论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2068-03

Caspase-3 抑制剂抗新生鼠缺氧缺血脑损伤作用的观察

张雨平,赵聪敏,王丽雁,于若谷,温恩懿 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

提 要: 目的 观察 Caspase-3 特异性肽类抑制剂 AC-DEVD-CHO 对新生鼠缺氧缺血脑损伤(hypoxia-ischemia brain injury, HIBI)模型的作用。**方法** 建立 HIBI 模型,予 AC-DEVD-CHO 经脑室注射后通过病理学、原位细胞凋亡检测观察近期效果,通过穿梭箱、自主活动仪、疲劳仪等测试远期学习记忆和运动能力以判断远期效果。**结果** Ac-DEVD-CHO 治疗组 HIBI 新生鼠较生理盐水对照组脑皮质、海马神经细胞凋亡显著减少,穿梭箱实验中被电击时间(ST)缩短,但在疲劳仪和自主运动实验中无显著差异。**结论** Ac-DEVD-CHO 侧脑室注射可显著减少 HIBI 新生鼠脑凋亡细胞新生鼠的远期学习记忆能力有所改善,对运动能力却无明显改善。

关键词: 脑缺血;脑缺氧;Caspase-3;AC-DEVD-CHO

中图法分类号: R741.02;R743.31;R977.6 **文献标识码**: A

Experimental study of caspase-3 inhibitor in treatment of HIBI neonatal rats

ZHANG Yu-ping, ZHAO Cong-ming, WANG Li-yan, YU Ruo-gu, WEN En-yi (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of a caspase-3 inhibitor, AC-DEVD-CHO, in the hypoxia-ischemia brain injury (HIBI) of neonatal rats. Methods After a total of 20 rats at the age of 7 d were inflicted with HIBI and then randomly and equally sacrificed at 24 h and 1 month later. There were NS sub-group [normal saline, intracerebroventricular administration(i. c. v.)] and AC-DEVD-CHO sub-group(20 μg/kg, i. c. v.), and another 5 rats served as normal control for each time point. Morphological changes and TUNEL-positive cells were observed. Shuttle box trial, tiredness and activity trials were carried out for their learning and motor abilities. Results The percentage of TUNEL-positive cell in the cortex and hippocampus were significantly decreased in AC-DEVD-CHO sub-group than in NS sub-group. The stimulating time in shuttle box trial was significantly shorter in Ac-DEVD-CHO sub-group than in the NS sub-group, but there were no obvious difference in tiredness and activity trials between the 2 sub-groups. Conclusion Intracerebroventricular administration of Ac-DEVD-CHO is helpful to decrease apoptotic neuronal death in HIBI rats and can improve their learning and memory abilities. However, it's no use in the improvement of the motor ability of the animals.

Keywords: cerebral hypoxia; cerebral ischemia; caspase-3; Ac-DEVD-CHO

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxia-ischemia encephalopathy, HIE)神经细胞死亡不是简单的坏死,而存在复杂的细胞凋亡机制。Caspases 是细胞凋亡程序中一类重要的同源半胱氨酸蛋白酶,其中 caspase-3 是关键的效应蛋白酶。本研究通过建立新生鼠 HIBI 模型,经脑室给予 caspase-3 特异性肽类抑制剂 AC-DEVD-CHO,通过病理学及行为学观察了解 caspase-3 特异性抑制剂对 HIBI 的疗效,旨在为治疗新生儿 HIE 探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

7 d 龄 Wistar 大鼠由第三军医大学实验动物中心提供,雌雄不限,体质量 12 ~ 15 g,共 30 只。按实验要求进行分组:将新生鼠分为 2 批,分别于缺氧缺血(HI)后 24 h、1 月龄时处死。每批分为正常对照组、HI 后生理盐水对照组、HI 后 AC-DEVD-CHO 治疗组各 5 只。

1.2 实验方法

1.2.1 新生鼠 HIBI 模型建立 参照改良 Levine[1] 法:新生

作者简介:张雨平(1972 -),女,四川省雅安市人,硕士,主治医师,主要从事新生儿缺氧缺血性脑损伤方面的研究。电话:(023)68774602

通讯作者:赵聪敏,电话:(023)68755602

收稿日期:2005-10-31;修回日期:2006-06-15

鼠经乙醚吸入麻醉后作颈部正中切口，分离左侧颈总动脉并结扎，缝合伤口后置于自制 1 L 容积缺氧仓内，以氧氮混合气（氧浓度为 8%）1 L/min 持续灌注 2 h。缺氧仓置于恒温水浴箱中，维持环境温度在 37～37.5 ℃。缺氧后将新生鼠放回母鼠身边。正常对照组施行假手术，仅在乙醚麻醉后作颈部正中切口，分离出颈总动脉后不进行结扎即缝合伤口。

1.2.2　给药途径和剂量　AC-DEVD-CHO 量按新生鼠体质量计算，予 20 μg/kg。注射前将 AC-DEVD-CHO 干粉溶于 5 μl DMSO 中，HI 后 1 h 予治疗组新生鼠侧脑室内注射。生理盐水对照组以生理盐水稀释相应量 DMSO 至 5 μl 后行侧脑室内注射。侧脑室内注射定位[2]：以后囟为原点，向嘴侧 2.0 mm，向侧方 1.5 mm，深度 2.0 mm。

1.2.3　病理学检查及 TUNEL 法检测原位细胞凋亡　在新生鼠 HIBI 后 24 h，以戊巴比妥钠 150～200 mg/kg 腹腔注射深麻醉后，开胸剪开右心耳以 4 ℃磷酸盐缓冲液经左心室灌注至流出液清亮后继用 10% 中性缓冲甲醛溶液灌注。迅速断头取脑，大体观察后自丘脑中 1/3 处切开，以 10% 中性缓冲甲醛溶液后固定 24～48 h，常规脱水石蜡包埋，连续切片。采用 HE 染色观察标本病理学改变。TUNEL 法检测原位细胞凋亡，以细胞核出现棕黄色染色为阳性。在 400 倍光镜下随机计数 10 个互不重叠视野（皮质浅层 4 个、皮质深层 4 个、海马 2 个）内阳性细胞数，求出每个视野的阳性细胞数所占该视野细胞总数百分比，再求每个时相点的均数。

1.3　行为学检测

剩余每组各 5 只新生鼠饲养至 1 月龄时进行行为学测试。

1.3.1　学习记忆能力测试　穿梭箱实验：采用大鼠穿梭程序自动控制仪。记录动物受电击次数（stimulate counts，SC）；受电击时间（stimulate time，ST）。实验时将大鼠放入箱内适应 10 s 后，持续出现蜂鸣音 5 s，蜂鸣强度为 20 dB。蜂鸣音停后马上给予 10 s 电刺激（电流强度 1.5～2 mA），间隔 5 s 后再次出现蜂鸣. 受到电击的大鼠即逃至箱对侧以逃避电击，如此迫使大鼠来回穿梭。当蜂鸣音出现时大鼠立即跳至对侧安全区以回避电击即认为出现了主动回避反应。每天进行 20 个循环，连续 7 d，以最后 3 d SC、ST 结果为实验结果。

1.3.2　运动能力测试　①自主活动实验：采用大小鼠自主活动程序自动控制仪，记录鼠 60 s 内的活动次数。连续实验 3 d。每天 1 次。记录 3 次结果。②疲劳实验：采用大小鼠转棒仪。记录鼠从实验开始到从转棒落下的时间（潜伏期），转速为 6 r/min，总记录时间为 60 s。连续实验 3 d，每天 1 次，记录 3 次结果。

1.4　统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析。

2　结果

2.1　HI 新生鼠一般情况和部位病理学改变

在 HIBI 模型制备过程中表现：缺氧 2～5 min 新生鼠先出现烦躁、紫绀，20～30 min 后渐转为抑制，间歇性兴奋，伴抽搐。HI 处理后新生鼠出现自发左旋或夹尾左旋。HI 后 24 h Ac-DEVD-CHO 治疗组、生理盐水对照组脑大体出现左脑肿胀发白。HE 染色低倍镜（100 倍）下可见上述 2 组新生鼠左脑有明显梗死区域，组织疏松，染色明显变浅。高倍镜（400 倍）下两组新生鼠左侧皮质有凋亡细胞呈弥散或小灶性分布，表现为细胞体积缩小，核固缩，核碎裂（图 1）。假手术组新生鼠脑组织皮质、海马结构清晰，细胞形态正常。

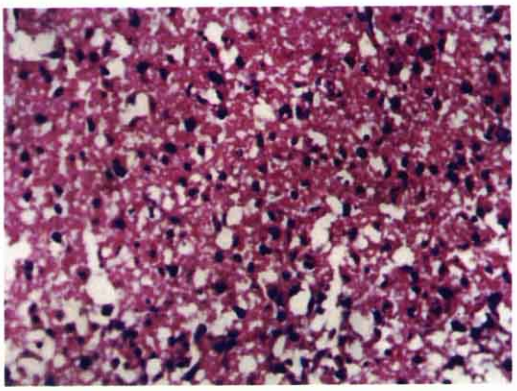
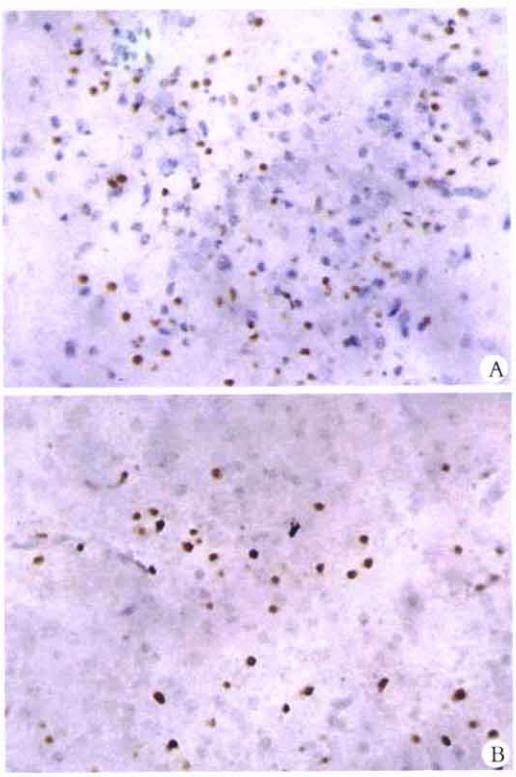


图 1　HIBI 新生鼠缺氧缺血后 24 h 患侧皮质　（HE×400）

2.2　Ac-DEVD-CHO 对 HIBI 新生鼠脑皮质、海马神经细胞凋亡的影响

HI 后 24 h 脑组织切片 TUNEL 染色可见 Ac-DEVD-CHO 治疗组、生理盐水对照组均有较多阳性细胞，以生理盐水对照组为多（图 2，3）。计数：Ac-DEVD-CHO 治疗组阳性细胞百分比为（30.2±11.2）%，生理盐水对照组阳性细胞百分比为（44.6±12.4）%，二者间差异显著（$P<0.01$）。



A：生理盐水对照组；B：Ac-DEVD-CHO 治疗组患侧皮质

图 2　新生鼠缺氧缺血后 24 h 凋亡细胞　（TUNEL×400）

2.3 Ac-DEVD-CHO 对新生鼠 HIBI 模型的远期行为学影响

2.3.1 学习记忆能力的影响 穿梭箱实验中可见生理盐水对照组新生鼠受电击次数(stimulation counts, SC)、受电击时间(stimulating time, ST)均较假手术组显著增加($P<0.01$),Ac-DEVD-CHO 治疗组较生理盐水对照组受电击时间显著缩短($P<0.05$);电击次数亦减少,但差异不显著($P>0.05$)(表1)。

表1 Ac-DEVD-CHO 干预对 HIBI 新生鼠学习记忆能力的影响

组别	电击次数(次)	电击时间(s)
假手术组	11.33±3.20	76.50±29.05
生理盐水对照组	16.17±2.72[a]	130.33±42.54[a]
Ac-DEVD-CHO 治疗组	14.83±3.58	82.83±50.06[b]

a: $P<0.05$,与假手术组比较; b: $P<0.01$,与生理盐水对照组比较

2.3.2 运动能力的影响 ①疲劳仪:生理盐水对照组新生鼠疲劳仪实验潜伏期(latent period of tiredness trial, LP)较假手术组显著缩短($P<0.05$),Ac-DEVD-CHO 治疗组较生理盐水对照组疲劳仪实验潜伏期增加,但差异不显著($P>0.05$)。②自主活动仪:生理盐水对照组新生鼠自主活动次数(Counts of activity trial, COA)较假手术组显著减少($P<0.05$),Ac-DEVD-CHO 治疗组较生理盐水对照组自主运动次数无显著差异($P>0.05$)(表2)。

表2 Ac-DEVD-CHO 干预对 HIBI 新生鼠运动能力的影响

组别	疲劳仪潜伏期(s)	自主活动(次)
假手术组	44.33±22.9	47.83±13.0
生理盐水对照组	16.36±22.5[a]	39.17±10.2[a]
Ac-DEVD-CHO 治疗组	28.73±23.6	30.67±13.4

a: $P<0.05$,与假手术组比较

3 讨论

近年来越来越多的实验证实细胞凋亡在 HIBI 中占有相当重要的作用[3,4]。Caspase-3 在细胞凋亡中发挥非常重要的作用,被称为死亡蛋白酶。生理情况下,caspase-3 以无活性的 caspase-3 酶原形式存在于哺乳动物多种组织和细胞内。当其受到蛋白酶激活后又进一步切割不同的底物,导致蛋白酶级联切割放大,最终使细胞走向凋亡[1]。HI 后 2 h 损伤侧海马组织中 caspase-3 活性显著增高,24~36 h 达高峰,48 h 下降接近正常。而非损伤侧 caspase-3 直到 HI 后 48 h 尚无明显增高[5,6]。

国外学者观察到脑室注射 caspase-3 抑制剂可阻止脑缺血成年鼠脑皮质、海马、纹状体神经元凋亡,减轻脑水肿并改善缺血后的神经功能恢复。在以往的实验中,我们首次将 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 应用于 HIBI 新生鼠,通过不同途径、不同剂量注射 Ac-DEVD-CHO 后观察其对 HIBI 新生鼠脑 caspase-3 活性的抑制作用,选出最佳剂量为 300 ng/只。本实验中我们应用该最佳剂量注射后,观察到其可显著降低脑细胞凋亡,肯定了 Ac-DEVD-CHO 对新生鼠 HIBI 模型具有脑保护作用。通过穿梭箱、疲劳仪和自主活动仪测试发现 Ac-DEVD-CHO 对 HIBI 新生鼠的远期学习记忆能力有所改善,而对其疲劳运动能力、自主活动能力却未见明显改善。国外学者 Gillardon 等[7]曾对 caspase 抑制剂的远期效果提出质疑,其在成年大鼠短暂脑缺血后脑室注射 caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK,14 d 后通过电生理检查显示,经强直性刺激后治疗组大鼠神经元的突触后电位兴奋区斜率(field excitatory postsynaptic potentials, fEPSPS)有增大趋势(较脑缺血组有所改善),但与记忆形成有关的长程增强效应(long-term potentiation, LTP)却没能恢复。这提示从远期效果来看,Ac-DEVD-CHO 的治疗结果可能并不让人满意。

Caspase 抑制剂在 HIBI 中的究竟能起到什么样的作用,如何发挥其有利的一面,尚需将其对神经元功能、轴突功能的影响等作更为详尽的研究。然而,目前可以肯定的是 Caspase 抑制剂能在新的神经营养环境建立之前,为受损神经元争取更多的存活时间。

参考文献:

[1] 王琍琍,王 杨,宣桂华,等. 新生大鼠脑缺氧缺血损伤模型的建立[J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(4): 259-261.

[2] CHENG Y, DESHMUKH M, D'COSTA A, *et al*. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. J Clin Invest, 1998, 101(9): 1992-1999.

[3] ZHU C, QIU L, WANG X, *et al*. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain[J]. J Neurochem, 2003, 86(2): 306-317.

[4] ZHU C, WANG X, CHENG X, *et al*. Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia[J]. Brain Res, 2004, 996(1): 67-75.

[5] 张雨平,赵聪敏,刘 立,等. 缺氧缺血新生鼠脑 caspase-3 活性的变化[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(13): 1172-1173.

[6] 杨宾侠,王永利. 缺血再灌注后脑细胞凋亡和 Caspase-3 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2003, 38(2): 205-207.

[7] GILLARDON F, KIPRIANOVA I, SANDKUHLER J, *et al*. Inhibition of caspases prevents cell death of hippocampal CA1 neurons, but not impairment of hippocampal long-term potentiation following global ischemia[J]. Neuroscience, 1999, 93(4): 1219-1222.

(编辑 王 红)