

· 研究简报 ·

流式细胞仪检测椎动脉型颈椎病动物模型脑神经细胞凋亡

Study on brain nerve cell apoptosis of vertebral artery in cervical spondylosis animal model with assaged by flow cytometry method

张清, 杨克新, 王尚全, 孙树椿

ZHANG Qing, YANG Kexin, WANG Shangquan, SUN Shuchun

关键词 椎动脉型颈椎病; 细胞凋亡 Key words Vertebral artery of cervical spondylosis; Apoptosis

椎动脉型颈椎病(vertebral artery of cervical spondylosis, CSA)能引起脑缺血系列症状,对脑细胞缺血神经细胞影响如何?本实验从细胞自身调控的角度研究 CSA 对脑缺血损伤的机制,不仅对 CSA 对脑缺血的机制有新的认识,而且对如何减轻 CSA 对脑缺血性损伤提供了思路。

1 材料与与方法

1.1 动物模型制作及实验分组 Wistar 大鼠 96 只,雌雄各半,平均体质量 200 g,由中国中医研究院动物中心提供。大鼠用 20% 乌拉坦行腹腔内注射麻醉,按剂量为 8 ml/kg 注射给药。麻醉成功后,行俯卧位,用自制的大鼠固定器,将大鼠四肢固定,手术视野剃毛,常规手术视野碘酒、酒精消毒,铺无菌手术巾。枕骨下 C₁ 正中切口,切开头颈部皮肤,切口约 3 cm,用牵开器将颈部肌肉牵开,从上方分离 C₁ 横突,暴露椎动脉,血管夹夹闭。模型 1 组:夹闭双侧椎动脉 30 min 后放松。模型 2 组:夹闭双侧椎动脉 30 min 后放松 30 min,再夹闭 30 min 后放松 30 min,再夹闭 30 min 后放松。假手术组,麻醉及手术入路同手术组,手术至显露两侧横突及椎动脉,不作椎动脉的夹闭。将大鼠随机分为 4 组,每组 24 只。A 组为正常组, B 组为假手术组, C 组为模型 1 组, D 组为模型 2 组。

1.2 实验仪器及实验试剂 流式细胞仪(Becton Dickinson Facslibu, 美国 BD 公司),流式细胞分析系统(Modfit LT 软件, 美国 BD 公司),流式细胞获取系统(Cell Quest 软件, 美国 BD 公司),低速离心机(LDZ5 2 型,北京医用离心机厂),快速混均器

(SK-1 型,江苏仪器厂),碘化丙啶(propidium iodide, PI)(美国 Singma 公司),RNA 酶 A(Rnase A)(美国 Singma 公司)。

1.3 实验方法 将各组动物于动物造模后 1、3、5 d 直接断头,迅速取新鲜脑组织,冠状切开,小心剥离海马组织。水盘中分离双侧鼠脑海马组织,低温均浆,制成单细胞悬液。收集细胞悬液,分别置于 5 ml 玻璃离心管中,用 PBS 冲洗细胞,1 000 r/min 离心 4 min。再次 PBS 冲洗细胞,1 000 r/min 离心 4 min,用终浓度为 75% 预冷乙醇固定细胞过夜。取出固定好的细胞用 PBS 冲洗 2 次,最后于离心管中留取 0.5 ml 细胞悬液,轻轻混匀,加入 20 μg/ml Rnase A 酶,37 °C 培养箱中孵育 30 min,然后用 50 μg/ml PI 染色,避光放置 60 min。上机检测:将细胞悬液混匀,过 200 目尼龙网,然后在流式细胞仪上检测。应用 Cell Quest 软件获取 1 000 个,进行凋亡细胞计数。以 ModFit 软件进行凋亡峰拟合,并绘制 DNA 分布图, G₁ 期前 G₁ 亚峰(A_p)为凋亡峰。

1.4 统计方法 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,全部数据应用 SPSS 10.0 进行计算机统计分析,计量资料应用方差分析。

2 结果

正常组与假手术组海马区域细胞凋亡百分率比较无显著性差异($P > 0.05$),随着时间的延长 1、3、5 d,细胞凋亡百分率无明显改变。模型 1 组细胞凋亡百分率与正常组比较有非常显著性差异($P < 0.01$),模型 1 组随着时间的延长 1、3、5 d,细胞凋亡百分率有下降趋势,无显著性差异。模型 2 组细胞

表 1 CSA 动物模型海马区细胞凋亡百分率计数比较($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 Counting comparison on percentage of apoptosis in Hippocampus of CSA animal model($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	1 d	3 d	5 d
正常组	24	1.42 ± 0.87	2.44 ± 1.69	2.17 ± 1.02
假手术组	24	3.16 ± 1.97	3.03 ± 2.01	2.73 ± 0.97
模型 1 组	24	9.54 ± 2.24**	8.97 ± 3.23**	7.47 ± 2.23**
模型 2 组	24	11.91 ± 4.67** ¥	14.47 ± 5.23** ¥ ¥	10.91 ± 5.65** ¥

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;模型 1 组与模型 2 组比较,¥ $P < 0.05$,¥ ¥ $P < 0.01$

凋亡百分率与正常组比较有非常显著性差异 ($P < 0.001$), 模型 2 组随着时间的延长 1、3 d, 细胞凋亡百分率增加, 5 d 凋亡比例反而下降, 说明随着时间的延长, 模型 2 组 3 d 细胞凋亡达高峰, 5 d 后细胞凋亡百分率下降可能与反复缺血造成神经细胞不可逆性损伤, 发生急性坏死有关。

3 讨论

本实验采用流式细胞技术及免疫荧光双染技术对 CSA 动物模型进行细胞凋亡的测定, 研究结果提示, 本实验造成了 CSA 动物模型脑组织海马神经细胞凋亡百分率改变, 本实验能引起脑神经细胞凋亡, 其程度、缺血时间与凋亡比例成正比。CSA 动物模型反复发作造成脑组织缺血性损害, CSA 动物模型反复缺血次数不同, 大鼠脑神经细胞凋亡程度也不同, 反复缺血次数越多, 缺血时间越长, 损伤程度加重, 神经细胞凋亡百分率越高。凋亡细胞数增加, 细胞死亡以及由此导致的不可逆性损伤病灶的进一步扩大, 表明主要是通过细胞凋亡机制实现的。模型 2 组 5 d 凋亡比例下降, 表现峰前的荧

光道上大量碎片, 可能与反复缺血细胞损伤较重, 造成神经细胞不可逆性损伤, 发生急性坏死有关。这与反复缺血可使神经细胞发生急性坏死, 而轻微短时或一过性缺血导致细胞迟发性死亡即凋亡相符合^[1,2]。

另外, 细胞凋亡是细胞接受外来信号后发生的一种主动自杀过程, 因此需要有新的基因表达。目前研究表明许多基因例如 bcl 2、bax、G fos、c jun 等都与细胞凋亡有着密切的关系, 这些控制细胞凋亡基因的异常表达, 也是细胞凋亡发生的主要机制^[3]。

参考文献

- 1 何丽云, 催魏, 范吉平, 等. 流式细胞仪检测缺血、缺氧神经细胞的研究. 中国中医基础学杂志, 2000, 6(11): 39.
- 2 孙莉, 吴江, 王守春, 等. 血管性痴呆大鼠脑血流量及细胞凋亡的研究. 中华老年心脑血管病医学杂志, 2001, 12(3): 409-412.
- 3 徐浩文, 郭云良. 脑缺血再灌注后神经元和内皮细胞凋亡的差异常与 Bcl 2 和 P53 表达的意义. 解剖学杂志, 2002, 24(5): 411-413.

(收稿日期: 2004-06-22 本文编辑: 李为农)

• 短篇报道 •

三种方法治疗青壮年股骨颈骨折疗效比较

郑玉堂, 林石明, 陈联源, 杨源中, 王剑云, 刘艺祥, 马伯俊, 张嵩图
(漳州市中医院骨三科, 福建 漳州 363000)

青壮年股骨颈骨折不愈合和股骨头坏死率较高, 选择合理的手术方法是减少骨折愈合并发症的关键。自 1994 年 1 月以来, 我院采用三种方法治疗 136 例, 现分析报告如下。

1 临床资料

我院 1994 年 1 月- 2003 年 6 月收治 136 例青壮年股骨颈骨折患者, 男 88 例, 女 48 例; 年龄 18~ 59 岁, 平均 42 岁; 入院后均先予胫骨结节骨牵引, 于 3~ 7 d 内分别采用中空加压螺钉内固定加骨瓣移植术(A 组); 中空加压螺钉内固定(B 组); DHS 内固定(C 组) 等三种术式进行治疗。A 组(50 例) 头下型(包括头颈型) 18 例, 经颈型 24 例, 基底型 8 例。B 组(46 例) 头下型(包括头颈型) 13 例, 经颈型 23 例, 基底型 10 例。C 组(40 例) 头下型(包括头颈型) 10 例, 经颈型 20 例, 基地型 10 例。

2 治疗方法

A 组 34 例取髋前侧弧形切口, 将髂嵴、腹股沟韧带中点及大粗隆下约 3 cm 连成弧形切口, 采用 3 枚加压螺钉内固定加旋髂深血管骨瓣移植; 16 例取髋后外侧切口, 采用 3 枚加压螺钉内固定加股方肌骨瓣移植; B 组取髋外侧切口, 采用加压螺钉内固定; C 组取髋外侧切口, 采用 DHS 内固定。

3 结果

全部病例均获随访, 平均 3.5 年(10 个月~ 7 年), 疗效标

准参照马元璋分级法[中华骨科杂志, 1984, 4(2): 111.] 进行评定。随访结果, A 组: 优 26 例, 良 22 例, 差 2 例, 优良率 96%, 其中 1 例未愈合, 1 例股骨头坏死; B 组: 优 22 例, 良 14 例, 差 10 例, 优良率 78.3%, 其中 4 例未愈合 6 例股骨头坏死; C 组: 优 16 例, 良 15 例, 差 9 例, 优良率 77.5%。其中 3 例未愈合, 6 例股骨头坏死。

4 讨论

本组资料表明骨瓣移植可以明显提高疗效, 减少并发症的发生。这充分说明了骨折端血运的重建是减少骨不愈合及骨坏死的关键。本组采用股方肌骨瓣治疗 16 例, 有 2 例因过早负重导致 1 例股骨头坏死, 1 例骨不愈合, 后均用旋髂深骨瓣治愈。而采用旋髂深骨瓣治疗 34 例, 均正常愈合, 未出现骨折不愈合及股骨头坏死等并发症, 取得较好疗效。青壮年股骨颈骨折治疗中值得注意的事项: ①术前应常规胫骨结节骨牵引复位, 避免因暴力复位而破坏残存血运, 同时手术应尽早进行。②股方肌骨瓣移植时, 分离股方肌时需注意骨膜下分离且不宜太靠近其起点处, 以免损伤血管; 旋髂深骨瓣移植时注意血管不能过分扭曲, 以免影响血供。③术后不宜过早负重, 应定期拍片复查, 待骨折端有大量骨痂生成时才能逐步负重, 一般至少应 3 个月后。

(收稿日期: 2004-05-10 本文编辑: 李为农)