

丁苯酞对脑缺血再灌注大鼠神经细胞超微结构及细胞凋亡的影响

张晓璇 邱海鹏

河北承德附属医院神经内科 承德 067000

【摘要】 目的 探讨丁苯酞对脑缺血再灌注大鼠神经细胞超微结构及细胞凋亡因子 bcl-2、bax 和 caspase-3 表达的影响。方法 采用大脑中动脉线栓法造缺血再灌注模型,分为假手术组、模型组和丁苯酞组,丁苯酞组大鼠在造模前 3 d 给予 80 mg/(kg·d) 丁苯酞,其他组大鼠给予同剂量的生理盐水。使用透射电镜观察神经细胞超微结构,并使用 TUNEL 法检测细胞凋亡情况,使用免疫组化法检测 bcl-2、bax 和 caspase-3 表达情况。结果 丁苯酞组脑细胞超微结构损伤轻于模型组,大部分线粒体膜较完整,空泡少,内质网形态较正常,高电子密度颗粒较少,染色质出现轻度聚集,核仁可见;假手术组、丁苯酞组和模型组凋亡细胞指数依次升高,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);假手术组、丁苯酞组和模型组 bax 和 caspase-3 依次升高,各组间相互比较差异有统计学意义($P<0.05$);假手术组、模型组和丁苯酞组 bcl-2 依次升高,各组间相互比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 丁苯酞可有效改善脑缺血再灌注大鼠神经细胞超微结构,使细胞凋亡减少,其发挥药效可能是通过对 bcl-2、bax 和 caspase-3 水平的调节实现的。

【关键词】 脑缺血再灌注;丁苯酞;细胞凋亡;细胞超微结构

【中图分类号】 R-322 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5110(2015)24-0042-02

近年来,缺血性脑卒中的发病率越来越高,严重威胁着人类的健康,脑缺血再灌注损伤对该类疾病的预后具有较大的影响,细胞凋亡是脑缺血再灌注损伤的主要病理基础。丁苯酞 (dl-3n-butylphthalide, NBP) 对缺血性脑卒中具有较好的临床效果,能从多条途径改善患者的临床症状。bcl-2、bax 和 caspase-3 对细胞凋亡具有重要的调控作用,可导致蛋白酶级联反应的发生而引起凋亡^[1-2]。笔者通过造脑缺血再灌注损伤模型,探讨丁苯酞对脑缺血再灌注大鼠神经细胞超微结构及细胞凋亡因子 bcl-2、bax 和 caspase-3 表达的影响,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物和处理 SD 雄性大鼠共 108 只,体质量(250±20)g,购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场,随机分为假手术组、模型组和丁苯酞组,丁苯酞组,每组 36 只,大鼠在造模前 3 d 以 80 mg/(kg·d) 的剂量给予丁苯酞,其他组大鼠给予同剂量的生理盐水。使用大脑中动脉内线栓阻断法制造脑缺血再灌注模型,造模成功 2 h 后拔除线栓,再灌注 24 h。每组使用 12 只用于神经细胞超微结构的观察,12 只用于 TUNEL 法检测细胞凋亡,12 只用于 bcl-2、bax 和 caspase-3 表达的检测。

1.2 神经细胞超微结构、凋亡细胞和免疫组化处理 缺血 2h 再灌注 24 h 后麻醉并开胸,右心耳放血并使用生理盐水灌流,最后用多聚甲醛灌注固定,取脑组织,制作石蜡切片,苏木精-伊红染色,使用透射电镜观察神经细胞超微结构。并使用 TUNEL 染色观察凋亡细胞,凋亡细胞特征:浓聚并集聚的核染色质,有凋亡小体存在;使用 SpectrumSee 医学图像分析系统对凋亡细胞和总细胞进行计数,凋亡细胞指数(AI)=[(凋亡细胞数/总细胞数)×100%]。bcl-2、bax 和 caspase-3 免疫组化试剂盒购于上海美轩生物科技有限公司,阳性细胞判断:bcl-2 胞浆和胞膜呈棕黄色着色;bax 胞浆呈棕黄色着色;caspase-3 细胞质、胞核呈棕黄色着色。使用 BandScan 图像分析软件计算各免疫组化结果的积分光密度值。

1.3 统计学分析 实验数据使用 SPSS 19.0 软件处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组脑细胞超微结构的差异 假手术组:规则的细胞形状,胞质内可见丰富的圆形或棒槌形线粒体,有较整齐的内嵴,且清晰呈现,无空泡变性,散在分布有粗面内质网,密集核糖体依附其上,核规则且圆,有完整的核膜,有明显的核仁,染色质均匀,具有较高的电子透明度。模型组:不规则的细胞外形,线粒体内嵴出现断裂、减少、甚至消失,有大量空泡存在,粗面内质网上的核糖体出现较多的脱落,胞质内存在高电子密度颗粒,核膜发生崩解,染色质聚集且靠边。

丁苯酞组:脑细胞超微结构损伤轻于模型组,大部分线粒体膜较完整,空泡少,内质网形态较正常,高电子密度颗粒较少,染色质出现轻度聚集,核仁可见。

2.2 各组脑组织凋亡细胞指数的差异 假手术组、丁苯酞组和模型组凋亡细胞指数依次升高,各组间相互比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组脑组织凋亡细胞指数的差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	凋亡细胞指数 %
假手术组	12	3.64±1.42* [#]
模型组	12	39.43±3.25 ^{&}
丁苯酞组	12	25.73±2.63

注:与模型组比较, $t=34.957$, $*P=0.000$;与丁苯酞组比较, $t=25.602$, $^{\#}P=0.000$;与丁苯酞组比较, $t=11.351$, $^{\&}P=0.000$

2.3 各组脑组织 bcl-2、bax 和 caspase-3 的差异 假手术组、丁苯酞组和模型组 bax 和 caspase-3 依次升高,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);假手术组、模型组和丁苯酞组 bcl-2 依次升高,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组脑组织 bcl-2、bax 和 caspase-3 积分光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	bcl-2	bax	caspase-3
假手术组	12	1.63±0.53 ^{ab}	2.16±0.47 ^{ab}	2.47±1.04 ^{ab}
模型组	12	17.84±3.52 ^c	8.64±2.11 ^c	36.47±4.85 ^c
丁苯酞组	12	26.74±4.36	5.84±1.85	21.53±3.88

注:与模型组比较, $t=15.775$, 10.384 , 23.745 , $*P=0.000$, 0.000 , 0.000 ;与丁苯酞组比较, $t=19.805$, 6.679 , 16.437 , $^bP=0.000$, 0.000 , 0.000 ;与丁苯酞组比较, $t=5.502$, 3.456 , 8.333 , $^cP=0.000$, 0.001 , 0.000

3 讨论

缺血性脑血管疾病 (ischemic cerebral vascular disease, ICVD) 急性期的血液存在中断,神经细胞在缺血缺氧的环境中,导致细胞的能量代谢发生异常,及时恢复缺血脑区的血液供应对该类疾病的治疗极为重要,但脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 对患者的预后也存在巨大的影响,如何预防缺血性脑血管疾病脑缺血再灌注损伤的发生成为该类疾病研究的新重点^[3]。神经元凋亡对脑缺血再灌注损伤的程度具有较大的影响,防止细胞凋亡成为减少缺血再灌注损伤的关键。

凋亡相关蛋白含量的变化在细胞凋亡过程中发挥重要

作用。Bcl-2 是一类膜整合蛋白,存在于线粒体、内质网等细胞器膜上,其对细胞凋亡具有较强的抑制作用,其在缺血过程中表达增加,但时间超过 24 h 后其表达逐渐降低,其浓度的升高可对神经细胞形成保护作用^[4]。bax 蛋白是一类促凋亡蛋白质,存在于胞内膜、胞浆和细胞核,具有促进细胞凋亡的作用,其通过形成二聚体而发挥调节作用,其含量增加可增加线粒体的通透性,导致细胞色素 C 释放入胞增多,引发细胞凋亡^[5]。Caspase-3 是白介素-1 转换酶家族中的一员,是一类半胱氨酸蛋白酶,其可以和天冬氨酸残基发生结合并进行剪切,其是调控细胞凋亡的重要执行者和关键蛋白酶^[6]。正常情况下,Caspase-3 是以无活性的状态下存在的,凋亡信号可使 Caspase-3 激活,形成了细胞凋亡的级联反应,形成凋亡底物。Caspase-3 的存在是细胞凋亡的必经之路,对 DNA 裂解修复功能具有重要影响。

丁苯酞是一类消旋体,在芹菜籽中存在其左旋体。丁苯酞可改变脑血流动力学,促进缺血区脑组织的血供,对脑组织的微循环具有改善作用^[7]。丁苯酞对脑缺血期线粒体膜流动性具有调节作用,能稳定线粒体膜电位,改善神经细胞的能量代谢,对自由基的生成也有抑制作用^[8]。

本研究中,丁苯酞组脑细胞超微结构损伤轻于模型组,大部分线粒体膜较完整,空泡少,内质网形态较正常,高电子密度颗粒较少,染色质出现轻度聚集,核仁可见,假手术组、丁苯酞组和模型组凋亡细胞指数依次升高($P<0.05$),说明丁苯酞能稳定缺血再灌注大鼠神经细胞的形态,抑制细胞凋亡的发生。假手术组、丁苯酞组和模型组 bax 和 caspase-3 依次升高($P<0.05$),假手术组、模型组和丁苯酞组 bcl-2 依次升高($P<0.05$),说明丁苯酞能降低 bax 和 caspase-3 水平,增加 bcl-2 水平,抑制细胞凋亡的发生。焦东亮等^[9]研究认为,丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其作用机制可能与抑制 caspase-3 表达相关。李国前等^[10]研究认为,丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与上调 Bcl-2 的表达、下调 Bax 的表达有关。蒋亮亮等^[11]研究认为,丁苯酞对在体外模拟脑缺血再灌注诱导的神经元损伤中的保护作用可能与其抑制 Caspase-3 表达,下调 bax/bcl-2 比值有关。

综上所述,丁苯酞能稳定脑缺血再灌注大鼠神经细胞超

微结构,使细胞凋亡减少,其发挥药效可能是通过增加 bcl-2 的表达,降低 bax 和 caspase-3 水平实现调节。

4 参考文献

- [1] 李延可,刘宁,谷有全,等.丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑程序性凋亡因子-5 表达的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2012,15(10):6-9.
- [2] 陈晓春.丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注神经元形态和 BaxmRNA 表达变化的影响[J].江西医学院学报,2009,49(2):10-12.
- [3] 张培蕾,鲁海清,朱悦奇,等.丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].介入放射学杂志,2012,21(3):239-242.
- [4] 李其富,陈志斌,王淑荣,等.丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2 表达的影响[J].华西药杂志,2011,26(4):325-327.
- [5] Wang YG, Li Y, Wang CY, et al. L-3-n-butylphthalide protects rats' cardiomyocytes from ischaemia/reperfusion-induced apoptosis by affecting the mitochondrial apoptosis pathway [J]. Acta Physiol, 2014, 210(3):524-533.
- [6] 周小琳,于首元.丁苯酞软胶囊对大鼠局灶性脑缺血后梗死体积和神经凋亡相关蛋白 bcl-2, caspase-3 表达的影响[J].中风与神经疾病杂志,2009,26(5):590-591.
- [7] 陈晓春,侯文利,刘星亮.丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注神经元形态和 Caspase-9 mRNA 表达的影响[J].西部医学,2009,21(8):1270-1272.
- [8] Li J, Li Y, Ogle M, et al. DL-3-n-Butylphthalide prevents neuronal cell death after focal cerebral ischemia in mice via the JNK pathway[J]. Brain Res, 2010, 1359:216-226.
- [9] 焦东亮,倪秀石,高艳,等.丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 caspase-3 表达的影响[J].中国临床神经科学,2007,15(1):19-23.
- [10] 李国前,王杰华,杨小霞,等.丁苯酞对大鼠脑缺血再灌注损伤后凋亡相关因子表达的影响[J].中国临床药理学杂志,2011,27(9):682-685.
- [11] 蒋亮亮,张镛,瑞霞,等.左旋丁苯酞在体外模拟脑缺血再灌注诱导的神经元损伤中的保护作用[J].山东医药,2008,48(22):3-5.

(收稿 2014-12-11)

腺苷钴胺对老年糖尿病周围神经病变患者 Hcy 水平的影响

万 欢 任汉强

江汉大学附属医院武汉市第六医院内分泌科 武汉 430015

【摘要】 目的 探讨腺苷钴胺对老年糖尿病(T2DM)周围神经病变患者血清同型半胱氨酸(Hcy)水平的影响。方法 2 型糖尿病老年患者共 72 例,随机分为单纯性糖尿病组、周围神经病变组,对照组为我院同期收治的 30 例非糖尿病患者,采用 ELISA 法测定血清同型半胱氨酸水平;周围神经病变组给予腺苷钴胺 1 mg 肌肉注射治疗,1 次/d,14 d/疗程,连续治疗 2 个疗程,比较治疗前后的 Hcy 水平及神经电生理水平。结果 周围神经病变组的 Hcy 水平明显高于单纯性糖尿病组及对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);周围神经病变组血清 Hcy 水平及神经传导速度明显改善,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 腺苷钴胺可明显降低 T2DM 患者的血清 Hcy 水平,同时改善周围神经的传导异常情况,值得临床推广使用。

【关键词】 糖尿病周围神经病变;老年人;腺苷钴胺;同型半胱氨酸;2 型糖尿病

【中图分类号】 R587.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5110(2015)24-0043-02

糖尿病周围神经病变是临床上 2 型糖尿病常见的慢性并发症之一,该病严重威胁和影响患者生活质量^[1]。血清同型半胱氨酸(Hcy)是人体内含硫氨基酸的一个重要的代谢中间产物,可能是动脉粥样硬化等心血管疾病发病的一个独立危险因素,同时也广泛存在于糖尿病的慢性并发症中,所以当体内的 Hcy 水平升高时往往存在心血管病变的可能性;此外,糖尿病周围神经发生病变时,患者的感觉神经传导速度和运动神经传导速度会发生明显变化^[2],需严格控制疾病的发展并及时采用有效手段治疗。本文探讨腺苷钴胺对老年糖尿病周围神经病变患者血清 Hcy 的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013-01—2014-01 我院内分泌科收治住院的 2 型糖尿病老年患者 72 例,男 40 例,女 32 例;平均年龄(67.28±8.34)岁;单纯糖尿病 35 例,糖尿病合并周围神

经病变(DPN)37 例。DPN 组纳入标准:四肢运动神经感觉异常,肢体麻木,肌肉萎缩,疼痛;肌电图显示正中神经和腓总神经传导异常。以上糖尿病患者均符合 1999 年 WHO 制定的糖尿病诊断标准^[3]:空腹血糖的葡萄糖水平(FPG)≥7.0 mmol/L,或糖尿病症状加任意时间血浆葡萄糖水平≥11.1 mmol/L,或葡萄糖耐量试验(OGTT)≥11.1 mmol/L。选取同期收治的 30 例非糖尿病患者为对照组,男 18 例,女 12 例;平均年龄(67.76±9.21)岁。所患疾病包括慢性胃炎、骨质增生、慢性气管炎,根据 OGTT 均排除患糖尿病的可能性。3 组年龄及性别方面均无显著差别($P>0.05$),且均无心、肝、肾功能的障碍,具有可比性。

1.2 方法 各组入院次日清晨空腹采血,静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 15 min,血清采用酶联免疫吸附实验法(ELISA)检测同型半胱氨酸水平(Hcy),实验操作严格按照说明书要求进行。血清 Hcy 浓度≥15 μmol/L 则诊断为高 Hcy 血