

运动训练对出血性脑损伤细胞凋亡基因 caspase-3 及其蛋白表达的影响

李红玲¹ 王金星¹ 赵 然¹ 雷景爱¹ 李春岩²

摘要 目的: 观察运动训练对脑出血大鼠神经细胞凋亡基因 caspase-3 及其蛋白表达的影响。**方法:** 实验动物用健康雄性 SD 大鼠 120 只。随机分为 3 组, 实验组(出血后运动, 40 只)、对照组(出血后不运动, 40 只)、假手术组(无出血不运动, 40 只)。各组又分为术后 7d, 14d, 21d, 28d 共 4 个时相点, 每个时相点 5 只用于免疫组化检测, 5 只用于 RT-PCR 和 Western 印迹法检测。实验组于术后 24h 开始跑笼训练, 其余大鼠在标准笼内自由活动。**结果:** ①免疫组化结果: caspase-3 阳性细胞表达为细胞胞浆着棕黄色, 阳性细胞主要分布于血肿周围和大脑皮质的神经元。实验组随运动训练时间延长似乎有表达上调趋势, 28d 时表达虽有下降迹象, 但仍处于较高水平。对照组表达水平较实验组更明显, 但两组差异无显著性意义 ($P>0.05$), 实验组和对照组与假手术组相比差异有非常显著性意义 ($P<0.01$)。② Western blotting 和 RT-PCR 结果与免疫组化一致。**结论:** caspase-3 参与了脑出血后细胞凋亡的发生, 但运动训练对 caspase-3 基因及其蛋白表达的抑制作用不明显。

关键词 运动训练; 脑出血; 大鼠; caspase-3; Western 印迹法; RT-PCR

中图分类号: R743, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2008)-07-0601-04

The exercise effects on expression of caspase-3 of neuronal cells after intracerebral hemorrhage in rats/LI Hongling, WANG Jinxing, ZHAO Ran, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(7): 601—604

Abstract Objective: To investigate the exercise effects on expression of caspase-3 of neuronal cells apoptosis after ICH in rats. **Method:** A total of 120 male SD rats (weight, 270 to 300g) were divided into three groups, trial group (ICH-induction and exercise group, $n=40$), control group (ICH-induction group, $n=40$) and sham operated group (no ICH without exercise, $n=40$). The rats brains were removed at 7d, 14d, 21d, 28d after ICH. The activation of caspase-3 was measured by immunohistochemistry, Western blotting and RT-PCR. **Result:** ①caspase-3-positive, appeared around the periphery of the hematoma and cortex. The number of caspase-3-positive cells was nearly zero in the sham-operation group. Although the expression of caspase-3 had a up-regulation trend in trial group and control group, but there was no difference between the two groups. There was a significant difference compared with sham operated group ($P<0.05$). ②The result of Western blotting, RT-PCR for caspase-3 mRNA showed the continuity with that of immunohistochemistry. **Conclusion:** Caspase-3 participated in neural apoptosis after ICH, but exercise training (cage-running) did not depress clearly the expression of caspase-3 and caspase-3 mRNA.

Author's address Dept. of Rehabilitation, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000

Key words exercise; intracerebral hemorrhage; rats; caspase-3; Western blotting; RT-PCR

国内外实验和临床研究有充分的证据说明, 康复运动可以改善脑卒中所造成的功能障碍, 降低致死率, 减少并发症, 提高生存质量。但这些研究主要是针对缺血性卒中进行的, 国外仅有少数作者报告, 运动训练有益于脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 动物^[1-2], 但对其作用机制未进行深入研究。国内至今尚少报道。本研究目的旨在观察运动训练对脑出血大鼠神经细胞凋亡基因 caspase-3 及其蛋白表达的变化, 从不同侧面探讨运动训练对脑出血后细胞凋亡的影响, 并希望能为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: 电泳仪 (DYY-12)、电泳槽 (DYCZ-40B) 和水浴式电转膜系统 (北京); 超低温冰箱 (日本); 5417R 低温高速离心机、5415D 台式高速离心机 (德国) 和 Mastercycler384DNA 扩增仪 (德国); Odyssey infrared imaging system (Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE); PVDF 膜 (Millipore 公司); 756 型紫外

1 河北医科大学第二医院康复科, 河北省石家庄市和平西路 215 号, 050000

2 通讯作者: 李春岩 (河北医大二院神经内科)

作者简介: 李红玲, 女, 主任医师, 博士, 硕士研究生导师

收稿日期: 2007-11-21

分光光度计(上海);GeneAmp 9600型PCR仪(美国);UVP凝胶扫描系统(美国);微量移液器(德国)。

1.1.2 主要试剂: 蛋白提取液(河北医科大学药学院);封闭用正常山羊血清、生物素标记羊抗兔IgG、辣根酶标记链霉卵白素(S-A/HRP)、DAB显色剂和APES(北京);异丙醇(北京);甘油(丙三醇,北京);EDTA(美国);caspase-3多克隆抗体(北京);丽春红S、十二烷基硫酸钠和 β -巯基乙醇(美国);三羟甲基胺基甲烷(Tris,上海);Red TaqDNA聚合酶(北京);RT-PCR引物(上海);逆转录酶(AMV-RT)、核糖核酸酶抑制剂(RNasin)、dNTP、Taq DNA聚合酶、随机引物(random primers)和琼脂糖(美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组: 健康雄性SD大鼠120只,体重270—300g(河北医科大学基础医学院实验动物中心),清洁级,实验动物合格证号为:605010,以标准饲料和纯净水喂养,饲养环境为我院动物室多层层流架,恒温(20—25℃)。随机分为3组,实验组(出血后运动n=40)、对照组(出血后不运动n=40)、假手术组(无出血不运动n=40只)。实验组和对照组又分为术后7d,14d,21d,28d共4个时相点,每个时相点5只用于免疫组化检测,每时相点5只用于RT-PCR和Western blotting检测。实验组于术后24h开始跑笼训练,其余大鼠在标准笼内自由活动。

1.2.2 动物模型建立: 参照Rosenberg方法^[1],实验组和对照组应用胶原酶Ⅶ诱导大鼠尾状核脑出血模型。假手术组操作方法同前两组,但不注射胶原酶,只注射同等剂量的生理盐水。

1.3 免疫组化标本采集

取大鼠于相应时间点,将动物用速眠新注射液(0.2ml/mg)麻醉后,迅速开胸,经心脏至主动脉插管,先用生理盐水约100ml冲洗血液,然后以多聚甲醛约400ml先快后慢进行灌流固定1.5—2h。迅速解剖取出大脑,去除额极4mm前部脑组织,经脑表面穿刺点冠状切开标本,取穿刺点后约4mm的脑组织,放入4%多聚甲醛液固定,经脱水、透明、石蜡包埋,免疫组化备用。

1.4 caspase-3检测

caspase-3蛋白检测采用免疫组化SP法。具体步骤按试剂盒说明书进行,兔抗caspase-3多克隆抗体,工作浓度1:100。caspase-3蛋白以细胞胞浆呈棕黄色着色为阳性细胞。随机选择5个视野,然后算出每高倍(400×)镜下阳性细胞数。

1.5 RT-PCR和Western blot取材

操作者严格操作,戴口罩、帽子、手套,由专人负

责断头处死大鼠,专人使用200℃干烤的器械于手术台上留取右侧血肿周围大脑组织100mg×2,迅速将组织置于4℃DEPC水中洗去血液后,放入消毒冻存的EP管内,投入液氮壶中,然后放入-80℃冰箱保存备用。

1.6 Western印迹法检测caspase-3蛋白表达

取各组100mg的脑组织加1ml裂解液(A液1ml,B液10 μ l,C液1 μ l)在研磨器内匀浆后,冰浴1h,4℃12000r/min离心30min,取上清,用分光光度计测定各组蛋白浓度。然后配置12%分离胶及5%浓缩胶,分别取样品100 μ g,加溴酚蓝5 μ l,煮沸5min,12,000r/min速离心1min,上样。先用电压80V,进行电泳,30min后,用电压100V,进行电泳,至溴酚蓝到底,取出凝胶进行转膜。按胶正膜负的原则将转膜夹放入转膜仪。转膜电压为100V,时间为1h。转膜完成后取出PVDF膜,用含有5%脱脂奶粉及10%BSA的TBS或PBS溶液孵育1h,封闭非特异性染色,然后用1:200的抗体孵育(1cm²的膜/0.1ml抗体),4℃过夜。二抗1:3000的IRDye700(山羊抗兔IgG),室温孵育2h,0.1%PBST彻底洗涤5min×4次,通过Odyssey红外荧光扫描成像系统进行扫描分析。

1.7 RT-PCR测定caspase-3mRNA表达水平

用Trizol RNA提取试剂提取细胞总RNA,紫外线分光光度计测定总RNA的浓度和纯度,用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定总RNA的质量。cDNA第一链合成后37℃反转录60min,95℃5min灭活反转录酶。反转录后cDNA作为PCR模板,扩增。上游引物:5'-gca gca gcc tca aat tgt tga cta -3',下游引物:5' tgc tcc ggc tca aac cat c-3',R-caspase-3基因扩增条件为:94℃5min,然后95℃30s,52℃30s,(35个循环),72℃延伸5min。扩增目的片段长度为144bp。同时扩增鼠 β -actin用作内参照,保证每次实验的相对可比性。扩增的目的片段长度为375bp。然后取RT-PCR产物4 μ l,加上样缓冲液1 μ l,在1.5%琼脂糖凝胶(含EB)上电泳,80V,45min,用UVP凝胶图像成像系统拍摄打印实验结果,用凝胶图像分析系统(Gel-Pro Analyzer 3.0版)分析结果。

1.8 统计学分析

应用State 8.0软件进行分析。数据以均数±标准差表示,各组均数的比较行单因素方差分析,进行两两比较。以P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 caspase-3免疫组化结果

caspase-3 阳性细胞表达为细胞胞浆着棕黄色,着色部位主要见于血肿周围和大脑皮质的神经元。实验组随运动训练时间延长似乎有表达上调趋势,尽管 28d 时有下降迹象,但仍处于较高水平。对照组也有同样变化,虽然表达水平较实验组更明显,但两组差异无显著性意义($P>0.05$),实验组与假手术组相比差异有非常显著意义($P<0.01$)(图 1,见前置彩色插页 5,表 1)。

2.2 血肿周围组织 caspase-3 蛋白含量测定

用抗 caspase-3 多克隆抗体进行 Western blotting,Odyssey Western blotting 分析结果显示,在分子量相当于 32KD 和 17KD 的区域各存在一 caspase-3 蛋白带。 β -actin 分子量相当于 42KD 区域。实验组与对照组相比,虽然 caspase-3 蛋白含量各时间点都有下降趋势,但两组差异无显著性意义($P>0.05$),实验组和对照组与假手术组比有显著性差异($P<0.05$),见图 2,表 2。

2.3 caspase-3 RT-PCR 检测

在 144bp 处和 375bp 处分别为 caspase-3 和 β -actin 的扩增带。取 caspase-3 与 β -actin 的比值为基因表达量。结果显示,在运动后 7d—28d 实验组与对照组基因表达无明显区别 $P<0.05$,两组在 21d—28d 与假手术组比差异显著意义 $P<0.05$ (见图 3,表 3)。

表 1 各组 caspase-3 阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

组别	7d	14d	21d	28d
实验组	16.2 $\pm$ 1.30 ^①	22.8 $\pm$ 3.11 ^①	34.8 $\pm$ 3.07 ^①	23.0 $\pm$ 4.74 ^①
对照组	15.0 $\pm$ 1.58 ^①	26.5 $\pm$ 5.86 ^①	41.2 $\pm$ 6.07 ^①	30.0 $\pm$ 3.08 ^①
假手术组	2.20 $\pm$ 1.58	2.44 $\pm$ 1.76	3.34 $\pm$ 1.27	2.78 $\pm$ 1.45

①与假手术组比较 $P<0.01$

表 2 各组 caspase-3 阳性蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

组别	7d	14d	21d	28d
实验组	0.76 $\pm$ 0.13 ^①	0.69 $\pm$ 0.06 ^①	0.72 $\pm$ 0.13 ^①	0.79 $\pm$ 0.18 ^①
对照组	0.76 $\pm$ 0.15 ^①	0.84 $\pm$ 0.77 ^①	0.82 $\pm$ 0.15 ^①	0.86 $\pm$ 0.16 ^①
假手术组	0.35 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.14

①与假手术组比较 $P<0.01$

表 3 各组 caspase-3 RT-PCR 定量数值 ($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

组别	7d	14d	21d	28d
实验组	0.89 $\pm$ 0.24	0.95 $\pm$ 0.31	0.99 $\pm$ 0.19 ^①	1.01 $\pm$ 0.29 ^①
对照组	0.86 $\pm$ 0.17	0.90 $\pm$ 0.21	1.01 $\pm$ 0.45 ^①	1.04 $\pm$ 0.29 ^①
假手术组	0.71 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.14

①与假手术组比较 $P<0.01$

3 讨论

研究证实,细胞凋亡机制参与了脑出血后继发性脑损伤。近年,又不断有临床研究报告证实脑出血患者存在细胞凋亡现象,如 Qureshi 等^[4]在 12 例行血肿清除术的脑出血患者中发现,10 例患者可见明显细胞凋亡。患者出血 24h 内可检测到凋亡细胞,5d 时仍可见到凋亡细胞。而且患者凋亡细胞与坏死细

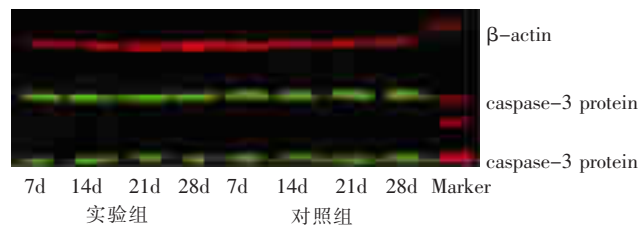


图 2 各组 caspase-3 Western 印迹分析结果

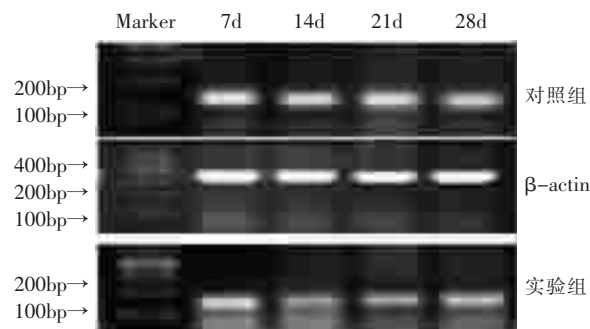


图 3 各组不同时间 caspase-3 RT-PCR 分析结果

胞的比例大致相等。研究表明,凋亡是脑出血后血肿周围区细胞死亡的主要形式。国内王文昭等^[5]选取 10 例因脑出血而死的尸检脑标本,应用 HE 染色, caspase-3 免疫组织化学染色和 caspase-3 mRNA 原位杂交,观察脑出血时海马区神经元损伤变化与 caspase-3 的关系。结果发现,海马 CA1 区,出血后 5h 可检测到 caspase-3 免疫组化染色的阳性细胞,24—48h 达高峰。caspase-3 mRNA 原位杂交表达始于 5h,24h 达高峰,二者均在 72h 后呈明显下降趋势。而 TUNEL 阳性细胞于出血后 24h 方可检测到,持续到 72h。郭富强^[6]和吴成翰等^[7]研究结果同样显示,细胞凋亡机制参与了脑出血继发性损伤,而且部分基因参与了神经元凋亡的调控,Bax, caspase-3 促凋亡,Bcl-2, P53 抑制凋亡。

本研究应用胶原酶诱导法制作大鼠脑出血模型,对照组(即 ICH 不运动组)自术后 7d—28d, caspase-3, caspase-3 mRNA 表达明显高于假手术组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明 caspase-3 参与了脑出血后细胞凋亡,而且持续时间较长,与上述研究一致。

半胱氨酸基天冬氨酸特异性蛋白酶(cysteineyl aspartate specific proteinase, caspase)属 ICE(interleukin-1 β convert enzyme)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]。迄今发现,caspase 家族至少有 4 个成员,其中 caspase-3 是在细胞凋亡中起关键作用的一种半胱氨酸蛋白酶。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 只有被激活才能降解多种胞内蛋白,导致胞体固缩,染色体崩解,凋亡小体形成^[10]。

Lee 等^[11-12]对高血糖脑出血和胶原酶诱导的脑出血模型研究显示,脑出血后 24h 开始踏车训练,30min/d,共 10d,结果发现运动可以抑制血肿体积扩大,以及 caspase-3 的表达,增加齿状回细胞增殖。由此推断,踏车运动可以改善脑出血后中枢神经系统功能,并为高血糖脑出血患者提供治疗价值。本研究发现显示:caspase-3mRNA 和 caspase-3 在实验组和对照组均有不同程度的表达,且与假手术组有显著差异,说明 caspase-3 参与了 ICH 后神经细胞凋亡。运动干预后,无论是 caspase-3 基因表达还是蛋白表达在实验组似乎有上调趋势,但与对照组相比未发现显著性意义,这可能与样本量小,实验操作过程或抗体来源等因素有关。但是,有作者研究发现^[13],有小部分 tunel 阳性细胞,caspase-3 却呈阴性。这可能意味着人出血后 caspase-3 参与了神经元的死亡,但并不是所有出血神经元的损伤都需要 caspase-3 的介导,有动物实验表明某些细胞凋亡不依赖 caspase-3,可能有其他酶类参与,且恰好也能产生被 TUNEL 标记的 DNA 片段。本研究发现,caspase-3 参与了 ICH 后神经细胞凋亡,但运动训练对其抑制作用不明显。这除了实验样本、运动方式、试剂及操作等因素影响外,也有可能运动抑制了 caspase-3 之外的其他途径,如 bcl-2 家组成员。考虑到神经细胞凋亡是一个极其复杂的过程,运动训练到底对其有多大的影响?哪些因子参与其中?作用大小等,还有待于进一步研究。

4 结论

本研究采用胶原酶诱导的脑出血模型,通过跑笼运动训练 4 周,结果显示,caspase-3 参与了 ICH

细胞凋亡的发生,从而引起继发性脑损伤(对照组),但运动训练对 caspase-3 蛋白及其 caspase-3mRNA 的抑制作用不明显。

参考文献

- [1] Lee HH, Shin MS, Kim YS, et al. Early treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats[J]. J Diabetes Complications, 2005,19(6):339—346 .
- [2] Lee HH, Kim H, Lee MH, et al. Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats [J]. Neurosci Lett, 2003,352(1):33—36 .
- [3] Rosenberg GA, Mun-Bryce BS, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. Stroke,1990,21(5): 801—807.
- [4] Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage[J]. Neurosurgery,2003,52: 1041—1047.
- [5] 王文昭,戚基萍,王德生,等.人脑出血后海马神经元损伤与 caspase-3 的关系[J]. 中风与神经疾病杂志, 2005,2:107—110.
- [6] 郭富强,李晓佳,陈隆益,等. 脑出血患者血肿周围组织细胞因子与细胞凋亡相关基因表达动态观察[J]. 中华神经学杂志,2006,5 (11):1097—1101.
- [7] 吴成翰,丁喜燕,王海燕,等. 脑出血患者血肿周围神经元凋亡及相关调控基因的观察[J]. 中华医学杂志,2006,86(3):3073—3076.
- [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] Mac 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].第 2 版.北京:北京科学出版社, 2001.202.
- [11] Lee HH, Kim H, Lee MH, et al. Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats [J]. Neurosci Lett, 2003,352(1):33—36.
- [12] Debow SB, Davies ML, Clarke HL, et al. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercise lessen deficits and volume of brain injury after stratal hemorrhage stroke in rats[J]. Stroke,2003,34(4):1021—1026.
- [13] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death[J]. Neurosci Lett, 2000,283:230—232.