

实验性脑出血血肿周围组织细胞凋亡的研究

李红玲^{1a}, 葛艳萍^{1a}, 郭艳苏^{1b}, 吴东霞^{1b}, 李春岩^{1b}

[摘要] 目的 探讨脑出血大鼠血肿周围组织细胞凋亡的发生、发展情况。方法 64 只 SD 大鼠被随机分为 2 组, 实验组(56 只)采用胶原酶诱导大鼠尾状核脑出血模型, 对照组(8 只)为假手术组, 实验组分为术后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d、7 个时相点, 运用 TUNEL、SP 技术和电子显微镜检测血肿周围组织中细胞凋亡及 caspase-3 蛋白表达。结果 TUNEL 阳性细胞数在实验组 6 h 时可见, 24~48 h 表达明显, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。caspase-3 蛋白表达规律与 TUNEL 一致, 但高峰时间早于 TUNEL。透射电镜可见细胞凋亡形态学改变。结论 脑出血后血肿周围组织存在神经细胞凋亡, 且与 caspase-3 蛋白表达有关。

[关键词] 脑出血; 凋亡; caspase-3; 大鼠

Apoptosis of Neuron Surrounding Intracerebral Hemorrhage in Rats LI Hong-ling, GE Yan-ping, GUO Yan-su, et al. Department of Rehabilitation, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Abstract: **Objective** To investigate the apoptosis of neuron surrounding the hematoma in intracerebral hemorrhage (ICH) rats. **Methods** 64 male SD rats were randomly divided into two groups, trial group (ICH, $n=56$) and control group (sham operated, $n=8$). The brains of the rats were removed 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d, 14 d after ICH. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin in situ nick end-labeling (TUNEL) was used to detect deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation. The activation of caspase-3 was measured with immunohistochemistry. The electron microscope were used to observe histological changes surrounding the hematoma. **Results** Under transmission electronic microscope, shrunken neuron and glial cell with pre-apoptotic signs of intensely stained cytoplasm and abnormally dense nucleus, swollen blood vessel were found. TUNEL-positive cells appeared in the periphery of the hematoma and increased from 6 h to 14 d after ICH. Little TUNEL-positive cells could be found in the control group. The change of the caspase-3-positive cells was similar to TUNEL, but the peak of caspase-3-positive cells was more early than that of TUNEL. **Conclusion** The apoptosis of neuron occurred surrounding the hematoma in ICH rats and it may related to caspase-3.

Key words: intracerebral hemorrhage (ICH); apoptosis; caspase-3; rats

[中图分类号] 743.34 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)03-0206-03

[本文著录格式] 李红玲, 葛艳萍, 郭艳苏, 等. 实验性脑出血血肿周围组织细胞凋亡的研究[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(3): 206—208.

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是神经系统常见病和多发病, 出血后继发性损害导致的组织细胞死亡具有重要意义。有研究显示, 细胞凋亡机制参与了脑出血继发性神经细胞损伤^[1-2]。本研究拟采用 TUNEL、caspase-3 以及电镜检测大鼠脑出血后血肿周围组织细胞凋亡的发生、发展规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 实验动物用健康雄性 SD 大鼠 64 只, 体重 280~300 g, 由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供, 多层次流架(河北省石家庄市长风净化设备厂, 河北省实验动物研究中心监制)恒温(20℃~25℃)以标准饲料和纯净水喂养。随机分为两组: 对照组 8 只, 试验组 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d、7 个时相点, 共 56 只。

1.2 材料与试剂 江湾 I 型 C 脑立体定位仪; OLPIX950 型数码相机; OLYMPUS 光学显微镜: 日本 NIKON 公司; JEM-1230 型电子显微镜: 日本电子公司; 恒温干燥箱: 北京市朝阳区来广营医疗器械厂; RM2135 石蜡切片机: 德国 LEICA 公司; HH-42 快速

恒温数显箱: 常州国华电器; -20℃冰箱: 日本 NOVUM; 麻醉药速眠新 II: 长春军需大学兽医研究所; VII 型胶原酶: 美国 Sigma 公司, 用生理盐水配制成 0.2 U/ μ l 溶液; TUNEL 试剂: 美国 Sigma 公司; 鼠抗 caspase-3 单克隆抗体: 北京中杉试剂公司; 多聚甲醛-戊二醛灌流固定液: 自配。其余试剂由河北医科大学第二医院神经内科实验室提供。

1.3 动物模型建立与标本采集 参照 Rosenberg 方法^[3], 实验组用 VII 型胶原酶 0.5 U(2.5 μ l) 诱导大鼠尾状核脑出血模型; 对照组操作方法同实验组, 注射等量生理盐水。实验组于不同时间点断头处死动物, 其中各时间组选 5 只取出大脑, 经脑表面穿刺点冠状切开标本, 取穿刺点后约 4 mm 脑组织, 放入 4% 多聚甲醛固定液中, 常规脱水、透明、浸蜡、包蜡, 用于 TUNEL 和 caspase-3 检测。

剩余大鼠(每组 3 只)用速眠新注射液 0.1 ml/kg 麻醉, 迅速开胸, 经心脏至主动脉插管, 先用 0.1 mol/L PBS(pH=7.4) 约 100 ml 冲洗血液, 然后以多聚甲醛-戊二醛混合液约 400 ml 先快后慢灌流固定 1.5~2 h。迅速解剖, 切取血肿周围(约小米粒大)脑组织, 投入相同固定液中继续浸泡固定 24 h, 用于电镜检测。

对照组大鼠各时间点处死 1 只大鼠取材检测, 取平均值。

基金项目: 河北省卫生厅科研基金项目(06035)。

作者单位: 1. 河北医科大学第二医院, a. 康复科; b. 神经内科, 河北石家庄市 050000。作者简介: 李红玲(1963-), 女, 河北晋州市人, 博士, 主任医师, 主要研究方向: 神经康复。通讯作者: 李春岩。

1.4 caspase-3 和 TUNEL 检测 caspae-3 蛋白检测采用免疫组化 SP 法,细胞凋亡采用 TUNEL 法。具体步骤按试剂盒说明书进行,其中鼠抗 caspase-3 单克隆抗体工作浓度 1:100。随机选择 5 个视野,计数每高倍(400×)视野下阳性细胞数。

1.5 电镜检测 已固定的血肿外周组织磷酸缓冲液冲洗 2 遍;1%四氧化饿酸后固定 1 h;50%、70%、80%、90%、100%(2 次)丙酮系列脱水,每级 15 min;100%丙酮:环氧树脂=1:1 浸透 1 h;100%丙酮:环氧树脂=1:3 浸透 37℃过夜;纯包埋剂浸透 4 h;Epon812 环氧树脂包埋;聚合:37℃24 h,60℃48 h,Leica UCT 超薄切片机切片,片厚 70 nm,醋酸铀、硝酸铅电子染色,JEM-1230 透射电镜观察。

1.6 统计学方法 检测数据用($\bar{x}\pm s$)表示,采用 State 8.0 统计软件进行两两比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 表示有显著性差异, $P<0.01$ 表示有非常显著性差异。

2 结果

2.1 TUNEL 阳性细胞、caspase-3 蛋白表达 对照组仅见散在阳性 TUNEL 细胞(封三彩图 1.1),而实验组 ICH 后 6 h 可见 TUNEL 阳性细胞(封三彩图 1.2),12 h 后逐渐表达增强,48 h 达高峰(封三彩图 1.3),7 d 后表达减弱,14 d 时仍可见明显表达;与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。caspase-3 表达规律与 TUNEL 一致,但高峰期出现在 ICH 后 24 h(封三彩图 1.4~图 1.6);表达量与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。

2.2 透射电镜 试验组 ICH 后 6 h 开始出现脑出血周围组织细胞的凋亡形态学改变;24~48 h 表现出典型的细胞凋亡,可见神经元和胶质细胞浆浓缩变小,染色质凝聚浓染,并可见神经元、胶质细胞、血管及神经纤维的水肿,但细胞器无明显变化;ICH 7 d、14 d 时上述表现减弱,水肿减轻,偶见凋亡细胞征像。而对照组未见上述变化,表现基本正常。(图 1~图 6)。

表 1 血肿周边组织不同时间点 TUNEL 阳性细胞、caspase-3 蛋白表达

项目	组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d	14 d
TUNEL	对照组	2.50±2.38						
	实验组	31.5±2.65 ^a	51.0±13.98 ^a	88.0±15.75 ^a	97.5±22.61 ^a	82±6.27 ^a	42.75±12.53 ^a	10.75±2.5
caspase-3	对照组	1.5±1.73						
	实验组	10.24±2.63 ^b	17.25±2.5 ^a	26.5±8.35 ^a	16.31±5.74 ^a	14.79±5.56 ^a	11±7.19 ^b	13.0±4.69 ^b

3 注:与对照组相比,a: $P<0.01$;b: $P<0.05$ 。

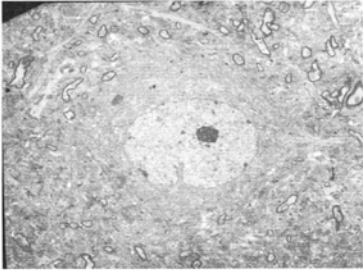


图 1 正常神经元和神经毡 (TEM,3000×)

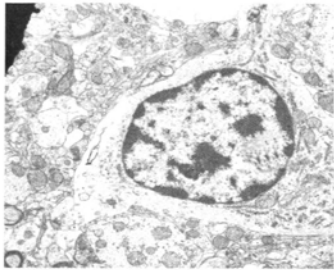


图 2 ICH 后 12 h (TEM,8000×)

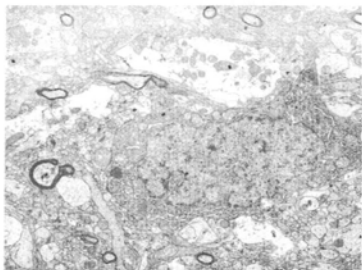


图 3 ICH 后 24 h (TEM,5000×)

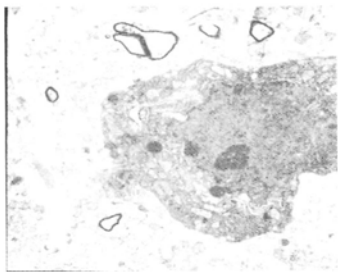


图 4 ICH 后 48 h (TEM,6000×)

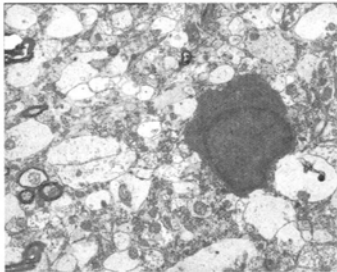


图 5 ICH 后 48 h (TEM,6000×)

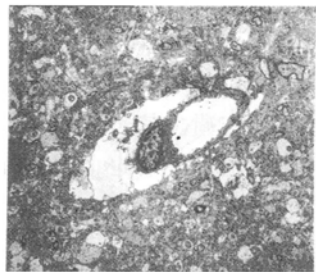


图 6 ICH 后 72 h (TEM,3000×)

讨论

细胞凋亡是一个遗传性的程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)过程,是细胞在基因调控下有序死亡的形式^[4]。它与细胞坏死这种被动过程在形

态特征和生化方面都有本质的区别。凋亡的形态特征包括细胞浆固缩、体积缩小、细胞皱缩以及细胞核致密等^[5]。凋亡的生化特征是凋亡细胞核内 DNA 被核酸内切酶降解为 180~220 bp 整数倍大小的片段,在琼

脂糖凝胶电泳上可呈现 DNA 梯形带。

近年来,许多实验研究都证实,细胞凋亡机制参与了脑出血后继发性脑损伤。Matsushita 等采用胶原酶诱导大鼠脑出血模型,用 TUNEL 染色发现,建立模型 24 h 后在血肿区及其周围检测到大量凋亡细胞, Niss 染色、神经核和胶质纤维酸性蛋白免疫细胞化学双标记染色证实,这些凋亡细胞主要为神经元(95%)和星形胶质细胞(5%);应用广谱胱冬酶抑制剂 Zvadfmk 可减少 24~48 h 时 TUNEL 阳性细胞数;为排除胶原酶的影响,在原代培养的神经元中加入等量的胶原酶,未发现任何形式的细胞死亡^[1]。Xue 等用自体血注入法制作大鼠脑出血模型,并对脑出血后细胞凋亡进行了较长时间的观察,结果发现,细胞凋亡在自体血注入后 4 h 时出现,并可持续 4 周以上^[6]。Karwacki 有类似发现^[2]。本研究结果显示,ICH 后 6 h 即有 TUNEL 阳性细胞染色,24~72 h 表达明显,7d 后表达虽有减弱,但 ICH 后 14 d 仍可见 TUNEL 阳性细胞,表明实验性脑出血时血肿周围存在细胞凋亡,且持续较长时间。与此前的研究结果相似。

脑出血后细胞凋亡的启动机制尚不清楚。由于血肿周围继发性缺血、凝血酶释放、血红蛋白分解、补体激活、炎性细胞浸润、多种因子的表达等因素参与了脑出血后脑水肿的形成,因此,推测它们也是诱发脑出血神经细胞凋亡的因素^[7]。

半胱氨酸基天冬氨酸特异性蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase, caspase)属白细胞介素-1 β 转化酶(interleukin-1 β convert enzyme, ICE)样蛋白酶家族,近年认为它们是一组介导细胞凋亡的关键性蛋白酶,其中最重要的 caspase-3 被认为是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。正常情况下, caspase 酶原没有活性,必须通过激活才能诱导凋亡。出血后启动凋亡级联反应的关键因素还没有确定。有作者认为,脑出血的邻近组织受轻微缺血影响^[8],大量激活的血液成分在出血后涌入大脑,其中细胞因子被活化后可导致信号转导介导凋亡^[9]。作为凋亡机制中重要的效应子成分, caspase 家族参与多种与凋亡有关的生理和病理过程。在神经元凋亡中, caspase 也起着关键作用。研究证实,在凋亡信号刺激下,所有 caspase 家族成员都被剪切,上游 caspase 有次序地激活下游,形成 caspase 级联反应,将凋亡信号传至底物,而下游 caspase-3 就是这个级联反应的终末执行酶。caspase-3 被激活,降解多种胞内蛋白,导致胞体固缩,染色体崩解,凋亡小体形成^[10-12]。本研究结果显示, caspase-3 于 ICH 后 6 h 即有表达,24 h 表达达高峰,早于 TUNEL 高峰,说明 caspase-3 参与了细胞凋亡,支持上述理论。

Chao^[13]等用 Western blot 方法研究血肿周围神

经细胞 caspase-3 mRNA 表达,发现脑出血后 6 h 开始表达,24 h 后达高峰,以后逐渐下降。且血肿周围主要以凋亡为主,血肿周边以坏死为主,远离部位无凋亡发生,证明了脑出血周围神经细胞损伤有凋亡机制参与。国内也有学者应用自体不凝血(50~60 μ l)注入大鼠尾状核制备脑出血模型,进行相关研究发现,脑出血后 6 h 血肿内部及周边组织出现 TUNEL 阳性细胞,48 h 达高峰,2 周时仍有少量表达; caspase-3 在脑出血后 6 h 表达明显增高,24 h 达高峰,各组与假手术组之间差异显著;脑出血后的 TUNEL 阳性细胞与 caspase-3 的表达呈正相关,且 caspase-3 的高峰时间早于凋亡的发生;认为脑出血后的细胞凋亡与 caspase-3 的表达有关^[14-15]。与本研究结果一致。

本研究显示,采用胶原酶诱导的实验性脑出血存在细胞凋亡的形态学和生化方面的改变,ICH 后 6 h TUNEL 阳性细胞开始表达,24~72 h 表达明显,一直持续到 ICH 后 14 d,并显示脑出血后的细胞凋亡与 caspase-3 的表达有关。

[参考文献]

- [1] Matsushita K, Meng W, Wang X, et al. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20: 396-404.
- [2] Karwacki Z, Kowianski P, Dzievatkowski J, et al. Apoptosis in the course of experimental intracerebral haemorrhage in the rat[J]. Folia Morphol (Warsz), 2005, 64(4): 248-252.
- [3] Rosenberg GA, Mum-Bryce BS, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1990, 21(5): 801-807.
- [4] Savill J, Fadok V, Hensen P, et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis[J]. Immunol Today, 1993, 14: 131.
- [5] Perer ME, Heuffler AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 12736-12737.
- [6] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and death[J]. Neurosci Lett, 2000, 283: 230-232.
- [7] Chiarugi V, Maguelli L, Cinelli M. Complex interplay among apoptosis factors: RB, p53, E2F, TGF- β , cell cycle inhibitors and the bcl-2 gene family[J]. Pharmacol Res, 1997, 35(4): 257.
- [8] Jenkins A, Mendelow AD, Graham DI, et al. Experimental intracerebral hemotoma, the role of blood constituents in early ischemia[J]. J Neurosurg, 1990, 4: 45-49.
- [9] Jac Manus JP, Linik MD. Gene expression induced by cerebral ischemic: an apoptotic perspective[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17: 815.
- [10] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 2 版. 北京: 北京科学出版社, 2001: 202.
- [11] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase/activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD[J]. Nature, 1998, 391(6662): 43-50.
- [12] Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, et al. The ced-3/interleukin-1 β converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin cleaving enzyme Mch2 alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32[J]. J Biol Chem, 1996, 271(43): 27099-27106.
- [13] Chao G, Nicholas B. Intracerebral hemorrhage induced neuronal death[J]. Neurosurgery, 2001, 48: 875-883.
- [14] 吴家骞, 李王君. caspase-3 在脑出血后神经细胞凋亡中的作用[J]. 放射免疫学杂志, 2005, 18(2): 135-137.
- [15] 朱凤清, 王宏盛. 脑出血后血肿周围神经细胞凋亡与 caspase-3 表达关系的实验研究[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2004, 17(5): 287-290.

(收稿日期: 2007-12-13)

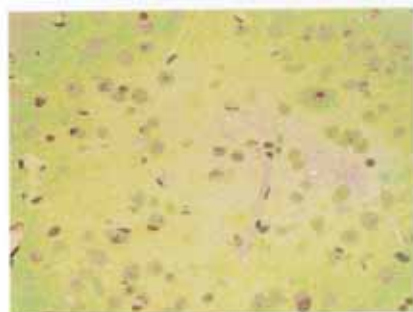


图 1.1 对照组 TUNEL 阳性细胞表达
(400 ×)

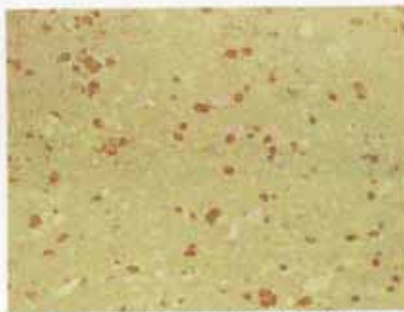


图 1.2 实验组 ICH 后 6h TUNEL 阳性细胞
表达 (400 ×)

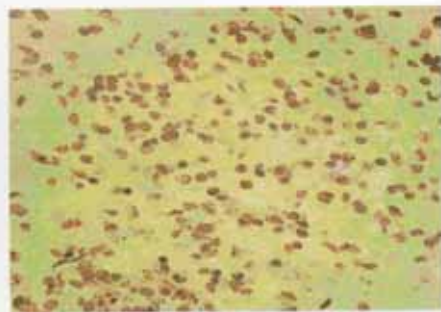


图 1.3 实验组 ICH 后 48h TUNEL 阳性细胞表
达 (400 ×)



图 1.4 对照组 caspase-3 表达
(400 ×)

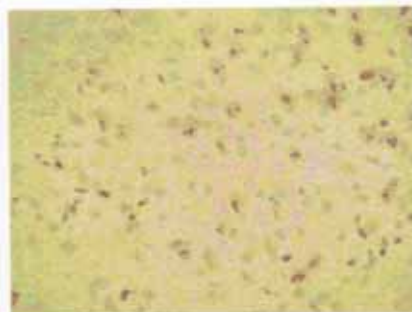


图 1.5 实验组 ICH 后 6h caspase-3 表达
(400 ×)



图 1.6 实验组 ICH 后 24h caspase-3 表达
(400 ×)