

· 实验研究 ·

Caspase-1 及其激活的细胞因子 在发育期惊厥性脑损伤中的作用

毛定安, 殷群, 刘利群, 薄涛, 白海涛, 熊洁

(中南大学湘雅二医院儿科, 湖南 长沙 410011)

[摘要] 目的 半胱氨酸天冬氨酸酶(caspase)-1及其激活的细胞因子与许多疾病的炎症反应和凋亡有关,但与惊厥性脑损伤的关系目前尚不清楚。该研究旨在探讨 caspase-1 及其激活的细胞因子在发育期惊厥性脑损伤中的作用。方法 96只20日龄健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠随机分为2组:对照组和惊厥组。通过三氟乙醚反复吸入制作发育期大鼠惊厥动物模型。RT-PCR方法检测各组动物反复惊厥后6 h,1,3,7 d大脑皮层 caspase-1, IL-18, IL-1 β mRNA的表达,同时观察脑含水量变化和光镜下大脑皮层神经元病理改变,并对脑损伤进行神经病理半定量积分。结果 ①惊厥组各时间点大脑皮层 caspase-1, IL-18 mRNA的表达均较对照组显著增高($P < 0.05$ 或 < 0.01);而 IL-1 β mRNA的表达呈双峰样改变,反复惊厥后6 h,1 d,7 d表达量较对照组显著增高($P < 0.01$),第3天表达量与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$)。②惊厥后皮层神经元出现水肿和变性坏死,并可见炎症细胞浸润和凋亡细胞。③反复惊厥后6 h,1 d,3 d脑含水量均较对照组显著升高($P < 0.01$),第7天与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$);惊厥组各时间点脑损伤积分较对照组显著升高($P < 0.01$)。结论 caspase-1及其激活的细胞因子在发育期惊厥性脑损伤中发挥重要作用。 [中国当代儿科杂志,2006,8(2):133-136]

[关键词] 脑损伤;脑发育;惊厥;半胱氨酸天冬氨酸酶-1;白细胞介素-18;白细胞介素-1 β ;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0133-04

Role of caspase-1 and cytokines activated by caspase-1 in brain injury of the developing rats following recurrent seizures

MAO Ding-An, YIN Qun, LIU Li-Qun, BO Tao, BAI Hai-Tao, XIONG Jie. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011 (Email: mda5611@sina.com)

Abstract: Objective The expressions of caspase-1 and cytokines activated by caspase-1 are associated with the pathophysiology of many diseases for its proinflammatory and proapoptotic peculiarity. However its relationship to brain injury of developing rats following recurrent seizures has not yet been identified. This study aimed to investigate the role of caspase-1 and cytokines activated by caspase-1 in brain injury of developing rats following recurrent seizures. **Methods** A total of 96 postnatal 20 day Sprague-Dawley rats were randomly assigned into Control and Seizure groups. Seizures were induced in the Seizure group by flurothyl inhalation daily for six days. Brain tissues were sampled at 6 hrs, and at 1, 3, and 7 days after last seizure. The expressions of caspase-1, interleukin (IL)-18 and IL-1 β mRNA in the cerebral cortex were detected by RT-PCR. The water content of the brain and the pathological changes of cortex nerve cells were observed. Brain injury was evaluated using a semiquantitative neuropathological scoring system. **Results** The levels of caspase-1 and IL-18 mRNA in the cerebral cortex of the Seizure group were obviously higher than those in the Control group at 6 hrs, and at 1, 3, and 7 days after seizure ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of IL-1 β mRNA in the Seizure group exhibited a biphasic pattern: increased significantly at 6 hrs, and at 1 and 7 days post-seizure ($P < 0.01$), but was not significantly different from the Control group at 3 days post-seizure. Edema, degeneration and necrosis of nerve cells in cerebral cortex, accompanying by inflammatory cell infiltration and apoptosis of nerve cells, were observed under a light microscope in the Seizure group after recurrent seizures. The water content of the brain in the Seizure group increased significantly compared with that in the Control group at 6 hrs, and at 1 and 3 days after recurrent seizures ($P < 0.01$). The Seizure group had significantly higher neuropathological scores than the Control group at each time point ($P < 0.01$). **Conclusions** Caspase-1 and cytokines activated by caspase-1 play an important role in the developing brain injury after recurrent seizures. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2):133-136]

Key words: Brain injury; Brain development; Seizure; Caspase-1; Interleukin-18; Interleukin-1 β ; Rats

[收稿日期]2005-08-30;[修回日期]2005-11-17

[作者简介]毛定安,男,博士,教授,主任医师。主攻方向:小儿神经系统疾病。

半胱氨酸天冬氨酸酶(caspase)-1,是caspase超家族的重要成员,被认为与机体的炎症反应和凋亡有关。在组织损伤过程中它可通过催化生成有活性的细胞因子IL-18和IL-1 β ,进一步发挥致炎促损伤等生物学效应。研究证实,caspase-1,IL-18,IL-1 β 与缺氧缺血性脑损伤密切相关^[1~3],但与发育期惊厥性脑损伤的关系尚未见文献报道。本实验旨在通过发育期大鼠惊厥模型的建立,观察反复惊厥后大脑皮层caspase-1,IL-18,IL-1 β 的表达变化及脑含水量和脑组织病理改变,探讨其在发育期惊厥性脑损伤发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

20日龄健康SD大鼠96只(中南大学湘雅二医院实验动物中心提供),雌雄各半,随机分为2组,对照组和惊厥组。两组大鼠在末次惊厥后再随机分为6h,1d,3d和7d等4个时相点,每个时相点12只动物。6只用于caspase-1,IL-18,IL-1 β mRNA的检测,6只用于脑组织病理形态学观察。对照组大鼠除不吸入三氟乙醚外,其他处理与惊厥组相同。

1.2 三氟乙醚致大鼠惊厥模型的制备

将20日龄大鼠放入一个长方形的实验舱(30cm×20cm×20cm)内,通过舱顶注射孔将液体的三氟乙醚(Aldrich公司)0.1mL缓慢滴入舱内滤纸上,封闭舱顶。从大鼠出现惊厥开始计时,惊厥30min后取出大鼠,观察大鼠恢复情况。大鼠每天诱导惊厥1次,连续6d。对照组大鼠除不吸入三氟乙醚外,其他处理与惊厥组相同。

1.3 主要实验试剂及引物

Trizol试剂由GIBCO BRL公司提供,cDNA逆转录试剂盒、TaqDNA聚合酶及dNTP Mix脱氧核苷酸混合物皆由美国Promega公司提供。caspase-1,IL-18,IL-1 β 及GAPDH引物皆由北京奥科生物有限公司设计合成,引物序列如下:caspase-1(扩增产物长度313bp),上游5'-CAG GAG GGA ATA TGT GGG ATC A-3',下游5'-GGA CAG GAT GTC TCC AGG ACA C-3';IL-18(扩增产物长度289bp),上游5'-CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3',下游5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3';IL-1 β (扩增产物长度334bp),上游5'-CTC GTG CTG TCT GAC CCA TGT-3',下游5'-GCT CTG CTT GAG AGG TGC TGA-3';GAPDH(扩增产物长度451bp),上游5'-CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3',下游5'-TCC ACC

ACC CTG TTG CTG TAG-3'。

1.4 实验方法

1.4.1 半定量RT-PCR检测大脑皮层caspase-1,IL-18,IL-1 β mRNA表达 两组大鼠于相应时间点断头取脑,分离右侧大脑皮层,置冻存管,存于液氮中备用。采用Trizol总试剂进行大脑皮层总RNA提取后逆转录合成cDNA第一链,在DNA循环合成仪上进行PCR扩增,1.5%的琼脂糖凝胶电泳。应用凝胶成像分析系统对条带扫描分析,计算caspase-1,IL-18及IL-1 β RT-PCR产物条带平均光密度值,以GAPDH作为内参照,将caspase-1,IL-18及IL-1 β 条带光密度值与相应GAPDH光密度值比较,得出caspase-1,IL-18及IL-1 β mRNA的相对含量。

1.4.2 脑组织病理形态学观察 固定大鼠,切开胸腔,暴露心脏,剪开右心耳,穿刺针经左心室穿至主动脉,生理盐水缓慢灌流冲洗至流出液清亮,肝脏呈灰白色,再予4%多聚甲醛缓冲液(4℃预冷,pH值7.4)50mL心脏灌注,肝脏变白、四肢及尾部出现肌肉颤动表示灌流成功。然后断头开颅,取双侧大脑半球置于4%多聚甲醛液中固定24h后常规石蜡包埋,从视交叉处做连续冠状切片5张,4 μ m厚,苏木素-伊红染色镜检,观察神经元病理改变。

1.4.3 脑组织含水量测定 动物断头处死后,尽快取出大脑,用滤纸吸尽脑表面的血渍后,锐性分离左侧大脑皮层后部全层脑组织及部分海马约100mg,置于已称重的带盖玻璃称样杯中,用电子分析天平(分度值0.1mg)称湿重后,置于110℃恒温干燥箱内烤干24~36h至恒重(两次称样差别 $\leq$ 0.2mg),称干重后,用Elliot公式计算各时相点脑含水量百分率。脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.4.4 脑损伤积分评定 脑组织切片进行常规苏木素-伊红染色,采用神经病理半定量积分法^[4],将皮层损伤分为0~4级,0级没有可见的损伤,4级梗塞包括皮层的大部分,海马、纹状体和丘脑损伤分为萎缩(0~3级)和可见的细胞损伤/梗塞(0~3级)。以上4个区域总的积分是0~22分。

1.5 统计学方法

所有数据采用SPSS11.5统计软件进行。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 示差异有显著性。

2 结果

2.1 两组大脑皮层caspase-1,IL-18,IL-1 β mRNA

的表达变化

对照组大鼠皮层仅有少量 caspase-1, IL-18, IL-1 β mRNA 表达, 反复惊厥后 6 h 与对照组相比 caspase-1, IL-18 mRNA 表达量显著增高 ($P < 0.05$), 第 1~7 天进行性增加, 与对照组及惊厥后 6 h 相比, 在统计学上差异有显著性 ($P < 0.01$), 表达的高峰位于惊厥后第 7 天; 而 IL-1 β mRNA 的表达呈双峰样改变, 反复惊厥后 6 h, 1 d, 7 d 表达量均较对照组显著增高 ($P < 0.01$), 表达的高峰位于惊厥后第 1 天, 第 3 天表达量与对照组相比在统计学上差异无显著性 ($P > 0.05$)。结果见表 1, 图 1~3。

表 1 两组大鼠大脑皮层 caspase-1, IL-18, IL-1 β mRNA 表达的平均光密度比值 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	caspase-1 mRNA	IL-18 mRNA	IL-1 β mRNA
对照组			
6 h	0.17 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.06
1 d	0.18 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.07
3 d	0.20 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02
7 d	0.18 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.07
惊厥组			
6 h	0.25 $\pm$ 0.05 ^a	0.26 $\pm$ 0.04 ^a	0.40 $\pm$ 0.06 ^b
1 d	0.67 $\pm$ 0.06 ^b	0.66 $\pm$ 0.08 ^b	0.64 $\pm$ 0.05 ^b
3 d	0.77 $\pm$ 0.05 ^b	0.96 $\pm$ 0.05 ^b	0.15 $\pm$ 0.02
7 d	0.89 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.13 ^b	0.35 $\pm$ 0.04 ^b

与对照组相应时间点比较 a $P < 0.05$, b $P < 0.01$

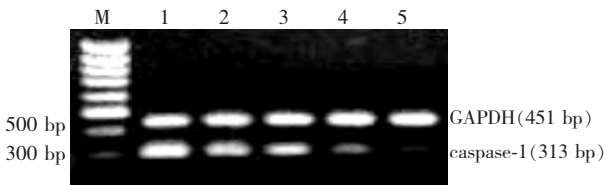


图 1 两组大鼠大脑皮层 caspase-1 mRNA 表达。M: marker; 1: 惊厥组 7 d; 2: 惊厥组 3 d; 3: 惊厥组 1 d; 4: 惊厥组 6 h; 5: 对照组

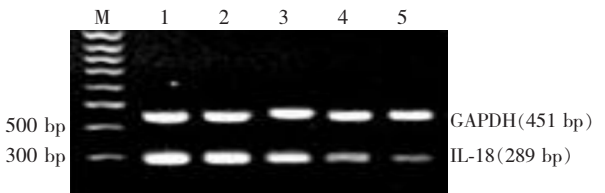


图 2 两组大鼠大脑皮层 IL-18 mRNA 表达。M: marker; 1: 惊厥组 7 d; 2: 惊厥组 3 d; 3: 惊厥组 1 d; 4: 惊厥组 6 h; 5: 对照组



图 3 两组大鼠大脑皮层 IL-1 β mRNA 表达。M: marker; 1: 惊厥组 7 d; 2: 惊厥组 3 d; 3: 惊厥组 1 d; 4: 惊厥组 6 h; 5: 对照组

2.2 脑组织病理学变化

对照组大鼠皮层神经元细胞结构清楚, 未见水肿及神经元变性坏死, 细胞核染色较均匀, 弱嗜碱性呈淡蓝色。反复惊厥后 6 h 神经元出现水肿和变性坏死; 惊厥后第 1~3 天神经元水肿及变性坏死显著, 有空泡变, 核结构不清, 固缩深染, 可见凋亡细胞; 第 7 天神经元水肿及变性坏死减轻, 有大量炎性细胞浸润, 胶质细胞增生明显。苏木素-伊红染色结果见图 4。

2.3 两组大鼠脑含水量变化

惊厥组大鼠脑含水量于末次惊厥后 6 h, 1 d, 3 d 均较对照组显著增高 ($P < 0.01$), 惊厥后 7 d 两组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

2.4 脑组织损伤积分的评定

惊厥组脑损伤积分于末次惊厥后 6 h, 1 d, 3 d, 7 d 均较对照组显著升高 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 两组大鼠脑含水量变化及脑损伤积分

($n=6$)

组别	脑含水量 (%)	脑损伤积分 ($\bar{x} \pm s$)
对照组		
6 h	78.01 $\pm$ 0.58	0
1 d	77.76 $\pm$ 1.14	0
3 d	78.02 $\pm$ 0.79	0
7 d	77.57 $\pm$ 0.82	0
惊厥组		
6 h	79.40 $\pm$ 0.46 ^a	4.60 $\pm$ 0.71 ^a
1 d	81.19 $\pm$ 1.04 ^a	9.85 $\pm$ 0.63 ^a
3 d	80.03 $\pm$ 0.77 ^a	12.25 $\pm$ 0.76 ^a
7 d	77.88 $\pm$ 0.94	11.07 $\pm$ 0.93 ^a

a 与对照组相应时间点比较 $P < 0.01$

3 讨论

caspase-1 基因是在人类 cDNA 文库查找线虫细胞死亡蛋白 CED-3 基因时发现的, 与细胞因子的成熟和细胞的生长分化过程密切相关。因为它可以催化前白细胞介素 1 β (IL-1 β) 转化为活性分子, 最初曾被命名为 IL-1 β 转换酶 (Interleukin-1 β converting enzyme, ICE)。另外, IL-18 与 IL-1 β 的结构和功能有明显相似性, ICE 也可使 IL-18 裂解为其活性形式。动物实验证实, caspase-1 及其激活的细胞因子广泛分布在新生鼠的脑组织中, 在新生鼠缺氧缺血性脑病中发挥重要作用^[1]。

本研究发现惊厥组大鼠各时间点大脑皮层 caspase-1 mRNA 表达均显著高于对照组, 表达的高峰日惊厥后第 7 天。与此同时, 脑损伤神经病理半

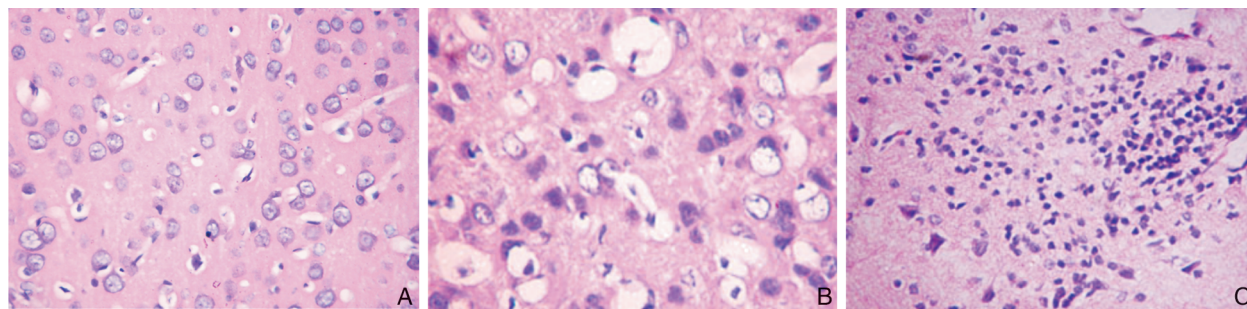


图4 对照组及惊厥组第3,7天脑组织病理学改变(苏木素-伊红×400)。A:对照组大脑皮层神经元未见病理改变,细胞结构清楚,未见水肿及神经元变性坏死,细胞核染色均匀;B:惊厥组第3天:大脑皮层神经元水肿、变性坏死显著,部分细胞空泡变,细胞核大小不一,部分浓缩凝固;C:惊厥组第7天脑组织有大量炎性细胞浸润,伴有胶质细胞增生。

定量积分明显升高,皮层神经元发生病理损害,以末次惊厥后3 d改变最显著。且 caspase-1 mRNA 的表达增高趋势与脑损伤积分升高的趋势一致,提示 caspase-1 参与了惊厥后脑损伤的发生发展过程,且主要在介导迟发性神经元死亡方面起着重要的作用。

IL-1 β 是一种淋巴细胞激活因子及单核细胞因子,与 TNF- α 一起能诱导 IL-6 和 IL-8 产生,引起发热、惊厥等。脑室内注射 IL-1 β 能引起大脑内炎症反应、中枢神经系统的细胞死亡和血管源性脑水肿^[5]。本研究显示惊厥组脑含水量、大脑皮层 IL-1 β mRNA 的表达在末次惊厥后 6 h 较对照组已明显增高,第 1 天表达量更高,而且脑含水量升高的程度与 IL-1 β 表达的趋势一致。同时皮层神经元病理形态亦发生类似的变化趋势,末次惊厥后 6 h 皮层神经元出现水肿、变性坏死,惊厥后 1 d 神经元水肿及变性坏死显著,表明 IL-1 β 在惊厥早期即被诱导合成,过度产生的 IL-1 β 可导致脑水肿和神经元病理损害。本研究还发现 IL-1 β mRNA 的表达在末次惊厥后第 1 天显著增加,第 3 天基本恢复正常,而第 7 天又显著增加。而脑组织神经元变性坏死却于第 7 天减轻,胶质细胞增生明显,提示 IL-1 β 在惊厥性脑损伤中可能存在着双向、多样性效应^[6]。IL-1 β 在早期过量的表达,加剧脑内炎症反应介导脑损伤,而后期适量表达可能对脑损伤有保护作用。

IL-18 是一种新的促炎症细胞因子,IL-18 和 caspase-1 在脑缺氧缺血后表达的时间和分布上密切相关,与 IL-1 β 相比,IL-18 可能是 caspase-1 更佳的作用底物。本研究发现惊厥后大脑皮层 IL-18 mRNA 于末次惊厥后 6 h 开始明显表达,第 7 天表达量最高,与 caspase-1 mRNA 表达的时程规律基本一致。Wang 等^[7]发现 caspase-1 基因缺陷鼠中没有

活性的 IL-18 和 IL-1 β 的合成,脑损伤程度较野生鼠减轻,提示 caspase-1 介导脑损伤是通过活化 IL-18 和 IL-1 β 而实现的。本研究还发现,惊厥组 IL-18 mRNA 表达显著升高,同时脑损伤神经病理半定量积分持续升高,脑组织病理损害显著,惊厥后第 1~3 天神经元水肿及变性坏死显著,直至第 7 天神经元变性坏死仍然存在,伴有炎性细胞浸润。且 IL-18 mRNA 表达的趋势与脑损伤神经病理半定量积分升高的趋势一致,提示后期的 IL-18 持续异常高表达,可能加剧了脑内炎症反应,对脑组织造成严重的损害,也提示 IL-18 主要在 caspase-1 介导的迟发性脑损伤的发病机制中发挥了重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Hedtjarn M, Leverin AL, Eriksson K, Blomgren K, Mallard C, Hagberg H. Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury[J]. J Neurosci, 2002, 22(14): 5910-5919.
- [2] 辛玥,初桂兰. 缺氧缺血新生大鼠脑组织 caspase-1 白细胞介素-18mRNA 表达及其关系探讨[J]. 中华儿科杂志,2005,43(8):568-571.
- [3] 汤亚南,赵凤临. Caspase-1 与围产期缺氧缺血性脑损伤[J]. 中国当代儿科杂志,2002,4(1):75-77.
- [4] Bona E, Hagberg H, Loberg EM, Bagenholm R, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome[J]. Pediatr Res, 1998, 43(6):738-745.
- [5] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1 beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema[J]. J Neurosurg, 2000, 92(1):108-120.
- [6] Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection[J]. J Neural Transm Suppl, 2000, 59(Suppl): 81-89.
- [7] Wang J, Lenardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 5):753-757.

(本文编辑:吉耕中)