基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0289-04

# 含川芎嗪的玻璃化保存液对雪旺细胞凋亡及调控基因表达影响的初步实验研究

刘建文,蒋电明,陈增刚,袁 新,欧云生
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨在不同温度下含川芎嗪的玻璃化保存液对大鼠雪旺细胞凋亡及调控基因表达的影响。方法:24 只 SD 大鼠,切取双侧坐骨神经(共 48 条),将其随机分成 2 组(每组 24 条):实验组(含川芎嗪)和对照组(不含川芎嗪)。实验组分为 A、B、C、D 亚组,对照组分为 A'、B'、C'、D'亚组(每亚组 6 条),分别在不同的温度下保存 3 周(A、A'亚组:-4℃保存;B、B'亚组:-20℃保存;C、C'亚组:-80℃保存;D、D'亚组:-196℃保存)。3 周后取神经进行检测:①HE 染色光镜检查;②免疫组化法检测 Bcl-2、Bax;③ TUNEL 法检测细胞凋亡。结果:除 D、D'亚组外,实验组各亚组神经雪旺细胞凋亡数量明显少于对照组相应的各亚组,实验组各亚组 Bcl-2 的阳性表达率均明显高于对照组相应的各亚组,实验组各亚组 Bax 阳性表达率均明显低于对照组相应的各亚组,差异均有显著性($P<0.05$);实验组中 B 亚组雪旺细胞凋亡情况和 Bcl-2 与 Bax 的表达情况与 C、D 亚组接近,比较无显著性差异($P>0.05$)。结论:含川芎嗪的玻璃化保存液能够在 -20℃条件下,通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而有效抑制雪旺细胞的凋亡。

【关键词】川芎嗪;雪旺细胞;玻璃;化保存液;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R318.06 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-10

# Preliminary experimental study of the effects of vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine on schwann's cell apoptosis and the expression of regulating gens

*LIU Jian-wen, et al*
(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

作者介绍:刘建文(1976- ),男,主治医师,硕士,
研究方向:周围神经的损伤与修复。
通讯作者:蒋电明,男,教授,E-mail:jdm571026@vip.163.com。

【Abstract】*Objective*:To investigate the effects of vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine on schwann's cell apoptosis and the expression of regulating gens under different

[7] Zhao C, Chen W, Yang L, et al .PPARgamma agonists prevent TGF-beta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 350(2):385-391.

[8] AM Elsharkawy, MC Wright, RT Hay, et al. Persistent activation of nuclear factor-κB in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IκB family proteins[J]. Hepatology, 1999, 30(3):761 - 769.

[9] IJi J, Hu W, Baldassare JJ, et al. The ethanol metabolite, linolenic acid ethyl ester, stimulates mitogen activated protein kinase and cyclin signaling in hepatic stellate cells[J]. Life Sci, 2003, 73(9):1083-1096.

[10] Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, et al. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007, 293(3):631-639.

[11] Saxena N K, Ikeda K, Rockey D C, et al. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice[J]. Hepatology, 2002, 35(4):762-771.

[12] Tada S, Iwamoto H, Nakamuta M, et al. A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats[J]. J Hepatol, 2001, 34(4):529-536.

[13] Murata T, Arii S, Mori A, et al. Therapeutic significance of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, on the established liver fibrosis[J]. Surg Res, 2003, 114(1):64-71.

[14] Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis[J]. Biochem J, 2008, 411(1):1-18.

[15] Nakamura T, Arii S, Monden K, et al. Expression of the $Na^+/Ca^{2+}$ exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(9):5389-5394.

[16] Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, et al. Tissue inhibitor of metal proteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model [J]. Hepatology, 2000, 32(6):1248-1254.

[17] Das S K, Vasudevan D M. Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2008, 68(4):260-269.

(责任编辑:关蕴良)

temperatures. *Methods*: 48 sciatic nerves obtained from 24 SD rats were randomly divided into 2 groups (each with 24 nerves): experimental group (with tetramethy -lpyrazine, 320mg/L) and control group (no tetramethylpyrazine). Experimental group included 4 subgroups :A B C D;and the control group included 4 subgroups: A',B',C',D' (each with 6 nerves). All the corresponding subgroups were cryopreserved 3 weeks under different temperatures(A A': -4℃,B B': -20℃,C C': -80℃,D D': -196℃) .After 3 weeks, all the nerves were obtained for tests: ①HE staining for light-microscope test, ② Schwann'S cell apoptosis was measured quantitatively by the terminal transferase UTP nick end labeling (TUNEL) method, ③The expression of Bcl-2 and Bax was determined by immunohistochemisty technique. *Results*: Aside from D D' subgroups, the number of Schwann's cell apoptosis in each experimental subgroup was significantly smaller than that in the corresponding control subgroup ($P<0.05$); the expression of Bcl-2 were significantly increased in each experimental subgroup compared with that in the corresponding control subgroup and the expression of Bax decreased significantly($P<0.05$). In the experimental group, the rate of Schwann'S cell apoptosis and that of the positive expression of Bcl-2(or Bax) in B subgroup were approximately equal to those in C and D subgroup($P>0.05$). *Conclusion*: These findings suggest that at -20℃ vitreous cryopreservation with TMP can depress Schwann'S cell apoptosis of rat by regulating the expression of Bcl-2 and Bax.

【Key words】 Ttetramethylpyrazine;Schwann's cell;Vitreous cryopreservation;Cell apoptosis

周围神经的冷冻保存以-196℃保存 3 周效果最佳,温度最高也不能超过-80℃[1]。但经单纯冷冻保存的周围神经雪旺细胞(Schwann's cell,SCs)缺血致活性降低或灭活,而丧失了释放促进神经再生因子的能力。玻璃化保存方法既可避免由于盐浓度的升高(慢速降温时)对细胞造成的化学性损伤,又能防止由于冰晶形成(快速降温时)造成的物理性损伤,获得 SCs 的较高存活率[2];但玻璃化保存对温度的要求较高,其最佳储存温度应在-120℃以下,至少不能高于-70℃,否则会影响生物标本的活力[3]。然而,-70℃~-80℃深低温冰箱保存需要专门的仪器设备和技术人员;-196℃液氮保存需要有液氮容器及定期补充液氮,费时费力,又不便于运输,不宜推广。

实验研究[4-7]表明,川芎嗪(Tetramethylpy razine, 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,但川芎嗪对周围神经的作用尚未见报道。我们采用含川芎嗪的玻璃化保存液在不同温度下对周围神经进行冷冻保存,研究川芎嗪能否抑制 SCs 的凋亡及其可能的作用机制,并探讨在较高的保存温度下含川芎嗪的玻璃化保存液对 SCs 凋亡的抑制作用是否与在-196℃下保存具有相同或相近效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

深低温冰箱(容声,广东),液氮生物容量瓶(成都金凤,YDS-30-125),双目显微镜(奥林巴斯,日本),病理组织包埋台(BMZ-Ⅲ型,苏州),超薄切片机(LEICAU RME 2135 型,德国),10%DMSO(二甲亚砜),20%小牛血清,HC-A 液(非改良型高渗枸橼酸盐嘌呤溶液),盐酸川芎嗪注射液(40 mg,2 ml/支):北京市燕京药业有限公司;免疫组化试剂盒:博士德公司 (批号:BA0412 和 BA0315),TUNEL 试剂盒:Roche 公司(批号:11684817910)。

### 1.2 保存液的制备

配制 1 瓶 100 ml 玻璃化液:HC-A 液(高渗枸橼酸盐嘌呤溶液,非改良型)70 ml,DMSO 10 ml,小牛血清 20 ml,密封置 4℃冰箱保存备用。另外配制 1 瓶 100 ml 相同的玻璃化液,加入 32 mg 川芎嗪,制备成含川芎嗪浓度为 320 mg/L[6]的玻璃化液,密封置 4℃冰箱保存备用。

### 1.3 神经获取与分组

24 只月龄相同、饲养条件一致的成年健康 SD 大鼠,性别不限,体重 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 处开始游离并切取双侧坐骨神经干(长约 15 mm),共获得 48 条坐骨神经。经生理盐水洗涤后,将其随机分成 2 组(每组 24 条):实验组和对照组;实验组分为 A、B、C、D 亚组,对照组分为 A'、B'、C'、D'亚组(每亚组 6 条),分别放入有保存液的冻存管中。实验组保存液:含川芎嗪的玻璃化液(浓度为 320 mg/L),对照组保存液:不含川芎嗪的玻璃化液。各亚组均经 4℃冷平衡 30 min,然后在不同的温度下保存 3 周。A、A'亚组:-4℃保存 3 周;B、B'亚组:-20℃保存 3 周;C、C'亚组:-80℃保存 3 周;D、D'亚组:-196℃液氮保存 3 周。

保存 3 周后将各亚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%中性福尔马林液固定,石蜡包埋,切片后备免疫组化及 TUNEL 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，应用原位 DNA 断裂位点的 3'-OH 末端标记法(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)，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 苏木素 - 伊红(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 6 条神经观察所得的 30 个值相加，取其均数作为该组雪旺细胞凋亡指数。

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 统计学分析

所采集数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)，组间比较采用 $t$ 检验，应用统计软件 SPSS13 进行统计分析，$P<0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结 果

2.1 HE 染色光镜观察

除 D、D' 亚组外，实验组各亚组神经 SCs 凋亡数量明显少于对照组相应的各亚组。实验组中 B 亚组 SCs 凋亡数量与 C、D 亚组相当，但明显少于 A 组。

2.2 雪旺细胞凋亡和 Bcl-2、Bax 检测结果

除 D、D' 亚组外，实验组各亚组神经 SCs 凋亡数量明显少于对照组相应的各亚组，实验组各亚组 Bcl-2 的阳性表达率均明显高于对照组相应的各亚组，实验组各亚组 Bax 的阳性表达率均明显低于对照组相应的各亚组，差异均有显著性($P<0.05$)；D、D' 亚组神经 SCs 凋亡数量与其他各亚组相比最少，D 与 D' 亚组细胞凋亡数量相当，无显著差异。实验组中 B 亚组 SCs 凋亡情况和 Bcl-2 与 Bax 的表达情况与 C、D 亚组接近，差异无显著性($P>0.05$)，而明显优于 A 亚组，有显著性差异($P<0.05$)。

**表 1 各亚组雪旺细胞凋亡指数和 Bcl-2、Bax 检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=30$)**

| 组别 | 凋亡指数(%) | Bcl-2 阳性率(%) | Bax 阳性率(%) |
|---|---|---|---|
| A 组 | $91.65 \pm 4.71^{\triangle\circ}$ | $8.75 \pm 1.20^{\triangle\circ}$ | $56.01 \pm 5.71^{\triangle\circ}$ |
| A' 组 | $100.00 \pm 0.00$ | $0.00 \pm 0.00$ | $71.39 \pm 7.79$ |
| B 组 | $50.89 \pm 4.14^{\triangle}$ | $18.04 \pm 1.53^{\triangle}$ | $46.69 \pm 2.72^{\triangle}$ |
| B' 组 | $67.60 \pm 9.70$ | $8.53 \pm 3.34$ | $67.24 \pm 3.55$ |
| C 组 | $49.99 \pm 3.08^{\triangle\bullet}$ | $18.49 \pm 1.79^{\triangle\bullet}$ | $46.61 \pm 1.92^{\triangle\bullet}$ |
| C' 组 | $65.83 \pm 8.89$ | $9.556 \pm 3.16$ | $63.91 \pm 3.06$ |
| D 组 | $48.72 \pm 4.44^{\blacktriangle\bullet}$ | $18.62 \pm 2.32^{\blacktriangle\bullet}$ | $45.85 \pm 3.30^{\blacktriangle\bullet}$ |
| D' 组 | $49.08 \pm 5.97$ | $18.20 \pm 1.95$ | $46.77 \pm 4.19$ |

注：各亚组内的比较：$^{\triangle}P<0.05$，$^{\blacktriangle}P>0.05$；实验组中 B 亚组与其余各亚组的比较：$^{\circ}P<0.05$，$^{\bullet}P>0.05$

## 3 讨 论

玻璃化保存(Vitreous cryopreservation)法是一种超速冷冻方法，它是以极快的速度降温冷冻细胞，使细胞游离的水和胶体迅速玻璃化，而不形成冰晶[8]。玻璃化保存对温度的要求较高，其最佳储存温度应在 -120℃以下，至少不能高于 -70℃，否则在储存过程中就有反复再结晶发生，影响生物标本的活力，亦即缩短了储存生物样品的有效期[3]。本实验结果显示，在 SCs 凋亡情况和 Bcl-2 与 Bax 的表达情况方面，-196℃保存 3 周组(D、D' 亚组)含川芎嗪的玻璃化液保存与单纯的玻璃化液保存效果接近。可能因为在深低温条件下细胞代谢率极低，生命处于所谓的“悬滞”状态，细胞本身凋亡进程缓慢[9]，因而川芎嗪对细胞凋亡的抑制作用表现并不明显。

Bcl-2 基因(即 B 细胞淋巴瘤/白血病-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[10,11]。Bax 基因是 Bcl-2 蛋白家族中另一成员，具有促进凋亡的作用。川芎嗪是从川芎中分离、纯化的一种生物碱，可通过多种途径抑制细胞凋亡。Gao C 等[12]进行大鼠同种异体肾移植实验，结果表明川芎嗪可通过上调 Bcl-2 的表达和降低 ICAM-1（内皮细胞间粘附分子）的表达，延缓因缺血再灌注损伤引起的肾功能障碍。Fan LH 等[4]实验显示，川芎嗪可通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达抑制细胞凋亡，而对兔脊髓的缺血再灌注损伤具有保护作用。本实验显示，除 D、D'亚组（-196℃）外，其他相应的各亚组间，在 SCs 的凋亡情况和 Bcl-2 与 Bax 的表达情况方面，含川芎嗪的玻璃化液保存均优于不含川芎嗪的玻璃化液保存。表明川芎嗪可通过上调 Bcl-2 和 Bcl-2/Bax 的表达而抑制大鼠 SCs 的凋亡。

目前，含川芎嗪的玻璃化液保存周围神经的研究尚未见报道。我们将川芎嗪和玻璃化保存液二者结合起来，在玻璃化液中加入川芎嗪（320 mg/L），在不同温度下保存大鼠坐骨神经 3 周。结果显示：实验组（含川芎嗪组）中，在周围神经 SCs 的凋亡情况和 Bcl-2 和 Bax 表达情况方面，B 亚组（-20℃）与 C 亚组（-80℃）和 D 亚组（-196℃）的保存效果接近，差异无显著性。表明含川芎嗪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。该保存方法结合了玻璃化保存液和川芎嗪的优点，玻璃化保存液能够降低降温和复温过程对细胞造成的损伤，而川芎嗪在整个保存过程通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而抑制 SCs 的凋亡。我们认为，利用含川芎嗪的玻璃化液保存周围神经，玻璃化液和川芎嗪对 SCs 的保护作用可能出现了叠加或协同效应。因而，在本实验中，B 亚组（-20℃保存 3 周）与 D 亚组（-196℃保存 3 周）SCs 的凋亡情况相似。而 A 亚组（-4℃保存 3 周）SCs 的凋亡数量明显高于 B、C、D 亚组，考虑为：在-4℃细胞代谢率显著增大，随着保存时间延长（3 周），SCs 的凋亡进程超越了川芎嗪抑制凋亡作用的极限。

综上所述，川芎嗪可通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而抑制大鼠周围神经 SCs 的凋亡；含川芎嗪的玻璃化液在-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。但还有很多问题尚未解决：除了通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达而抑制 SCs 的凋亡外，川芎嗪是否可通过其他作用机制而抑制 SCs 的凋亡；含川芎嗪的玻璃化液在-20℃对周围神经的有效保存时间能否更长；对周围神经的保存，川芎嗪的最佳浓度是多少；含川芎嗪的玻璃化液在-20℃保存能否有效降低周围神经的免疫原性。

## 参 考 文 献


[1] 王秋根，应 明，鲁树荣，等. 不同冷冻温度和保存时间对同种异体神经移植后神经功能影响的研究[J]. 中华手外科杂志，1998，14（1）：53-55.

[2] Karlsson J O M，Cravalho E G，Toner M. A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing[J]. ApplPhysiol，1994，75：4442.

[3] Jens O M K，Mehmet T.Long-term storage of tissues by cryo-preservation：critical issues[J]. Biomaterials，1996，17：243-256.

[4] Fan L H，Wang K Z，Cheng B. et al. Anti-apoptotic and neuro-protective effects of Tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits[J]. BMC Neuroscience，2006，7：48-56.

[5] 曲友直，赵燕玲，秦怀洲，等.川芎嗪对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及其相关蛋白 Fas-L 表达的影响[J]. 中国中医急症，2007，16(5)：581-582.

[6] 刘胜雄，欧阳永忠，汤 明.川芎嗪对大鼠移植肝的保护作用[J]. 中华现代外科学杂志，2006，3(8)：662-665.

[7] 周智华，朱有华，牛 强，等.川芎嗪改善高渗枸橼酸盐嘌呤溶液保存犬肾的效果[J]. 中华器官移植杂志，2006，27(7)：411-413.

[8] Rall W F，Fahy G M.Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification[J]. Nature，1985，313(6003)：573-575.

[9] 关 静，龚承元，崔占蜂.玻璃化冷冻保存细胞、组织研究进展[J]. 国外医学生物医学工程分册，2004，27(4)：252-256.

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

[11] Kluck R M，Bossy-Wetzel E，Green D R，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.

[12] Gao C，Feng L，Li Y P，et al. Effect of ligustrazine on chronic allograft nephropathy in rats[J]. Transplant proc，2007，39(10)：3415-3419.


（责任编辑：冉明会）