

• 研究报告 •

丙泊酚对大鼠脑创伤后神经细胞死亡相关蛋白激酶 mRNA 表达及凋亡的影响

梁敏 李艳 王宇田

【关键词】 脑创伤； 死亡相关蛋白激酶； 凋亡； 丙泊酚； 大鼠

死亡相关蛋白激酶(DAPK)^[1]可出现于脑缺血和创伤性脑损伤后神经细胞凋亡启动阶段信号转导级联反应定型之前,其基因表达与多种促凋亡信号转导的生物分子作用有关^[2-3]。已证实丙泊酚具有脑保护作用,其作用机制还未完全阐明。本研究通过观察丙泊酚对大鼠脑外伤后神经细胞 DAPK mRNA 表达的影响,探讨其对脑组织的保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立:60 只雄性 Wistar 大鼠(购自广东省实验动物中心),体重(250±50)g,按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、脑损伤组、生理盐水对照组、脂肪乳剂治疗组、丙泊酚治疗组,每组 10 只。腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠,采用 Feeney 自由落体脑损伤装置,用 40 g 砝码于 25 cm 高处坠落造成左顶叶重度脑挫裂伤模型(致伤冲击力 1 000 g/cm),尾静脉留置套管针供给药用。打击后缝合伤口,大鼠出现短暂四肢抽搐、呼吸暂停数秒,表明模型制备成功。术后 24 h 取标本。正常对照组不进行任何处理,直接取标本;假手术组只钻骨窗不打击;脑损伤组只制模;生理盐水对照组给予打击后通过留置针持续泵注生理盐水(2 ml·kg⁻¹·h⁻¹)4 h;

脂肪乳剂治疗组给予打击后通过留置针持续泵注体积分数为 10% 的脂肪乳剂(2 ml·kg⁻¹·h⁻¹)4 h;丙泊酚治疗组给予打击后通过留置针持续泵注丙泊酚注射液(2 ml·kg⁻¹·h⁻¹)4 h。

1.2 检测指标及方法:24 h 后断头活杀大鼠取出脑组织,以脑挫裂伤区为中心冠状切取约 0.5 cm 厚脑组织,多聚甲醛水溶液固定 48 h,常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,做连续 5 μm 厚的冠状切片,用以测定神经细胞凋亡情况。做 DAPK 测定的脑组织不用固定,以损伤最明显点为中心取约厚 0.4 cm 左半冠状切片,迅速置入 RNA 保存液中。

1.2.1 脑组织 DAPK mRNA 表达的检测:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),氯仿/异丙醇提取 RNA,取 4 μl RNA 模板进行逆转录反应。反应条件:37 C 1 h,95 C 3 min。荧光定量 PCR 反应条件:93 C 2 min,93 C 30 s,55 C 45 s,共 40 循环。采用 Primer express 2.0 软件设计引物探针:R-DAPK 上游引物:5'-CGCGCACTTTGACCTGAA-3',下游引物:5'-GGGCTGGCTGCATGCTT-3';荧光探针:5'-FAM 荧光素-CCGGAGAACATCATGTTGCTGG-TAMRA 荧光素-3'。以三磷酸甘油醛脱氢酶

(GAPDH)为参照,上游引物:5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3',下游引物:5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACA-3';荧光探针:5'-FAM 荧光素-CATCTGGGCTACACTGAGGACCA-TAMRA-3'。

1.2.2 脑神经细胞凋亡测定:采用原位末端缺刻标记法(TUNEL),TUNEL 凋亡试剂盒由深圳晶美生物有限公司提供,按照说明书操作。在损伤区、损伤周边区和非损伤区随机计数 100 个神经细胞,记录染色阳性的细胞数。

1.3 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行统计处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析和 *q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示,脑创伤后损伤区、损伤周边区神经细胞过度表达 DAPK mRNA,并且出现明显的神经细胞凋亡,与正常对照组和假手术组比较差异均有统计学意义(*P*均<0.05)。在左顶叶大脑皮质损伤区和损伤周边区,丙泊酚治疗组神经细胞凋亡及 DAPK mRNA 表达要少于脑损伤组、生理盐水对照组、脂肪乳剂治疗组(*P*均<0.05),但脑损伤

表 1 各组大鼠脑皮质中 DAPK mRNA 及 TUNEL 阳性细胞表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	DAPK mRNA		TUNEL 阳性细胞		
		损伤侧	非损伤	损伤区	损伤周边区	非损伤区
正常对照组	10	0.088±0.031	0.091±0.027	1.23±0.16	1.35±0.25	1.43±0.14
假手术组	10	0.089±0.014	0.010±0.005	1.35±0.12	1.81±0.15	1.32±0.18
脑损伤组	10	0.312±0.013 ^{ab}	0.012±0.022 ^{ab}	48.23±0.16 ^{ab}	39.13±0.13 ^{ab}	1.34±0.21 ^{ab}
生理盐水对照组	10	0.291±0.056	0.099±0.005	46.44±0.32	43.27±0.94	1.51±0.73
脂肪乳剂治疗组	10	0.283±0.062	0.036±0.043	42.65±0.54	38.54±0.83	1.46±0.53
丙泊酚治疗组	10	0.207±0.085 ^{cde}	0.029±0.026	32.12±0.39 ^{cde}	29.43±0.58 ^{cde}	1.60±0.67

注:与正常对照组比较,^a*P*<0.05;与假手术组比较,^b*P*<0.05;与脑损伤组比较,^c*P*<0.05;与生理盐水对照组比较,^d*P*<0.05;与脂肪乳剂治疗组比较,^e*P*<0.05

基金项目:海南省自然科学基金资助项目(2004-80462)

作者单位:570013 海口,海南省人民医院麻醉科

作者简介:梁敏(1955-),女(汉族),海南省人,医学硕士,主任医师,海南省医学会麻醉专业委员会主任委员,Email:mzk2230@163.com。

组、生理盐水对照组、脂肪乳剂治疗组间比较差异无统计学意义(P 均 >0.05);而在非损伤区 4 组间神经细胞凋亡情况及 DAPK mRNA 表达差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

3 讨论

1995 年 Rink 等^[4]首先报道了神经细胞凋亡在实验动物创伤性脑损伤后继发性神经细胞死亡中的地位和作用,证实脑损伤后迟发性神经细胞凋亡是产生继发性脑损害的主要途径。这一结论也陆续被研究所证实,其机制的研究在不断进展之中。

近年研究发现,DAPK 可出现于脑缺血和创伤性脑损伤后神经细胞凋亡启动阶段信号转导级联反应定型之前,其基因表达与多种促凋亡信号转导的生物分子作用有关^[5-6]。DAPK 被认为是调控细胞凋亡的关键酶,在凋亡信号通路上处于“分子开关”和“整合点”的地位,当细胞受到各种死亡信号刺激后,首先由 DAPK 相关蛋白(DRP-1)将信号传递给 DAPK,然后 DAPK 将链接相互作用蛋白激酶(ZIPK)磷酸化,从而使得 ZIPK 滞留于细胞质中,通过 P53 途径或非 P53 途径以及引起膜空泡作用促进细胞凋亡^[2-3]。如果能够遏制 DAPK 的表达激活,就可能较早地阻断凋亡信号通路,逆转细胞死亡的结局。因此 DAPK 就成为神经变性疾病限时性治疗“时间窗”的新治疗靶点。

本课题组进行的前期研究发现,损伤侧脑组织中 DAPK 在伤后 8 h 开始明显表达,24 h 达表达高峰,随后呈下降趋势;而脑损伤后神经细胞于伤后 8 h 开始出现明显凋亡,24 h 达凋亡高峰,随后下降,直到伤后 72 h 凋亡仍多于正

常,所以,伤后 24 h 内是最佳抗凋亡治疗时机^[7]。本实验结果发现,损伤区和损伤周边区均出现了神经细胞凋亡,脑组织 DAPK mRNA 表达与凋亡细胞出现的结果基本一致,说明 DAPK 参与了脑外伤后神经细胞凋亡的信号转导机制。

丙泊酚是一种静脉麻醉药,近年来对其脑保护作用方面的研究较多。丙泊酚可减轻缺血性脑损伤,显著减小局灶性缺血的脑梗死面积^[8];丙泊酚可抑制不完全性缺血导致的促凋亡相关蛋白表达,其对轻度局灶性脑缺血的神经保护作用可持续到损伤后 4 周^[9];丙泊酚还可抑制大鼠脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡,减轻海马区的延迟性神经细胞死亡^[10]。本研究发现,丙泊酚治疗组伤后 24 h 神经细胞凋亡和脑组织 DAPK mRNA 表达均低于其他脑损伤组,提示丙泊酚具有抗神经细胞凋亡作用,并且其抗凋亡作用与降低 DAPK 的表达有关。但具体通过什么途径来降低细胞内 DAPK 的激活,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Sanjo H, Kawai T, Akira S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(43):29066-29071.
- [2] Schumacher AM, Velentza AV, Watterson DM. Death-associated protein kinase as a potential therapeutic target[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2002, 6(4):497-506.
- [3] Schumacher AM, Velentza AV, Watterson DM, et al. DAPK catalytic activity in the hippocampus increases during the recovery phase in an animal model of brain hypoxic-ischemic injury [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1600

(1-2):128-137.

- [4] Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(6):1575-1583.
- [5] Stevens C, Hupp TR. Novel insights into DAPK autophagic signalling using peptide aptamer combinatorial protein-interaction screens [J]. *Autophagy*, 2008, 4(4):531-533.
- [6] Shani G, Marash L, Gozuacik D, et al. Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19):8611-8626.
- [7] 梁敏,王宇田.调节神经元凋亡信号转导途径的关键酶:死亡相关蛋白激酶 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(5):318-319.
- [8] Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2002, 14(1):66-79.
- [9] Gelb AW, Bayona NA, Wilson JX, et al. Propofol anesthesia compared to awake reduces infarct size in rats [J]. *Anesthesiology*, 2002, 96(5):1183-1190.
- [10] Kodaka M, Mori T, Tanaka K, et al. Depressive effects of propofol on apoptotic injury and delayed neuronal death after forebrain ischemia in the rat—comparison with nitrous oxide-oxygen-isoflurane [J]. *Masui*, 2000, 49(2):130-138.

(收稿日期:2008-06-10)

修回日期:2008-11-01)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

增加输血成分比例能提高创伤复苏后存活率

美国科学家通过研究旨在评价改变输血成分比例能否提高存活率。研究人员回顾性评价 259 例创伤患者。纳入标准为创伤术后 24 h 接受 10 次以上输血。研究人员比较了输血成分中新鲜冷冻血浆(FFP)与红细胞(RBC)比例为 2:3 和血小板(PLT)与红细胞为 1:5 的患者,与输血成分未达到此比例的患者比较,采用多因素分析独立预测病死率。结果:259 例患者当中,64 例接受 FFP:RBC 为 2:3 患者 30 d 内病死率远低于 195 例输血成分未达到此比例的患者(41%比 62%, $P=0.008$)。63 例接受 PLT:RBC 为 1:5 患者 30 d 内病死率远低于 196 例输血成分未达到此比例的患者(38%比 61%, $P=0.001$)。回归模型表明,排除年龄与创伤严重程度评估(TRISS)因素,FFP 与 RBC 比例是 30 d 内病死率的独立预测因子(相对比值比(OR)1.78,95%可信区间(CI)1.01~3.14)。研究人员认为,创伤后大量输血提高 FFP 与 RBC 和 PLT 与 RBC 比例可提高生存率。大量输血应重视输血成分比例,以达到最佳复苏效果。

白慧颖,编译自《J Trauma》,2008,65(3):527-534;胡森,审校

丙泊酚对大鼠脑创伤后神经细胞死亡相关蛋白激酶mRNA表达及凋亡的影响

作者: 梁敏, 李艳, 王宇田
作者单位: 海南省人民医院麻醉科, 海口, 570013
刊名: 中国危重病急救医学 
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE
年, 卷(期): 2008, 20(11)
被引用次数: 0次

参考文献(10条)

1. [Gelb AW;Bayona NA;Wilson JX Propofol anesthesia compared to awake reduces infarct size in rats](#) 2002 (05)
2. [Wilson JX;Gelb AW Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics](#) 2002 (01)
3. 梁敏;王宇田 调节神经元凋亡信号转导途径的关键酶:死亡相关蛋白激酶[期刊论文]-中国危重病急救医学 2005 (05)
4. [Shani G;Marash L;Gozuacik D Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions](#) 2004 (19)
5. [Stevens C;Hupp TR Novel insights into DAPK autophagic signalling using peptide aptamer combinatorial protein interaction screens](#) 2008 (04)
6. [Rink A;Fung KM;Trojanowski JQ Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat](#) 1995 (06)
7. [Schumacher AM;Velentza AV;Watterson DM DAPK catalytic activity in the hippocampus increases during the recovery phase in an animal model of brain hypoxia-ischemic injury](#) 2002 (1-2)
8. [Schumacher AM;Velentza AV;Watterson DM Death-associated protein kinase as a potential therapeutic target](#) 2002 (04)
9. [Kodaka M;Mori T;Tanaka K Depressive effects of propofol on apoptotic injury and delayed neuronal death after forebrain ischemia in the rat-comparison with nitrous oxide-oxygen-isoflurane](#) 2000 (02)
10. [Sanjo H;Kawai T;Akira S DRANKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis](#) 1998 (43)

相似文献(1条)

1. 期刊论文 梁敏. 李艳. 王宇田. 李铁军. LIANG Min. LI Yan. WANG Yu-tian. LI Tie-jun 厚朴酚对大鼠脑创伤后神经元凋亡及死亡相关蛋白激酶表达的影响 -中国医药 2008, 3 (12)

目的 观察厚朴酚对大鼠脑创伤后神经细胞死亡相关蛋白激酶(DAPK)的表达和凋亡的影响,探讨厚朴酚对脑创伤后神经细胞凋亡的脑保护机制.方法 建立大鼠自由落体脑创伤模型,雄性的Wistar大鼠60只,随机数字表法分为脑损伤组、生理盐水组、脂肪乳剂组、厚朴酚组各4组15只.采用TUNEL法观察神经细胞凋亡和RT-PCR法观察DAPK mRNA在脑创伤后的变化.结果 脑创伤后受伤区、受伤周边区神经细胞过度表达DAPK mRNA,并且出现明显的神经细胞凋亡,厚朴酚能够使DAPK mRNA的表达高峰及神经细胞凋亡高峰下调.结论 厚朴酚可能通过抑制DAPK的表达,减少神经细胞凋亡而发挥脑保护作用.

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx200811019.aspx

授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 42ed8439-2d30-46ec-ab19-9ee501182678

下载时间: 2011年5月16日