DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.002

生物波调控因子对脑缺血保护作用的研究*

李露斯** (第三军医大学附属西南医院神经内科) 重庆,400038
黄春基 徐启旺 (第三军医大学生物波研究中心) 重庆,400038

提 要 目的:研究生物波调控因子对脑缺血后再灌流脑细胞线粒体有无保护作用。方法:通过大鼠四血管闭塞(热灼两侧椎动脉、夹闭两侧颈总动脉)造成脑缺血和再灌流的动物模型,提纯脑组织匀浆中线粒体并用丙酮酸钠及苹果酸钠作底物,测定脑细胞线粒体的呼吸三态、四态和呼吸控制率。结果:脑缺血20 min组和缺血20 min后再灌流4 d组大鼠脑线粒体呼吸功能与假手术组相比差异非常显著,特别是呼吸控制率的降低非常明显;而用生物波调控因子治疗的缺血20 min再灌流4 d的大鼠无论呼吸三态、四态及呼吸控制率都与假手术组差异不明显。结论:生物波调控因子对缺血后再灌流性脑损伤的脑线粒体呼吸功能有一定保护作用,研究可能为治疗缺血性脑损伤开辟一条新途径。

关键词 脑缺血;再灌流损伤;呼吸控制率;生物波调控因子
中图法分类号 R743.32

以往的研究发现短暂脑缺血及缺血后再灌流性脑细胞损伤的病理生理过程与线粒体的功能失调有关,线粒体功能失常可能是脑组织损伤的主要因素[1]。近年来我们在研究生物波理论时[2],分离纯化出了生物波调控因子(Bio-wave regulation factor, BRF),这种调控因子是细菌在特定条件下进行波动自我调控的产物,可促进细胞再分布及调节胞内蛋白质发生凝-溶过程而促进组织细胞功能恢复正常。本实验对大白鼠脑缺血及BRF治疗后脑细胞线粒体呼吸功能的变化进行了研究,旨在观察BRF对缺血性脑损伤的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康Wistar大鼠40只,雌雄不限。体重(180±40) g,由本校实验动物中心提供。

1.1.2 仪器设备 低温高速离心机(J2-21型 Beckman);氧电极(上海植物生理研究所);循环恒温水浴箱(北京市医疗设备厂);记录仪(重庆仪表总厂);721分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.1.3 药品与试剂 BRF注射液(100 mg/ml),本校生物波研究中心提供。ADP系美国Sigma公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 脑缺血再灌流动物模型的制作 采用改良的Pulsinell法[3,4]。大鼠用乙醚进行麻醉,用玻璃针分离暴露两侧第一颈椎横突孔,热灼两侧椎动脉。分离两侧颈总动脉,用微动脉夹夹闭两侧颈总动脉20 min,为缺血期。缺血期满松开动脉夹为再灌流期。整个缺血期意识丧失,直立反射消失者留作实验动物,废弃有抽搐及短暂昏睡的动物。未烧灼椎动脉,未夹闭颈总动脉,其余手术方法与脑缺血再灌流动物模型的制作相同的大鼠为假手术组。

1.2.2 实验分组 每组10只成活动物。① 假手术组。② 脑缺血20 min。③ 脑缺血20 min再灌流4 d组。④ BRF治疗组:用BRF注射液按500 mg/kg体重分别在缺血前20 min、缺血后20 min、再灌流24、48 h皮下注射,观察缺血20 min再灌流4 d大鼠脑线粒体的呼吸功能。

1.3 大鼠脑线粒体的分离

用改良的Clark技术[5]。大鼠按实验分组达到预定时间断头后迅速(30 s)取出前脑(去除脑干和小脑),浸入带有冰渣的分离介质中(25 mmol/L蔗糖,75 mmol/L甘露醇,1 mmol/L EDTA,pH7.4)剪碎,用分离介质洗3次,玻璃匀浆器手工匀浆(8上8下),制得脑匀浆。差速离心3 min(2000× g),取上清;离心8 min(12500× g),取沉淀;用3% Ficoll液10 ml(3% Ficoll: 0.12 mol/L蔗糖、0.03 mol/L甘露醇和25 μmol/L EDTA-K_2 pH7.4)悬浮沉淀。仔细分层后加入6% Ficoll溶液20 ml(6% Ficoll: 0.24 mol/L蔗糖,0.06 mol/L甘露醇和50 μmol/L EDTA-K_2 pH7.4),离心30 min(104000× g),取沉淀,用分离介质再悬浮沉淀离心10 min(12100× g)后得到的沉淀为提纯的脑线粒体,用分离介质稀释至20 mg/ml备用,以上所有操作均在0℃~2℃条件下进行。分离介质必须保持有冰渣状态。

用Lowry法测定脑线粒体蛋白[6]。

1.4 脑线粒体呼吸功能的测定

用氧电极法[6]。将1只大鼠脑提取的线粒体100 μl(20 mg/ml)加入2 ml反应体系中(120 mmol/L KCl, 15 mmol/L Tris-Cl 2 mmol/L Tris-PO_4, 75 mmol/L蔗糖,25 mmol/L甘露醇,0.05 mmol/L EDTA-K_2 pH7.4)温度30℃,孵育2 min,加入底

* 国家自然科学基金资助项目,No,39270273
** 李露斯,52岁,女,副教授

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

物 10μl(5 mmol/L丙酮酸钠+ 5 mmol/L苹果酸钠)后加入 ADP(200 nmol),测得氧气消耗率为呼吸三态(nmol·min^{-1}·mg^{-1})待 ADP完全磷酸化,氧气的消耗速度下降,此时测得的氧气消耗率为呼吸四态,三态/四态之比为呼吸控制率。

1.5 统计学方法

实验所得数据处理后用 $\bar{x}\pm s$表示。采用双标本 t检验。

2 结果

用氧电极法以丙酮酸钠加苹果酸钠作为底物,测得假手术组、缺血 20 min组(简称缺血组,Ischemia)、缺血 20 min再灌流 4 d组(简称再灌流组,Reperfusion)、缺血 20 min再灌流 4 d用 BRF治疗组(简称 BRF治疗组,BRF therapy)的呼吸三态、四态和呼吸控制率,见表 1

表 1　各组脑线粒体呼吸功能比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of cerebral mitochondria respiratory function($\bar{x}\pm s$)

Group	n	State 3 respiration	State 4 respiration	RCR
Control	10	26.01± 0.27	6.40± 2.42	4.15± 0.29
Ischaemia	10	14.15± 0.74**	7.21± 0.19	1.96± 0.24**
Reperfusion	10	38.60± 9.44**△△	17.0± 2.75**△△	2.32± 0.66**△
BRF therapy	10	21.40± 3.95△△	5.50± 1.78△	3.98± 1.06△△

** : $P<0.01$ *vs* control;△: $P<0.05$,
△△: $P<0.01$ *vs* ischaemia group

在本实验中,缺血 20 min组脑线粒体的呼吸功能明显下降,其呼吸三态与呼吸控制率分别下降至假手术组的 54% 和 47%;缺血 20 min再灌流 4 d组,虽然呼吸功能有所恢复,但与假手术组相比,仍有非常显著的差异,主要表现为呼吸四态的延长和呼吸控制率的降低。用 BRF治疗组的呼吸三态、四态和呼吸控制率与假手术组相比差异都不显著,而较脑缺血组的呼吸功能有明显好转。

3 讨论

本实验采用的 Pulsinelli的大鼠四血管闭塞造成全脑缺血及再灌流的动物模型,在双侧颈总动脉闭塞时前脑的血流量减少到 0.1 ml·mg^{-1}·min^{-1}以下[7]。缺血后再灌流脑血流量短暂增加(缺血后充血),以后逐渐减少(延迟性低灌注)。由于脑血流量的改变,使脑组织产生缺氧缺血的变化。McGee-Russel等[8]研究发现,在脑缺氧缺血的细胞损伤中,线粒体的改变发生最早。线粒体的功能是氧化磷酸化,两者是紧密偶联的,习惯上将呼吸三态的呼吸速度对四态的呼吸速度的比值称为呼吸控制率。呼吸控制率高,说明磷酸化对氧化的反馈控制强,偶联得紧密。本实验中观察到脑线粒体的呼吸控制率在脑缺血时下降非常显著,再灌流后仍然不能达到假手术组的水平,说明其为缺血性脑损伤的敏感观察指标。用 BRF治疗的大鼠其呼吸三态、四态和呼吸控制率都与假手术组差异不明显,表明可能由于 BRF的药物作用,大鼠虽然经受了缺血及再灌流的打击,但脑线粒体的呼吸功能仍然能恢复至假手术组水平。

实验结果表明 BRF对脑细胞线粒体呼吸功能的恢复有明显作用,其机制可能有二,一是对线粒体有保护作用,二是促进受影响的线粒体结构与功能的恢复。根据生物波理论[2]及其研究成果,BRF所具有的自组织作用及促进细胞再分布作用,可能是 BRF对缺血性脑损伤具有保护作用的原因所在。群体细胞发生自限和协同,可导致生物波,实验证实,细菌在营养物质大量消耗废物大量堆积的不利环境中会不再断裂而发生自限,并协同发生波动,出现宏观有序的生命活动过程,它说明了生物波调控因子所具有的自组织作用。针对脑缺血时细胞所处的不利环境,可能通过自组织作用使脑细胞发生自限,稳定线粒体膜及溶酶体膜,在渡过了不利因素的作用后,调节脑细胞呼吸功能发生迅速、明显的好转。组织正常情况下是处于动态平衡即非平稳状态,从而使得组织在多细胞结构上进行着较有规律的运动,这种运动的程度取决于自身代谢及自身所处环境的改变程度,这个过程被称为 Heptotaxis[9]。目前已被普遍接受的观点是机体对不利因素的抵抗力及损伤后的恢复能力,主要取决于细胞移动的速度和程度,BRF具有促进细胞再分布的作用,可能使这种细胞移动达到了一种较为合适的速度和程度。

参考文献

1 Sims N R. Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. J Neurochem, 1991, 56(6): 1836

2 刘俊康,郭　刚,徐启旺,等.生物波理论的研究.中国微生态学杂志, 1994, 6(6): 40

3 赵卫东.大鼠再灌流综合征模型初探.中华神经精神科杂志, 1987, 13(3): 193

4 Pulsinell W A, Brierley J B. A new model of bilateral in the unanes thatized rat hemispheric ischemia. Stroke, 1979, 10(2): 267

5 Clark J B, Nicklas W J. The metabolism of rat brain mitochondria Preparation and characterization. J Biol Chem, 1970, 245(10): 4724

6 Lowry O H. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193(2): 265

7 Todd N V, Picozzi P, Crockard H A, *et al*. Reperfusion after cerebral ischemia Influence of duration of ischemia. Stroke, 1986, 17(3): 460

8 McGee-Russel S M, Brown A W, Brierleg J B. A combined

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

light and electron microscope study of early anoxic-ischemic cell change in rat brain. Brain Res, 1970, 20(1): 193
9 Brandley B K, Shaper J H, Schnaar R L. Tumor cell haptotaxis. Dev Biol, 1990, 140(1): 161

(收稿: 1998-03-04;修回: 1998-07-14)
(编辑 汪勤俭)

Protective effects of bio-wave regulation factor on cerebral ischemia in rats*

Li Lusi, Huang Chunji, Xu Qiwang (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To determine whether bio-wave regulation factor (BRF) can exert protective effects on mitochondria in brain cells after ischemia/reperfusion. Methods: The state 3 and 4 respiration and respiration control ratio (RCR) of the mitochondria in brain cells were determined in a model of ischemia/reperfusion in rats. Results: The respiratory function, especially RCR, was significantly decreased in the rats with only cerebral ischemia and those with ischemia/reperfusion as compared with those of sham operation (SO). However, the respiratory function in animals treated with BRF was not markedly different from that in those of SO. Conclusion: BRF can exert protective effects on mitochondria in brain cells after ischemia/reperfusion, which might provide a new way for treatment of ischemic cerebral injury.

Key words ischemia/reperfusion; respiration control ratio; bio-wave regulation factor; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39270273

个案与短篇

烧伤病人血清中首次检出 LDH-IgG复合物1例

A case of LDH-IgG complex detected in serum of postburn patient

刘泽军* 杨 新 黄兴玉 魏明竞 (第三军医大学附属西南医院检验科) 重庆, 400038

病例: 对烧伤病人的血清标本进行 LDH同工酶测定时,发现异常的电泳带出现, LDH_4升高,并且在 LDH_5的阴极侧出现多余的同工酶带,红细胞 LDH同工酶测定显示出正常的型式,排除了遗传变异的可能性。为了鉴定异常带的性质,使用 IgG IgA IgM抗血清对病人血清进行免疫对流电泳,结果在加了抗 IgG抗血清的泳道中 LDH_4处及 LDH_5处出现沉淀线,证明异常带为 LDH结合免疫球蛋白 G复合物。

讨论

循环血中血清酶和免疫球蛋白结合形成可溶性的复合物,这一现象日本称为酶结合免疫球蛋白,欧美称为特异酶抗体[1],但在我国几乎未见报道。本例为烧伤病人中首次发现,酶结合免疫球蛋白的出现可导致酶活力的改变,影响同工酶的测定值[2]。由于发现的病例较少,其机制和临床意义尚不清楚,估计可能与疾病的进程有关[3]。

关键词 酶结合免疫球蛋白; LDH同工酶; 烧伤
中图法分类号 R392.11

参考文献

1 户沢辰雄.酵素结合性免疫ゲロブリンによる分子修饰.日本临床, 1995, 53(5): 50
2 Tozuka M, Hidaka H, Okumura N, *et al*. A case of immunoglobulin Aγ conjugated with lactate dehydrogenase-5 isoenzyme, causing an extremely high enzyme activity in serum. Clin Chem, 1996, 42(8): 1288
3 Nabeshima S, Hayashi J, Hirata M, *et al*. Increased lactic dehydrogenase (LDH)-linked immunoglobulin associated with interferon-α therapy in a case of chronic hepatitis C. Intern Med, 1994, 33(7): 446

(收稿: 1998-01-06;修回: 1998-05-21)
(编辑 汪勤俭)

* 刘泽军,男,43岁,副主任技师,硕士

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