

· 实验研究 ·

Caspase-3 抑制剂对大鼠短暂局灶性脑缺血模型的神经保护作用

Neuroprotective effects of caspase-3 inhibitor on rats subjected to transient focal cerebral ischemia

王宇卉¹, 夏春林², 强 华³, 邵福源⁴

(1. 解放军第 100 医院神经科, 苏州 215007; 2. 苏州大学医学院神经细胞生物学研究室; 3. 北京市同仁医院骨科; 4. 第二军医大学长征医院神经内科)

[摘要] **目的:** 研究 caspase-3 抑制剂 III Ac-DEVD-CMK 干预治疗对大鼠短暂局灶性脑缺血模型的神经保护作用。 **方法:** 大鼠或不进行预处理(MCAO 组), 或分别经左侧侧脑室注射 Ac-DEVD-CMK(DEVD 组)、溶剂二甲亚砷(DMSO 组)后, 用线栓法制作大鼠左侧大脑中动脉(MCA)缺血/再灌注模型; 通过 Klenow 标记及 TUNEL 染色技术检测鼠脑中单、双链 DNA 断裂; 分别用原位杂交及免疫组化技术检测鼠脑中 caspase-3 和 calpain mRNA 及活性形式蛋白质的表达。 **结果:** 与 MCAO 组相比, DMSO 组鼠脑缺血侧 DNA 单、双链断裂, caspase-3 和 calpain mRNA 及活性蛋白质的表达均无明显差异; DEVD 组缺血侧脑中 Klenow 及 TUNEL 阳性细胞数均明显减少, caspase-3 及 calpain 的表达也明显减少。 **结论:** Caspase-3 抑制剂干预治疗短暂局灶性脑缺血具有潜在的临床应用价值。

[关键词] 脑缺血发作, 短暂性; caspase-3; calpain; caspase-3 抑制剂**[中图分类号]** R 743.31 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0334-03

近年来的研究提示, 细胞坏死与凋亡机制均参与缺血性脑损伤过程, 凋亡过程中的关键蛋白酶 caspase-3 的作用特别令人关注^[1,2]。我们以往的研究^[3]也证明了 caspase-3 抑制剂对缺氧/复氧神经元有保护作用; 在大鼠大脑中动脉(MCA)缺血/再灌注模型研究中, 缺血侧大脑皮质出现明显的单、双链 DNA 断裂^[4], caspase-3 及 calpain 活性增强^[5,6], caspase-3 和(或) calpain 抑制剂干预可减轻 DNA 损伤^[7]。为进一步研究 caspase-3 及 calpain 与神经元死亡的关系, 本研究用 caspase-3 抑制剂 III (Ac-DEVD-CMK) 进行干预, 探讨其在大鼠缺血性脑损伤中的神经保护作用, 为临床药物研发提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 成年 SD 大鼠 33 只(由苏州大学实验动物中心提供), 体质量 250~280 g, 雌雄不拘, 随机分为下列几组: 缺血对照组(MCAO 组); caspase-3 抑制剂 III (Ac-DEVD-CMK) 治疗组(DEVD 组); 溶剂二甲亚砷对照组(DMSO 组)和假手术组(Sham 组)。前 3 组再进一步分为缺血 2 h 再灌注 24 h 及 48 h 亚组, 每亚组 5 只动物; Sham 组为术后 24 h, 共 3 只($n=3$)。

1.2 给药方法 DEVD 组和 DMSO 组大鼠在手术前经 3.6% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 俯卧固定于脑立体定位仪上, 分别经左侧侧脑室缓慢注射 Ac-DEVD-CMK(美国 Calbiochem 公司) 2 μ g(溶于 2% 二甲亚砷 2 μ l 中)或溶剂二甲亚砷 2 μ l, 随后即进行造模手术^[7]。

1.3 MCAO 模型的建立 参照 Belayev 等改良的 Longa 线栓法, 尼龙线插入深度为距颈总动脉分叉处(18.0 \pm 0.5) mm; Sham 组尼龙线插入的深度为 15 mm^[4]。

1.4 组织切片的制备 在各设定时间点用 3.6% 的水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 经右心房快速灌注肝素化 PBS 及 4% 多聚甲醛各 250 ml 进行固定, 断头取脑, 置 4% 多聚甲醛中后固

定 2 h, 石蜡包埋, 在海马与齿状回互抱处取材, 振动切片机上经冠状面进行连续滚动石蜡切片, 片厚 4 μ m。

1.5 DNA 单链断裂(SSBs)研究 用 Klenow-FragEL DNA 片段检测法, 试剂盒购自美国 Oncogene 公司, 按操作程序进行^[4]。

1.6 DNA 双链断裂(DSBs)检测 用 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术(TUNEL), 试剂盒购自美国 Clontech 公司, 按操作说明进行检测^[4]。

1.7 Caspase-3 及 calpain mRNA 的表达 Caspase-3 mRNA 及 I 型 calpain mRNA 原位杂交试剂盒购自博士德公司, 地高辛标记的寡核苷酸探针与 mRNA 互补, 按说明书进行^[5,6]。光学显微镜下观察, 阳性细胞为棕黄色染色。用 PBS 代替杂交探针作为阴性对照片。

1.8 Caspase-3 及 calpain 活性形式蛋白质的表达 Caspase-3 多克隆抗体和 calpain I 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)均针对它们的活性形式; 二抗(山羊抗大鼠 IgG)及 SABC 免疫组化染色试剂盒购自博士德公司。按说明书进行操作^[5,6]。光学显微镜下观察, 阳性细胞为棕黄色染色, 阴性对照片用 PBS 代替一抗。

1.9 统计学处理 由对实验不知情者在高倍镜($\times 400$)下分别计数相邻脑片中缺血侧及非缺血侧相同部位的阳性细胞数, 实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析(ANOVA)进行分析处理, 两两比较采用 LSD Post Hoc 检验。

2 结果

2.1 鼠脑中的 DNA 损伤情况 用 Klenow 标记分析发现,

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK1999084)。**[作者简介]** 王宇卉(1965-), 女(汉族), 博士, 副主任医师。

E-mail: yhwangch@sina.com

Sham 组大鼠脑中及其余 3 组鼠脑缺血对侧中无明显阳性细胞;大鼠 MCA 缺血 2 h 再灌注后缺血侧脑中出现不同程度的 DNA 单链断裂,以再灌注 24 h 最明显(表 1);与 MCAO 组相比,DMSO 组的 Klenow 阳性细胞数无明显差异;DEVD 组大鼠缺血脑组织的 Klenow 阳性细胞数与 DMSO 组和 MCAO 组相比显著减少($P<0.01$);但不能完全阻止缺血脑中的 DNA 损伤。显微镜下观察见 Klenow 阳性染色信号位于神经元胞核。

TUNEL 技术检测也发现,除 Sham 组外,其余各种干预治疗组在缺血侧脑组织也出现不同程度的 DNA 双链损伤,再灌注 24 至 48 h,TUNEL 阳性细胞数逐渐增加(表 1)。DMSO 组与 MCAO 组相比无显著性差异($P>0.05$);而 DEVD 组缺血脑组织中的 TUNEL 阳性细胞数较 DMSO 组和 MCAO 组显著减少($P<0.01$);但仍高于 Sham 组或缺血对侧脑组织($P<0.01$)。形态学上可见 TUNEL 阳性染色信号位于神经元胞核,部分胞核明显皱缩。

表 1 各组大鼠脑组织中 Klenow 及 TUNEL 标记的 DNA 单、双链断裂

($\bar{x}\pm s$)

组别	Klenow 阳性细胞数				TUNEL 阳性细胞数			
	再灌注 24 h		再灌注 48 h		再灌注 24 h		再灌注 48 h	
	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧
MCAO 组	302.20±16.90**	5.80±2.86	146.60±23.22*	6.00±1.22	85.00±13.82**	4.80±1.64	298.20±15.45**	5.80±2.86
DMSO 组	296.60±18.12**	7.60±1.14	148.80±14.57*	7.80±0.84	86.40±11.21**	7.60±1.67	296.80±11.63**	8.00±1.22
DEVD 组	109.60±6.19**△△	6.20±2.39	58.80±4.97**△△	8.00±2.35	33.20±3.70**△△	5.80±2.86	99.20±11.56**△△	7.60±2.07
Sham 组	6.00±2.24	5.80±1.92	6.00±2.24	5.80±1.92	4.20±2.68	4.80±2.38	4.20±2.68	4.80±2.38

** $P<0.01$ 与 Sham 组相比;△△ $P<0.01$ 与 DMSO 或 MCAO 组相比

2.2 不同干预治疗后鼠脑中 caspase-3 的表达 Sham 组大鼠脑中持续表达少量的 caspase-3 mRNA,但活性蛋白的表达极少;其余 3 组大鼠在 MCA 缺血 2 h 再灌注 24 及 48 h,缺血对侧 caspase-3 mRNA 的表达无明显改变,而缺血脑中的表达则不同程度地增加,再灌注 48 h 更明显,caspase-3 p20 免疫反应也以相似的趋势逐渐增强(表 2)。DMSO 组 caspase-3 mRNA 及 p20 蛋白的表达与 MCAO 组相似;DEVD 组缺血侧脑组织中的 caspase-3 阳性细胞数显著减少,但仍高于缺血对侧或 Sham 组($P<0.01$)。Caspase-3 mRNA 阳性染色信号位于神经元的胞质及部分突起,而 caspase-3 p20 阳性染色信号位于神经元胞质,部分位于核内。

2.3 不同干预治疗后鼠脑中 calpain mRNA 及活性蛋白的表达 Sham 组大鼠脑中持续表达少量的 calpain mRNA,但活性蛋白几无表达。其余 3 组大鼠在 MCA 缺血 2 h 再灌注 24 及 48 h,缺血侧脑中 calpain mRNA 的表达不同程度地增强,calpain 活性蛋白质的表达也增加(表 3),以再灌注 24 h 最为显著。DMSO 组的表达量与 MCAO 组相似;DEVD 组大鼠缺血对侧脑中的 mRNA 表达无明显增加,也未发现明显的 calpain 蛋白活化;而缺血侧脑组织中的 calpain 阳性细胞数明显减少,再灌注后 24 h 作用最强,但仍高于对侧($P<0.01$)。Calpain mRNA 阳性染色信号位于神经元的胞质及部分突起,活性蛋白阳性染色信号位于神经元胞质。

表 2 各组大鼠脑组织中 caspase-3 mRNA 及其活性形式蛋白 p20 的表达

($\bar{x}\pm s$)

组别	Caspase-3 mRNA 阳性细胞数				Caspase-3 p20 阳性细胞数			
	再灌注 24 h		再灌注 48 h		再灌注 24 h		再灌注 48 h	
	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧
MCAO 组	211.40±16.32**	44.40±9.26	301.60±20.83**	48.60±6.27	207.20±14.32**	5.40±1.81	263.80±20.80**	4.80±0.84
DMSO 组	210.60±17.90**	46.20±6.42	309.80±15.80**	47.40±6.95	211.00±14.75**	5.80±1.48	267.00±16.60**	5.80±1.30
DEVD 组	108.40±10.65**△△	46.80±7.22	134.00±8.51**△△	45.80±6.94	69.80±6.53**△△	5.60±1.34	91.00±8.54**△△	6.40±1.14
Sham 组	42.40±9.81	45.40±9.45	42.40±9.81	45.40±9.45	3.40±1.14	3.80±0.84	3.40±1.14	3.80±0.84

** $P<0.01$ 与 Sham 组相比;△△ $P<0.01$ 与 DMSO 或 MCAO 组相比

表 3 各组大鼠脑组织中 calpain mRNA 及其活性形式蛋白的表达

($\bar{x}\pm s$)

组别	Calpain mRNA 阳性细胞数				Calpain 阳性细胞数			
	再灌注 24 h		再灌注 48 h		再灌注 24 h		再灌注 48 h	
	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧	缺血侧	缺血对侧
MCAO 组	304.00±17.93**	24.40±5.03	179.40±12.76**	23.40±4.77	294.20±15.66**	2.80±0.84	156.20±14.20**	2.80±0.84
DMSO 组	306.40±16.53**	24.00±3.16	183.20±11.01**	24.60±4.77	300.60±13.87**	2.60±1.14	153.40±13.97**	3.00±1.58
DEVD 组	156.40±11.41**△△	24.80±4.76	96.40±10.71**△△	23.60±4.72	134.80±10.50**△△	2.80±2.17	93.40±8.91**△△	2.80±2.05
Sham 组	22.20±3.35	22.40±4.16	22.20±3.35	22.40±4.16	2.40±1.14	2.60±1.82	2.40±1.14	2.60±1.82

** $P<0.01$ 与 Sham 组相比;△△ $P<0.01$ 与 DMSO 或 MCAO 组相比

3 讨论

本研究发现,大鼠短暂局灶性脑缺血后缺血脑组织出现明显的DNA单、双链损伤,caspase-3及calpain mRNA及活性蛋白表达明显增加;缺血前用caspase-3抑制剂Ⅲ预处理后,Klenow及TUNEL阳性细胞数均较未治疗组显著减少,caspase-3和calpain表达也明显减少。这一结果与我们在离体条件下所发现的caspase-3抑制剂Ⅲ可降低缺氧海马神经元的caspase-3活性,提高细胞存活率的结果一致^[3],进一步证实细胞凋亡机制在缺血性脑损伤过程中起重要作用,caspase-3与calpain共同参与缺血性脑损伤过程^[5,6],Ac-DEVD-CMK具有明显的神经保护作用。

Caspase-3是细胞凋亡过程中的关键蛋白酶,正常情况下以休眠状态的酶原形式存在于正常细胞中,可经线粒体依赖性途径和细胞表面死亡区包含的受体两条不同的途径分别由caspase-9或caspase-8激活变为异二聚体形式。活化后,通过切割细胞骨架蛋白、参与调节细胞骨架的蛋白、参与DNA修复的酶以及抗凋亡蛋白等多种蛋白质底物,最终引起细胞死亡,从而参与缺血性脑损伤^[1,2]。Ac-DEVD-CMK是人工合成的一种强力的、细胞渗透性的不可逆性caspase-3抑制剂,通过使caspase保守序列QACXG中的半胱氨酸残基烷化而使酶的活性位点不可逆性失活,对caspase-6、-7及-10也有一定的抑制作用,从而阻断caspase和细胞凋亡^[8,9],无论在体外抑或体内均可对缺血性神经元产生保护作用。用药时间及剂量各家报道不一,多数体外研究发现其用量以数十微摩尔为宜,并呈剂量依赖性。在体内研究中,多通过侧脑室注射给药,所用剂量在数百纳克至数微克不等,缺血前一次性给药,或数次重复给药,均可产生神经保护作用^[7,8]。

Caspase-3抑制剂治疗的时间窗与caspase活化的时间有关。Fink等^[10]研究发现,在小鼠短暂MCA缺血(30 min)后,脑室注射caspase-3抑制剂zDEVD-fmk 480 ng有明显的神经保护作用,可减轻神经功能损伤程度,减小梗死体积,减少凋亡细胞数。在血流恢复后9 h注射仍有效,但在12 h注射则无效。这一9 h的治疗窗与caspase的活化时间有关。因此,在caspase活化之前给予zDEVD-fmk治疗可阻止缺血性损伤的发展,超过9 h后给药,由于caspase级联已经激活,其下游的效应因子作用于多种底物,使之产生不可逆的降解,因而细胞死亡已经与caspase失去偶联,即使抑制了caspase的活性,也不能改变这些不可逆过程。zDEVD-fmk对caspase-3样蛋白酶活性的抑制持续时间较长,可能是由于该抑制剂对caspase-3的活性位点的不可逆烷化所致。

以往认为钙激活中性蛋白酶calpain主要参与神经元坏死,近年来的研究发现它在细胞凋亡过程中也起重要作用。我们的研究也发现,神经元缺氧/复氧或缺血/再灌注后caspase-3与calpain共同活化,参与缺血性神经元损伤过程^[1~3,5,6]。Ac-DEVD-CMK对calpain也有较强的抑制作用,因此,它不是一种特异性很强的caspase-3抑制剂。

本研究证实半胱氨酸蛋白酶caspase-3及calpain在缺血性脑损伤过程中起重要作用,caspase-3抑制剂具有明显的神经保护作用,针对性地进行药物研发,将为脑缺血的治疗增加新的手段。

[参考文献]

- [1] Blomgren K, Zhu C, Wang X, *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.
- [2] Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates [J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 62(3): 273-295.
- [3] 王宇卉, 邵福源, 夏春林, 等. 大鼠海马神经元缺氧/复氧后caspase-3活性的变化 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(11): 1214-1217.
- [4] 王宇卉, 邵福源, 夏春林, 等. 大鼠局灶性脑缺血/再灌注后单、双链DNA断裂的实验研究 [J]. 中国临床神经科学, 2002, 10(4): 345-348.
- [5] 王宇卉, 邵福源, 夏春林, 等. 大鼠大脑中动脉缺血/再灌注模型中caspase-3的表达 [J]. 临床神经病学杂志, 2003, 16(4): 214-217.
- [6] 王宇卉, 夏春林, 强 华, 等. 大鼠短暂局灶性大脑中动脉缺血后calpain的表达 [J]. 中国神经科学杂志, 2003, 19(3): 151-155.
- [7] 王宇卉, 卞杰勇, 强 华, 等. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂对大鼠脑缺血模型DNA损伤的实验研究 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(7): 1064-1065.
- [8] Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases [J]. *Ann Neurol*, 1999, 45(4): 421-429.
- [9] Loetscher H, Niederhauser O, Kemp J, *et al.* Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia [J]? *Drug Discov Today*, 2001, 6(13): 671-680.
- [10] Fink K, Zhu J, Namura S, *et al.* Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(10): 1071-1076.

[收稿日期] 2004-06-12

[修回日期] 2004-09-18

[本文编辑] 孙 岩