DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.015

Iloprost液4℃保存兔胎脑皮层组织的细胞存活率及腺苷磷酸酯的含量变化*

刘海鹏 张可成 黄永萍** 黄林清** 吴悦维*** (第三军医大学附属新桥医院脑外科) 重庆,630037

提 要 以 Iloprost液、生理盐水为保存液,对4℃保存兔胎脑皮层组织进行对比研究,以了解4℃保存的细胞存活率及能量代谢情况。结果表明:① 随保存时间延长,细胞存活率逐渐下降,Iloprost液保存的细胞存活率明显高于生理盐水;② 三磷酸腺苷(ATP)、能量负荷(EC)随保存时间延长明显下降,在保存2 h后接近耗竭,两组间差异不显著($P > 0.05$)。从以上结果,我们认为 Iloprost液的保存效果优于生理盐水,但保存时间仍有限,应考虑在细胞保护剂的基础上加用新陈代谢抑制剂,从而降低代谢速度,改善4℃保存。

关键词 兔胎脑;组织保存;细胞存活率;腺苷磷酸酯含量; Iloprost
中图法分类号 R446.8

脑组织保存对于中枢神经组织移植有着重要的意义[1]。在脑组织保存方法中,4℃保存较为简单易行,便于推广及临床应用,但保存时间不长。所以有些学者在4℃保存时加用细胞保护剂,以延长保存时间[2~4]。本实验采用 Iloprost[一种前列腺环素(PGI2)的新的、稳定的衍生物]为细胞保护剂,从细胞存活率及能量代谢方面探讨4℃保存时间不长的原因,为进一步改善4℃保存效果提供参考。

1 材料与方法

1.1 兔胎脑皮层组织的取材与保存

通过无菌手术,取出健康孕兔的23 d~24 d胚胎。0.5%洗必泰消毒胎兔头皮,剪开颅骨及硬脑膜,小心揭去软脑膜,暴露脑组织。确认大脑皮层组织后,以锐利刀片切下,放入冷生理盐水中,切为约1 mm×1 mm×1 mm大小,随机置于生理盐水或Iloprost液中,于4℃条件保存。Iloprost由德国 Schering AG公司 Thierauch博士提供,临用前配成50 ng/ml。

1.2 保存后的脑组织作台盼蓝染色检查

在无菌条件下,将保存前及保存后不同时间的脑组织以机械法制成($2\sim4$)×10^6/ml的细胞悬液,其后立即进行台盼蓝染色,相差显微镜计数200个细胞,记录活细胞百分比(即细胞存活率)。

1.3 保存后1 h、2 h及保存前的组织中的三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)的提取与检测

1.3.1 腺苷提取 组织从保存液中取出后,立即置液氮中保存。检测前取出,在0℃加冷冻的3.6%高氯酸3 ml在预冷的乳钵中研磨,制匀浆,0℃反应30 min后,0℃离心30 min(16000×g)取上清,用3 mol/L KOH 0.5 mol/L K_2CO_3中和,调pH值为5.0~6.0,0℃放置12 h,再次离心(0℃,10 min,1000×g),取上清液于-25℃保存待测。

1.3.2 标准曲线制作 将标准品 ATP、ADP、AMP分别配成:(1×10^{-10}) mol/ml,(3×10^{-10}) mol/ml,(0.5×10^{-10}) mol/ml,并分别逐次两倍稀释5次。按 Jennings等[5]方法行高效液相色谱(HPLC)分析,制标准曲线,算回归方程。

1.3.3 检测 将提取液于0℃自溶,用45×10^{-6} m微孔滤膜抽滤,取20 μl滤液用于检测。色谱条件:色柱为4.6 mm×150 mm ultrasphere ODS不锈钢柱;流动相为0.05 mol/L、pH6.0磷酸胺缓冲液加甲醇,其中甲醇含量0 min~5 min由0%升到2%;5 min~10 min甲醇维持在2%水平,12 min~15 min甲醇由2%升至8%,15 min降为0%。检测后按回归方程计算样品分析结果。

1.3.4 蛋白定量及计算 据 Lowry法测定蛋白含量,然后以 ATP、ADP、AMP的测定值除以蛋白含量,单位以 b_B μmol·g^{-1} pro表示。

2 结果

2.1 兔胎脑皮层组织4℃保存的细胞存活率检测结果见表1

表1 兔胎脑皮层组织4℃保存的细胞存活率(%) ($n=5, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 Survival rate of rabbit embryonic brain cortex cells preserved at 4℃ (%) ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

	Pre-preservation	Post-preservation (h)			
		1	2	3	4
Saline	85.58 ± 1.72	84.68 ± 2.32	78.18 ± 1.27△	68.44 ± 3.94△	58.60 ± 1.80△
Iloprost	85.50 ± 1.74	84.42 ± 1.77	81.86 ± 1.06△*	73.56 ± 3.05△*	70.28 ± 1.12△*

△: $P < 0.01$ *vs* pre-preservation; *: $P < 0.01$ *vs* saline

* 全军"八五"攻关项目
** 中心仪器室 重庆,630037
*** 麻醉科 重庆,630037

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

由表 1可以看出,在不同保存组中的兔胎脑皮层组织,其细胞存活率在不同时间均有明显差别。保存前细胞存活率为 85.5%左右,保存 1 h,有所下降(约 1%),差异无显著性($P > 0.05$)。保存 2 h及以后,细胞存活率均显著下降($P < 0.01$)。另外在保存 2 h及以后,Iloprost液组的细胞存活率明显高于生理盐水组($P < 0.01$)。

2.2　兔胎脑皮层组织 4℃保存的腺苷酸含量及能量负荷(Energy charge, EC)水平见表 2

表 2　兔胎脑皮层组织 4℃保存的腺苷磷酸酯含量及能量负荷水平 ($n = 5$)

Tab 2　Adenosine phosphates contents and EC level of rabbit embryonic cortex preserved at 4℃　($n = 5$)

		ATP	ADP	AMP	TAN※	EC※
Pre-preservation		9.10± 0.13	1.67± 0.20	0.24± 0.06	11.01± 0.33	0.90± 0.11
Post-preservation						
Saline	1 h	2.87± 0.06△△	2.21± 0.02△	5.18± 0.33△△	10.89± 0.10	0.36± 0.01△△
	2 h	0.21± 0.02△△**	1.85± 0.06	3.49± 0.81△△**	5.54± 0.80△△**	0.21± 0.03△△**
Iloprost	1 h	2.75± 0.11△△	3.56± 0.79▲△△	6.72± 1.06△△	13.03± 1.91	0.35± 0.02△△
	2 h	0.27± 0.08△△**	1.73± 0.10**	3.40± 0.76△△**	5.41± 0.89△△**	0.21± 0.02△△**

※: TAN= ATP+ ADP+ AMP; EC= (ATP+ 0.5ADP)/(ATP+ ADP+ AMP); ATP, ADP, AMP, TAN expresed by b_B/μmol·g^{-1} pro; △: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$ *vs* pre-preservation; ▲: $P < 0.05$ *vs* saline; ** : $P < 0.01$ *vs* 1 h in each group

由表 2可以看出,不论是用生理盐水或是 Iloprost液于 4℃保存兔胎脑皮层组织,其组织中 ATP含量及能量负荷(EC)均随保存时间延长而明显下降($P < 0.01$),两保存组之间差异不显著($P > 0.05$)。ADP含量则在保存 1 h显著上升,保存 2 h有所下降,Iloprost液组尤为明显($P < 0.01$)。AMP含量在保存前为 b_B/0.24μmol·g^{-1} pro;保存 1 h生理盐水组及 Iloprost液组均明显上升,分别为 b_B/(5.18～6.72)μmol·g^{-1} pro,保存 2 h与 1 h相比又分别明显下降了 b_B(2.32～3.32)μmol·g^{-1} pro($P < 0.01$)。TAN含量在保存 1 h,两组同保存前比较均无明显变化,而在保存 2 h均明显下降($P < 0.01$)。

3　讨论

由于中枢神经系统的代谢率远高于其它组织,而脑内氧、葡萄糖、ATP及磷酸肌酸储备能力极小,所以脑组织离体后,因缺氧及无营养物质供应,很快即致能量衰竭,导致死亡。一般认为低温可降低代谢需要,从而延长组织离体后的存活时间。但温度低于 0℃,因冰晶的机械破坏及复温中冰的溶解都会对细胞造成严重的损伤。目前常用的 -80℃或 -196℃低温保存,方法复杂,需添加低温保护剂以避免或减少组织细胞在冻融过程中的损害,但低温保护剂又有毒性,可致细胞的不可逆性损伤[2]。相对而言,4℃保存不经过细胞冻融过程,则无需添加低温保护剂,并且方法简便,但保存时间不长。所以有的学者在 4℃保存中应用细胞保护剂如尼莫地平、PGE$_1$、神经生长因子(NGF)、Iloprost等[2-4]来改善 4℃保存。

在这些细胞保护剂中,PGE$_1$虽有较强的细胞保护作用,但在 37℃及生理 pH时,会迅速破坏而失去作用。Iloprost是 PGE$_1$的衍生物,其药理性能更有效且稳定,其细胞保护作用主要有以下几个方面[2]:① 具有强的膜稳定作用,能保护组织免受溶酶体酶的作用;② 可清除氧自由基;③ 可能有钙通道调节作用,从而防止钙离子内流及兴奋性氨基酸的释放。胎脑组织离体后即处于缺血、缺氧环境,使产生氧自由基,并因溶酶体酶、兴奋性氨基酸的释放及钙离子内流,致组织细胞死亡。所以 Iloprost可以保护胎脑组织对抗有害刺激,在缺血缺氧状态下继续存活。Palaoglus以 Iloprost液保存大鼠胎脑组织并将所保存组织用于移植也取得了良好的结果[2]。本实验则首次以 Iloprost液为保存液,对兔胎脑皮层组织进行保存。实验结果显示,以 Iloprost液保存的兔胎脑皮层组织,其细胞存活率明显高于生理盐水同期保存,并且其形态学改变也较生理盐水组为优[4]。

本实验还对所保存组织的腺苷磷酸酯含量进行了检测,以推测能量代谢变化,探讨保存时间不长的原因。在 4℃保存时,因低温的作用,磷脂类物质丧失,ATP大量分解,而 ATP合成反而降低,细胞又要利用 ATP,所以导致 ATP迅速下降,ADP上升。随后因能量代谢的需要,ADP、AMP相继分解。最终导致总腺苷酸(TAN)的变化及能量负荷(EC)的明显下降[5]。本

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

组结果基本符合上述过程。但本实验中还可以看出,两组相比,除 ADP含量在保存 1 h有差异外($P < 0.01$),其它各项均无明显差异。据此,我们推测 Iloprost液对所保存组织能量代谢的影响与生理盐水基本一致。因此,能量的迅速衰竭可能是4℃保存时间不长的原因之一。

本实验中还发现,保存兔胎脑皮层组织2 h, ATP接近耗尽, EC明显下降,而此时两组的细胞存活率都比较高,病理改变也不明显。分析其原因,可能为:① 神经元维持膜电位及结构完整,需消耗大量能量,所以能量变化发生于细胞活性变化之前。② 能量耗竭仅是细胞死亡机制之一,虽然能量接近耗尽,但细胞并不一定死亡。而台盼蓝染色法所反映的"死活"细胞只是是否发生了"膜漏"的细胞。因此,我们认为单纯以 Iloprost液为保存液仍然是不够的,应考虑予以改进,除考虑如何防止能量衰竭(降低代谢、添加底物)外,还应继续深入研究4℃保存中有关的代谢旁路、膜标志酶的反应速度、低温时细胞体积及细胞外液 pH的变化及降温的方式、速度等。

(向为本实验提供 Iloprost的 Thierauch博士表示致谢!)

参考文献

1 Couier T J, Gallagher M J, Sladek C D. Cryopreservation and storage of embryonic rat messencephalic dopamine neurons for one year: comparison to fresh tissue in culture and neural grafts. Brain Res, 1993; 623(2): 249

2 Palaoglu S, Erbengi A, Kaya S *et al*. Improved survival of transplanted cortical brain tissue grafts by iloprost in rats. Surg Neurol, 1990; 34(4): 212

3 王振宇,段国升,张 纪等.神经生长因子促进胚胎脊髓组织移植前后及生长的形态学观察.中华神经外科杂志, 1993; 9(2): 80

4 刘海鹏,张可成. Iloprost液4℃保存兔胎脑皮层组织的实验研究.立体定向和功能性神经外科杂志, 1995; 8(1): 1

5 Belzer F O, Southard J H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation, 1988; 45: 673

(收稿: 1995-12-25;修回: 1996-09-07)

(编辑 冯崇英)

Changes of cell survival rate and adenesine phosphates content in rabbits' embryonic brain cortex preserved in iloprost solution at 4℃

Liu Haipeng, Zhang Kecheng, Huang Yongping, Huang Linqing, Wu Yuewei (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract In order to demonstrate the survival rate and energy metabolism of the cells of brain cortex preserved at 4℃, a comparative study was undertaken between the rabbits' embryonic brain cortex preserved with iloprost solution (50 ng/ml) and that preserved with saline at 4℃. It was found that: (1) The cell survival rate of the preserved cortex was decreased with the prolongation of the preserving time. The cell survival rate in iloprost solution was significantly higher than that in the saline. (2) Adenosine triphosphate (ATP) and energy charge (EC) level was obviously decreased when the preserving time was prolonged and tended to be exhausted on the second hour after preservation. The difference between the two groups was not significant statistically ($P > 0.05$). Through the analysis of these findings, it was concluded that iloprost solution was better than saline in preserving the rabbits' embryonic brain cortex but its preserving time was still limited. It is suggested that some metabolism inhibitors be added to the cell protective agents to decrease the metabolic speed and improve the preserving effects at 4℃.

Key words Embryonic brain, rabbit; tissue preserration; cell survival rate; Adenosine phosphates; Iloprost

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