

·论著·

新生大鼠缺氧缺血晚期 Caspase - 3 表达 及 bFGF 对其的影响

王菊莉¹, 李娟¹, 曹洪涛², 韩玉昆¹

(1. 中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 佳木斯市中心医院, 黑龙江 佳木斯 154002)

[摘要] 目的 观察凋亡相关基因 Caspase - 3 在新生大鼠 HIBD 晚期的蛋白表达情况以及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对其影响。方法 采用新生大鼠 HIBD 模型, 新生 7 d 龄 Wistar 大鼠, 随机分成 4 组: HIBD 组、假手术组、对照组(生理盐水治疗)及 bFGF 治疗组。分别于缺氧缺血(HI)后 2 周、3 周或 4 周处死大鼠, 用免疫组织化学染色方法观察脑组织 Caspase - 3 的表达情况, 用 TUNEL 法观察神经细胞 DNA 断裂情况。结果 HI 后 2 周和 3 周时左脑凋亡细胞数高于假手术组 ($P < 0.05$); HI 后 2 周和 3 周时脑组织 Caspase - 3 平均光密度值 ($0.39 \pm 0.04, 0.38 \pm 0.04$) 明显高于相应假手术组 ($0.36 \pm 0.01, 0.36 \pm 0.02$), 差异有显著性 ($P < 0.05$); bFGF 组于治疗 3 周后 Caspase - 3 平均光密度值 (0.36 ± 0.09) 低于对照组 (0.37 ± 0.04) 和 HIBD 组 (0.38 ± 0.04), 差异有显著性 ($P < 0.05$); bFGF 治疗 3 周后 TUNEL 阳性细胞数 (4.20 ± 1.30) 亦明显少于对照组 (9.80 ± 1.92) 和 HIBD 组 (8.00 ± 1.00), 差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 Caspase - 3 参与了新生大鼠 HIBD 过程, 并持续活化; bFGF 可能通过下调 HIBD 模型鼠脑组织中 Caspase - 3 的表达及阻止其随后的 DNA 断裂, 从而发挥其神经保护作用。
[中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 335 - 338]

[关键词] 缺氧-缺血; 脑; Caspase - 3; bFGF; TUNEL; 新生大鼠

[中图分类号] R - 33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2003)04 - 0335 - 04

Caspase - 3 Expression and the Effect of bFGF on it Following Hypoxic-Ischemic Brain Damage at Late Stage in Neonatal Rats

Ju-Li WANG, Juan LI, Hong-Tao CAO, Yu-Kun HAN. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: Wangjuli@hotmail.com).

Abstract: **Objective** To explore the role of Caspase - 3 protein and DNA fragmentation at late stage after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) and the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on Caspase - 3 expression. **Methods** Seven-day-old Wistar rats were randomly assigned into HIBD group, shamoperated group, normal saline treatment group and bFGF treatment group. Caspase - 3 expression of the brain was measured by the immunohistochemical method and DNA fragmentation of neurocytes was detected by TUNEL at 2 w, 3 w or 4 w after hypoxia-ischemia (HI). **Results** The number of the TUNEL positive cell in the HIBD group at 2 w and 3 w after HI was greater than that of the shamoperated group ($P < 0.05$). The Caspase - 3 average OD values of the brain ($0.39 \pm 0.04, 0.38 \pm 0.04$) in the HIBD group at 2 w and 3 w after treatment were significantly higher than those in the shamoperated group ($0.36 \pm 0.01, 0.36 \pm 0.02$), $P < 0.05$. The Caspase - 3 average OD value in the bFGF group at 3 w after HI (0.36 ± 0.09) was significantly lower than those in the control group and HIBD group ($0.37 \pm 0.04, 0.38 \pm 0.04$), $P < 0.05$. The number of the TUNEL positive cell in the bFGF group at 3 w after treatment (4.20 ± 1.30) was significantly less than those in the control group and HIBD group ($9.80 \pm 1.92, 8.00 \pm 1.00$), $P < 0.05$. **Conclusions** Caspase - 3 may take part in the pathogenesis of HIBD and keep continuous activation, suggesting a prolonged role for apoptosis in neonatal HIBD. bFGF has neuroprotective effects against neonatal HIBD by down-regulating Caspase - 3 protein expression and preventing DNA from fragmentation.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(4): 335 - 338]

[收稿日期] 2002 - 11 - 01; [修回日期] 2003 - 02 - 14

[作者简介] 王菊莉(1964 -), 女, 博士研究生, 主任医师。主攻方向: 新生儿缺氧缺血性脑病。

[通讯作者] 王菊莉, 辽宁省沈阳市中国医科大学附属第二医院, 邮编: 110004。

Key words: Hypoxia-Ischemia, Brain; Caspase - 3; bFGF; TUNEL; Neonatal rat

新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)后,Caspase - 3活化参与了神经细胞的凋亡过程,Caspase - 3一旦被激活,凋亡将不可逆转。Caspase - 3在缺氧缺血(hypoxic - ischemia, HI)后细胞凋亡过程中是一种关键的蛋白酶^[1],但有关Caspase - 3在新生大鼠HIBD晚期的表达以及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对其影响的研究罕见,本研究采用经典的新生大鼠HIBD模型,观察了Caspase - 3在HI后期的表达情况及bFGF对其影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

新生7 d龄Wistar大鼠,雌雄不限,体重12~18 g,随机分成4组,HIBD组、假手术组、对照组和bFGF组。HIBD组及假手术组观察到缺氧缺血或假手术后2周、3周或4周,对照组及bFGF组观察到HI后3周,每组每个时间点各5只。

1.2 新生大鼠HIBD模型的制备

新生7 d龄Wistar大鼠,乙醚吸入麻醉后取仰卧位,四肢固定于手术板上,颈正中切口,游离左侧颈总动脉,用0~4号线结扎,缝合切口,放回原饲养环境中恢复2~4 h后置于由氮气和空气调节、测氧仪监控的常压缺氧舱内[舱温(36±1)℃,氧浓度8%],缺氧持续时间为1.5 h,缺氧结束后回笼恢复。bFGF组于缺氧后立即给予bFGF腹腔注射4 U/g,每日一次,连续用3周。对照组于HIBD后给予等量生理盐水腹腔注射。假手术组仅分离颈总动脉,不结扎不缺氧。断头处死大鼠后,将脑组织迅速固定于戊二醛中,或固定于中性福尔马林缓冲液中。

1.3 TUNEL法原位检测细胞凋亡

利用寡核苷酸末端脱氧核糖转移酶(TdT)介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)原位检测凋亡。石蜡切片常规脱蜡入水。以新鲜配制的3% H₂O₂室温处理10 min;蛋白酶K消化;标记缓冲液20 μl/片,标记液20 μl/片(阴性对照不加TdT),37℃标记2 h;封闭液,50 μl/片;生物素化抗地高辛抗体,50 μl/片加于标本上,37℃反应30 min;SABC,DAB显色,苏木素轻复染,脱水、透明、封片。结果判定:400倍光镜计数10个视野(浅皮层4个视野,深皮层4个视野,海马2个视野)阳性细胞数,并取其平均值。

1.4 透射电镜检查

取大脑皮层约1.0 mm×1.0 mm×2.0 mm小块,2.5%戊二醛及1%锇酸双重固定后,丙酮逐级脱水,树脂包埋,LKB型切片机作超薄切片,切片厚度为50 nm,醋酸铀和柠檬铅双重染色后,JEM-1200-EX型透射电镜检查并照相。

1.5 Caspase - 3检测

采用免疫组织化学染色方法:脑冠状切片,6 μm厚,常规脱蜡至水后,3% H₂O₂室温10 min;放入枸橼酸盐缓冲液中,电炉加热至95~98℃,持续10 min,冷却至室温;抗原修复液修复;正常山羊血清封闭液,室温20 min;一抗工作液即Caspase - 3(P20)兔IgG蛋白抗体,4℃过夜;生物素化山羊抗兔IgG,37℃20 min;PBS洗后用DAB显色,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。用右侧脑组织做自身对照,不加第一抗体做空白/阴性对照。Caspase - 3以胞浆有黄色颗粒沉着为阳性细胞。免疫强度判定:400倍光镜下观察每组各时间点5只大鼠脑组织切片(各二张),经数码相机采样,左右皮层各5个视野,输入MetaMorph Imager System Version 4.6,将大脑皮层的免疫阳性细胞的染色强度变成量化指标,计算其平均光密度(OD)值。

1.6 统计学方法

用SPSS 10.0软件包处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 TUNEL检测结果

HI后额顶皮层躯体感觉区、纹状体、丘脑及海马处有一些散在的染色质浓缩呈黄色颗粒的圆形或卵圆形的凋亡细胞,以额顶皮层躯体感觉区相对多见,在半暗带内亦可见凋亡细胞。HI后2周、3周时左脑凋亡细胞数与假手术组比较明显增高,差异有显著性($P < 0.05$);HI后2周时左脑凋亡细胞数高于3周($P < 0.05$)。见表1,图1。缺血缺氧后3周bFGF组的脑凋亡细胞数明显低于对照组和HIBD组($P < 0.05$),对照组和HIBD组间凋亡细胞数差异无显著性($P > 0.05$)。见表3。

2.2 透射电镜观察结果

透射电镜下可清晰地观察到凋亡细胞核、膜、线粒体及内质网等改变,可见到早、中、晚期凋亡细胞。

从形态学上进一步证实了存在细胞凋亡。见图 2。

2.3 免疫组化结果

假手术组, 仅在皮层个别区域有少量 Caspase - 3 阳性细胞。HIBD 组中, 2 周时皮层即出现明显的 Caspase - 3 免疫阳性细胞, 其平均光密度值与假手术组比较差异有显著性 ($P < 0.05$); 3 周时 Caspase - 3 免疫阳性细胞较 2 周时逐渐减少 ($P < 0.05$), 其平均光密度值仍高于假手术组 ($P < 0.05$)。见表 2。bFGF 治疗 3 周后 Caspase - 3 蛋白表达较对照组和 HIBD 组明显减少 ($P < 0.05$), 对照组和 HIBD 组间 Caspase - 3 表达差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 3 及图 3, 4。

表 1 HIBD 组与假手术组左脑 TUNEL 阳性细胞数

Table 1 TUNEL positive cell counts in the left brain of HIBD and sham - operation groups (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	2 W	3 W	4 W
假手术组	4.40 $\pm$ 1.14	4.00 $\pm$ 1.22	3.80 $\pm$ 1.30
HIBD 组	15.60 $\pm$ 2.07 ^{a, b}	8.00 $\pm$ 1.00 ^a	4.00 $\pm$ 1.00

注: a 与假手术组比较 $P < 0.05$; b 与 3 周组比较 $P < 0.05$

表 2 HIBD 组与假手术组左侧大脑皮层 Caspase - 3 平均光密度值

Table 2 Average OD values of Caspase - 3 in the left brain of HIBD and sham - operation groups (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	2 W	3 W	4 W
假手术组	0.36 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.02
HIBD 组	0.39 $\pm$ 0.04 ^{a, b}	0.38 $\pm$ 0.04 ^a	0.35 $\pm$ 0.02

注: a 与假手术组比较 $P < 0.05$; b 与 3 周组比较 $P < 0.05$

表 3 缺血缺氧后 3 周各组左侧大脑皮层 TUNEL 阳性细胞数和 Caspase - 3 平均光密度值

Table 3 TUNEL positive cell counts and average OD values of Caspase - 3 on the left brains of each group 3 weeks after HIBD (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	TUNEL	Caspase
假手术组	4.00 $\pm$ 1.22	0.36 $\pm$ 0.02
对照组	9.80 $\pm$ 1.92 ^c	0.37 $\pm$ 0.04 ^c
HIBD 组	8.00 $\pm$ 1.00 ^c	0.38 $\pm$ 0.04 ^c
bFGF 组	4.20 $\pm$ 1.30 ^{a, b}	0.36 $\pm$ 0.09 ^{a, b}

注: a 与对照组比 $P < 0.05$; b 与 HIBD 组比 $P < 0.05$; c 与假手术组比较 $P < 0.05$



图 1 新生大鼠 HIBD 3 周后左侧大脑皮层凋亡细胞 ($\times 40$)

Figure 1 Apoptotic cells on the left side of the brain cortex of HIBD group 3 weeks after HI ($\times 40$)

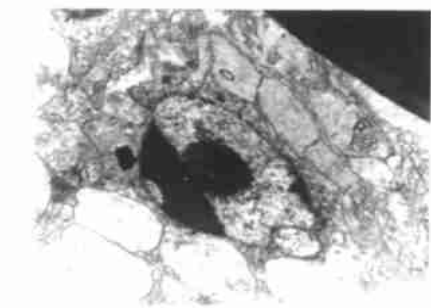


图 2 凋亡细胞染色质聚集成块 ($\times 8\ 000$)

Figure 2 Chromatin clustered in apoptotic cell ($\times 8\ 000$)

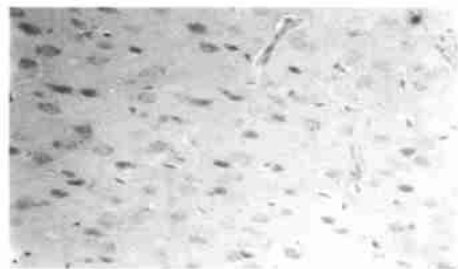


图 3 对照组左侧大脑皮层 Caspase - 3 表达 ($\times 40$)

Figure 3 Caspase - 3 expression on the left side of the brain cortex of control group ($\times 40$)



图 4 bFGF 组左侧大脑皮层 Caspase - 3 表达 ($\times 40$)

Figure 3 Caspase - 3 expression on the left side of the brain cortex of bFGF group ($\times 40$)

3 讨论

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)发病率高,预后差,一直是儿科研究的重点内容。随着有关缺血性神经细胞障碍病理研究的进展,有必要从分子水平的高度来研究HIE的机制。1995年Hill首次证明:乳大鼠单侧脑缺血缺氧后,脑组织中有DNA断裂细胞,提示存在细胞凋亡^[2]。根据动物实验,缺氧缺血性脑损伤神经细胞死亡有坏死和凋亡两种形式,而坏死主要见于严重的缺氧缺血性脑损伤,即使在严重的缺氧缺血性脑损伤,神经细胞死亡仍以凋亡为主,凋亡是一慢性、可逆的过程,有许多因素可以阻断凋亡,从而为临床上治疗缺氧缺血性脑病创造了时机。本文用较敏感的TUNEL方法在新生大鼠HIBD模型证实了HI后3周仍发生神经细胞凋亡。

Caspase家族是近年来新发现的一类半胱氨酸蛋白酶,均具有特异酶切天冬氨酸氨基位点的特性,是细胞凋亡过程中最重要的终末剪切酶,一旦被激活,凋亡常难以避免,因此Caspase-3是有可能被阻抑的最下游凋亡执行蛋白,该酶是否被激活也是鉴别细胞凋亡与坏死的主要依据。Nakajima等研究发现:新生鼠HI后24h到7dCaspase-3表达增加,凋亡细胞持续存在达数周,提示新生鼠HIBD后凋亡持续存在^[3]。缺氧缺血后Caspase激活、神经元凋亡是一个延迟发生的过程,为临床寻找有效的药物治疗提供了更广阔的时间窗,针对Caspase设计的各种抑制剂对脑损伤的保护作用正日益受到重视。Caspase-3的研究为围产期缺氧缺血性脑损伤的治疗提供了新的思路^[4]。本文结合TUNEL、透射电镜及组化方法证实了新生鼠HI后3周仍有Caspase-3表达及DNA断裂。

bFGF是与肝素具有亲和性的生长因子、具有广泛的生物学效应,能维持神经原生长、分化和存活,促进神经系统损伤的修复。正常情况下,脑内仅有轻度bFGF样免疫反应,而在缺血脑组织中bFGF及其受体的mRNA水平增高,提示bFGF可能与脑缺血的修复有关。在脑缺血损伤后,bFGF具有拮抗兴奋性氨基酸及NO神经毒的作用,阻止细胞内钙离子超载,保护神经元^[5]。已有学者发现给予外

源性bFGF可减轻HIBD的程度。延迟静脉内给予bFGF可减少局灶缺血/再灌注模型梗塞范围,其机制可能包括直接的细胞保护和/或血管活化效应。bFGF可保护缺血区及其周围区域的神经元免于死亡,从而减轻迟发性神经元死亡,明显缩小脑梗塞范围。bFGF是直接还是间接发挥这种抗损伤作用尚无定论。因Caspase-3主要在星形胶质细胞表达,bFGF抗损伤作用可能与星形胶质细胞的增生有关,在放射性神经胶质细胞中缺氧诱导的FGF信号可能代表了损伤后脑能再生神经元的部分保守程序^[6]。推测bFGF可能通过下调星形胶质细胞Caspase-3的表达来阻止Caspase-3的活化,从而直接阻止了神经细胞凋亡的发生。本研究亦证实了新生大鼠HIBD后连续给予bFGF可不断下调Caspase-3蛋白表达及随后的DNA断裂。但bFGF对HI后脑细胞中Caspase-3的表达发挥调节作用的确切机制尚待进一步探讨。

总之,新生大鼠HIBD晚期神经元凋亡的研究对进一步加深理解HI后脑损伤的分子机制及持续时程具有重要的意义,对防止脑瘫及减轻HIE后遗症的发生将有重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] Blomgren K, Zhu CL, Wang XY, et al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia [J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 10191-10198.
- [2] Hill IE, MacManus JP, Rasquinha I, et al. DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat [J]. Brain Res, 1995, 676(2): 398-403.
- [3] Nakajima W, Ishida A, Lange MS, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat [J]. J Neurosci, 2000, 20(21): 7994-8004.
- [4] 汤亚南. Caspase-3与围产期缺氧缺血性脑损伤[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(1): 75-78.
- [5] Maiese K, Boniece I, DeMeo D, et al. Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity [J]. J Neurosci, 1993, 13(7): 3034-3040.
- [6] Ganat Y, Soni S, Chacon III, et al. Chronic hypoxic up-regulates fibroblast growth factor ligands in the perinatal brain and induces fibroblast growth factor-responsive radial glial cells in the subependymal zone [J]. Neuroscience, 2002, 112(4): 997-991.

(本文编辑:俞燕)