

·论著·

MK-801 对新生大鼠脑缺氧缺血后 Caspase-3 激活及其对凋亡的影响

朱长连^{1,2}, 王小阳¹

(1. 河南医科大学第三附属医院儿内科; 2. 河南省围产医学中心, 河南 * 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂 MK-801 对新生大鼠缺氧缺血(HI)后半胱天冬酶-3(Caspase-3)激活及凋亡的影响。方法 7日龄新生大鼠在 HI 后即刻给予腹腔注射 MK-801 0.5 mg/kg, 在 HI 后 24 h 取脑制作脑组织连续切片进行微管相关蛋白-2(MAP-2), Caspase-3 免疫组化染色及发夹寡核苷酸探针(Hairpin Probe, HPP)原位杂交, 计算脑损伤面积及 Caspase-3, HPP 阳性细胞数。结果 MK-801 干预组脑损伤面积为(23 ± 5)%, 较生理盐水对照组(52 ± 12)%明显降低, $P < 0.01$; MK-801 干预组 Caspase-3 及 HPP 阳性细胞数(65 ± 8)/高倍视野, (61.6 ± 11.5)/高倍视野, 与对照组(40 ± 6.7)/高倍视野, (12.6 ± 5.2)/高倍视野相比均明显减少, 其中 HPP 阳性细胞数减少比 Caspase-3 阳性细胞数减少更明显。结论 MK-801 能明显抑制 Caspase-3 的激活, 减少神经元的凋亡, 减轻缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的程度。

[关键词] 脑缺氧缺血; 凋亡; 半胱天冬酶-3; NMDA 受体; MK-801; 发夹探针; 新生大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)03-0236-03

Effect of MK-801 on Caspase-3 Activation and Apoptosis after Cerebral Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Rats

ZHU Chang-Lian, WANG Xiao-Yang

Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Henan Medical University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: **Objective** To study the effect of MK-801, the antagonist of NMDA receptor, on caspase-3 activation and apoptosis after cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal rats. **Methods** Seven-day-old rat pups were injected with either 0.5 mg/kg MK-801 or normal saline immediately after cerebral hypoxic-ischemic injury (HI). The pups were killed 24 h after the injection. Brain damage was evaluated using MAP-2 immunostaining. Caspase-3 activation was examined using anti-p17 subunit antibody. Apoptosis was examined by in situ labeling of hairpin probe (HPP). The infarction area was calculated according to MAP-2 staining. Active caspase-3 cells and HPP positive cells were counted in the MAP-2 negative area of the cortex. **Results** The infarction area was reduced from (52 ± 12)% to (23 ± 5)% after the treatment with MK-801. A few caspase-3 and HPP positive cells were also found in the cortex of normal rat brains. The number of positive cells reached a peak at 24 h after HI. Both the number of caspase-3 (from 65 ± 8 to 40 ± 6.7 per high power visual field) and HPP (from 61.6 ± 11.5 to 12.6 ± 5.2 per high power visual field) positive cells were decreased after the treatment with MK-801. **Conclusions** MK-801 inhibits caspase-3 activation and reduces the number of apoptotic cells. NMDA is involved in the activation of the apoptotic process in the immature brain after HI.

Key words: Cerebral hypoxic-ischemic injury; Caspase-3; Apoptosis; NMDA receptor; MK-801; Hairpin probe (HPP); Neonatal; Rat

N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体通过介导钙离子内流在缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的发病中起

重要作用, NMDA 受体的拮抗剂 MK-801 能明显减轻 HIBD^[1], 但其它研究发现, MK-801 能增加未成

[收稿日期] 2000-08-09; [修回日期] 2000-12-07
[作者简介] 朱长连(1964-), 男, 博士, 教授, 科主任。

熟脑神经细胞的凋亡^[2]。凋亡是神经系统发育过程中的生理现象,但在缺氧缺血(HI)的病理过程中也有大量凋亡存在,其中半胱天冬酶-3(Caspase-3)的激活在凋亡的病理过程中起关键作用^[3],而MK-801对Caspase-3激活的影响如何尚未见报道。本研究将探讨MK-801对新生儿HIBD的保护作用及对Caspase-3激活和神经细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 缺氧缺血(HI)模型的制作

新生7日龄Wistar大鼠,雌雄兼有,氟烷吸入麻醉,分离并结扎左颈总动脉后,局部切口进行浸润麻醉,缝合皮肤伤口后,放回到母鼠恢复60 min,整个麻醉时间为10 min,而后将大鼠放入充有湿化的含氧7.7%的氮氧混合气36℃恒温箱55 min^[4]。

1.2 分组及给药方案

HI后即刻实验组($n=6$)给予腹腔注射MK-801 0.5 mg/kg(Sigma),对照组($n=6$)给予生理盐水腹腔注射,而后将新生大鼠放回到母鼠恢复其生理状态。在HI后24 h苯巴比妥腹腔注射麻醉,经心脏灌注4%甲醛-磷酸盐缓冲液(0.1 M pH 7.2)5 min,而后快速分离取出大脑,在上述灌注缓冲液中4℃浸润固定24 h,经过等级乙醇和二甲苯脱水后,石蜡包埋,冠状切片,厚度为5 μ m,用于组织学检查。

1.3 微管相关蛋白-2(MAP-2)免疫组织化学染色

组织切片经过固定及脱石蜡处理后,10 mM, pH 6.0枸橼酸盐缓冲液煮沸处理10 min,用4%马血清PBS阻断非特异性反应30 min, PBS洗涤3次后,与抗MAP-2单克隆抗体(Sigma, 4 μ g/ml)室温孵育60 min, PBS洗涤后与生物素标记的马抗鼠二抗(2 μ g/ml)室温孵育60 min,内源性过氧化物酶的活性用3% H_2O_2 作用5 min阻断。显色用ABC试剂盒及0.5 mg/ml二氨基联苯胺(DAB)(Sigma), 15 mg/ml硫酸镍胺, 2 mg/ml β -D-葡萄糖, 0.4 mg/ml氯化铵和0.01 mg/ml β -葡萄糖氧化酶(Sigma)。

1.4 Caspase-3免疫组化染色

组织切片经过固定及脱石蜡处理后,用10 μ g/ml蛋白酶K在室温下处理10 min,而后用10 mM, pH 6.0枸橼酸盐缓冲液煮沸处理10 min,用4%羊血清PBS阻断非特异性反应。兔抗鼠Caspase-3活性片段p17抗体(Merck Frosst)(1:500)在室温下孵育60 min, PBS洗3次后用生物素标记的羊抗兔二抗(6 μ g/ml)在室温下使用60 min,内源性过氧化物

酶的活性用3% H_2O_2 作用5 min。显色用ABC Elite试剂盒。特异性试验包括用PBS代替一抗;

用过量的重组活性Caspase-3(MBL, Nagoya, Japan)预先吸附一抗。

1.5 发夹寡核苷酸探针(HPP)原位杂交^[5]

石蜡切片先进行脱蜡及脱水处理,而后在65 mM枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)孵育90 min, PBS洗5 min $\times 3$ 次,用25 μ g/ml蛋白酶K-PBS在室温下处理10 min。PBS洗3次后,在每一组织上加30 μ l杂交溶液(50 mM Tris-HCl, pH 7.8; 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 15% FEG 6000, 35 μ g/ml HPP及250 U/ml T4 DNA连接酶),在室温下孵育2 h,用3% H_2O_2 -PBS孵育5 min阻断内源性过氧化物酶。杂交结果用ABC试验盒(Vector, CA)和0.05% DAB(Sigma)显色。非特异性标记通过省去T4 DNA连接酶进行观察。

1.6 脑损伤程度的评价

脑损伤的评价依赖MAP-2染色, MAP-2阴性区域表示脑损伤。脑损伤程度的计算通过公式: $[1 - (\text{损伤侧MAP-2阳性区域面积} / \text{对侧面积})] \times 100\%$ 。

1.7 细胞计数及图像分析

染色结果用Nikon光学显微镜观察,图像经Photoshop处理。定量分析Caspase-3和HPP阳性细胞,在皮层MAP-2阴性区随机取3个视野(0.067 mm^2)计数阳性细胞,取平均值。

1.8 统计学处理

采用Mann-Whitney U检验, $P < 0.05$ 为显著性差异的指标。

2 结果

2.1 MK-801对脑损伤面积的影响

MK-801治疗组HI侧大脑皮层损伤面积为(23 $\pm$ 5)%,生理盐水对照组脑皮层损伤面积为(52 $\pm$ 12)%,两组相比差异有显著性意义, ($P < 0.01$)。

2.2 MK-801对Caspase-3激活的影响

正常对照组大脑皮层可见少量阳性细胞, HI后损伤侧大脑皮层Caspase-3阳性细胞数为(65 $\pm$ 8)/高倍视野,明显高于对侧皮层的阳性细胞数。MK-801处理后, Caspase-3阳性细胞数明显降低为(40 $\pm$ 6.7)/高倍视野,与HI组相比有明显差异性($P < 0.01$)(图1)。

2.3 MK-801对神经元凋亡的影响

正常对照组大脑皮层很难发展HPP阳性细胞,

而在 HI 后 24 h 损伤侧大脑皮层阳性细胞数明显增加为 (61.6 ± 11.5) /高倍视野,经 MK-801 处理后,损伤侧阳性细胞明显减少为 (12.6 ± 5.2) /高倍视野,与生理盐水对照组相比有明显差异性, ($P < 0.01$)。

2.4 脑损伤与 Caspase-3, HPP 阳性细胞的关系

HPP 阳性细胞分布在 MAP-2 阴性区域即脑损伤区域,而 Caspase-3 阳性细胞除主要分布在 MAP-2 阴性区域外,在脑损伤的边沿区域也可见 Caspase-3 阳性细胞。

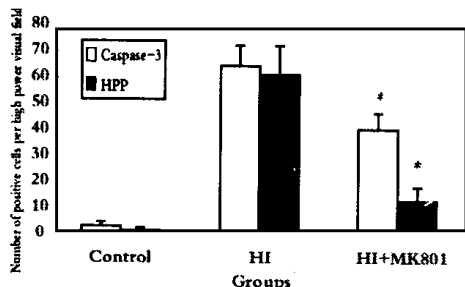


图1 Caspase-3 及 HPP 阳性细胞计数直方图

Figure 1 Bar graphs showing the average number of Caspase-3 and HPP positive cells in the cortex of MAP-2 negative area

3 讨论

MAP-2 是维持正常神经元细胞骨架和结构完整的重要部分。在 HI 等病理情况下蛋白酶被激活,导致 MAP-2 降解,细胞完整性受到破坏,细胞损伤。动态观察发现,MAP-2 免疫活性丧失提示神经元正在经历不可逆转的死亡过程,最终导致细胞死亡。因此,MAP-2 免疫组化染色阴性的区域正是脑损伤的区域,MAP-2 被认为是脑损伤的敏感标志,是用来计算脑损伤面积和体积的重要依据^[6]。本研究中新生 7 日龄大鼠在 HI 后给予 MK-801 处理后能明显减轻脑损伤面积,提示 MK-801 对 HI 引起的脑损伤有保护作用。

HI 引起的神经细胞损伤包括坏死和凋亡,凋亡的发生与 Caspase-3 的激活有关^[7]。MK-801 作为 NMDA 受体拮抗剂对脑损伤的保护作用与其拮抗兴奋性氨基酸激活 NMDA 受体的兴奋毒性有关^[8],但是 Ikonomidou 报道^[2] MK-801 0.5 mg/kg $\times$ 3 次能引起 7 日龄新生大鼠广泛的神经元凋亡。在本研究中给予单一剂量 MK-801 能明显降低 HPP 阳性

细胞数即凋亡细胞数,同时能抑制 Caspase-3 的激活,其中对凋亡的影响更明显,提示 NMDA 受体的激活可以导致细胞凋亡,除与 Caspase-3 激活相关外,还有其它因素参与神经元的凋亡过程。

HPP 是被用来检测 DNA 双链断裂的敏感指标,是凋亡的一个标志^[9]。已有研究发现,在 HI 后 HPP 与 Caspase-3 阳性细胞分布高度一致,而 Caspase-3 阳性的出现要较 HPP 早,提示先用 Caspase-3 激活,而后出现 DNA 的断裂^[5]。MK-801 的治疗能明显降低 HPP 和 Caspase-3 阳性细胞数,而 HPP 的降低比 Caspase-3 更明显,提示 NMDA 受体激活也可通过非 Caspase-3 途径而导致神经细胞的凋亡。

致谢:本研究得到瑞典哥德堡大学围产医学中心 Blomgren 博士和 Puka Sundvall 博士的帮助。

[参 考 文 献]

- [1] Kang J, Bai KM, Wang BL, et al. Increased production of interleukin 4 in children with simple idiopathic nephrotic syndrome [J]. Clin Med J (Engl), 1994, 107(5): 347 - 350.
- [2] Cho BS, Lee CE, Pyun KH. Studies on the role of IL-4 and Fc ϵ R in the pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome [J]. J Korean Med Sci, 1992, 7(4): 343 - 347.
- [3] 王越. 人类 T_H 亚群研究进展 [J]. 国外医学免疫学分册, 1999, 22(4): 188 - 190.
- [4] Neuhaus TJ, Wadhwa M, Callard R, et al. Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) in steroid-sensitive nephrotic syndrome [J]. Clin Exp Immunol, 1995, 100(3): 475 - 479.
- [5] 李成荣, 杨锡强, 王莉佳, 等. 小儿激素敏感型肾病综合征辅助性 T 细胞亚群研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(4): 237 - 239.
- [6] Daniel V, Trautmann Y, Konrad M, et al. T-lymphocyte population, cytokines and other growth factors in serum and urine of children with idiopathic nephrotic syndrome [J]. Clin Nephrol, 1997, 47(5): 289 - 297.
- [7] Cheng Y, Deshmukh M, D Costa A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. J Clin Invest, 1998, 101(9): 1992 - 1999.
- [8] Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, et al. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro [J]. Neuroscience, 1995, 68(3): 615 - 619.
- [9] 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.

(本文编辑:曹励之)