维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)02-0153-03

阿魏酸钠对培养大鼠大脑微血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用

陈莉芬[1]，胡长林[1]，汤为学[2]

（1. 重庆医科大学附属第二医院神经内科，重庆 400010；2. 重庆医科大学基础医学院病理生理教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：研究缺氧对脑微血管内皮细胞（brain microvascular endothelial cells，BMEC）的损伤及阿魏酸钠（Sodium ferulate）对它的保护作用。方法：取体外培养的大鼠脑皮质微血管内皮细胞，置于 95% N_2 和 5% CO_2 的缺氧盒中 12h 造成内皮细胞缺氧。用透射电镜观察 BMEC 的超微结构变化。用内皮细胞线粒体活性和内皮细胞死亡率来评价内皮细胞活力，并用乳酸脱氢酶（LDH）漏出量作为评价损伤的指标。结果：体外培养大鼠脑皮质 BMEC 缺氧 12h 后，细胞超微结构损伤，细胞存活率及线粒体活性明显降低，LDH 释放量显著增加。阿魏酸钠可显著对抗缺氧对 BMEC 的损伤。结论：阿魏酸钠对大鼠脑皮质 BMEC 缺氧损伤具有保护作用。

【关键词】脑微血管内皮细胞；缺氧；阿魏酸钠

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-09-02

Protective effect of sodium ferulate on rat brain microvascular endothelial cells injured by hypoxia

CHEN Lifen, et al

(*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the protective effect of Sodium ferulate on rat brain microvascular endothelial cells (BMEC) injured by hypoxia. *Methods*: BMEC from Wistar rat cerebral cortex was cultured and placed in an anoxia chamber with 95%N_2 and 5% CO_2 for 12 hours. BMEC activity or injury was assayed by observing cell ultramicrostructures and measuring viability by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, trypan blue staining (TBST) and the lactate dehydrogenase (LDH), a marker of cell death. *Results*: The BMEC activity and viability was decreased after hypoxia as assessed by MTT,TBST and LDH, The ultrastructure of BMEC was damaged after hypoxia. SF could enhance BMEC activity and viability and ameliorate hypoxia injury. *Conclusions*: Sodium ferulate exerts protective action on BMEC injured by hypoxia.

【key words】Brain microvascular endothelial cells; Hypoxia; Sodium ferulate

血管内皮细胞的结构及功能改变，在血管性疾病的发病中具有重要的作用。对脑血管病患者，保护血管内皮细胞免受缺氧性损伤具有十分重要的意义。本研究采用大鼠大脑皮质微血管内皮细胞缺氧培养为实验模型，观察中药阿魏酸钠对 BMEC 缺氧性损伤的影响，旨在从细胞水平探讨阿魏酸钠的的保护作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

参照脑血管内皮细胞培养方法[1]，进行原代和传代培养。

自 1~5 天的 Wistar 新生大鼠（重庆医科大学实验动物中心提供）取脑，去除大血管、软脑膜、脑干、小脑和大脑髓质，匀浆，经孔径为 75μm 尼龙网过滤匀浆悬液，冰冷 Hank's 液洗涤、离心（500r/min × 3min）收集滤网上面的微血管段，0.1‰的Ⅶ型胶原酶（Sigma 公司）37℃水浴中消化 20min，离心（800r/min × 3min），弃上清，沉淀物加入含 15% 胎牛血清(Hyclone 公司)的 M199 完全培养液（Hyclone 公司）制成细胞悬液，接种于 35ml 塑料培养瓶中，置 37℃，5%

作者介绍：陈莉芬（1969- ），女，博士，
主要研究方向：脑血管疾病。

基金项目：重庆市卫生局医学科研资助项目（2004-B-86）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

CO_2 培养箱孵育，1 天后换全液，以后每 3 天换完全培养液 1 次至细胞长成融合单层，0.25% 胰蛋白酶（Sigma 公司）消化细胞传代，第 3 代细胞用于实验。

1.2 体外 BMEC 缺氧模型的制作

取培养细胞（培养板）置入含有 95% N_2 和 5% CO_2 混合气体（重庆液化空气有限公司）的密闭容器内，放入 37℃恒温培养箱中造成缺氧，12h 后取出。

1.3 实验分组

按实验要求分为正常对照组，缺氧组和阿魏酸钠组。阿魏酸钠（批号 20011208）由四川成都制药一厂生产，用 M199 培养液稀释为 100μg/ml。培养 BMEC 融合后，更换培养液中加入阿魏酸钠（终浓度为 100μg/ml），2h 后和缺氧组分别缺氧培养 12h。

1.4 检测指标

1.4.1 BMEC 的鉴定 用倒置显微镜观察内皮细胞的形态，内皮细胞进行ⅧF:Ag（北京中山生物技术有限公司）免疫组化检查以及透射电镜观察。

1.4.2 BMEC 超微结构观察 BMEC 经 2% 戊二醛溶液固定后，常规电镜样品制备，透射电镜观察其超微结构变化。

1.4.3 MTT 法活细胞测定 细胞接种于 96 孔培养板中，接种密度为 3×10^4/ml，培养至所选时间，弃上清，每小组取 9 孔，每孔加入 200μl M199，20μl MTT（Sigma 公司）继续培养 4h 后，离心（2000 r/min × 5 min），弃上清，每孔加入 200μl 二甲基亚砜溶解紫色结晶，置全自动酶标仪上测出每孔吸光度值（A 值），测定波长为 570nm。

1.4.4 台盼蓝(TB)染色计数 BMEC 死亡率（%） 制成细胞悬液，用 0.4%TB 染色，用血球计数仪板于显微镜下计数 200 个 BMEC 中 TB 着色细胞与未着色细胞数，细胞死亡率 =（死细胞数 / 细胞总数）× 100%

1.4.5 乳酸脱氢酶（LDH）活力测定 各组细胞培养至所选时间，收集培养上清液 100μl，按试剂盒说明书（南京建成生物工程研究所）测定培养液中 LDH 活性。LDH 活力 =［（测定管 OD 值 − 空白管 OD 值）/（标准管 OD 值 − 空白管）］× 标准管浓度 × 1000ml × 测试前样品稀释倍数。

1.5 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用方差分析，显著性水平 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 BMEC 的鉴定

倒置显微镜下观察内皮细胞融合成片状，细胞紧密排列，互不重叠，呈典型的铺路卵石样结构。原代、第三代内皮细胞进行ⅧⅠ因子相关抗原免疫细胞化学检查，见细胞浆和核膜周围被染成黄色。透射电镜观察培养细胞胞浆中可见典型棒状的 Weible-Palada 小体，证实培养的细胞为血管内皮细胞。

2.2 BMEC 超微结构的观察

电镜观察正常 BMEC 呈长椭圆形，细胞核内染色质细密，具典型的高尔基体、内质网和线粒体，核周胞浆丰富，质膜和核膜完整（见图 1）。低氧 12h 后，内皮细胞核染色质边集、凝聚成团块，胞质水肿，胞内脂质体和空泡增加，线粒体肿胀，粗面内质网扩张（见图 2）。与阿魏酸钠共同孵育的 BMEC 缺氧后细胞超微结构基本正常，有少许线粒体内室肿胀（见图 3）。

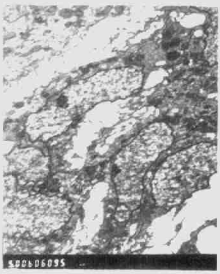


图 1 正常组：内皮细胞超微结构基本正常。(×5000)

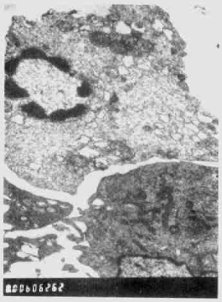


图 2 缺氧组：内皮细胞坏死，核边集，胞质水肿。(×8000)

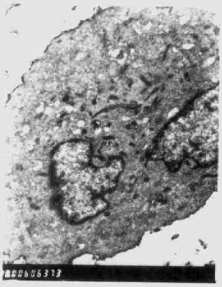


图 3 阿魏酸钠组：内皮细胞少许线粒体内室肿胀(×8000)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 阿魏酸钠对 BMEC 活性和死亡率的影响

由表 1 可知，经缺氧处理后，脑微血管内皮细胞活性明显下降，死亡率明显增加，与正常组比较有显著性差异（$P<0.01$）。阿魏酸钠能提高 BMEC 活性，显著降低死亡率，与缺氧组比较有显著性差异（$P<0.05, P<0.01$）。见表 1。

表 1 阿魏酸钠对 BMEC 活性和死亡率的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞活性(A 值)	BMEC死亡率（%）
正常组	0.61 ± 0.09	5.5 ± 1.05
缺氧组	0.33 ± 0.07##	41.17 ± 8.01##
阿魏酸钠组	0.51 ± 0.11#**	15.17 ± 4.88##**

注：#$P<0.05$ 与正常组比较 ##$P<0.01$ 与正常组比较
*$P<0.01$ 与缺氧组比较 **$P<0.01$ 与缺氧组比较

2.4 阿魏酸钠对 LDH 释放量的影响

血管内皮细胞经缺氧后，LDH 漏出量增多，与正常组比较有显著性差异（$P<0.01$），阿魏酸钠能明显抑制缺氧诱导的 LDH 释放（$P<0.05$）。见表 2。

表 2 阿魏酸钠对 LDH 释放量的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	LDH（u/L）
正常组	191.71 ± 34.26
缺氧组	1667.33 ± 244.31##
阿魏酸钠组	611.83 ± 119.80##**

注：##$P<0.01$ 与正常组比较 **$P<0.01$ 与缺氧组比较

3 讨 论

体外脑微血管内皮细胞培养对研究脑血管疾病特别是脑缺血是非常必要的[2]，低氧（缺氧）对机体是一种异常的刺激，是常见的脑血管疾病的一个病理性刺激因素，可引发一系列病理反应。低氧是内皮细胞损害的主要因素，而低氧时血管内皮细胞也是组织中受攻击的第一道靶器官[3-6]。在本项研究中，我们通过大鼠脑皮质 BMEC 缺氧模型，直观地研究了阿魏酸钠对缺氧大脑皮层的保护作用，此点是整体模型所不能替代的。本实验结果显示，缺氧导致 BMEC 超微结构明显损伤，表现为核染色质固缩，凝聚成团块，细胞肿胀、空泡化等。而与阿魏酸钠共同孵育的 BMEC 缺氧后细胞超微结构基本正常，只有少许细胞肿胀。

细胞膜通透性的改变是细胞损伤的一个共同的特征，细胞损伤程度与 LDH 释放量及台盼蓝染色成正比，故测定二者可作为反映细胞损伤的一种敏感且较为简便的指标，细胞死亡时 LDH 释放入培养液，其上清液中 LDH 水平反映出细胞的损伤或死亡程度。MTT 比色分析是一种检测细胞生长和存活的灵敏方法，重复性好。活细胞线粒体的琥珀酸脱氢酶可将黄色的 MTT 还原为蓝紫色结晶物，而死亡细胞则无此功能，通过测定吸光度即可反映细胞活性。本文研究显示 BMEC 经缺氧处理后，细胞存活率及活性均明显下降，而 LDH 显著增加，说明缺氧造成了 BMEC 损伤。我们研究发现，阿魏酸钠可明显提高细胞存活率和活性，减少 LDH 的释放，表明阿魏酸钠对膜有一定的稳定作用。

阿魏酸钠是中药川芎、当归等的主要成分阿魏酸的钠盐，具有扩张血管、抑制血小板聚集、疏通微循环、抑制炎症反应、抗氧化和清除自由基等的作用[7]。阿魏酸钠对 BMEC 的缺氧损伤具有明显的保护作用，而阿魏酸钠抗缺氧的机制较为复杂，抗氧化和清除自由基似乎是其主要活性所在，进一步深入研究阿魏酸钠抗缺氧作用的分子机理，从而为临床寻找治疗和预防缺血、缺氧性血管内皮细胞损伤的药物提供新的线索则显得很有意义。

参 考 文 献

[1] 吴文斌，胡常林，汤为学.大鼠脑皮质微血管内皮细胞的培养[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27(2):151-152.

[2] Nagy Z, Vastag M, Skopal J, et al. Human brain microvessel endothelial cell culture as a model system to study vascular factors of ischemic brain[J]. Keio-J-Med, 1996 ; 45(3): 200-206.

[3] D' Agnillo F, Wood F, Porras C, et al. Effects of hypoxia and glutathione depletion on hemoglobin and myoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium[J]. Bichim Biophys Acta, 2000; 1495:150-159.

[4] Samarasinghe DA, Tapner M, Ferrell GC. Role of oxidative stress on hypoxia-reoxygenation injury to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells[J]. Hepatology, 2000; 31:160-165.

[5] Shostak HDC, Lemasters JJ, Edgell CJ, et al. Role of ICE-like proteases in endothelial cell hypoxic and reperfusion injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997; 231:844-847.

[6] Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999; 26(1): 74-84.

[7] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海：上海科技出版社，1998; 1341.