DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.016
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0033-03

论著

蛋白激酶C与培养神经元缺氧后caspase-3表达及细胞凋亡关系的研究

黄河清,陈康宁,邵淑琴 (第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨蛋白激酶C(PKC)对神经元缺氧凋亡的影响及作用机制。方法 建立体外培养Wistar胎鼠皮层神经元模型及培养神经元缺氧模型,用3种不同浓度的PKC催化亚基特异性抑制剂Calphostin C预孵育培养神经元后进行缺血处理,观察神经元下述指标的改变:神经元存活率、caspase-3(CPP32)和细胞凋亡的规律。结果 随着缺氧时间的延长和Calphostin C浓度的增加,培养神经元的存活数显著下降、caspase-3和TUNEL荧光染色阳性率及平均荧光强度均显著升高。结论 ①PKC和caspase-3均参与了缺氧神经元凋亡;②PKC抑制剂Calphostin C可加重缺氧神经元凋亡;且该作用是通过caspase-3信号转导途径实现的;③PKC的激活在缺氧神经元凋亡中起保护作用。

关键词:神经元;缺氧;凋亡;蛋白激酶C;caspase-3
中图法分类号:R741 文献标识码:A

Relationship of protein kinase C with caspase-3 expression and apoptosis of cultured rat neuron after hypoxia

HUANG He-qing, CHEN Kang-ning, SHAO Shu-qin (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third military medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between protein kinase C (PKC) and apoptosis of rat cultured rat neuron due to hypoxia. Methods Neurocortical neuron of fetal rat were cultivated under ischemic and hypoxic condition and 4 different concentrations of Calphostin C, an inhibitor against the catalytic subunit of PKC, were added into the culture media and cultured further for 2 h. The survival rate of neurons, the expression of caspase-3 and the process of apoptosis indicated by TUNEL reaction were observed. Results With the prolonging of hypoxic time and the increasing concentration of Calphostin C, the survival rate of neuron was decreased significantly, and the positive rate of fluorescence staining and the average fluorescent intensity of caspase-3 and TUNEL were significantly increased. Conclusion ①PKC and caspase-3 take part in the process of neuron apoptosis after hypoxia. ② Calphostin C can enhance the hypoxic neuron apoptosis through the signal transduction of caspase-3. ③ The activating of PKC can protect neuron against hypoxic condition.

Key words: neuron; hypoxia; apoptosis; protein kinase C; caspase-3

既往的大量研究证实蛋白激酶C(Protein kinase, PKC)的移位激活参与了局灶脑缺血的神经元凋亡[1,2],但PKC在此过程中的信号转导机制目前众说纷纭。是否通过caspase途径,国内外尚未见报道。本实验拟通过建立体外培养大鼠皮层神经元的模型及模拟体内缺氧环境,观察PKC特异性抑制剂Calphostin C对神经元凋亡、抗凋亡蛋白Bcl-2的表达的影响,以及观察Calphostin C是否参与了致凋亡的caspase信号转导级联反应,从而初步探讨缺血神经元凋亡中PKC的作用机制。

1 材料和方法

1.1 体外皮层神经元培养模型及培养神经元缺氧模型的建立

按Chow[3]的方法改良。取孕16~19 d的Wistar大鼠,在无菌条件下分离出双侧皮层,制成密度为5×10^5/ml的单细胞悬液,接种后加完全培养基常规培养。培养2 d时加入20 μmol/L阿糖胞苷,作用24 h后更换完全培养基,以后每3 d更换1/2培养基。完全培养基由90%的DMEM(高糖):F12(1:1)、10%胎牛血清、1.2 g/L的碳酸氢钠以及青霉素、链霉素各100 u/ml组成。

取培养10d的皮层神经元,分为对照组(继续原环境培养)和"缺血"组。用"缺血"培养基(低糖、无氧、无血清)置换"缺血"组神经元的完全培养基后移至恒温(37℃)密闭容器内,真空泵抽去空气,充入无氧混合气体(95%N_2、5%CO_2),使密闭容器内氧浓度<1%,继续培养1、6、12 h。同时按是否加Calphostin C及浓度分为0、50、100、200 nmol/l 4个组,均预孵育细胞2 h后进行缺氧实验。"缺血"培养基由DMEM(低糖):F12(1:1)、1.2 g/L的碳酸氢钠、青霉素和链霉素各100 u/ml、硫代硫酸钠1 mmol/L组成。

1.2 形态学观察

倒置相差显微镜分别观察各组神经元的形态变化,并在200倍下观察并计数9个相邻视野(每视野0.16 mm^2)的存活神经元数。

1.3 培养神经元的caspase-3和TUNEL双标记免疫荧光观察

取各处理组的培养皮层神经元4%多聚甲醛固定15 min,正常山羊血清封闭液室温20 min,羊抗caspase-3(p20活性片段)(SANTA CRUZ,1:1000)4℃过夜,(替代对照用正常兔血清代替

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670269)
作者简介:黄河清(1972—),女,重庆市人,硕士,医师,主要从事缺血性神经元损伤机制及防治方面的研究。电话:(023)68754000-73070
收稿日期:2000-04-13;修回日期:2000-09-26

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

一抗)，生物素化兔抗羊 IgG(中山公司 1∶50)，22 ℃ 1 h，抗生蛋白链霉素化 CY3(Sigma，1∶400)，漂洗并备用。取上述神经元，常规TUNEL(Boehringer mannheim gmbH)荧光染色(对照用 25 μl 标记溶液而非混合反应液)，缓冲甘油(pH8.0)封片。在荧光显微镜(OLYMPUS BX60)下随机观察并计数 9 个相邻视野(每视野 0.16 mm^2)的 caspase-3 和 TUNEL 免疫反应阳性和阴性神经元数，计算它们各自的免疫反应阳性神经元所占百分率以及双标记阳性神经元所占百分率；激光共聚焦显微镜照相并计算 caspase-3 和 TUNEL 的平均荧光强度。

1.4 统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 Office 2000 中的 Excel 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 皮层神经元的形态学、细胞存活数观察

分离培养的孕 Wistar 大鼠皮层神经元在培养 10 d 时，神经元胞体丰满，胞体周围有明显的折光性，立体感强，神经突起较长且互相联络成网。缺氧 1 h 时，部分胞体肿胀增大，少数神经元胞体出现空泡，随着细胞缺氧及时间的延长，细胞存活数逐渐减少，胞体变暗，神经元突起缩短。在每个时间段内，随着 Calphostin C 浓度的增加，存活细胞数明显减少，除了神经元胞体变暗、突起缩短外，可见存活细胞的胞体皱缩，突起明显缩短甚至消失。各组神经元存活数，见表 1。

表 1 缺氧及 **Calphostin C** 对培养皮层神经元存活数的影响($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 1 Effects of hypoxia and Calphotin C on the number of survival of cultured neurocortical neuron($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Time of anoxia (h)	Control	Calphostin C(nmol/L)		
		50	100	200
0	38.37±1.50	35.97±2.01	33.59±1.85 *	32.24±2.54 *
1	32.26±2.13△	31.29±2.17	26.36±1.49 *△	20.03±1.42 **#△
6	23.46±2.11△△	19.38±1.53△△※	14.85±1.82 *※	9.87±1.75 **#△△
12	15.51±1.56△△	10.85±100 *△△※※	9.17±0.91 **※	4.24±1.58 **#△△

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$ *vs* 100 nmol/L；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* 0 h；※：$P<0.05$，※※：$P<0.01$ *vs* neighbour group

2.2 caspase-3 及 TUNEL 免疫荧光双标记观察

在正常培养条件下仅见少数 caspase-3 阳性淡染细胞，且各 Calphostin C 组的表达阳性率分别为(29%、33%、36%、42%)，而缺氧各组 caspase-3 表达阳性率均为 100%。

caspase-3 表达的平均荧光强度随着缺氧时间的延长而逐渐增高(各时相点间有显著差异)；而在同一时相点中，随着 Calphostin C 浓度的升高，其平均荧光强度显著增加，见表 2。

在正常培养条件下仅 Calphostin C 200nmol/L 组有 4.61% 的 TUNEL/CPP32 双阳性细胞，随着缺氧时间的延长 TUNEL/CPP32 双标记阳性细胞数升高。100 nmol/L 和 200 nmol/L 组与相邻组比较均差异显著，见表 3。

TUNEL 表达的平均荧光强度各时相点间差异显著，且随着缺氧时间的延长而显著增加。而在同一时相点中，100 nmol/L 和 200 nmol/L 组与相邻组比较均显著升高，见表 4。

表 2 缺氧及 **Calphostin C** 对培养皮层神经元 **caspase-3** 表达的平均荧光强度影响($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 2 Effects of hypoxia and Calphostin C on the expression of caspase-3(average fluorescent intensity，$\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Time of anoxia (h)	Control	Calphosfin C(nmol/L)		
		50	100	200
0	33.39±1.38	41.99±1.31 *	55.23±1.72 ##	68.38±1.90 ##
1	71.28±2.15△△	94.04±3.47 *△△	115.92±3.99 ##	140.48±4.95 ##△△
6	114.29±1.96※※	129.70±1.85 *※※	146.86±5.12 ##※※	160.75±4.07 #※※
12	125.69±4.24※	131.64±5.10※	151.63±5.55 #△△	177.09±7.29 ##※

*：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* 100 nmol/L；△△：$P<0.01$ *vs* 0 h；※：$P<0.05$，※※：$P<0.01$ *vs* neighbour group

表 3 缺氧及 **Calphostin C** 对培养皮层神经元 **TUNEL** 和 **caspase-3** 双表达的阳性细胞数的影响($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 3 Effects of hypoxia and Calphostin on the number of TUNEL and caspase-3 positive cells of cultured neurocortical neuron($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Time of anoxia (h)	Control	Calphostin C(nmol/L)		
		50	100	200
0	0.00	0.00	0.00	0.75±0.07 *
1	1.13±0.04△△	1.15±0.02※※	1.41±0.04 #※※	1.87±0.03 #※※
6	1.97±0.05※※	2.07±0.09※※	2.14±0.03 *※※	3.56±0.10 #※※
12	3.05±0.12※※	4.88±0.23 *※※	2.15±0.09 #	1.34±0.08 #※※

*：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$ *vs* 50 nmol/L；△△：$P<0.01$ *vs* 0 h；※※：$P<0.01$ *vs* neighbour group

表 4 缺氧及 **Calphostin C** 对培养皮层神经元 **TUNEL** 表达阳性细胞平均荧光强度的影响($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 4 Effects of hypoxia and Calphostin on the average fluorescent intensity in TUNEL positive cells of cultured neurocortical neuron($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Time of anoxia (h)	Control	Calphostin C(nmol/L)		
		50	100	200
0	0.00	0.00	0.00	35.17±3.09 *
1	46.02±4.23△△	59.07±5.35 *△△	64.70±6.77 *	70.83±6.64 *△△
6	61.81±5.63※※	62.63±6.16△△	76.37±7.45 #※	90.96±8.68 #※※
12	110.25±10.72※※	121.39±11.97※※	130.44±13.35 **※※	142.34±13.56 *※※

*：$P<0.01$，**：$P<0.05$ *vs* control；#：$P<0.05$ *vs* 50 nmol/L group；△△：$P<0.01$ *vs* 0 h；※：$P<0.05$，※※：$P<0.01$ *vs* neighbour group

3 讨论

我们的实验证明 PKC 的活化在缺氧神经元损伤中具有保护作用。此结论与 Boris-Moller F 在 1998 年的报道和 Gottlieb 文章中的观点一致[4]，但也有一些实验结果与我们的结论相反[5]。存在这种矛盾的原因可能与以下因素有关：①PKC 在不同实验模型中表现出的作用与实验所用的细胞类型、致凋亡的因子或条件、细胞周期和细胞内信号通道有关；②PKC 抑制剂和激动剂的特异性也是一个重要影响因素[6]；③出现矛盾结果的一个重要的原因是不同研究方法的局限性，解决这个问题可以用具有 PKC 同工酶特异性的生化方法，同时结合免疫印迹技术[7]。

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

我们的实验发现：①随着缺氧时间的延长，caspase-3 活性显著增强，缺氧 6h 的 CPP32 的活性上升最明显，之后则速度减缓，这种变化规律与 Chen 等人的在体研究类似[8]。②TUNEL 染色的平均荧光强度变化与 CPP32 的呈正相关，所不同的是 TUNEL 平均荧光强度在缺氧 12 h 上升最快，故推测细胞凋亡过程中的 DNA 断裂可能与 CPP32 活性的某个阈值有关。③实验推测 PKC 和 caspase-3 之间可能存在某种活性调节关系，但具体的作用机制还需要进一步的深入探讨。

绝大部分的研究以及本实验分别从不同的角度和层次证明，caspase-3 活化是缺血神经元凋亡的关键环节，并且在迟发性神经元损伤中起重要作用[9]，已有一些实验发现用 caspase-3 抑制剂可明显延长脑缺血的治疗窗[10]，故开发可通过血脑屏障的、不可逆的 caspase-3 和 PKC 亚型抑制剂不仅能缩小梗塞体积、减轻缺血神经元损伤、减少副作用，还可明显延长脑缺血治疗窗。这对脑缺血发病机制和新的神经保护策略研究起着巨大的推动作用，为有效的神经保护治疗提供了新的途径。

参考文献：

[1] Wieloch T, Hu B R, Boris-Miller A, *et al*. Intracellular signal transduction in the postischemic brain[J]. Adv Neurol, 1996, 71: 371—388.

[2] Domaska-Janik K. Protein serine/threonine kinases (PKA, PKC and CaMKII) involved in ischemic brain pathology[J]. Acta Neurobiol Exp Warsz, 1996, 56(2): 579—585.

[3] Chow E, Haddad G. Differential effects of anoxia and glutamate on cultured neocortical neurons[J]. Exp Neurol, 1998, 150(1): 52—59.

[4] Reshef A, Sperling O, Zoref-Shani E. Opening of ATP-sensitive potassium channels by cromakalim confers tolerance against chemical ischemia in rat neuronal cultures[J]. Neurosci Lett, 1998, 250(2): 111—114.

[5] Pongracz J, Tiffley W, Johnson G D, *et al*. Changes in protein kinase C isoenzyme associated with apoptosis in U937 mylomonocytic cells[J]. Exp Cell Res, 1995, 218(2): 430—438.

[6] Wood J P, Osborne N N. Induction of apoptosis in cultured human retinal pigmented epithelial cells: the effect of protein kinase C activation and inhibition[J]. Neurochem Int, 1997, 31(2): 261—273.

[7] Genestier L, Bonnejoy B N, Rouahlt J P, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha up-regulates Bcl-2 expression and decreases calcium-dependent apoptosis in human B cell lines[J]. Int Immunol, 1995, 7(4): 533—540.

[8] Chen J, Nagayama T, Jin K, *et al*. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in hippocampus after transient cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 1998, 18(13): 4 914—4 928.

[9] Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, *et al*. Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Stroke, 1998, 29(7): 1 417—1 422.

[10] Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata 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.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2001)01-0035-01

经验与短篇

Kaneda 和 AF 器械的生物力学强度测试

Biomechanical testing on the Kaneda and the AF device

伦保国[1]，周 跃[1]，周军海[2]（第三军医大学：[1] 附属新桥医院骨科；[2] 力学中心；重庆 400038）

胸腰椎爆裂性骨折常常导致脊柱严重失稳和不同程度的神经损害，为使重建脊柱获得牢固的稳定性，提高植骨融合率，常需内固定治疗。本研究拟采用离体试验的方法，对 Kaneda 和 AF 两种器械的生物力学强度进行测试，旨在为临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验采用 9 具新鲜人尸体脊柱 T_{11}-L_5 节段标本，均取自急性颅脑损伤死亡者。仔细剔除除韧带和小关节囊外的所有软组织，T_{11} 和 L_5 椎体分别用自凝牙托粉包埋。Kaneda 和 AF 二种器械各 3 套，Kaneda 安装于椎体左侧。9 具标本随机分为 3 组，Kaneda、AF 各为一组，另设完整对照一组。除对照组外，其余标本分两步模拟脊柱损伤：①切除 L_2 椎体下半部及 $L_{2,3}$ 椎间盘，骨水泥块模拟植骨；②切除 L_2 椎体及 $L_{1,2}$、$L_{2,3}$ 椎间盘，模拟植骨。

1.2 实验方法

采用 WD-10E 电子万能试验机和特制加载系统。稳定性试验加载分为前屈、后伸、左右侧弯及左右轴向旋转 6 个方向。电阻应变式位移传感器借两臂固定于 L_1、L_3 椎体，测定两者间的相对扭转位移。最大弯矩 10 Nm，分别记录 2、4、6、8、10 Nm 时的位移。最大扭矩 8 Nm，分别记录 2、4、6、8 Nm 时的位移，加载稳定 15 s 后记录位移量。各组标本最后采用轴向压缩载荷行屈服强度试验，以压力“折弯点”代表结构的屈服强度。试验过程中，生理盐水保持标本湿润。

2 结果

首先将每个标本 2、4、6、8、10 Nm 载荷下的位移标准化，换算为单位载荷位移，可视各实验组样本含量 n(屈伸、侧弯)=3×5=15；n(轴旋)=3×4=12。数据采用 SPSS 8.0 软件进行统计学处理。屈服强度采用中位数(M)。

（下转 38 页）

作者简介：伦保国(1963—)，男，山西省长治市人，硕士，主治医师，主要从事脊柱创伤的外科治疗方面的研究。电话：(0351)4422972 转骨科

收稿日期：2000-01-11；修回日期：2000-06-07

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