

【基础研究】

作者简介:殷 闯(1981-),男,河南南阳人,硕士,主治医师,研究方向:脑血管病。

that in the model group, but higher than that in the control group ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that the expression of caspase-3 in astrocytes after OGD/R in the model group was relatively the highest, it in the experimental group took second place, while it in the control group was the lowest, there was significant difference among the three groups ($P < 0.05$). After OGD/R for 24 h, the level of LDH in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), while it in the model group was higher than that in the experimental group ($P < 0.05$). **Conclusion** Butylphthalide can improve astrocyte injury which was induced by OGD/R.

Key words: caspase-3; butylphthalide; astrocytes; oxygen-glucose deprivation and reoxygenation

脑组织缺血再灌注损伤后的过度炎症反应是导致缺血性脑血管疾病的重要损伤机制之一, caspase-3 作为细胞凋亡发生时的重要中间物质, 具有促进细胞凋亡的作用^[14]。本研究主要通过离体条件下培养 Sprague-Dawley (SD) 大鼠的星形胶质细胞, 由星形胶质细胞模拟缺血再灌注模型, 进而检测星形胶质细胞培养液中乳酸脱氢酶的水平 and 上清液中 caspase-3 的含量, 探讨丁基苯酞对离体条件下大鼠星形胶质细胞损伤的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 出生 24 h 内的 SD 大鼠 5 只, 雌雄不限, 体质量约 10 g。由新乡医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器 高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、无糖 DMEM 购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰蛋白酶购自美国 HyClone 公司, 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司, caspase-3 mRNA 原位杂交试剂盒、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体、caspase-3 抗体、菁染料琥珀酰亚胺酯-3 (CyDye mono-reactive NHS esters, Cy3)、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的荧光二抗购自武汉博士德生物工程有限公司, 丁苯胺氯化钠注射液购自石药集团恩必普药业有限公司, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自美国 Sigma 公司。荧光显微镜购自日本奥林巴斯公司, 台式高速离心机、371 型细胞培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司, 37 °C 恒温孵育箱购自德国 Heraeus Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠星形胶质细胞的原代培养及纯化 将新生 24 h 内的 SD 大鼠断头处死, 快速剥离皮层上脑膜与血管膜, 分离鼠端脑皮质, 于解剖液中切碎, 将切碎的脑组织置于 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰蛋白酶中, 37 °C 下消化 30 min。取出已消化的组织置于培养

液中终止消化。经机械吹打, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 重悬后制成密度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 接种于事先用多聚赖氨酸包被过的培养瓶中, 放入 37 °C、体积分数 5% 的 CO_2 培养箱中进行培养。每 3 d 更换新鲜培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM), 体外培养的混合胶质细胞培养到第 7 ~ 9 天进行纯化。

分离培养的混合细胞接种 2 h 开始贴壁生长, 2 d 后胞体增大, 细胞开始长出细小突触, 5 d 时基本长满瓶底, 进而分离传代、纯化, 传至第 3 代胞体较大、扁平、形状多样, 从胞体发出许多有分支的突起, 形成较密集的细胞网络。

1.3.2 免疫荧光染色鉴定星形胶质细胞 将第 3 代原代培养的星形胶质细胞接种于含有盖玻片的 6 孔板中, 盖玻片事先由多聚赖氨酸包被, 细胞经 48 h 贴壁并伸出突触后, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 漂洗 3 次, 再用 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定 10 min, 弃去多聚甲醛, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 用体积分数为 0.1% Triton 作用 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白封闭 1 h, 弃掉封闭液, 加兔抗大鼠 GFAP 抗体 (1 : 200 稀释), 孵育过夜, 弃一抗, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 加 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 200 稀释), 室温孵育 2 h, 将二抗清洗干净, 用 1 : 20 DAPI 染核, 室温孵育 10 min, PBS 漂洗 5 次, 每次 3 min。加入防荧光淬灭封片剂, 避光。荧光显微镜下观察拍照所培养细胞荧光表达情况。

1.3.3 实验分组和氧糖剥夺/复氧糖模型的建立

取第 3 代融合 80% 以上的星形胶质细胞传代至 6 孔板内, 随机分为对照组、实验组和模型组。细胞经 48 h 贴壁并伸出突触后实验组及模型组更换 DMEM 无糖培养基进行氧糖剥夺, 对照组仍更换 DMEM 高糖培养基, 放入体积分数 95% 氮气、体积分数 5% CO_2 的培养箱中孵育。氧糖剥夺 6 h 后, 实验组更换含 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁基苯酞的 DMEM 高糖培养基, 模型组更换为 DMEM 高糖培养基, 对照组更换新的 DMEM 高糖培养基, 3 组细胞同时转移到细胞培养箱内培养 24 h。

1.3.4 MTT 法检测星形胶质细胞活性 取第3代星形胶质细胞以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 密度接种于96孔板,每孔100 μL ,细胞数为 10^4 个,待细胞融合后,按“1.3.3项”中氧糖剥夺/复氧糖处理过程操作,各孔加入相应的培养基100 μL 在复氧复糖24 h时,每孔加入MTT 50 μL ,在细胞培养箱内继续孵育4 h后平板离心机 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心5 min,弃培养液,每孔加150 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),37 $^{\circ}\text{C}$ 摇晃10 min,在450 nm波长处测定吸光度值,各组设5个复孔,独立重复3次,吸光度越高,表示细胞活性越大。

1.3.5 免疫荧光检测星形胶质细胞中 caspase-3 表达 取第3代星形胶质细胞传代至6孔板内,分组及氧糖剥夺过程如“1.3.3项”所述。细胞贴壁后,PBS漂洗3次,每次3 min,用 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多聚甲醛固定10 min,弃去,PBS洗3次,体积分数0.1% Triton 作用10 min,PBS漂洗3次,50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白封闭1 h,弃掉,加兔抗大鼠 caspase-3 抗体(1:200 稀释)和小鼠抗大鼠 GFAP(1:200 稀释),孵育过夜,弃一抗,PBS漂洗3次,加Cy3 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:200 稀释)和加 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(1:200 稀释),室温孵育1 h,弃二抗,荧光显微镜下观察拍照并观察是否有目的蛋白的表达。

1.3.6 免疫印迹检测星形胶质细胞中 caspase-3 表达 分别消化各组细胞,加蛋白裂解液,冰上裂解20 min,测目的蛋白 caspase-3 水平,加入上样缓冲液,沸水变性5 min,每孔加入40 μg 蛋白样品电泳,硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane,NC)转膜,封闭后加一抗(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加辣根

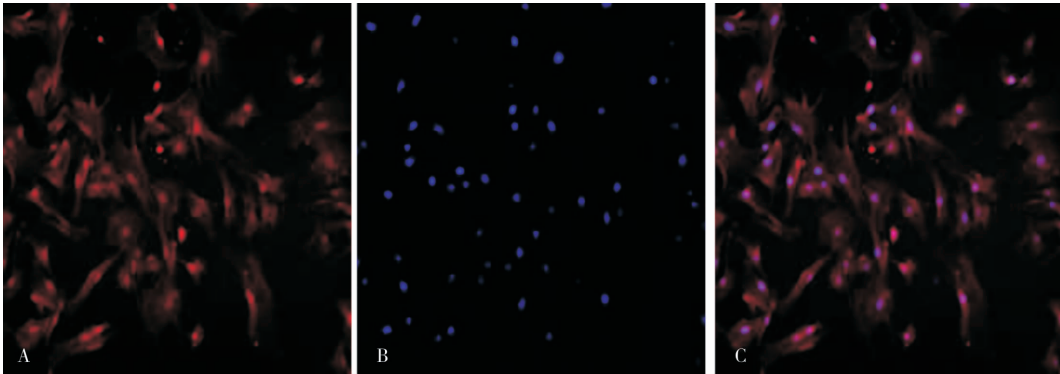
过氧化物酶(horse reddish peroxidase, HRP)标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影, β -actin 作内参对照,Image J 软件分析荧光条带吸光度值。以目的蛋白 caspase-3 与内参的比值进行统计分析。

1.3.7 星形胶质细胞培养液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平检测 将星形胶质细胞按照 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种于24孔板中进行培养,待星形胶质细胞贴壁后,吸弃旧的细胞培养液,随机分为对照组、实验组和模型组,每组设置3个复孔,实验重复3次,各组按1.3.3项处理过程进行氧糖剥夺/复氧糖,复氧糖后,收集各组细胞培养液,按照大鼠 LDH 酶联免疫吸附检测试剂盒的操作步骤测定各组细胞培养液中 LDH 水平。用酶标仪测定450 nm 波长下的吸光度值,然后通过标准曲线计算各组星形胶质细胞中 LDH 的水平。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Turkey 法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 星形胶质细胞鉴定 取原代培养第3代星形胶质细胞,用兔抗 GFAP 多克隆抗体进行免疫荧光染色,可见细胞阳性率达95%以上;荧光显微镜下可显示轮廓清晰的星形胶质细胞,细胞质呈红色荧光(二抗为 Cy3 标记),颜色略淡,细胞核荧光明显,细胞体宽大扁平,发出多个短而粗大的突起,形态不规则成片(图1)。



A:GFAP 染色;B:DAPI 染色;C:GFAP 与 DAPI 融合。

图1 免疫荧光染色鉴定星形胶质细胞(×200)

Fig.1 Identificating the astrocyte by immunofluorescence staining(×200)

2.2 各组星形胶质细胞活力比较 氧糖剥夺/复氧糖后 MTT 法检测对照组、实验组和模型组星形胶质细胞吸光度值分别为 0.728 ± 0.048 、 0.494 ± 0.054 、 0.213 ± 0.031 。对照组星形胶质细胞活力高

于实验组和模型组($P < 0.05$),实验组星形胶质细胞活力显著高于模型组($P < 0.05$)。

2.3 各组星形胶质细胞内 caspase-3 免疫荧光表现 免疫荧光染色显示,对照组星形胶质细胞内荧光

信号最弱;模型组星形胶质细胞内荧光信号最强;实验组星形胶质细胞内荧光强度较模型组降低,但高于对照组(图2)。

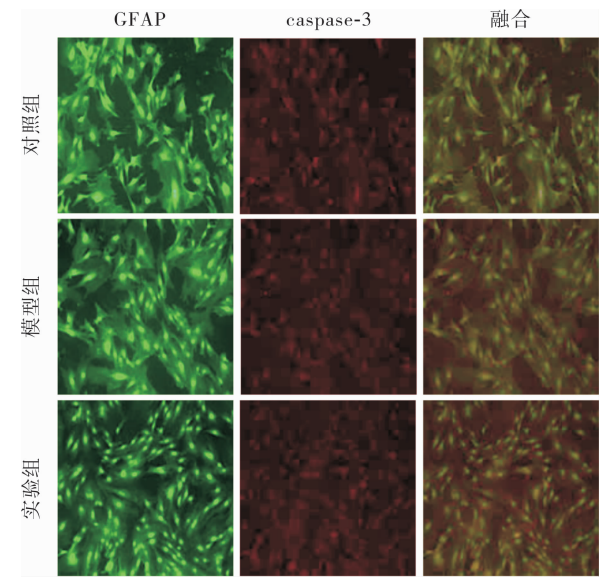


图2 复氧糖 24 h 后各组星形胶质细胞内 caspase-3 表达 (×200)

Fig.2 Expression of caspase-3 of astrocyte after reoxygenation for 24 h in the three groups(×200)

2.4 氧糖剥夺/复氧糖后各组星形胶质细胞内 caspase-3 表达比较 结果见图3。氧糖剥夺/复氧糖 24 h 后,对照组、实验组、模型组星形胶质细胞内 caspase-3 的表达分别为 0.4746 ± 0.0024 、 0.4934 ± 0.0007 、 0.5513 ± 0.0015 。模型组星形胶质细胞在氧糖剥夺/复氧糖后 caspase-3 表达相对较高,实验组次之,对照组最低,各组间两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

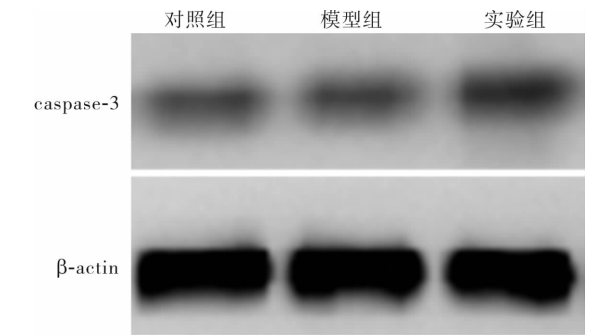


图3 免疫印迹检测各组星形胶质细胞内 caspase-3 表达

Fig.3 Expression of caspase-3 in astrocyte detected by Western blot in the three groups

2.5 各组细胞培养液中 LDH 水平比较 氧糖剥夺/复氧糖 24 h 后,对照组、实验组、模型组星形胶质细胞培养液内 LDH 水平分别为 498.56 ± 59.12 、 836.56 ± 102.50 、 1155.32 ± 122.46 ,实验组星形胶质细胞培养液中 LDH 水平高于对照组($P < 0.05$),

模型组星形胶质细胞培养液中 LDH 水平显著高于对照组和实验组($P < 0.05$)。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤机制复杂,其病理过程是一个多因素、多机制的级联反应,炎症反应是其中较为公认的一种机制。脑缺血再灌注损伤的最早反应是局部白细胞迁移、炎性细胞因子出现和增多等。在此过程中,趋化因子是具有调节白细胞迁移和小神经胶质细胞活化的关键物质。脑缺血再灌注损伤过程中各种趋化因子及炎症介质表达增加,白细胞释放大氧自由基和炎性因子,激活或抑制多种反应通路,导致继发神经损伤^[5-8]。

丁基苯酞对缺血性脑卒中具有较强的治疗作用,同时对脑损伤、惊厥、记忆障碍等疾患也有一定的改善和保护作用。丁基苯酞可作用于缺血性脑卒中所致脑损伤的多个病理环节,具有较强的抗脑缺血再灌注对神经元损伤的作用,具体表现为:(1)重构缺血区微循环,增加缺血区灌注,缩小脑梗死面积;(2)保护线粒体功能,恢复能量代谢;(3)改善神经功能损伤和促进患者神经功能恢复。对缺血再灌注损伤有保护作用^[9-11]。

Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,在细胞凋亡中起着不可替代的作用^[12-14]。Caspase-3 基因参与细胞增殖和凋亡的调控^[15]。Caspase-3 可以被多种因素活化,在杀伤性 T 细胞的杀伤作用中,它既可被 FAS/FASL 凋亡通路活化,也可以通过颗粒酶 B 途径活化。Caspase-3 最主要的底物是聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (poly-ADP-ribose polymerase, PARP),该酶与 DNA 修复、基因完整性监护有关。在细胞凋亡启动时,相对分子质量 116 000 的 PARP 在 Asp216-Gly217 之间被 caspase-3 剪切成相对分子质量 31 000 和 85 000 2 个片段,使 PARP 中与 DNA 结合的 2 个锌指结构与羧基端的催化区域分离,不能发挥正常功能。结果使受 PARP 负调控影响的 Ca/Mg 依赖性核酸内切酶的活性增高,裂解核小体间的 DNA,引起细胞凋亡。

本研究显示,氧糖剥夺/复氧糖后模型组中 caspase-3 表达明显升高,表明氧糖剥夺/复氧糖后细胞损伤导致细胞凋亡较其他组明显;同时,LDH 的表达也明显升高,也进一步证实了氧糖剥夺/复氧糖后的细胞损伤。而实验组应用丁基苯酞后星形胶质细胞中 caspase-3 及星形胶质细胞培养液中 LDH 均较模型组降低,提示丁基苯酞对氧糖剥夺/复氧糖后星形胶质细胞损伤有抑制作用,抑制 caspase-3 的表达是其可能的作用机制之一。

(下转第 373 页)

且雌激素 + 孕激素组的死胎率明显高于对照组,大鼠体质量明显低于对照组,对大鼠的预后影响较大,不利于后续实验研究的开展。综上所述,雌激素、孕激素、雌激素 + 孕激素均有诱导大鼠胆汁淤积的作用,采用孕激素给药方式能够建立更符合 ICP 研究的中孕期大鼠胆汁淤积症模型。

参考文献:

[1] 廖志,张勇,罗红权,等. 妊娠期肝内胆汁淤积症孕妇所产新生儿脐动脉血清诱导 A549 细胞凋亡的机制研究[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(2):98-100.

[2] 杜巧玲,段涛. 胆汁酸与妊娠期肝内胆汁淤积症发病机制关系的研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2013,48(2):141-143.

[3] GRONE A K,SMITH J F. Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Neo Rev*,2012,13(3):e145-e150.

[4] 张慧,卞兆连,王琦夏,等. 胆汁淤积小鼠模型的探讨[J]. 肝脏,2015,20(3):218-222.

[5] 朱平生,龙爱华,王兵. ANIT 诱发大鼠肝内胆汁淤积的动态病理变化观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):190-191.

[6] 杨红莲. 氯丙嗪致大鼠胆汁淤积效应及其作用机制研究[D].

北京:中国人民解放军军事医学科学院,2007.

[7] 戴进,王晓东. LPS 诱导动物胆汁淤积模型的制备及微胆管蛋白对 BSEP 功能影响的研究[J]. 中国血液流变学杂志,2009,19(4):525-526.

[8] WEI W,HU Y Y. Expression of hypoxia-regulated genes and glyco-metabolic genes in placenta from patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Placenta*,2014,35(9):732-736.

[9] 何春容,杨芳,刘小乐,等. 雌激素受体与妊娠期肝内胆汁淤积症的相关研究[J]. 实用临床医药杂志,2013,17(13):40-42.

[10] REYES H,SJOVALL J. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Ann Med*,2000,32(2):94-106.

[11] 张利平. 雌孕激素对孕鼠肝脏、胎盘组织中 FXR/BSEP 受体系统表达的影响研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2007.

[12] 王玥,赵晓杰. 妊娠期肝内胆汁淤积症及其不良结局的发病机制研究进展[J]. 现代妇产科进展,2015,24(2):155-157.

[13] 张利平,刘建,黄楠. 雌激素对肝脏、胎盘组织 FXR/BSEP 受体系统表达的影响研究[J]. 中国医药指南,2013,11(27):9-12.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

(上接第 368 页)

参考文献:

[1] 杨生汝,张伟,赵云鹤,等. c-Jun 在胆红素脑病幼鼠海马神经细胞凋亡中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(21):1654-1657.

[2] 王劲,陈燕,王琳,等. 高体积分数氧对骨髓间充质干细胞含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 和增殖细胞核抗原表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(3):217-220.

[3] 厉新新,刘丽娟,陈宝石,等. 银杏内酯 B 对 H₂O₂ 诱导人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2016,36(9):822-825.

[4] 李云,刘菲. Cyt C 和 caspase-3 在 STZ 诱导糖尿病大鼠晶状体上皮细胞中的表达[J]. 眼科新进展,2014,34(3):228-231.

[5] 李宏伟,周斌,张海鸿. TRPM8 通过 cAMP-PKA/UCP4 信号调控氧糖剥夺/复糖复氧诱导的神经元凋亡[J]. 南方医科大学学报,2016,36(9):1265-1270.

[6] 邓松筠,艾宇航,张丽娜,等. 脑红蛋白在氧糖剥夺-复氧复糖诱导人神经母细胞瘤细胞线粒体膜电位去极化及活性氧生成中的作用[J]. 中华内科学杂志,2017,56(1):44-48.

[7] YANG X,ASAKAWA T,HAN S,*et al.* Neuroserpin protects rat neurons and microglia-mediated inflammatory response against oxygen-glucose deprivation and reoxygenation treatments in an *in vitro* study[J]. *Cell Physiol Biochem*,2016,38(4):1472-1482.

[8] MA Y,ZHAO P,ZHU J,*et al.* Naointong protects primary neurons

from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced injury through PI3K-AKT signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2016,2016:5815946.

[9] 董高翔,冯亦璞. 丁基苯酞对局部脑缺血再灌注大鼠脑线粒体 ATPase、抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响[J]. 中国医学科学院学报,2002,24(1):93-97.

[10] 荣国铃,吴世政,张淑坤,等. 丁苯酞抑制原代大鼠海马神经元氧糖剥夺/复氧诱导的凋亡[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):1015-1019.

[11] 种兆忠,冯亦璞. 丁基苯酞对缺血脑组织中及低糖低氧刺激后培养的神经细胞中胆碱乙酰化酶活性的影响[J]. 中国药学杂志,1999,34(8):519-522.

[12] 马岚,张奕霞,练海东,等. 右美沙芬对糖尿病视网膜神经病变中 caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展,2015,35(5):432-434.

[13] 刘猛. 急性力竭运动大鼠脑皮质运动区组织中 caspase-3 的表达[J]. 新乡医学院学报,2017,34(1):22-25.

[14] 马艳,吴志鸿,司南,等. αB 晶状体蛋白对急性高血压大鼠视网膜神经节细胞保护作用机制的研究[J]. 眼科新进展,2015,35(4):318-322.

[15] 玄承敏,薛天阳,许伟,等. 苦参碱对人横纹肌肉瘤 RD 细胞增殖及凋亡的影响及其作用机制[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(3):233-235.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)