

- [12] SUN J ,PEARCE E J. Suppression of early IL - 4 production underlies the failure of CD4 T cells activated by TLR - stimulated dendritic cells to differentiate into Th2 cells [J]. J Immunol 2007 ,178(3) : 1 635 - 1 644.
- [13] LAURENS E J ,NIJHUIS B J ,OLIVIER W J ,et al. Neurogenic regulation of dendritic cells in the intestine [J]. Biochem Pharmacol 2010 ,80 (12) : 2 002 - 2 008.
- [14] BAUMGART D C ,METZKE D ,GUCKELBERGER O , et al. Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Clin Exp Immunol 2011 ,166(1) : 46 - 54.

收稿日期: 2015 - 09 - 23
(本文编辑: 王作利)

作者简介: 郑天送(1989—) 男, 安徽省潜山县人, 在读硕士, 主要从事中西医结合临床工作。

文章编号: 1671 - 8631(2016) 01 - 0010 - 03
DOI: 10.16047/j.cnki.cn14-1300/r.2016.01.003

左卡尼汀对脑缺血再灌注损伤后 caspase - 3 表达的影响⁽¹⁾

韩征宇¹ 李光来^{2*}

(1. 中铁十七局集团有限公司中心医院, 山西 太原 030032; 2. 山西医科大学第二医院, 山西 太原 030001)

摘要 目的: 观察脑缺血再灌注损伤后左卡尼汀对 caspase - 3 表达的影响。方法: 40 只 Wistar 雄性健康大鼠随机分为 A 组(假手术组)、B 组(对照组)、C 组(左卡尼汀 100 mg/kg 治疗组) 和 D 组(左卡尼汀 200 mg/kg 治疗组)。线栓法制造大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型, 观察左卡尼汀对大鼠神经功能症状、组织形态学改变以及对 caspase - 3 表达的影响。结果: 与 B 组比较, 左卡尼汀各治疗组能显著改善大鼠神经功能缺失症状, 减少脑组织的梗死缺血损伤, 降低 caspase - 3 的表达($P < 0.01$)。结论: 左卡尼汀通过抑制脑缺血再灌注损伤后脑组织中 caspase - 3 的表达起到保护神经细胞的作用。

关键词 左卡尼汀; 脑缺血再灌注损伤; Caspase - 3
中图分类号: R965 文献标识码: A

Effect of levocarnitine on the expression of caspase - 3 in the rat model of focal cerebral ischemia - reperfusion

HAN Zhengyu¹ , LI Guanglai²

(1. Railway 17th Bureau Group Company Central Hospital ,Taiyuan 030032 ,China; 2. The Second Hospital of Shanxi Medical University ,TaiYuan 030001 ,China)

Abstract Objective: To observe the effect of levocarnitine on the expression of caspase - 3 in the rat model of focal cerebral ischemia - reperfusion. Methods: Forty healthy male Wistar rats were divided into four groups randomly: sham operation group(A group) ,saline - controled group(B group) ,treated with 100 mg/kg of levocarnitine group(C group) and treated with 200 mg/kg of levocarnitine group(D group) . The focal cerebral I/R rats models were made by the MCAO. The neurological deficit score ,histological changes of brain and the expression of caspase - 3 in cortex and hippocampus were detected. Results: The neurological deficit score ,histological changes and the expression of caspase - 3 in cortex and hippocampus were significantly decreased ($P < 0.01$) in levocarnitine group compared with B group. Conclusion: The results indicated that Levocarnitine has neuro protective effect to decrease the expression of caspase - 3 protein against cerebral I/R induced injury in rat brain.

Key words levocarnitine; cerebral ischemia reperfusion; caspase - 3

卡尼汀在机体的能量代谢中起到非常重要的作用, 它通过线粒体脂肪酸 β - 氧化后进入三羧酸循环, 产生 ATP 为细胞供能。目前研究表明左卡尼汀对治疗组织细胞缺血后血管再灌注损伤有一定的疗效, 是一种治疗细胞缺血后再灌注损伤有效的药物。研究表明左卡尼汀通过新型有机阳离子转运子 2

(OCTN2) 透过血 - 脑积液屏障后在多个不同环节阻断脑缺血性损伤的连锁反应起到保护脑神经细胞的作用^[1-2]。本实验通过研究左卡尼汀干预大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 caspase - 3 表达, 探讨其保护神经细胞的机制。

1 材料与方法

(1) 本课题为山西省科技攻关项目(项目编号: 20100311098 - 1)

* 本文通讯作者: 李光来

1.1 分组及试剂

选用山西医科大学生理实验室 40 只鼠龄 3~4 个月的 Wistar 健康雄性大鼠, 体重 200~250 g。随机分为 A 组(假手术组)、B 组(对照组)、C 组(左卡尼汀 100 mg/kg 治疗组)和 D 组(左卡尼汀 200 mg/kg 治疗组), 每组 10 只。珠海亿邦制药有限公司提供注射用左卡尼汀(批号 20090102); 即用型免疫组化 SABC 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司生产; caspase-3 抗体由北京博奥森生物技术有限公司生产; 普通试剂由山西医科大学寄生虫实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠模型制作及缺血 2 h 再灌注 24 h 后评价大鼠神经功能缺失评分

用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型, 具体详细操作过程及评分标准见参考文献 [3]。A 组仅插入 1.0 cm 鱼线, 余步骤同其他组。B 组在制作模型前 30 min 给予 0.9% 生理盐水 2 mL 腹腔注射; C 组和 D 组在制作模型前 30 min 分别以 100 mg/kg、200 mg/kg 左卡尼汀行腹腔注射。

1.2.2 组织切片的制作

按照常规组织切片的制作方法在大鼠视交叉前后取厚度为 5 μm 冠状位切片。分别进行苏木精-伊红染色法(HE 染色)、caspase-3 免疫组化染色。完全按 SABC 免疫组化试剂盒说明书上的步骤进行, 阴性对照用 PBS 代替一抗。免疫组化染色观察核中出现棕黄色颗粒为 caspase-3 阳性表达细胞。

1.2.3 图像分析

用 BI-2000 医学图像分析系统, 每只大鼠选择 5 张切片, 在 400 倍光镜下选择 5 个不同视野, 计数每个视野的阳性细胞数, 求出的平均数就是每张切片阳性细胞数。

1.2.4 统计学方法

用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验进行两组间样本均数比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

光镜下 A 组神经细胞形态正常。B 组正常神经细胞正常形态破坏, 胞体肿胀明显, 出现核缩、核溶解, 细胞变性坏死。左卡尼汀各治疗组变性神经细胞较 B 组明显减少。

2.2 左卡尼汀对 caspase-3 蛋白表达影响

A 组可见少量 caspase-3 阳性细胞的表达; B 组 Caspase-3 阳性细胞的表达明显增多, 与 A 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 B 组比较, C 组和 D 组的 caspase-3 阳性细胞的表达明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。C 组和 D 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

在脑缺血再灌注损伤过程中, 细胞线粒体功能受的损害, 导致细胞线粒体 DNA 被破坏, 使得细胞线粒体膜通透性遭到破坏, 导致 ATP 生产大量减少, 导致细胞内大量的钙离子内流, 大量自由基产生, 脂质过氧化反应增强, 大量细胞色素 C 释放, 促使细胞凋亡程序启动, caspase-3 大量激活, 细胞凋亡通路程序执行, 神经细胞程序性死亡。通过对神经细胞死亡机制的研究, 为保护神经细胞提供新的途径。细胞凋亡是细胞程序性死亡过程。Caspase 凋亡系统对细胞凋亡过程起到决定性作用^[4], 而 Caspase-3 在 Caspase 家族蛋白系统中占有核心地位, 它是在细胞凋亡程序中起决定性作用的最后执行者^[5]。左卡尼汀通过保护线粒体, 避免细胞线粒体膜通透性破坏, 使得细胞线粒体内环境稳定, 线粒体 DNA 功能完好, ATP 大量生成, 导致细胞色素 C 释放明显减少, 同时降低细胞色素 C 的水平, 避免及制约 Caspase 家族蛋白系统的激活, 同时抑制 caspase-3 的激活, 通过阻止细胞凋亡程序的执行, 达到阻止细胞程序性死亡的作用^[6]。相关研究表明左卡尼汀通过抑制 caspase 凋亡途径的不同环节, 通过抑制 caspase-8 因子的启动, 进一步阻止 Apaf-1、细胞色素 c、dATP 与 caspase-9 结合, 使 caspase 凋亡通路中断, 同时通过抑制活化因子激活 caspases-3, 使 caspase 凋亡执行最后通路中断, 故认为左卡尼汀是一种 Caspase 凋亡系统的抑制剂, 阻止细胞凋亡程序的启动及执行^[7]。左卡尼汀通过抑制 Fas 凋亡系统的执行, 明显提高 Bcl-xL 抗凋亡蛋白的表达水平, 明显降低细胞色素 C 的产生, 抑制 Caspase 凋亡系统中起始因子 caspase-8 的启动^[8]。左卡尼汀对细胞线粒体内环境稳定的维持, 使得线粒体 DNA 功能完好, 使凋亡激活物显著降低, 凋亡起始途径激活受阻, 随其药物浓度的增加凋亡信号传导通路阻断明显增加, 活化的 Caspase-3 明显减少^[9]。Barhwal 等^[10]在实验室研究表明左卡尼汀通过使基质金属蛋白酶稳定, 细胞色素 C 释放减少,

Bcl-2 蛋白的表达的增加 ,降低 caspase-3 的水平 ,阻止细胞程序性死亡。

本研究表明 ,左卡尼汀能通过降低 Caspase-3 的表达 ,抑制 Caspase 凋亡系统通路的最后执行 ,阻止神经细胞的死亡。左卡尼汀对神经细胞保护机制是避免线粒体受损伤 ,使线粒体 DNA 功能完好 ,提供 ATP^[11] ,提高内源性抗氧化能力^[3] ,清除氧自由基 ,降低细胞凋亡激活物的产生 ,降低 Caspase-3 的表达 ,使得凋亡信号传导通路中断 ,阻止细胞凋亡程序的启动及执行 ,起到抗凋亡、保护神经细胞的作用。有关左卡尼汀对神经细胞保护机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] ZANELLI S A ,SOLENSKI N J ,ROSENTHAL R E ,et al. Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine [J]. Ann N Y Acad Sci 2005 ,1 053 (9) : 153 - 161.

[2] INANO A ,SAI Y ,NIKAIDO H ,et al. Acetyl-L-carnitine permeability across the blood-brain barrier and involvement of carnitine transporter OCTN2 [J]. Biopharm Drug Dispos 2003 24(8) :357 - 365.

[3] 韩征宇 ,李光来. 左卡尼汀对脑缺血再灌注损伤的抗氧化作用及其机制研究 [J]. 临床医药实践 2010 ,19 (1) : 18 - 20.

[4] AN S ,HISHIKAWA Y ,KOJI T. Induction of cell death in rat small intestine by ischemia reperfusion: differential roles of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax systems de-

pending upon cell types [J]. Histochem Cell Biol , 2005 ,123 (3) :249 - 261.

[5] FAUBEL S ,EDELSTEIN C L. Caspases as drug targets in ischemic organ injury [J]. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2005 5(3) :269 - 287.

[6] DICESARE M L ,GHELARDINI C ,CALVANI M ,et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy [J]. Eur J Neurosci 2007 26(4) :820 - 827.

[7] MUTOMBA M C ,YUAN H ,KONYAVKO M ,et al. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. [J]. FEBS Lett 2000 ,478 (1) : 19 - 25.

[8] KHANDEKAR N ,WILLCOX M D ,SHIH S ,et al. Decrease in hyperosmotic stress-induced corneal epithelial cell apoptosis by L-carnitine. [J]. Mol Vis 2013 , 19(19) :1 945 - 1 956.

[9] YE J ,LI J ,YU Y ,et al. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. [J]. Regul Pept 2010 ,161(9) :58 - 66.

[10] BARHWAL K ,HOTA S K ,PRASAD D ,et al. Hypoxia-induced deactivation of NGF-mediated ERK1/2 signaling in hippocampal cells: neuroprotection by acetyl-L-carnitine. [J]. Neurosci Res 2008 ,86(12) : 2 705 - 2 721.

[11] 韩征宇 ,李光来. 左卡尼汀对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠 ATP 酶活性的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志 2010 8 (1) :77 - 78.

收稿日期:2015-07-09
(本文编辑:王作利)

作者简介:韩征宇(1981—) 男 ,山西省临县人 ,硕士学位 ,主治医师 ,主要从事脑血管病的基础及临床研究工作。

文章编号:1671-8631(2016)01-0012-04

DOI:10.16047/j.cnki.cn14-1300/r.2016.01.004

经乳突-面隐窝入路人工耳蜗植入手术的三维影像解剖学研究⁽¹⁾

李娟娟 ,柴福 ,韩晓东 ,王鹏 ,曾宪海 ,赵海亮 ,杨婷君

(深圳龙岗中心医院 ,深圳市耳鼻咽喉科研究所 ,广东 深圳 518172)

摘要 目的:探讨经乳突-面隐窝入路人工耳蜗植入手术的相关解剖结构 ,并对其进行观察测量 ,为该入路手术提供解剖学资料。方法:选取就诊患者 30 例 ,行颞骨部位螺旋 CT 检查 ,在重建后的 3D 图像上观察和测量外耳道上棘、面神经、面隐窝、锥隆起、圆窗、前庭窗、砧骨等相关的解剖结构 ,以及上述结构之间的空间距离 ,并对数据进行统计学处理。结果:经过 3D 重建后 ,面隐窝区域的结构清晰可辨 ,并可对其中重要结构进行测量。其中锥隆起至圆窗距离为(3.78±2.11) mm ,前庭窗至圆窗距离为(3.23±1.12) mm ,砧骨头至圆窗距离为(7.78±3.23) mm ,砧骨短脚至圆窗距离为(8.13±3.19) mm ,砧骨短脚至锥隆起距离为(5.27±2.19) mm ,面隐窝纵径(5.78±2.34) mm ,面隐窝横径为(3.16±2.33) mm。结论:经乳突-面隐窝入路人工耳蜗植入手术中部分重要解剖结构位置相对恒定 ,结构间距离及角度在一定范围内变化。同时 CT3D 成像可为人工耳蜗手术提供可靠的影像资料 ,可以作为指导临床手术的可靠依据。

关键词 中耳;后鼓室;面隐窝;应用解剖学

(1) 本课题为龙岗区 2013 年度科技计划医疗卫生项目(项目编号:YS2013055)