

通心络对低氧预适应小鼠神经元超微结构及内皮细胞自修复能力的影响*

吴相春^{1,2Δ}, 来静³, 吴相锋², 贾振华¹, 魏聪¹, 王宏涛¹

(1. 河北以岭医药研究院, 石家庄 050035; 2. 河北以岭医院, 石家庄 050091; 3. 石家庄市第三医院, 石家庄 050017)

【摘要】 目的: 观察低氧预适应对小鼠脑皮层神经元和内皮细胞超微结构的改变及通心络的作用。方法: 40只小鼠随机分为正常对照组、低氧组、低氧预适应组和通心络组(低氧预适应+通心络), 利用重复低氧5次复制低氧预适应小鼠模型后, 记录小鼠每次低氧耐受的时间, 观察脑皮层神经元和血管内皮细胞超微结构的改变。结果: 随着低氧次数的增加, 预适应组和通心络组小鼠耐受时间增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与预适应组比较, 通心络组小鼠耐受时间增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 低氧组小鼠脑皮层内皮细胞和神经元超微结构发生明显改变, 预适应组小鼠脑组织神经元及血管内皮细胞超微结构改善, 通心络组脑组织神经元及血管内皮细胞超微结构明显改善。结论: 低氧预适应显示出机体具有强大的自修复能力, 通心络能明显增强机体的自修复能力, 提高自适应性。

【关键词】 低氧预适应; 通心络; 自修复; 神经元; 内皮细胞

【中图分类号】 R329.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2011)04-396-04

Effects of Tongxinluo on neuron ultrastructure and endothelial cell self-repairing ability in hypoxia preconditioning mice

WU Xiang-chun^{1,2}, LAI Jing³, WU Xiang-feng², JIA Zhen-hua¹, WEI Cong¹, WANG Hong-tao¹

(1. Hebei Yiling Pharmaceutical Research Institute, Shijiazhuang 050035; 2. Hebei Yiling Hospital, Shijiazhuang 050091, China;

3. The Third Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050017, China)

【ABSTRACT】 **Objective:** To observe the ultrastructure changes of cerebral cortex neuron and endothelial cell in hypoxia preconditioning mice and the effects of Tongxinluo (TXL, Chinese traditional medicine) on them. **Methods:** Mice were randomly divided into 4 groups: control group, hypoxia group, hypoxia preconditioning (HP) group and Tongxinluo (TXL) group. The hypoxia preconditioning mice were exposed by repetitive hypoxia for 5 runs. The animals' tolerance time of each hypoxia run was recorded. The ultrastructure change of cerebral neuron and endothelial cell were studied by electron microscope. **Results:** The hypoxic tolerance time in HP and TXL groups were significantly increased run by run. Compared with HP group, the tolerance time of TXL group were increased in every run. The ultrastructure of cerebral neuron and endothelial cell in hypoxia group changed obviously, mitochondrion and endoplasmic reticulum destroyed. However they were slighter in HP group than those in hypoxia group. The change in TXL group had no obvious difference with control group and were slighter than those in HP group. **Conclusion:** Hypoxia preconditioning shows that organism has a strong self-repairing ability. Tongxinluo self-repairing could increase self-repairing ability and adaptive ability of mice to hypoxia obviously.

【KEY WORDS】 hypoxia preconditioning; Tongxinluo; self-repairing; neuron; endothelial cell

低氧时血管内皮细胞是组织中受攻击的第一道靶器官, 低氧可造成血管内皮细胞凋亡和坏死, 从而影响内皮细胞许多重要生理功能的发挥。机体所有组织中, 神经系统, 特别是大脑皮层对低氧最为敏感, 脑组织是耐受低氧的最主要的限制因子。人体是有生命的活体, 受到一定范围内的损伤之后能够进行自我修复和自我调节以维持机体的正常生命活

动, 超过一定程度的损伤, 则导致疾病的发生。预适应是生物界中普遍存在的生物自我保护机能, 低氧预适应具有强大的保护和防御作用, 效果极其肯定, 但确切机制仍不明确^[1]。

通心络是临床上用于治疗心脑血管疾病的常用药物, 大量基础及临床研究证实具有较好的作用^[2]。本研究观察低氧预适应小鼠脑组织神经元及血管内皮的超微结构改变以及通心络的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

通心络超微粉(石家庄以岭药业有限公司提

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2005CB523301); 国家十一五“重大新药创制项目”: 络病理论指导药物开发集成创新技术平台建设(009ZX09313-003)

【收稿日期】 2010-11-19 **【修回日期】** 2011-03-21

【通讯作者】 E-mail: wxc222@163.com

供); 120 ml 广口瓶 120 个; 秒表 20 个; 橡胶塞 60 个。

1.2 实验动物及分组

标化动物雄性昆明小鼠 40 只, 购于北京大学医学部实验动物科学部, 许可证号: SCXK(京)2006-0008。按体重随机分为正常对照组, 低氧组, 预适应组和通心络组(低氧预适应+通心络)。

1.3 给药剂量及方法

根据通心络超微粉提高小鼠低氧耐受性的时效、量效关系实验结果^[3], 选择通心络超微粉组剂量为 1.52 g/kg, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制成浓度为 0.152 g/ml 混悬液, 按 0.1 ml/10 g 动物体重灌胃。空白对照组, 按 0.1 ml/10 g 动物体重用 0.5% CMC-Na 溶液灌胃。于实验前 5 d 开始给药, 末次给药 1 h 后实验, 实验周期为 5 d。

1.4 低氧方法

1.4.1 低氧预适应模型的复制 参照吕国蔚等^[4]的方法, 在室温 18℃~22℃下, 将小鼠称质量后放入含有新鲜空气、经过标定的约 120 ml 广口瓶内, 以橡皮塞密封、计时, 一旦动物出现喘呼吸时立即取出, 并随即转移到另一相似容积、含有新鲜空气的广口瓶内密闭、记时, 如此重复 5 次后进行低氧实验。各次倒瓶中从密闭开始到喘呼吸出现的时间为“原始耐受时间”, 观察它们低氧耐受时间的变化。

1.4.2 低氧模型 将低氧组小鼠称质量后放入含有新鲜空气、经过标定的约 120 ml 广口瓶内, 以橡皮塞密封、计时, 一旦动物出现喘呼吸时立即取出, 并记录时间。预适应组、通心络组小鼠放入相同容积的广口瓶内, 橡皮塞密闭, 低氧时间与低氧组的平均耐受时间相同。

1.5 观察指标

1.5.1 标准耐受时间 参照吕国蔚等^[2]的方法依下式算出相当于 100 ml 有效空气量下的“标准耐受时间”, 比较各次的耐受水平。T=喘呼吸出现时间×100/(120-小鼠体重/0.94)。

1.5.2 脑组织神经元及血管内皮细胞的超微结构 低氧实验结束后, 动物立即断头取血, 即刻取脑并于 2.5% 的戊二醛固定液中取脑皮层并休整后于 2.5% 的戊二醛固定液中固定。常规电镜样品制备, 透射电镜观察其超微结构的变化。

1.6 统计处理

所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 13.0 统计软件包, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两组间比较采用 t 检验, 组内比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠低氧耐受时间的变化

与低氧组比较, 预适应组和通心络组小鼠随着低氧次数的增加, 耐受时间明显增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与预适应组比较, 通心络组各次的低氧耐受时间明显增加, 具有统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表 1)。

Tab. 1 Effect of TXL on hypoxia tolerance time of mouse in three groups($\bar{x} \pm s$ n=10)

Group	H ₁ (minute)	H ₃ (minute)	H ₅ (minute)
Hypoxia	15.25 ± 3.36		
HP	15.57 ± 2.00	41.69 ± 9.04 *	51.44 ± 14.38 **
TXL	18.01 ± 2.37 [△]	68.34 ± 13.22 * ^{△△}	85.87 ± 6.95 ** ^{△△}

H₁: Hypoxia exposure once; H₃: Hypoxia exposure 3 times; H₅: Hypoxia exposure 5 times; Hypoxia: Hypoxia exposure only once; HP: Hypoxia preconditioning; TXL: Tongxinluo(Chinese traditional medicine)

* $P < 0.01$ vs H₁ in the same group; ** $P < 0.05$ vs H₃ in the same group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs HP group at the same hypoxia exposure times

2.2 各组小鼠脑皮层超微结构的改变

2.2.1 神经元超微结构的改变 正常组小鼠大脑皮层神经元细胞核核膜完整, 核内染色质密度均一, 胞浆内线粒体、粗面内质网形态和分布均正常。低氧组神经元细胞肿胀, 核膜部分溶解或消失, 异染色质边集; 线粒体肿胀, 嵴大部分断裂或消失, 粗面内质网扩张。与低氧组比较, 低氧预适应组小鼠神经元, 核膜轮廓基本显示, 核内染色质密度较均一, 见染色质边集, 线粒体轻度肿胀, 嵴形态明显好转, 内质网轻度扩张。与预适应组相比, 通心络组小鼠神经元核膜基本清楚, 核内染色质密度较均一, 少见染色质边集, 线粒体形态及分布基本正常, 接近正常状态。

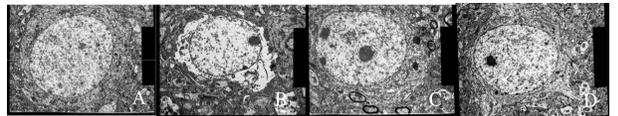


Fig. 1 Ultrastructure changes of cerebral neuron by electron microscopy (×6 k)

A: Control; B: Hypoxia; C: Hypoxia Preconditioning; D: TXL

2.2.2 血管内皮细胞超微结构的改变 正常对照组小鼠脑血管内皮细胞呈长椭圆形, 细胞核内染色质细密, 有高尔基体、内质网和线粒体, 核周胞浆丰富, 质膜完整, 细胞间紧密连接存在, 基底膜连续完整。低氧组小鼠脑血管内皮细胞核染色质边集, 血

管基质水肿, 线粒体空泡化, 粗面内质网扩张, 嵴减少, 核膜溶解或消失, 基膜断断续续, 细胞间紧密连接中断, 部分模糊不清。与低氧组比较, 低氧预适应组小鼠脑微血管内皮细胞超微结构改善, 血管基质水肿明显减轻, 细胞器增多, 核膜存在, 线粒体肿胀减轻, 内质网扩张减轻, 嵴增多。与预适应组比较, 通心络组小鼠脑微血管内皮细胞超微结构改善, 细胞器增多, 核膜基本完整, 粗面内质网扩张减轻, 嵴增多, 细胞间隙变小。

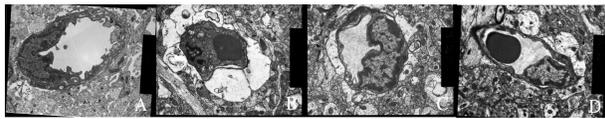


Fig. 2 Ultrastructure changes of cerebral endothelial cell by electron microscopy ($\times 6\text{ k}$)

A: Control; B: Hypoxia; C: Hypoxia Preconditioning; D: TXL

3 讨论

目前, 人类对低氧所触发的机体许多适应和不适应的系统反应的认识还很少^[5]。预适应是预先给予机体一个轻、中度的短暂刺激, 间隔一段时间后, 机体适应能力增强, 能耐受更加严重持久的刺激, 是机体重要的内源性保护机制。再生和修复是生物界在长期进化过程中获得的自我防御机制之一。

低氧存活时间是判断低氧耐受性高低的重要指标, 本实验结果显示, 预适应组与通心络组随着低氧次数的增加, 小鼠耐受低氧的时间逐次增加。与预适应组比较, 通心络组小鼠的耐低氧时间明显增加。提示机体对低氧等刺激具有强大的耐受能力, 低氧预适应小鼠通过自身适应机制可以提高机体的低氧耐受性, 而通心络能够提高低氧预适应小鼠的自适应能力, 提高低氧预适应小鼠的低氧耐受性。

既往多项研究证实通心络对内皮细胞、神经元具有保护作用, 而内皮细胞的保护对于心脑血管疾病的防治具有重要意义^[2]。本研究结果显示低氧预适应的过程中, 低氧组小鼠脑微血管内皮细胞及神经元的超微结构发生明显改变, 而低氧预适应组小鼠超微结构较低氧组好转, 通心络组小鼠脑组织神经元和微血管内皮细胞超微结构明显改善。表明低氧可造成小鼠脑皮层神经元损伤; 低氧预适应可减轻低氧所导致神经元的损伤, 而通心络可明显减轻低氧导致神经元的损伤, 具有促进低氧预适应对神经元的保护作用。

低氧预适应不仅能改善神经元的结构, 还能改善其功能。既往研究发现低氧预适应对大鼠星形胶质细胞低氧损伤具有保护作用, 低氧损伤上调了星

型胶质细胞 Bax 表达, 抑制了 Bcl-2, 从而引起细胞凋亡, 而低氧预适应通过激活内源性的保护手段促使星型胶质细胞高表达 Bcl-2 并且低表达 Bax^[6]。低氧引起大鼠海马 CA1 区神经元凋亡等病理改变, 并导致学习记忆能力降低, 预低氧对海马 CA1 区神经元的低氧性损伤具有保护作用, 并能有效减轻严重低氧所导致的学习记忆能力下降^[7]。

低氧预适应及通心络保护神经和血管内皮细胞的机制可能与低氧诱导因子 1 (HIF-1) 的生物学效应有关。低氧预适应可明显提高低氧小鼠的 HIF-1 α 蛋白表达, HIF-1 可以诱导下游靶基因如血管内皮生长因子 (VEGF), 促红细胞生成素 (EPO) 等几十种物质的转录, 从而产生一系列代偿反应, 促进细胞的生长和代谢^[8]。VEGF 是已经明确具有脑保护功能的生长因子, 低氧预适应能明显增加 VEGF 的表达, VEGF 可以通过直接刺激细胞而不通过血管新生使细胞在低氧环境下生存, 作为营养因子作用于运动神经元表面而阻止神经元坏死。因此 VEGF 增加可能参与预适应形成并参与脑保护^[9]。通心络通过促进缺血病灶侧脑组织 VEGF-mRNA 表达增加, 从而诱导内源性神经干细胞的增殖, 促进脑缺血损伤后神经功能恢复^[10]。通心络可明显抑制低氧引起的血管内皮细胞 Caspase-3 活性增高并减少低氧所诱导的动脉内皮细胞凋亡^[11]。

机体低氧时, 通过触发、启动自身调控机制产生各类保护性因子抑制损伤因子, 通过机体自适应, 调节系统内部联系, 修复机体组织细胞从而实现代偿达到稳态平衡。本研究结果表明低氧预适应能激活机体的自修复等内源性保护机制, 改善低氧小鼠脑组织神经元和微血管内皮细胞的超微结构, 而通心络能够明显改善低氧预适应小鼠脑组织神经元和微血管内皮细胞的超微结构, 具有提高小鼠自修复能力的作用。

感谢河北医科大学电镜室对本研究电镜技术的支持; 感谢河北以岭医药研究院药理室的支持。

【参考文献】

- [1] 吕国蔚, 崔秀玉, 吴滨镛. 脑低氧/缺血性预适应的机制[J]. 基础医学与临床, 1997, 17(1): 8.
- [2] 吴以岭. 络病理论科学求证[M]. 北京: 科学出版社, 2007. 67-372.
- [3] 吴相春, 来静, 吴以岭, 等. 通心络超微粉提高小鼠缺氧耐受性的时效、量效研究[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(11): 1986-1987.
- [4] 吕国蔚, 史美棠, 李凌, 等. 急性重复缺氧对小鼠缺氧耐受性的影响及其机制的初步探讨[J]. 中国病理

- 生理杂志, 1992, 8(4): 425-429.
- [5] Grocott M P, Martin D S, Levett D Z, *et al.* Arterial blood gases and oxygen content in climbers on mount everest[J]. *N Eng J Med*, 2009, 360(2): 140-149.
- [6] 周 焜, 张海福, 刘发益, 等. 低氧预适应对离体星形胶质细胞低氧耐受性的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2008, 24(1): 30-34.
- [7] 陈 建, 黄 斌, 高钰琪, 等. 预缺氧对大鼠低压缺氧性脑损伤保护作用的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(22): 2113-2115.
- [8] Powell F L, Fu Z. HIF-1 and ventilatory acclimatization to chronic hypoxia[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008, 164(1-2): 282-287.
- [9] 邵 国, 苏 燕, 张 胜, 等. 急性重复缺氧增加小鼠海马组织血管内皮生长因子的表达[J]. *包头学院学报*, 2006, 22(4): 362-364.
- [10] 王立新, 尹瑞雪, 孙景波. 通心络对脑缺血再灌注损伤后神经巢蛋白及 VEGF 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(12): 2131-2135.
- [11] 曾和松, 刘正湘, 马业新. 通心络抑制缺氧诱导的血管内皮细胞凋亡及机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2004, 10(3): 27-30.

caspase-3、bax、bcl-2 及 c-kit 在中华大蟾蜍 脊髓损伤后的表达变化*

李 平, 张 昱, 蔡亚非[△], 王 燕
(安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000)

【摘要】 目的: 探究高等动物脊髓损伤修复困难的原因。方法: 利用免疫组化方法检验中华大蟾蜍脊髓损伤后凋亡相关基因及 c-kit 的表达。结果: ①损伤后促凋亡因子 (caspase-3 及 bax) 随时间变化的规律为先升高再降低; ②抑制凋亡因子 bcl-2 表达规律为先降低后升高; ③ bcl-2/bax 比值的变化趋势与 caspase-3 的相反, bcl-2/bax 比值的升高可能抑制 caspase-3 表达; ④ c-kit 表达呈现先增高再降低的规律, c-kit 表达出现峰值时 bcl-2 表达增加, bax 减少。结论: 这些差异可能能够促进蟾蜍神经损伤后修复, 也是低等脊椎动物较高等脊椎动物再生能力强的原因之一, 为哺乳类脊髓损伤后修复方法研究提供一定的理论依据。

【关键词】 凋亡相关基因; c-kit; 脊髓损伤

【KEY WORDS】 apoptosis-related genes; c-kit; spinal cord injury

【中图分类号】 R73-3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2011)04-399-03

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是众多意外损伤中较为严重的一种, 具有发生率高, 致残、致死率高, 治疗耗费高, 恢复困难等特点, 其治疗一直是医学界的难题。脊髓损伤后伴随着一系列的基因调控, 包括细胞凋亡和基因转录等^[1], 细胞凋亡 (apoptosis), 是一个复杂的生理过程, 并存在加以调控的可能性。许多基因参与了细胞凋亡的调控, 其中半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 是多种凋亡途径的共同下游效应部分, 在细胞凋亡过程中发挥极其重要的作用。bcl 家族与凋亡也密切相关, 其中 bcl-2 是一种抑制凋亡基因, 能够抑制氧化物诱导的凋亡现象^[2], bax 则促进细胞凋亡。bcl-2 与 bax 相互作用, 形成异源二聚体参与抗氧化反应, 而 bcl-2/bax 的比值则影响细胞凋亡的发生, 是细胞死亡的调控器。c-kit 是一种受体酪氨酸激酶家族的原癌基因, 通过受体干细胞因子 (SCF) 系统参与细胞凋亡。高等脊椎动物 (如哺乳类) 的脊髓结构重建和功能恢复困难, 一旦损伤, 很难恢复到受伤前

状态, 而低等脊椎动物 (如两栖类) 再生能力较强, 一些低等动物在脊髓横断损伤后植入胚胎脊髓, 可以得到很好修复, 为探究高等脊椎动物损伤修复困难的原因, 本文选择两栖类模式动物蟾蜍作为实验材料, 测定蟾蜍脊髓损伤后凋亡相关基因 (caspase-3、bcl-2 和 bax) 以及 c-kit 在蛋白质水平的表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

成年中华大蟾蜍, 雌雄不限, 购自皖南医学院养殖中心, 3~4 年龄, 体重 (60±5) g, 饲养 3 d 后进行实验, 分成对照组和 SCI 处理两大组, 其中对照为假损伤组, 只切开椎板, 但不损伤脊髓, SCI 处理后分别在 6 h、12 h、24 h、72 h 和 168 h 共 5 个时间点取材, 总共分为 6 组 (n=4)。

1.2 试剂

兔抗鼠 caspase-3、bcl-2、bax 和 c-kit 多克隆抗体, 即用型抗兔 SABC 试剂盒, DAB 显色试剂盒, APES、PBS 缓冲液和枸橼酸盐缓冲液等均购自武汉博士德生物有限公司。

1.3 动物模型制作与取材

腹腔注射 0.4% 水合氯醛 0.4 g/kg 后, 俯卧位固定在实

【基金项目】 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2009A039); 安徽省科技人员服务企业计划项目 (10020303043)

【收稿日期】 2010-09-13 **【修回日期】** 2011-03-04

【通讯作者】 Tel: 13955332951; E-mail: yaifeicai@163.com