastin AJ. Passage of peptides across the blood-brain barrier: pathophysiological perspectives. *Life Sci*, 1996, 59(23): 1923-43.
- Kaufmann AM, Cardoso ER. Aggravation of vasogenic cerebral edema

- by multiple-dose mannitol. *J Neurosurg*, 1992, 77(4): 584-9.
- 惠国栋, 周幽心, 胡锦. 外伤性脑水肿组织单胺递质变化的实验研究. *中华神经外科杂志*, 1994, 10(2): 74-6.
- Hui GZ, Zhou YX, Hu J. Experiments for study of changes tissue monoamines in traumatic brain edema. *Chin J Neurosurg*, 1994, 10(2): 74-6.
- 杨林, 王国安, 孙璇. 大鼠外伤性脑水肿单胺神经递质的改变. *湖北医科大学学报*, 2000, 21(2): 136-8.
- Yang L, Wang GA, Sun X. The change of catecholamine following traumatic brain injuries in rats. *Acta Acad Med Hubei*, 2000, 21 (2): 136-8.
- Cicccone CD. Free-radical toxicity and antioxidant medications in Parkinson's disease. *Phys Ther*, 1998, 78(3): 313-9.
- Gottowik J, Cesura AM, Malherbe P, et al. Characterization of wild-type and mutant forms of human monoamine oxidase A and B expressed in a mammalian cell line. *FEBS Lett*, 1993, 317(1-2): 152-6.
- Maas JW, Contreras SA, Miller AL, et al. Studies of catecholamine metabolism in schizophrenia/psychosis-II. *Neuropsychopharmacology*, 1993, 8(2): 111-6.
- Parkinson Study Group. A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease: the TEMPO Study. *2002*, 59(12): 1937-43.
- Heinonen EH, Savijarvi M, Kotila M, et al. Effects of monoamine oxidase inhibition by selegiline on concentrations of noradrenaline and monoamine metabolites in CSF of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 1993, 5(3): 193-202.
- 黄华艺, 梁熙南, 吴祥祜. 多巴胺羟化酶和单胺氧化酶活性与急性脑缺血严重程度间关系的探讨. *中国危重病急救医学*, 1996, 8(3): 142-4.
- Huang HY, Liang XN, Wu XT. Study of the relationship between dopamine-hydroxylase and monoamine oxidase activity and the severity of acute cerebral ischemia. *Chin Crit Care Med*, 1996, 8 (3): 142-4.

日本科学家发现分解煤炭的微生物

日本玉川大学加部八惠子教授发现了一种能够分解煤炭的微生物,并计划把它应用在煤炭液化技术上。据介绍,这种微生物是在山林的腐朽木材里分离出来的,是丝状木材腐朽菌——白腐菌的一种。加部教授把它放在含有煤炭黑腐酸的水溶液里进行培养,大约 1 个月之后,黑腐酸被脱色和分解,转变为相对分子质量比较低的灰黄酸。参与脱色和分解的是木质素过氧化酶、锰过氧化酶和虫漆酶。由于这一反应是在常温常压下进行的,因此她认为,这种微生物分泌的酶作用于煤粉,将煤炭液化,有可能成为一种新的煤炭液化技术。与现在研究开发的热分解法等相比,其最大优点是不使用能源。

煤炭是人类社会活动的能源之一,主要成分有碳、氢、氧和氮。由远古时代的森林生成,世界蕴藏量相当丰富。但煤炭直接燃烧时会产生大量的二氧化碳和硫化物等废气,对环境造成很大污染。因此,许多国家都在研究开发清洁煤技术。应用分解木质素的微生物处理煤炭即是方法之一。加部教授的这一科研成果不久前在日本石油学会年会上发表后,引起了同行的极大兴趣。