

川芎嗪对发育期大鼠惊厥性脑损伤后海马 caspase - 1 mRNA 表达的影响

刘利群, 毛定安, 薄涛, 白海涛, 熊洁

(中南大学湘雅二医院儿科, 湖南长沙 410011)

【摘要】 目的: 探讨发育期大鼠反复惊厥后海马 caspase - 1 mRNA 表达及川芎嗪对其表达的影响。方法: 162 只 20 日龄健康 SD 大鼠随机分为对照组、惊厥组及川芎嗪组。采用三氟乙醚反复吸入(连续 6 次, 每日 1 次)方法制作发育期大鼠惊厥模型。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组动物反复惊厥后 6 h 及 1、3、7 d 时海马组织 caspase - 1 mRNA 的表达, 同时观察脑含水量的变化和光镜下海马区神经元病理改变, 并对脑损伤进行病理半定量积分。结果: 川芎嗪干预组各时间点 caspase - 1 mRNA 表达较惊厥组均显著下调, 脑含水量(7 d 时除外)和脑损伤积分显著降低(P 均 < 0.01), 海马神经水肿、变性、坏死均明显减轻。结论: 川芎嗪能有效减轻惊厥性脑水肿和海马神经元病理损伤, 其机制可能与抑制海马 caspase - 1 mRNA 异常表达有关。

【关键词】 caspase - 1; 脑损伤; 脑发育; 海马; 惊厥; 基因表达; 川芎嗪

中图分类号: R285.5; Q344.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-9691(2006)01-0019-04

Effect of tetramethylpyrazine on expression of caspase - 1 mRNA in the hippocampus of the developing rats following recurrent seizures LIU Li - qun, MAO Ding - an, BO Tao, BAI Hai - tao, XIONG Jie. Department of Pediatric, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the expression of caspase - 1 mRNA in hippocampus of developing rats following recurrent seizures and the effects of tetramethylpyrazine on it. **Methods:** One hundred and sixty-two postnatal Sprague - Dawley rats of 20-day old were randomly divided into three groups: the control group, the seizure group and the tetramethylpyrazine treated group. Seizure model of rats were induced by inhalant flurothyl daily in 6 consecutive days. Brain tissue was sampled at 6 hours, 1 day, 3 days and 7 days in each group after last seizure, and the expression of caspase - 1 mRNA in the hippocampus was detected by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR). At the same time, the water content was detected and the pathological changes in the hippocampus of rats were observed after recurrent seizures and the brain injury was evaluated by using a semiquantitative neuropathological scoring system. **Results:** In tetramethylpyrazine treated group, the levels of caspase - 1 mRNA in the hippocampus, water content of brain tissues and neuropathological score at different time points were obviously lower than those in seizure group (except water content of brain tissues at 7 days, all $P < 0.01$); edema, degeneration and necrosis of nerve cells in the hippocampus of the rat were also significantly decreased. **Conclusion:** Tetramethylpyrazine can effectively decrease brain edema and neuron injuries of the hippocampus induced by seizures and its protective mechanism on the developing brain injury of seizures is probably related to the suppression of the abnormal levels of caspase - 1 mRNA in the hippocampus.

【Key words】 caspase - 1; brain injury; brain development; hippocampus; seizure; mRNA expression; tetramethylpyrazine

反复或持续惊厥常导致儿童智力低下等继发性脑损害, 但到目前为止对惊厥性疾病仍缺乏有效的治疗手段。已有实验证实, 中药川芎嗪对脑损伤和氧剥夺损伤鼠星形胶质细胞皆有保护作用^[1,2], 但川芎

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400483)

作者简介: 刘利群(1971-), 女(汉族), 湖南望城人, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为小儿神经系统疾病。

嗪对发育期惊厥性脑损伤的防治作用以及对惊厥性脑损伤后 caspase - 1(cystine - containin aspartate - specific protease)表达是否有影响, 目前未见报道。本实验中拟以发育期大鼠制作惊厥模型, 并以川芎嗪进行干预研究, 观察惊厥后海马组织 caspase - 1 mRNA 表达变化及川芎嗪对其表达的影响, 以期阐明川芎嗪治疗发育期惊厥性脑损伤的可能机制, 为

其对发育期脑损伤进行临床干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:20 日龄健康 SD 大鼠 162 只(本院实验动物中心提供),雌雄各半,体重(52.30±1.85)g。按随机数字表法分为对照组(18 只)、惊厥组(72 只)及川芎嗪组(72 只)3 组。其中川芎嗪组大鼠在每次惊厥后立即腹腔注射川芎嗪 50 mg/kg,12 h 后再重复注射 1 次,连用 6 d。与此同时,惊厥组大鼠腹腔内注射等量生理盐水,连用 6 d。对照组大鼠除不吸入三氟乙醚外,其他处理与惊厥组完全相同。惊厥组和川芎嗪组大鼠再随机分为末次惊厥后 6 h、1 d、3 d 和 7 d 共 4 个时间点亚组,每个时间点 18 只动物,其中 6 只用于 caspase-1 mRNA 的检测,6 只用于脑含水量的测定,另外 6 只用于脑组织病理形态学观察。

1.2 三氟乙醚致大鼠惊厥模型的制备^[3]:将大鼠放入一个长方形的实验舱(30 cm×20 cm×20 cm)内,通过舱顶的注射孔将液态三氟乙醚(Aldrich 公司)0.1 ml 缓慢滴在舱内滤纸上,封闭舱顶。从大鼠出现惊厥开始记时,30 min 后取出大鼠,观察大鼠恢复情况。每日诱导大鼠惊厥 1 次,连续 6 d。

1.3 主要实验试剂及引物:Trizol 试剂(RNA 淬取液)由 GIBCO BRL 公司提供;cDNA 逆转录试剂盒、TaqDNA 聚合酶及 dNTP Mix 脱氧核苷酸混合物皆由美国 Promega 公司提供。caspase-1、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物皆由北京奥科生物有限公司设计合成,引物序列如下:caspase-1 上游引物:5'-CAG GAG GGA ATA TGT GGG ATC A-3',下游引物:5'-GGA CAG GAT GTC TCC AGG ACA C-3',扩增产物长度 313 bp;GAPDH 上游引物:5'-CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3',下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3',扩增产物长度 451 bp。

1.4 实验方法

1.4.1 脑组织病理形态学观察:大鼠经体积分数为 4%的多聚甲醛缓冲液(4℃预冷,pH 7.4)行心脏灌注固定,然后断头开颅,取双侧大脑半球置于 4%多聚甲醛液中固定 24 h 后,常规石蜡包埋,从视交叉处进行连续冠状切片 5 张,4 μm 厚,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察神经元病理改变。

1.4.2 海马组织中 caspase-1 mRNA 表达:半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)进行检测。于相应时间点对各组大鼠断头取脑,分离右侧海马,置冻存管,存于液氮中备用。采用 Trizol 总试剂进行

海马组织总 RNA 提取,然后逆转录合成 cDNA 第一链,在 DNA 循环合成仪上进行 PCR 扩增,质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳。应用凝胶成像分析系统对条带扫描分析,计算 caspase-1 RT-PCR 产物条带平均吸光度值,以 GAPDH 作为内参照,将 caspase-1 条带吸光度值与相应 GAPDH 吸光度值比较,得出 caspase-1 mRNA 的相对含量。

1.4.3 脑组织含水量测定:将动物断头处死后,尽快取出大脑,用滤纸吸尽大脑表面的血渍后,锐性分离海马组织约 100 mg,置于已称重的带盖玻璃称样杯中,用电子分析天平(分度值为 0.1 mg)称湿重后,置于 110℃恒温干燥箱内烘烤 24~36 h 至恒重(两次称样差别≤0.2 mg),称干重后,用 Elliot 公式计算各时间点脑含水量。

$$\text{脑含水量}(\%) = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

1.4.4 脑损伤积分评定^[4]:将脑组织切片进行常规 HE 染色,采用神经病理半定量积分法,将皮质损伤分为 0~4 级,4 个区域总的积分为 0~22 分。0 级无可见的损伤,4 级梗死区包括皮质的大部分。0~3 级海马、纹状体和丘脑损伤分为萎缩或可见的细胞损伤/梗死。

1.5 统计学分析:所有数据采用 SPSS11.5 统计软件进行。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素(one way ANOVA)方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海马组织病理学变化:对照组海马神经细胞排列规则,细胞结构及层次清楚,神经元未见水肿、变性和坏死,细胞核染色较均匀,弱嗜碱性呈淡蓝色(图 1)。惊厥组反复惊厥后 6 h 海马神经细胞排列疏松,神经元出现水肿和变性坏死;惊厥后 3 d 海马神经细胞排列紊乱,极向不清,神经元水肿、变性和坏死显著,有空泡变,核结构不清,固缩深染,可见凋亡细胞(图 2);7 d 时神经元水肿和变性坏死减轻,有炎性细胞浸润,胶质细胞增生明显。川芎嗪组反复惊厥后 6 h 神经元水肿较惊厥组减轻,与对照组比较无明显改变;3 d 时神经元水肿、变性和坏死较惊厥组明显减轻,核固缩较少见,与对照组相比海马神经细胞排列较疏松,但较惊厥组整齐(图 3);7 d 时炎性细胞浸润减少,胶质细胞增生不如惊厥组明显。

2.2 各组海马组织 caspase-1 mRNA 表达变化(表 1,图 4):惊厥组反复惊厥后各时间点海马组织 caspase-1 mRNA 表达量与对照组相比差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高峰位于惊厥后 7 d。

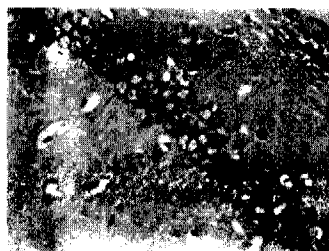


图 1 对照组海马神经元病理变化(HE, ×400)

Figure 1 Pathological changes of neuron in hippocampus of rats in control group (HE, ×400)

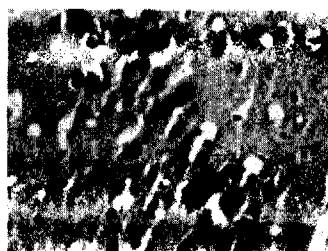


图 2 惊厥组第 3 日海马神经元病理变化(HE, ×400)

Figure 2 Pathological changes of neuron in hippocampus of rats on third day in seizure group(HE, ×400)

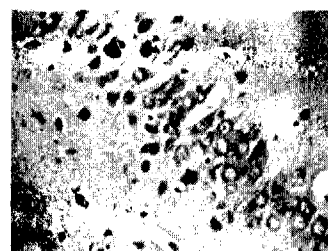


图 3 川芎嗪组第 3 日海马神经元病理变化(HE, ×400)

Figure 3 Pathological changes of neuron in hippocampus of rats on third day in tetramethylpyrazine treated group(HE, ×400)

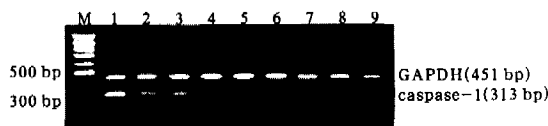
川芎嗪组各时间点海马组织 caspase - 1 mRNA 表达量均较惊厥组明显降低(P 均 < 0.01)。

表 1 各组大鼠不同时间点海马组织 caspase - 1 mRNA 表达的平均吸光度比值、脑含水量及脑损伤积分($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Average optical density ratio of caspase - 1 mRNA, water content of brain tissues and brain injury scores in the hippocampus of rats in different groups at different time points($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	时间	caspase - 1 mRNA	脑含水量(%)	脑损伤积分(分)
对照组		0.20±0.06	78.00±0.53	0
惊厥组	6 h	0.29±0.06 [#]	79.55±0.54 ^{##}	4.60±0.71 ^{##}
	1 d	0.73±0.08 ^{##}	81.79±0.64 ^{##}	9.85±0.63 ^{##}
	3 d	0.83±0.07 ^{##}	80.19±0.51 ^{##}	12.25±0.76 ^{##}
	7 d	1.03±0.05 ^{##}	77.97±0.91	11.07±0.93 ^{##}
川芎嗪组	6 h	0.19±0.05 ^{▲▲}	77.96±0.60 ^{▲▲}	2.31±0.40 ^{▲▲}
	1 d	0.29±0.08 ^{▲▲}	78.62±1.17 ^{▲▲}	4.15±0.88 ^{▲▲}
	3 d	0.35±0.03 ^{▲▲}	78.05±0.51 ^{▲▲}	6.92±1.02 ^{▲▲}
	7 d	0.50±0.03 ^{▲▲}	77.39±0.61	7.13±0.67 ^{▲▲}
F 值		148.723	23.870	155.954
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与惊厥组相应时间点比较:^{▲▲} $P < 0.01$



M 为 Marker, 1 为 7 d 惊厥组; 2 为 3 d 惊厥组; 3 为 1 d 惊厥组; 4 为 6 h 惊厥组; 5 为对照组; 6 为 6 h 川芎嗪组; 7 为 1 d 川芎嗪组; 8 为 3 d 川芎嗪组; 9 为 7 d 川芎嗪组

图 4 各组大鼠海马组织 caspase - 1 mRNA 表达
Figure 4 Expression of caspase - 1 mRNA in the hippocampus of rats in different groups

2.3 各组大鼠脑含水量变化(表 1):惊厥组大鼠脑含水量于末次惊厥后 6 h、1 d 和 3 d 均较对照组显著增高(P 均 < 0.01),惊厥后 7 d 两组间差异无显著性($P > 0.05$)。川芎嗪组脑含水量于末次惊厥后 6 h、1 d 和 3 d 均显著低于惊厥组(P 均 < 0.01)。

2.4 脑损伤积分评定(表 1):惊厥组脑损伤积分于

末次惊厥后 6 h、1 d、3 d 和 7 d 均较对照组显著升高(P 均 < 0.01)。而川芎嗪组各时间点脑损伤积分均较惊厥组显著降低(P 均 < 0.01)。

3 讨论

caspase 即半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶。对编码 caspases 基因缺陷鼠的研究表明,caspase 家族成员广泛参与了凋亡、细胞因子成熟和细胞的生长分化过程^[5]。Caspase - 1 是 caspase 家族第一个被发现的成员,因为它可以催化前白细胞介素 - 1 β (IL - 1 β) 转化为活性分子,又称为 IL - 1 β 转换酶(interleukin - 1 β converting enzyme, ICE)。另外,IL - 18 与 IL - 1 β 的结构和功能有明显的相似性,ICE 也可使 IL - 18 裂解为其活性形式。Caspase - 1 属炎性介导因子,但也参与了凋亡过程^[6]。有研究报道,caspase - 1 mRNA 和蛋白的表达在新生鼠缺血、缺氧后 1 d 开始增多,在 14 d 达到高峰^[7]。应用广谱 caspase 抑制剂 zVAD 可明显减少大鼠海马组织 caspase - 1、caspase - 3 表达和死亡神经元数目,神经学病理半定量积分也得到明显改善。Caspase - 1 特异性抑制剂 (Ac - WEHD CHO) 较 caspase - 3 特异性抑制剂 (Ac - DMQD CHO) 更显著提高了缺血后 7 d 海马锥体细胞的存活率^[8],表明 caspase - 1 可加重迟发性神经元死亡。

本研究中发现,发育期大鼠反复惊厥后各时间点海马 caspase - 1 mRNA 表达较对照组显著增加,同时海马组织病理变化显著,脑含水量、脑损伤神经病理半定量积分也明显升高,且 caspase - 1 mRNA 表达升高趋势与脑损伤积分升高趋势一致,提示 caspase - 1 参与了惊厥后脑损伤的发生、发展过程,且主要在脑损伤后期表达,并在迟发性惊厥脑损伤中发挥重要作用。Wang 等^[5]发现 caspase - 1 基因缺陷鼠中没有活性 IL - 18 和 IL - 1 β 合成,脑损伤程度较野生鼠减轻,提示 caspase - 1 介导脑损伤炎症反应是通过活化 IL - 18 和 IL - 1 β 而实现的。已

证实惊厥后鼠脑组织中 IL-1 β mRNA 表达增加,而 caspase-1 抑制剂可明显减轻 IL-1 β 的免疫反应,同时细胞凋亡的程度明显减轻,提示 caspase-1 除了通过 IL-1 β 介导脑损伤炎症反应外,对凋亡的调节作用也可能部分通过 IL-1 β 实现^[9]。由此可以推测,caspase-1 介导惊厥性脑损伤的机制可能与惊厥后 caspase-1 过度激活催化无活性的 IL-18 和 IL-1 β 前体物质,使之生成成熟的、有完全活性的细胞因子,使脑组织内 IL-18 和 IL-1 β 表达增加,进一步加剧继发性脑损伤炎症反应或凋亡,加重脑损伤。当然不能完全排除 caspase-1 的直接损伤作用,具体机制还有待于进一步研究。

研究表明,川芎嗪对缺血/再灌注脑组织具有保护作用,可减轻脑缺血/再灌注损伤后内皮细胞与白细胞的黏附^[10,11]。本研究中还发现,川芎嗪组大鼠脑组织含水量和神经病理半定量积分较惊厥组明显降低,海马神经元变性坏死减轻,炎性细胞浸润减少,表明川芎嗪可减轻发育期大鼠惊厥后脑水肿和神经元病理损伤,减轻脑内炎症反应。与此同时,川芎嗪组海马 caspase-1 mRNA 表达较惊厥组各相应时间点明显下调,且海马神经元变性和坏死减轻、病理半定量积分下降的趋势与 caspase-1 mRNA 表达下调趋势一致。提示海马 caspase-1 mRNA 的表达上调在发育期惊厥性脑损伤炎症过程中发挥了重要作用,而川芎嗪对发育期脑损伤的保护机制,可能与抑制海马 caspase-1 mRNA 的异常表达有关。caspase-1 在脑组织中主要由胶质细胞表达并分泌,惊厥后缺血、缺氧可刺激脑胶质细胞合成分泌 caspase-1 增加^[12]。川芎嗪可通过降低血黏度和扩张小动脉等作用改善缺血局部微循环而减少胶质细胞的活化,使 caspase-1 及其所激活的细胞因子 IL-1 β 、IL-18 合成减少,同时抑制了其活化白细胞黏附分子引起白细胞聚集、黏附和渗出过程,从而减轻脑水肿和神经元病理损害^[13]。但它到底通过什

么样的途径抑制惊厥所诱导的 caspase-1 表达而发挥对发育期脑损伤的保护作用,需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 杨喜民,李拴德,王晓峰,等. 川芎嗪对急性颅脑损伤大鼠治疗作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2001,8:360-361.
- [2] 毛定安,尹飞,彭镜,等. 川芎嗪对大鼠星形胶质细胞在氧糖剥夺损伤中的保护作用[J]. 中国急救医学,2005,25:36-38.
- [3] Holmes G L, Gairisa J L, Chevassus - Au - Louis N, et al. Consequences of neonatal seizures in the rat; morphological and behavioral effects[J]. Ann Neurol, 1998,44:845-857.
- [4] Bona E, Hagberg H, Loberg E M, et al. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia - ischemia, short - and long - term outcome[J]. Pediatr Res, 1998,43:738-745.
- [5] Wang J, Lenardo M J. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies[J]. J Cell Sci, 2000,113(pt5):753-757.
- [6] Knida K, Lippke J A, Ku G, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin - 1 β converting enzyme [J]. Science, 1995,267:2000-2003.
- [7] Hedtjarn M, Leverin A L, Eriksson K, et al. Interleukin - 18 involvement in hypoxic - ischemic brain injury[J]. J Neurosci, 2002,22:5910-5919.
- [8] Rabuffetti M, Sciorati C, Tarozzo G, et al. Inhibition of caspase - 1 like activity by Ac - Tyr - Val - Ala - Asp - chloromethyl ketone induces long - lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines[J]. J Neurosci, 2000,20:4398-4404.
- [9] Hayashi Y, Likiham I, Yagi T, et al. Immunohistochemical investigation of caspase - 1 and effect of caspase - 1 inhibitor in delayed neuronal death after transient cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2001,893:113-120.
- [10] 王春霞,包仕尧,刘春风,等. 尼莫通和川芎嗪对脑缺血-再灌注时 c-fos 和 bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999,11:609-612.
- [11] 高长越,周华东,邓娟,等. 川芎嗪对脑缺血-再灌注损伤后细胞间黏附作用的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002,9:135-136.
- [12] Kim N G, Lee H, Son E, et al. Hypoxic induction of caspase - 11/caspase - 1/interleukin - 1 β in brain microglia [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2003,114:107-114.
- [13] 李岚,赵光东,张健. 川芎嗪对局部脑缺血再灌注模型纹状体内 IL-1 β 的影响[J]. 中国临床神经科学, 2001,9:36-38.

(收稿日期:2005-08-09 修回日期:2005-11-28)

(本文编辑:李银平)

• 消息 •

爱尔血液灌流学术研讨会暨第 10 届全国学习班会议通知

爱尔血液灌流研讨会暨学习班在北京、天津、扬州、长沙等地已成功举办了 9 届,学员反映良好。为进一步提高血液灌流整体水平,我厂将于 2006 年 7 或 8 月与哈尔滨医科大学附属第一医院在哈尔滨联合举办第 10 届全国学习班,届时将邀请王质刚、段仲平等京、津著名血液净化专家进行学术研讨。学习期间以理论与实践相结合,安排见习,会期 5 d。欢迎大家索取学习班邀请函。联系人:徐飞;手机:13082070760;联系电话:(0316)2021113-6304;联系地址:河北省廊坊市建国道 158 号;邮编:065000;网址:www.aier-hp.com。

(河北省廊坊市爱尔血液净化器材厂)