

• 基础研究 •

N-乙酰半胱氨酸对大鼠脑梗死灶体积及 caspase-1 蛋白表达的影响

马莉

[摘要] 目的 观察 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对成年大鼠局灶性脑缺血后脑梗死体积及凋亡基因 caspase-1 表达的影响。方法 70 只大鼠随机分为正常对照组、假手术组、缺血组和 NAC 组, NAC 组于大脑中动脉栓塞后 30 min 腹腔注射 NAC 150 mg/kg, 比较缺血组和 NAC 组的梗死灶体积、caspase-1 免疫组化阳性细胞数。结果 NAC 组 24 h~7 d 各检测时间点的梗死灶体积小于缺血组, caspase-1 免疫组化阳性细胞数少于缺血组($P < 0.01$)。结论 NAC 有减小持续性局灶性脑缺血大鼠脑梗死灶体积、抑制细胞凋亡的作用, 且可能与抑制 caspase-1 蛋白表达有关。

[关键词] 缺血性脑血管病; N-乙酰半胱氨酸(NAC); 细胞凋亡

Effect of N-acetylcysteine on cerebral infarct volume and expression of caspase-1 protein in rat MA Li. Department of Neurology, Shenyang Central Hospital, Shenyang 110024, Liaoning, China

[Abstract] Objective To observe the effect of N-acetylcysteine (NAC) on cerebral infarct volume and expression of caspase-1 protein after permanent focal cerebral ischemia in adult rat. Methods 70 healthy adult male SD rats were randomly divided into normal control group, sham operated group, ischemia group and NAC group. NAC group treated with NAC (150 mg/kg, intraperitoneal injection) after middle cerebral artery embolized for 30 minutes. The change of infarct volume and the number of caspase-1 positive staining cells in ischemia group and NAC group was compared. Results The infarct volume of NAC group decreased significantly compared with that of ischemia groups at different time-points of cerebral ischemia. In NAC group, the number of caspase-1 positive staining cells decreased at different time-points of cerebral ischemia compared with those of ischemia group. Conclusion Treatment with NAC after brain ischemia may reduce infarct volume permanent focal cerebral ischemia in rat. The effect of NAC decreasing apoptosis following permanent focal cerebral ischemia may be related to downregulation of caspase-1 protein.

[Key words] ischemia disease; N-acetylcysteine (NAC); cell apoptosis

中图分类号: R743.33 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2005)04-0273-03

[本文著录格式] 马莉. N-乙酰半胱氨酸对大鼠脑梗死灶体积及 caspase-1 蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(4): 273-275.

本研究采用血管内栓堵大脑中动脉建立大鼠持续性局灶性脑缺血模型, 观察脑缺血后应用 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对脑梗死灶体积、caspase-1 蛋白表达的影响, 为 NAC 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 健康雄性 SD 大鼠 70 只, 4~5 月龄, 体重 250~290 g。随机将大鼠分为 4 组: ①正常对照组($n=5$); ②假手术组($n=5$); ③缺血组($n=30$); ④NAC 组($n=30$)。缺血组与 NAC 组又分为 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 和 7 d 6 个时间点, 每个时间点 5 只。

1.2 大鼠持续性局灶性脑缺血模型制作 按照 Nagasawa 等报道的方法^[1]加以改进。大鼠腹腔内注射 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后, 仰卧固定。颈部正中切口分离并暴露左侧颈总动脉及颈外动脉, 在颈

外动脉分叉处结扎颈外动脉, 在近心端结扎颈总动脉。在颈总动脉近颈内、颈外动脉分叉处剪一小口, 将长 4 cm 的尼龙线(直径 0.26 mm)顺势缓慢送入, 深度为 (24 ± 0.5) cm, 在大脑中动脉起始端堵塞血流。然后将颈总动脉连同尼龙线一起结扎, 缝合皮肤, 自由喂养。假手术组只分离颈总动脉及颈外动脉, 不插入尼龙线。术中用 100 W 白炽灯照明, 保持大鼠肛温 37℃左右。选择苏醒后行走向右旋转或右侧肢体瘫痪的大鼠为栓堵成功鼠进行实验, 否则视为栓堵失败, 弃之不用。全部大鼠统一栓塞左侧大脑中动脉。

NAC 组大鼠于造模后 0.5 h 腹腔内注射 NAC 150 mg/kg(美国 Sigma 公司), 对照组腹腔内注射生理盐水 0.5 ml。

1.3 神经功能评分 造模后, 采用 Zealunga 评分法评定大鼠神经功能: ①0 分: 无神经功能缺失症状; ②1 分: 不能完全伸展对侧前爪; ③2 分: 爬行时出现右侧转圈; ④3 分: 行走时向身体瘫痪侧倾倒; ⑤4 分: 不能自发行走, 意识丧失。评分为 0 分和 4 分的大鼠均被剔除, 随机补充, 保证分组 5 只不变。

1.4 病理标本制备 造模后, 各组大鼠在规定时间内

断头取脑,将完整的鼠脑放入 4 %多聚甲醛中固定,于 4℃冰箱中保存。

将已固定好的鼠脑切除额极和枕极,沿视交叉前缘冠状切断,并分别向前、向后将鼠脑切成 4 mm 厚的组织块,经 0.1 M PBS 洗 3 次后,快速脱水,低温石蜡包埋。取视交叉后的第 1 个组织块自额侧连续切取 3 张组织片,分别做常规 HE 染色、caspase-1 蛋白免疫组化检测。每张切片厚度均为 7 μm。

1.5 梗死灶体积检测 用图像分析仪检测常规 HE 染色切片,计算梗死灶体积^[2]: $V = t_1 (A_1 + A_2) / 2 + t_2 (A_2 + A_3) / 2 + \dots + t_{n-1} (A_{n-1} + A_n) / 2$ (注: V 为体积, t 为两相邻冠状面的间距, A 为每个冠状面上梗死灶面积, n 为冠状面序列号)。分别将每个鼠脑标本所含组织块的梗死灶体积相加,做为该标本的梗死灶体积。

1.6 caspase-1 免疫组化阳性细胞检测 采用半定量

表 1 缺血组与 NAC 组脑梗死灶体积 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	7 d
缺血组	283.72 ± 40.58	288.74 ± 42.03	237.28 ± 29.49	179.68 ± 47.76	141.97 ± 28.34	101.28 ± 19.42
NAC 组	202.00 ± 32.66 ^a	200.83 ± 36.80 ^a	161.84 ± 24.24 ^a	134.76 ± 17.49 ^a	98.97 ± 32.76 ^a	78.92 ± 23.24 ^a

注: a: 与缺血组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 caspase-1 蛋白免疫组化检测 正常对照组及假手术组可见少量褐色免疫组化阳性细胞;缺血组造模后 24 h 海马区即可出现褐色免疫阳性细胞,48 h 后阳性细胞数量增多,但多数体积较小,形似胶质细胞,第 3 天阳性细胞数达高峰,在皮质呈散在较均匀分布,而基底节区仅有零星的阳性细胞;NAC 组各时间点的阳性细胞数明显少于缺血组 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 缺血组与 NAC 组 caspase-1 蛋白免疫阳性细胞 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	7 d
缺血组	167 ± 17	227 ± 23	255 ± 37	216 ± 17	203 ± 18	122 ± 25
NAC 组	103 ± 14 ^a	132 ± 26 ^a	176 ± 35 ^a	122 ± 14 ^a	118 ± 23 ^a	66 ± 10 ^a

注: a: 与缺血组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

脑缺血后,神经元的死亡是一个极其复杂的病理过程,主要表现为坏死和凋亡两种形式,分别涉及主动和被动细胞死亡机制^[3,4]。在脑缺血急性期,神经元坏死与凋亡并存,细胞坏死位于缺血中心区,细胞凋亡主要出现在缺血半暗带。而在脑缺血的迟发性神经元死亡期,则以细胞凋亡为主。凋亡可能决定了最终的梗死体积^[5]。细胞凋亡是在生理和病理条件下细胞的一种主动死亡方式,受相关基因和一些细胞外因子的调控。Macmanns 等发现,大鼠脑缺血后半暗带区出现大量凋亡细胞^[6]。

NAC 是一种抗氧化剂,也是一种巯基供给剂。有研究显示, NAC 可阻断细胞凋亡过程,而且作为自由基清除剂,可干扰自由基的形成^[7]。NAC 具有抗毒作

计数,40 倍物镜下在每张切片梗死灶边缘区相互不重叠的 8 个视野计数其中的 caspase-1 免疫组化阳性细胞。每组鼠所有切片阳性细胞数的 ($\bar{x} \pm s$) 作为该组动物梗死灶边缘区 caspase-1 免疫组化阳性细胞数。

1.7 统计学处理 所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 梗死灶体积 缺血组大鼠持续性局灶性脑缺血 24 h 后, HE 染色光镜下可见大脑中动脉供血区的皮层和皮层下白质染色较浅,缺血边界较清楚,24 h 形成的梗死灶体积基本固定,24 ~ 72 h 的体积最大,但 120 h 的体积减小,7 d 的体积更小。与缺血组相比, NAC 组 24 h ~ 7 d 各相应时间点梗死灶体积不同,其中 24 ~ 72 h 的梗死灶体积最大,7 d 的体积最小,而且各时间点的梗死灶体积明显小于缺血组 ($P < 0.01$),见表 1。

用,其巯基为羟化提供了接受部位,在溶液中使硫芥或氮芥环化,保护 DNA 免受氮芥、硫芥等羟化剂的损伤^[8],阻止羟化剂引起的细胞凋亡。NAC 也是一种含-SH 的化合物,在细胞内去乙酰化后生成半胱氨酸,提供合成细胞内重要的非酶类抗氧化物质谷胱甘肽 (GSH) 的底物,维持细胞内的 GSH 水平。NAC 也可通过形成硫中心自由基及其后的继发反应,有效地清除自由基,这也可能是该类药物的作用机制之一^[7]。GSH 是巯基保护剂,有保护细胞抵御细胞毒性的作用。调节 GSH 水平可影响硫化剂的毒性,亦影响由羟化剂导致的细胞死亡方式。HL-60、V937 和 K562 3 个细胞系经苯丙氨酸氮芥处理后都不同地出现细胞凋亡。如果用抑制剂降低细胞内 GSH 的水平,再用苯丙氨酸氮芥作用,细胞死亡的方式就由凋亡改变为坏死。至今,尚不清楚细胞坏死和细胞凋亡是组成细胞死亡共同途径的两个部分,还是代表了两种截然不同的现象。NAC 和 GSH 均可对抗硫芥引起的细胞坏死和凋亡,提示细胞凋亡和细胞坏死有某种共同途径。

细胞凋亡是基因调控的细胞死亡,与坏死有本质的区别。参与凋亡的基因中研究最多、作用最明显、最重要的是 caspase-1 和 caspase-3^[9]。caspase 家族共有 11 个成员, caspase-1 是最早发现的,是 caspase 家族的奠基成员,因可激活白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),故原称 IL-1 β 转化酶,可使 IL-1 β 前体断裂成熟,并与受体结合导致神经元凋亡。在多种因素诱发的细

胞凋亡过程中, caspase-1 表现为高表达, 且呈时间效应关系^[10,11]。caspase-1 可直接诱导细胞凋亡, 而突变的 caspase-1 基因则丧失诱导细胞凋亡的能力^[12]。caspase-1 介导的细胞凋亡可被 bcl-2 抑制。脑缺血时, 各种 caspase, 尤其是 caspase-1 和 caspase-3 在神经元凋亡中具有重要作用。在全脑及局灶性脑缺血动物模型的海马、皮质等缺血敏感区, caspase-1 蛋白及其靶蛋白的裂解产物 IL-1 β 的水平明显增高, 伴神经元 DNA 片段化^[12,13], 但 caspase-1 仅在胶质细胞内表达而非神经元内, 提示 caspase-1 可能是通过炎症反应介导脑缺血损害^[13]。

本研究显示, 大鼠局灶性脑缺血后 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、7 d 给予 NAC 治疗能有效地减小脑梗死灶的体积, 对脑缺血有保护作用, 可减轻神经损伤, 推测 NAC 可使大鼠对持续性局灶性脑缺血产生耐受性。这可能与 NAC 诱导凋亡相关基因或氧自由基清除剂有关, 表明 NAC 有可能作为治疗脑缺血的有效药物。

本研究大鼠持续性局灶性脑缺血后 caspase-1 蛋白表达的变化提示, 迟发性程序细胞死亡过程参与了脑缺血后的细胞损伤机制, 尽管不能就此肯定 caspase-1 蛋白表达增加能加重缺血性脑损害, 但 caspase-1 的确参与了脑缺血的病理生理过程。caspase-1 蛋白表达增加可能激发胶质细胞合成成熟的 IL-1 β 增加, 通过介导 IL-1 β 间接地在脑缺血中发挥凋亡调节作用。然而 caspase-1 在脑缺血后发挥凋亡调节作用的确切机制尚不明确, 有待进一步研究。我们发现, 脑缺血后, caspase-1 免疫阳性细胞数呈动态变化, 提示 caspase-1 在脑缺血后的迟发性表达可能主要与胶质细胞有关。曾有学者用脂多糖成功地诱导了 caspase-1 的表达, 并发现 caspase-1 的表达与胶质细胞的分泌活动有关, 本研究结果与之相符合。大鼠的海马区神经元对脑缺血耐受力较差, 在脑缺血后的 3~4 d 易发生细胞凋亡, 这与我们观察到的 caspase-1 免疫阳性细胞的动态变化一致, 也提示脑缺血后的细胞凋亡与 caspase-1 的表达有关。另外, NAC 组大鼠 caspase-1 免疫阳性细胞数明显少于缺血组, 进一步提示 NAC 的脑保护作用可能与抑制 caspase-1 蛋白表达有关。

总之, 本研究显示, caspase-1 在脑缺血后不仅不能被诱导表达, 而且这种表达上调可能在脑缺血的细胞凋亡机制中发挥作用。

[参考文献]

- [1] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20: 1037—1043.
- [2] Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, et al. Therapeutic effects of hyperbaric oxygenation on acute focal cerebral ischemia in rats[J]. Surg Neurol, 1990, 54: 101—106.
- [3] Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, et al. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss[J]. Mol Brain Res, 1995, 29: 1—14.
- [4] Sei Y, Von Lubitz JE, Basile AS, et al. Internucleosomal DNA fragmentation in gerbil hippocampus following forebrain ischemia[J]. Neurosci Lett, 1994, 171: 79—82.
- [5] Hsu CY, An G, Liu JS, et al. Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat[J]. Stroke, 1993, 24(Suppl 1): 78—81.
- [6] Peter ME, Heufllder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis lymphocytes from nitrogen mustard-induced apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 1998, 51(9): 1123—1129.
- [7] Samaja M, Motterlini R, Santoro F, et al. Oxidative injury in reoxygenated and reperfused hearts[J]. Free Radic Biol Med, 1994, 16(2): 255—262.
- [8] Dorr RT, Lagel K. Effect of sulfhydryl compounds and glutathione depletion on rat heart myocyte toxicity induced by 4-hydroperoxy cyclophosphamide and acrolein in vitro[J]. Chem Biol Interact, 1994, 93(2): 117—128.
- [9] 芮建中, 袁倚盛, 凌树森, 等. 毛细血管区带电泳同时分离维拉帕米和去甲维拉帕米对映体[J]. 中国药理学杂志, 1998, 33: 553.
- [10] Harvey NL, Butt AJ, Kumar S. Functional activation of Nedd2/ICH (caspase-2) is an early process in apoptosis[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 13134—13139.
- [11] Li H, Bergeron L, Cryns V, et al. Activation of caspase-2 in apoptosis[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 21010—21017.
- [12] Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, et al. Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(5): 2007—2012.
- [13] Bhat RV, Ipocco R, Marcy VR, et al. Increased expression of IL-1 β converting enzyme in hippocampus after ischemia: selective localization in microglia[J]. J Neurosci, 1996, 16(13): 4146—4154.

(收稿日期: 2005-01-10 修回日期: 2005-02-21)