文章编号: 1000-5404(1999)12-0884-03

尼莫通对脑缺血神经元凋亡作用的实验研究

陈康宁[1],董为伟[2] ([1]第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038; [2]重庆医科大学神经医学研究所,重庆 400016)

【提要】 目的: 观察钙超载与神经元凋亡的关系及钙通道阻滞剂的治疗作用。方法: 采用大鼠全脑缺血模型,观察脑缺血/再灌流后突触体游离钙、神经元凋亡的变化及尼莫通对上述的影响。结果: 脑缺血/再灌流可以导致突触体游离钙增加及神经元的凋亡,尼莫通可以阻止上述变化。结论: 钙超载参与了脑缺血/再灌流诱导的神经元凋亡,钙通道阻滞剂可以阻滞上述变化。

关键词 钙超载;尼莫通;脑缺血/再灌流;凋亡
中图法分类号 R743.31; R972.4 文献标识码 A

钙为细胞死亡的最终共同通路(Final common pathway)[1]。我们以往的研究表明钙超载在神经元缺血性损伤中起重要的作用。尤其是缺血诱导的神经元坏死。近年来发现凋亡参与了脑缺血神经元损伤[2],钙超载是否参与缺血诱导的神经元的凋亡值得进一步的研究。为此,我们采用Wistar大鼠全脑缺血/再灌流模型,观察脑缺血/再灌流脑组织突触小体游离钙、神经元凋亡的变化及尼莫通的影响,旨在探讨钙在缺血诱导神经元凋亡中的作用及尼莫通的治疗价值,为临床缺血性脑血管病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康Wistar大鼠随机分成缺血前、缺血20 min、缺血20 min再灌流1、6、24 h组,每组动物6只。实验动物由我校实验动物中心提供。

主要试剂: Fura-2/AM从中国医学科学院购得。细胞凋亡测定试剂盒德国Boehringer Mannheim GMbH购得。其他试剂均为国产分析纯。尼莫通由德国拜尔公司提供。

1.2 方法

1.2.1 Wistar大鼠全脑缺血模型制作 采用改良的Pulsinelli[3]法。

1.2.2 突触体内游离钙的测定 按照Dodd的方法提取突触体。按照Giovanni等[4]的方法测得突触体内的游离钙(nmol/L)。

1.2.3 神经元凋亡的原位观察 荧光标记的终末去氧核糖核酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TDT-mediated dUTP nick end labelling, TUNEL)。实验动物达到缺血/再灌流时限时,迅速从左心室灌注10%福尔马林(4℃),而后断头取脑,置灌注液中固定过夜(4℃)。常规石蜡包埋(软蜡)。常规切片(5 μm),脱蜡,入水。蛋白酶K消化30 min(37℃),0.15 mol/L PBS冲洗。加入试剂盒中的反应成分37℃孵育60 min,0.15 mol/L PBS冲洗。切片烤干,封片。用荧光显微镜观察,并记数每个切面的凋亡小体的数目。

1.2.4 药物干预 用尼莫通按每次1 mg/kg,腹腔内注射。缺血前15 min及缺血后20 min各给药1次。

1.3 统计学处理

采用Oxstat-H进行统计学处理。

2 结果

2.1 实验鼠脑缺血/再灌流突触体游离钙的变化及尼莫通的影响见表1

表1 尼莫通对神经元游离钙的影响(nmol/L, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The effect of Nimotop on intra-neuronal free calcium in ischemic rats(nmol/L, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

	Preischemic	20 min after ischemia	Ischemia for 20 min and then reperfusion (h)		
			1	6	24
Untreated	130.9± 8.07	232.32± 8.34☆★	427.34± 37.36★	1005.46± 89.12☆★	907.58± 39.91☆★
Treated	99.84± 8.36	110.8± 7.58☆	123.67± 11.14☆	250.84± 12.30☆	248.77± 11.21☆

☆: $P<0.001$ *vs* preischemic; ★: $P<0.001$ *vs* treated

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670269)

作者简介: 陈康宁,男,1964.08.27生,四川省雅安市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事脑血管病的研究,发表论文16篇。电话: (023)68754114-73079

收稿日期: 1999-03-20; 修回日期: 1999-08-30

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

2.2 实验鼠脑缺血/再灌流神经元凋亡的变化及尼莫通的影响见表 2

表 2 尼莫通对神经元凋亡的影响(/2 cm², n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The effect of Nimotop on apoptosis of neuron in ischemic rats(/2 cm², n= 6, $\bar{x}\pm s$)

	Preischemic	20 min after ischemia	Ischemia for 20 min and then reperfusion(h)		
			1	6	24
Untreated	7.5± 1.51	13.75± 2.15☆	24.57± 2.44☆★	37.7± 2.60☆★	115.14± 5.27☆★
Treated	5.5± 1.11	11.57± 1.62☆	19.7± 2.14☆	22.57± 2.15☆	36.00± 2.24☆

☆: P <0.001 *vs* preischemic; ★: P <0.001 *vs* treated

3 讨论

3.1 大鼠脑缺血/再灌流神经元凋亡的变化

我们的研究发现,在脑缺血前脑组织有一定的凋亡神经元,散布在皮层。这与 Morley等[1]的观察是一致的,可能是一种生理性的细胞死亡,或者是由于取材、紫外线的照射有关。而缺血以后,凋亡神经元明显的增加。再灌流以后,随着再灌流的进行,凋亡神经元不断的增加,这些增加的神经元主要分布在纹状体,这与 Li[5]的实验结果一致。

自 Goto 1990年发现脑缺血可以引起神经元凋亡以来,很多学者都致力于这方面的研究。结合我们的观察,可以肯定脑缺血/再灌流可以引起神经元的凋亡,也就是说:传统的认为脑缺血/再灌流引起神经元坏死的观念是不全面的,因为凋亡也参与了缺血性脑损伤。很多学者的研究表明凋亡的神经元主要存在于梗塞的内边缘,也就是说主要存在于缺血半影区。凋亡的程度决定了缺血梗塞范围的大小,这迫使人们从防治凋亡的角度去探索缺血性脑血管病的治疗。

3.2 大鼠脑缺血/再灌流神经元游离钙的的变化

我们的研究发现,脑缺血时神经元内游离钙浓度明显增高;再灌流以后,神经元内游离钙浓度进一步升高,到再灌流 6 h,神经元内游离钙浓度达到最高峰,以后钙浓度虽有下降,但仍高于缺血前水平。

正常神经元内的游离钙浓度很低,只有细胞外钙浓度的 1/10⁴。如此高的电化学梯度是依赖于细胞对钙的主动排出和细胞对钙的相对无通透性来完成的。细胞内的钙平衡(Calcium homestasis)对细胞生理功能的正常发挥是非常重要的。细胞通过以下机制来维持细胞内的钙平衡:① 细胞对钙的主动泵出,这是一个消耗 ATP的过程;② 细胞内的钙储(Intracellular calcium store)的缓冲;③ 某些蛋白的结合。如 Calcibindin。而脑缺血/再灌流时,细胞内钙明显增高可能与以下因素有关:① 脑缺血时细胞能量代谢受阻,钙排除受阻;② 脑缺血时大量自由基生成,破坏了细胞膜对钙的屏障功能,大量钙流入细胞内;③ 脑缺血时谷氨酸大量释放导致钙内流;④ 脑缺血对蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)的激活通过多种途径参与了钙内流,如直接修饰钙通道、促进自由基的生成、消耗 ATP及降低 G蛋白依赖的钙通道抑制作用[6]等。

3.3 细胞内钙增高与神经元的凋亡

我们的观察发现脑缺血/再灌流后细胞内游离钙的浓度不断增加,伴有神经元凋亡的不断增加。这提示脑缺血导致的钙超载参与了神经元的凋亡。我们用钙通道阻滞剂尼莫通防止了脑缺血/再灌流导致的钙内流,同时也减少了脑缺血/再灌流导致神经元的凋亡,也证明钙超载参与了神经元的凋亡。

钙超载参与神经元凋亡的机制目前尚不清楚,我们推测可能与以下因素有关:① 钙超载破坏了线粒体的结构和功能,使细胞能量代谢受阻,ATP生成减少;② 钙超载发生于细胞核,激活 Ca^{2+} –Mg^{2+} 依赖的内源性核酸内切酶,使 DNA降解成 185–200 bp核小体单位的 DNA片段,导致神经元凋亡;③ 钙超载可以促进自由基的生成从而导致神经元的凋亡;④ 钙超载可以激活蛋白激酶 C, PKC可以通过多种途径来引起神经元的凋亡,如激活磷脂酶促进自由基生成、磷酸化核转录因子(NF-κB)使其活化,使血管收缩加重缺血缺氧等。值得一提的是钙超载可以激活蛋白激酶 C,蛋白激酶 C的激活又可以促进钙超载,形成恶性循环,导致神经元的凋亡。

钙通道阻滞剂尼莫通可以阻滞脑缺血/再灌流诱导的钙超载,从而防止了钙超载所导致的一系列病理反应,可以减少脑缺血/再灌流诱导的神经元的凋亡。所以,从防治神经元凋亡的角度看,尼莫通不失为治疗缺血性脑血管病的一种良药。

参考文献

[1] Morley P, Hohan M J, Hakim A M. Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection[J]. Brain

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

Pathol, 1994, 4(3): 37- 47.
[2] Okamoto M, Matsumoto M, Ohtsuki T, *et al*. Internucleosomal DNA cleavage involved in ischemia-induced neuronal death [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 196(25): 1356- 1362.
[3] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral in the unaneathesized rat hemispheric ischemia [J]. Stroke, 1979, 102(3): 267-271.
[4] Giovanni F, Blaustein M P. Calcium buffering and free Ca^{2+} in rat brain synaptosomes [J]. J Neurochem, 1993, 60(6): 843- 850.
[5] Li Y, Chopp M, Jiang N, *et al*. Temporal profile of *in situ* DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(63): 389- 397.
[6] 陈康宁,董伟为. PKC与脑缺血损伤 [J].国外医学: 内科学分册, 1996, 23(4): 164- 167.

(编辑 汪勤俭)

Experimental study on the effects of Nimotop on neuronal apoptosis

CHEN Kang-ning, DONG Wei-wei (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To investigate the relationship between calcium overload and neuronal apoptosis and the role of Nimotop in treating ischemic neuronal injury. Methods: After the model of ischemia/reperfusion was established in male Wistar rats, the changes of activity of PKC and intraneuronal free calcium content were observed. Meanwhile, the effects of Dengzhanhua, the PKC inhibitor, on the two parameters was also observed. Results: Cerebral ischemia/reperfusion resulted in the increase of intraneuronal free calcium content and activation of PKC. Dengzhanhua could prevent this change. Conclusion: PKC plays an important role in ischemic neuronal injury through inducing calcium overload.

Key words calcium overload; Nimotop; cerebral ischemia/reperfusion; apoptosis

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39670269)

文章编号: 1000-5404(1999)12-0886-02

三孔法超声腹腔镜胆囊切除术 250例体会

Experiences of laparoscopic cholecytectomy by laproscopic ultrasonography with three hole method in 250 cases

曹 红[1],周月庆[1],彭和平[2] ([1]第三军医大学附属大坪医院肝胆外科,重庆 400042; [2]广州医学院附属第二医院,广州 510260)

腹腔镜胆囊切除术(Laparoscopic cholesystectomy, LC)具有手术时间短、生理干扰少、出血少、痛苦轻、恢复快、住院日短等优点,已得国内广大患者和医师的接受,该术式已得以普及,并经典地采用四孔操作法。我院于 1997年 12月至 1998年 8月采用以色列生产的 Sharplan超声腹腔镜系统连续对 250例患者施行三孔法 LC手术,术中常规用腹腔镜超声(Laparoscopic ultrasonography, LapUS)检查 45例,现将手术方法及结果报道如下。

作者简介: 曹 红,男, 1964.08.29生,四川省武胜县人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤治疗方面的研究,发表论文 8篇 电话: (023)68757247

收稿日期: 1998-09-30;修回日期: 1999-07-15

1 临床资料与方法

1.1 临床资料

本组 250例中,男 71例,女 179例(男∶女= 1∶2.52),年龄 21~ 79岁(平均 51.6岁)。既往有下腹部手术史 25例,上腹部手术史 4例。伴有心肺功能异常者 25例。术后诊断胆囊结石伴慢性胆囊炎 175例,胆囊息肉 47例,胆囊结石伴急性胆囊炎 28例,其中胆囊积脓 7例,胆囊坏疽 3例。术中采用全麻 247例,硬膜外麻醉 3例。

1.2 手术方法

术前常规置胃管,全麻气管插管或硬膜外置管后患者取头

(下转 889页)

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