

## • 基础研究 •

## BPI-1095 对大鼠局灶性脑缺血后 caspase 3 蛋白表达的影响

李菁晶<sup>1</sup>, 毛淑静<sup>2</sup>, 万虹<sup>3</sup>, 历俊华<sup>3</sup>, 翟晶<sup>3</sup>, 刘丽萍<sup>1</sup>, 王春雪<sup>1</sup>, 王拥军<sup>1</sup>

[摘要] 目的 观察 BPI-1095 对大鼠脑缺血后神经元 caspase-3 蛋白表达的影响。方法 大鼠大脑中动脉闭塞缺血模型(n=90), 随机分成 6 组: BPI-1095 大剂量组(240 mg/kg)、BPI-1095 中剂量组(80 mg/kg)、BPI-1095 小剂量组(27 mg/kg)、阿司匹林组(80 mg/kg)、安慰剂组、假手术组。分析梗死面积百分数并观察各组 Caspas-3 蛋白表达。结果 BPI-1095 大、中剂量组梗死面积百分数小于安慰剂组( $P<0.05$ ); 各组脑组织缺血周边和皮层 caspase-3 表达阳性细胞较安慰剂组减少, 大剂量组 caspase-3 阳性细胞减少最多( $P<0.05$ )。结论 BPI-1095 对大鼠永久性大脑中动脉闭塞模型的局灶脑缺血有神经保护作用, 其作用机制与下调凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达有关。

[关键词] 脑缺血; 大脑中动脉闭塞(MCAO); caspase-3; 细胞凋亡; 缺血半暗带

Effects of BPI-1095 on Caspase 3 in Middle Artery Occlusion Rats LI Jing-jing, MAO Shu-jing, WAN Hong, et al. Department of Neurology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of BPI-1095 on caspase-3 protein expression in middle artery occlusion (MCAO) rats. **Methods** Cerebral ischemia was induced with MCAO in adult male SD rats. Rats were randomly subjected into 6 groups with 15 rats in each group. Each rat has been given tested medication of different dosage and was sacrificed 24 h after treatment. The area of infarction was measured on each slice by image analysis system. Meanwhile, immunohistochemistry staining was used to identify caspase-3 expression in ischemic brain tissue. **Results** The infarcted area were significantly decreased in big and moderate dose treated rats ( $P<0.05$ , vs the placebo group). The expression of caspase-3 protein decreased in contralateral and ipsilateral hemisphere areas. The caspase-3 positive cell was significantly decreased in rats treated with big doses compared with placebo or ASA-treated rats. **Conclusion** BPI-1095 shows neuroprotection in MCAO rats, which may related with the inhibition of caspase-3 expression resulting in apoptosis in penumbra.

**Key words:** cerebral ischemia; middle artery occlusion (MCAO); caspase-3; apoptosis; penumbra

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)05-0427-03

[本文著录格式] 李菁晶, 毛淑静, 万虹, 等. BPI-1095 对大鼠局灶性脑缺血后 caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(5): 427-429.

乙酰水杨酸(acetylsalicylic acid, ASA)是传统的抗血小板制剂, ASA 的正确使用可以减少 25%~40% 的缺血性卒中复发。但由于其各种不良反应, 特别是常见的消化道及出血倾向等副作用, 严重影响患者的依从性。一氧化氮-阿司匹林(NO-ASA)是在传统 ASA 化学结构的基础上连接能释放 NO 的基团, 在代谢位点缓慢而稳定地分解生成 ASA 和释放 NO<sup>[1-2]</sup>。由于 NO 参与机体多种生理功能的调节, 因此 NO-ASA 既能增强 ASA 的抗血小板、抗血栓的治疗作用, 又能减轻 ASA 的胃肠道损伤等不良反应<sup>[3-5]</sup>。BPI-1095(2-乙酰氧基-4-硝酸甲酯基-苯甲酸)是 ASA 与硝酸酯类 NO 供体相偶联的化合物。本实验利用大鼠永久大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)形成的局灶性脑缺血(Local cerebral ischemia)模型, 通过观察不同剂量 BPI-1095 下鼠局灶性脑缺血后神经元 caspase-3 蛋白的表达, 并与梗死面积进行

相关分析, 探讨 BPI-1095 对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** SPF 级 SD 雄性大鼠 90 只, 体重(280±30)g, 维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证编号: SCXK(京)2002-0003。参照 Zea Longa 报道的方法加以改进<sup>[6]</sup>行 MCAO 10 min 后, 动物随机分为 6 组, 每组 15 只, 分别处理如下: 大剂量组: BPI-1095 240 mg/kg; 中剂量组: BPI-1095 80 mg/kg; 小剂量组: BPI-1095 27 mg/kg; ASA 组: ASA 80 mg/kg; 安慰剂组: 含 0.5%吐温 80, 0.4%甲基纤维素, 0.8%苯甲醇的生理盐水 5 ml/kg; 假手术组: 不进行 MCAO。给药方式采用灌胃方法。

**1.2 主要试剂和仪器设备** BPI-1095、ASA: 美国贝达药业有限公司; 红四氮唑(TTC)、多聚甲醛(PFA)、水合氯醛(CH): 北京化学试剂公司; SXP-1B 手术显微镜: 上海医用光学仪器厂; GD350-S3 高频电刀: 上海沪通电子仪器厂; ACS-2EAS 电子称: 北京菲姆斯科技开发公司; 醇酸清漆(II型): 红狮涂料国际有限公司; DR-HW-1 电热恒温水浴箱: 北京西城区医疗器械厂; 进口鱼线直径 0.25 mm: 德国 OCKERT; 衡流泵: 上海

基金项目: 北京市优秀人才基金资助项目(20061d0300416)。

作者单位: 1. 首都医科大学附属北京天坛医院神经内科, 北京市 100050; 2. 北京护士学校药剂组, 北京市 101149; 3. 北京市神经外科研究所, 北京市 100050。作者简介: 李菁晶(1971-), 女, 浙江龙泉市人, 硕士, 主治医师, 主要从事脑血管方面研究。通讯作者: 王春雪。

市沪西仪器厂; KRYOSTAT 1720 切片机、Leica 0500I W 图像分析系统:德国 Leica。

1.3 动物灌注固定与取材 麻醉清醒后姿势反射实验得分  $\geq 1$  分的大鼠纳入实验。动物腹腔注射 6% 水合氯醛 5 ml/kg; 灌注生理盐水, 将血管内血液全部冲净后, 灌注 4℃ 固定液, 动物经灌注固定, 立即取脑, 放入含 30% 蔗糖的 4% 多聚甲醛溶液内 4℃ 过夜。

1.4 梗死面积测定 动物经末次行为评分后, 断头取脑, 立即置于 -20℃ 冰箱中速冻 20 min, 自前脑额极起切出 6 片冠状切片, 每片厚 2 mm, 将脑片置于 2% TTC 染色液中, 正常脑组织染成粉红色, 梗死灶染成白色。然后将脑片置于新鲜配制的 10% 多聚甲醛溶液中避光保存 24 h 以上固定。利用图像分析系统测定缺血灶面积、同侧半球面积、对侧半球面积, 根据 Swanson 公式<sup>[7]</sup>计算半球缺血区的面积占对侧面积的百分数。

1.5 caspase-3 染色 冰冻切片机切片, 厚度 40  $\mu$ m, 切片放入 0.01 mol/L PBST 液(pH = 7.2 ~ 7.5)内待染; 然后切片依次入 0.01 mol/L PBST 液中浸洗 3 次, 室温下入 1 N 盐酸抗原修复 30 min 后; 再入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消除内源性过氧化物酶的活性 10 min; 0.01 mol/L PBST 浸洗 3 次, 每次 5 min; 入 5% 脱脂奶粉 PBST 液(或 5% 正常羊血清)室温下封闭 30 min; 入 1:1000 一抗孵育室温过夜; 将切片用 0.01 mol/L PBST 浸洗 3 次, 每次 5 min, 入 1:300 生物素标记的 II 抗(1% BSA, 0.01 mol/L PBST 稀释), 0.01 mol/L PBST 浸洗 3 次, 每次 5 min, 入 1:300 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 II 抗(0.01 mol/L PBST 稀释)室温 2 ~ 3 h; 0.01 mol/L PBST 浸洗 3 次, 每次 5 min; 室温下 DAB 显色 10 ~ 30 min。在 0.01 mol/L PB 液中裱片, 自然干燥; 切片上行脱水, 透明, 封固, 观察结果。

1.6 阳性细胞计数 高倍镜下(200 $\times$ ), 每只大鼠分别取 caspase-3 抗体染色切片 3 张, 随机选取各切片的缺血周边区、缺血侧皮层(cerebral cortex, CC)及健侧半球(作为对照)相应区域内各 5 个视野, 计数阳性细胞, 以阳性细胞数占总细胞的百分数为单位进行统计分析。

1.7 统计学方法 所有数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 应用 SAS 8.0 统计软件对各组动物梗死面积百分数和 caspase-3 阳性细胞百分数进行单因素方差分析(ANOVA), 如有显著性差异进一步做 Student-Newman-Keuls 检验, 进行两两比较。P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 梗死面积测定 大、中剂量组梗死面积均比安慰

剂组梗死面积减少(P < 0.05), 小剂量组、ASA 组与安慰剂组比较梗死灶有缩小的趋势, 但无显著性差异(P > 0.05)。见表 1。

表 1 各组梗死面积比较(%)

| 组别    | n  | 梗死面积百分数                     |
|-------|----|-----------------------------|
| 安慰剂组  | 7  | 50.43 ± 4.59                |
| ASA 组 | 8  | 47.55 ± 7.50                |
| 小剂量组  | 7  | 48.23 ± 6.10                |
| 中剂量组  | 8  | 41.43 ± 8.25 <sup>a</sup>   |
| 大剂量组  | 8  | 38.69 ± 5.18 <sup>a,b</sup> |
| 假手术组  | 10 | 0 <sup>a,b</sup>            |

注:a:与安慰剂组比较, P < 0.05; b:与 ASA 组比较, P < 0.05。

2.2 caspase-3 蛋白表达 安慰剂组 caspase-3 阳性表达主要在大脑皮层和尾壳核内侧周边区(缺血半暗带), 并以梗死灶周边区表达最明显, 在缺血中心区仅发现少量阳性细胞。阳性神经元胞浆呈棕色, 颗粒感, 也有部分胞浆、胞核均着色。治疗组 caspase-3 表达少于安慰剂组(P < 0.05), 且主要在梗死灶周边区。见表 2。

表 2 各组 caspase-3 蛋白表达比较(%)

| 组别    | n | caspase-3                    |
|-------|---|------------------------------|
| 安慰剂组  | 5 | 81.04 ± 14.29                |
| ASA 组 | 5 | 75.59 ± 13.68                |
| 小剂量组  | 5 | 67.64 ± 9.13                 |
| 中剂量组  | 5 | 47.18 ± 11.14 <sup>a,b</sup> |
| 大剂量组  | 5 | 39.55 ± 14.78 <sup>a,b</sup> |
| 假手术组  | 5 | 13.61 ± 2.66 <sup>a,b</sup>  |

注:a:与安慰剂组比较, P < 0.05; b:与 ASA 组比较, P < 0.05。

3 讨论

NO 作为一种重要的信使分子, 既表现出神经保护作用, 又具有神经毒性作用<sup>[8]</sup>。大量研究表明, 在缺血性脑损伤时, 缺血后短时间内, 低浓度 NO 对缺血脑组织有保护作用; 但随着缺血时间延长, 尤其是 24 h 以上或高浓度 NO, 则对脑组织有损伤作用。在脑缺血早期(尤其是 24 h 以内), NO 可能由神经元和内皮细胞产生, 此时的 NO 表现出对缺血脑的保护作用, 应用 NO 供体如 L-精氨酸能提高脑组织液的 NO 含量, 增强保护作用<sup>[8-9]</sup>。本研究显示, 在大鼠局灶脑缺血后 10 min 给予 BPI-1095 80 mg/kg、240 mg/kg 治疗, 梗死体积较安慰剂有缩小, 提示这一剂量的 BPI-1095 对大鼠缺血早期具有保护作用。

caspase 家族是一大类凋亡调节基因, 凋亡特征的出现与 caspase 的作用密切相关<sup>[10-12]</sup>。其中 caspase-3 是 caspase 家族中最重要的凋亡执行者(executioner)之一, 它广泛分布于各种不同类型的细胞中, caspase-3 一旦被激活, 凋亡常难以避免。在神经系统中, caspase-3 促进各种因素诱导的培养神经元的凋亡, 提示 caspase-3 是缺血神经元凋亡重要效应分子<sup>[13-14]</sup>。

缺血半暗带是局灶性脑缺血后位于缺血中心周围

的缺血脑组织,其脑血流量轻、中度降低(15 ~ 35 ml/100g · min),介于神经细胞电机能衰竭阈值与膜机能衰竭阈值之间。许多研究表明,缺血半暗带的细胞损伤主要通过神经元凋亡(apoptosis)途径进行<sup>[15-18]</sup>。在脑缺血急性期,神经元坏死和凋亡并存,凋亡可能决定了最终梗死体积。如果能通过阻断缺血性神经元凋亡,设法恢复缺血后半暗带区神经元的活力,有望大大减少缺血性脑血管病患者的死亡率或后遗症<sup>[19]</sup>。

研究表明,缺血后 6 ~ 8 h 有 caspase-3 的表达,24 h 达高峰<sup>[20-21]</sup>。本实验显示缺血后 24 h,安慰剂组半暗带 caspase-3 较假手术组明显升高,与文献报道<sup>[22-23]</sup>相符,提示凋亡刺激信号引起 caspase-3 上调。给予 BPI-1095 治疗后,能使 caspase-3 的表达不同程度地下降,表明 BPI-1095 能降低局灶性脑缺血后半暗带 caspase-3 的表达,从而抑制半暗带的神经元凋亡的发生,对脑缺血预后有重要意义。Fredduzzi 等用自发性高血压大鼠永久性局灶脑缺血模型研究发现,NO-ASA(NCX-4016)通过抑制缺血性神经元凋亡发挥了神经保护作用<sup>[24-27]</sup>。本实验结果也证实了这一点。Stamler 等阐明了 NO 可以与含有还原巯基的氨基酸或蛋白质等体内活性物质共价结合,因此可以将某些蛋白的半胱氨酸残基 S-亚硝酰化。caspase 属于半胱氨酸蛋白酶,酶催化中心的半胱氨酸残基可以被 S-亚硝酰化,从而可以被 NO 抑制,因此 NO-ASA 是 caspase 抑制剂<sup>[28]</sup>。与本研究结果相符。

NO-ASA 类药物 BPI-1095 对大鼠局灶性脑缺血损伤具有神经保护作用,下调 caspase-3 的表达,减少梗死灶体积。其机制除与 NO 协同 ASA 抗炎、抗血栓机制之外,更多的作用环节尚需要进一步深入研究。同时,本研究初步探索了急性脑缺血损伤动物有效治疗剂量,为将来新药研发和临床用药提供参考。

#### [参考文献]

- [1] Minuz P, Lechi C, Zuliani V. NO aspirins: antithrombotic activity of derivatives of acetylsalicylic acid releasing nitric oxide[J]. Cardiovasc Drug Rev, 1998, 16:31 - 47.
- [2] Soldato P, Sorrentino R, Pinto A. NO-aspirins, a class of new inflammatory and anti-thrombotic agents[J]. Trends Pharmacol Sci, 1999, 20:319 - 323.
- [3] Wallace JL, Zamuner SR, McNight W, et al. Aspirin, but not NO-releasing aspirin (NCX-4016), interacts with selective COX-2 inhibitors to aggravate gastric damage and inflammation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286:G76 - G81.
- [4] Wallace JL, Muscara MN, McNight W, et al. In vivo antithrombotic effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative, NCX 4016[J]. Thromb Res, 1999, 93: 43 - 50.
- [5] Tashima K, Fujita A, Umeda M, et al. Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing aspirin, NCX-4016, in the stomach of diabetic rats[J]. Life Sci, 2000, 67:1639 - 1652.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. J Stroke, 1989, 20:84 - 91.
- [7] Swanson RA, Morton MT, Trsao Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1990, 10:290 - 293.
- [8] Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemia brain injury[J]. Trends Neurosci, 1997, 20:132 - 139.
- [9] 胡小吾, 刘海乐. 一氧化氮与缺血性脑损伤[J]. 人民军医, 1997, 40(457):713 - 715.
- [10] Farnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspase: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis[J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68:383 - 424.
- [11] Shi J, Panickar KS, Yang SH, et al. Estrogen attenuates overexpression of  $\beta$ -amyloid precursor protein messenger RNA in an animal model of focal ischemia[J]. Brain Res, 1998, 810(1 - 2):87 - 92.
- [12] Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspase[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1387(1 - 2):17 - 31.
- [13] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407:802 - 809.
- [14] Mang YB, Luo Y, IkDng WW. Effect of Caspase-3 on neuron injury of cerebral ischemia[J]. Guo wai yi xue nao xue guan fen ce(国外医学脑血管病分册), 2000, 2:29.
- [15] Love S. Apoptosis and brain ischemia[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(2):267.
- [16] Yao H, Takasawa R, Fukuda K, et al. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats[J]. Mol Brain Res, 2001, 91:112 - 118.
- [17] 曲友直, 高国栋, 赵振伟, 等. 川芎嗪对局灶性缺血再灌注后 Bcl-2 和 Fas-L 表达的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(6):3082 - 3083.
- [18] 兰希发, 姚文秀, 郭阳. 脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的机制[J]. 中国临床康复, 2003, 7(9):2726 - 2727.
- [19] Hakim AM. Ischemic penumbra: the therapeutic window[J]. Neurology, 1998, 51(3):44 - 46.
- [20] Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC, et al. The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia caspase-3 as a case study[J]. Mol Brain Res, 2000, 75(1):143 - 149.
- [21] 万琪, 张巍, 刘勇红. 大鼠大脑中动脉阻塞后 DNA 单链断裂损伤的实验研究[J]. 中国临床康复, 2003, 7(7):1062 - 1063.
- [22] Hermann DM, Kuroiwa T, Hata R, et al. Expression of redox factor-1, p53-activated gene 608 and caspase-3 messenger RNAs following repeated unilateral common carotid artery occlusion in gerbils: relationship to delayed cell injury and secondary failure of energy state[J]. Neuroscience, 2001, 102(4):779 - 787.
- [23] 范红杰, 于维东, 欧阳疑. 栓线法建立大鼠中动脉局灶性脑缺血实验模型对再灌注损伤的评价意义[J]. 中国临床康复, 2003, 7(16):2292 - 2293.
- [24] Clementi E, Brown GC, Foxwell N, et al. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:1559 - 1562.
- [25] Paxinou E, Weiss M, Chen Q, et al. Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:11575 - 11580.
- [26] Fiorucci S, Mencarelli R, Mannucci R, et al. NCX-4016, a nitric oxide-releasing aspirin, protects endothelial cells against apoptosis by modulating mitochondrial function[J]. Faseb J, 2002, 16:1645 - 1647.
- [27] Fredduzzi S, Mariucci G, Tantucci M, et al. Nitroaspirin (NCX-4016) reduces brain damage induced by focal cerebral ischemia in rat[J]. Neurosci Lett, 2001, 302:121 - 124.
- [28] Fiorucci S. NO-releasing NSAIDs are caspase inhibitors[J]. Trends Immunol, 2001, 22(5):232 - 236.

(收稿日期:2008-03-24)