

·论著·

HIBD 新生大鼠活性 Caspase - 3 表达的动态变化

旷寿金, 黑明燕, 殷萍

(中南大学湘雅三医院儿科, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 目的 了解缺血缺氧性脑损伤(HIBD)后24 h内脑组织活性Caspase - 3表达的动态变化。方法 7 d龄SD大鼠随机分为正常对照组和HIBD组,HIBD组分别观察到缺血缺氧后3 h,6 h,12 h,24 h。以免疫组化及Western Blot方法观察各组活性Caspase - 3的表达。结果 随时间推移缺血缺氧后24 h内活性Caspase - 3阳性染色由细胞质性转向细胞核性,活性Caspase - 3阳性染色细胞明显皱缩。HIBD组受损侧枕部皮质区活性Caspase - 3阳性细胞数于缺血缺氧3 h增多,6 h有所下降,12 h再次增多,并于24 h达高峰,均高于正常对照组($P < 0.05$ 或 0.01);海马回CA1区活性Caspase - 3阳性细胞数则随时间延长而增多,并于24 h达高峰,均高于正常对照组($P < 0.01$ 或 0.05)。Western Blot方法亦示HI后3 h开始损伤侧脑组织中出现Caspase - 3表达,6 h时表达减弱,12 h再次增高。结论 以活性Caspase - 3作为HIBD导致脑细胞凋亡的指标,可观察到HIBD后24 h内凋亡二次增多的动态变化现象,为掌握抗凋亡制剂治疗HIE的时机提供了一定的依据。

[中国当代儿科杂志,2003,5(4):331-334]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤;活性Caspase - 3;新生鼠

[中图分类号] R - 332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2003)04 - 0331 - 04

Expression of Cleaved Caspase - 3 in Neonatal Rats with Hypoxic - Ischemic Brain Damage

ShouJin KUANG, Ming-Yan HEI, Ping YIN. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: kuangshj@sohu.com)

Abstract: **Objective** To study the change of cleaved Caspase - 3 expression within 24 hs following hypoxia-ischemia brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** Seven-day-old rats were randomly assigned into control group and HIBD group. The Caspase - 3 expression was assayed by the immunohistochemical staining and Western Blot analysis at 3, 6, 12 and 24 hs after hypoxia-ischemia (HI). **Results** The positive staining of Caspase - 3 transferred from cytoplasm to the nuclei and the cells were apparently condensed and shrunk within 24 hs after HI. The number of the cleaved Caspase - 3 positive cells in the damaged cortex increased at 3 h, decreased at 6 h, increased again at 12 h and peaked at 24 h after HI, whereas the number in the damaged hippocampal CA1 region increased with time and peaked 24 hs after HI. The number of the Caspase - 3 positive cell both in the cortex and the hippocampal CA1 region of the HIBD group at 3 h, 6 h, 12 h and 24 h was greater than that of the control group ($P < 0.05$ or 0.01). Caspase - 3 expression was also found in the damaged brain tissue 3 hs after HI by Western blotting analysis. The intensity of the expression, decreasing at 6 h but increased again 12 hs after HI. **Conclusions** The character of brain cell apoptosis within 24 hs following HIBD, increase of apoptotic cells twice, may be found with Caspase - 3 as the marker for evaluating brain cell apoptosis in HIBD and it may be as reference for using anti-apoptotic agents in treatment of HIE.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(4):331-334]

Key words: Cleaved Caspase - 3; Hypoxic-ischemic brain damage; Neonatal rat

[收稿日期] 2002 - 12 - 07; [修回日期] 2003 - 04 - 06

[作者简介] 旷寿金(1963 -),男,硕士,副主任医师。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯作者] 旷寿金,湖南省长沙市桐梓坡路88号中南大学湘雅三医院儿科,邮编:410013。

凋亡是细胞自我调控的死亡模式。在脑的正常发育过程中,无功能的细胞通过凋亡的形式被清除。临床^[1]及动物实验^[2,3]均证明缺血缺氧性损伤可引发凋亡。形态学上,凋亡细胞的细胞质浓缩,细胞膜未破损,部分凋亡细胞中有凋亡小体的存在。凋亡的发生发展过程受一组 Caspase 的调控,其中 Caspase - 3 在脑组织中活性较高。当 Caspase - 3 被激活时,由 32 kDa 的四聚体分裂成一个小的主体和两个各 17 kDa 和 12 kDa 大小的亚单位^[4],即裂解下来的 Caspase - 3 亚单位的表达在一定程度上代表了 Caspase - 3 的激活状态,从而进一步说明了凋亡的程度。缺血缺氧性脑损伤(HIBD)可使 Caspase - 3 被激活^[4~6],但激活的 Caspase - 3 的表达与 HIBD 的时间相关性不十分清楚。本实验的目的是了解 HIBD 损伤后 24 h 内脑组织中活性 Caspase - 3 表达的动态变化。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作及分组

7 d 龄 SD 大鼠随机分为正常对照组($n = 3$)及 HIBD 组(再分为缺氧缺血后 3 h, 6 h, 12 h 和 24 h 组,免疫组化时各组 $n = 5$, Western Blot 时各组 $n = 3$)。HIBD 组动物予以右侧颈总动脉分离结扎后,再置 8 % O_2 低氧舱 2.5 h,温度控制在 $(34 \pm 0.1) ^\circ C$ 。

1.2 脑切片标本制备

Isoflurane 吸入麻醉下暴露心脏,经左心室升主动脉以 50 ml PBS 冲洗灌注后,以 50 ml 4 % 多聚甲醛固定灌注。再断头取脑组织置 4 % 多聚甲醛固定过夜($4 ^\circ C$),换置 30 % 蔗糖 - PBS 液中($4 ^\circ C$)脱水处理,待标本沉底后,以恒冷切片机切 $10 \mu m$ 脑片,风干待用。

1.3 活性 Caspase - 3 免疫组化染色

脑切片以 PBS 液及 3 % H_2O_2 处理后,以含 3 % BSA + 0.1 % Triton - X + 15 % NGS 的 PBS 液处理 1 h 以阻断内源性非特异性过氧化反应。一抗用兔抗小鼠 Caspase - 3 P17 抗体(Cell Signaling Technology)以 1 : 200 浓度置 $4 ^\circ C$ 孵育过夜。二抗采用生物素标记的羊抗兔 IgG (1 : 200,室温,1.5 h)。采用 Vector ABC Elite 试剂盒(Pharmingen) DAB 法显色。光镜下观察并摄片。每个切片在枕部皮质区和海马回 CA1 区均匀分散地选择 5 个高倍视野(400 倍)进行活性 Caspase - 3 阳性细胞计数,取平均值作为该动物该区阳性细胞数。

1.4 蛋白质杂交法(Western Blot)检测脑组织活性

Caspase - 3 表达

缺血缺氧损伤后 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 取损伤侧脑组织常规提取蛋白质(每加样孔中加入 50 mg)进行 SDS - PAGE 电泳。在转移缓冲液中($25 \mu mol/L$ Tris - HCl, 196 mmol/L 甘氨酸, 20 % 甲醇, pH 8.5 ~ 8.6)电转移过夜。TBS 缓冲液($20 mol/L$ Tris - HCl, 0.9 % NaCl, pH 7.6)洗膜,封闭液(TBS, 含 0.1 % 吐温 20)室温封闭 1 h。一抗(兔抗小鼠 Caspase - 3 P17 抗体)室温温育 4 h。TBS 洗膜后以二抗(生物素标记羊抗兔 IgG)室温温育 1 h。TBS 洗膜后于 NBT/BCIP 显色液中显色。予以 EPSON 1640 型扫描仪扫描测定各时间点左右两侧条带密度,以右侧(损伤侧)/左侧密度表示活性 Caspase - 3 的相对密度。

1.5 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

正常新生 SD 大鼠脑组织可有少数细胞活性 Caspase - 3 染色阳性,细胞大小、形态正常,阳性染色主要位于细胞质,在枕部皮质(图 2a)和海马回 CA1 区(图 2b),平均每高倍(400 倍)视野阳性细胞数目分别为 3 个和 4 个。

缺血缺氧后 3 h,损伤侧枕部皮质区可见细胞大小、形态基本正常的活性 Caspase - 3 阳性细胞,阳性染色位于细胞质,染色浅(图 1a)。缺血缺氧后 6 h,活性 Caspase - 3 阳性染色加深,仍主要位于细胞质,细胞稍有皱缩,细胞核可见弱阳性染色(图 1b)。缺血缺氧后 12 h,活性 Caspase - 3 阳性染色细胞进一步皱缩,阳性染色主要在细胞核(图 1c)。缺血缺氧后 24 h,阳性染色细胞已高度皱缩,细胞明显缩小(图 1d)。缺血缺氧后 24 h 内,随时间推移,活性 Caspase - 3 阳性染色由细胞质性转移向细胞核性,细胞明显皱缩,该现象在受损侧海马回 CA1 区可早在 HI 后 6 h 观察到。

在受损侧皮质区,从缺血缺氧后 3 h 起活性 Caspase - 3 染色阳性细胞数目较对照组明显增多($P < 0.05$ 或 0.01) (图 3a), HI 后 6 h 反而有所减少(图 3b), HI 后 12 h 阳性细胞数再次明显增多(图 3c),至 HI 后 24 h 活性 Caspase - 3 阳性细胞几乎遍布枕部皮质(图 3d),显著高于 3 h, 6 h, 12 h ($P < 0.01$)。在受损侧海马回 CA1 区,缺血缺氧后活性 Caspase - 3 阳性细胞数目随时间延长而增多,均高于正常对照组($P < 0.01$ 或 0.05) (图 3 e, f, g,

h),其中12 h CA1 区的 Caspase - 3 阳性细胞明显高于3 h,24 h CA1 区的 Caspase - 3 阳性细胞数最高($P < 0.01$)。见表1。图1~3 见封 III。

正常新生 SD 大鼠脑蛋白提取物应用 Western Blot 方法不能检测出活性 Caspase - 3 条带。缺血缺氧后3 h 损伤侧(即右侧)脑组织中可观察到 Caspase - 3 条带,6 h 表达减弱,12 h 时再次增强,24 h Caspase - 3 表达最强(图4)。在 HIBD 后3 h,6 h,12 h,24 h 各时间点的 Caspase - 3 相对密度分别为 2.07 ± 0.64 , 0.94 ± 0.32 , 1.33 ± 0.29 和 3.56 ± 0.77 ,具有二次增强趋势,并于24 h 最明显,其中3 h 与6 h 和12 h,24 h 与其它各时间点差异有显著性($P < 0.05$)。

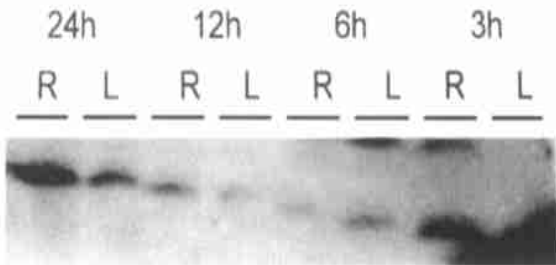


图4 HIBD 后两侧脑组织 Western Blot 结果

表1 缺血缺氧后不同点活性 Caspase - 3 阳性细胞数目变化

Table 1 The positive cells of cleaved Caspase - 3 in 2 groups at different time points
($n = 5, \bar{x} \pm s$, 个/ Hp)

组别	3 h		6 h		12 h		24 h	
	皮质区	CA1 区	皮质区	CA1 区	皮质区	CA1 区	皮质区	CA1 区
正常对照组	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2						
HIBD 组	14 $\pm$ 4 ^a	10 $\pm$ 3 ^a	8 $\pm$ 3 ^a	15 $\pm$ 4 ^a	10 $\pm$ 2 ^a	17 $\pm$ 3 ^{a,d}	32 $\pm$ 4 ^{b,c}	26 $\pm$ 4 ^{b,c}

注: a 与正常对照组比 $P < 0.05$; b 与正常对照组比 $P < 0.01$; c 与3 h,6 h,12 h 比 $P < 0.01$; d 与3 h 比 $P < 0.05$

3 讨论

目前常用于研究凋亡的方法包括常规 HE 染色观察凋亡小体, TUNEL 染色、凝胶电泳观察 DNA 裂解带及活性 Caspase - 3 的表达等。另外, HPP^[7] 及抗 ssDNA 抗体^[8] 亦被用于观察 DNA 损伤。有研究曾比较 TUNEL 染色、活性 Caspase - 3、HPP 及 ssDNA 对了解凋亡的敏感性, 认为活性 Caspase - 3 是 HI 损伤 24 h 内了解 DNA 损伤的最合适指标^[4]。

本实验观察到活性 Caspase - 3 阳性染色于 HI 后 24 h 内随时间推移由细胞质转入细胞核, 目前国内尚未见类似报道。本实验亦观察到 HI 后 6 h, 当皮质区活性 Caspase - 3 阳性染色主要位于细胞质时, 海马回 CA1 区活性 Caspase - 3 染色已主要位于细胞核。提示该区凋亡的发生发展早于皮质区, 与临床上观察到的 HIE 患儿海马回 CA1 区神经元较易受损^[9] 相符合, 也与动物实验所证明的海马回 CA1 区锥形神经元对缺血性损伤尤其敏感^[10] 相符合。

本实验应用免疫组化方法观察到 HIBD 后 3 h 起活性 Caspase - 3 阳性细胞数目增多, 24 h 达高峰, 细胞皱缩最明显, 染色最深, 为细胞核性。朱长连等应用免疫组化方法也观察到 Caspase - 3 p17 于

HI 后 3 h 呈免疫阳性反应并于 24 h 达高峰^[4]。Wang 等应用 Western Blot 方法则发现 17 kDa 的 Caspase - 3 条带可于 HI 后 1 h 观察到, 而于 24 h 达高峰^[5]。本实验观察到皮质区 Caspase - 3 阳性染色细胞于 HI 后 12 h 再次增多, 与 Western Blot 方法观察到的 Caspase - 3 表达密度于 HI 后 12 h 再次增强相符。提示 HI 导致的脑神经细胞凋亡有二次高峰存在。这一结果与国外一项应用 MRI 对 61 名窒息新生儿进行脑组织氧化磷酸化过程的临床研究结果相符合, 该研究发现在窒息后脑组织发生“二次能量代谢崩溃”现象^[11]。了解 HIBD 导致的脑细胞凋亡的二次加重现象对于掌握抗凋亡制剂治疗 HIE 治疗时机有积极意义。

[参 考 文 献]

[1] Scott RJ, Hegyi L. Cell death in perinatal hypoxic - ischemic brain injury [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1997, 23 (4) : 307 - 314.
[2] Pulera MR, Adams LM, Liu H, et al. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia - ischemia [J]. Stroke, 1998, 29 (12) : 2622 - 2630.
[3] Yue X, Mehmet H, Penrice J, et al. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia - ischemia [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1997, 23 (1) : 16 -

25.

[4] Zhu CL, Wang XY, Hagberg H, et al. Correlation between Caspase - 3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia - ischemia [J]. J Neurochem, 2000, 75(2) : 819 - 829.

[5] Wang XY, Karlsson JO, Zhu CL, et al. Caspase - 3 activation after neonatal rat hypoxia - ischemia [J]. Biol Neonate, 2001, 79 (3 - 4) : 172 - 179.

[6] 汤亚南. Caspase - 3 与围产期缺氧缺血性脑损伤. 中国当代儿科杂志, 2002(4) : 75 - 78.

[7] Didenko VV, Tunstead JR, Hornsby PJ. Biotin - labeled hairpin oligonucleotides: probes to detect double - strand breaks in DNA in apoptotic cells [J]. Am J Pathol, 1998, 152(4) : 897 - 902.

[8] Frankfurt OS, Robb JA, Sugarbaker EV, et al. Monoclonal anti-body to single - stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis [J]. Exp Cell Res, 1996, 226(2) : 387 - 397.

[9] Rivkin MJ. Hypoxic - ischemic brain injury in the term newborn. Neuropathology, clinical aspects, and neuroimaging [J]. Clin Perinatol, 1997, 24(3) : 607 - 625.

[10] Shughrue PJ, Merchenthaler I. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. Neuroscience [J]. 2003, 116(3) : 851 - 861.

[11] Azzopardi D, Wyatt JS, Cady EB, et al. Prognosis of newborn infants with hypoxic - ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy [J]. Pediatr Res, 1989, 25 (5) : 445 - 451.

(本文编辑:俞燕)

· 消息 ·

新生儿脑损伤学习班暨研讨会通知
(国家级继续医学教育项目 项目编号:2003 - 06 - 03 - 001)

为了提高新生儿科和产科医师对新生儿脑损伤的理论和临床认识,提高早期诊断的能力和治疗水平,经卫生部继续医学教育委员会批准,由湘雅医院儿科主办“新生儿脑损伤学习班”,时间定为 2003 年 11 月上旬。该班由全国新生儿专家授课,同时由中国当代儿科杂志社举办全国新生儿脑损伤专家研讨会。内容涉及 HIE,颅内出血,胆红素脑病,遗传性代谢病所致的脑损伤,换血治疗,高压氧治疗,亚低温疗法,脑内移植治疗的实验研究和新生儿脑损伤的监测等等。欢迎新生儿科和产科医务人员参加。学习结束后可取得国家级 I 类学分 16 分。如有兴趣参加者可向以下地址索取正式通知。

联系地址:邮编 410008,湖南省长沙市湘雅路 141 号湘雅医院儿科 李清香、邓芳明 同志
联系电话:0731 - 4327208 或 0731 - 4327402;传真:0731 - 4327402
E - mail: xyped @public. cs. hn. cn;网址:www. cjcp. org

中南大学湘雅医院
中国当代儿科杂志社

HIBD 新生大鼠活性 Caspase-3 表达的动态变化

(正文见第 331 页)

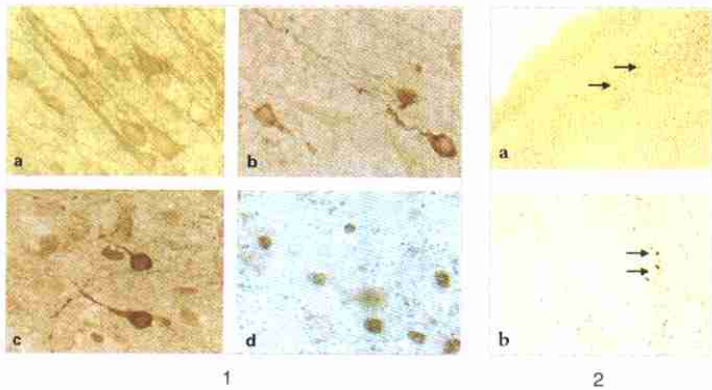


图1 H I 损伤后右侧皮质区活性 Caspase-3 阳性细胞形态变化 (× 400)

HI 后 3 h, 活性 Caspase-3 染色局限于细胞质, 细胞大小形态正常 (a)。HI 后 6 h, 阳性染色开始出现于细胞核, 阳性细胞开始皱缩 (b)。HI 后 12 h, 阳性细胞进一步皱缩, 活性 Caspase-3 染色已较多地位于细胞核 (c)。HI 后 24 h, 活性 Caspase-3 阳性细胞高度皱缩, 阳性染色为细胞核性 (d)。

图2 正常新生大鼠脑组织活性 Caspase-3 免疫组化染色 (× 100)

正常情况下, 大鼠脑枕部皮质区 (a) 和海马回 CA1 区 (b) 可见少量阳性细胞。

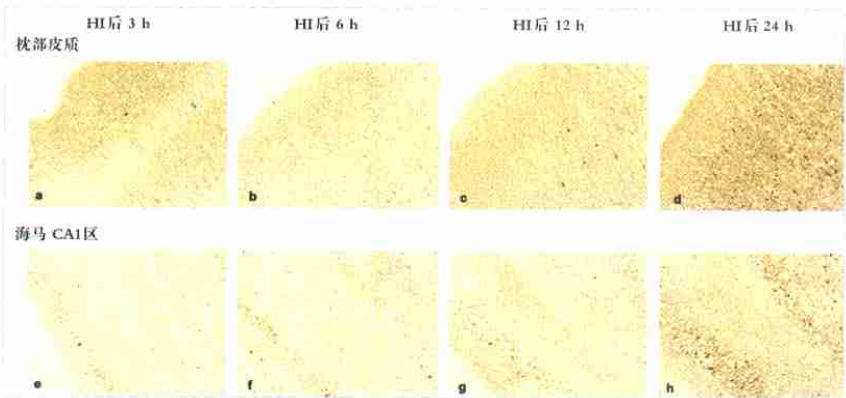


图3 HIBD 后 24 h 内枕部皮质及海马 CA1 区活性 Caspase-3 免疫组化染色 (× 100)

在受损侧皮质区, HI 后 3 h 活性 Caspase-3 阳性染色细胞数目开始增多 (a), HI 后 6 h 反而有所减少 (b), HI 后 12 h 阳性细胞数再次增多 (c), HI 后 24 h 活性 Caspase-3 阳性细胞已几乎遍布枕部皮质 (d)。在受损侧海马 CA1 区, HI 后 3 h 至 24 h, 活性 Caspase-3 阳性细胞持续增多 (e, f, g, h)。

Chediak-Higashi 综合征 2 例

(正文见第 385 页)

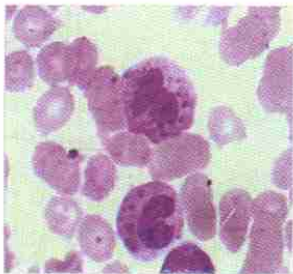


图1 CHS 血片中含异常颗粒的中性细胞 油镜 (× 1 000)

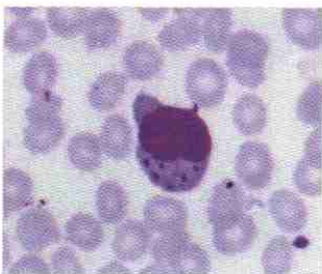


图2 CHS 血片中含异常颗粒的淋巴细胞油镜 (× 1 000)



图3 与正常人 (右) 的头发比较 光镜 (× 400)