

## 常温缺血后选择性超深低温对猴脑 Bcl-2和 Bax 表达的影响

高永军<sup>1)</sup>, 王 韬<sup>1)</sup>, 李 冉<sup>1)</sup>, 李宝成<sup>2)</sup>, 蒲 军<sup>1)</sup>, 徐 蔚<sup>1)</sup>

(1) 昆明医学院第二附属医院神经外科, 云南省亚低温治疗研究中心, 云南昆明 650101; 2) 普洱市人民医院神经外科, 云南普洱 665000)

**[摘要]** **目的** 观察猴脑常温缺血 0 min、10 min、15 min、20 min 后选择性脑超深低温断血流复苏对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响。 **方法** 健康成年恒河猴 15 只, 雄性, 随机分为 4 组, 0 min 组 (双侧颈动脉常温下阻断 0 min 后行脑选择性超深低温灌注, 即热缺血 0 min, 简称 0 min 组, n=4), 10 min 组 (方法同上, n=4), 15 min 组 (n=4), 20 min 组 (n=3)。依照昆明医学院第二附属医院神经外科前期方法建立模型, 术后行神经功能缺失评分。实验猴灌注或复苏死亡后立即开颅取脑, 长期存活猴饲养到术后 4 周处死开颅取脑。免疫组织化学法检测猴额叶神经细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达水平。 **结果** 0 min 组、10 min 组安全复苏并长期存活, 术中、术后血流动力学稳定, 术后神经功能评分无异常; 15 min 组长期存活 2 只, 重残 1 只, 死亡 1 只; 20 min 组则全部死亡。免疫组化结果表明: 4 组间相互比较, Bax 的表达逐渐增高 ( $P < 0.05$ )。10 min 组、15 min 组、20 min 组 3 组间猴脑额叶 Bcl-2 表达明显逐渐降低, 3 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0 min 组与 20 min 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0 min 组较 10 min 组、15 min 组猴额叶 Bcl-2 的表达无明显差异, 无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 **结论** 超深低温能显著降低 Bax 的表达, 促进 Bcl-2 的表达, 从而起到脑保护的作用。

**[关键词]** 选择性超深低温; 猴脑; 断血流; Bcl-2; Bax

**[中图分类号]** R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 01-0008-05

## The Effects of Selective Cerebral Ultra-Profound Hypothermia on Bcl-2 and Bax Expression in Brain Tissues of Monkeys after Occlusion of Cerebral Blood Flow under Different Time Limits

GAO Yong-jun, WANG Tao, LI Ran, LI Bao-chen, PU Jun, XU Wei

(1) Dept. of Neurosurgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Neurosurgery, People's Hospital of Pu'er, Pu'er Yunnan 665000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the influence of selective cerebral ultra-profound hypothermia reperfusion on the expression of Bcl-2 and Bax in nerve cells in experimental monkeys after occlusion of cerebral blood flow for different time (0, 10, 15 and 20 min). **Methods** 15 healthy adult male rhesus monkeys were randomly divided into 4 groups: 0 min group (reperfusion 0min after bilateral internal carotid arteries blockage, n=4), 10min group (the same as way, n=4), 15min group (n=4), 20 min group (n=3). The model was established by right internal carotid artery (ICA) infusing and internal jugular vein (IJV) extracting (referring to the last way). We executed the monkeys 4 weeks after operation for long-term survival monkeys. Immunohistochemical technique was used to detect the level of Bcl-2 and Bax protein expression in the four groups respectively. **Results** All monkeys in 0min and 10min groups (n=8) survived till they were executed, and

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30960398); 云南省自然科学基金资助项目 (2009CD177; 2011FB200); 教育部博士学科点基金资助项目 (20095317110001)

**[作者简介]** 高永军 (1975~), 男, 山西忻州市人, 在读博士研究生, 主治医师, 主要从事神经外科临床及低温脑保护的研究工作

**[通讯作者]** 徐蔚. E-mail: xuwei\_301@yahoo.com

their preoperative and postoperative hemodynamical parameters were steady and nerve function scores were normal. 2 monkeys survived for long-term, 1 monkey was disabled and 1 died in 15min group ( $n = 4$ ). All monkeys died in 20 min group. Immunohistochemical test showed that Bax protein expression was gradually elevated from 0min group to 20min group, and there was a significant difference among four groups ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference among 0 min group, 10 min group and 15 min group ( $P > 0.05$ ), but Bc1-2 protein expression was lower in 20 min group, ompared with the former three groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Selective ultra-profound hypothermia has significant brain protective effects in monkey after brain ischemia through upregulating the Bc1-2 protein expression and downregulating the bax protein expression.

[**Key words**] Selective ultra-profound hypothermia; Monkey brain; Occlusion of cerebral blood flow; bc1-2; Bax

目前亚低温已经成为神经外科重要的救治手段之一, 但对于特重型颅脑损伤, 仍然有 25% ~ 45% 的死亡率, 于是对深低温的研究便提上议事日程. 1996 年 Schwartz 等对狒狒选择性脑部降温, 开始深低温的研究, 其后又有相关研究. 包括深低温的获得方法、灌注液的选择、灌注方法、凝血机制及实验动物的选择. 其中恒河猴在组织结构、代谢和生理功能等生物学特性方面与人类极为相似, 脑组织结构、外形和血液供应和人体基本一致, 具有最完全的颅内和颅外循环系统. 本实验模拟急性心跳呼吸骤停, 然后予以深低温停循环处理后, 通过对脑组织 Bc1-2 和 Bax 表达变化的研究, 从而探讨脑选择性超深低温的脑保护作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

健康成年恒河猴 15 只 (由中国科学院昆明动物研究所提供), 雄性, 神经功能正常, 平均年龄 ( $7.90 \pm 1.82$ ) 岁, 平均体重 ( $8.22 \pm 2.15$ ) kg. 随机分为 4 组, 双侧颈动脉阻断立即超深低温灌注组 ( $n = 4$ ), 双侧颈动脉阻断 10 min 后超深低温灌注组 ( $n = 4$ ), 双侧颈动脉阻断 15 min 后超深低温灌注组 ( $n = 4$ ), 双侧颈动脉阻断 20 min 后超深低温灌注组 ( $n = 3$ ). 按照昆明医学院第二附属医院神经内科前期试验方法完成猴脑选择性超深低温断血流复苏的模型建立和神经功能评分, 4%多聚甲醛活体灌注后取脑, 石蜡包埋. 常规免疫组化染色, 显微镜观察结果, 免疫组化染色阳性为黄 - 棕黄颗粒, 用灰度值来表示不同强度.

### 1.2 统计学处理

实验数据用 SPSS 统计软件包处理, 统计量以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 根据实验资料要求, 做方差分析并行组与组间比较 (SNK 法),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 一般结果

0 min 组、10 min 组猴全部成活, 无神经功能缺损; 15 min 组中长期存活 2 只, 重残 1 只, 死亡 1 只; 20 min 组复苏困难, 生命体征分别维持 3、7、20 h 后全部死亡; 其中 15 min 组 1 只猴因为发生伤口渗血和伤口感染, 于术后 72 h 处死.

### 2.2 免疫组化

10 min 组、15 min 组、20 min 组 3 组间猴脑额叶 Bc1-2 表达明显逐渐降低, 3 组间有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0 min 组与 20 min 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0 min 组较 10 min 组、15 min 组猴额叶 Bc1-2 的表达无明显差异, 无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 对 Bax, 0 min 组、10 min 组、15 min 组、20 min 组 4 组间比较, 猴脑额叶 Bax 的表达明显逐渐增高, 各组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1.

Bc1-2 和 Bax 在各组表达情况见图 1 ~ 8, 箭头所指为阳性表达细胞.

表 1 各组猴脑额叶 Bc1-2 和 Bax 表达平均灰度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of average gray of bc1-2 and Bax among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	Bax	Bc1-2
0 min 组	4	145.34 $\pm$ 1.51*	153.68 $\pm$ 1.42 <sup>△</sup>
10 min 组	4	134.21 $\pm$ 1.43*	151.24 $\pm$ 1.50 <sup>△</sup>
15 min 组	4	122.75 $\pm$ 3.14*	155.12 $\pm$ 1.14 <sup>△▲</sup>
20 min 组	3	114.33 $\pm$ 3.46*	168.27 $\pm$ 3.62 <sup>▲</sup>

与 Bax 4 组间比较, \* $P < 0.05$ ; 与 20 min 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与 10 min 组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$

每一指标的阳性率是通过每张片子观察 10 个部位, 每只猴一张, 这样四只猴可得 40 个数据, 然后求均数.

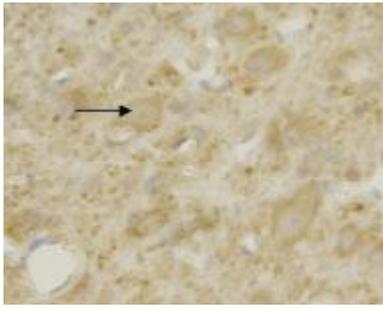


图1 Bcl-2 表达 0 min 组 (×400)  
Fig. 1 Bcl-2 expression in 0 min group (×400)

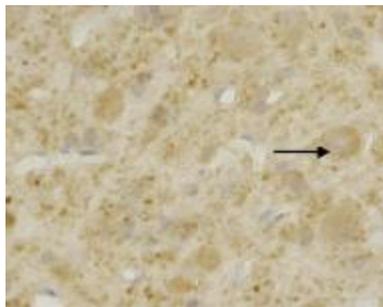


图2 Bcl-2 表达 10 min 组 (×400)  
Fig. 2 Bcl-2 expression in 10 min group (×400)

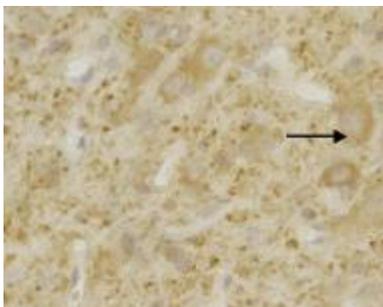


图3 Bcl-2 表达 15 min 组 (×400)  
Fig. 3 Bcl-2 expression in 15 min group (×400)

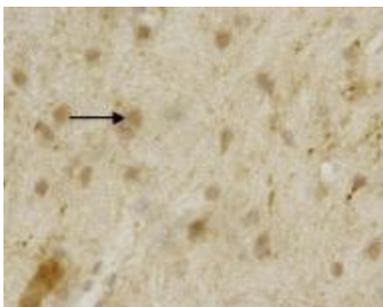


图4 Bcl-2 表达 20 min 组 (×400)  
Fig. 4 Bcl-2 expression in 20 min group (×400)

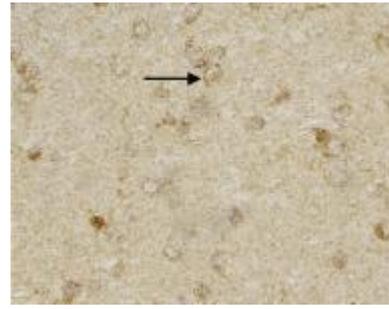


图5 Bax 表达 0 min 组 (×400)  
Fig. 5 Bax expression in 0 min group (×400)

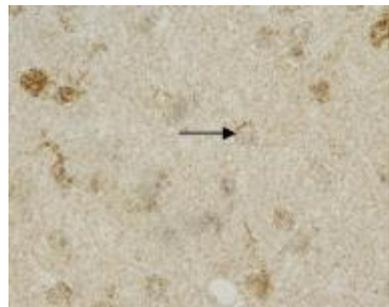


图6 Bax 表达 10 min 组 (×400)  
Fig. 6 Bax expression in 10 min group (×400)

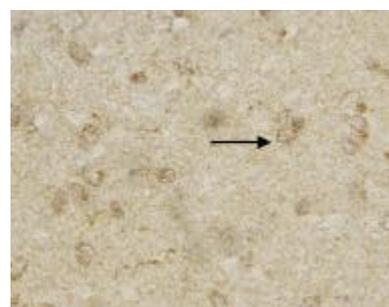


图7 Bax 表达 15 min 组 (×400)  
Fig. 7 Bax expression in 15 min group (×400)

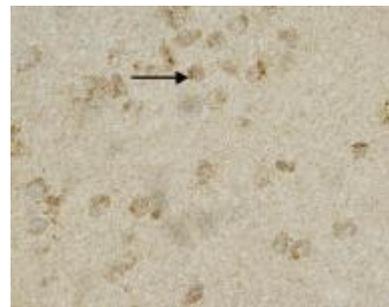


图8 Bax 表达 20 min 组 (×400)  
Fig. 8 Bax expression in 20 min group (×400)

### 3 讨论

常温条件下, 人脑能耐受的缺血时间为 5~8 min. 当人体温度降至 15 °C 时, 代谢率仅为正常状态时的 10%, 而当脑温降至 23 °C 时, 脑组织代谢率仅相当于正常情况下的 25%, 脑组织对缺氧的耐受性增加 10 倍. 大量的动物实验及临床研究均证实, 温度降低时, 细胞内需氧酶反应被抑制, 组织代谢率降低, 氧需求量减少, 而且脑温越低, 其脑保护作用越明显, 脑组织对缺氧的耐受性越强, 这就为超深低温的实验研究提供了理论上的依据. 然而, 由于传统的全身深低温治疗会导致心律失常、低血压及凝血功能障碍等严重并发症, 所以就限制了它在临床的广泛应用<sup>[1-3]</sup>. 近 10 多 a 来, 由于深低温技术的日趋成熟, 以及脑保护液、灌注方法和凝血机制的研究进展, 对深低温和超深低温应用于临床已是一种必然的趋势.

1999 年国内成功进行了犬脑局部超深低温无血循环复苏的实验研究<sup>[4]</sup>. 2002 年成功利用高等动物猴建立了选择性深低温断血流复苏模型, 断流 60~80 min 复苏后未引起神经功能缺失, 心、肺、肾等脏器功能正常, 脑组织超微结构无异常<sup>[5]</sup>. 此后又进行了恒河猴常温缺血 10 min 后进行脑选择性超深低温复苏的研究, 结果证实脑在常温缺血 10 min 后, 脑选择性超深低温能有效的保护脑组织, 减轻脑组织的损害. 该实验提示猴脑选择性深低温可明显增强脑对缺血缺氧的耐受性, 这就为神经外科临床的部分难治性疾病的治疗及重型颅脑损伤的救治提供新的辅助手段.

虽然深低温停循环 (deep hypothermic circulation arrest, DHCA) 可延长脑保护的安全时限但 DHCA 并不是生理过程, 它对脑组织既有保护作用又有损伤作用. 神经细胞在缺血缺氧后会出现坏死和凋亡, 缺血神经元选择坏死还是凋亡, 很大程度上可能依赖于缺血损害的程度. DHCA 中神经元损害的程度, 取决于血流阻断的程度、时间, 血液再灌注时间以及保护措施. 早期重度缺血对神经元以坏死为主, 凋亡很少, 轻度缺血时以细胞凋亡为主. 迟发性的神经系统并发症与脑缺血诱发脑细胞的凋亡之间存在密切的关系<sup>[6]</sup>, 脑在有效安全时限内脑细胞死亡的主要原因是后期的迟发性脑细胞凋亡.

Bax 是促进细胞凋亡的基因, Bax 蛋白可以直接和线粒体膜结合, 形成线粒体跨膜通道, 促进细胞色素 C 的释放, 促进细胞凋亡. 抑制细胞凋亡

功能的蛋白 Bcl-2 和促进细胞凋亡的蛋白 Bax 两者在组织细胞中常协同表达, 两者比值 (Bcl-2/Bax) 增大时促进细胞存活, 反之导致细胞死亡<sup>[7-10]</sup>.

在本实验中, 常温下猴脑缺血 0 min 组、10 min 组、15 min 组、20 min 组 4 组间相互比较, 10 min 组、15 min 组、20 min 组 3 组间猴额叶 Bcl-2 表达逐渐降低, 各组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 0 min 组较 10 min 组、15 min 组猴额叶 Bcl-2 的表达无明显差异, 无统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而 Bax 的表达明显逐渐增高, 各组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示缺血缺氧对脑细胞的损伤可随着缺血缺氧时间的延长逐渐增加, 深低温对 Bax 的影响明显, 且可持续较长时间. 20 min 组较其余 3 组猴额叶 Bcl-2 的表达明显降低, 提示深低温可促进 Bcl-2 的表达, 但随着缺血时间的延长, 这种保护作用逐渐减弱.

同时本实验也表明, 常温下脑缺血的极限为 10 min, 超过此时限, 就可能形成不可逆的神经功能损伤, 临床上还要尽量缩短停循环的时间以减少出现并发症的可能性<sup>[11,12]</sup>.

### [参考文献]

- [1] 徐蔚, 江基尧, 杨朋范, 等. 选择性超深低温断血流对猴神经功能及神经元超微结构的影响[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(8): 486-488.
- [2] LEOPOLDO C, CANCIO, WILLIAM G, et al. hypothermia in acute head injury[J]. Resuscitation, 1994, 28:9-19.
- [3] JULIAN E, BALIES J E, MARC L, et al. Ultraprofound hypothermia with complete blood substitution in a canine model [J]. Neurosurg, 1991, 74:781-788.
- [4] 江基尧, 徐蔚, 杨朋范, 等. 猴脑选择性超深低温对神经元超微结构的影响 [J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(4): 304-306.
- [5] GASSP P, HERDEGEN T, BRAVO R, et al. Induction of immediate early gene encoded proteins in the rat hippocampus after bicuculline-induced seizures; differential expression of KROX-24, Fos and Jun proteins[J]. Neuroscience, 1992, 48(2): 315-324.
- [6] 王宇卉, 邵福源, 夏春林, 等. 大鼠局灶性脑缺血/再灌注后单、双链DNA断裂的实验研究[J]. 中国临床神经科学, 2002, 10(4): 345-348.
- [7] MARANI M, TENEV T, HANCOCK D, et al. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(11): 3577-3589.
- [8] TSCHOPP J, MARTINON F, BURNS K. NALPs: a novel p-

(下转第 15 页)

隆发生了改变,即肿瘤克隆在疾病发展过程中已发生了演化.这种生物学上的演化给临床上带来的困难是难治.

9/43 例变异的 Ph 染色体的 CML 均检测出 bcr/abl 融合基因,说明此类 CML 仍然由 bcr/abl 融合基因发动.这与国外学者的研究结果一致<sup>[3]</sup>,1 例 Ph 染色体阴性伴其它染色体易位,检测出 bcr/abl 融合基因,2 例 Ph 染色体阴性伴倒位未检测出 bcr/abl 融合基因.可能存在其它融合基因形成的发病机制,国外有个别报告,此类 CML 病例的发病机理值得进一步研究. CML 的细胞遗传学不仅为诊断提供可靠、可循的依据,亦对预后判断有重要意义<sup>[5,6]</sup>.

### [参考文献]

[1] ABE S, MINAMIHISAMATSU M, ISHIHARA T, et al. C-hromosomal in situ hybridization and Southern blot analyses

using c-abl, c-sis, or bcr probe in chronic myelogenous leukemia cells with variant Philadelphia translocations [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1989, 38(1): 61 - 74.

[2] 李正发, 沈晓梅, 赵仁彬, 等. 急性髓细胞性白血病微分化型 (ANLL—M0) 的临床研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2003, 24(1): 39 - 41.

[3] 李正发, 沈晓梅, 宋建新, 等. Wortmannin 抑制 PI3K 途径对 K562 细胞增殖和 Ara-C 诱导的细胞凋亡的影响 [J]. *昆明医学院学报*, 2004, 25(4): 17 - 19.

[4] 李正发, 沈晓梅, 朱宝生, 等. 慢性髓细胞性白血病的细胞遗传学与预后的临床分析 [J]. *中国肿瘤临床*, 2002, 29(9): 665 - 667.

[5] 钱思轩, 李建勇, 潘金兰, 等. 荧光原位杂交技术在异性间造血干细胞移植后 Ph 阳性白血病的检测意义 [J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(3): 253 - 255.

[6] 李正发, 沈晓梅, 朱宝生, 等. 白血病患者异基因造血干细胞移植后细胞遗传学标志的临床观察 [J]. *中国医师杂志*, 2007, 9(10): 1 300 - 1 303.

(2011 - 12 - 09 收稿)

(上接第 11 页)

rotein family involved in inflammation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4 (2): 95 - 104.

[9] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD [J]. *Nature*, 1998, 391: 43.

[10] 郎海滨. Bcl-2 家族蛋白与线粒体凋亡路径研究进展 [J]. *国外医学卫生分册*, 2004, 31(2): 88 - 91.

[11] SENMANN S, STOLL G, SCHROETER M, et al. Differential regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-X proteins in focal cortical isohemial in the rat [J]. *Brain pathol*, 1998, 8

(1): 49 - 62.

[12] 江基尧, 徐蔚, 毛青, 等. 脑超深低温下猴脑血流阻断时间窗的研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 2008, 10, 24 (10): 756 - 758.

[13] ALGRA S O, KORNMANN V N, VAN DER TWEEL, et al. Increasing duration of circulatory arrest, but not ante-grade cerebral perfusion, prolongs postoperative recovery after neonatal cardiac surgery [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 7: 189 - 192.

(2011 - 10 - 18 收稿)