DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.022
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
1172 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)13-1172-02

# 缺氧缺血新生鼠脑 caspase-3 活性的变化

张雨平,赵聪敏,刘 立,王丽雁,温恩懿,廖 伟 (第三军医大学附属新桥医院儿科,重庆 400037)

提 要:目的 了解缺氧缺血对新生鼠脑组织 caspase-3 活性的影响并探讨其意义。方法 7 d 龄 Wistar 大鼠分为假手术组、缺氧缺血脑损伤(HIBD)组。HIBD 组新生鼠行左颈总动脉结扎后,吸入氧氮混合气(氧浓度为 8%)1 L/min 持续 2 h。于 1、12、24、48 h 取脑组织在低温下进行匀浆,离心后取上清用四肽荧光底物法测定其荧光强度。结果 HIBD 后 1 h caspase-3 活性已升高,24 h 达高峰,48 h 明显下降。各时间点左侧脑组织荧光强度之间比较,差异有显著性;各时间点与假手术组比较,左侧脑组织荧光强度差异有显著性。结论 HIBD 新生鼠脑组织中 caspase-3 明显激活。可能为临床新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)脑损伤的重要原因。

关键词:脑缺血;脑缺氧;caspase-3;大鼠
中图法分类号:R345.79;R743.31 文献标识码:A

## Activity of caspase-3 in cerebral tissue of the neonatal hypoxic ischemic rat

ZHANG Yu-ping, ZHAO Cong-min, LIU Li, WANG Li-yan, WEN En-yi, LIAO Wei (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract**: Objective To study the effect of hypoxia-ischemia on caspase-3 activity in cerebral tissue of neonatal rats and its significance. Methods Wistar rats of 7 d were divided into sham operation group and HIBD (Hypoxic ischemic brain damage) group. In HIBD group, the left carotid artery of rats was ligated and animals were exposed to 8% oxygen for 2 h. At 1, 12, 24, and 48 h after HIBD, both ipsilateral and contralateral cerebral tissues were homogenized and centrifugated. Caspase-3 activity was measured by cleavage of the fluorescence substrate AC-DEVD-AMC. Results Caspase-3 activity in ipsilateral cerebral tissue increased gradually after HIBD and peaked at 24 h, and then decreased significantly at 48 h. Compared with that of the control, Caspase-3 activity significantly changed in the ipsilateral tissue at all time points. Conclusion The obviously activated caspase-3 in neonatal cerebral tissue in HIBD groups may be the important factor leading to hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) of the newborn.

**Key words**: cerebral hypoxia; cerebral ischemia; caspase-3; rats

新生儿缺氧缺血性脑病(Hypoxia-ischemia encephalopathy, HIE)是一种发病率、病死率、致残率均高的疾病,其复杂的发病机制导致神经系统不可逆损害,严重威胁新生儿健康。近年来发现,HIE 脑损伤中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,天冬半胱氨酸蛋白酶(Caspases)与细胞凋亡有密切关系。其中 caspase-3 被认为是细胞凋亡中最关键的效应蛋白酶。我们应用四肽荧光底物法测定新生鼠缺氧缺血脑损伤(Hypoxia-ischemia brain damge, HIBD)模型脑组织 caspase-3 活性,了解缺氧缺血对新生动物脑组织 caspase-3 活性的影响并探讨其意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HIBD 模型的制备:7 d 龄 Wistar 大鼠 25 只,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。实验动物随机分为假手术组、HIBD 后 1、12、24、48 h 组每组 5 只。HIBD 组新生鼠经乙醚吸入麻醉后作颈部正中切口,分离左侧劲总动脉并结扎,然后置于自制 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。缺氧过程中,将缺氧仓置于 37 ℃ 水浴中。缺氧后将新生鼠放回母鼠身边饲养。假手术组仅在乙醚麻醉后作颈部正中切口,分离出颈总动脉后即缝合伤口,不进行缺氧处理。

### 1.2 方法

1.2.1 脑组织取材及匀浆 分别于 HIBD 后 1、12、24、48 h(每组 5 只)以及假手术后 24 h 处死动物。以戊巴比妥钠 200 mg/kg 腹腔注射麻醉后,开胸剪开右心耳以预冷磷酸盐缓冲液经左心室灌注至流出液清亮为止。迅速取脑组织并在大脑中动脉供血区分别取左、右脑组织精确称重 100 mg,加 500 μl 预冷细胞裂解液(含 10 mmol/L Tris-Hcl, 10 mmol/L $NaH_2PO_4$/$Na_2HPO_4$, 130 mmol/L NaCl, 1% Triton-X-100, 10 mmol/L NaPPi)在冰上碾磨至不见组织块,继续冰上孵育 10 min。4 ℃离心 12 000 r/min 20 min。取上清液于 −20 ℃ 保存待测。

1.2.2 蛋白定量 用 Warburg Christian 法,各标本取 200 μl 稀释 7.5 倍后在紫外分光光度计 260 nm 和 280 nm 处进行比色。

作者简介:张雨平(1972— ),女,四川省雅安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事新生儿脑损伤干预方面的研究。电话:(023)68755602

收稿日期:2002-09-09;修回日期:2002-12-16

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

根据 Warburg Christian 公式：蛋白浓度(mg/ml)＝(1.55×$A_{280}$－0.757×$A_{260}$)×稀释倍数，计算出标本蛋白浓度。用稀释缓冲液将各样品蛋白浓度稀释为 10 mg/ml。

1.2.3　Caspase-3 活性测定　　采用四肽荧光底物法，取各标本 100 μl、Ac-DEVD-AMC 四肽荧光底物(购自深圳晶美公司)10 μl 加到 HEPES 缓冲液(20 mmol/L HEPES，10% 甘油，2 mmol/L DTT)至 1 ml，37 ℃孵育 1 h。应用美国柏金-埃尔默公司 LS-50B 荧光分光光度计在激发波长 380 nm，释放波长 460 nm 处测定其荧光强度。

### 1.3　统计学方法

采用 SPSS10.0 统计学软件，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。左右侧比较采用配对 $t$ 检验，同侧各时间点两两比较，根据方差齐性检验结果，采用独立样本 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　HIBD 后大鼠一般情况

在 HIBD 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。20 只新生鼠中有 10 只出现明显抽搐。缺氧处理后有 16 只出现自发性左旋或夹尾左旋。

### 2.2　脑大体改变

HIBD 后 1、12 h 脑组织未见异常，24、48 h 可见左侧脑组织肿胀，伴有现明显苍白和软化。

### 2.3　各时间点 caspase-3 活性变化

HIBD 后 1 h caspase-3 活性已升高，到 HIBD 后 24 h 达高峰，48 h 后又有明显下降，见表 1。其显著性检验如下：①HIBD 后各时间点之间比较左侧脑组织荧光强度差异有显著性($P<0.01$)；②HIBD 后各时间点与假手术组比较左侧脑组织荧光强度差异有显著性($P<0.05$)；③HIBD 后各时间点左侧和右侧比较荧光强度差异有显著性($P<0.05$)；④ HIBD 后 1、12、24、48 h 新生鼠与假手术组比较右侧脑组织荧光强度稍有增加，但差异无显著性。

表 1　新生鼠 **HIBD** 后各时间点左右两侧脑组织荧光强度比较($\bar{x}\pm s$)

**Tab1　Comparison of fluorescence intensity in ipsilateral and contralateral cerebral issues at different time points after HIBD($\bar{x}\pm s$)**

| Group | $n$ | Ipsilateral(left) | Contralateral(right) |
|---|---|---|---|
| 1 h after HIBD | 5 | 103.28±0.8980 **▲▲# | 80.07±6.4508 |
| 12 h after HIBD | 5 | 206.36±18.1665 **▲▲ | 86.59±13.8128 |
| 24 h after HIBD | 5 | 416.69±68.0384 **▲▲# | 76.36±6.6339 |
| 48 h after HIBD | 5 | 119.34±21.6297 *▲△ | 87.58±5.4131 |
| Control | 5 | 74.37±4.1638 | 72.63±4.8772 |

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；▲：$P<0.05$，▲▲：$P<0.01$ *vs* contralateral；#：$P<0.01$ *vs* 12 h after HIBD；△：$P<0.01$ *vs* 24 h after HIBD

## 3　讨论

Caspase 是细胞凋亡程序中一类关键的天冬半胱氨酸蛋白酶，特异性在天冬氨酸残基后裂解靶蛋白。它们瀑布式活化后降解其底物，使一系列细胞骨架蛋白及细胞修复酶等裂解，导致细胞凋亡。其作用底物主要是许多维持细胞内环境稳定的必需结构蛋白、代谢和修复蛋白[1]。其中 caspase-3 被认为是 caspase 级联反应中最关键的效应蛋白酶。Caspase-3 激活后酶解其特异性底物，使底物结构改变或影响特定的信号分子而参与细胞的凋亡过程。

近年来研究表明，HIE 脑损伤后脑细胞死亡不仅有坏死，也存在细胞凋亡，但以凋亡为主[1]。且证明 HIE 后早期即有脑细胞凋亡，2～3 d 达高峰，持续存在达 3 周[1,2]，损害以纹状体、皮质、海马 CA1 区为重。鉴于 caspase 与细胞凋亡的关系，有国外学者对新生鼠 HIE 模型进行了检测，发现 HIBD 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 HIBD 后 48 h 尚无明显增高[3]。我们应用四肽荧光底物法检测新生鼠 HIBD 后脑组织 caspase-3 活性，证实了在 HIBD 后患侧新生鼠脑组织中 caspase-3 活性从 HIBD 后 1 h 就高于假手术组，随后逐渐升高，到 24 h 达高峰，48 h 明显下降，结果与国外报道相符，在国内尚未见类似报道。而本实验中未结扎右侧颈总动脉，右侧脑组织仅有缺氧因素作用。其 caspase-3 活性仅有少量增高，无显著意义，说明单纯缺氧一因素对新生鼠脑 caspase-3 活性没有显著影响。

由于 caspase 与细胞凋亡的密切关系，近年来有国外学者将 caspase 四肽抑制物应用于成年鼠脑缺血模型，发现经脑室注射 caspase 抑制物可能阻止皮质、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[4,5]。这些研究为把 caspase 抑制剂应用于新生鼠 HIBD 提供了基础，旨在探索临床新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)早期干预的一条新的有效治疗途径。

## 参考文献：


[1] 孙桂莲．新生大鼠脑缺氧缺血后脑细胞凋亡的超微结构[J]．中华围产医学杂志，1999，2(1)：21－23

[2] Waters C M，Moser W，Walkinshaw G，*et al*. Death of neurons in the neonatal rodent and primate globus pallidus occurs by a mechanism of apoptosis [J]．Neuroscience，1994，63(3)：881－894

[3] Cheng Y，Deshmukh M，Dcosta A，*et al*. Caspase inhibitor affords neuroprotectionwith delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]．J Clin Invest，1998，101(9)：1992－1999.

[4] Endres M，Namura S，Shimizu S M，*et al*. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family [J]．J Cereb Blood Flow Metab，1998，18(3)：238－247.

[5] Hara H，Friedlander R M，Gagliardini V，*et al*. Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage[J]．Proc Natl Acad Sci U S A，1997，94(5)：2007－2012.


(编辑　郭建秀)

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