DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.008
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1245-03

论著

Caspase-3在缺血再灌注大鼠脑海马神经元凋亡中作用的实验研究

尹昌林,熊健琼,文 亮 (第三军医大学西南医院急救部,重庆 400038)

提 要:目的 探讨一种在天冬氨酸残基后进行裂解的半胱氨酸蛋白酶caspase-3(cystein protease cleaving after an asp residue, caspase-3);在全脑缺血20 min再灌注大鼠脑海马神经元凋亡中的作用。方法 雄性Wistar大鼠182只,体质量(220±20)g,分为对照组(14只)、缺血组(84只)和Ac-DEVD-CHO治疗组(84只),后两组设立8、24、48、72、120、168 h 6个时相点。按Pulsinelli等的方法制作大鼠全脑缺血20 min再灌注模型,别于再灌注后上述6个时相点处死取海马组织,对照组施行麻醉及手术,但不缺血,观察72 h后活杀取海马组织,分别测定海马组织胞质(S-100)中caspase-3活性及海马区神经元凋亡情况,分析caspase-3活性与海马区神经元凋亡的关系。结果 ①海马组织胞质中caspase-3活性在对照组中为0,缺血再灌注后酶活性随时间的推移逐渐升高,至120 h达最高点,168 h则有所下降;Ac-DEVD-CHO治疗后并不能完全抑制酶的活性,但显著降低了各时相点酶的活性(8 h $P>0.05$, 24~120 h $P<0.01$, 168 h $P<0.05$);②对照组海马中偶见凋亡细胞,缺血再灌注8 h凋亡细胞无明显增加($P>0.05$),24 h凋亡细胞明显增加,120 h达峰值,168 h有所减少,但24~168 h各时相点凋亡细胞数均明显多于对照组(P均<0.01);Ac-DEVD-CHO治疗后并不能完全阻止凋亡细胞的增加,但与相应时相点缺血组比较,除8 h外,显著降低了凋亡细胞的升高程度(P均<0.01)。凋亡细胞主要分布在CA1区,CA2、CA3区于48 h后亦可见凋亡细胞,但数量明显少于CA1区,齿状回区仅偶见凋亡细胞;③分别以缺血组、治疗组各时相点S-100中caspase-3活性与海马区神经元凋亡数行直线相关分析,结果二者的变化呈显著正相关(r分别为0.9356及0.9800)。结论 caspase-3在缺血再灌注大鼠脑海马神经元凋亡中起着重要作用,Caspase-3的激活是引起海马神经元凋亡的主要因素之一。

关键词:caspase-3;脑缺血再灌注;凋亡
中图法分类号:R557.9;R329.25;R743.32 文献标识码:A

Roles of caspase-3 in neuron apoptosis following cerebral ischemia/reperfusion in the hippocampus of rats

YIN Chang-lin, XIONG Jian-qiong, WEN Liang (Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the roles of Caspase-3 in neuron apoptosis following cerebral ischemia/reperfusion in the rat hippocampus. **Methods** A model of rats with global ischemia induced by occlusion of the four vessels according to the method by Pulsinelli *et al* was used in this study. A total of 182 Wistar rats [(220±20) g] were divided randomly into three groups: control group ($n=14$), cerebral ischemia group ($n=84$), and cerebral ischemia group treated with acetyl-asp-glu-val-asp-aldehyde (Ac-DEVD-CHO, $n=84$). Time points for observation included 8, 24, 48, 72, 120, and 168 h in the latter two groups. Caspase-3 activity in cytosolic extracts (S-100) of hippocampus and apoptotic neurons in hippocampus following cerebral ischemia/reperfusion were observed at the above-mentioned time points, respectively. **Results** (1) No caspase-3 activity was detected in S-100 from the control group. In S-100 from the ischemia group, weak caspase-3 activity was detected at 8 h, but it increased gradually and peaked at 120 h, and then decreased apparently at 168 h after reperfusion. After treatment with Ac-DEVD-CHO following cerebral ischemia/reperfusion, caspase-3 activity was inhibited to some extent at each time point. (2) Apoptotic cells were occasionally observed in hippocampus in the control group, but the apoptotic cells increased apparently at 24 h, peaked at 120 h, and decreased a few at 168 h after reperfusion in ischemia group. After treatment with Ac-DEVD-CHO following cerebral ischemia/reperfusion, apoptosis decreased to some extent at each time point (except 8 h following cerebral ischemia/reperfusion). (3) Caspase-3 activity in S-100 from hippocampus was

作者简介:尹昌林(1970-),男,四川省彭州市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事心肺脑复苏、创伤后并发症及防治方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)65310592
收稿日期:2003-10-24;修回日期:2003-12-27
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

positively correlated with apoptotic neurons in hippocampus following cerebral ischemia/reperfusion at each time point (r= 0.9356 in ischemia group, r= 0.980 0 in treatment group). **Conclusion** Caspase-3 may be one of the key causes resulting in neuron apoptosis in rat hippocampus after cerebral ischemia/reperfusion. It may play an important role in ischemia-reperfusion brain injury.

Key words: caspase-3; cerebral ischemia/reperfusion; apoptosis

全脑缺血后神经元损伤的机制及其防治的研究对提高心肺复苏后脑复苏的成功率具有十分重要的意义。自Goto[1]首先报道脑缺血可导致神经元凋亡以来,对其发生机制及防治的研究受到越来越多的重视。本实验采用Pulsinelli全脑缺血大鼠模型[2],通过检测脑海马组织胞质(S-100)中(cystei protease cleaving after an asp residue, caspase-3)活性及海马区神经元凋亡情况,探讨全脑缺血再灌注后脑海马神经元调亡与caspase-3的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性Wistar大鼠182只,体质量(220±20) g(第三军医大学实验动物中心提供);乙酰天冬氨酰谷氨酰缬氨酰天冬氨酸乙醛(Acetyl-asp-glu-val-asp-aldehyde, AC-DEVD-CHO)、乙酰天冬氨酰谷氨酰缬氨酰天冬氨酸氨甲基香豆素(Acetyl-asp-glu-val-asp-7-amide-4-methyl-coumarin, AC-DEVD-AMC)、氨甲基香豆素(Aminomethylcoumarin, AMC)、Hoechst 33342,均由美国Sigma公司提供;脑立体定位仪(西安WA-D型),低温超速离心机(日本日立55P-73型),荧光显微镜(日本Olympus BX60型),荧光分光光度计(日本MPF-4型),恒温冰冻切片机(美国S-600型)。

1.2 动物模型的复制

大鼠分为对照组(14只)、缺血组(84只)和Ac-DEVD-CHO治疗组(84只),后两组设立8、24、48、72、120、168 h共6个时相点,每个时相点14只动物。各组处理如下:①缺血组:以改良Pulsinelli法进行。动物术前禁食12 h,麻醉后(10%乌拉坦700 mg/kg腹腔注射),分离双侧颈总动脉,穿线备用。然后动物卧位固定,沿正中剪开枕后第2颈椎皮肤,分离、暴露第1颈椎翼孔,沿翼孔烧灼双侧翼孔下行走的椎动脉,阻断血供。次日动物清醒后以动脉夹夹闭双侧颈总动脉,造成全脑缺血,缺血20 min后松开双侧动脉夹,形成再灌注期。实验过程动物肛温维持于37~38 ℃。模型成功标准:缺血后1 min内动物对外界刺激失去反应,眼球、耳廓苍白,呼吸频率变快,翻正反射消失。不符合上述标准或出现偏瘫者不列入实验动物总数。②治疗组:动物在烧灼椎动脉后,按照Bures图谱于侧脑室(A1.5, L1.5, H3.0)埋置不锈钢导管一个(外径0.6 mm),用牙托粉固定,动物肌注青霉素钠(2万U/只)。在缺血后5 min、1、2 d于侧脑室内注射AC-DEVD-CHO 80 ng/5 μl。③假手术对照组:模型制作除不夹闭颈总动脉和烧灼椎动脉外,余同缺血组,侧脑室埋管,注入等量生理盐水。

缺血组和治疗组于各时相点处死取海马组织,对照组观察72 h后处死取海马组织备用。

1.3 脑海马组织胞质提取物(S-100)的制取及caspase-3活性测定

1.3.1 脑海马组织S-100的制取 参照Yang等[3]的方法进行。制备的S-100置液氮中保存备用。标本蛋白定量以Lowry法进行。

1.3.2 脑海马组织S-100中caspase-3活性测定 参照Hampton等[4]的方法略加改动进行。S-100 0.5 ml加入配有底物Ac-DEVD-AMC的工作液[100 mmol/L Hepes, pH 7.25, 10%蔗糖, 5 mmol/L DTT, 10^{-6}%NP-40, 0.1% CHAPS] 2.5 ml中,Ac-DEVD-AMC在反应体系中终浓度50 μmol/L,37 ℃孵育30 min后,在荧光光度计上测定A值。λexcitation 355 nm, λemission 460 nm;另用工作液配制不同浓度的AMC,测定其荧光A值,制作标准曲线,用所测得的A值从标准曲线上求取相应的AMC值,以单位质量(mg)标本于单位时间(min)内裂解产生的AMC量(pmol/L)表示标本中caspase-3活性。

1.4 海马组织凋亡的观察

参照姜泊等[5]的方法进行,达成功标准的各时相点动物脑组织灌注固定后冷冻切片,5 μg/ml的Hoechst 33342染色10~15 min,洗片、封片后荧光显微镜下于WU档(330~350 nm)观察海马细胞凋亡情况。10×40视野下,每张切片随机取5个视野,计数每个视野中凋亡细胞数,以5个视野的均值做为结果。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS10.0软件进行双因素方差分析,对caspase-3活性与海马区神经元凋亡的关系进行相关性分析。

2 结果

2.1 海马组织S-100中caspase-3活性的变化

以荧光分光光度法测定的caspase-3活性表明,对照组中酶活性为0,缺血再灌注后酶活性随时间的推移逐渐升高,至120 h达最高点,168 h则有所下降;Ac-DEVD-CHO治疗后并不能完全抑制酶的活性,但显著降低了8 h以后各时相点酶的活性(表1)。

表1 脑缺血再灌注后海马组织S-100中caspase-3活性的变化(AMC: pmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of Caspase-3 activity in cytosolic extracts (S-100) from hippocampus following cerebral ischemia/reperfusion (AMC: pmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time after cerebral ischemia/reperfusion (h)					
	8	24	48	72	120	168
Ischemia	1.02±0.09	3.08±0.06	4.98±0.16	9.98±0.91	11.31±3.07	5.60±2.18
Treatment	1.46±0.64	2.20±0.54△	2.87±1.26△	4.14±0.34△	6.17±0.82△	3.12±0.26△△

F=406.302, P<0.001, △: P<0.05, △△: P<0.01, *vs* ischemia

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　脑海马细胞凋亡情况的观察

应用 Hoechst 33 342 染色原位观察海马细胞核凋亡表现。正常细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光, 核膜及核内容物显示清楚。发生细胞凋亡时, 细胞核可见浓缩致密的块状荧光, 有的则不见核的形态, 在胞质中出现边界清楚, 浓缩致密的颗粒状荧光小体(凋亡小体)。

对照组海马中偶见凋亡细胞, 缺血再灌注 8 h 凋亡细胞无明显增加($P>0.05$), 24 h 凋亡细胞明显增加, 120 h 达峰值, 168 h 有所减少, 但 24~168 h 各时相点凋亡细胞数均明显多于对照组(P 均<0.01); Ac-DEVD-CHO 治疗后并不能完全阻止凋亡细胞的增加, 但与相应时相点缺血组比较, 除 8 h 外, 显著降低了凋亡细胞的升高程度(P 均<0.01)。凋亡细胞主要分布在 CA1 区, CA2、CA3 于 48 h 后, 亦可见凋亡细胞, 但数量明显少于 CA1 区, 齿状回区则仅偶见凋亡细胞(表 2)。

表 2　脑缺血再灌注后海马凋亡细胞计数的变化(个/HP, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of apoptotic neuron in hippocampus following cerebral ischemia/reperfusion(cell/HP, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time after cerebral ischemia/reperfusion(h)					
	8	24	48	72	120	168
Control					1.2±0.4	
Ischemia	1.4±0.5	6.4±1.7*	11.8±1.3*	19.8±3.1*	31.2±5.9*	19.8±2.3*
Treatment	1.2±0.4	2.8±0.8*△	5.8±1.9*△	10.0±1.9*△	16.4±2.4*△	9.0±2.3*△

*: $P<0.01$, *vs* control; △: $P<0.01$, *vs* ischemia

2.3　caspase-3 活性与海马区神经元凋亡的关系

分别以缺血组、治疗组各时相点 S-100 中 caspase-3 活性与海马区神经元凋亡数行直线相关分析, 结果二者的变化呈显著正相关(r 分别为 0.935 6 及 0.980 0, $P<0.01$)。

3　讨论

自 Goto[1] 首先报道脑缺血可致神经元凋亡(apoptosis), 对其机制及防治的研究受到越来越多的重视。形态学观察是检测细胞凋亡的重要手段。Hoechst 33342 是一种嗜染色质的分子染料, 活体细胞胞核能主动摄取它。由于其具有穿透性好、灵敏度高、显示核形态清晰且因结合量少而不影响核实际形态等特点, 在凋亡的研究中已获广泛采用。本实验显示, 对照组海马组织中偶见凋亡细胞; 缺血再灌注 8 h 凋亡细胞无明显增加, 24 h 凋亡细胞明显增加, 120 h 达高峰, 168 h 有明显下降, 但仍显著高于对照组水平。凋亡细胞以 CA1 区最多, 与有关的报道一致[6]。

Caspase-3 是凋亡过程中最重要的一种 caspase, 在正常细胞中以酶原形式存在, 受凋亡刺激因素作用后激活, 引起细胞凋亡。在局灶脑缺血模型中发现缺血后有 caspase-3 mRNA 的表达升高, 而通过脑室内注射广谱的 caspase 及 caspase-3 抑制剂获得对缺血性脑损害的保护作用[7], 说明 caspase-3 的激活参与了缺血性脑损害。Caspase-3 被激活后可裂解其底物蛋白激酶 C δ、多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶, 使损伤 DNA 的修复不能进行; 活化的 caspase-3 可直接激活其它的 caspases (caspase-2, -8, -7, -6 等), 通过裂解 DNA 依赖的蛋白激酶、肌动蛋白、模板、甾醇调控的要素结合蛋白家族及异核核糖核苷蛋白家族, 使 DNA 的损伤不能正常修复, 引起核固缩, DNA 裂解, 凋亡小体形成。此外, 活化的 caspase-3 可直接诱导线粒体 PT[8], 加速 Bcl-2 降解, 加速线粒体功能障碍和 CytC 释放, 使凋亡信号不断放大, 涉及范围不断增加, 最终引起细胞凋亡[9, 10]。我们的实验证实, 全脑缺血再灌注后海马组织中出现了 caspase-3 的激活, 使用 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 后, 胞质提取物中 caspase-3 活性受到明显抑制, 细胞凋亡减少, 从而减轻了脑损害程度, 说明激活的 caspase-3 在脑缺血再灌注后的细胞凋亡发生中确实起着非常重要的作用, 与上述报道一致。

缺血引起神经元凋亡的具体机制尚未阐明。通过本实验的研究结合我们以前的工作, 发现脑缺血再灌注后 CytC 由线粒体到胞质的再分布, caspase-3 的激活, ROS 的产生, NGF 及其受体表达的变化以及凋亡相关蛋白 BCl-2s 的表达变化可能均参与了凋亡的发生。脑缺血再灌注后促凋亡因素作用增强、抑制凋亡因素作用减弱, 促使损伤信号在细胞内逐渐放大, 由局部波及整个细胞, 引起神经元凋亡。

参考文献:

[1] Goto K, Ishige A, Sekiguchi K, *et al*. Effect of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus[J]. Brain Res, 1990, 534(1—2): 299—302.

[2] Pulsinelli W, Brierley J. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 102(10): 267—272.

[3] Yang J, Liu X, Bhalla K, *et al*. Prevention of apoptosis by Bcl-2: cytochrome C from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303): 1129—1132.

[4] Hampton M B, Zhivotovsky B, Slater A F G, *et al*. Importance of the redox state of cytochrome C during Caspase activation in cytosolic extracts[J]. Biochem J, 1998, 329(Pt 1): 95—99.

[5] 姜　泊, 张亚历. 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 174—175.

[6] Moskowitz M A, Le D A, Whalen M J. Caspases and upstream mechanisms in central nervous system ischemic injury[J]. International Congress Series, 2003, (1252): 155—161.

[7] Reed J C. Apoptosis-based therapies[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 111—121.

[8] Ferri K F, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(4): E255—E263.

[9] Springer J E, Azbill R D, Nottingham S A, *et al*. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2000, (20): 7246—7251.

[10] Graham S H, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(2): 99—109.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net