

· 论 著 ·

大鼠海马神经元癫痫模型中神经元凋亡及 caspase 3 基因的表达

刘建民^{1*}, 赵文元¹, 卢亦成², 周晓平¹, 赵 瑞¹

(1. 第二军医大学长海医院神经外科, 上海 200433; 2. 长征医院神经外科, 上海 200003)

[摘要] 目的: 探讨体外培养大鼠海马神经元癫痫模型中神经元丢失的分子机制。方法: 制备大鼠海马神经元癫痫样放电细胞模型, 以膜片钳全细胞记录对模型放电进行检测, 采用 RT-PCR 法克隆大鼠全长 caspase 3 cDNA, 采用原位杂交和流式细胞术检测模型中 caspase 3 基因表达和神经元凋亡情况。结果: 成功克隆获得大鼠全长 caspase 3 cDNA, 其序列与文献报道一致。模型组海马神经元癫痫样放电 3 h 后 caspase 3 基因表达开始增多, 6 h 后凋亡细胞开始明显增加, 两者均较对照组明显增加。结论: 癫痫样放电可能启动神经元 caspase 3 表达, 继而介导神经元凋亡。

[关键词] Caspase 3; 基因表达; 癫痫; 海马; 神经元; 凋亡

[中图分类号] R 742.1

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2005)01-0069-03

Caspase 3 expression and neuronal apoptosis induced by recurrent epileptic discharge in cultured hippocampal neurons in rats

LIU Jian-min^{1*}, ZHAO Wen-yuan¹, LU Yi-cheng², ZHOU Xiao-ping¹, ZHAO Rui¹ (1. Department of Neurosurgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the molecular mechanism of neuronal loss induced by epileptic discharge in Sombati's model of cultured hippocampal neurons in rats. **Methods:** Sombati's model of cultured hippocampal neurons was established and the discharge was detected with patch clamp. Full-length caspase 3 cDNA was cloned with RT-PCR in rats. Gene expression of caspase 3 and apoptotic neurons in Sombati's epileptic model was detected with *in situ* hybridization and flow cytometry. **Results:** Full-length caspase 3 cDNA in rat was obtained by PCR, whose sequence corresponded to that reported. The expression of caspase 3 in hippocampal neurons in the model group increased 3 h after recurrent epileptic discharge, while the number of apoptotic neurons in the model group increased 6 h after epileptic discharge. Both parameters were significantly higher than those of control. **Conclusion:** The epileptic discharge may trigger neuronal caspase 3 expression and neuronal apoptosis may be induced subsequently.

[KEY WORDS] Caspase 3; gene expression; epilepsy; hippocampus; neurons; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 69-71]

Caspase 3 是 caspases 家族的核心成员, 在哺乳动物中 caspase 3 通过水解相应的蛋白底物, 介导了大多数细胞的凋亡。本实验首先克隆 caspase 3 全长 cDNA, 同时建立体外培养大鼠海马神经元的癫痫模型, 然后检测模型中神经元凋亡和 caspase 3 的表达情况, 初步探讨癫痫样放电致神经元丢失凋亡的分子机制, 为干涉、控制神经元的凋亡提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 出生 24 h 内的新生 SD 大鼠由本校实验动物中心提供, 凋亡 DNA 快速抽提纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, RNA 抽提试剂盒购自上海华舜公司, DMEM、B27 培养液均为 Gibco 公司产品, PCR 引物由上海皓嘉公司合成, Caspase 3 流式检测试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 模型制备 参照 Sombati 法^[1], 取 24 h 内新

生 SD 大鼠 4 只, 断头取脑, 解剖出双侧海马, 置入 0°C 解剖液 1 ml 中, 剔除结缔组织后剪碎, 加 0.125% 胰蛋白酶 1 ml, 置 37°C、5% CO₂ 孵箱内消化 19 min, 加种植液 (20% DMEM 培养液 + 10% 胎牛血清 + 10% 马血清) 2 ml 终止消化 10 min。将消化后的海马组织移入离心管内加 2 ml 种植液吸管吹打后, 静置 5 min, 吸取上层细胞悬液以种植液稀释成 5 × 10⁵/ml, 取 1 ml 接种至涂有 0.1% 多聚赖氨酸的 35 mm 培养皿中心, 置 37°C、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h 使细胞贴壁后, 更换 B27 无血清培养液 1 ml 培养, 每 3 d 更换一半培养液。第 8 天改无镁

[基金项目] 国家自然科学基金 (39980039); 上海市自然科学基金 (99ZB14039)。

[作者简介] 刘建民 (1962-), 男 (汉族), 教授、主任医师, 博士生导师。

* Corresponding author. E-mail: liujm@guomai.sh.cn

培养液培养 3 h 后,恢复 B27 无血清培养液 1 ml 培养,即制备成海马神经元癫痫样放电的细胞模型。以培养 8 d 但未经无镁处理的细胞作为对照。

1.3 全细胞膜片钳记录模型放电情况 采用 Hamill 法,操作如下:取出培养皿,以记录用细胞外液灌流置换培养液,灌流速度 1~2 ml/min。在倒置相差显微镜下,通过微操纵仪将微电极(口径 1~2 μm)以 45° 角度推向神经元,并观察电极电阻变化。当电极电阻突然增大时表示微电极已接触神经元表面,此时通过微电极内施加 20~30 cmH₂O (1 cmH₂O = 0.098 kPa)负压,当电极电阻升至 6 Ω 时,表明微电极已与细胞形成紧密封接,调节快电容补偿旋钮消除瞬间电容电流。再次向微电极内施加约 100 cmH₂O 负压,当电阻下降,观察到来自细胞膜的跨膜电容电流后,表明全细胞记录已形成,可记录电位。

1.4 RT-PCR 克隆 caspase 3 全长 cDNA 断头处死 SD 大鼠,迅速取 1.5 g 的肾组织,剪碎,采用异硫氰酸胍法抽提组织总 RNA,沉淀物溶于 DEPC 处理的双蒸水中备用。PCR 引物的序列为:caspase 3 F Primer 5'-ATG GAC AAC AAC GAA ACC TCC GTG-3', caspase 3 R Primer 5'-CCA CTC CCA GTC ATT CCT TTA GTG-3'。逆转录反应体积为 20 μl,先以 2 μg 总 RNA、0.5 μg Oligo-DT 加 H₂O 至 14 μl,混匀后置 70℃ 水浴 10 min。再加入 1 μl (10 mmol/L) dNTP、2 μl (0.1 mol/L) DTT、1 μl Superscript II RT 及 2 μl 相应的 10×buffer 混合后 25℃ 10 min,37℃ 1 h;94℃ 3 min;4℃ 保存,-80℃ 分装。PCR 的反应体积为 20 μl,反应组分有 1 μl 逆转录产物,引物 F 1 μl (10 pmol),引物 R 1 μl (10 pmol),MgCl₂ 1.5 μl (25 pmol/L),dNTP 1 μl (5 pmol/L),10×PCR buffer 2.5 μl (无镁离子)、H₂O 16.5 μl。95℃ 3 min 后加入 Ultima™ DNA 多聚酶 1 μl (IU)。PCR 参数:95℃ 40 s,55℃ 40 s,72℃ 1 min,30 个循环后,72℃ 延伸 5 min。PCR 产物纯化试剂盒纯化所得片段,1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,交由上海皓嘉生物公司测序。

1.5 原位杂交检测 常规方法进行,探针制备采用 RT-PCR 法,dNTP 以地高辛 (DIG) 标记,反应条件同 1.4。将盖玻片培养的神经元标本浸入 0.1 mol/L PBS 5 min×3 次;0.1 mol/L 甘氨酸漂洗 5 min;0.5 μg/ml 蛋白酶 K 室温消化 30 min;4% 多聚甲醛固定 5 min;0.1 mol/L PBS 5 min×3 次;0.25% 醋酸酐室温处理 10 min;2×SSC 漂洗 10 min。标本放入探针(经 95℃ 10 min 后迅速置冰上冷却变性)含量为 0.5 μg/ml 的杂交液(50% 去离子甲酰胺、

10% 葡聚糖硫酸酯、1×Denhardt 液、10 mmol/L Tris-HCl、0.3 mol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L 变性鱼精 DNA)43℃ 杂交 6 h;4×SSC 漂洗 15 min;2×SSC 漂洗 30 min;1×SSC 漂洗 15 min;0.5×SSC 漂洗 15 min;0.05 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次;含 0.5% H₂O₂+0.05 mol/L PBS 处理 30 min;加 AKP-Anti-DIG-Ab Fab 室温 4 h;0.05 mol/L PBS 漂洗 5 min×4 次;0.05 mol/L Tris-HCl 漂洗 5 min;以 NBT-BCIP 显色 3 h,封片。
1.6 流式细胞术检测 依据凋亡流式细胞仪检测试剂盒操作:细胞培养标本以 4℃ PBS (0.1 mol/L, pH 7.2) 轻柔洗涤 2 次,混悬 1×Binding 缓冲液 1 ml,Annexin-FITC 5 μl,PI 2 μl,室温下避光放置 15 min,加 1×Binding 缓冲液 0.4 ml,即可上机检测。

2 结果

2.1 海马神经元癫痫样放电细胞模型的制备 对照组正常神经元静息膜电位约为 -(56±10) mV,偶有动作电位出现。模型组神经元经无镁培养 3 h 后,阵发性出现连续的 14~50 mV 动作电位,放电频率 4~16 Hz,同时出现阵发性去极化移位。

2.2 Caspase 3 基因 cDNA 的克隆 RT-PCR 扩增产物电泳显示约 800 bp DNA 片段区带(图 1),与预期值一致。序列测定显示所得克隆的开放阅读框架长 843 bp,其序列与文献报道^[2]完全一致。

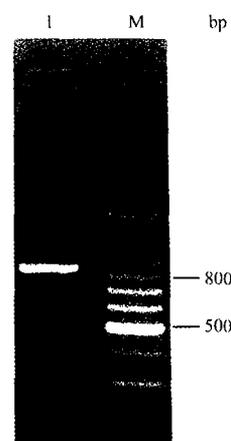


图 1 RT-PCR 产物电泳分析

Fig 1 Electrophoretic analysis of RT-PCR product

1: Product of RT-PCR; M: 100 bp marker

2.3 Caspase 3 原位杂交 对照组阳性染色神经元少于 10%,神经元突起饱满,形成广泛的突触联系;模型组无镁处理 3 h 后阳性细胞明显增多,尤其是 12 h 后有较多强阳性染色神经元,这些神经元基本保持有神经元突起,但突起变得菲薄(图 2)。



图 2 无镁处理 12 h 后 caspase 3 的表达
Fig 2 Caspase 3 mRNA expression within neurons 12 h after Mg-free processing (×400)

2.4 流式细胞术检测结果 流式细胞术分析显示, 在无镁处理 6 h 后, 凋亡细胞开始明显增加 ($P < 0.01$)。细胞各时间段的凋亡-时间曲线的斜率各异, 说明单位时间内凋亡细胞数不尽一致 (图 3)。

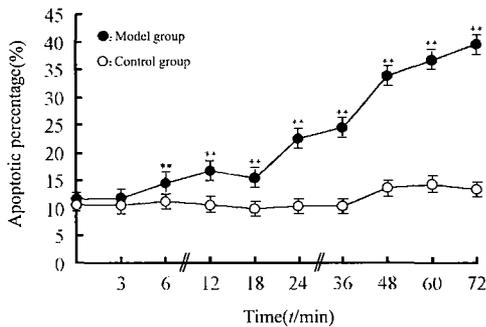


图 3 流式细胞术检测海马神经元的凋亡
Fig 3 Flow cytometry study of apoptosis of hippocampal neurons

** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

一般认为 caspase 3 是介导细胞凋亡的核心蛋白酶^[3]。颞叶癫痫患者海马神经元死亡的机制是热点研究课题, Gillardon 等^[4]采用原位杂交检测了由海人藻酸诱发的癫痫大鼠的海马组织, 发现海马组织存在 caspase 3 基因表达和凋亡神经元, 因而推测可能是神经元癫痫样放电的兴奋性激活调控 caspase 3 的表达和海马神经元的凋亡丢失。但该癫痫模型所使用的大海人藻酸具有神经毒性, 且未能排除模型中缺血、缺氧和神经毒性药物等干扰因素, 因此难以确定海马神经元癫痫样放电与 caspase 3 激活及神经元凋亡的必然联系。为排除干扰因素, 本研究采用 Sombati 法^[1]将原代培养的大鼠海马神经元作短期无镁培养, 结果发现神经元反复出现癫

痫样放电动作电位, 由此得到一种新的海马神经元癫痫样放电的细胞模型。在此基础上采用原位杂交技术检测神经元癫痫样放电后 caspase 3 在神经元中的表达, 发现 caspase 3 被激活表达, 且随着放电的延续, 其表达阳性的细胞递增。同时, 流式细胞术检测显示神经元癫痫样放电后凋亡神经元增加。本模型中未添加神经毒性物质, 且培养环境稳定, 避免了血压波动及缺血、缺氧的干扰, 克服了 Gillardon 等的研究中多重影响因素的干扰。

值得注意的是, 本实验中原位杂交显示 caspase 3 基因表达阳性的神经元保持有神经元突起, 并未表现凋亡的形态特征, 这与以往研究结果是一致的: Pittman 等^[5]发现 caspase 3 激活表达时, 凋亡细胞处于凋亡执行期 (commitment) 的起始阶段, 此时细胞尚未进入凋亡活跃期, 因此尽管 caspase 3 已激活表达, 但神经元仍保持原有形态特征。本实验中无镁处理 3 h 后即有 caspase 3 表达, 而凋亡神经元在 6 h 后开始明显增加这一结果则进一步佐证了这一观点; 当神经元进入凋亡活跃期后, 细胞形态发生改变的同时贴壁能力减弱, 在染色过程中脱落丢失, 因此染色封片时无法观察到这类细胞^[6]。

通过本研究我们发现, 癫痫样放电导致神经元凋亡, caspase 3 参与了该凋亡过程。由此可以设想, 或许通过阻止 caspase 3 表达或抑制 caspase 3 活性这一策略可以减少神经元凋亡、延缓海马硬化的进程^[7], 但结果如何还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Pal S, Sombati S, Limbrick DD Jr, et al. *In vitro* status epilepticus causes sustained elevation of intracellular calcium levels in hippocampal neurons[J]. *Brain Res*, 1999, 851(1-2): 20-31.
 [2] Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(49): 30761-30764.
 [3] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(6): 725-731.
 [4] Gillardon F, Bottiger B, Schmitz B, et al. Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, 50(1-2): 16-22.
 [5] Pittman RN, Wang S, DiBenedetto AJ, et al. A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death[J]. *J Neurosci*, 1993, 13(9): 3669-3680.
 [6] Mattson MP, Keller JN, Begley JG. Evidence for synaptic apoptosis[J]. *Exp Neurol*, 1998, 153(1): 35-48.
 [7] Meldrum BS. Implications for neuroprotective treatments [J]. *Prog Brain Res*, 2002, 135: 487-495.

[收稿日期] 2004-06-12

[修回日期] 2004-09-13

[本文编辑] 曹静