

• 基础研究 •

不同浓度川芎嗪的玻璃化保存液对施万细胞凋亡的作用*

刘建文[#], 欧云生, 蒋电明, 赵增辉

(重庆医科大学附属第一医院骨科 400016)

摘要:目的 探讨不同浓度川芎嗪(TMP)的玻璃化保存液对大鼠施万细胞凋亡及调控基因表达的影响,以便获得川芎嗪的最佳浓度。方法 20 只 SD 大鼠,切取双侧坐骨神经(共 40 条),将其随机分成 A、B、C、D、E 组,每组 8 条,分别用含不同浓度川芎嗪的玻璃化保存液在-20℃保存 3 周(A 组:0 mg/L、B 组:80 mg/L、C 组:160 mg/L、D 组:320 mg/L、E 组:640 mg/L)。3 周后取神经进行苏木素-伊红(HE)染色光镜检查;免疫组化法检测 Bcl-2、Bax;末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡。结果 D 组神经施万细胞凋亡数量明显少于其余各组施万细胞凋亡数量,A 组神经施万细胞凋亡数量明显多于其余各组施万细胞凋亡数量;D 组 Bcl-2 的阳性表达率最高,且明显高于其余各组,A 组 Bcl-2 的阳性表达率最低,且明显低于其余各组;D 组 Bax 阳性表达率明显低于其余各组,A 组 Bax 阳性表达率明显高于其余各组。结论 川芎嗪能通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而有效抑制施万细胞的凋亡,在-20℃含川芎嗪的玻璃化液保存大鼠坐骨神经,川芎嗪的浓度以 320 mg/L 最佳。

关键词:川芎嗪;施万细胞;玻璃化保存液;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.10.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)10-0973-02

Effects of vitreous cryopreservation with different concentration of tetramethylpyrazine on Schwann's cell apoptosis^{*}

Liu Jianwen[#], Ou Yunsheng, Jiang Dianming, Zhao Zenghui

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of vitreous cryopreservation with different concentration of tetramethylpyrazine on Schwann's cell apoptosis and the expression of regulating genes, in order to get the optimum concentration of tetramethylpyrazine. **Methods** 40 sciatic nerves obtained from 20 SD rats were randomly divided into 5 groups (n=8): A, B, C, D, and E groups, and preserved in vitreous cryopreservation solution with the concentration of tetramethylpyrazine: 0mg/L, 80mg/L, 160mg/L, 320mg/L, and 640 mg/L, respectively. All the groups were cryopreserved at -20℃ for 3 weeks. After 3 weeks, all the nerves were obtained for tests: HE staining for light-microscope test, Schwann's cell apoptosis was measured quantitatively by the terminal transferase UTP nick end labeling (TUNEL), and the expressions of Bcl-2 and Bax were determined by immunohistochemistry. **Results** The number of Schwann's cell apoptosis in D group was significantly smaller than that in other groups, and the number of Schwann's cell apoptosis in A group was significantly more than that in other groups ($P<0.05$). The expression of Bcl-2 in D group was significantly higher than that in other groups, and the expression of Bcl-2 in A group was significantly lower than that in other groups ($P<0.05$). The expression of Bax in D group was significantly lower than that in other groups, and the expression of Bax in A group was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$). **Conclusion** These findings suggest that at -20℃, vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine can depress Schwann's cell apoptosis by regulating the expression of Bcl-2 and Bax, and the optimum concentration of tetramethylpyrazine in vitreous cryopreservation is 320 mg/L.

Key words: tetramethylpyrazine; schwann's cell; vitreous cryopreservation; cell apoptosis

实验研究表明^[1-3],川芎嗪(tetramethylpyrazine TMP)可通过多种途径抑制细胞凋亡,对组织、器官(如中枢神经、肝、肾等)具有保护作用,但 TMP 对周围神经的作用报道甚少。本实验前期的研究表明^[4],TMP 可通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而抑制大鼠周围神经施万细胞(SCs)的凋亡,含 TMP 的玻璃化液在-20℃保存大鼠周围神经 3 周对 SCs 凋亡的抑制作用与在-196℃保存 3 周的效果接近。在本实验中作者采用含不同浓度 TMP 的玻璃化液在-20℃对大鼠坐骨神经进行冷冻保存 3 周,进一步探索在-20℃条件下,含 TMP 的玻璃化液中 TMP 的最佳浓度,并进一步探讨 TMP 抑制 SCs 凋亡的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 深低温冰箱(容声),双目显微镜(奥林

巴斯),病理组织包埋台(BMZ-Ⅲ型),超薄切片机(LEICA URME 2135 型),10%二甲亚砜(DMSO),20%小牛血清,非改良型高渗枸橼酸盐嘌呤溶液(HC-A 液),盐酸川芎嗪注射液(40 mg,2mL),免疫组化试剂盒,TUNEL 试剂盒。

1.2 保存液的制备 配制 5 瓶 100 mL 玻璃化液:HC-A 液(非改良型)70 mL,10%DMSO 10 mL,20%小牛血清 20 mL,密封置 4℃冰箱保存备用。分别在 5 瓶 100 mL 玻璃化液中加入 0、8、16、32、64 mg TMP,制备成含 TMP 浓度分别为 0、80、160、320、640 mg/L 的玻璃化液,密封置 4℃冰箱保存备用。

1.3 神经获取与分组 20 只月龄相同、饲养条件一致的成年健康 SD 大鼠,性别不限,体质量 200~250 g(由重庆医科大学实验动物中心提供)。3.5%水合氯醛麻醉、脱毛,常规手术方法暴露双侧坐骨神经,在距梨状肌下缘 5 mm 处开始游离并切

* 基金项目:重庆市卫生局中医药科研计划项目(2008-2-32)。

[#] 现在四川省仁寿县人民医院骨科。

取双侧坐骨神经干(长约 15 mm),共获得 40 条坐骨神经。经生理盐水洗涤后,将其随机分成 A、B、C、D、E 组,每组 8 条,分别放入含 TMP 浓度为 0、80、160、320、640 mg/L 保存液的冻存管中。各组均经 4℃冷平衡 30 min,然后在-20℃下保存 3 周。保存 3 周后将各组冻存的周围神经取出,在 38℃水浴中快速复温至解冻,进行大体观察,置入 10%中性甲醛液固定,石蜡包埋,切片后免免疫组化及末端标记法(TUNEL 法)检测。

1.4 观察指标和方法

1.4.1 HE 染色光镜观察 对神经切片行 HE 染色,光镜下大体观察细胞的存活、凋亡情况。

1.4.2 细胞凋亡的检测 采用 Roche 公司的细胞凋亡检测试剂盒,应用 TUNEL 法,DAB 显色,最后用苏木素液轻度复染,酒精脱水,二甲苯透明,封固切片,光镜观察结果。

1.4.3 Bcl-2/Bax 的检测 采用武汉博士德公司提供的一抗、二抗试剂盒。4 μm 厚切片,60℃烤片 3 h,SABC 法免疫组化染色技术(即用型 SABC 试剂盒)染色,最后用苏木素液轻度复染,脱水,二甲苯透明,封固切片,光镜观察结果。

1.5 结果判定

1.5.1 普通光镜下观察 HE 染色,凋亡细胞核固缩碎裂、呈蓝黑色、胞浆呈淡红色。正常细胞核呈均匀淡蓝色或蓝色,坏死细胞核呈很淡的蓝色或蓝色消失。

1.5.2 TUNEL 法检测细胞凋亡 正常细胞核呈蓝色,染色阳性信号为棕黄色,无阳性染色者为阴性。每条神经切片随机观察计数 5 个互不重叠的高倍视野中凋亡阳性细胞数,以凋亡阳性细胞数:总细胞数作为细胞凋亡指数,将各组 8 条神经观察所得的 40 个值相加,取其均数作为该组 SCs 凋亡指数。

1.5.3 Bcl-2、Bax 表达的测定 Bcl-2 和 Bax 阳性反应细胞其着色部位主要在细胞核和细胞浆。胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应,阴性对照除细胞核染成蓝色外,胞核和胞浆内无棕黄色反应物。计算 Bcl-2(或 Bax)阳性细胞率,阳性细胞数:总细胞数,方法同 1.5.2。

1.6 统计学处理 所采集数据用 $\bar{x} \pm s$,组间比较采用 *t* 检验,应用统计软件 SPSS13.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色光镜观察 D 组神经 SCs 凋亡数量明显少于 A、B、C、E 组。A 组 SCs 凋亡数量明显多于其余各组。

表 1 各组施万细胞凋亡指数和 Bcl-2、Bax 检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	凋亡指数	Bcl-2 阳性率	Bax 阳性率
A 组	92.35±4.71*	6.75±1.20*	79.01±5.71*
B 组	58.89±4.14*#	14.13±1.23*#	54.38±4.32*#
C 组	56.53±3.89*#	15.21±1.79*#	53.45±4.92*#
D 组	47.72±4.44#	19.62±2.32#	43.85±3.30#
E 组	54.57±4.05*#	15.12±2.07*#	52.09±3.56*#

#: $P < 0.05$,与 A 组的比较;*: $P < 0.05$,与 D 组的比较。

2.2 SCs 凋亡和 Bcl-2、Bax 检测结果 D 组神经 SCs 凋亡数量明显少于 A、B、C、E 组,A 组 SCs 凋亡数量明显多于其余各组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。D 组 Bcl-2 的阳性表达率明显高于 A、B、C、E 组,A 组 Bcl-2 的阳性表达率明显低于其余各组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中 A、D 组见封

3 图 1、2。D 组 Bax 的阳性表达率明显低于 A、B、C 和 E 组,A 组 Bax 的阳性表达率明显高于其余各组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中 A、D 组见封 3 图 3、4。各组施万细胞凋亡指数和 Bcl-2、Bax 表达的统计学分析见表 1。

3 讨 论

玻璃化保存法是一种超速冷冻方法,使细胞游离的水和胶体迅速玻璃化,而不形成冰晶^[6]。Bcl-2 基因是一种原癌基因,可能通过多种机制抑制细胞凋亡,对细胞凋亡的抑制起着决定性作用^[6-7]。Bax 基因是 Bcl-2 蛋白家族中另一成员,具有促进凋亡的作用。Fan 等^[8]实验显示,TMP 可通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达,降低脊髓中丙二醛的水平和抑制超氧化物的活性,从而抑制细胞凋亡,而对免脊髓的缺血再灌注损伤具有保护作用。Cheng 等^[9]实验显示,TMP 可通过调节 Bcl-2 家族的表达和抑制细胞色素 C 的释放,从而抑制过氧化氢诱导的 PC12 细胞(嗜铬细胞瘤细胞系)的凋亡,对神经具有保护作用。本研究前期的实验表明 TMP 可通过上调 Bcl-2 和 Bcl-2/Bax 的表达而抑制大鼠 SCs 的凋亡^[4,10],含 TMP 的玻璃化液能提高有效保存周围神经的温度,在-20℃保存大鼠周围神经 3 周对 SCs 凋亡的抑制作用与在-196℃保存 3 周的效果相近。因此,在本实验中采用的保存温度为-20℃,进一步探索在-20℃条件下,含 TMP 的玻璃化液中 TMP 的最佳浓度,并进一步探讨 TMP 抑制 SCs 凋亡的可能作用机制。在本实验中 A 组(未加 TMP)Bcl-2 和 Bcl-2/Bax 的阳性表达率均明显低于 B、C、D、E 组(含不同浓度的 TMP)的阳性表达率,差异有统计学意义,再次证实 TMP 可通过上调 Bcl-2 和 Bcl-2/Bax 的表达而抑制大鼠 SCs 的凋亡。而含不同浓度 TMP 的玻璃化保存液的组间比较,在 SCs 的凋亡情况和 Bcl-2 与 Bax 的表达情况方面,D 组(320 mg/L)明显优于 B、C、E 组,表明在-20℃玻璃化保存液中 TMP 的最佳浓度为 320 mg/L。

Xiao 等^[1]通过对损伤的实验研究显示 TMP 对大鼠的脑缺血性损伤的保护作用很可能和降低神经元氮氧化酶的表达有关。Jia 等^[11]实验研究显示 TMP 通过上调硫氧还蛋白的转录而对大鼠脑缺血再灌注具有保护作用。俞海国等^[12]通过实验性大鼠缺血缺氧脑损伤(HIBD)的研究,提示 TMP 可抑制缺血缺氧脑损伤 FOS 蛋白的表达,对 HIBD 具有保护作用。而 Gao 等^[13]实验显示,TMP 对大鼠的脑缺血性损伤的保护作用很可能通过抑制细胞凋亡蛋白酶得以实现。作者认为,TMP 除了通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而抑制 SCs 的凋亡外,还可能通过其他作用机制而抑制 SCs 的凋亡。

综上所述,TMP 可通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而抑制大鼠周围神经 SCs 的凋亡;在-20℃以含 TMP 的玻璃化液保存周围神经,TMP 的最佳浓度为 320 mg/L。TMP 抑制 SCs 的凋亡的其他可能作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Xiao X,Liu Y,Qi C,et al. Neuroprotection and enhanced neurogenesis by tetramethylpyrazine in adult rat brain after focal ischemia[J]. Neurol Res,2010,32(5):547-555.
[2] Zheng H,Chen XL,Han ZX,et al. Effect of Ligustrazine on liver injury after burn trauma[J]. Burns,2006,32(3):328-334.
[3] Feng L,Ke N,Cheng F,et al. The protective mechanism of ligustrazine against renal ischemia/reperfusion injury [J]. J Surg Res,2011,166(2):298-305.(下转第 977 页)

生服务中心糖尿病防治力量亟待加强。由社区卫生服务中心直接转诊到综合医院糖尿病专科者仅占 29.61%,发生低血糖症等急性并发症时才转诊。许多患者由于血清肌酐升高、周围血管病变、视网膜病变等慢性并发症感觉不适时才到综合医院糖尿病专科就诊。提示大部分患者是在病情严重到无法耐受时自行到综合医院糖尿病专科就诊,说明某社区卫生服务中心糖尿病防治团队的技术水平需要尽快提高。当然,远郊地区尤其农村经济条件相对较差,也是造成患者就诊不及时、并发症不筛查、胰岛素应用比例低的原因之一。可喜的是,卫生部关于糖尿病管理模式推广项目的实施已经开始覆盖远郊以及农村地区,在上海远郊以及农村地区将实现糖尿病防治研的有效管理。

参考文献:

[1] 代庆红,王忠东.中国糖尿病的现状调查[J].中国医药指南,2011,9(13):206-208.

[2] 于雪梅,陈培红.上海市远郊医院糖尿病达标状况及相关因素分析[J].医药论坛杂志,2011,32(15):5-6.

[3] Yang WY,Lu JM,J WP,et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med,2010,362(1):1090-1101.

[4] Jia WP,Pang C,Chen L,et al. Epidemiological characteristics of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in a Chinese adult population;the Shanghai Diabetes Studies,a cross-sectional 3-year follow-up study in Shanghai urban communities[J]. Diabetologia,2007,50(2):286-292.

[5] 贾伟平.血糖控制达标是预防糖尿病并发症的关键[J].上海医学,2005,28(1):1-3.

[6] 朱江,陆跃斌,宋家明,等.强化管理对糖尿病患者的影响

[J]. 辽宁实用糖尿病杂志,2004,12(5):31-33.

[7] 贾伟平.无缝管理糖尿病,医院社区一体化[J].糖尿病新世界,2010,5(5):3.

[8] 张斌,向红丁,毛微波,等.北京、上海、天津、重庆四城市住院2型糖尿病患者糖尿病慢性并发症及相关大血管疾病的流行病学分析[J].中国医学科学院学报,2002,24(5):452-456.

[9] Pan C,Yang W,Jia W,et al. Management of Chinese patients with type 2 diabetes,1998-2006;the Diabcare-China surveys[J]. Curr Med Res Opin,2009,25(1):39-45.

[10] 潘长玉,田慧,刘国良,等.中国城市中心医院糖尿病健康管理调查[J].中华内分泌代谢杂志,2004,20(5):420-424.

[11] 姜素英,左玉华,张和平,等.社区糖尿病治疗达标现状分析[J].上海医学,2005,28(1):30-32.

[12] 马晓静,孙庆毅,包玉倩,等.糖尿病医院一社区一体化管理模式初步探索[J].上海医学,2010,33(7):685-686.

[13] 季黎明,刘伟,伍彩霞,等.糖尿病信息管理系统与健康教育在2型糖尿病治疗中的联合应用[J].上海医学,2010,33(5):462-466.

[14] 陈兴宝,唐玲,陈慧云,等.2型糖尿病并发症对患者治疗费用的影响评估[J].中国糖尿病杂志,2003,11(4):238-241.

[15] 唐玲,陈兴宝,陈慧云.2型糖尿病患者的血糖控制和医疗费用的多因素分析[J].中华糖尿病杂志,2004,12(3):205-208.

[16] 杨杰松.五省市推广糖尿病管理模式[N].健康报,2009-09-02(1).

(收稿日期:2011-11-05 修回日期:2011-12-06)

(上接第974页)

[4] 刘建文,蒋电明,陈增刚,等.含川芎嗪的玻璃化保存液对施万细胞凋亡及调控基因表达影响的初步实验研究[J].重庆医科大学学报,2009,34(3):289-292.

[5] Rall WF,Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification[J]. Nature,1985,313(6003):573-575.

[6] Pugazhenth S,Nesterova A,Jambal P,et al. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons[J]. J Neurochem,2003,84(5):982-996.

[7] Kluck RM,Bossy-Wetzel E,Green DR,et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. Science,1997,275(5303):1132-1136.

[8] Fan LH,Wang KZ,Cheng B,et al. Anti-apoptotic and neuro-protective effects of Tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits [J]. BMC Neuroscience,2006,14(7):48-56.

[9] Cheng XR,Zhang L,Hu JJ,et al. Neuroprotective effects

of tetramethylpyrazine on Hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Cell Biol Int,2007,31(5):438-443.

[10] 陈增刚,蒋电明,欧云生,等.大鼠坐骨神经-20℃川芎嗪玻璃化液保存对异体移植后神经再生的影响[J].第四军医大学学报,2009,30(11):978-981.

[11] Jia J,Zhang X,Hu YS,et al. Protective effect of tetraethyl pyrazine against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: therapeutic time window and its mechanism [J]. Thromb Res,2009,123(5):727-730.

[12] 俞海国,汤云珍,杨锡强.川芎嗪对新生鼠缺血缺氧脑损伤FOS蛋白表达的影响[J].重庆医学,2003,32(4):416-417.

[13] Gao C,Liu X,Liu W,et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Auton Neurosci,2008,141(1/2):22-30.

(收稿日期:2011-11-08 修回日期:2011-12-22)