

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.02.005

前列腺素 E1 对大鼠全脑缺血-再灌注损伤细胞凋亡及 Caspase-3 表达的影响*

戴伟娟 朱凡河 张国安 徐旭东 王旭
(济宁医学院基础医学院, 济宁, 272067)

摘要 目的 探讨前列腺素 E1 (PGE1) 对大鼠全脑缺血-再灌注损伤神经元凋亡和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 表达的影响。**方法** 将健康雄性 Wistar 大鼠 24 只, 随机分为 3 组: 假手术组、缺血-再灌注模型组、PGE1 组 (12 μg/kg), 药物于缺血前 5mins 静脉滴注, 持续 2h; 利用双侧颈总动脉结扎法建立大鼠全脑缺血-再灌注模型, 形态学方法观察细胞凋亡的变化, 免疫组化染色方法检测脑组织 Caspase-3 表达的变化。**结果** 缺血 20mins, 再灌注 6h 后, 缺血-再灌注模型大鼠脑组织细胞凋亡数和 Caspase-3 的表达, 较假手术组明显增多 ($P < 0.05$), 与缺血-再灌注模型组相比, PGE1 组能减少细胞凋亡的数量, 抑制 Caspase-3 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** PGE1 脑保护作用机制与其抑制神经细胞凋亡和 Caspase-3 表达有关。

关键词 前列腺素 E1; 脑缺血-再灌注; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3
中图分类号: R743 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)04-098-05

Effects of PGE1 on the apoptosis and expression of caspase-3 in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

DAI Weijuan, ZHU Fanhe, XU Xudong, ZHANG Guoan, WANG Xu
(School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Prostaglandin E1 (PGE1) on the neuronal apoptosis and expression of caspase-3 in rats with whole brain ischemia-reperfusion injury. **Methods** 24 healthy male Wistar rats were randomly divided into three groups which were sham operated group (n = 8), cerebral ischemia-reperfusion model group (n = 8). PGE1-pretreated groups (12 μg/kg, n = 8). Rats model of whole cerebral ischemia-reperfusion injury were made through bilateral common carotid artery ligation for 20min followed with 6 hours of reperfusion. The change of cellular apoptosis were observed with morphological method, and the expression of caspase-3 were detected using immunohistochemical method. **Results** After the ischemia for 20 min and reperfusion for 6 h in rats, the number of apoptotic cells and the expressions of caspase-3 in brain tissue were increased compared with those in the sham operative group ($P < 0.01$). In PGE1 group, the number of apoptosis cells and the expressions of caspase-3 were lower than those in the ischemia reperfusion model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The protective mechanism of PGE1 on cerebral ischemia-reperfusion injury is related to reducing neuronal apoptosis by inhibiting the expression of caspase-3.

Keywords: Prostaglandin E1; Rat; Cerebral ischemia-reperfusion; apoptosis; Caspase-3

前列腺素 E1 (prostaglandin E1, PGE1), 为二十碳不饱和羟基脂肪酸的衍生物, 属天然前列腺素类物质。具有舒张血管, 改善微循环, 细胞保护, 抑制血小板聚集活化、炎症细胞浸润及免疫复合物形成

等作用。临床用于心脑血管病等疾病的治疗^[1]。以往研究证明, PGE1 对脑缺血-再灌注损伤具有保护作用, 能够减轻脑水肿, 缩小脑梗死体积、改善脑损伤的病理形态变化; 抑制脂质过氧化反应, 降低 MDA 的含量, 增强 SOD、GSH-Px 及 ATP 酶的活力; 减少 TNF-α 和 IL-1β 生成等^[2-3], 但其保护机制

* [基金项目] 山东省自然科学基金项目(2012ZRB14146)

尚未完全清楚。目前认为,细胞凋亡在脑缺血-再灌注损伤的发生发展过程中起着重要作用,其凋亡过程又受多种基因的调控。本实验通过建立大鼠全脑缺血-再灌注模型,观察 PGE1 对脑缺血-再灌注损伤后神经细胞凋亡及促凋亡基因 Caspase-3 表达的影响,进一步探讨 PGE1 的脑保护作用机制,为 PGE1 防治脑缺血-再灌注损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠,体质量 250 ~ 300g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,许可证号:410108600026354。

1.1.2 药品、试剂及仪器 前列腺素 E1 (沈阳市生物化学制药厂);免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)、DAB 显色剂[基因科技(上海)股份有限公司];Leica RM2235 切片机(德国 Leica 公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);电热恒温烤箱(上海跃进医疗器械)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组与给药 将 Wistar 大鼠随机分为假手术组、缺血-再灌模型组、PGE1 组(12μg/kg),每组 8 只。PGE1 粉针剂溶于生理盐水中,于阻断血流前 5mins 经阴茎静脉开始滴入,持续 2h。假手术组和模型组均于相同时间段由阴茎静脉滴入同容积的生理盐水。

1.2.2 大鼠全脑缺血-再灌注模型的制备及取材 取雄性大鼠称重,用 10% 水合氯醛(350mg·kg⁻¹)麻醉后,仰卧固定于大鼠手术板上,剪毛、消毒、钝性分离暴露双侧颈总动脉,用无创伤性动脉夹同时夹闭双侧颈总动脉,阻断血流,20mins 后,松开动脉夹恢复供血(即再灌注)。假手术组分离出双侧颈总动脉后进行缝合,其余不作处理。再灌注 6h,断头取脑,4% 的多聚甲醛固定,脱水,常规石蜡包埋,制成蜡块。

1.2.3 细胞凋亡的形态学观察 取制备好的蜡块,连续行 5μm 厚度的切片,苏木素-伊红(HE)染色,每组取两张片子,每张随机选取海马区 5 个视野,光镜下计数凋亡细胞数。

1.2.4 免疫组织化学法(SABC 法)检测 Caspase-3 的表达 取制备好的蜡块,连续行 5μm 厚度的切

片,严格按照免疫组化试剂盒说明书,经脱蜡、水化、抗原修复等步骤操作,直至封片,然后加入一抗(阴性对照组以 PBS 代替一抗)、二抗,DAB 显色。每组取 3 张切片,每张切片随机选取 3 个视野,于 400 倍光学显微镜下,观察脑缺血-再灌注 6h 后 Caspase-3 的表达情况,计数出现棕黄色颗粒的阳性细胞。

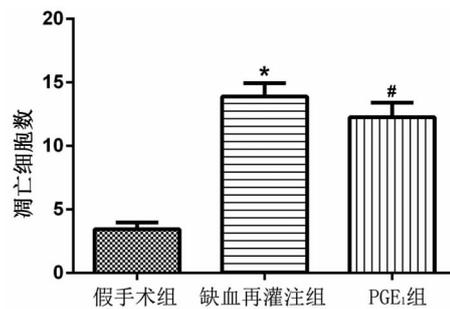
1.3 统计学方法

实验数据应用 SPSS17.0 统计软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,总体差异采用方差分析,并运用 SNK-q 检验法进行两两比较, $P \leq 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组缺血-再灌注大鼠脑组织凋亡神经细胞计数

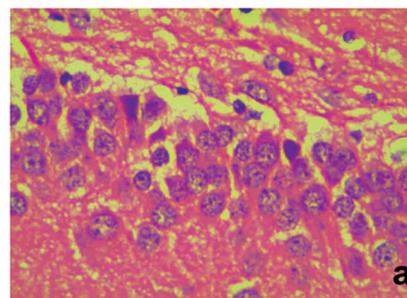
假手术组、缺血-再灌模型组及 PGE1 处理组均可看到凋亡的神经细胞,显示细胞质浓缩,体积缩小,细胞核染色质凝聚成新月状。计数结果显示,与假手术组相比,缺血-再灌注模型组凋亡细胞数明显增加($P < 0.01$);PGE1 组与模型组相比凋亡细胞数显著减少($P < 0.01$)。见图 1、2。

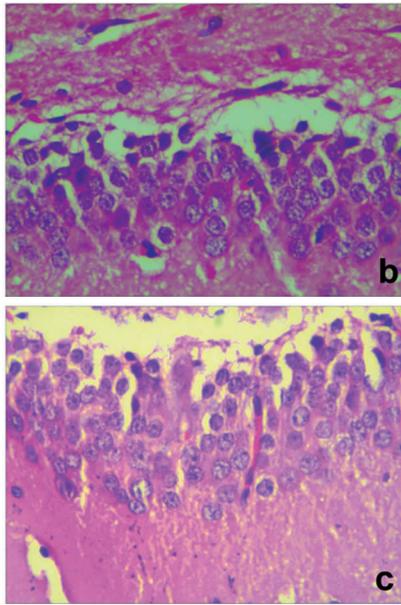


注:3 组间比较, F 值 = 67.953, $P = 0.000$;

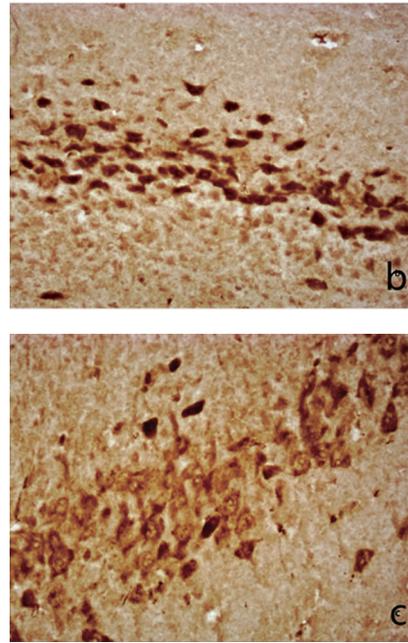
与假手术组相比, * $P < 0.01$; 与缺血-再灌注组相比, # $P < 0.01$

图 1 各组缺血-再灌注脑组织凋亡神经细胞数比较





注:a.假手术组 b.缺血再灌模型组 c.低剂量组
图2 各组大鼠脑组织(海马区)凋亡神经细胞形态学变化(HE染色, ×400)



注:a.假手术组 b.缺血-再灌模型组 c.低剂量组
图3 各组大鼠脑组织 Caspase-3 的表达(SABC染色, ×400)

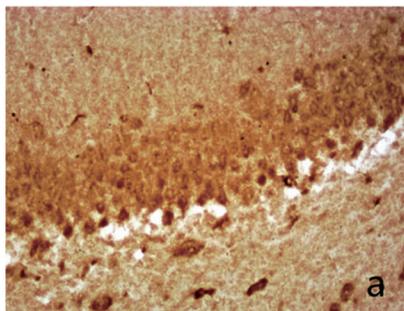
2.2 各组缺血-再灌注大鼠脑组织 Caspase-3 表达结果

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 Caspase-3 的表达明显高于假手术组,差异有统计学意义($q = 13.5579, P < 0.01$),与模型组相比,PGE1 组 Caspase-3 的阳性细胞数显著减少($q = 9.9229, P < 0.01$)。结果见表 1、图 3。

表1 各组大鼠脑组织 Caspase-3 阳性细胞数比较(n, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性细胞数
假手术组	8	2.556 + 1.236
模型组	8	37.78 + 5.333 *
PGE1 组	8	12.00 + 2.872 #
F 值		208.76
P		0.000

注:与假手术组相比, * $P < 0.01$;与缺血-再灌注组相比, # $P < 0.01$



3 讨论

临床研究报告,用 PGE1 治疗脑卒中,病人的神经功能症状,肌力、语言能力恢复等较好,且治愈后的复发率较低^[4-6]。既往实验研究发现,PGE1 对多种器官缺血-再灌注损伤具有保护作用。随着分子生物学研究的不断深入,人们发现脑缺血-再灌注可诱发神经细胞凋亡^[7],有报道脑缺血 2h 再灌注 0.5h,可见有较多的凋亡细胞,随着再灌注时间的延长,在多个脑区均有凋亡细胞的分布^[8],认为细胞凋亡是脑缺血-再灌注后引起继发性损害的重要原因之一,而细胞凋亡过程又是受多个相关的促凋亡和抑凋亡基因严格控制的级联反应。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cysteine aspartic acid protease, Caspase)家族是一大类调控凋亡的重要蛋白酶,在凋亡过程中发挥始动和效应作用。国内外研究均证实,在缺血-再灌注损伤的脑组织 Caspase-3 的表达增强,凋亡细胞数增多,且两者存在相关性。Caspase-3 抑制剂可使缺血区脑组织凋亡细胞数明显减少,并进一步证明了 Caspase-3 是细胞凋亡的重要执行者,在细胞凋亡的级联反应中发挥着关键作用^[9-15]。所以,Caspase-3 已成为研究防治脑缺血-再灌注损伤药物的靶点。PGE1 对脑缺血-再灌

注损伤保护作用是否与其抑制神经细胞凋亡有关的研究也较少。鉴于神经细胞凋亡及促凋亡调节基因 Caspase-3 与脑缺血-再灌注损伤关系密切,本文利用大鼠全脑缺血-再灌注模型,旨在探讨 PGE1 是否通过抑制神经细胞凋亡及促凋亡基因 Caspase-3 的表达发挥脑保护作用,从分子水平探讨与之有关的作用机制。

本文结果显示,大鼠全脑缺血 20mins 再灌注 6h 后,光镜下发现假手术组海马区偶见散在的凋亡神经细胞,而缺血-再灌注模型组可见大量凋亡的神经细胞,计数结果统计,与假手术组相比有显著性差异($P < 0.01$),这一结果又进一步证实了脑缺血-再灌注可诱导神经细胞凋亡;应用 PGE1 的大鼠脑组织可看到呈凋亡形态学改变的神经细胞明显减少,与模型组相比有显著性差异($P < 0.01$),提示 PGE1 可能通过抑制缺血-再灌脑组织神经细胞凋亡,发挥脑保护作用的。本文显示在大鼠全脑缺血 20mins 再灌注 6h, Caspase-3 在缺血-再灌注组表达显著升高,与假手术组比较有显著性差异($P < 0.05$),说明全脑缺血-再灌注后可诱导 Caspase-3 表达,而 PGE1 组能使促凋亡基因 Caspase-3 的表达减少,与缺血-再灌模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。多数观点认为, Caspase-3 是最关键的凋亡执行蛋白酶,在各种诱因启动的凋亡程序中起最后枢纽作用,所以,抑制其表达可以使凋亡细胞数量减少。目前研究已证明,脑缺血-再灌注后可造成氧自由基(OFR)爆发性增加,是诱发神经细胞凋亡的触发因子。本文及其他研究证明,PGE1 有较强的抗氧化作用,可抑制自由基的产生,提高抗氧化酶的活性。故推测 PGE1 减少缺血-再灌注脑组织神经细胞的凋亡,可能与抑制自由基的产生,脂质过氧化减弱,进而抑制 Caspase-3 等促凋亡基因的激活有关。

参考文献:

[1] 周如君,武英. 前列地尔的剂型及临床研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2014(11):1883-1887. DOI: 10.11723/mtgyx1007-9564201411055.
 [2] 戴伟娟,王旭,张伟,等. 前列腺素 E1 对脑缺血再灌注损伤的治疗作用[J]. 济宁医学院学报,2001,24(3):13-14. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2001.03.006.

[3] 冯国清,吴红霞,王振基,等. 前列腺素 E1 对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2003,19(4):427-431. DOI: 10.3321/j.issn:1001-1978.2003.04.017.
 [4] 李连,王建国. 前列腺素 E1 治疗急性脑梗塞的疗效观察[J]. 脑与神经疾病杂志,2000,8(1):34-35. DOI:10.3969/j.issn.1006-351X.2000.01.011.
 [5] 杨红雯,任会英. 前列腺素 E1 治疗急性脑梗塞临床观察[J]. 航空航天医药,2005(3):24.
 [6] 王森,荣阳,荣根满. 前列腺素 E1 治疗脑梗死合并冠心病的疗效分析与临床研究[J]. 中国医药指南,2016,14(15):79-80.
 [7] Peng J, Mao XO, Stevenson FF, et al. The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (31): 32626-32632. DOI: 10.1074/jbc.M404596200.
 [8] Dong C, Yang DD, Tournier C, et al. JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation [J]. Nature, 2000, 405 (6782): 91-94. DOI: 10.1038/35011091.
 [9] 刘天会,陈瑞,杜艳玲. 小鼠短暂前脑缺血海马中半胱天冬酶-3 酶原表达的变化[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2006,22(1):55-58. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7626.2006.01.009.
 [10] Chen J, Nagayama T, Jin K, et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia [J]. J Neurosci, 1998, 18(13):4914-4928.
 [11] Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, et al. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2003, 29(5): 472-481. DOI: 10.1046/j.1365-2990.2003.00485.x.
 [12] Zhou HP, Wang MS, Shi F, et al. Effects of acupuncture pre-conditioning on apoptosis in hippocampal neurons following ischemia-reperfusion injury in aged rats [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011, 91(17):1203-1206.
 [13] 王向慧,王迪. 尼莫地平对大鼠急性脑缺血再灌注损伤 NF-κB 和 caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国生化药物杂志,2015,36(1):10-13.
 [14] 王宇卉,卞杰勇,强华,等. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂对大鼠脑缺血模型 DNA 损伤的实验研究[J]. 中国临床康复,2003,7(7):1064-1065. DOI:10.3321/j.issn:

1673-8225. 2003. 07. 015.

- [15] Harrison DC, Davis RP, Bond BC, et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 89 (1-2): 133-146.

DOI:10.1016/S0169-328X(01)00058-4.

(收稿日期 2017-03-09)
(责任编辑:石俊强)

.....
(上接第 97 页)

糖转运蛋白-2 及胰岛淀粉样多肽的转录,甚至与胰岛的再生有关,因此,PDX-1 可作为胰腺干细胞的特异性标志之一^[9-10]。本实验用 RT-PCR 检测了第 2 代,第 4 代和第 6 代 HUMSCs 经 bFGF, EGF, β -巯基乙醇诱导后细胞 PDX-1 的表达,实验组均出现相应的 PDX-1 蛋白条带,对照组无 PDX-1 蛋白的表达,加入高糖培养基后检测到的胰岛素的表达也是如此。经双硫腍染色来鉴别细胞内锌离子螯合情况,实验组细胞部分细胞胞浆被染成棕红色,说明此部分细胞内有锌离子螯合情况。综上所述,在体外含有 bFGF, EGF, β -巯基乙醇及后来的高糖培养基的微环境中 HUMSCs 可诱导出具有胰岛素分泌功能的胰岛细胞。利用本实验方法得到的 HUMSCs 经诱导分化可以得到胰岛样细胞,但诱导得到的胰岛样细胞若植入体内后,是否能分泌合适的胰岛素等激素水平去发挥正常内分泌细胞的功能,仍需要深入研究。希望能通过努力为糖尿病病人从细胞水平提供一个较好的细胞来源。

参考文献:

- [1] Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone[J]. Stem Cells, 2002, 20(4):284-292. DOI:10.1634/stemcells.20-4-284.
- [2] Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 2009:789526. DOI:10.1155/2009/789526.
- [3] 高彦琳,张宁坤,陈厚良,等.改良原代培养体系提高人脐带间充质干细胞的产量[J].中国组织工程研

究, 2015, 19 (10): 1477-1481. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2015.10.001.

- [4] Ma L, Feng XY, Cui BL, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells[J]. Chin Med J, 2005, 118(23):1987-1993.
- [5] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets[J]. Science, 2001, 292(5520):1389-1394. DOI:10.1126/science.1058866.
- [6] 袁丽丽,马登殿,孔佑华. EPO 促进胚胎神经干细胞向神经元分化的形态学研究[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(5):313-315. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2014.05.003.
- [7] Naujok O, Francini F, Picton S, et al. A new experimental protocol for preferential differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells[J]. Cell Transplant, 2008, 17(10-11):1231-1242. DOI: 10.3727/096368908787236549.
- [8] 马桂霞,何红燕,罗敏洁,等.人脐带间充质干细胞分化为胰岛 β 细胞的实验研究[J].实用儿科临床杂志, 2008, 23(8):618-620. DOI: 10.3969/j.issn.1003-515X.2008.08.022.
- [9] Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow[J]. Diabetes, 2004, 53(7):1721-1732. DOI:10.2337/diabetes.53.7.1721.
- [10] Cho YM, Lim JM, Yoo DH, et al. Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic beta-cell differentiation in human embryonic stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366(1):129-134. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.11.112.

(收稿日期 2016-11-22)
(责任编辑:石俊强)