

# 硒对沙土鼠脑缺血再灌注的保护作用及其作用机制研究

吕凤亚<sup>1</sup>, 李义召<sup>2</sup>, 徐龙宪<sup>1</sup>, 张秋玲<sup>3</sup>, 李支援<sup>1</sup>

(1. 菏泽市立医院, 山东 菏泽 274031; 2. 长城医院, 山东 济南 250000; 3. 泰山医学院 生理教研室, 山东 泰安 278000)

**摘要:** 目的 研究亚硒酸钠对沙土鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法 将 50 只沙土鼠随机分为 5 组, I 组: 假手术组; II 组: 缺血灌注 1 天处死组; III 组: 缺血再灌注 4 天处死组; IV 组: 硒处理, 缺血再灌注 1 天处死组; V 组: 硒处理, 缺血再灌注 4 天处死组。采用夹闭双侧颈动脉法制备沙土鼠脑缺血再灌注模型, 焦油紫染色, 光镜下观察各组海马 CA 1 区神经细胞的形态变化, 电镜下超微结构变化。同时测定脑组织中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量。结果 硒处理组沙土鼠脑缺血再灌注后, 神经细胞病理形态损伤较轻, SOD、GSH-PX 含量较高, MDA 含量较低。结论 硒对沙土鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 其机制可能和增强脑缺血再灌注早期脑组织中 SOD、GSH-PX 的活性, 抑制氧自由基损伤, 减轻脂质过氧化反应有关。

**关键词:** 缺血再灌注损伤; 硒; 丙二醛; 谷胱甘肽过氧化物酶; 超氧化物歧化酶

**中图分类号:** R-332 **文献标识码:** A

**A Study on the Protective Effects and Mechanisms of Selenium on Cerebral Ischemia Reperfusion in Gerbils** LU Feng-ya et al. Department of Neurology, Huzhou Municipal Hospital, Huzhou 274031, China

**Abstract Objective** To study the protective effects and mechanisms of sodium selenite on cerebral ischemia reperfusion in gerbils **Methods** 50 gerbils were divided into five groups at random. I: sham-operated group; II: cerebral ischemia reperfusion for 1 day; III: cerebral ischemia reperfusion for 4 days; IV: cerebral ischemia reperfusion for 1 day with sodium selenite treatment; V: cerebral ischemia reperfusion for 4 days with sodium selenite treatment Cerebral ischemia reperfusion models were made with occlusion of bilateral carotid arteries Pathologic changes of neuron in hippocampus were observed under optical microscope and electron microscope Contents of MDA, SOD and GSH-PX in cerebral tissue were assayed **Results** The pathomorphological injuries were lighter in neurons of gerbils with selenium treatment And also the contents of SOD, GSH-PX were higher, while MDA was lower in the gerbils receiving selenium treatment **Conclusions** Selenium could protect neuron against injures in cerebral ischemia reperfusion in gerbils The mechanisms may be related to enhancing the activity of GSH-PX and SOD in cerebral tissue, inhibiting the damage of free radical and attenuating lipid peroxidation

**Key words:** Cerebral ischemia reperfusion injury; Selenium; Malondialdehyde; Glutathione peroxidase; Superoxide dismutase

近年来, 随着临床上对缺血性脑血管病溶栓治疗的开展, 脑缺血再灌注损伤受到了更多关注, 有关脑缺血再灌注损伤的病理生理机制及其药物保护作用的研究取得了重大进展。硒是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的必需成分, GSH-PX 能特异性地催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应而起到抗氧化、清除自由基的作用。本研究利用沙土鼠前脑缺血再灌注模型, 通过焦油紫染色光镜下观察各组海马 CA 1 区神经细胞的形态变化, 醋酸铀染色观察电镜下神经细胞超微结构变化, 观察了硒对脑缺血再灌注后海马 CA 1 区神经细胞的保护作用, 通过测定脑组织中丙二醛

(MDA)、GSH-PX、超氧化物歧化酶(SOD)的含量, 探讨了其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 健康成年沙土鼠 50 只, 月龄 4~5 月, 体重 (50 ± 10) g, 雌雄不限, 由泰山医学院生理教研室提供, 蛋白酶 k、DAB (过氧化物酶底物)、多聚甲醛由美国 Sigam 公司提供, GSH-PX 试剂盒、MDA 试剂盒、SOD 试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供, 亚硒酸钠为国产普通标准, 普通自来水配制成 0.8 mmol/L 的溶液。

## 1.2 方法

**1.2.1 试验方法** 50 只沙土鼠随机分为 5 组, I 组: 假手术组; II 组: 缺血再灌注 1 天处死组; III 组: 缺血再灌注 4 天处死组; IV 组: 自由饮用亚硒酸钠水, 缺血再

收稿日期: 2003-01-03; 修回日期: 2003-04-29

作者简介: 吕凤亚(1969-), 女, 山东菏泽人, 主治医师, 硕士, 从事神经病学研究。



灌注 1 天处死组; V 组: 自由饮用亚硒酸钠水, 缺血再灌注 4 天处死组。IV 组、V 组自由饮用 0.8 mmol/L 亚硒酸钠 1 个月, 做脑缺血再灌注模型, 术后继续自由饮用亚硒酸钠水至处死取材, I、II、III 组均自由饮用自来水, 饲料同为普通颗粒鼠料, 由山东省生物制品研究所提供。

1.2.2 前脑缺血再灌注模型制作 乙醚吸入麻醉后取颈前部正中切口, 分离并用无创微血管夹夹闭双侧颈总动脉 5 min, 然后去除微血管夹, 造成前脑缺血再灌注状态, 分别于手术后 1 天、4 天处死动物取材。假手术组除不夹闭颈总动脉外, 其余操作与以上步骤相同。

1.2.3 焦油紫染色 去眼球放血处死后, 迅速剥离脑组织, 取乳头体至视交叉处脑组织, 以 4% 多聚甲醛固定 6 h, 梯度浓度酒精脱水, 石蜡包埋, 切片厚度为 5  $\mu$ m, 1% 焦油紫+ 0.05% 嗜天青 II+ 0.25% 甲苯胺兰复合染色, 光镜下观察海马 CA 1 区神经细胞的形态变化。

1.2.4 双重染色 每组取 3 只沙土鼠, 处死后立即冰盘内剥离海马, 切成 1 mm<sup>3</sup> 小块, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 2% 锇酸固定 2 h, 梯度浓度丙酮脱水, 环氧树脂 120 包埋, 行半超薄切片 (1  $\mu$ m), 光镜下定位后行超薄切片, 醋酸铀及枸橼酸铅双重染色, 透射电镜观察海马 CA 1 区神经细胞的变化。

1.2.5 MDA、SOD、GSH-PX 含量测定 每只取脑组织 0.5 g, 加生理盐水稀释 10 倍, 用玻璃均浆器在冰上研磨, 离心后取上清液进行 MDA、SOD、GSH-PX 含量的测定, 具体操作方法按说明书进行。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 10.0 版软件进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 再用 LSD 法进行两两比较。

## 2 结果

2.1 光镜结果 假手术组沙土鼠海马 CA 1 区锥体细胞 3~4 层, 排列紧密, 细胞核圆而大, 核仁清晰, 焦油紫染色示胞浆内尼氏体丰富, 神经纤维密集, 排列整齐; 缺血再灌注 1 天沙土鼠海马 CA 1 区锥体细胞层次减少, 排列稀疏, 细胞间隙增大, 部分细胞肿胀, 结构模糊, 形态不清, 少数细胞空泡变性, 细胞核固缩, 核仁消失; 硒处理+ 脑缺血再灌注 1 天细胞层次亦减少, 但仍可见 1~2 层细胞, 损害较缺血再灌注 1 天轻; 脑缺血再灌注 4 天细胞层次进一步减少, 排列更为稀疏, 细胞核固缩为三角形或多角形, 脱失现象明显; 硒处理+ 脑缺血再灌注 4 天海马区可辨出残留的细胞层次, 细胞形态改变也较轻。

2.2 电镜结果 假手术组: 核膜完整光滑, 染色质分布均匀, 线粒体膜完整, 线粒体嵴清晰可见 (见图 1);

脑缺血再灌注 1 天: 核膜溶解, 染色质凝聚, 线粒体肿胀, 线粒体嵴断裂或消失, 部分线粒体膜溶解, 胞浆内可见高电子密度致密小体 (见图 2); 硒处理+ 脑缺血再灌注 1 天: 核膜部分溶解, 结构模糊, 可见残存核膜, 染色质分布比较均匀, 线粒体肿胀, 线粒体嵴稀疏, 胞浆内致密小体电子密度较 II 组低, 细胞损伤较轻 (见图 3); 脑缺血再灌注 4 天: 核膜崩解, 局部凹陷, 染色质凝聚, 边集, 线粒体膜溶解, 线粒体嵴消失, 部分线粒体呈空泡样变 (见图 4); 硒处理+ 脑缺血再灌注 4 天: 核膜结构基本完整, 染色质轻度凝聚, 边集, 线粒体嵴比较清晰, 部分线粒体呈空泡样变 (见图 5)。

## 2.3 各组 MDA、GSH-PX 及 SOD 比较 (表 1)

MDA: 除 II 组与各组比较  $P < 0.01$  外, 其余 9 组间比较均  $P > 0.05$ ; GSH-PX: I 组与 IV 组、II 组与 III 组比较  $P > 0.05$ , I 组与 V 组比较  $P < 0.05$ , 其余 7 组间比较均  $P < 0.01$ 。SOD: I 组与 IV 组、I 组与 V 组、IV 组与 V 组比较  $P > 0.05$ , II 组与 III 组比较  $P < 0.05$ , 其余 6 组间  $P < 0.01$ 。

表 1 各组 MDA、SOD、GSH-PX 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SOD (NU/ngprot)	MDA (nmol/ml)	GSH-PX (活力单位)
I 组	72.85 $\pm$ 5.70	2.74 $\pm$ 0.24	35.24 $\pm$ 6.41
II 组	51.92 $\pm$ 8.09	6.61 $\pm$ 1.55	18.97 $\pm$ 2.57
III 组	59.20 $\pm$ 3.30	2.84 $\pm$ 0.67	19.66 $\pm$ 2.51
IV 组	74.18 $\pm$ 4.59	2.86 $\pm$ 0.28	33.87 $\pm$ 5.58
V 组	67.70 $\pm$ 3.04	2.77 $\pm$ 0.31	34.14 $\pm$ 7.32
F 值	31.26	46.86	17.74
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

## 3 讨论

我们通过焦油紫染色神经细胞的尼氏小体, 对缺血再灌注后海马 CA 1 区病理改变以及硒干预后的病理变化进行了动态观察。结果发现在缺血 5 min 再灌注 1 天后海马 CA 1 区锥体细胞即有明显的细胞变性坏死, 表现为层次减少, 细胞间隙增大, 部分细胞肿胀, 结构模糊, 形态不清, 少数细胞空泡变性, 细胞核固缩, 核仁消失。4 天后细胞损伤进一步加重, 细胞排列更为稀疏, 残存的细胞极少。说明缺血再灌注后对海马 CA 1 区的损害严重。而硒处理后的沙土鼠缺血再灌注后海马区细胞层次的减少、细胞形态损伤性改变相对较轻, 说明硒可以减轻沙土鼠脑缺血再灌注时光镜下海马 CA 1 区神经细胞病理形态损伤。对缺血再灌注的超微结构观察, 发现细胞内的各种细胞器尤其是线粒体损伤严重, 染色质大量边集, 膜系统大量崩解。而硒处理后, 损伤较缺血再灌注组明显减轻, 超微结构显示了硒对细胞内部结构具有良好的保护作用。

目前认为, 脑缺血再灌注损伤与氧自由基形成、兴奋性氨基酸的细胞毒性、细胞内钙增高、中性粒细胞浸

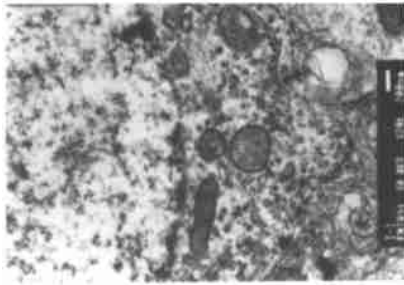


图1 假手术组电镜下表现(×20000)(鼠号8)  
(核膜完整光滑,染色质分布均匀,线粒体膜完整,线粒体嵴清晰可见)

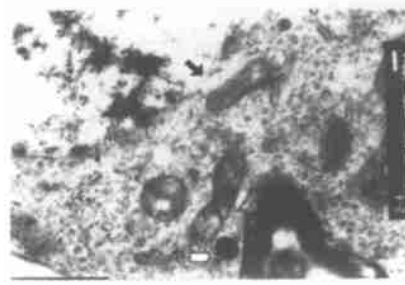


图2 缺血再灌注1天电镜下表现(×20000)(鼠号19)  
(核膜溶解(\),染色质凝聚,线粒体肿胀,线粒体嵴断裂或消失,部分线粒体膜溶解,胞浆内可见高电子密度致密小体(⇨))

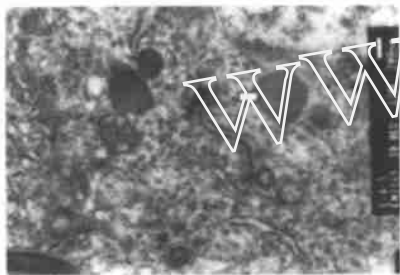


图3 硒处理+缺血再灌注1天电镜下表现(×20000)(鼠号28)  
(核膜部分溶解,结构模糊,可见残存核膜,染色质分布比较均匀,线粒体肿胀,线粒体嵴稀疏,胞浆内致密小体电子密度较II组低(⇨),细胞损伤较轻)

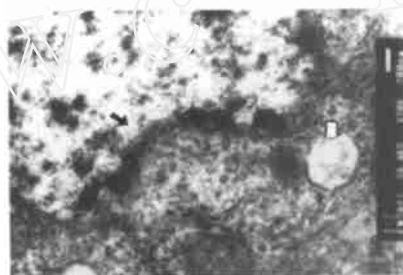


图4 缺血再灌注4天电镜下表现(×20000)(鼠号38)  
(核膜崩解(\),局部凹陷,染色质凝聚,边集,线粒体膜溶解,线粒体嵴消失,部分线粒体呈空泡样变(⇨))

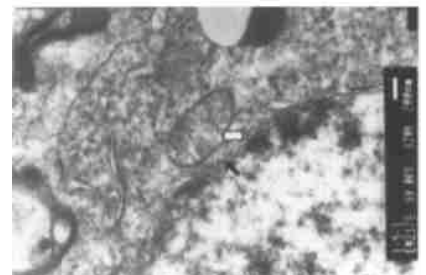


图5 硒处理+缺血再灌注4天电镜下表现(×20000)(鼠号48)  
(核膜结构基本完整(\),染色体轻度凝聚,边集,线粒体嵴比较清晰(⇨),部分线粒体呈空泡样变)

润与内皮细胞损害有关<sup>[1-3]</sup>。自由基代谢异常是脑缺血再灌注损伤的重要原因,脑缺血再灌注时,细胞内氧自由基大量增加,氧自由基极易攻击含不饱和双键的生物膜结构,发生脂质过氧化反应,使膜结构遭到破坏,影响膜的通透性,使离子转运、生物能的产生和细胞器的功能发生一系列病理生理改变,导致神经细胞、胶质细胞和血管内皮细胞损伤。MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,其含量变化间接反映了组织中氧自由基含量及细胞损伤的程度。本试验中,沙土鼠脑缺血再灌注1天脑组织MDA 含量较假手术组明显增高( $P < 0.01$ ),而饮用亚硒酸钠水的沙土鼠在脑缺血再灌注1天后脑组织MDA 含量较假手术组无明显变化( $P > 0.05$ ),表明脑缺血再灌注后,脑组织内自由基产生增加,发生了明显的脂质过氧化反应,而亚硒酸钠可以减少自由基的产生,减轻脂质过氧化反应。脑缺血再灌注4天,硒处理组和对照组脑组织MDA 含量与假手术组相比差异无显著性( $P > 0.05$ ),表明在脑缺血再灌注后期脑组织自由基水平可自动恢复稳态,与文献报道一致<sup>[4]</sup>。

GSH-PX 的活性中心是硒半胱氨酸,硒是 GSH-PX 的必需成分,硒还参与花生四烯酸级联反应中酶

活性的调节<sup>[5]</sup>,Chang<sup>[6]</sup>及Mahan<sup>[7]</sup>等通过动物实验证明,饮食中补硒,可影响 GSH-PX mRNA 水平的过度表达。Molnar 等<sup>[8]</sup>也证明了血浆硒浓度与 GSH-PX 呈正相关。同时,Rayman 等<sup>[9]</sup>也提出了在 GSH-PX 中,硒对于破坏过氧化物是一个重要的清除系统的组成部分,当血浆中硒浓度降低时,则过氧化物增多。本组实验亦提示补充硒可以提高缺血再灌注时脑组织内 GSH-PX、SOD 的含量,这与上述提到的硒能降低缺血再灌注时脑组织内MDA 的含量相吻合。硒对MDA 含量的降低是通过提高 GSH-PX、SOD 的活性而实现的,从而起到减轻氧自由基损伤,减弱脂质过氧化反应,保护神经细胞的作用。

参考文献:

- [1] Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn [J] Biol Neonate, 2001, 79(3-4) 180-186
- [2] Liao SL, Chen WY, Ruaung SL, et al A association of immune responses and ischemic brain infarction in rat [J] Neuroreport, 2001, 12(9) 1943-1947.
- [3] Lopachin RM, Gaughan CL, Lehning EJ, et al Effects of ion channel blockade on the distribution of Na, K, Ca and other elements in oxygen-glucose deprived CA1 hippocampal neurons [J] Neuroscience, 2001, 103(4) 971-983
- [4] Hajime B, Memezawa K, Maj-lis S. Penumbra tissues salvaged by



- reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats [J] Stroke 1992, 23: 55
- [5] 张在香. 硒的分子生物学 [J] 国外医学 卫生学分册, 1999, (2): 89-92
- [6] Cheng WH, Ho YS, Ross DA, et al Overexpression of cellular glutathione peroxidase does not affect expression of plasma glutathione peroxidase of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mice offered diets adequate or deficient in selenium [J] J Nutri, 1997, 127: 675-680
- [7] Mahan DC, Parrett NA. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine [J] J Anim Sci, 1996, 74: 2967-2974
- [8] Molnar J, Macpherson A, Dixon J, et al Effect of supplementation with selenium on whole blood glutathione peroxidase activities and on plasma and tissue selenium concentration in lambs [J] Biol Trace Elem Res, 1996, 55: 253-262
- [9] Rayman MP, Abou Shakra FR, Ward M, et al Comparison of selenium levels in preeclamptic and normal pregnancies [J] Biol Trace Elem Res, 1996, 55: 9-20

文章编号: 1004-6194(2003)04-0165-01

## · 短篇报道 ·

# 糖尿病伴发皮肤病变的临床分析

欧阳芳, 姜睿, 马红艳, 徐玲

(泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000)

中图分类号: R587.106

文献标识码: D

糖尿病患者可出现多种皮肤损害, 约 61% 的 2 型糖尿病患者伴发皮肤病变<sup>[1]</sup>。近 2 年诊治 2 型糖尿病伴发皮肤病变 132 例, 占同期糖尿病住院患者的 38.6% (132/342), 总结报告如下。

2 型糖尿病患者男 58 例, 女 74 例, 年龄 42~73 岁, 平均 (56.8 ± 11.5) 岁, 病程 3 周~15 年。主要皮肤病变有: 感染 76 例 (57.6%), 其中癣菌及白色念珠菌感染 47 例 (61.8%), 金黄色葡萄球菌感染 25 例 (31.9%), 疱疹病毒感染 4 例 (5.3%), 60 岁以上病例占 60.5% (46/76), 糖化血红蛋白 (HbA<sub>1c</sub>) > 8.0% 者 47 例 (61.8%), 5 例下肢湿性坏疽者均超过 60 岁, HbA<sub>1c</sub> > 10.0%; 胫前色素沉着斑 42 例 (31.8%), 男性多见, 男: 女为 1.8: 1, 病程 5 年以上者占 61.9% (26/42), 瘙痒症 7 例 (5.3%), 发病率与年龄分布及病程无明显相关; 糖尿病性大疱病 4 例 (3.0%), 湿疹 3 例 (2.3%), 均见于 60 岁以上, 大疱病患者伴有神经病变、大血管及微血管病变多种并发症, 病程均超过 5 年。所有病例在控制血糖水平同时治疗皮肤病变。

所有病例经治疗后 3 周~8 周, 空腹及餐后 2 h 血糖水平控制在正常范围, 73 例 (瘙痒症 7 例, 糖尿病性大疱病 4 例, 湿疹 3 例及感染 59 例) 皮疹消退, 皮损愈合, 瘙痒症状消失; 17 例 (下肢皮肤化脓性感染 7 例, 癣菌感染 10 例) 皮损部分愈合, 均为皮损严重, 合并多种并发症的患者; 42 例胫前色素沉着斑皮损无消退, 亦无新皮损出现。随访 2 年, 感染复发率

15.8% (12/76), 其中 58.3% (7/12) 为血糖控制不好、并发症较多的老年患者。

皮肤病变是糖尿病的常见合并症, 发病情况及发病机制未完全明了, 可能与糖代谢异常、微血管病变、动脉硬化、神经病变有关。部分病例以皮肤病变为首发表现, 可作为诊断糖尿病的线索, 因此正确认识糖尿病皮肤病变有助于提高糖尿病早期诊断的准确率。

本组皮肤病变中感染最常见, 与国内外文献报道一致<sup>[1,2]</sup>, 患者容易发生皮肤感染, 与糖尿病患者机体防御机能减弱, 白细胞的趋化功能、吞噬作用和杀菌能力均减退等因素有关。感染与年龄及代谢控制程度密切相关, HbA<sub>1c</sub> 水平高、年龄大的患者感染发生率高。老年患者感染程度严重、易复发。皮损预后与年龄、代谢控制程度及并发症有关。治疗的关键是控制血糖水平, 选用敏感药物治疗感染, 必要时清创处理, 同时治疗并发症。

约 50% 的糖尿病患者有胫前萎缩性色素沉着斑<sup>[3]</sup>, 以男性多见, 皮损多发生在胫骨前, 呈淡棕色萎缩性斑, 边缘不规则, 表皮光滑、菲薄, 皮损约 1.5 年~2 年消失, 但新皮损不断出现。也可见于少数非糖尿病老年人。本组资料显示胫前色素沉着斑与血糖水平无关, 但多见于病程 5 年以上者。可能是由于皮肤血液循环与周围神经功能的障碍, 引起皮肤营养不良, 当有轻微外界刺激作用于局部皮肤时发生此类皮损<sup>[4]</sup>。目前无特殊治疗方法。

糖尿病患者的瘙痒症表现为全身性瘙痒和局限性瘙痒, 与患者血糖水平升高、植物神经功能减退和伴随出汗减少造

成皮肤干燥有关。应避免搔抓、摩擦及采用刺激药品, 控制血糖水平及抗组胺药可改善瘙痒症状。

糖尿病性大疱病表现为自发的、无损伤性清晰水疱, 多发生于指 (趾) 端部, 其次为足、小腿, 一般病程较长, 伴有神经病变、大血管及微血管病变等多种慢性并发症, 全身营养状况差, 可能与微血管病变、神经营养障碍、局部代谢紊乱、创伤等有关, 有大疱病者应注意预防感染。湿疹在糖尿病中发病率可达 30%~40%<sup>[5]</sup>, 常发生于外阴等易摩擦处及皮脂分布较多的部位, 本组 3 例分别发生于外阴及双下肢, 控制血糖水平及对症治疗后好转。

糖尿病是引起皮肤病变的根本病因, 控制血糖水平是预防和治疗糖尿病性皮肤病的关键措施, 同时患者应该重视保护皮肤, 避免损伤、感染。

### 参考文献:

- [1] G. Romano, G. Moretti, Di Benedetto, et al Skin lesions in diabetes mellitus: prevalence and clinical correlations [J] Diabetes Research and clinical practice 1998, 39: 101-106
- [2] 林芳, 程培华. 78 例糖尿病皮肤病临床分析 [J] 中国皮肤性病学杂志, 1997, 11 (4): 214-215
- [3] 钟学礼. 临床糖尿病学 [M] 上海: 上海科技出版社, 1989: 286
- [4] 刘新民. 实用内分泌学 [M] 第 2 版. 北京: 人民军医出版社, 1997: 352
- [5] 刘开源, 黄昭穗. 糖尿病皮肤病变研究进展 [J] 现代诊断与治疗, 2000, 11 (5): 316-318

收稿日期: 2002-12-18; 修回日期: 2003-02-28