

· 实验研究 ·

Calpain 抑制剂-3 对新生大鼠脑缺氧缺血后 海马 CA1 区 Caspase-3 表达和神经元凋亡的影响

陈莉娜¹, 姚裕家¹, 鄢波², 陈大鹏¹

(1. 四川大学华西第二医院儿科; 2. 四川大学华西医院神经内科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 钙依赖中性蛋白酶 Calpain 的活化可引起神经元凋亡, 其抑制剂-3 (MDL28170) 对成年动物脑缺血有治疗作用, 但尚不清楚 MDL28170 对新生动物缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 是否也有治疗作用。本研究观察了 MDL28170 对新生大鼠 HIBD 后海马 CA1 区 Caspase-3 表达及细胞凋亡的影响, 探讨其神经保护作用机制。方法 将 7 日龄新生 SD 大鼠随机分为 HIBD 模型组 ($n=40$)、干预组 ($n=40$) 及对照组 ($n=8$), 干预组在 HI 后 0 h、2 h、4 h 予腹腔注射 MDL28170 50 mg/kg, 模型组和对照组同时予腹腔注射生理盐水。干预组和模型组大鼠在 HI 后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 各处死 8 只, 用免疫组化染色和脱氧核糖核酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法 (TUNEL) 分别检测海马 CA1 区 Caspase-3 的表达和神经凋亡。结果 HIBD 组大鼠损伤侧海马 CA1 区 Caspase-3 阳性细胞在 HI 后 6 h 时较对照组增多 ($13.4 \pm 3.5/\text{HP}$ vs $2.6 \pm 0.6/\text{HP}$, $P=0.028$), 于 48 h ($27.1 \pm 4.1/\text{HP}$) 达到高峰, 72 h 仍高于对照组 ($22.6 \pm 4.8/\text{HP}$, $P<0.001$); TUNEL 阳性细胞于 HI 后 6 h 开始增多, 12 h 时与对照组比较差别有显著性 ($25.0 \pm 1.7/\text{HP}$ vs $2.3 \pm 1.5/\text{HP}$, $P<0.001$), 48 h ($67.8 \pm 2.6/\text{HP}$) 到达高峰, 72 h 仍处于较高水平 ($44.3 \pm 6.8/\text{HP}$)。MDL28170 干预可明显减少 Caspase-3 及 TUNEL 阳性细胞数量, 与模型组比较 48 h 内差异有显著性, 72 h 以后作用不明显。结论 MDL28170 可通过抑制海马 CA1 区 Caspase-3 的表达, 减少脑细胞凋亡, 起到脑保护作用。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(5): 443-446]

[关键词] 缺氧-缺血, 脑; 半胱氨酸天冬酶-3; 凋亡; Calpain 抑制剂-3; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)05-0443-04

Effect of Calpain inhibitor-3 on Caspase-3 expression and neuronal apoptosis in hippocampal CA1 region of neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage

Li-Na CHEN, Yu-Jia YAO, Bo YAN, Da-Peng CHEN. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Yao Y-J, Email: yjyao2002@163.com)

Abstract: Objective Activation of calcium-dependent neutral proteinase, Calpain, can induce apoptosis of neuron and Calpain inhibitor-3 (MDL28170) has protective effects against brain ischemia in adult animals. Whether it also has protective effects on neonatal animals with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) is has not been determined. In this study, the effect of MDL28170 on Caspase-3 expression and apoptosis in hippocampal CA1 region of neonatal rats after HIBD was examined to explore its neural protective effect on neonatal animals and the possible underlying mechanism. **Methods** Seven-day-old Sprague-Dawley rat pups were randomly assigned into three groups: HIBD ($n=40$), MDL ($n=40$) and Control ($n=8$). The pups in the first two groups were subjected to unilateral ligation of the right carotid artery followed by 2 hrs of hypoxia (8% O_2). The pups in the MDL group were intraperitoneally injected with MDL28170 (50 mg/kg) at 0, 2 and 4 hrs after hypoxia-ischemia (HI), while those in the Control and HIBD groups were intraperitoneally injected with normal saline instead. The rats in the HIBD and MDL groups were sacrificed at 6, 12, 24, 48 and 72 hrs after HI (8 rats in each group at each time point). Immunohistochemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick end labeling staining (TUNEL) were used to detect the Caspase-3 expression and neuronal apoptosis in hippocampal CA1 region. **Results** In the HIBD group, Caspase-3 expression in hippocampal CA1 region increased at 6 hrs after HI compared with the Control group ($13.4 \pm 3.5/\text{HP}$ vs $2.6 \pm 0.6/\text{HP}$, $P=0.028$), peaking at 48 hrs ($27.1 \pm 4.1/\text{HP}$) and remaining higher at 72 hrs ($22.6 \pm 4.8/\text{HP}$, $P<0.001$). The number of TUNEL-positive neurons in the HIBD group increased at 6 hrs after HI, and were significantly greater than those of the Control group at 12 hrs ($25.0 \pm 1.7/\text{HP}$ vs 2.3 ± 1.5 , $P<0.001$). At 48 hrs after HI, the number of TUNEL-positive neurons peaked ($67.8 \pm 2.6/\text{HP}$)

[收稿日期] 2005-04-24; [修回日期] 2005-06-12

[作者简介] 陈莉娜 (1978-), 女, 博士研究生, 医师。主攻方向: 新生儿疾病。

[通讯作者] 姚裕家, 四川大学华西第二医院儿科, 邮编: 610041。

and remained greater at 72 hrs ($44.3 \pm 6.8/\text{HP}$). The treatment with MDL28170 attenuated the Caspase-3 expression and reduced the number of TUNEL-positive neurons within 48 hrs after HI when compared with the HIBD group ($P < 0.05$), but the effect significantly decreased at 72 hrs. **Conclusions** MDL28170 can inhibit the Caspase-3 expression and reduce the apoptotic cells in hippocampal CA1 region, thereby yielding protective effects against HIBD in neonatal rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(5):443-446]

Key words: Hypoxia-ischemia, brain; Caspase-3; Apoptosis; Calpain inhibitors-3; Rats

围产期缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain damage, HIBD)是引起新生儿死亡和儿童致残的主要原因之一,目前对此尚缺乏满意的治疗手段。在HIBD的发病机制中,细胞内 Ca^{2+} 持续增高是导致神经元死亡的关键因素。细胞内 Ca^{2+} 超载可激活钙依赖中性蛋白酶Calpain及Caspase-3,引起神经元的凋亡和坏死^[1,2]。Calpain抑制剂能抑制Calpain的活化,近年来成为抗脑缺血药物研究热点。Calpain抑制剂-3,即MDL28170,能通过血脑屏障,可通过静脉或腹腔给药。在不同的动物模型中,它均能明显缩小全脑或局灶性脑缺血的梗塞体积,减轻脑水肿程度,减少凋亡,表现神经保护作用^[3-5]。但MDL28170对新生动物HIBD是否也有保护作用,国内外研究甚少。本实验建立新生大鼠HIBD模型,探讨MDL28170对HIBD的保护作用及对海马CA1区Caspase-3表达和神经细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

新生7日龄SD大鼠,雌雄不限,体重12~15 g,由四川大学动物实验中心提供。Caspase-3兔多克隆抗体及SABC试剂盒购自武汉博士德公司,DAB显色剂购自北京中山生物技术有限公司,TUNEL试剂盒购自罗氏公司,MDL28170购自美国Sigma公司。其余试剂为化学纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠HIBD模型的建立 新生大鼠乙醚麻醉后,取颈正中切口,分离并永久结扎右颈总动脉,缝合皮肤后放回母鼠身边恢复60 min,整个手术于10~15 min内完成。而后将大鼠放入36℃低氧箱中,通入氮氧混合气(含8% O_2 , 92% N_2) 2 h,保持湿度为75%。

1.2.2 分组及处理 将新生7天SD大鼠随机分为3组:正常对照组($n=8$),HIBD组($n=40$),MDL组($n=40$)。HIBD和MDL组大鼠予以脑缺氧缺血。MDL组在HI后0 h、2 h、4 h均给予腹腔注射50 mg/kg MDL28170(浓度为10 g/L,溶剂为体积比为1:1的二甲亚枫/聚乙二醇300)^[3]。HIBD组与

对照组同时予腹腔内注射0.1 mL生理盐水。给药后将新生大鼠放回母鼠旁恢复。

HIBD和MDL组在HI后6 h、12 h、24 h、48 h、72 h各取8只大鼠,苯巴比妥腹腔注射麻醉,分别经心脏灌注生理盐水和4%多聚甲醛缓冲液各20 mL,而后完整取出大脑,4℃下置于4%多聚甲醛缓冲液中浸润固定,48~72 h后常规脱水,透明,浸蜡,包埋,从海马背侧中部作连续冠状切片(6 μm),标本用作组织学检查。对照组大鼠与HIBD组6 h亚组同时处死。

1.2.3 Caspase-3免疫组化染色 组织切片经常规脱蜡,水化,微波修复,阻断内源性过氧化氢酶和非特异性反应,滴加兔抗鼠Caspase-3多克隆抗体(1:500)4℃过夜。洗涤后分别滴加生物素标记的羊抗兔二抗及过氧化物酶标记的SABC 37℃孵育30 min,3',3-二氨基联苯胺(DAB)显色苏木素复染,脱水,透明,加拿大树胶封片。

1.2.4 脱氧核糖核酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡 操作按试剂盒说明书进行。石蜡切片脱蜡至水后,蛋白酶K 37℃消化30 min,滴加标记混合液30 $\mu\text{L}/\text{片}$ 37℃反应60 min,滴加生物素化抗地高辛抗体37℃30 min,快红显色,苏木素复染,封片。

1.2.5 结果判定及统计分析 400倍光镜下观察海马CA1区Caspase-3和TUNEL阳性细胞数。结果以均值 $\pm$ 标准差表示,数据用SPSS10.0统计软件分析,多样本均数比较用单因素方差分析,多样本均数两两间比较采用 q 检验,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 MDL28170对海马CA1区Caspase-3表达的影响

正常对照组海马CA1区可见少量Caspase-3阳性细胞[(2.6 ± 0.6)/HP],HI后6 h Caspase-3阳性细胞数开始增加[(13.4 ± 3.5)/HP],随着时间延长阳性细胞逐渐增多,在HI后48 h达到高峰[(27.1 ± 4.1)/HP],72 h开始下降[(22.6 ± 4.8)/

HP],但仍明显高于对照组。MDL28170 处理后, Caspase-3 阳性细胞数较 HIBD 组明显减少,到 HI 后 48 h 差异仍显著 $[(13.6 \pm 2.4)/HP, P < 0.001]$,HI 后 72 h 保护作用不明显 $[(17.6 \pm 3.4)/HP, P = 0.094]$ 。见图 1,2。

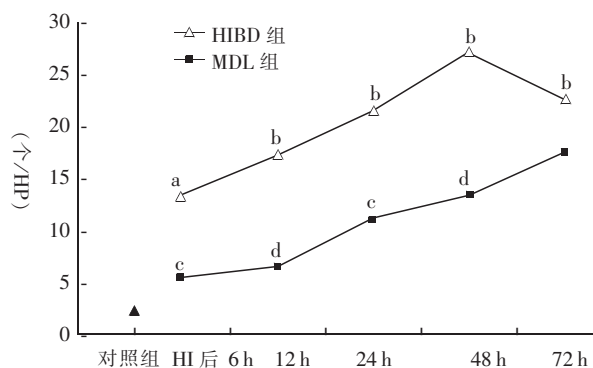


图1 各组海马 CA1 区 Caspase-3 阳性细胞数 ($n = 8$)。与对照组比较 a $P < 0.05$, b $P < 0.01$,与同时点 HIBD 组比较 c $P < 0.05$, d $P < 0.01$ 。

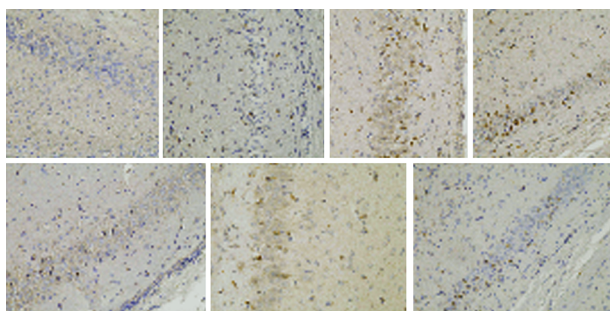


图2 MDL 28170 对海马 CA1 区 Caspase-3 表达的影响。正常对照组海马 CA1 区可见少量 Caspase-3 阳性细胞(图 A), HIBD 后 6 h 阳性细胞数开始增加(图 B),在 HI 后 48 h 达到高峰(图 C),72 h 开始下降(图 D)。MDL28170 处理后, Caspase-3 阳性细胞数较 HIBD 组明显减少(图 E~G,分别为 HI 后 6 h,48 h,72 h)。HI 后 72 h MDL 组和 HIBD 组差异不明显。

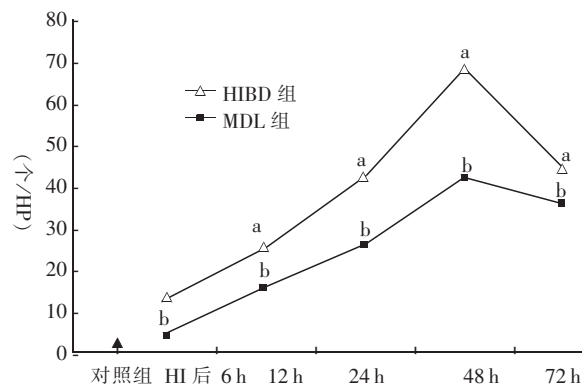


图3 各组海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞数 ($n = 8$)。与对照组比较 a $P < 0.01$,与同时点 HIBD 组比较 b $P < 0.05$ 。

2.2 MDL28170 对海马 CA1 区神经元凋亡的影响

正常组海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞少见 $[(2.3 \pm 1.5)/HP]$,HI 后 6 h CA1 区凋亡细胞明显增多 $[(13.2 \pm 4.4)/HP]$,HI 后 48 h 达到高峰 $[(67.8 \pm 2.6)/HP]$,72 h 开始下降 $[(44.3 \pm 6.8)/HP]$,但仍明显高于对照组。MDL28170 处理后,凋亡细胞较 HIBD 组明显减少,到 HI 后 48 h 差异仍显著 $[(42.0 \pm 6.2)/HP, P = 0.003]$,HI 后 72 h 保护作用不明显 $[(35.8 \pm 3.5)/HP, P = 0.117]$ 。见图 3。

3 讨论

新生儿缺氧缺血性脑病发病机制复杂,细胞内钙超载被认为是神经元损伤的中心环节。脑缺氧缺血时细胞内 Ca^{2+} 浓度剧增可激活多种 Ca^{2+} 依赖性的酶系。Calpain 是一个 Ca^{2+} 依赖性的半胱氨酸蛋白酶家族,通常以没有活性的酶前体形式存在于神经元内,胞内 Ca^{2+} 超过一定阈值时被激活。根据活化时所需的钙离子浓度不同 Calpain 分为 μ -Calpain 和 m-Calpain 两种类型,前者活化所需的钙浓度较低($\mu\text{mol/L}$),而后者要在钙浓度高时(mmol/L)时才被激活。激活后可水解多种细胞成分,如细胞骨架蛋白和各种酶,引起神经元损伤^[1,6]。

凋亡是细胞死亡的一种形式,脑细胞在生理状态下也存在凋亡现象,但在缺氧缺血时细胞凋亡增多,参与 HIBD 的发病过程。凋亡过程中一系列蛋白酶被激活,以往认为 Caspase 家族起了主导作用,近年来研究显示 Calpain 也参与了凋亡的发生。目前认为,中枢神经系统中这两种水解酶之间存在相互作用: Caspase 可水解 Calpain 的内源性抑制剂 Calpastatin 来增高 Calpain 的活性;同时在缺氧缺血后 Calpain 能激活 Caspase-3,促进凋亡^[6]。Calpain 和 Caspase 还有许多相同的底物,如细胞骨架蛋白、蛋白激酶及转录因子等,仅切割位点不同^[7]。

Calpain 的特异性抑制剂 MDL28170 是一种肽基醛类化合物,它对 μ -Calpain 和 m-Calpain 均有抑制作用。它能透过血脑屏障,体内半衰期为 2 h^[3]。Rami 等^[5]报道 MDL28170 能减少沙鼠短暂脑缺血后凋亡神经元数目。Buki 等^[8]报告在大鼠脑外伤前给予 MDL28170 能抑制减轻轴突损伤。本实验结果显示,新生大鼠 HI 后缺血侧海马 CA1 区有大量神经元凋亡,而用 MDL28170 干预后,凋亡细胞显著减少,证实了 Calpain 参与了新生鼠 HIBD 凋亡的发生以及 MDL28170 的脑保护作用。另外,正常对照

组海马 Caspase-3 表达较少,而 HIBD 组表达明显增加,用 MDL28170 干预后,Caspase-3 又显著减少,表明 MDL28170 还可以抑制 Caspase-3 的表达,减轻凋亡,发挥脑保护作用。MDL28170 的保护作用在 HI 后 72 h 不明显,可能与其半衰期短有关系。

综上所述,本实验证实新生大鼠 HIBD 后予腹腔注射 Calpain-3,即 MDL28170,有一定的脑保护作用,为临床寻求治疗新生儿缺氧缺血性脑病的有效手段提供了新治疗的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Blomgren K, McRae A, Elmered A, Bona E, Kawashima S, Saito TC, et al. The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic-ischemia[J]. Ann N Y Acad Sci. , 1997, 825:104-119.
- [2] Wang X, Karlsson JO, Zhu C, Bahr BA, Hagberg H, Blomgren K. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia[J]. Biol Neonate, 2001,79(3-4): 172-179.
- [3] Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR, et al. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 1998 ,29(1): 152-158.
- [4] Blomgren K, Hallin U, Andersson AL, Puka-Sundvall M, Bahr BA, McRae A, et al. Calpastatin is up-regulated in response to hypoxia and is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia[J]. J Biol Chem, 1999, 274 (20): 14046-14052.
- [5] Rami A, Agarwal R, Botez G, Winckler J. μ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic affects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage[J]. Brain Res, 2000,866(1-2):299-312.
- [6] Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA,et al . Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis" [J]? J Biol Chem, 2001, 276(13):10191-10198.
- [7] Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? [J]. Trends Neurosci, 2000, 23(1):20-26.
- [8] Buki A, Farkas O, Doczi T, Povlishock JT. Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL-28170 attenuates traumatically induced axonal injury[J]. J Neurotrauma,2003,20(3):261-268.

(本文编辑:钟乐)