论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1226-03

大鼠脑创伤后海马区Fas蛋白表达与神经细胞凋亡

赵景霞[1],刘清军[2],崔建忠[3],高俊玲[1],洪 军[3],宋朝彦[3] (华北煤炭医学院:[1]基础部生理学教研室,[2]附属医院神经外科,[3]唐山工人医院神经外科,唐山 063000)

提 要:目的 进一步深入研究颅脑创伤后神经细胞凋亡的机制,探讨美洛宁对大鼠脑创伤后的影响,为临床治疗颅脑创伤病人提供一定的理论基础。**方法** 采用重型闭合性颅脑创伤模型,将Wistar大鼠300只随机分为脑创伤组、美洛宁治疗组、假手术组,每组又分别划分成伤后3、6、12、24、48、72、168及336 h等8个时相组,每时相组各12只,另12只作为正常对照组。动态观察大鼠颅脑创伤后海马区的神经细胞凋亡以及Fas蛋白的表达情况。**结果** 脑创伤后海马区出现Fas蛋白表达增加并出现神经细胞凋亡。美洛宁治疗组伤后海马神经细胞Fas蛋白表达高峰较创伤组明显下调,凋亡阳性细胞密度亦较创伤组有所下调。**结论** 脑创伤后Fas蛋白表达增加可能造成伤后神经细胞凋亡,美洛宁能够减少脑创伤后Fas蛋白表达,并减少神经细胞凋亡。

关键词:大鼠;重型闭合性颅脑损伤;海马;凋亡;Fas;CTP
中图法分类号:R329.25;R341;R651.15 **文献标识码**:A

Effects of Fas protein expression on neural apoptosis in hippocampus after traumatic brain injury in rats

ZHAO Jing-xia[1], LIU Qing-jun[2], CIU Jian-zhong[3], GAO Jun-ling[1], HONG Jun[3], SONG Zhao-yan[3] ([1]Department of Biology, College of Medicine, [2]Department of Neurosurgery, Northern China Coal Medical College; [3]Department of Neurosurgery, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To study the mechanisms of nerve cell apoptosis after traumatic brain injury and the influences of CTP on rats after brain trauma. **Methods** The model of severe closed traumatic brain injury (TBI) was used. A total of 300 Wistar rats were divided randomly into TBI group, CTP treatment group, and sham operation group. The Fas protein expression and neural apoptosis in each group were observed at 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, and 336 h after TBI. At the same time, the rest 12 rats were employed as the normal controls. Immunohistochemistry and TUNEL staining were used to observe the neural apoptosis and the expression of Fas protein in hippocampus of rats after TBI. **Results** Increased expression of Fas protein and neural apoptosis were found in the rat hippocampus after TBI. **Conclusion** The increased expression of Fas protein may result in neural apoptosis after TBI. CTP can reduce the expression of Fas protein and neural apoptosis.

Key words: rat; severe closed traumatic brain injury; hippocampus; apoptosis; Fas; CTP

近年来,分子生物学研究表明,海马作为脑损伤后选择易损区,伤后出现神经细胞延迟性死亡。目前,国内外有关这一领域的研究大多局限于缺血性脑损伤,有关脑创伤后这一领域的确切机制尚少有全面的报道。因此,本研究利用重型闭合性颅脑损伤模型,采用免疫组织化学、原位细胞凋亡检测对大鼠脑创伤后神经细胞凋亡的机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

取成年健康雄性Wister大鼠300只(购自北京大学医学部实验动物中心),体质量300~350 g,随机分成脑创伤组(96只),美洛宁治疗组(96只)及假手术组(96只),每组又分别划分为伤后3、6、12、24、48、72、168、336 h等8个时相组,每个时相点12只大鼠,另12只作为正常对照组。

1.2 大鼠闭合型脑创伤模型制备

按照Marmarou等[1]创立的方法大鼠闭合型脑创伤模型。假手术组仅给予麻醉及头皮切开、缝合,但不致伤。正常对照组不做任何处理。

1.3 给药方法

美洛宁治疗组大鼠伤后经腹腔注射美洛宁(三磷酸胞苷二钠,购自于广东江门生物技术公司,药物批号:粤卫药准字第616021号)30 $mg \cdot kg^{-1} \cdot 次^{-1}$,每24小时1次直至各时相点处死。脑创伤组、假手术组及正常对照组在相同时间内给予等量生理盐水腹腔注射。

1.4 取材

于上述伤后各时相点,对动物进行乙醚吸入深度麻醉。开

作者简介:赵景霞(1970-),女,河北省唐山市人,讲师,主要从事神经生理学方面的研究。电话:(0315)3725606,E-mail: Lqjzjx6112@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-04-20;修回日期:2004-12-05

胸，4%多聚甲醛经心灌流固定 10 min 后，断头取出脑组织，置于 4%多聚甲醛后固定 12～24 h(4 ℃)。取出固定液中脑组织标本，常规脱水、石蜡包埋。冠状面连续切片，厚度约 4 μm，经粘片剂处理过的载玻片捞片，置于 60 ℃烤箱烘烤 1 h 后，按下述方法进行染色。

1.5　原位细胞凋亡检测(TUNEL 法)

严格按照德国 BM 公司(*in situ* cell death detection kit, AP)说明书操作，每次实验均设阴性对照，以 PBS 代替一抗。凋亡阳性细胞胞核呈蓝紫色。

1.6　Fas 蛋白免疫组化检测方法

严格按照北京中山生物技术有限公司提供的说明书进行操作。每次实验均设阴性对照，以 PBS 代替一抗。胞浆及胞核有棕褐色颗粒者为 Fas 阳性细胞。

1.7　图像分析

采用 CMIAS-真彩色医学图像分析系统(由北京航空航天大学提供)和 OLYMPUS 摄像显微镜进行海马区凋亡阳性细胞记数(个/400 倍视野)及 Fas 蛋白阳性细胞的平均光密度值(D)的测定。

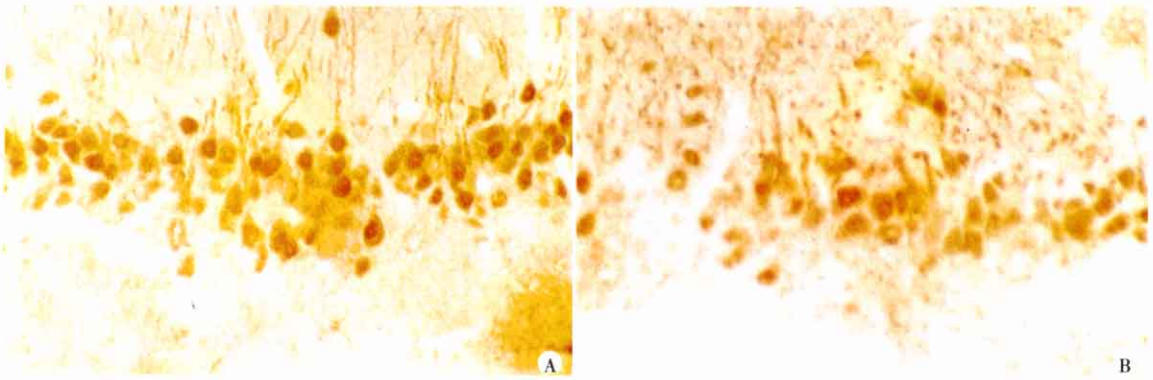
1.8　统计学方法

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，经 access 数据库整理后应用美国 SAS 统计软件进行 t 检验。

2　结　果

2.1　伤后海马区神经细胞凋亡检测结果

正常对照组及假手术组海马未见凋亡阳性细胞。脑创伤组大鼠伤后 24 h，海马 CA2 区即出现少量凋亡阳性细胞，镜下阳性细胞核着蓝紫色(图 1)；伤后 72 h 阳性细胞数量逐渐增多；于伤后 7 d 达高峰(图 2)；伤后 14 d 凋亡阳性细胞数量有所下降。同创伤组相比，美洛宁治疗组使凋亡的高峰明显下调，统计学上有显著意义(表 1，图 1)。



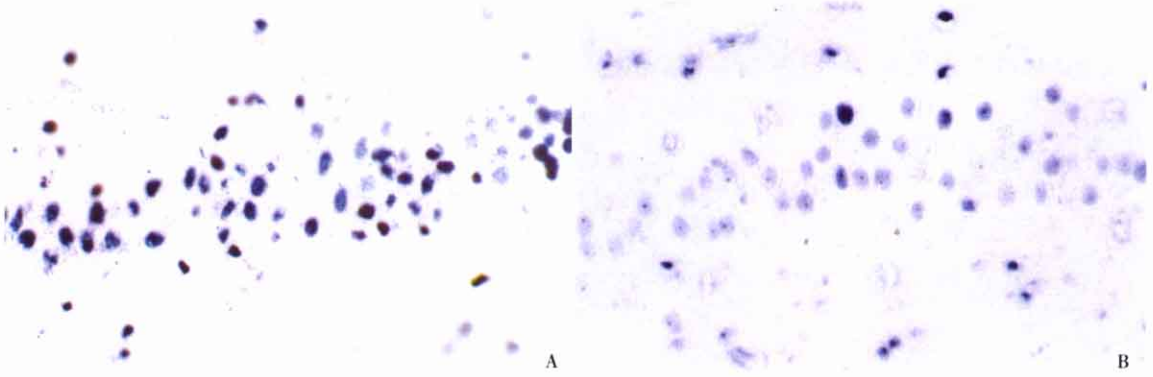
A: TBI group; B: CTP group

图 1　伤后 48 h 海马 CA2 区 Fas 蛋白表达　(S-P×400)

Fig 1　Expression of Fas protein in the hippocampal CA2 region at 48 h after TBI　(S-P×400)

2.2　免疫组织化学检测结果

大鼠伤后 6 h 海马 CA2 区出现 Fas 蛋白的表达增加，12 h 明显增强，2～3 d 达高峰，7 d 明显下降，于伤后 14 d Fas 蛋白免疫反应消失。伤后 2～3 d 美洛宁治疗组较创伤组 Fas 蛋白的免疫反应明显减轻(表 2，图 2)。假手术组各时相点及正常对照组海马 CA2 区未检测到 Fas 蛋白的表达。



A: TBI group; B: CTP group

图 2　伤后 7 d 海马 CA2 区神经细胞凋亡　(TUNEL×400)

Fig 2　Neural apoptosis in the hippocampal CA2 region at day 7 after TBI　(TUNEL×400)

表1 脑创伤后海马 CA2 区神经细胞 Fas 蛋白表达（D，$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Expression of Fas protein in the hippocampal CA2 region after TBI（D，$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Phase (h)				
	6	12	24	48	72
TBI	0.127±0.015	0.171±0.025	0.232±0.028	0.255±0.023	0.247±0.025
CTP	0.123±0.016	0.157±0.020	0.189±0.025*	0.179±0.025**	0.174±0.021**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* TBI group

表2 脑创伤后海马 CA2 区神经细凋亡（*number/HP*，$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Neural apoptosis in the hippocampal CA2 region after TBI（*number/HP*，$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Phase (h)				
	24	48	72	168	336
TBI	18.00±3.408	21.18±3.75	24.45±3.067	29.18±4.67	15.26±3.350
CTP	17.45±3.504	19.45±3.11	21.19±3.562*	21.00±4.64**	11.82±2.560*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* TBI group

3 讨论

Fas 蛋白属于神经生长因子受体（nerve growth factor receptor，NGFR）/肿瘤坏死因子受体（tumor necrosis factor receptor，TNFR）超家族成员，这一家族成员对细胞生存、分化及免疫反应调节发挥着广泛的作用。Fas 抗原在功能上与 TNF-RI 有联系，因为它们两者都拥有一个能够传递细胞毒性/凋亡信号的死亡结构域[2]。FasL 与 Fas 结合促发一系列细胞内事件，最终导致靶细胞 caspases 激活，细胞死亡[3]。

我们研究了大鼠闭合性颅脑损伤后大鼠伤后 Fas 蛋白的表达，大鼠伤后 6 h 海马 CA2-3 区出现 Fas 蛋白的表达增加，于 12 h 明显增强，2～3 d 达高峰，7 d 明显下降，于 14 d Fas 蛋白免疫反应消失。美洛宁能够使 Fas 蛋白的表达高峰下调，假手术组各时相点及正常对照组海马 CA2-3 区未检测到 Fas 蛋白的表达。我们研究发现 Fas 蛋白的免疫反应不但定位于胞质，而且在核区出现更加强烈的染色，脑损伤后 Fas 蛋白在胞核中强烈表达尚少见文献报道，其作用机制还有待于进一步研究。

关于脑损伤后 Fas 蛋白表达国内外鲜有人报道，Rosenbaum 等[4]证实在大鼠局灶性脑缺血后的缺血区的神经元 Fas 及 Fasl 表达增加，说明 Fas 介导的凋亡参与了脑缺血的病理生理学过程。Beer 等[5]在研究大鼠实验性 TBI 后 Fas 及 Fasl 的表达时程中发现，在创伤后 15 min 至 72 h 损伤部位同侧皮质内分别见到增长的 Fas 及 Fasl 的免疫反应。新近有学者发现脑创伤后 Fas 参与了死亡诱导信号复合体（DISCs）的装配，认为 Fas 可能在脑损伤后发挥死亡受体的作用[6]。

三磷酸胞苷（CTP）作为参与磷脂、蛋白质及核酸代谢的有效成分，全面营养神经细胞，能够减轻甚至逆转多种原因所引起的神经系统损伤，如：中毒性、代谢性、创伤性及缺血性脑损伤等。近年来，CTP 已经广泛用于重型颅脑损伤的临床治疗[7]。重型颅脑损伤可导致不同程度的颅内压增高、脑灌注压降低、脑缺血、缺氧等。实验证实，CTP 治疗外伤引起的意识障碍等神经功能紊乱，主要是通过其神经营养作用来降低脑水肿。磷脂酰乙醇胺（脑磷脂）和磷脂酰胆碱（卵磷脂）是细胞膜的主要成分，CTP 直接参与甘油磷脂与核酸的合成。有研究表明，细胞内磷酸乙醇胺胞苷酰基转移酶（PECT）、磷酸胆碱胞苷酰基转移酶（PCCT）的活性和磷酸酯合成率对 CTP 细胞浓度具有高度的依赖性，PECT 对 CTP 的依赖性更大[8]。CTP 通过多种途径参与脑磷脂合成，在提高神经细胞膜的合成率方面发挥重要作用[9]。本研究表明 CTP 使大鼠脑创伤后的神经细胞 Fas 蛋白的表达高峰下调，减少神经细胞凋亡。

结合我们的研究结果，Fas 蛋白的免疫反应高峰先于凋亡的高峰出现，我们认为：Fas 及 Fasl 参与了大鼠闭合性颅脑损伤凋亡性神经变性的病理学机制。美洛宁可能通过抑制 Fas 蛋白的表达，减少神经细胞凋亡来发挥其治疗作用。

参考文献：

[1] Marmarou A, Foda M A, Van den Brink-W, *et al*. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics[J]. J Neurosurg, 1994, 80(2): 291－300.

[2] Nagata S, Golstein P. The fas death factor[J]. Science, 1995, 267(5203): 1449－1456.

[3] Becher B, Barker P A, Owens T, *et al*. CD95-CD95L: can the brain learn from the immune system[J]? Trends Neurosci, 1998, 21(3): 114－117.

[4] Rosenbaum D M, Gupta G, D'Amore J, *et al*. Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(6): 686－692.

[5] Beer R, Franz G, Schopf M, *et al*. Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(4): 669－677.

[6] Qiu J, Whalen M J, Lowenstein P, *et al*. Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3504－3511.

[7] 王启弘，李国忠，李英斌，等. 重度颅脑损伤显微外科手术后三磷酸胞苷的作用[J]. 中华显微外科杂志，2000，23(1)：77－78.

[8] Alberghina M, Lupo G, Anfuso C D, *et al*. Lipid peroxidation inhibits acyl-CoA: -1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine O-acyltransferase but not CTP: phosphocholine cytidylyltransferase activity in rat brain membranes[J]. Neurochem Int, 1995, 26(5): 477－487.

[9] Ross B M, Moszczynska A, Blusztajn J K, *et al*. Phospholipid biosynthetic enzymes in human brain[J]. Lipids, 1997, 32(4): 351－358.

（编辑 薛国文）