

· 基础研究 ·

短暂缺氧、血清剥夺再灌流后神经细胞顿抑现象的研究

邓晓红 张苏明 许予明 许康 喻志源

【摘要】目的 研究短暂缺氧、血清剥夺复氧复注血清(再灌流)后有无神经细胞顿抑现象存在及可能的发生机制。**方法** 将 PC12 细胞随机分为正常对照组和缺氧组,每组根据不同的再灌流时间点又分为 3 个亚组(缺氧组分别为缺氧 15 min 再灌流 1 h 组、3 h 组、6 h 组,正常对照组各亚组的时间点与缺氧组相对应)。测定短暂缺氧血清剥夺再灌流后不同时间点的三磷酸腺苷含量、线粒体膜电位和细胞活性。**结果** 与正常对照组相比,缺氧血清剥夺 15 min 再灌流 1 h 后的三磷酸腺苷含量、线粒体膜电位、细胞活性显著降低,差异具有显著性意义($P < 0.05$);缺氧血清剥夺 15 min 再灌流 6 h 后基本恢复至正常水平,差异无显著性意义($P > 0.05$)。**结论** 短暂缺氧血清剥夺再灌流后,存在低能量状态,且可完全恢复,表明可能存在神经细胞顿抑现象,其原因可能与缺氧血清剥夺再灌流后线粒体呼吸链上的琥珀酸脱氢酶等活性下降及线粒体的膜电位变化等有关。

【关键词】 缺氧; 血清剥夺; 再灌流; 神经细胞顿抑; 能量代谢

A study of the stunning phenomenon of nerve cells after transient anoxia-serum deprivation / reperfusion

DENG Xiao-hong, ZHANG Su-ming, XU Yu-ming, XU Kang, YU Zhi-yuan. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To identify whether there is nerve cells stunning after transient anoxia-serum deprivation / reperfusion and to explore the probable underlying mechanism of the phenomenon. **Methods** The PC12 cells were randomly divided into a control group and a anoxia group, the two groups were divided into 3 subgroups, respectively, according to time of reperfusion after 15 minutes of anoxia-serum deprivation. The content of adenosine triphosphate, mitochondria membrane potential and cell activity were determined at different time points after transient anoxia-serum deprivation / reperfusion. **Results** The content of adenosine triphosphate, mitochondria membrane potential and cell activity after 15 minutes of anoxia-serum deprivation plus 1 hour of reperfusion in the anoxia group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$) and they recovered to the level of the control group after 6 hours of reperfusion. **Conclusion** There was lower energy status after transient anoxia-serum deprivation / reperfusion, the lower energy status can recover to the normal level. The result showed that there might be nerve cells stunning. This phenomenon probably resulted from lower succinate dehydrogenase activity in the respiratory chain of the cells and the changes of mitochondria membrane potential.

【Key words】 Anoxia; Serum deprivation; Reperfusion; Nerve cells stunning; Energy metabolism

随着急性心肌梗死溶栓治疗及经皮冠状动脉腔内成型术等心脏介入性治疗和心脏外科手术的广泛开展,心肌顿抑现象已成为国内、外学者的研究热点^[1,2]。与此类似,Overgaard 等^[3]曾推测,在脑缺血早期阶段自发或者诱导发生的再灌流后可能出现“大脑顿抑”现象,即神经元暂时性功能障碍而非死亡的现象。目前大量临床试验和动物实验证实,超早期溶栓治疗急性脑梗死有显著的远期疗效,但近期疗效不明显^[4,5]。这种在短暂缺血再灌流后的脑组织或者梗死

灶周边半暗带的脑组织内出现的神经功能延迟恢复的现象,极可能与缺血半暗带区域内的“神经细胞顿抑”有关。本研究通过对短暂缺氧血清剥夺再灌流后不同时间点 PC12 细胞的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)含量、细胞活性和线粒体膜电位的动态变化的研究,进一步探讨神经细胞顿抑现象及其可能的发生机制。

材料与方法

一、材料与仪器

PC12 细胞购于武汉大学典藏中心, RPMI-1640 培养基、胎牛血清、马血清购于 Gibco 公司, ATP 化学发光检测试剂盒、Rhodamine123、四甲基偶氮唑盐(MTT)、十

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30070825)

作者单位:430030 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科(邓晓红现工作单位:湖北大学教育学院心理系;许予明现工作单位:郑州大学附属第一医院神经内科)

二烷基硫酸钠(SDS)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砷均购于 Sigma 公司, Röhren 管、Lumat LB 9507 型弱光仪为德国 EG&G BERTHOLD 公司产品。

二、短暂缺氧血清剥夺再灌流后不同时间点(再灌流 1 h, 3 h, 6 h) ATP 含量的测定

1. 试剂: 包括荧光素酶液和 ATP 标准液。①荧光素酶液: 于 FL-AAM 瓶中准确加入无菌双蒸水 5.0 ml, 放在冰浴中使其慢慢溶解, 此溶液包括: 荧光素、荧光素酶、硫酸镁、二硫代苏糖醇、乙二胺四乙酸及牛血清蛋白等, 然后用稀释缓冲液稀释 10 倍并分装, -20℃ 避光保存。因荧光素酶活力随时间延长而降低, 故每次测定前必须随时制作标准曲线。②ATP 标准液: 用无菌水配制成浓度为 2×10^{-6} mol/L 的标准液, 用前临时稀释成所需浓度。

2. ATP 标准曲线的绘制: 取 ATP 标准液 10 μ l, 稀释 200 倍后, 取 10 μ l 于 Röhren 管中。加入 100 μ l 荧光素酶液, 在旋涡振荡器上充分混匀 3 min 后, 放入发光仪暗室的比色杯内, 记录 6 s 积分发光强度。发光强度的大小与反应体系中 ATP 的量成正比, 以 ATP 标准液发光强度的对数为纵坐标, ATP 标准液浓度的对数为横坐标, 绘制 ATP 标准曲线, 每次样品的测定均需作标准曲线。

3. 细胞培养、分组及处理: 常规培养 PC12 细胞, 待细胞融合 80% 时即可用于实验。将细胞随机分为正常对照组、缺氧组, 每组根据其不同的再灌流时间点(再灌注 1 h, 3 h, 6 h) 又分为 3 个亚组。正常对照组: 将细胞用含 10% 马血清、5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(完全培养基)洗 1 次, 加入 2 ml 完全培养基, 于有氧条件下(37℃, 20% O₂, 5% CO₂) 培养 15 min 后将细胞取出, 吸弃培养基。复注 2 ml 完全培养基后, 分别在有氧条件下培养 1 h、3 h、6 h 后收集细胞。缺氧组: 将细胞用无血清 RPMI-1640 培养基洗 1 次, 加入 2 ml 无血清 RPMI-1640 培养基, 于缺氧(37℃, 2% O₂, 93% N₂, 5% CO₂) 条件下培养 15 min 后将细胞取出, 吸弃培养基。复注 2 ml 完全培养基, 分别在有氧条件下培养 1 h、3 h、6 h 后收集细胞。每时间点 4 瓶, 实验重复 3 次。

4. 样品制备: 将收集的细胞弃去原培养基, 加 4 ml 无菌 PBS 液, 制备单细胞悬液。调整细胞密度至 2×10^5 个/ml, 取 100 μ l 悬液至一无菌 1.5 ml Eppendorf 管中, 加入 0.2 ml 细胞裂解液, 在旋涡振荡器上充分混匀 3 min, 4℃、3 000 rpm 离心 3 min, 取 100 μ l 上清液置 -80℃ 冰箱中保存待测。

5. ATP 含量的测定: 将待测 ATP 样品稀释 10 倍后, 取 10 μ l 于 Röhren 管中, 加入 100 μ l 荧光素酶液, 在旋涡振荡器上充分混匀 3 min 后, 放入发光仪中, 记

录 6 s 积分发光强度, 样品管测定值以标准曲线为准, 计算出 ATP 含量。

三、短暂缺氧血清剥夺再灌流后不同时间点(再灌流 1 h, 3 h, 6 h) 线粒体膜电位的测定

细胞培养、分组及处理同上。将收集的细胞调整至 1×10^6 个, PBS 液洗 3 次, 将细胞重新悬浮于 0.5 ml PBS 中, 再将保存于 -20℃ 冰箱溶于二甲亚砷的 Rhodamine123 贮存液(1 mg/ml) 加入到细胞悬液中(终浓度为 10 mg/L), 于 37℃ 避光染色 30 min, 上机检测。每个样本吸取 10 000 个细胞, 用流式细胞仪测定单个细胞荧光, 进行细胞荧光强度分析。由于 Rhodamine123 进入线粒体的量与线粒体膜电位成正比, 因而用 Rhodamine123 的荧光强度可以表示线粒体的膜电位。

四、短暂缺氧血清剥夺再灌流后不同时间点(再灌流 1 h, 3 h, 6 h) 细胞活性的测定

1. 细胞培养、分组及处理: 常规培养 PC12 细胞, 待细胞融合 80% 时, 调整密度为 5×10^4 个/ml, 将细胞接种至 2 个无菌 96 孔板中(分别用作正常对照组、缺氧组, 每时间点设 8 个复孔), 100 μ l/孔, 置于 37℃, 20% O₂, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 d, 待细胞融合 80% 时即可用于实验。细胞的分组、时间点同上, 除每孔加入培养基的量为 200 μ l 以外, 其余处理同上。

2. MTT 微量酶反应比色法测定细胞活性: 各组细胞经上述处理后每孔加入 MTT 液(5 mg/ml) 20 μ l, 有氧条件下继续培养 4 h。待蓝紫色的甲臜复合物形成后, 再分别加入终止液(10% SDS + 5% DMF) 100 μ l, 于 37℃, 20% O₂, 5% CO₂ 培养箱中温育过夜, 使蓝色甲臜颗粒彻底溶解, 再用全自动酶标仪测定每孔光密度(optical density, OD) 值(570 nm)。整个实验重复 3 次。

五、统计学分析

本实验数据用($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验。

结 果

将 ATP 标准液稀释成不同浓度的标准 ATP 应用液, 按上文所述方法测定其发光强度, 并绘制 ATP 标准曲线(图 1), 回归方程为: $Y = 6.107 + 0.906X$, $r = 0.997$ ($F = 512.726$, $P < 0.01$)。

各组不同时间点 ATP 含量、线粒体膜电位、细胞活性的测定结果见表 1。与正常对照组相比, 缺氧血清剥夺 15 min 再灌流 1 h 组的 ATP 含量、线粒体膜电位、细胞活性显著降低, 差异具有显著性意义($P < 0.05$); 缺氧血清剥夺 15 min 再灌流 3 h 组与缺氧血清剥夺 15 min 再灌流 1 h 组相比, ATP 含量、线粒体膜电位和细胞活性均显著升高, 差异具有显著性意义($P <$

0.05);但与正常对照组相比,仅 ATP 含量的差异具有显著性意义($P < 0.05$),而线粒体膜电位、细胞活性的差异无显著性意义($P > 0.05$)。缺氧血清剥夺 15 min 再灌注 6 h 组与缺氧血清剥夺 15 min 再灌注 1 h 组相比,ATP 含量、线粒体膜电位和细胞活性明显升高,差异具有显著性意义($P < 0.05$);且与正常对照组相比,ATP 含量、线粒体膜电位、细胞活性的差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

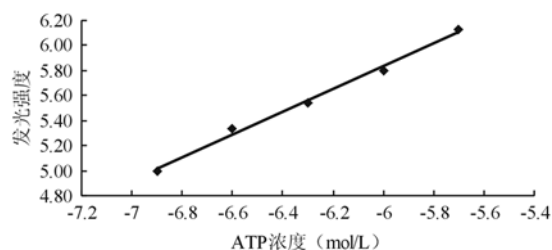


图 1 ATP 标准曲线

表 1 不同时间点 ATP 含量、OD 值、线粒体膜电位的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ATP 含量 (1×10^{-9} mol/L)	线粒体膜电位 (荧光指数)	OD 值
正常组 1 h	1.98 ± 0.67	51.503 ± 0.733	0.957 ± 0.059
缺氧组 1 h	$1.05 \pm 0.34^*$	$41.349 \pm 1.242^*$	$0.809 \pm 0.087^*$
正常组 3 h	2.01 ± 0.83	51.778 ± 0.691	0.934 ± 0.042
缺氧组 3 h	$1.78 \pm 0.57^{**}$	$50.339 \pm 0.919^{\Delta\#}$	$0.914 \pm 0.064^{\Delta\#}$
正常组 6 h	2.05 ± 0.45	50.692 ± 0.645	0.946 ± 0.012
缺氧组 6 h	$2.08 \pm 0.64^{\Delta\#}$	$51.526 \pm 0.653^{\Delta\#}$	$0.927 \pm 0.079^{\Delta\#}$

注:与正常对照组相应时间点比较,* $P < 0.05$, $\Delta P > 0.05$;与缺氧组 1 h 比较, $\#P < 0.05$

讨 论

1982 年,Braunwald 和 Kloner 提出心肌顿抑的概念^[6],指心肌短时间缺血后当冠脉血流恢复正常或接近正常时,心肌细胞未发生损害而心肌机械功能发生一过性异常的状态。这种异常可持续数小时、数天甚至数周。

心肌顿抑产生的机制,目前有许多学说,包括自由基的产生、钙通道异常及能量代谢的改变,其中能量代谢一直是研究的热点。有学者认为心肌缺血再灌注后,ATP 水平即刻降低,其恢复过程在时间上与心肌收缩功能的恢复一致^[7];纠正心肌能量代谢可使其功能得到改善^[8]。国内林静等^[9]亦报道,缺血区无论 ATP 含量还是能量储备均低于正常,表明低能量状态在心肌顿抑中起重要作用。

我们推测神经细胞顿抑的机制可能比心肌顿抑更为复杂,包括复杂的细胞内紊乱和多种机制的相互作用,能量代谢的改变可能为其中重要机制之一。脑组织具有耗氧量大、代谢率高、氧和 ATP 储备少、对缺氧耐受性差等特点。大量研究表明,脑缺血再灌注时神

经细胞损伤的最早期表现就是线粒体肿胀、结构破坏、氧化磷酸化不能进行,导致能量代谢障碍引起的细胞衰竭。故本实验试图研究短暂缺氧血清剥夺再灌注后不同时间点的 ATP 含量、线粒体膜电位、细胞活性的动态变化,寻找神经细胞顿抑现象存在的确切证据,并探讨其与能量代谢之间的可能关系。

目前测定 ATP 含量的方法很多,其中生化发光法测定 ATP 含量具有微量、简单、快速、灵敏和特异性强等特点,其原理是利用生物体系在酶催化中所产生的光来测定反应物质浓度,ATP 与荧光素在荧光素酶和 Mg^{2+} 作用下生成活化腺苷酰荧光素,然后与氧反应产生光子,再用发光计测定。本实验用 MTT 法测定细胞活性,MTT 是四氮唑化合物,可以在活细胞线粒体呼吸链上的琥珀酸脱氢酶作用下,形成蓝紫色的甲臌产物,沉淀在细胞内和细胞周围,通过检测其光密度值的变化,定量地反映活细胞的数量、细胞活性及线粒体活性。Rhodamine123 是一种阳离子荧光染料,由于线粒体内膜的负电性而滞留在活细胞线粒体内,故常用其来检测线粒体膜电位变化。

本研究结果显示,缺氧血清剥夺 15 min 再灌注 1 h 后的 ATP 含量、线粒体膜电位、细胞活性均出现即刻降低;缺氧血清剥夺 15 min 再灌注 3 h 时线粒体膜电位和细胞活性已恢复至正常水平,ATP 含量明显恢复,但未达正常水平;缺氧血清剥夺 15 min 再灌注 6 h ATP 含量、线粒体膜电位和细胞活性均恢复至正常水平。这表明短暂缺氧血清剥夺再灌注后,存在低能量状态,且可完全恢复,同时也表明可能存在神经细胞顿抑现象,这与近年来大量有关心肌顿抑的研究结果相类似。这种结果可能是由于神经细胞对非常短暂的缺血、缺氧很敏感,缺氧和血清剥夺后,本实验中仅一小部分细胞发生不可逆的损伤,大部分细胞处于受到轻度打击但仍存活的可恢复的“顿抑”的低功能状态,而这种低功能状态本身即可能是一种自我保护现象,可降低耗氧量,避免损伤继续恶化。出现低能量状态的机制目前尚不清楚,从本研究结果看,可能与缺氧和血清剥夺后线粒体呼吸链上的琥珀酸脱氢酶等活性下降及线粒体的膜电位变化等有关。

今后我们将进一步寻找神经细胞顿抑现象存在的其他证据,研究氧自由基损伤、细胞膜离子通道功能异常等与神经细胞顿抑的关系。神经细胞顿抑现象的研究为探索缺血再灌注后脑损害及保护机制提出了完全崭新的研究领域和观念,在临床应用方面也有极重要的意义。认识顿抑现象可使医生更加准确地评价再灌注效果,例如评价急性脑梗死超早期溶栓治疗效果时不能在再灌注后即刻进行,而应推迟至溶栓后的一段时间进行。明确顿抑发生的病理生理过程及发病机

制,可通过加强关键环节上的神经保护措施,干预神经细胞顿抑过程,缩短病程,促进顿抑脑组织恢复,加速患者康复。

参 考 文 献

- 1 Rinaldi CA, Hall RJ. Myocardial stunning and hibernation in clinical practice. *Int J Clin Pract*, 2000, 54: 659-664.
- 2 Grubitzsch H, Ansorge K, Wollert HG, et al. Stunned myocardium after off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71: 352-355.
- 3 Overgaard K. Thrombolytic therapy in experimental embolic stroke. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1994, 6: 257-286.
- 4 Barnes E, Baker CS, Dutka DP, et al. Prolonged left ventricular dysfunction occurs in patients with coronary artery disease after both dobutamine and exercise induced myocardial ischaemia. *Heart*, 2000, 83:

283-289.

- 5 毛春,邓晓红,张苏明,等.在改良法血栓栓塞性脑卒中大鼠模型上进行尿激酶静脉溶栓治疗.卒中与神经疾病,2003,1:20-22.
- 6 Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 1982, 66:1146-1149.
- 7 Kloner RA, Bolli R, Marban E, et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*, 1998, 97:1848-1867.
- 8 Allibardi S, Chierchia SL, Margonato V, et al. Effects of trimetazidine on metabolic and functional recovery of postischemic rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1998, 12:543-549.
- 9 林静,陈健,张钧华,等.心肌顿抑的心功能及能量代谢研究.中国介入心脏病学杂志,1996,4:132-133.

(收稿日期:2003-07-14)

(本文编辑:熊芝兰)

· 短篇论著 ·

矫正板对脑卒中内翻足患者步行速度的影响

王少军 徐璐洁 郑红 应晓健

步行功能障碍是脑卒中患者功能残疾的主要表现之一,阻碍偏瘫下肢功能康复的主要因素是平衡障碍、足下垂内翻及膝关节屈曲等。内翻矫正板能帮助步行障碍者进行步行练习和平衡训练,我们将其早期应用于脑卒中内翻足患者,探讨矫正板对偏瘫患者步行速度的影响。

一、对象和方法

脑卒中后内翻足患者 32 例,均经头颅 CT 检查,符合第 4 届全国脑血管病会议确定的诊断标准^[1]。其中男 20 例,女 12 例;年龄 30~76 岁,平均 61.3 岁;病程 23~60 d;左侧偏瘫 12 例,右侧偏瘫 20 例。排除感觉性失语、定向障碍、前庭或小脑功能障碍、其它神经系统疾病及严重的骨科疾病。

患者入院后均接受神经内科常规药物治疗。待病情稳定、可独立或扶平行杠行走 10 m 以上后,指导患者徒手或扶平行杠在内翻矫正板上训练,每次 20~30 min,每日 2 次。使用内翻矫正板治疗前及治疗 10 d 后进行最大步行速度测定。

最大步行速度测定标准^[2]:于起点到终点为 16 m 的平坦地面上测量患者步行速度,患者以最大速度从起点走向终点,用计数器和跑表记录中间 10 m 的步数和步行时间,连续测量 3 次,取时间最短的 1 次作为计算测定值。根据计算测定值求步行周期中的参数:最大步行速度(m/min)=10 m/时间;步长(cm)=1 000 cm/步数;步频(次/min)=步数/时间。应用 SPSS/PC 统计软件对计量资料进行 *t* 检验。

二、结果

使用内翻矫正板后,最大步行速度和步长明显提高,步频明显降低($P<0.001$)(表 1)。

三、讨论

脑卒中患者由于上运动神经元受损,使运动系统失去其高

位中枢的控制,导致被抑制的皮层以下中枢的原始运动反射释放,引起运动模式异常^[3]。在偏瘫患者的康复过程中,主要康复目标是恢复步行能力,而早期获得移动能力是其重要的课题之一。偏瘫患者的患足在摆动位和着地时过度跖屈,从而严重影响了患者的步行能力。使用内翻矫正板可限制足内翻及过度跖屈,帮助患者进行站立和步行训练,促进直立反应和平衡反应的形成,增加患肢负重,防止健侧下肢肌肉萎缩,促进正确的步行模式,提高步行能力,并有助于新的神经回路和正常运动程序的建立^[4]。本研究对内翻矫正板治疗前、后患者的最大步行速度进行了测定,结果显示其最大步行速度明显高于治疗前,提示内翻矫正板可以提高脑卒中内翻足患者早期的最大步行速度;而步频明显减少提示内翻矫正板治疗可提高患者步行的持久性。因此,脑卒中内翻足患者早期使用内翻矫正板对改善患者的步行能力、提高其生活自理能力有重要作用。

表 1 内翻矫正板治疗前、后患者步行速度比较($n=32, \bar{x} \pm s$)

治疗时间	最大步行速度(m/min)	步长(cm)	步频(次/min)
治疗前	20.1 ± 4.1	25.2 ± 3.3	70.0 ± 4.0
治疗后	33.6 ± 4.9*	39.3 ± 4.4*	62.0 ± 3.3*

注: * 与治疗前比较, $P<0.001$

参 考 文 献

- 1 全国第 4 届脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病诊断要点. 中华神经科杂志, 1996, 29: 79.
- 2 燕铁斌, 主编. 实用瘫痪康复. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 158.
- 3 南登崑, 主编. 康复医学. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 208.
- 4 缪鸿石. 中枢神经系统损伤后功能恢复的理论. 中国康复理论与实践, 1996, 2: 1-5.

(收稿日期:2003-09-13)

(本文编辑:吴倩)