

基础研究

牵张性脊髓损伤后神经细胞中 Caspase-3 表达及其作用的实验研究

刘 雷¹, 裴福兴², 唐康来¹, 杨 柳¹, 李起鸿¹

(1 第三军医大学西南医院骨科 400038 重庆市; 2 四川大学华西医院骨科 610041 成都市)

【摘要】目的:观察大鼠牵张性脊髓损伤后脊髓神经细胞中半胱氨酸天冬氨酸酶 3(Caspase-3)的表达及其在神经细胞凋亡中的作用。**方法:**大鼠脊髓 T13~L2 经牵张损伤,皮层体感诱发电位监测 P1-N1 波幅下降至术前波幅 70%后维持 10min,分别于术后 6h、1、4、7、14、21d 处死取材。采用流式细胞仪、原位末端脱氧核苷酸转移酶介导的生物素脱氧尿嘧啶核苷酸缺口末端标记法(TUNEL 法)、免疫组织化学检测等方法观察大鼠脊髓神经细胞中 Caspase-3 表达变化及神经细胞凋亡情况,测定 Caspase-3 活性。**结果:**脊髓损伤后神经细胞凋亡率、TUNEL 阳性细胞数、Caspase-3 免疫组织化学阳性表达及 Caspase-3 活性测定均较空白对照组及椎板切除组显著升高($P<0.05$ 或 0.01),前三项指标改变趋势大致相同,均为术后 7d 达高峰,而 Caspase-3 活性则术后 4d 达高峰。**结论:**大鼠牵张性脊髓损伤后神经细胞中 Caspase-3 表达增高、Caspase-3 活性增强,是检测神经细胞凋亡的早期生物学指标,对认识脊髓损伤机制具有一定的意义。

【关键词】牵张性;脊髓损伤;半胱氨酸天冬氨酸酶 3;凋亡

中图分类号:R651.2, R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-05-0296-04

The experimental study of expression and effect of Caspase-3 in neurons after tractive spine cord injury in rats/LIU Lei, PEI Fuxing, TANG Kanglai, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(5): 296-299

【Abstract】 Objective: To investigate Caspase-3 expression and the role of Caspase-3 on neuronal apoptosis. **Method:** The T13~L2 spinal cord of rats were injured by traction after the amplitude of P1-N1 wave was decreased to seventy percent in postoperation than in preoperation through cortical somatosensory evoked potential(CSEP) monitor. The rats were killed in 6h, 1, 4, 7, 14 and 21 days respectively after ward. Flow cytometer terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxynuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL), Caspase-3 activity assay and immunohistochemical method were used to investigate Caspase-3 expression in spinal cord tissue and spinal cell apoptosis in rats. **Result:** The apoptotic cell detected by flow cytometry, TUNEL, Caspase-3 immunohistochemistry and Caspase-3 activity were higher significantly in injured group than in normal control group and laminectomy group ($P<0.05, 0.01$). There was approximately same trend of changes in the first three tests, which reached a peak in 7 days after injury, but in the 4th d for Caspase-3 activity reached the peak. **Conclusion:** The high expression of Caspase-3 protein and activity in neurons after tractive spinal cord injury is the signal of biochemistry in early stage of spinal cell apoptosis. There are many significances in understanding mechanism of spinal cord injury.

【Key words】 Traction; Spinal cord injury; Caspase-3; Apoptosis

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Southwestern Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China

中枢神经系统损伤后广泛存在细胞的凋亡。有研究表明, Caspase 家族蛋白酶是凋亡发生的核心分子, 它的激活与抑制是控制细胞凋亡最重要

的环节之一^[1]。本实验采用大鼠牵张性脊髓损伤模型, 观察损伤后大鼠脊髓组织中 Caspase-3 表达及细胞凋亡的改变, 探讨牵张性脊髓损伤后神经元凋亡的机制, 以期为神经再生的治疗提供理论依据。

第一作者简介: 男(1966-), 副主任医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱脊髓损伤的修复

电话: (023)68754907 E-mail: LeiLei_0452@sina.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年 SD 大鼠 32 只, 雌雄不限, 体重 180~260g, 随机分为空白对照组 4 只(A 组); 椎板切除组 4 只(B 组); 脊髓损伤组 24 只(C 组), 按脊柱撑开至皮层体感诱发电位(CSEP)波幅下降 70% 持续 10min 后 6h、1d、4d、7d、14d、21d 共 6 个时相点, 每个时相点 4 只。

1.2 主要设备及试剂

特制的脊柱撑开器(成都仪器厂), Cantata 体感诱发电位仪 (DANTEC, 丹麦), EPICS ELITE ESP 型流式细胞仪(库尔特公司, 美国), 羊抗鼠 Caspase-3 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), Caspase-3 Activity Assay 试剂盒(Roche 公司)。

1.3 动物损伤模型的制备

根据我们对大鼠牵张性脊髓损伤模型的观察和评价进行模型制备^[2]。5%水合氯醛 6ml/kg 腹腔内注射麻醉大鼠, 俯卧固定于手术台, 腰背部脱毛, 无菌原则下行背中下段正中纵切口。在放大镜下以 T13 为中心暴露 T12~L3 棘突椎板, 咬除 T13~L2 棘突椎板, 暴露 T13~L2 相应部位脊髓并保持脊髓完整。将特制的脊柱撑开器固定在 T12~L3 椎体横突上, 同时行 CSEP 监测。撑开至 CSEP 波幅下降 70% 持续 10min 后, 取出撑开器, 关闭切口。椎板切除组只进行椎板切除及放置撑开器, 不进行撑开, 持续 10min 后即行关闭切口, 空白对照组只作切口不进行椎板切除。术前、术后肌注青霉素 20 万 u, 2 次/d, 共 3 d。防止感染。损伤组动物术后单独管理饮食及排便, 若有死亡, 随即向该组补充新的动物。

1.4 取材及切片制备

脊髓损伤组大鼠分别于术后 6h、1d、4d、7d、14d、21d 处死取材。用 5%水合氯醛 6ml/kg 腹腔内注射麻醉大鼠, 自左心室插管后剪开右心耳, 快速灌注生理盐水冲洗, 待流出的液体清亮后, 灌注 4%多聚甲醛。自背部打开椎管, 切取 T13~L2 脊髓节段约 1.5cm, 从中分为上下两段, 一段用 4%多聚甲醛固定 24~48h, 常规石蜡包埋, 连续切片, 片厚 5 μ m, 备用; 一段制成细胞悬液。空白对照组对应部位取材, 椎板切除组操作与脊髓损伤组一致。

1.5 流式细胞仪测定凋亡率

取各时相点损伤节段脊髓组织, 以机械方法切碎, 磷酸缓冲液冲洗, 400 目滤网过滤, 收集混

合单细胞悬液, 镜检计数 $>10^6$, 备用, 反复用 PBS 冲洗, 离心去上清液, 加入 800 μ l 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI) 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30min, 上机测定细胞凋亡率。

1.6 TUNEL 法染色

从空白对照组、椎板切除组及损伤组术后各时相点每只大鼠脊髓标本的连续切片中随机抽取, 参考相关实验技术作 TUNEL 法染色。先用 0.2%蛋白酶 K 消化 30min, TUNEL 液孵育 60min, 抗荧光素抗体于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 最后用二氨基苯联胺(DAB)显色, 苏木素复染, 封片后光镜观察。细胞核中有紫蓝色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡细胞, 复染的细胞呈绿色。阴性对照片为不加标记的磷酸缓冲液, 其余操作同上。

1.7 Caspase-3 免疫组织化学染色(SP 法)

随机抽取每只大鼠脊髓标本切片, 参考相关实验技术作免疫组化染色。DAB 显色, 苏木素复染, 二甲苯透明, 封片, 用 PBS 代替 Caspase-3 抗血清做对照实验, 结果阴性。以胞浆出现棕黄色染色为阳性。

1.8 Caspase-3 活性测定

按 Roche 公司 Caspase-3 Activity Assay 检测试剂盒说明进行操作。

1.9 图像分析

每张切片采用 Spot 图像分析处理系统任取 5 个视野, 高倍镜下计数每个视野内染色的阳性细胞数。

1.10 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 软件进行统计分析, 各组均值与对照组进行比较, t 检验, $P < 0.05$ 为差别有显著性意义。

2 结果

见表 1。空白对照组与椎板切除组细胞凋亡率较低。损伤组术后 6h 细胞凋亡率开始上升, 出现明显亚二倍体峰(图 1), 术后 7d 细胞凋亡率达高峰。术后 4、7、14、21d 损伤组的细胞凋亡率明显高于空白对照组及椎板切除组, 差异有显著性意义($P < 0.05$ 或 0.01)。

空白对照组与椎板切除组 TUNEL 染色偶见散在的阳性细胞。脊髓损伤组术后镜下观察到较多阳性细胞, 6h 阳性细胞数开始增多, 术后 7d 达高峰(图 2、3, 后插页 I)。阳性细胞主要出现于白

表 1 各组大鼠脊髓神经细胞凋亡率、TUNEL 阳性细胞、Caspase-3 免疫组化阳性细胞数及 Caspase-3 活性
(n=4) ($\bar{x}\pm s$)

	细胞凋亡率 (%)	TUNEL 阳性细胞数 (个/mm ²)	免疫组化阳性细胞 (个/mm ²)	Caspase-3 活性 (荧光值)
A 组	4.53±1.53	2.14±0.12	4.14±1.04	546±91
B 组	4.73±1.69	2.75±0.96	4.56±1.12	553±98
C 组				
术后 6h	5.85±1.65	5.14±1.58 ^①	7.52±2.18 ^①	792±81 ^①
1d	9.63±2.92 ^①	8.32±2.71 ^②	13.36±2.72 ^②	1426±95 ^②
4d	20.55±5.44 ^②	13.55±3.32 ^②	20.54±2.81 ^②	1924±101 ^②
7d	28.90±5.51 ^②	18.25±4.11 ^②	28.41±3.45 ^②	1547±121 ^②
14d	18.71±3.88 ^②	14.32±3.54 ^②	18.67±3.15 ^②	956±74 ^②
21d	9.58±3.08 ^①	7.62±2.84 ^②	13.43±2.07 ^②	894±74 ^②

注：A、B 组比较^① $P<0.05$ ；^② $P<0.01$

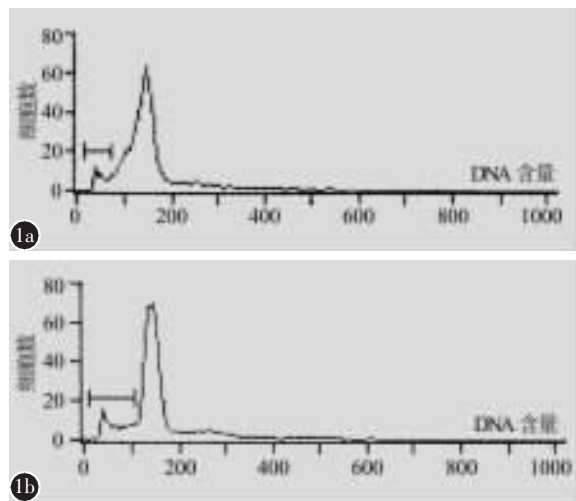


图 1 PI 染色流式细胞仪检测凋亡细胞直方图
(a 对照组 b 实验组)

质脱髓鞘区域，细胞形态特征与少突胶质细胞相似。术后损伤组各时相点阳性细胞数与空白对照组及椎板切除组比较，差异有显著性意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

空白对照组与椎板切除组 Caspase-3 免疫组织化学染色可见少量的阳性细胞，损伤组术后阳性细胞开始增多，术后 7d 最明显，各时相点阳性细胞与空白对照组比较差异有显著性意义 ($P<0.05$ 或 0.01) (图 4、5，后插页 I)

空白对照组 Caspase-3 活性荧光值为 536 ± 41 ，椎板切除组为 553 ± 48 ，损伤组术后各时相点活性荧光值均明显增高，术后 4d 最明显，随后开始下降，与空白对照组及椎板切除组比较差异有

显著性意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)

3 讨论

Caspase-3 又称半胱氨酸蛋白酶 32 (Cysteine protease P32, CPP32)，或称为 apopain。分子量为 32kD，在人类基因中位于 4q32-4q35.1 处。正常情况下 Caspase-3 在细胞质中以无活性的形式存在，其激活过程是一个产生 P20/P11 二聚体的蛋白水解事件。大量的实验证据表明^[3,4]，凋亡的发生似乎是蛋白酶级联切割过程，Caspase-3 在这一过程中处于核心位置，被称作死亡蛋白酶。通过对蛋白激酶、核酸酶及细胞骨架的裂解，Caspase-3 可激活特定信号系统，产生核皱缩、DNA 片段形成等凋亡现象，最终控制着凋亡的发生和发展。上述反应主要有两种途径，一条为凋亡的线粒体依赖途径，其过程是凋亡因子促使线粒体释放细胞色素 C，在三磷酸腺苷 (ATP) 存在下，细胞色素 C 使凋亡蛋白酶活化因子-1 发生构象改变而活化，从而促使 Procaspase-9 活化，活化的 Caspase-9 激活下游的效应酶 Caspase-3，切割特定的凋亡底物，诱发细胞凋亡。另一条为凋亡的死亡受体途径，其过程是死亡受体 CD95、TNFR1、DR3、DR4 或 DR5 等接头蛋白介导，接头蛋白具有死亡效应结构区，活化起始酶 Caspase-1 等，进而活化 Caspase-3 等，诱发凋亡反应。Yakovlev 等^[5]在脑损伤模型中观察到神经细胞凋亡同时伴有 Caspase-3 的活性增高。除了神经元在创伤后存在 Caspase-3 活性增高外，许多胶质细胞 (小胶质细胞除外) 也会出现轻微增高，说明 Caspase-3 在神经系统中的作用具有广泛性^[6]。

细胞凋亡在神经细胞生长、发育、分化和再生过程中起着重要作用，而 Caspase-3 的激活对细胞凋亡早期的启动与发生有明显影响。有研究发现^[7]，外伤性脊髓损伤后，Caspase-1、Caspase-3 参与了细胞凋亡过程。损伤后上游基因激活了 Caspase-1、Caspase-3，使 Caspase-1 的活性增加了 17 倍，Caspase-1、Caspase-3 又激活了其下游基因，使脊髓神经细胞发生了凋亡。同时有研究发现 Caspase 抑制剂可有效地抑制 Caspase 活性的增加，减少脊髓神经细胞的凋亡，从而改善神经功能^[8]。牵张性脊髓损伤是脊柱矫形手术中常见的并发症之一。研究表明，脊髓血流下降是牵张性脊髓损伤早期的主要病理变化。在牵张性脊髓损伤的

继发病理过程中是否包含凋亡机制,有何特点,值得进一步研究。本实验结果显示,正常脊髓组织中 Caspase-3 表达较弱,牵张性脊髓损伤后神经元 Caspase-3 表达明显升高,术后 7d 达最高值,随后下降。流式细胞仪及 TUNEL 检测凋亡细胞与 Caspase-3 蛋白表达趋势的改变大致相同。脊髓损伤后 Caspase-3 活性升高时间早于凋亡细胞。这对检测细胞凋亡有作用,故 Caspase-3 的活化是细胞凋亡早期生物化学指标^[9]。由此我们认为, Caspase-3 参与了脊髓牵张性损伤后的神经细胞凋亡,充分认识 Caspase-3 的作用及机制,在细胞水平上了解脊髓损伤继发性损害的病理变化,对提高脊髓损伤的治疗水平有重要意义。

4 参考文献

1. Yamada A, Jono M, Hori S, et al. Temporal and spatial profile of apoptotic cells after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurology*, 1999, 39(8): 575-583.
2. 刘雷, 裴福兴, 吕波, 等. 皮层体感诱发电位监测脊髓牵张性损伤的实验研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26(9): 513-516.
3. Cohen GM. Caspase: the executioners of apoptosis[J]. *Biochem J*, 1997, 326(1): 1-16.
4. Rodrigues CM, Sola S, Nan Z, et al. Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats [J]. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 6087-6092.
5. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, et al. Activation of CPP32-like caspase contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 1997, 17(19): 7415-7423.
6. Yang X, Yang S, Zhang J, et al. Role of Caspase-3 in neuronal apoptosis after acute brain injury [J]. *Chin J Traumatol*, 2002, 5(4): 250-256.
7. Hayashi T, Sakurai M, Abe K, et al. Apoptosis of motor neurons with induction of caspase in the spinal cord after ischemia [J]. *Stroke*, 1998, 29(5): 1007-1013.
8. Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury [J]. *Neuroscience*, 2000, 20(19): 7246-7251.
9. Sasalei C, Kitagawa H, Zhang WR, et al. Temporal profile of cytochrome c and caspase-3 immunoreactivities and TUNEL staining after permanent middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Neuro Res*, 2000, 22(2): 223-228.

(收稿日期: 2004-11-08 修回日期: 2005-01-24)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)

问与答

稿件为什么要退修?

问: 我投贵刊的一篇稿件退修了 2~3 次, 还在待审中, 退修根据什么原则?

(河南新乡一位作者)

答: 稿件退修是医学论文编辑出版流程中重要的步骤之一; 它是编辑部对那些内容基本合乎本刊要求, 但某些地方: 如文章结构、文字表达、书写格式、重要项目或数据有遗漏或有误等, 需要修改、补充的论文, 在参考有关审稿专家意见的基础上, 由责任编辑把稿件中的主要问题整理出来, 提出明确具体的修改意见, 与作者沟通、交流, 以达到共同提高论文质量的一种方法。对作者来说, 见到编辑部寄来的退修通知, 这意味着该论文具备可能被刊出的条件, 需认真修改。

从某种意义上讲, 稿件退修质量的好坏, 直接关系到稿件最后能否被刊用。俗语说: “文不厌改”、“不改不成文”, 特别对年轻作者更是如此, “一挥而就”的人和文章只是少数。编辑人员根据审稿人的意见和出版要求对论文进行深入了解和初步加工后提出修改意见和问题与作者商讨, 作者接到退修通知后应仔细阅读、理解退修信, 按要求认真修改论文, 如有不同意见可提出来与编辑商讨。退修的目的是编辑与作者共同使论文更具科学性和可读性, 以最少的篇幅容纳最多的信息, 使其内容更符合办刊宗旨和要求, 为使论文的顺利发表创造条件。决不是为难某些作者, 高质量的学术期刊需要作者和编辑的共同努力。

(编辑部)