

· 实验研究 ·

亚低温减轻新生大鼠缺氧缺血脑细胞 凋亡的作用及机制研究

王来栓, 于立君, 邵肖梅

(复旦大学附属儿科医院新生儿科, 上海 200032)

[摘要] 目的 细胞凋亡在新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)的发病机制中起重要作用,亚低温治疗是HIE最有前途的治疗方法之一。通过观察缺氧缺血后凋亡通路中关键成分的变化,探讨亚低温减轻新生大鼠脑细胞凋亡的作用及机制。方法 采用7日龄SD清洁级大鼠,建立新生大鼠HIBD标准模型。模型动物随机分为常温缺氧缺血组(IN,肛温=37℃)和亚低温缺氧缺血组(IH,肛温=33℃)。采用TUNEL结合苏木素-伊红染色、神经元Nissl染色等方法检测脑细胞凋亡;Western blotting加免疫组织化学法观察线粒体及胞浆细胞色素C蛋白改变;分别用RT-PCR和显色底物法检测caspase-3 mRNA表达及其酶活性改变。结果 IN组海马CA1区TUNEL阳性锥体细胞明显增多,DNA电泳梯状条带明显;72 h亚低温治疗显著降低脑细胞凋亡发生率,与常温比较差异有显著性(6.4 ± 1.7 vs 25.3 ± 1.5 , $P < 0.01$)。IN组胞浆Cyt c水平6 h开始明显升高,72 h达高峰,而线粒体内Cyt c水平则出现相应的下降;亚低温治疗组胞浆Cyt c水平降低和对应线粒体Cyt c水平的升高,以24 h、48 h和72 h最为明显,与IN组比较差异有显著性($P < 0.05$)。HIBD后24 h组结扎侧脑组织caspase-3 mRNA表达明显增加,亚低温治疗显著降低caspase-3 mRNA表达水平,以48 h、72 h治疗组最明显($P < 0.05$),而caspase-3酶活性却在24 h达高峰,亚低温治疗可明显降低HIBD后24 h的caspase-3酶活性,与常温比较差异有显著性(2.42 ± 0.5 RFU vs 34.7 ± 3.2 RFU, $P < 0.01$)。结论 亚低温治疗能够显著降低HIBD后细胞凋亡发生率,其机制可能作用于凋亡通路的多个部位:减少Cyt c释放,减轻或抑制caspase-3表达及其蛋白酶活性等。

[中国当代儿科杂志,2007,9(1):37-41]

[关键词] 脑缺氧;脑缺血;低温;凋亡;细胞色素C;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)01-0037-05

Mild hypothermia attenuates neuronal apoptosis after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats

WANG Lai-Shuan, YU Li-Jun, SHAO Xiao-Mei. Department of Pediatrics, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China (Shao X-M, Email: shao-xiaomei@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the effects of mild hypothermia on sequential events of neuronal apoptosis following hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** A model of HIBD was prepared by ligating the left common carotid artery in 7-day-old rats, followed by 8% hypoxia exposure. HIBD rats were randomly assigned into a hypothermia group (rectal temperature = 33 °C) and a normothermia group (rectal temperature = 36 °C). TUNEL, Haematoxylin and Eosin, and Nissl staining were used to detect neuronal apoptosis. Western blotting, RT-PCR and enzyme activity measurement were used to evaluate the changes of plasma and mitochondrial cytochrome c (Cyt c), caspase-3 mRNA expression and caspase-3 enzyme activity, respectively. **Results** The number of apoptotic cells in the ipsilateral hemisphere of the hypothermia group was significantly reduced compared with that of the normothermia group at 72 hrs post-HI ($6.4 \pm 1.7\%$ vs $25.3 \pm 1.5\%$) ($P < 0.01$). Analysis of Western blotting showed that Cyt c levels increased in the cytosolic fraction, but decreased significantly in the mitochondrial fraction in the ipsilateral hemisphere of the hypothermia group at 24, 48 and 72 hrs of HI insult compared with the normothermia group ($P < 0.05$). Caspase-3 mRNA increased significantly after 24 hrs post-HI in the normothermia group, and this change became more pronounced with time. Mild hypothermia treatment decreased significantly caspase-3 mRNA expression at 24, 48 and 72 hrs post-HI ($P < 0.05$). Caspase-3 activity gradually increased 2 hrs after HI insult and peaked at 24 hrs in the normothermia group. Mild

[收稿日期]2006-08-07;[修回日期]2006-09-12

[基金项目]教育部“211工程”资助项目;复旦大学“985工程”资助项目

[作者简介]王来栓,男,博士,主治医师。主攻方向:围生期脑损伤防治研究。

[通讯作者]邵肖梅,教授,复旦大学附属儿科医院新生儿科,邮编:200032。

hypothermia treatment resulted in a significant reduction in caspase-3 activity in the ipsilateral hemisphere, with an optimal effect produced at 24 hrs post-HI (2.42 ± 0.5 RFU vs 34.7 ± 3.2 RFU; $P < 0.01$). **Conclusions** Mild hypothermia treatment attenuates neuronal apoptosis following HIBD, possibly through a reduction in Cyt c release from mitochondria and an inhibition of caspase-3 mRNA expression and its enzyme activity.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (1):37-41]

Key words: Hypoxia, brain; Brain ischemia; Hypothermia; Apoptosis; Cytochrome c; Neonatal rats

近年大量的动物和临床试验表明亚低温是围生期缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)最有前途的治疗措施之一^[1]。然而,亚低温脑保护的作用机制还未完全阐明,已知细胞凋亡在HIBD后继发性脑细胞死亡中起着关键作用。但是,细胞凋亡是一个非常复杂的主动的细胞死亡过程,理论上可分为三个阶段:启动阶段、执行调控阶段和效应阶段。线粒体通过释放促凋亡分子(如细胞色素C等)在细胞凋亡的调控中起着关键作用,效应阶段的主要事件是效应性半胱天冬酶(caspase)的级联反应,其结果是对底物的分解和巨噬细胞对凋亡细胞的清除,亚低温作用于通往凋亡通路的具体靶点还不清楚。本实验采用成熟的7日龄大鼠HIBD模型,探讨亚低温减轻HIBD后细胞凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、模型制作和亚低温实施

7日龄SD清洁级大鼠,雌雄不拘共30窝254只,体重12~18g,由中国科学院上海药物研究所实验动物中心提供。7日龄大鼠乙醚麻醉后,分离出左颈总动脉并永久结扎,2~3h后再将鼠放入37℃低氧箱中,通入8%氧气和92%氮气的混合气2h;对照组为假手术动物。实验动物分为4组:常温对照组(CN,肛温=37℃)、亚低温对照组(CH,肛温=33℃)、常温缺氧缺血组(IN,肛温=37℃)、亚低温缺氧缺血组(IH,肛温=33℃)。亚低温的实施方法参考文献[2]。

1.2 方法

1.2.1 病理学检测及原位缺口末端标记法检测(TUNEL染色) 取6h和72h组大鼠脑灌注固定,石蜡包埋,从海马背侧中部开始连续冠状切片(5μm)3张,分别行苏木素-伊红常规染色、尼氏体(Nissl)染色和TUNEL染色。TUNEL检测采用美国R&D system公司试剂盒,具体方法严格按照说明书进行。根据Nakajima等^[3]的方法区分凋亡、坏死和正常细胞。采用双盲法分别记数结扎侧和未结扎侧海马CA1区、CA3区阳性细胞数和未结扎侧正常细

胞数,每区分别记数3个记数框(13μm²/每框)。两侧阳性细胞数之差再除以未结扎侧脑细胞总数(阳性细胞数+正常细胞数)得出12个记数框内细胞凋亡率;以同样方法检测细胞坏死率。

1.2.2 DNA梯带检测 参考文献[4]进行DNA的抽提并进行DNA梯带检测。

1.2.3 胞浆及线粒体Cyt c免疫印迹 胞浆和线粒体Cyt c的提取参考文献^[4]进行。取样50μg在12.5% SDS-PAGE上电泳半干电转移法转移到硝酸纤维素膜上,进而在含脱脂奶的PBST中摇动1~2h,与抗-Cyt c抗体孵育1~2h,4℃冰箱过夜, PBST洗涤后加入驴抗羊IgG,暗室中采用增强化学发光法(ECL)X光胶片放射自显影。用β-actin抗体作为内参照,结果用图像处理软件Gel Pro R analyzer对照片进行半定量分析和统计分析。

1.2.4 caspase-3 mRNA及酶活性检测 caspase-3 mRNA的检测严格按照Takara公司试剂盒说明书。引物rat caspase-3 (GeneBank No: U49930)上游引物: 5'-⁴08TTTGGAACGAACGGACCTGT-3' 上游引物 5'-⁷98CACGGGATCTGTTTCTTTGC-3' 扩增长度:412bp。用GAPDH mRNA作为内对照,最后用校正值进行统计分析。caspase-3酶活性的测定:采用荧光光度法分析试剂盒,以静态法测定酶活性,caspase-3活性以各组与正常对照组比较得出相对值(RFU)表示。

1.3 统计学分析

采用SPSS11.0统计软件进行数据分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。根据方差齐性检验结果,采用配伍组设计双因素方差分析比较各配伍组差别。 $P < 0.05$ 被认为差异有显著性。

2 结果

2.1 新生大鼠HIBD后脑组织病理学检查及细胞凋亡情况

由于细胞坏死晚期DNA的降解也使TUNEL染色阳性,因此单独使用TUNEL法很难区分坏死和凋亡细胞,我们结合苏木素-伊红染色、尼氏体染色高倍镜下观察细胞形态和TUNEL观察以区分坏死和

凋亡细胞,结果发现细胞凋亡发生率在 IN 6 h 组与同时时间点 IH 组比较未见明显差异,而 IH 72 h 组其脑细胞凋亡发生率却较同时时间点 IN 组有显著降低 ($P < 0.01$),与 IN 组比较, IH 组细胞细胞坏死发生率无论是 6 h 还是 72 h 组都未见差异有显著性 ($P > 0.05$)。(表 1, 图 1),说明亚低温只特异的抑制细胞凋亡。

表 1 不同处理对新生大鼠 HIBD 后结扎侧脑细胞凋亡率、坏死率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	凋亡发生率 (%)		坏死发生率 (%)	
		6 h	72 h	6 h	72 h
CN	6	4.2 ± 0.3	6.1 ± 0.7	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1
CH	6	3.8 ± 0.8	5.8 ± 0.8	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2
IN	10	4.9 ± 0.7	25.3 ± 1.5 ^a	3.3 ± 2.1	13.0 ± 1.4
IH	10	4.8 ± 0.5	6.4 ± 1.7	4.1 ± 1.8	11.3 ± 0.7
F 值		15.5			

a 与 CN, CH, IH 组比较, $P < 0.01$

DNA 琼脂糖凝胶电泳结果发现,缺氧缺血性脑损伤导致典型的染色质被切割后产生的长约 180 ~ 200 bp 及其倍体的 DNA 梯状电泳条带,为凋亡细胞所特有,坏死细胞不出现此条带。在 IN 组 DNA 梯

状电泳条带尤为明显,而亚低温治疗组却不明显。假手术组未见梯状条带出现。

2.2 缺氧缺血性脑损伤对线粒体释放 Cyt c 的影响

在缺氧缺血损伤 6 h 未见胞浆 Cyt c 条带的明显升高,再灌注后 24 h 可见明显的升高,随着时间的延长仍可观察到胞浆 Cyt c 条带的升高,72 h 达最高 ($P < 0.01$)。而线粒体 Cyt c 的含量变化在缺氧缺血后明显减少,以 6 h, 24 h, 48 h 和 72 h 最明显,表明大量的 Cyt c 从线粒体内释放到胞浆。亚低温治疗后线粒体内 Cyt c 水平可见相应的明显升高和胞浆 Cyt c 的降低(图 2)。

2.3 各组大鼠不同时间 caspase-3 mRNA 及 caspase-3 活性的变化

缺氧缺血性脑损伤恢复期不同时间点 caspase-3 mRNA 的变化表明缺氧缺血性脑损伤使片段长度为 412 bp 的 caspase-3 mRNA 表达随时间延长而逐渐增高,大于 24 h 的亚低温治疗可见到 caspase-3 mRNA 表达降低; IN 组 24 h, 48 h, 72 h caspase-3 mRNA 表达水平与对照组和 24 h, 48 h, 72 h 亚低温

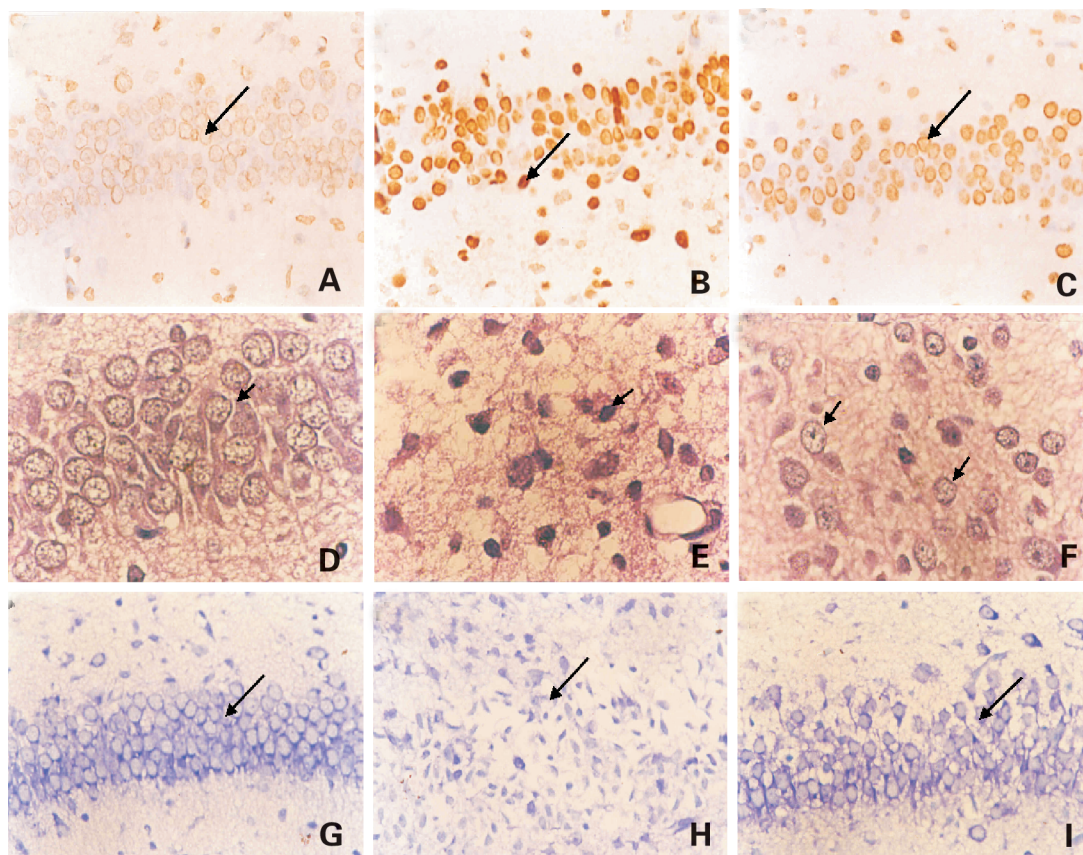


图 1 海马 CA1 区锥体细胞凋亡情况。 A, D, G 正常对照组; B, E, H 常温缺氧缺血组; C, F, I 亚低温治疗组。A ~ C 为 TUNEL 检测; D ~ F 为苏木素-伊红染色; G ~ I 为 Nissl 染色。(A ~ C 200 ×, D ~ F 400 ×, G ~ I 200 ×) 与正常对照组比较缺氧缺血组细胞数明显减少和有大量的凋亡细胞,组织结构破坏严重;而亚低温治疗组凋亡细胞明显减少,组织结构保存较好。

治疗组比较差异均有显著性($P < 0.05$)(图3)。

caspase-3 活性的动态观察表明,HIBD 24 h 内 IN 组脑组织 caspase-3 酶活性逐渐增高,24 h 达到高峰(34.7 ± 3.2 RFU),随后缓慢下降,但 48 h 和 72 h 后仍维持在较高的水平,72 h 仍高于 CN 组

($F = 32.1, P < 0.01$),不同时间的亚低温治疗可明显降低 HIBD 引起 caspase-3 酶活性增高,以亚低温治疗 24 h 的降低幅度最大,与 IN 组相比差异具有非常显著性($F = 32.1, P < 0.01$)。见表 2。

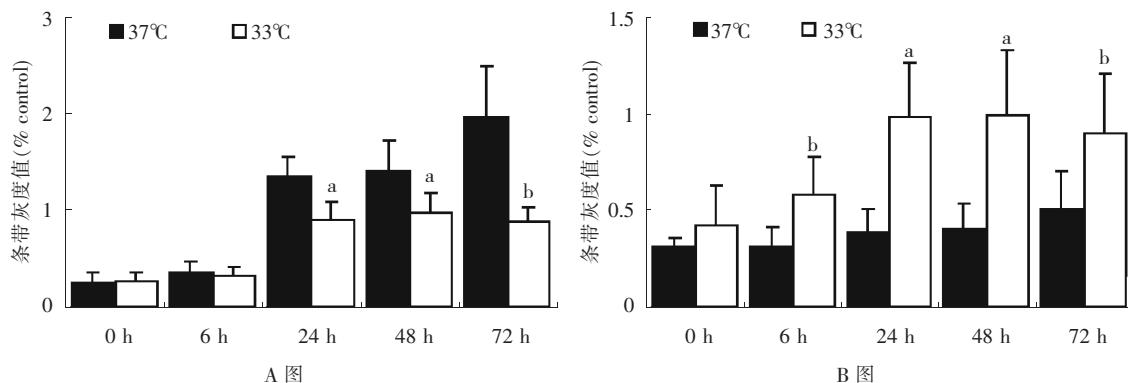


图2 免疫印迹显示缺氧缺血性脑损伤后胞浆(A图)和线粒体(B图)Cyt c的变化(a $P < 0.05$; b $P < 0.01$)

表2 各组大鼠不同时间 caspase-3 活性相对荧光值变化的比较

($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	caspase-3 活性(RFU)					
		0 h	2 h	6 h	24 h	48 h	72 h
CN	24	1.00 ± 0.1	1.02 ± 0.2	1.06 ± 0.1	1.10 ± 0.3	1.11 ± 0.4	1.17 ± 0.3
CH	20	1.00 ± 0.1	1.05 ± 0.7	1.04 ± 0.1	1.09 ± 0.8	1.12 ± 0.4	1.14 ± 0.2
IN	36	1.12 ± 0.5	2.23 ± 1.1^b	4.73 ± 1.2^b	34.7 ± 3.2^b	12.9 ± 4.1^b	4.18 ± 0.9^b
IH	30	1.12 ± 0.5	1.90 ± 0.6	1.59 ± 0.7^a	2.42 ± 0.5^a	1.74 ± 1.0^a	1.51 ± 1.2^a

a 与 IN 组比较, $P < 0.01$, c 与 0 h 时段比较, $P < 0.01$

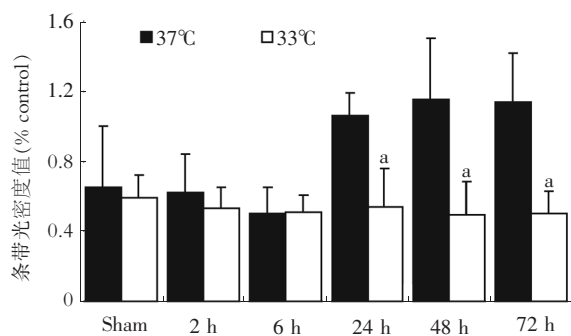


图3 缺氧缺血性脑损伤恢复期不同时间点 caspase-3 mRNA 表达的变化(a $P < 0.05$)

3 讨论

随着分子生物学研究的进展,人们发现细胞凋亡是一个需要能量的主动细胞死亡过程,具有阶段性和程序性,因此也为研究凋亡每一阶段特征性的分子事件并采取相应的干预手段提供了可能。我们以前的研究表明^[2,5],亚低温治疗新生大鼠 HIBD,可以明显减少细胞凋亡发生,其机制与保护线粒体

功能、减少能量的耗竭及降低 caspase-3 酶活性关系密切,但 caspase-3 的激活已经是凋亡发生的不可逆阶段,对此之前的分子事件的了解能加深我们对亚低温治疗 HIBD 机制的认识。本研究发现亚低温治疗能够显著降低 HIBD 后的细胞凋亡发生率,其机制可能作用于凋亡通路的多个部位:减少 Cyt c 的释放,通过减轻或抑制 caspase-3 的 mRNA 表达及蛋白酶活性特异的抑制凋亡,为临床上亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病提供了理论依据。

在 HIBD 后发生的迟发性神经元凋亡中,Cyt c 从线粒体释放入胞浆是其关键步骤之一。因此,如何在凋亡发生的可逆阶段保护好线粒体功能,减少 Cyt c 的释放,就能阻断效应阶段发生的级联放大过程将有助于减轻缺氧缺血性脑损伤。Xu 等^[6]在成年鼠的大脑缺血模型所作的实验表明,亚低温治疗可对线粒体膜起到保护作用,从而减少线粒体释放凋亡促进因子如 Cyt c 等,而线粒体释放凋亡促进因子是线粒体途径细胞凋亡的必经之路,且早于 caspase-3 的激活,有关新生动物这方面的研究尚未

见报道。本实验证明缺氧缺血后6 h内,大鼠结扎侧半球中存在一些胞质 Cyt c 染色阳性的神经元,采用 Western 印迹等方法可证实胞质中 Cyt c 是自线粒体中所释放,且这种释放早于 DNA 裂解,提示 Cyt c 释放参与了 HIBD 后迟发性神经元死亡机制。IH 组胞质 Cyt c 染色阳性的神经元明显减少,Western 印迹结果也显示呈时间依赖性的胞质 Cyt c 的逐渐减少和凋亡细胞及 DNA 梯状条带的减弱,表明亚低温治疗可以抑制 Cyt c 从胞浆的释放从而减轻细胞凋亡。

细胞凋亡效应阶段的主要事件是 caspase 对其底物的分解和巨噬细胞对凋亡细胞的清除,该阶段为凋亡的不可逆阶段。caspase 介导细胞凋亡的信号转导^[7],其中 caspase-3 被认为是各种凋亡刺激因子激活的 caspase 家族中的关键蛋白酶, caspase-3 是以无活性的酶原形式存在,当线粒体释放的细胞色素 c 与凋亡蛋白酶活化因子-1 (Apaf-1)、caspase-9 酶原结合即启动了 caspase 瀑布式的级联反应, caspase-3 的激活使其降解为两个分别长达 29KDa 和 17KDa 的活性片断,并作用于其相应的底物,使细胞发生凋亡,因此 caspase-3 的活化是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。本实验以半定量 RT-PCR 分析和 ac-DEVD-AFC 作为底物,通过荧光分光光度法对 caspase-3 mRNA 表达及其活性均进行了检测,结果发现 HIBD 能引起 caspase-3 基因和蛋白均表达增高,但时相却有所不同, caspase-3 酶活性与对照组相比在缺氧缺血后 2 h 就有明显的升高,是 CN、CH 组的两倍以上,以后随缺氧缺血时间的延长,其活性也逐渐增高,24 h 后达高峰,是 CN 组的 30 倍,之后才有缓慢的下降;而其基因的表达直到缺氧缺血后 24 h 才观察到有显著的升高,6 h 的

转录水平还有所下降,但未见显著性差异,说明其基因表达在缺氧缺血早期可能受到抑制,但蛋白表达却未受限制,其具体机制目前还不清楚。亚低温治疗后对 caspase-3 mRNA 和酶活性也都有不同程度的降低,但对其 mRNA 降低的最佳时程为亚低温治疗 48 h,而对其活性的最佳时程为亚低温治疗 24 h 以上,说明二者对亚低温治疗的敏感性不同,如果达到最佳的抑制效果,需要足够长的时间。

[参 考 文 献]

- [1] Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Ferriero DM, Polin RA, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomized trial [J]. *Lancet*, 2005, 365 (3): 663-670.
- [2] 王来栓,于立君,张旭东,邵肖梅. 亚低温对新生大鼠缺氧缺血脑损伤线粒体功能及凋亡的影响 [J]. *复旦学报(医学科学版)*, 2003, 30 (2): 95-98.
- [3] Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, 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] Xu XR, Nakamura T, Nagao S, Mayamoto O, Jin L, Toyoshima T, et al. Specific inhibition of apoptosis after cold-induced brain injury by post injury hypothermia [J]. *Neurosurgery*, 1998, 43 (1): 107-115.
- [5] 于立君,王来栓,邵肖梅,杨毅. 亚低温对新生鼠缺氧缺血脑损伤能量代谢的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5 (3): 192-196.
- [6] Xu L, Yenari MA, Steinberg GK, Giffard RG. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(1): 21-28.
- [7] Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ. Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis [J]. *J Neurosci*, 2001, 21 (6): 1931-1938.

(本文编辑:吉耕中)