基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1794-04

注射 YVAD-CHO 后癫痫大鼠海马组织细胞形态及 Caspase-3表达的改变

陈 博,谢延风,唐文渊,石全红,詹 彦
(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨癫痫大鼠单侧海马注射 Caspase-3抑制剂 YVAD-CHO 后海马组织形态及 Caspase-3表达的改变。方法:将 YVAD-CHO 注射入癫痫大鼠模型单侧海马,HE 染色观察组织形态学变化, 免疫组化法观察 Caspase-3蛋白的表达及相应的改变。结果:HE 染色显示,干预组 1 大鼠海马安蒙角(Cornu ammonis,CA)1-CA3 区神经细胞胞质浓染,核固缩等改变,与模型组比较明显减少;免疫组化显示干预组 1 海马区 Caspase-3蛋白的表达较模型组明显减少。结论:YVAD-CHO 可在体内抑制大鼠海马神经元凋亡。

【关键词】癫痫;组织形态;凋亡;Caspase-3
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-23

Changes of super microstructure of hippocampus and expressions of Caspase-3 in epileptic rats after injection of YVAD-CHO

CHEN Bo, et al
(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of super microstructure of hippocampus and expression of Caspase-3 in epileptic rats after injection of YVAD-CHO. *Methods*: YVAD-CHO was injected into unilateral hippocampus of rats in intervention group 1. The changes of super microstructure were studied by HE staining. The changes of expressions of Caspase-3 protein were studied by immunohistochemistry method. *Results*: HE staining indicated

作者介绍:陈 博(1979-),男,硕士,
研究方向:癫痫外科。
通讯作者:谢延风,男,教授,E-mail:3058@163.com。

导细胞,利用 MTT 结果选择最佳的用药浓度。各用药组细胞在倒置显微镜下观察,随着用药浓度的增加,膀胱癌细胞出现明显的凋亡。RT-PCR 检测结果显示,随着用药浓度的增加,caspase-3 mRNA 表达上调,而 survivin mRNA 表达下调;免疫印迹检测结果显示, 随着杨梅素浓度升高 caspase-3 蛋白表达显著增高,survivin 蛋白表达显著下降,且呈一定的剂量依赖性。这一结果提示杨梅素能明显诱导 BIU-87 膀胱癌细胞凋亡,其凋亡机制与 caspase-3 和 survivin 这对基因具有显著的相关性,但其明确机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Jung S K, Lee K W, Byun S, et al. Myricetin inhibits UVB-induced angiogenesis by regulating PI-3 kinase in vivo[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(5): 911-917.

[2] Ko C H, Shen S C, Hsu C S, et al. Mitochondrial dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochromec, and caspase cascade[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(6): 913.

[3] Ko C H, Shen S C, Lee T J, et al. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity incolorectal carcinoma cells[J]. Molecular cancer therapeutics, 2005, 4(2): 281.

[4] Mountzios G, Bamias A, Dalianis A, et al. Endocardial metastases as the only site of relapse in a patient with bladder carcinoma: a case report and review of the literature[J]. Int J Cardiol, 2010, 140(1): 4-7.

[5] Mitza A, McGuirk M, Hockenberry T N, et al. Human survivin is negatively regulated by wild type p53 and participates in p53 depend apoptotic pathway[J]. Oncogene, 2002, 21(17): 2613-2622.

[6] Daniel J C, Smythe W R. The role of Bcl-2 family members in non-small cell lung cancer[J]. Semin Thorac Cardiovase Surg, 2004, 16(1): 19-27.

[7] Sun L M, Huang H Y, Huang E Y, et al. A prospective study to assess the bladder distension effects on dosimetry in intracavitary brachytherapy of cervical cancer via computed tomography-assisted techniques[J]. Radiother Oncol, 2005, 77(1): 77-82.

[8] Shin S, Sung B J, Cho Y S, et al. An anti-apoptotic protein human surviving is a direct inhibitor of caspase-3 and 7[J]. Biochem, 2001, 40(4): 1117-1123.

(责任编辑:关蕴良)

that hippocampal neurons in CA1-CA3 regions changed in rats of intervention group 1, with nerve cell cytoplasm stained thick and condense chromation in nucleus, which reduced significantly compared with mode 1 group. Immunohistochemistry indicated that the expressions of Caspase-3 protein in hippocampus highly decreased in intervention group 1 in contrast to mode 1 group. *Conclusion*: YVAD-CHO can reduce apoptosis of rat's hippocampal neurons in vivo.

【Key words】Epilepsy; Morphometrics; Apoptosis; Caspase-3

癫痫持续状态(Status epilepticus, SE)可导致的神经元凋亡,Caspase-3参与的蛋白酶级联切割途径是细胞凋亡反应的必经之路,也是凋亡的关键酶和执行者。痫性神经元损伤过程中染色体 DNA 的阶段性降解主要是由 Caspase-3介导的,在细胞凋亡中 Caspase-3被激活的频率最高[1]。海人酸诱导大鼠 SE 后脑组织有相当数量的神经细胞发生凋亡。本实验研究应用特异性 Caspase-3抑制剂 YVAD-CHO 干预神经细胞凋亡过程,以观察海马组织形态及 Caspase-3 蛋白表达的变化。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级成年雄性 Wistar 大鼠(重庆医科大学实验动物研究中心提供)32 只,体重 180~220 g。随机分为 4 组,每组 8 只;A 组:对照组,B 组:模型组,C 组:干预组 1(YVAD-CHO 干预组),D 组:干预组 2(DMSO 注射组)。在癫痫后每个实验组检测 6 h、1 d、3、5、7 d 共 5 个时间点。

1.2 模型制备

癫痫模型的建立:参照既往研究,模型组及干预组大鼠均采用腹腔注射 KA(15 mg/kg)[2],对照组大鼠注射等体积等渗盐水。干预模型的建立:于癫痫发作后 6 h、1 d、3、5、7 d 后,用 10%水合氯醛 380 mg/kg 腹腔注射麻醉各组大鼠后,将其固定于脑立体定向仪上,头顶部正中切口暴露前囟,参照大鼠脑立体定位图谱,以前囟为原点,向后 3.5 mm,旁开 2.0 mm 为穿刺点,钻孔穿颅,自脑表面进针 3.0 mm 至海马,用微量注射器将 YVAD-CHO 各 1 μl (5 μg) 在 10 min 内缓慢注入,留针 5 min,以使 YVAD-CHO 充分浸润局部组织,同法给干预组 2 大鼠注射等量 YVAD-CHO 的溶剂 DMSO,对照组注射等量的生理盐水。退针后,缝合切口,常规饲养。

1.3 行为观察与分级

痫性发作分级参照 Racine[3]分级标准,依据发作程度分为 6 级。0 级:无惊厥;Ⅰ级:湿狗样抖动,面肌抽搐,抖动;Ⅱ级:面部阵挛伴节律性点头;Ⅲ级:面部阵挛伴节律性点头、前肢阵挛;Ⅳ级:前肢阵挛、后肢站立;Ⅴ级:失平衡、跌倒、四肢抽动、全身阵挛。选取Ⅳ~Ⅴ级大鼠作为实验对象。

1.4 脑片制作

于设定时间点内,对麻醉大鼠进行心脏灌注,生理盐水冲洗清亮后,用多聚甲醛灌注。取冠状海马厚片固定,石蜡包埋。制片厚 5 μm。

1.5 HE 染色

常规 HE 染色,光学显微镜下观察各时间点海马区细胞形态变化并照相。

1.6 免疫组化染色法检测 Caspase-3 的表达

兔抗鼠多克隆抗体 Caspase-3购自美国 Santa Cruz 公司,兔 SP kit 免疫组化试剂盒,购自北京中山工程有限公司,参照使用说明书进行。切片常规脱蜡,3%过氧化氢孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,将切片浸入 0.01 mmol/L (pH6.0)枸橼酸盐缓冲液,微波炉加热至沸腾后断电,冷却后 PBS 洗涤 1、2 次,滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 20 min,甩去多余液体,加入用抗原稀释液稀释的 Caspase-3抗体(1:150),4℃过夜,PBS 冲洗 3 次每次 3 min,滴加生物素标记羊抗兔 IgG,37℃温育 15 min,PBS 冲洗 3 次每次 3 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃温育 10~15 min,PBS 冲洗 3 次每次 3 min,DAB 室温显色,镜下控制反应时间,Mayor 氏苏木素复染 20 s,自来水洗涤,常规脱水透明、封片、镜检。

1.7 统计学分析

Caspase-3阳性反应为黄色成棕褐色,定位于胞浆,亦可见于胞膜和胞核。染色不着色为阴性,显示淡黄色为弱阳性,棕褐色为强阳性。随机选取 10 个高倍镜视野,分别计数阳性细胞数和总细胞数,并计算 Caspase-3蛋白表达阳性率。用美国产 Image-proplus 图像处理与分析系统进行光密度分析。测量时,在每张切片的海马安蒙角(Cornu ammonis, CA)1区和 CA3 区各取 3 个视野,测定细胞总数和阳性细胞数,计算平均值。结果以均值±标准差表示,结果用 SPSS13.0 统计软件分析,采取两样本均数间 t 检验进行统计。$P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学表现

模型组海人酸注射后 30 min 内出现单个的痫样抽搐(表现为点头及面肌抽搐),间隔 10~15 min,出现典型的 SE。干预组 1 大鼠出现 SE 的潜伏期平均为(80±10) min,惊厥分级平均为Ⅱ~Ⅲ级;模型组大鼠的潜伏期为(40±15) min,惊厥分级达到Ⅳ~Ⅴ级。对照组和干预组 2 无抽搐及异常肢体动作。

2.2 组织形态学(HE 染色)

模型组大鼠海马 CA1、CA3 区神经元数量较对照组明

显减少主要表现为较多的细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩,整个细胞深染,此种表现随时间推移表现愈加明显。而干预组 1 大鼠海马 CA1、CA3 区细胞形态的改变,与同时间段模型组比较明显减少(见图 1、图 2)。

2.3　免疫组化染色法检测 Caspase-3 的表达

模型组大鼠海马有散在分布的阳性细胞,染色较浅,随时间的推移,阳性细胞不断增加,染色加深,干预组 1 大鼠海 Caspase-3的表达均较同时间点模型组程度轻(见图 3、图 4)。

2.4　2 组大鼠海马组织 Caspase-3 表达比较

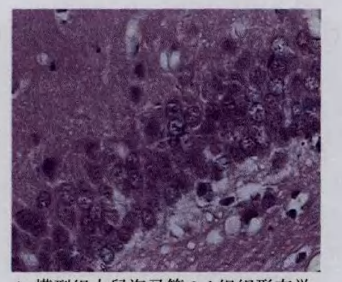
详见表 1。

2.5　阴性对照

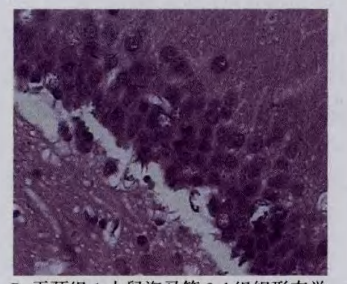
对照组在相应时间点进行检查未发现明显细胞胞体缩小,胞浆浓缩,核固缩及 Caspase-3表达。干预组 2 未发现对细胞形态改变及 Caspase-3表达有明显的影响。

3　讨　论

海人酸点燃模型是颞叶癫痫动物实验研究中应用最为广泛的模型之一,安全性高,易于控制,操作简单,其病理改变同人类海马硬化极其一致[4],具有长期的癫痫敏感性[5]。本

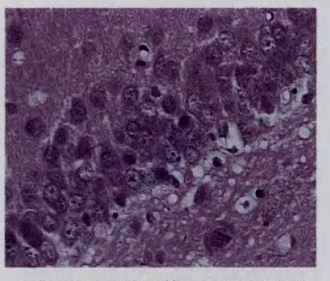


A. 模型组大鼠海马第 3 d 组织形态学

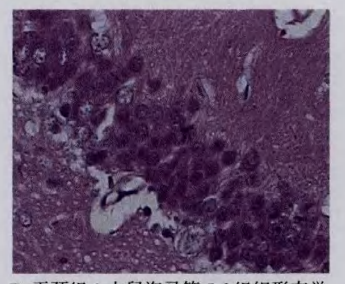


B. 干预组 1 大鼠海马第 3 d 组织形态学

图 1　模型组与干预组 1 大鼠海马第 3 d 组织形态学特点(HE 染色 × 200)

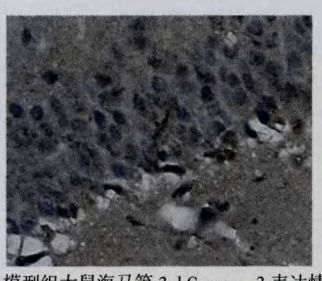


A. 模型组大鼠海马第 5 d 组织形态学

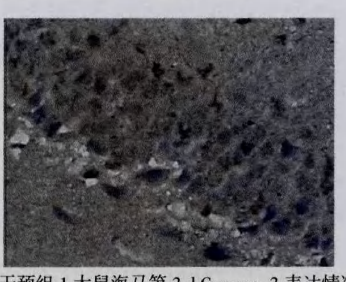


B. 干预组 1 大鼠海马第 5 d 组织形态学

图 2　模型组与干预组 1大鼠海马第 5 d 组织形态学特点(HE 染色 × 200)

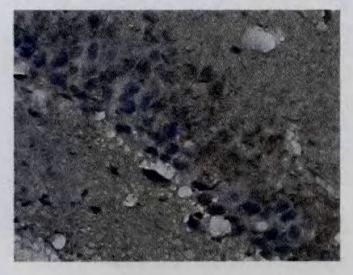


A. 模型组大鼠海马第 3 d Caspase-3 表达情况

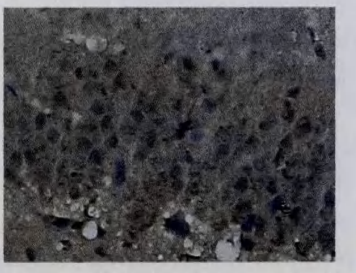


B. 干预组 1 大鼠海马第 3 d Caspase-3 表达情况

图 3　模型组大鼠与干预组 1 大鼠海马区第 3 d Caspase-3 表达(免疫组化染色 × 200)



A. 模型组大鼠海马第 5 d Caspase-3 表达情况



B. 干预组 1 大鼠海马第 5 d Caspase-3 表达情况

图 4　模型组大鼠与干预组 1 大鼠海马区第 5 d Caspase-3 表达(免疫组化染色 × 200)

表 1 大鼠海马组织 Caspase-3 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3 表达阳性率(%)	Caspase-3 蛋白反应光密度	
		CA1	CA3
模型组	40.25 ± 4.25	0.31 ± 0.034	0.18 ± 0.038
干预组 1	2.63 ± 1.34	0.07 ± 0.034	0.06 ± 0.025

注:$P<0.01$

实验采用的动物模型是海人酸腹腔注射所诱发的急性化学点燃模型,与脑内注射药物或电点燃相比,可以避免人为脑部创伤所致的病理变化,有利于神经化学和组织形态学方面的研究,与人类全身惊厥性癫痫持续状态的病理变化具有相似性[2]。

本实验研究发现,海马 CA1 区和 CA3 区细胞形态学的改变在 6 h 后开始出现,相应时间段内的 Caspase-3表达逐渐增强,至 1、3、5、7 d,Caspase-3仍持续高水平表达。同时还观察到,1 次诱发成功的癫痫发作,在 8 h 内其行为改变可以完全停止,但是脑区的神经病理改变仍在进行。结果显示模型组大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经细胞凋亡及 Caspase-3蛋白表达细胞数明显增多,神经元凋亡的发生与 Caspase-3的高表达密切相关,提示 Caspase-3在癫痫后海马神经元凋亡过程中起重要作用,与 Lee 等[6]报道相一致。海马神经元 Caspase-3的高水平表达,持续时间较长,早期为癫痫发作引起的急性神经元损伤所致,后期与迟发性神经元死亡有关[7]。

首次建立 Caspase-3特异性抑制剂 YVAD-CHO 干预模型,通过对模型组与干预组 1 同组大鼠海马 CA1、CA3 区细胞形态进行比较,发现随时间的推移所表现的细胞破坏也是逐步加重的,但组间比较早期干预对细胞正常形态的保护非常明显。可以认为细胞形态的破坏、海马神经元的缺失,是癫痫存在的病理基础。干预组 1 较模型组 CA1、CA3 区神经细胞形态学改变减少,Caspase-3蛋白表达减弱,阳性细胞数量明显低于模型组,说明 YVAD-CHO 对 KA 致痫大鼠海马神经细胞凋亡和 Caspase-3 蛋白表达有抑制作用,减缓了梯度级联反应的速度与强度,具有一定的脑保护作用。Caspase-3 介导细胞凋亡是严格按程序化进行的,直接破坏细胞结构导致细胞凋亡,这种细胞死亡途径的激活不是"全或无"的现象,而是死亡效应因子逐渐放大的过程[8]。通过观察发现只要干预措施足够早,可以阻止神经凋亡,促进神经症状改善。其机制可能与抑制神经元的凋亡,增加内源性腺体分泌,产生抗氧化、抗兴奋性氨基酸毒性的作用,及诱导内源性保护因子形成有关。通过复习文献及实验观察,癫痫的发生尤其是与海马 CA1、CA3 区病变密切相关的,是互为因果,互相促进,逐步加重的过程,癫痫的发生可以促使海马硬化及进一步脑组织损伤,而海马硬化及脑损伤进一步促使癫痫的发生,最终造成癫痫的难治性,复杂性。Caspase-3在脑组织中或许存在着相当数量的作用底物,这些底物的共同作用可能在癫痫的发生、发展中起重要的作用。相信通过对凋亡机制和细节更加深入的研究,人为地调控、抑制癫痫发作后神经元凋亡的发生,对减轻癫痫发作所致的神经损害,保护脑功能具有重要意义。而对于细胞凋亡的核心蛋白酶 Caspase-3 表达的抑制,则对易损脑区海马 CA1 区和 CA3 区的保护具有重要意义。通过实验未发现 YVAD-CHO 的溶剂 DMSO 对细胞形态的破坏与 Caspase-3表达有明显的抑制作用,另有文献证实 DMSO 有一定的脑保护作用[9],也可能是干预组 2 在相应时间点进行检查未发现明显细胞形态改变及 Caspase-3 表达增加的原因。

本实验证明 YVAD-CHO 对 KA 致痫大鼠具有一定的脑保护作用,从而为临床治疗难治性癫痫提供了新思路。随着相关研究的不断深入,明确不同部位 Caspase-3不同程度表达的意义及 YVAD-CHO 给药途径,加深对癫痫的认识,更好的指导临床。

参 考 文 献

[1] Kondratyev A,Gale K. Latency to onsetof status epilepticus deter-minesmolecularmechanisms of seizure-induced cell death[J].Brain Res Mol Brain Res,2004,121(1): 86-94.

[2] 孙建英,关新华,张秀清,等.2 种给药途径致痫大鼠海马神经元超微结构损伤及 Caspase-3 的表达特征[J].神经解剖学杂志,2007,23(6):565-570.

[3] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation-cortical areas[J].Electroencephalogr Clin Neurophysio,1975,38(1):1-12.

[4] McLaughlin B.The kinder side of killer proteases:Caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodeling[J].Apoptosis,2004,9(2):111-121.

[5] Grutter M G.Caspase:keyplayers in programmed cell death[J].Current opinion strutur biology,2000,10(6):649-655.

[6] Lee D,Long S A,Murray J H,et al.Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspase-3 and 7[J].J Med Chem,2001,44(12):2015-2019.

[7] 卢 峰,杨朋范,丁 鑫,等.颞叶内侧癫海马 CA1 区 CytC、Caspase-9、caspase-3 蛋白的表达研究[J].中国微侵袭神经外科杂志,2009,14(11):504-506.

[8] Henshall D C,Chen J,Simon R P.Involvement of caspase-3 like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures[J]. Neu-rochem,2000,74(3):1215-1223.

[9] 李建峰,王树凯,周 辉,等.二甲基亚砜对大鼠颅脑损伤后 Survivin 基因表达的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2008,11(4):56-57.

(责任编辑:冉明会)