DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.022
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)22-2033-04

论著

抑肽酶预处理对凝血酶诱导的星形细胞凋亡的影响

崔 剑,陶国才,易 斌,鲁开智,文欣荣,陈 杰,王 震 (第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

提 要:目的 观察不同剂量抑肽酶预处理对凝血酶诱导的星形细胞损伤和凋亡影响。方法 体外原代培养星形细胞后,随机数字表法分为6组:C(等量培养基对照组),A0(抑肽酶0 U/ml预处理),A100(抑肽酶100 U/ml预处理),A300(抑肽酶300 U/ml预处理),A500(抑肽酶500 U/ml预处理),A700(抑肽酶700 U/ml预处理),制备凝血酶体外作用模型,采用流式细胞仪和AO-EB染色法对凝血酶100 U/ml浓度下不同浓度的抑肽酶预处理后细胞凋亡情况进行检测。结果 A0和A100及A100和A300间均有非常显著的差异($P<0.01$),A300和A500间有显著性差异($P<0.05$),A500和A700间则没有显著性差异。AO-EB染色部分细胞也呈现典型的凋亡表现,结果和流式细胞仪结果相吻合。结论 抑肽酶对凝血酶诱导的星形细胞凋亡有明显的抑制作用。

关键词:抑肽酶;凝血酶;星形细胞;流式细胞术
中图法分类号:R322.81;R329.28;R977.3 文献标识码:A

Effects of pretreament with different dosages of aprotinin on astrocytic apoptosis induced by thrombase

CUI Jian, TAO Guo-cai, YI Bin, LU Kai-zhi, WEN Xin-rong, CHEN Jie, WANG Zhen (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of pretreatment with different dosages of aprotinin on astrocytic injuries and apoptosis induced by thrombase. Methods Primary cultured astrocytes were randomized into 6 groups: group C (control group, with the equivalent culture medium), group A100 (pretreated with 100 U/ml aprotinin), group A300 (pretreated with 300 U/ml aprotinin), group A500 (pretreated with 500 U/ml aprotinin), and group A700 (pretreated with 700 U/ml aprotinin). Then the model of treatment with thrombase was established *in vitro*. Flow cytometry (FCM) and AO-EB staining were employed to detect the effects of different dosages of aprotinin on the apoptosis of astrocytes induced by 100 U/ml thrombase. Results There was significant difference between groups A0 and A100 and between groups A100 and A300 ($P<0.01$), and there was statistical difference between groups A300 and A500, but the difference was not very significant. There was no statistical difference between groups A500 and A700. AO-EB staining method showed typical apoptosis, which was accordant with the results by FCM. Conclusion Aprotinin can inhibit the apoptosis of astrocytes induced by 100 U/ml thrombase *in vitro*.

Key words: aprotinin; thrombase; astrocyte, flow cytometry

凝血酶是哺乳动物体内凝血瀑布反应的关键酶,在脑血肿中心部位凝血酶的最高浓度可以达到250 U/ml甚至更高,虽然凝血酶在向周围脑组织渗透过程中有所衰减,但是高浓度的凝血酶直接作用于中枢神经细胞时却可诱导神经细胞发生不同程度的损伤和凋亡反应,具体表现为血肿周围的细胞发生水肿、退化、功能丧失直至死亡[1]。临床上主要表现为很多脑创伤和颅内手术后的病人发生不同程度的癫痫、功能缺陷甚至精神障碍。抑肽酶是从牛肺组织中提取的天然丝氨酸蛋白酶抑制剂,临床上常用于大手术如体外循环、肝脏移植时的血液保护,与凝血酶有一定的拮抗作用但又不影响机体的凝血功能。本研究采用体外细胞模型,拟在体外情况下研究临床血药浓度的抑肽酶的保护作用,为临床应用提供一定的研究基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和器材

DMEM-F12培养基、层粘连蛋白、D-Hanks液购自Gibco公司,优质胎牛血清、胰蛋白酶(1∶250)购自Hyclone公司,兔抗鼠

作者简介:崔 剑(1975-),男,河南省郸城县人,硕士研究生,医师,主要从事麻醉手术期器官保护方面的研究。电话:(023)68752450,E-mail:cqjian211@mail.tmmu.com.cn
通信作者:陶国才,电话:(023)68754197,E-mail:Tgcfsc@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-07-20;修回日期:2004-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胶质纤维酸性蛋白(glial fibrllary acidic protein, GFAP)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔 IgG、碘化丙啶(PI)购自上海申友公司,凝血酶购自 Sigma 公司(华美公司分装),抑肽酶为 Reche 公司产品。一次性细胞培养板为美国 COSTAR 公司产品,TDL-40B 低温离心机(上海安亭医疗器械厂),Thermo Forma 3111 细胞培养箱(美国),Olympus CK40 型倒置显微镜及照相系统(日本),SW-CJ 超净工作台(苏州),OLYMPUS BX60 型荧光显微镜及照相系统(日本),电泳成像系统(美国 Polaroid 公司产品),紫外分析仪(德国 Pharmacia 公司产品),FSCStar PLUS 型流式细胞仪(Becton Dickison 公司,美国)。

1.2 细胞培养

星形细胞的培养参照文献[2]的方法进行。简述如下:同窝出生 1 d 内的健康昆明小鼠 10 只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量 7~9 g,无菌条件下分离大脑皮层,解剖显微镜下剥除脑膜和血管,0.25%胰蛋白酶 37 ℃消化 20 min,加入含 15%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基终止胰蛋白酶反应,光头吸管轻轻吹打至组织分散,200 目尼龙滤网过滤以除去大块组织,调整细胞密度为 1×10^6/ml,接种于事先用鼠尾胶原和层粘连蛋白包被的培养瓶中,3 d 更换 1 次培养基,培养 9 d 后传代,待细胞长满瓶底 85%后加入药物进行实验。

1.3 模型制备

模型制备参照文献[2]加以改进后进行:传代培养 5 d 的细胞,细胞长满培养瓶底及盖玻片 85%左右,按细胞培养瓶随机分为 6 组(n=4):C 组:等量空白培养基对照;A0 组:抑肽酶预处理浓度为 0 U/ml,凝血酶终浓度为 100 U/ml;A100 组:预先加入终浓度为 100 U/ml 的抑肽酶,15 min 后加入终浓度为 100 U/ml 的凝血酶;A300 组:预先加入终浓度为 300 U/ml 的抑肽酶,15 min 后加入终浓度为 100 U/ml 的凝血酶;A500 组:预先加入终浓度为 500 U/ml 的抑肽酶,15 min 后加入终浓度为 100 U/ml 的凝血酶;A700 组:预先加入终浓度为 700 U/ml 的抑肽酶,15 min 后加入终浓度为 100 U/ml 的凝血酶。培养基中含有灭活胎牛血清的浓度为 3%。

1.4 免疫细胞化学检测

细胞传代生长 5 d 后进行星形细胞的特异性蛋白 GFAP(1∶200)鉴定:培养于盖玻片上的细胞,随机分为对照组和实验组(n=4),对照组以 PBS 代替一抗,余操作步骤与实验组相同,ABC 法进行免疫细胞化学,显微镜下观察,计算阳性细胞率。

1.5 细胞凋亡检测

1.5.1 流式细胞仪检测细胞的凋亡 取出药物处理后的细胞,1%EDTANa 轻度消化后细胞刮刀轻轻刮出并收集细胞,分别置 10 ml 玻璃离心管中,用 4 ℃PBS 洗细胞,800 r/min 离心 5 min,共 2 次,最后于离心管中留取 0.5 ml 细胞悬液,轻轻混匀,加入 20 μg/ml RNase 酶、50 μg/ml 浓度的碘化丙啶和 0.3% TritonX-100 共同染色,4 ℃避光放置 30 min。将细胞悬液混匀,过 200 目尼龙网,然后在流式细胞仪上检测。应用 CellQuest 软件获取细胞 10 000 个,进行凋亡细胞计数。以 Winmdi2.8 和 Cylchred 软件进行凋亡峰拟合及细胞周期分析,G_1/G_0 期前的 G_1 亚峰(sub G_1/G_0)即为凋亡细胞。

1.5.2 AO-EB 复染观察细胞凋亡 10 mg/ml EB 和 10 mg/ml AO 按 1∶1 比例在用前混合配制成 AO-EB 复合染液。药物作用 48 h 后取出盖玻片,轻轻冲洗 2 次,稍晾干后即滴加 AO-EB 复合染液,立即荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 软件包进行单因素方差分析,计数资料进行 χ^2 检验。

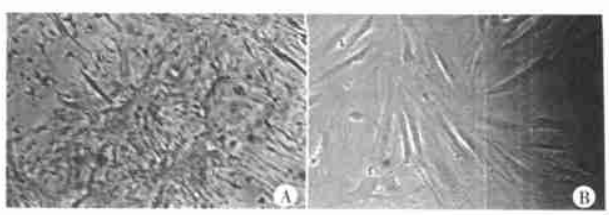
2 结果

2.1 细胞培养结果

星形细胞经传代和纯化培养后进行 GFAP 免疫细胞化学法鉴定,星形细胞纯度达(97.5±2.3)%。

2.2 形态学改变

凝血酶加入后,通过倒置显微镜观察发现,同 C 组相比,A0 组星形细胞的突起发生明显的回缩,细胞间的极性消失,部分细胞开始聚集成团,形成"集落"或"沟壑"样结构(图 1A)。预先加入不同剂量抑肽酶后,细胞回缩明显减弱,细胞间生长仍保持一定的极性,胞体形态改变缓解,脱落细胞明显减少,核固缩现象明显改善(图 1B)。



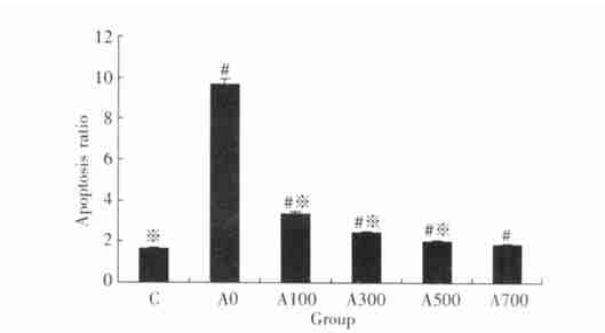
A: Astrocytes at 48 h after treatment with thrombase; B: Astrocytes pretreated with aprotinin

图 1 凝血酶作用后的星形细胞 (倒置显微镜×200)

Fig 1 Astrocytes treated with thrombase (Inverted microscope × 200)

2.3 细胞凋亡检测结果

2.3.1 流式细胞仪检测 使用 PI 染色,流式细胞仪行细胞周期检测,位于 G_0/G_1 期前的 G_0/G_1 亚峰即是凋亡峰,通过 Winmdi2.8 和 Cylchred 软件进行凋亡峰拟合及细胞周期分析,结果显示,A0 和 A100 及 A100 和 A300 间均有非常显著的差异($P<0.01$),A300 和 A500 间有显著性差异($P<0.05$),A500 和 A700 间差异不显著($P>0.05$),见图 2。



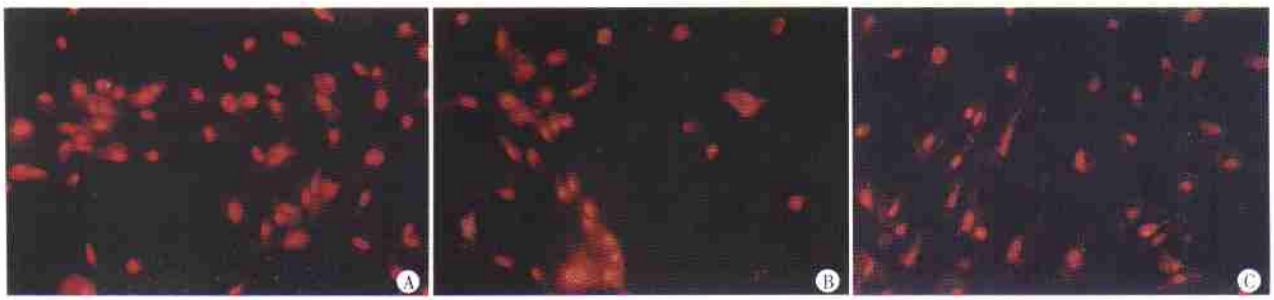
#: $P<0.01$, *vs* group C, ※: $P<0.05$, *vs* group A0

图 2 流式细胞术检测的星形细胞凋亡率

图 2 Apoptotic rate of astrocytes detected by FCM

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3.2　AO-EB 染色结果　　绿色滤光片下, 可见对照组细胞呈均匀一致的红色(蓝色滤光片下呈均匀一致的绿色), 核轻度深染(图 3A)。A0 组细胞在相同大小视野下明显减少, 极性消失, 多聚集成团, 突起明显回缩, 细胞大部分均变为圆形, 染色不均, 细胞核周围出现分布不均的黄色亮点, 胞体呈橙黄色, 核浑浊不清, 为染色质溢出核膜所致, 细胞呈凋亡形态(图 3B)。抑肽酶预处理组细胞丛集现象消失, 细胞核染色均匀, 核膜完整, 但并未完全恢复正常(图 3C)。



A: Normal astrocytes; B: Astrocytes treated with thrombase; C: Astrocytes pretreated with aprotinin

图 3　AO-EB 染色的星形细胞　(AO-EB × 400)

Fig 3　Astrocytes stained with A0-EB　(AO-EB × 400)

3　讨论

颅内出血是临床常见的一种危急重症, 出血后脑水肿、脑细胞坏死及局部甚至全身的功能障碍, 晚期可形成癫痫、功能丧失、神经或精神异常等后遗症, 出血后脑细胞损伤是该类病人致残甚至死亡的主要原因之一。国内外近几年的研究表明, 出血后血肿形成过程中大量的凝血酶释放可能是脑出血后并发症形成的主要原因, 并对此进行了一些相关性的研究, 但至今未能找出理想的适合临床应用的药物治疗方案[3]。

3.1　关于实验设计

本实验采用流式细胞仪和 AO-EB 染色法检测了凝血酶不同剂量下细胞的凋亡率, 具有客观、简便的特点。从结果分析, 100 U/ml 底物浓度的凝血酶细胞凋亡率为(9.66 ± 2.68)%, 凝血酶底物浓度低于 100 U/ml 的各组细胞凋亡率均低于 10%, 并非很高, 与在体的动物实验的大面积的细胞损伤和凋亡也有较大差别, 分析产生这种结果的原因主要有: ①体外实验和在体实验间存在差别, 凝血酶在机体内除参与直接性损伤外, 还参与了机体的炎症反应[4]。②体外细胞在凋亡和死亡的同时, 仍在继续分裂增殖, Reimann 等[5] 研究发现, 增殖细胞和非增殖细胞在药物诱导的细胞凋亡率间存在明显的区别, 非增殖细胞在凋亡率达到 30%时, 大部分增殖细胞仍未出现凋亡反应。③凝血酶在促进凋亡的同时, 也促进了星形细胞的分裂增殖, 具体结果要根据哪种作用占优势。④体外培养的星形细胞是单一性细胞, 缺乏在外界刺激时细胞间的相互影响。⑤在体实验使用的凝血酶剂量和离体细胞使用的剂量存在当量上的区别。所以从以上因素分析, 凝血酶诱导的星形细胞凋亡仍然非常严重。

3.2　抑肽酶作用的可能机制

抑肽酶是一种天然丝氨酸蛋白酶抑制剂, 它是一种含有 58 个氨基酸和 3 个二硫键的单链多肽, 抑肽酶预处理后细胞的凋亡率明显降低, A100 和 A300 组抑制细胞凋亡率的作用具有非常显著的统计学差异($P < 0.01$), 而更大剂量的 A500 组和 A700 组进一步降低凋亡率的作用有限, 说明使用中小剂量的抑肽酶拮抗凝血酶诱导的星形细胞凋亡是比较合理的。

体外培养的星形细胞存在大量的凝血酶激活受体——蛋白酶激活受体(protease activated receptors, PARs), 主要包括 PAR1、PAR3、PAR4, 特别是 PAR1, 广泛存在于星形细胞、神经元、脑毛细血管内皮细胞、小胶质细胞上, 凝血酶可与之结合, 促使其裂解成活性单体, 从而产生各种生物学效应。PAR1 在很小的凝血酶浓度下即可被激活, 而 PAR3 和 PAR4 则需要很高的凝血酶浓度[6]。从抑肽酶预处理后细胞凋亡率的改变可以看出, 抑肽酶并不能完全抑制大剂量凝血酶诱导的星形细胞凋亡。透射电镜下的超微结构改变也提示, 抑肽酶虽然可以在一定程度上改变凝血酶诱导的细胞超微结构的改变, 但是仍然存在明显的线粒体肿胀和内质网的扩张。这可能与抑肽酶特异性地抑制 PAR1 的裂解、而对 PAR3、PAR4 的活化无抑制作用或抑制作用较弱有关。

3.3　抑肽酶在脑外科手术中的应用前景

本研究采用抑肽酶预处理的方法, 临床研究也表明预处理的效果明显优于后期干预, 结合本研究结果, 可以认为抑肽酶和凝血酶是竞争性抑制, 抑肽酶可以竞争性抑制凝血酶与 PARs 的结合, 而对已经与 PARs 结合的凝血酶的致损伤作用则无拮抗作用或作用不强。在自发性脑出血和创伤性脑出血中, 无法进行预处理, 但可以抑制炎症反应和凝血酶再释放引起的神

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

经损伤，而在脑外科手术引起颅内出血则可进行抑肽酶预处理进行保护。

脑外科手术引起的脑内出血的危害性主要集中在直接的机械损伤、出血、炎症反应、脑水肿以及脑细胞的延迟性损伤，而抑肽酶除对直接的机械损伤不能干预外，可以减少出血、抑制炎症反应、保护脑血管屏障、保护细胞膜、减轻血管源性脑水肿和细胞源性脑水肿，更对凝血酶引起的脑细胞延迟性损伤有明显的保护作用，所以可以明确在脑外科手术中应用中小剂量的抑肽酶具有很高的价值，尤其是在引起脑内出血的长时间手术中有很好的应用前景。

本实验研究的的对象是体外培养的星形细胞，体外环境和体内存在着一定的差别，星形细胞也只是脑内功能细胞中较为重要的一种，本实验所研究的指标只能对细胞作用机制的少数几个方面进行解释，而要较全面地阐述抑肽酶和凝血酶在脑出血中的作用和机制，尚需进行大量的研究。

参考文献：

[1] Matsushita Y, Bramlett H M, Kuluz J W, *et al*. Delayed hemorrhagic hypotension exacerbates the hemodynamic and histopathologic consequences of traumatic brain injury in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(7): 847－856.
[2] 郑志[illegible] 林 玲. 神经细胞培养理论与实践[M]. 北京：科学出版社，2002. 89－103.
[3] Rincon F, Mayer S A. Novel therapies for intracerebral hemorrhage[J]. Curr Opin Crit Care, 2004, 10(2): 94－100.
[4] Hoff J T, Xi G. Brain edema from intracerebral hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2003, 86: 11－15.
[5] Reimann R, Philipp U, Weigel P H, *et al*. Mechanismas of cell death in primary cortical neurons and PC12 cells[J]. J Neurosci Res, 2001, 64(6): 654－660.
[6] Huang R, Hertz L. Receptor subtype and does dependence of dexmedetomidine-induced accumulation of [^{14}C] glutamine in astrocytes suggests glial involvement in its hypnotic-sedative and anesthetic-sparing effects[J]. Brain Res, 2000, 873(2): 279－301.

（编辑 栗 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)22-2036-01

32 例慢性支气管炎患者注射胸腺肽 α_1 后 T 细胞亚群的变化

Changes of T cell population in chronic bronchitis patients after injection of thymosin α_1: a report of 32 cases

施 阳，蹇启政 （四川省人民医院急救中心，成都 610072）

检测了 32 例慢性支气管炎患者，采用胸腺肽 α_1（thymosin α_1，Tα_1）治疗 3 个月前后 T 细胞亚群的比较，并以 30 例未用 Tα_1 治疗的慢性支气管炎患者进行同期对照。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择

62 例慢性支气管炎患者均为我院 2001 年 2 月至 2004 年 1 月门诊或住院病人。所有病例经询问病史及 X 线胸片检查均符合慢性支气管炎诊断标准。随机分成两组：Tα_1 治疗组（治疗）32 例，男 19 例，女 13 例，平均年龄 59.6 岁；对照组 30 例，男 17 例，女 13 例，平均年龄 61.3 岁，两组患者在年龄，性别，病变程度，病程等方面无显著性差异（$P>0.05$），具有可比性。

1.2 治疗方法

两组所有病例均无自身免疫缺陷性疾病，近 3 个月内未使用任何免疫调节剂，观察时间均为 3 个月。两组患者在慢性支气管炎缓解期均不给予任何药物，若遇急性发作期则常规给予抗生素抗感染以及祛痰、止咳、平喘等对症处理。治疗组在此基础上给予 Tα_1（成都地奥九泓制药厂生产）1.6 mg 皮下注射，2 次/周，连续 3 个月。

1.3 检测方法

治疗组及对照组共 62 例患者均分别于观察期限（3 个月）前后抽取 2 ml EDTA 抗凝血液，采用流式细胞仪测定法，检测外周 T 淋巴细胞及其亚群：CD3、CD4、CD8、CD4/CD8。

1.4 统计学方法

所得数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

2.1 治疗组治疗前与对照组同期 T 淋巴细胞及其亚群检查结果

表 1 结果显示治疗 Tα_1 治疗前与对照组相比 CD3，CD4，CD4/CD8 均低于正常，CD8 高于正常，两组相比无显著差异（$P>0.05$）。

表 1 治疗组治疗前与对照组 T 细胞亚群测定（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
治疗组	32	55.20±2.36	31.32±2.35	32.42±2.68	0.87±0.56
对照组	30	55.04±2.28	30.76±2.13	33.23±1.97	0.89±0.54
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

作者简介：施 阳（1962－），女，江苏省南通市人，副主任医师，主要从事急诊心肺复苏方面的研究。电话：13708189844

收稿日期：2004-09-09；修回日期：2004-11-05

（下转 2041 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net