

缺氧缺血性脑损伤鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 的表达及其意义

初桂兰 辛玥

【摘要】 目的 研究新生鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1) mRNA 的表达及其意义。**方法** 将 112 只新生 7 d Wistar 大鼠随机分为假手术对照组以及 HIBD 后 3、8、24 h 以及 3、6 和 14 d 组,每组 16 只。其中 8 只应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测病变侧脑皮质 caspase-1 mRNA 的表达情况;另外 8 只进行脑组织苏木素-伊红(HE)染色,在光镜下观察脑组织病理变化。**结果** 假手术对照组中有少量 caspase-1 mRNA 表达,HIBD 24 h 组其表达水平开始增加(与假手术对照组比较 $P < 0.01$),6 d 达高峰(与其余各组比较 P 均 < 0.01),14 d 时其表达下降,但仍高于假手术对照组($P < 0.01$)。组织病理学检查发现,HIBD 后 24 h~6 d 神经元大量变性、坏死、丢失,同时胶质细胞显著增生。**结论** HIBD 后 caspase-1 mRNA 的表达增加,其变化规律与光镜观察到的脑损伤进展时间完全吻合,提示 caspase-1 可能参与了新生鼠 HIBD 的病理损伤过程。

【关键词】 缺氧缺血性脑损伤; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 缺血-再灌注损伤

Expression of caspase-1 after hypoxic-ischemic brain damage CHU Gui-lan, XIN Yue. Department of Pediatrics, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

【Abstract】 Objective To study the expression of caspase-1 mRNA in the cerebral cortex after hypoxic-ischemic brain damage(HIBD) in neonatal rats. **Methods** One hundred and twelve 7-day-old Wistar rats were randomly assigned to control group, HIBD 3 hours, 8 hours, 24 hours, 3 days, 6 days and 14 days groups ($n=16$ in each group), and standardized HIBD was given. In each group, 8 rats were used to assess the mRNA expression of caspase-1 in cerebral cortex by semi-quantitative reverse transcription-polymerase reaction, and another 8 rats were used to study histological changes with hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** The expression of caspase-1 mRNA was observed in the cerebral cortex in both control and HIBD groups. After HIBD, the level of caspase-1 mRNA in ischemic cortex began to increase at 24 hours ($P < 0.01$ vs. controls), peaked at 6 days ($P < 0.01$ vs. other groups) and decreased at 14 days. Histological study showed that the degenerated and necrotic neurons were increased progressively from 1 day to 6 days after HIBD, together with proliferation of glial cells. **Conclusion** The increased expression of caspase-1 mRNA after HIBD, which was consistent with the time frame of the development of brain injury, indicates that it might play an important role in pathogenesis of HIBD in neonatal rats.

【Key words】 cerebral hypoxic-ischemia injury; caspase; ischemia/resperfusion injury

半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)是一个半胱氨酸天冬氨酸特异性的蛋白酶家族,迄今为止已在哺乳动物中发现了其至少 14 个成员,均具有相似的氨基酸序列、结构和底物特异性,它们在调节细胞凋亡、细胞因子的成熟和细胞生长、分化等过程中发挥了非常关键的作用^[1]。Caspase-1 通过对其他 caspase 成员活性调节作用在与 caspase 相关的凋亡级联中占据了重要位置。另外,caspase-1 还是一种重要的炎症介导因子,它可以催化无活性的细胞因子前体转化成具有生物活性的成熟形式,进而发挥其致炎效应;研究表明其致炎和致凋亡的双重作用参与了多种疾病的形成。本实验拟采用逆转录-聚

合酶链反应(RT-PCR)方法,探讨新生鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)时 caspase-1 mRNA 的表达规律,同时观察光镜下脑组织的病理变化,以进一步明确 caspase-1 在 HIBD 中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:112 只 Wistar 大鼠,7 d 龄,雌雄不限,体重 12~16 g,随机分为假手术对照组以及 HIBD 3、8、24 h 组和 3、6、14 d 组,每组 16 只,其中 8 只用于检测 caspase-1 mRNA 表达,另 8 只用于苏木素-伊红(HE)染色行病理光镜观察。以上动物均由天津医科大学公共卫生学院动物室提供。

1.2 动物模型制备:参照 Rice 等^[2]介绍的方法制备模型。颈正中切口,分离并结扎左侧颈总动脉,缝合切口恢复 2 h,然后置于 37℃ 恒温 2 500 ml 密闭玻璃容器中,以 1.5~2.5 L/min 的速度输入体积分

作者单位:300052 天津医科大学总医院儿科

作者简介:初桂兰(1946-),女(满族),天津市人,教授,主任医师,主要从事新生儿疾病研究,已发表论文 20 余篇。

数为 8% 氧气和 92% 氮气的混合气体, 2 h 后取出送回母鼠身边继续哺乳喂养。假手术对照组动物只分离左侧颈总动脉, 不结扎, 亦不进行低氧处理。

1.3 组织学观察: 分别于相应时间点经心脏灌注固定后断头处死各组新生大鼠, 开颅分离结扎左侧大脑半球, 于体积分数为 4% 的多聚甲醛磷酸盐缓冲液中常温固定 5~7 d, 冠状留取海马丘脑水平的脑组织, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察。

1.4 RT-PCR 反应

1.4.1 标本采集和总 RNA 提取: 分别于相应时间点断头处死各组新生大鼠, 分离结扎左侧脑皮质, 置入冻存管, 存于液氮中备用。按 TRIzol 试剂说明书操作抽提总 RNA, 经核酸/蛋白分析仪测定 RNA 样品的纯度和浓度, 质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量。

1.4.2 RT 反应: 取 2 μ g RNA 用于 RT 反应。反应体系 20 μ l, 包括莫洛尼鼠白血病毒反转录酶 (M-MLV reverse transcriptase)、5 $\times$ 第一步逆转录反应缓冲液、二硫苏糖醇 (DTT)、dNTP 混合物、RNA 酶抑制剂、随机引物等, 离心混匀后依次置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 和 95 $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min, 然后将产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.3 PCR 反应: caspase-1 引物序列检索自 GenBank No. D85899。上游引物: 5'-TCC TGA GGG CAA AGA GGA AGC-3' (14~34); 下游引物: 5'-GGC AAG ACG TGT ACG AGT GGG T-3' (471~492); 扩增产物长度 479 bp。内参照 β -肌动蛋白 (β -actin) 上游引物: 5'-AAC CCT AAG GCC AAC CGT GAA AAG-3' (331~354); 下游引物: 5'-TCA TGA GGT AGT CTG TCA GGT-3' (551~571); 扩增产物长度为 241 bp。以上引物均由上海生工生物工程公司合成。PCR 反应体系 25 μ l, 包括 DNA 聚合酶混合液 (Premix Taq)、caspase-1 及 β -actin 上下游引物、cDNA 等。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.4.5 RT-PCR 产物经质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, DL 2000 Marker 作为标准分子质量参照, 暗室紫外灯下观察产物片段大小, 借助 Image Station 440 凝胶成像系统进行吸光度扫描分析, 用 caspase-1 与内参 β -actin RT-PCR 产物吸光度值 (A 值) 的比值进行半定量分析。

1.5 统计学分析: 全部数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS10.0 for Windows 统计软件处理

数据。统计学方法采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理学检查: 假手术对照组脑组织结构及细胞层次清楚, 未见水肿和变性、坏死的神经元。HIBD 3 h 组皮质和海马出现少量水肿神经元, 个别神经元嗜伊红性增强。HIBD 8 h 组神经元出现变性、坏死, 呈点片状分布。HIBD 24 h~6 d 组变性、坏死的神经元增多, 程度加重, 表现为胞体极度皱缩, 胞浆均匀红染, 胞核固缩成梭形或三角形, 染色质结构不清; 神经纤维疏松, 胶质细胞增生, 变性、坏死的神经元被小胶质细胞大量吞噬、丢失。HIBD 14 d 组神经元变性、坏死减轻, 存活神经元明显减少, 星形胶质细胞增生肥大填充空隙, 偶见胶质瘢痕形成。

2.2 caspase-1 mRNA 的表达 (表 1, 图 1): 假手术对照组可见 caspase-1 mRNA 少量表达。HIBD 3 h 和 8 h 组其表达水平仍较低, 与假手术对照组比较差异均无显著性 (P 均 > 0.05); HIBD 24 h 组 caspase-1 mRNA 的表达开始增加, 但与 HIBD 3 d 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 且两组均高于假手术对照组 (P 均 < 0.01)。HIBD 6 d 组 caspase-1 mRNA 的表达达到高峰 (与其余各组比较, P 均 < 0.01); HIBD 14 d 组其水平已经下降, 但仍较假手术对照组高, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。由图 1 可见, 各组 241 bp 及 479 bp 位置均出现两条电泳条带, 分别代表 β -actin 和 caspase-1 的 RT-PCR 产物, 其中 β -actin 电泳条带在各组亮度接近, 表明其表达量变化不大; 假手术对照组及 HIBD 3 h 和 8 h 组 caspase-1 电泳条带相对较暗; HIBD 24 h 及 3、6 和 14 d 组的电泳条带亮度较 3 h 和 8 h 组增强, 但并不均一, 以 HIBD 6 d 组电泳条带最亮, 提示其表达量最高。

表 1 各组大鼠 caspase-1 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of caspase-1 mRNA expressions in each group ($\bar{x} \pm s$) A 值

组别	动物数 (只)	caspase-1 mRNA 表达
假手术对照组	8	0.291 8 $\pm$ 0.080 9 [#]
HIBD3 h 组	8	0.298 6 $\pm$ 0.089 0 ^{△#}
HIBD8 h 组	8	0.316 4 $\pm$ 0.060 7 ^{△#}
HIBD24 h 组	8	0.522 2 $\pm$ 0.094 1 [*]
HIBD3 d 组	8	0.577 8 $\pm$ 0.078 3 [*]
HIBD6 d 组	8	0.788 6 $\pm$ 0.048 0 [△]
HIBD14 d 组	8	0.531 4 $\pm$ 0.127 2 [*]

注: $F = 27.688$, $P < 0.01$; 与假手术对照组比较: ^{*} $P < 0.01$; 与 HIBD24 h 组比较: [△] $P < 0.01$; 与 HIBD6 d 组比较: [#] $P < 0.01$



图 1 各组大鼠 caspase-1 mRNA RT-PCR 产物电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis image of caspase-1 mRNA RT-PCR products in each group

3 讨论

本实验中以新生 7 d 龄 Wistar 大鼠作为研究对象,应用 RT-PCR 方法检测 HIBD 后 caspase-1 mRNA 的表达变化。结果显示,假手术对照组中即有 caspase-1 mRNA 的少量表达,说明 caspase-1 存在于正常的脑组织中,只是目前它的生理作用还不是很明确。同时,HIBD 后 24 h caspase-1 mRNA 的水平已经开始增加,6 d 达到表达高峰,14 d 时明显下降,接近 HIBD 24 h 组的水平,但仍高于假手术对照组;HIBD 后 caspase-1 mRNA 的表达在脑缺氧、缺血后 24 h~6 d 呈现逐渐增加的趋势,同时脑组织病理学观察发现在此时间段内神经元变性、坏死的程度也逐渐加重,表现为 caspase-1 在 HIBD 后的表达变化规律与 HE 染色光镜观察到的脑损伤进展时间框架完全吻合,提示我们 caspase-1 可能参与了新生鼠 HIBD 的形成。本结果中还见到,HIBD 后 caspase-1 mRNA 的表达在脑缺血损伤区出现了明显上调,但是这种转录水平的增加直到脑缺氧、缺血后 24 h 才开始发生,6 d 达到最高峰。国外相关研究显示,caspase-1 在成鼠脑缺血性损伤时也有类似的变化,如 Jander 等^[3]在大脑中动脉永久性闭塞和皮质微血管光照血栓形成两种方法诱导的沙土鼠局灶性脑缺血模型中,应用 RT-PCR 方法研究了 caspase-1 基因表达的时间变化,结果显示,脑缺血后 2 d caspase-1 mRNA 的表达才开始增加,6 d 达到高峰,此后逐渐下降。由此可见,脑缺血后 caspase-1 表达呈现一种延迟性上调及其相对持久的模式,它主要在脑缺氧、缺血后期发挥促损伤作用,而 HIBD 后 1 周左右可能是其作用最显著的时间点。能够证实 caspase-1 在脑缺氧、缺血时发挥促损伤作用的最有效方法是使用 caspase-1 抑制剂。在窒息性心搏骤停造成的大鼠全脑缺氧、缺血模型中观察到 caspase-1 的免疫反应性明显增强,caspase 广谱抑制剂 z-VAD-FMK 可抑制

caspase-1 活性,神经元细胞死亡数目显著减少^[4], Hayashi 等^[5]也观察到应用 caspase-1 特异性抑制剂 Ac-WEHD-CHO 可明显提高缺血后 7 d 海马锥体细胞的存活率,且这种保护作用较 caspase-3 的抑制剂 Ac-DMQD-CHO 要显著得多。以上均证明 caspase-1 活性增强确实极大地促进了 HIBD 的恶化。已证实凋亡是缺血-再灌注损伤中细胞死亡的另一种重要形式,而 caspase-1 作为一种促凋亡物质,可能又通过多种机制在 HIBD 后细胞凋亡的过程中发挥了极其重要的作用^[6]。例如,caspase-1 可直接酶解凋亡的最终执行者 caspase-3 的前体,使其转变为活性形式引发细胞凋亡^[7];同时它还可以与另一种 caspase-3 上游激活者 caspase-8 相互作用,彼此活化,从而将凋亡信号循环放大^[8]。caspase-1 对细胞凋亡的调节作用,部分可能还通过白细胞介素-1 β (IL-1 β)来实现,但其确切机制目前尚不十分清楚,有待进一步研究。

综上所述,HIBD 后 caspase-1 的表达明显上调,提示它可能通过多种机制在新生鼠 HIBD 中发挥了重要的促损伤作用。caspase-1 抑制剂的合理使用,有可能为临床提供新的 HIBD 药理治疗途径。如果能对 caspase-1 及其细胞因子底物进行更加深入的研究和探讨,可为临床新生儿 HIBD 的治疗提供更加坚实的理论基础。

参考文献:

- 1 尹卫东,许百男.半胱氨酸天冬酶家族和创伤性脑损伤[J].中国危重病急救医学,2001,13:502-503.
- 2 Rice J E, Vannucci R C, Brierley J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9: 131-141.
- 3 Jander S, Schroeter M, Stoll G. Interleukin-18 expression after focal ischemia of the rat brain: association with the late-stage inflammatory response[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22: 62-70.
- 4 Katz L M, Lotocki G, Wang Y, et al. Regulation of caspases and XIAP in the brain after asphyxial cardiac arrest in rats[J]. Neuroreport, 2001, 12: 3751-3754.
- 5 Hayashi Y, Jikihara I, Yagi T, et al. Immunohistochemical investigation of caspase-1 and effect of caspase-1 inhibitor in delayed neuronal death after transient cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2001, 893: 113-120.
- 6 宋路线,徐迎新,宋旭华,等.大黄对小肠上皮细胞 ICE 基因 mRNA 表达水平的影响[J].中国危重病急救医学,2000,12: 387-389.
- 7 Rabuffetti M, Sciorati C, Tarozzo G, et al. Inhibition of caspase-1 like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines[J]. J Neurosci, 2000, 20: 4398-4404.
- 8 Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, et al. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction[J]. J Neurosci, 2001, 21: 7127-7134.

(收稿日期:2004-10-08 修回日期:2005-02-23)

(本文编辑:李银平)