维普资讯 http://www.cqvip.com

·论著·

糖尿病酮症酸中毒兔血-脑脊液屏障的变化

朱晓云 顾小军 常家宝 张燕 冯艳红 殷国庆

【摘要】 **目的** 探讨糖尿病酮症酸中毒的血-脑脊液屏障损伤机制。**方法** 新西兰家兔随机分模型组($n=6$)和生理盐水对照组($n=6$)。模型组从耳缘静脉注射四氧嘧啶和链脲佐菌素各 150 mg/kg,对照组给予等量生理盐水,72 h 后检测血糖、尿酮体。两组静脉内均注射伊文氏蓝,6 h 后检测动脉血气;处死动物,取脑组织用紫外分光光度计测定伊文氏蓝吸光度(A),并观察光镜、超微结构、碱性磷酸酶细胞化学及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)免疫组织化学结果。**结果** 72 h 后模型组:血糖全部大于 17 mmol/L,尿中出现酮体;伊文氏蓝 A 值略增高,和对照组相比无显著性差异。组织学和超微结构观察模型组脑血管周围水肿,内皮细胞损伤,神经元变性、坏死。碱性磷酸酶细胞组化显示血管内皮上酶活性明显弱于对照组。免疫组化可见脑实质内血管壁上 iNOS 染色阳性。**结论** 在四氧嘧啶和链脲佐菌素诱发的糖尿病酮症酸中毒动物模型中出现脑水肿,其产生与血-脑脊液屏障的破坏及一氧化氮(NO)参与有关。

【关键词】 糖尿病酮症酸中毒; 血-脑脊液屏障; 一氧化氮合酶; 碱性磷酸酶; 脑水肿
中图分类号:R587.2;R363.22 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-0603(2004)03-0175-04

Changes of blood-cerebrospinal fluid barrier in rabbits with diabetic ketoacidosis *ZHU Xiao-yun*, GU Xiao-jun, CHANG Jia-bao, ZHANG Yan, FENG Yan-hong, YIN Guo-qing. * The Second Hospital of Nanjing, Medical College of Southeast University, Nanjing 210003, Jiangsu, China*

【**Abstract**】 **Objective** To explore the mechanism of the changes of blood-cerebrospinal fluid barrier in rabbits with diabetic ketoacidosis (DKA). **Methods** The New Zealand rabbits were injected with 150 mg/kg streptozotion and alloxan monohydrate each (model group, $n=6$) intravenously, or equal volume of normal saline (control group, $n=6$). After 72 hours, blood sugar and uric ketone were detected. All of animals were injected with Evans blue(EB). After 6 hours, arterial blood gases were measured and animals were killed. Absorbency of EB of brain tissue was detected. All brains of animals were examined with light and electron microscopy. Marker of blood-cerebrospinal fluid barrier, cytochemical stains of alkaline phosphatase (ALPase) was operated by ultrastructure. The inducible nitric oxide synthase (iNOS) in brain tissue was detected by immunohistochemical method. **Results** The models of DKA were established after 72 hours of injecting streptozotion and alloxan monohydrate. Absorbency of EB of model group rabbits was slightly increased, but had no significant difference compared with controls ($P>0.05$). The brain edema, damages of vessel endothelium and necrosis of neuron were observed through histological and ultrastructure examination in model group. ALPase activity of model group was evidently decreased in brain blood vessel endothelium in comparison with controls. Compared to controls, the iNOS activity of model group was increased and it's positive cells were aggregated on blood vessel of brain membrane. **Conclusion** By streptozotion and alloxan monohydrate inducing DKA models, NO could induce blood-cerebrospinal fluid barrier damages and result in brain edema.

【**Key words**】 diabetic ketoacidosis; blood-cerebrospinal fluid barrier; nitric oxide synthase; alkaline phosphatase; brain edema
CLC number:R587.2;R363.22 **Document code**:A **Article ID**:1003-0603(2004)03-0175-04

糖尿病酮症酸中毒(diabetic ketoacidosis, DKA)是胰岛素缺乏所引起的以高血糖、高酮血症和代谢性酸中毒为主要生化改变的临床综合征,常经过抢救治疗,血糖下降,酸中毒改善,但昏迷反而加深,或病情改善后出现意识障碍,甚至导致死亡。我们使用新西兰家兔成功复制 DKA 模型,通过测定伊文氏蓝(Evans blue, EB)吸光度(absorbency, A)、碱性磷酸酶(ALPase)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)染色等方法,研究血-脑脊液屏障及其渗透性的变化,旨在探讨脑损伤的发病机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:链脲佐菌素、四氧嘧啶、EB、鼠抗人 iNOS 单克隆抗体均为 Sigma 公司产品;ABC 试剂盒由 Dolor 公司提供。12 只雄性普通级新西兰家兔由江苏省农科院提供,体质量 1.65～3.25 kg。

1.2 动物模型复制及分组:12 只动物随机分为模

基金项目:江苏省卫生厅立项课题(TS9904)

作者单位:210003 东南大学医学院附属南京市第二医院
作者简介:朱晓云(1968-),女(汉族),硕士研究生,江苏省人,主治医师(Email:zxyone@sina.com)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

型组和对照组($n=6$)，参照 Harris 等[1]的方法作适当改动。模型组家兔从耳缘静脉注射链脲佐菌素和四氧嘧啶各 150 mg/kg，对照组给予等量生理盐水。72 h 后模型组动物血糖皆>17 mmol/L，尿中均出现酮体，所有动物均清醒。

1.3 检测指标及方法：模型制成后从耳缘静脉注射 EB(剂量按 2%，1 g/L)，6 h 后用氯胺酮 50 mg 腹腔注射麻醉，打开胸腔，右心房抽静脉血检测有关生化指标，左心室抽动脉血检测血气并插管，生理盐水灌注至右心房灌注液呈无色，从插管至灌注结束在 20 min 之内，取脑组织进行光镜、透射电镜、细胞化学及免疫组织化学(组化)观察。

1.3.1 称重后每克脑组织加 4 ml 二甲基酰胺浸泡，浸泡的脑组织匀浆、离心，取匀浆上清液用紫外分光光度计(波长为 625 nm)测定脑组织 EB 的 A 值。

1.3.2 光镜标本制备：用体积分数为 10%的甲醛固定标本，低温石蜡包埋，切片做苏木素-伊红(HE)染色，光镜下观察。

1.3.3 透射电镜标本制备：用 2.5%的戊二醛固定标本，常规电镜制样，半薄切片定位，超薄切片，经醋酸铀-柠檬酸铅双重染色，用日产 H-600 电子显微镜观察超微结构。

1.3.4 依照 Lewis 等[2]描述的方法做电镜下碱性磷酸酶(ALP 酶)细胞化学方法染色。取动物脑组织，固定在 0.4%戊二醛和 10%多聚甲醛固定液中。采用手工法切片，厚度不超过 40 μm，缓冲液冲洗。40 mmol/L Tris(pH 为 9.2)，8 mmol/L β-甘油酸钠和 2.4 mmol/L 硝酸铅室温哺育 60 min。哺育后冲洗，固定于锇酸中，环氧树脂包埋，超薄切片。不染色，直接用电镜观察。每个样本都做一阴性对照，仅不加甘油酸钠，其余各项均相同。

1.3.5 免疫组化方法(ABC 法)：石蜡切片经二甲苯脱蜡，乙醇进水，蒸馏水洗。2.5%的胰酶消化 30 min，磷酸缓冲液(PBS)洗，过氧化氢预处理 30 min，PBS 再洗，正常兔血清封闭 20 min，加特异性第一抗体(鼠抗人 iNOS 抗体)，PBS 洗后加二抗，PBS 洗，加入链酶素-生物素复合物(ABC)作用 30 min，清洗后 3,3′-二氨基联苯胺(DAB)显色，苏木素复染，封片。玻片上的棕黄色颗粒或斑块为阳性产物。

1.4 统计学处理：实验数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用 t 检验判定均数差异的显著性。

2 结 果

2.1 两组动物注药前后血糖、尿酮体和体质量比较：表 1 结果显示，模型组和对照组动物在实验前血糖浓度无明显差异。模型组动物在给致糖尿病试剂后血糖明显升高(都大于 17 mmol/L)，实验前后有显著性差异($P<0.01$)；对照组实验前后无明显差异。对照组家兔实验后体质量增加，而模型组发生糖尿病后体质量下降，两组比较差异显著($P<0.05$)。对照组家兔实验前后尿酮体均阴性；模型组动物尿酮体实验前为阴性，发生糖尿病后尿酮体为阳性。

2.2 两组动物注药后血渗透压、血气和电解质及 EBA 值比较：两组动物用药后 72 h，血渗透压、血气和电解质差异明显，符合 DKA 诊断标准。模型组 EBA 值略增加，与对照组比较无显著差异(见表 2)。

表 1 注药前后两组血糖浓度、尿酮体和体质量比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Comparison of blood sugar, urine ketone and body weight between two groups($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	血糖浓度(mmol/L)		体质量(kg)		尿酮体	
	注药前	注药后	注药前	注药后	注药前	注药后
对照组	5.96±1.60	5.18±0.84	2.26±0.42	2.68±0.78	阴性	阴性
模型组	4.22±1.53	24.30±3.80**	2.43±0.75	2.34±0.15*	阴性	阳性

注：与对照组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$

表 2 注药后 72 h 两组动物电解质、血气和 EB 的 A 值变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Changes of blood gas, electrolyte and absorbency of Evans blue 72 hours after injection in two groups($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	PO_2(mm Hg)	PCO_2(mm Hg)	SaO_2	HCO_3^-(mmol/L)	pH
模型组	22.57±19.40**	58.36±12.78*	0.49±0.24*	11.33±4.46*	6.90±0.13**
对照组	95.17± 7.78	32.34± 1.98	0.97±0.01	15.80±3.15	7.41±0.02

组别	血乳酸(mmol/L)	BUN(mmol/L)	血糖(mmol/L)	AG(mmol/L)	血渗透浓度(mmol/L)	EB A 值
模型组	8.54±2.88**	28.88±6.50*	34.60±6.81**	30.25±5.02*	363.06±15.64**	0.025 87±0.007 70
对照组	1.20±0.15	19.20±4.93	7.50±0.67	34.95±3.82	311.00± 3.50**	0.023 03±0.004 50

组别	Ca^{2+}(mmol/L)	Na^-(mmol/L)	K^+(mmol/L)	Cl^-(mmol/L)	Mg^{2+}(mmol/L)
模型组	1.38±0.19**	143.58±4.78	6.98±1.57	108.75±5.61*	0.69±0.21*
对照组	2.50±0.28	146.00±1.15	5.75±0.20	101.00±1.45	1.01±0.44

注：与对照组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$；PO_2：血氧分压，PCO_2：血二氧化碳分压，SaO_2：血氧饱和度，BUN：尿素氮；AG：阴离子隙

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 脑组织结构的改变(光镜下 HE 染色):模型组脑实质内血管周围间隙明显增宽,病变呈弥漫性,少数见炎性细胞包绕血管周围,形成袖套状浸润;神经元结构模糊,有髓神经纤维、无髓神经纤维无明显异常变化(见图 1)。对照组动物脑组织光镜下无异常。

2.4 超微结构的变化:模型组动物脑实质内血管壁塌陷,内皮细胞部分区域结构消失,电子密度增高,呈均匀不规则物质,紧密连接结构破坏,基底膜与内皮细胞混合成均匀一致物质,周细胞外见大片空晕,即血管外水肿区(见图 2);神经元细胞膜消失,胞浆内呈空晕,内浆网扩张成囊泡状,粗面内质网上糖原颗粒消失,线粒体肿胀,核膜消失,染色质靠边排列(见图 3)。对照组动物脑组织超微结构无变化。

2.5 ALP 酶细胞化学染色:对照组 ALP 酶反应物显示高电子密度物,呈细颗粒状分布在脑实质血管内皮细胞上(见图 4),形成明显的酶活性带;在神经元内浆网上也有颗粒状酶活性存在,内浆网结构正常。模型组脑血管内皮细胞上 ALP 酶活性明显减少,酶活性带消失;神经原内浆网破坏,酶活性也减少(见图 5),与对照组有明显差别。

2.6 iNOS 免疫组化染色:模型组脑实质内血管上见表达较强的黄色阳性物附着于血管壁(见图 6)。对照组为阴性。

3 讨 论

血-脑脊液屏障存在于血液与脑组织之间,限制某些物质进入脑组织,保护神经组织功能,它由脑毛细血管内皮细胞、基底膜和神经胶质细胞构成。毛细血管内皮细胞之间以紧密连结封闭,内皮外有基底膜、周细胞和星形胶质细胞足突包裹血管壁外,形成形态学屏障。另外,它还存在功能性屏障:内皮细胞对某些物质具有选择性通过的能力,甚至有逆浓度转运的功能,内皮细胞是构成血-脑脊液屏障的主要结构。血管内皮细胞功能完善,很多物质不能透过血管壁;发生功能障碍时,血管壁内外浓度差随之消失,异常物质就透过血-脑脊液屏障。血管内皮细胞膜上存在 ALP 酶,膜转运功能愈强,酶活性也愈强,ALP 酶活性的多少、分布状态可以部分反映血-脑脊液屏障功能[3]。Albreacht 等[4]给动物腹腔注射氧

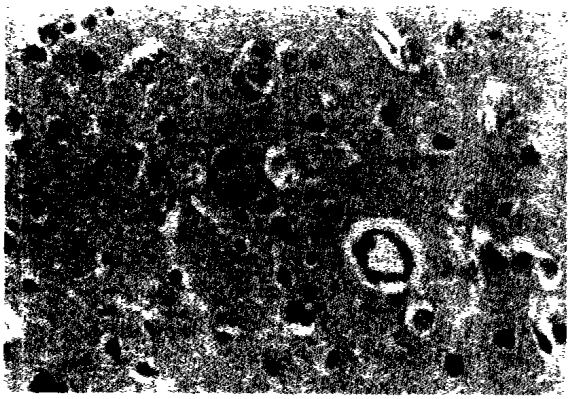

图 1 模型组脑实质内水肿(HE,×200)

Fig. 1 Brain edema in the parenchyma in the model group (HE, ×200)

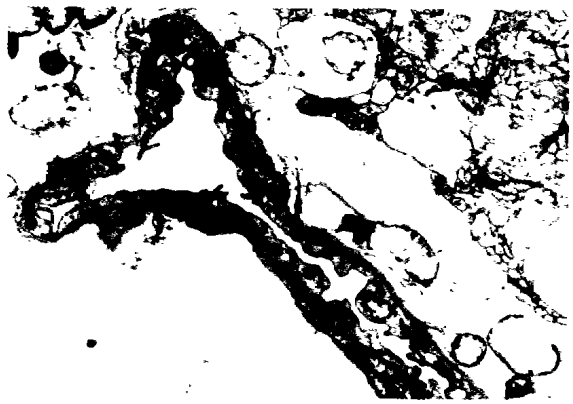

图 2 模型组血管内皮损伤,血管周围水肿(电镜,×5 000)

Fig. 2 Edema around vessels and the damages on endothelium of vessels in the model group (ultrastructure, ×5 000)

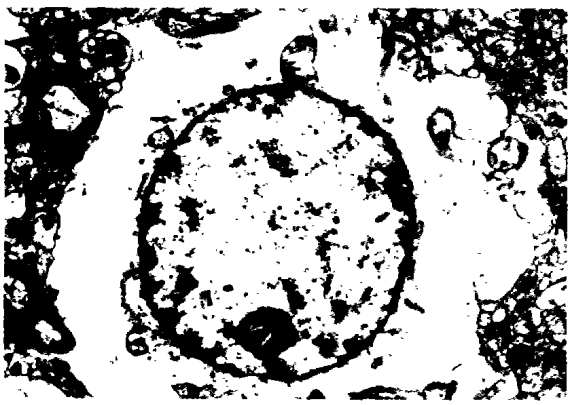

图 3 模型组神经元坏死(电镜,×5 000)

Fig. 3 Necrosis of neuron in the model group (ultrastructure, ×5 000)

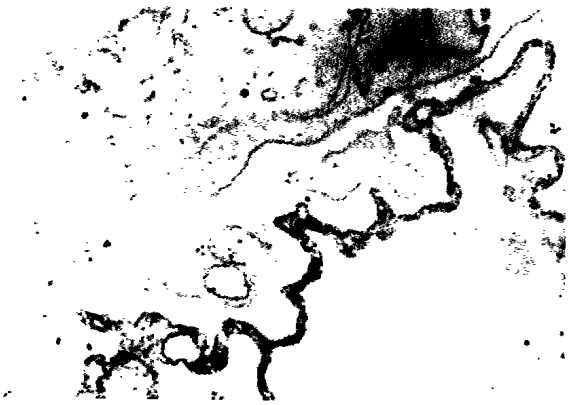

图 4 对照组血管膜上的正常 ALP 酶活性呈高电子密度物(×12 000)

Fig. 4 ALPase activity showed material of high election density in endothelium of vessels in the control group (×12 000)

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 5　模型组血管膜上的 ALP 酶活性减少(×5 000)

Fig. 5　Decrease of ALPase activity on endothelium of vessels and the damage of vessels in the model group(×5 000)

图 6　模型组脑实质内血管上 iNOS 活性沉积(×400)

Fig. 6　iNOS activity in vessels in brain parenchyma in the model group(×400)

化汞，用 ALP 酶细胞化学的方法证实脑毛细血管上的漏出与 ALP 酶活性一致，首先用细胞化学 ALP 酶活性定位法观察血-脑脊液屏障功能。本研究中也用 ALP 酶细胞化学染色法，观察到正常对照组细胞膜 ALP 酶活性强，转运功能活跃；模型组内皮细胞膜上 ALP 酶活性显著减少，反映血-脑脊液屏障转运功能受到破坏。

EB 是观察血-脑脊液屏障损伤的重要指标之一，当血-脑脊液屏障破坏时，脑组织内 EB 浓度可显著增高，目前已广泛用于脑损伤、脑水肿的实验研究。Bemana等[5]用 EB 荧光染色法观察冷损伤脑水肿血-脑脊液屏障渗透性的变化，发现通透性有明显变化。刘海东等[6]在脑液压伤模型中观察伤侧脑组织内不同时间吸光度的变化发现，损伤 6 h *A* 值达高峰，与对照组有显著性差异。本研究中可见模型组 EB 的 *A* 值较对照组略增加，但无统计学意义，表明本模型动物的血-脑脊液屏障渗透性有改变，但未达到统计学差别。

光镜和超微结构可见模型组动物有脑水肿，神经元损伤，与 ALP 酶组织化学反应相一致，形态学变化和 ALP 酶改变均是定性变化，是血管内皮和神经元损伤的指标，而 EB 则反映了血管渗出程度，这两者可从不同层面反映损伤，但不完全等同。

通过上述指标观察，DKA 时血-脑脊液屏障损伤是产生脑水肿、脑损伤的基础。

血管内皮细胞分泌的多种活性物质中还包括一氧化氮(nitric oxide，NO)，NO 是舒张血管因子，可使局部血管扩张，起神经递质的作用；又对细胞有毒性作用，是组织损伤的诱发因子和各种病变的增强因子。由于 NO 由 NOS 所催化生成，NOS 在体内稳定，可以检测 NOS 以反映 NO 的情况。Schilling 等[7]认为脑水肿与组胺、花生四烯酸及自由基、NO 的产生等有关。近期也有研究认为糖尿病脑组织形态学异常与 NO 增加造成损害有关[8]；糖尿病肾病与 NO 活性、稳定性减弱和其有毒产物增多有关[9]。本研究结果显示，血管 iNOS 酶活性表达增加，间接反映了 NO 大量生成可能造成血管内皮损伤，破坏了血-脑脊液屏障，导致脑水肿和脑损伤。

参考文献：

1　Harris G D, Fiordalisi I, Yu C. Maintaining normal intracranial pressure in a rabbit model during treatment of severe diabetic ketoacidemia[J]. Life Sci, 1996, 59(20): 1695 - 1702.

2　Lewis P R, Knight D P. Cytochemical staining methods for electron microscopy[M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1992. 147.

3　Beuckmann C, Hellwig S, Galla H. Induction of blood brain - barrier - associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries is mediated via cAMP [J]. Eur J Biochem, 1995, 229(3): 641 - 644.

4　Albreacht J, Szumanska G, Gadamski R, *et al*. Changes of activity and ultrastructural localization of alkaline phosphatase in cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuride chloride [J]. Neurotoxicology, 1994, 15(4): 897 - 902.

5　Bemana I, Nagao S. Treatment of brain edema with a nonpeptide arginine vasopressin V_1 receptor antagonist OPC - 21268 in rats [J]. Neurosurgery, 1999, 44(1): 148 - 155.

6　刘海东，王文仲，周晓平，等. 鼠脑液压伤后血脑屏障通透性变化对磷脂酶 A_2 和脑水肿的影响[J]. 中国危重病急救医学，1998，10(6)：326 - 328.

7　Schilling L, Wahl M. Brain edema: pathogenesis and therapy [J]. Kidney Int Suppl, 1997, 51(59): S69 - S75.

8　陈国荣，徐正协，毛孙忠，等. 糖尿病大鼠脑组织学及脂质过氧化和一氧化氮水平的变化[J]. 中国病理生理杂志，2001，17(4)：333 - 334.

9　Craven P A, DeRubektis F R, Melhem M. Nitric oxide in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int Suppl, 1997, 52(60): S46 - S53.

(收稿日期：2003 - 08 - 13　修回日期：2004 - 02 - 22)

(本文编辑：李银平)