

银杏叶提取物对惊厥性脑损伤大鼠天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 表达的影响及意义

毛定安, 谭传梅, 刘利群, 薄涛

(中南大学湘雅二医院儿科, 湖南 长沙 410011)

【摘要】 目的 探讨天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)在惊厥性脑损伤发病机制中的作用及银杏叶提取物对脑损伤的可能保护机制。方法 将 20 日龄健康 SD 大鼠 108 只随机分为 3 组:对照组、惊厥组及银杏叶提取物干预组。通过三氟乙醚反复吸入制备大鼠惊厥模型。干预组在每次惊厥后立即腹腔注射银杏叶提取物 50 mg/kg, 12 h 后再重复注射 1 次, 其他两组注射等量生理盐水。各组动物于末次惊厥后 1、3 和 7 d 采用免疫组化法检测海马组织中 caspase-3 蛋白表达, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测海马组织中 caspase-3 mRNA 表达。结果 末次惊厥后 1、3 和 7 d 海马 caspase-3 的蛋白及 mRNA 表达均较对照组显著升高, 3 d 时达峰值(P 均 < 0.01)。银杏叶提取物干预组各时间点海马 caspase-3 的蛋白及 mRNA 表达均较惊厥组显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 大鼠反复惊厥后海马 caspase-3 表达显著增高, 提示 caspase-3 参与了惊厥性脑损伤的病理过程。银杏叶提取物能下调惊厥后海马 caspase-3 的异常表达, 提示其对惊厥性脑损伤的保护机制可能与抑制海马 caspase-3 异常表达有关。

【关键词】 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3; 银杏叶提取物; 脑损伤; 惊厥; 大鼠

中图分类号: R285.5; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)02-0081-05

Effect and significance of Ginkgo biloba (银杏叶) extract on the expression of caspase-3 in the infant rats with brain injury following recurrent seizures MAO Ding-an, TAN Chuan-mei, LIU Li-qun, BO Tao. Department of Pediatrics, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Ginkgo biloba (银杏叶) extract on the expression of caspase-3 in the hippocampus of the rats following recurrent seizures, the role of caspase-3 in the brain injury induced by seizures and the possible protective mechanism of Ginkgo biloba extract against brain injury. Methods One hundred and eight Sprague-Dawley (SD) rats, twenty-day-old, were divided randomly into three groups: the control group, the seizure group and the Ginkgo biloba extract treatment group. Seizures models in rats were produced by consecutive inhalation of flurothyl daily for six days. The rats in the Ginkgo biloba extract treatment group received 50 mg/kg of the Ginkgo biloba extract through intra-abdominal injection immediately after every seizure, and after 12 hours another injection was repeated, while the rats in seizure group and control group received volume-matched saline through intra-abdominal injections. Brain tissue was sampled at different time points (1 day, 3 days, 7 days) after last seizure. The expression of caspase-3 protein in the hippocampus was detected by immunohistochemistry, and the expression of caspase-3 mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results The caspase-3 protein and caspase-3 mRNA levels at the time points of post-seizure 1, 3, 7 days in the hippocampus of the rat pups in seizure group were much higher than those in control group, while they were highest on the post-seizure 3rd day (all $P < 0.01$). In Ginkgo biloba extract treatment group, the expression of caspase-3 mRNA and caspase-3 protein in the hippocampus at different time points significantly lower than those at corresponding points in seizure group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion Ginkgo biloba extract can down-regulate the abnormal expression of caspase-3 in the hippocampus after rat repeated seizures. The suppression of the abnormal levels of caspase-3 in the hippocampus is probably related to the protective effects of Ginkgo biloba extract on the brain injury induced by seizures.

【Key words】 caspase-3; Ginkgo biloba extract; brain injury; seizure; rat

基金项目: 湖南省科技计划基金资助项目(06sk3030)

作者简介: 毛定安(1956-), 男(汉族), 湖南省人, 医学博士, 教授, 主任医师, 研究方向为小儿神经系统疾病。

反复惊厥可引起脑缺血、缺氧, 并通过多种通道导致细胞凋亡。其中线粒体通道可以使线粒体释放

细胞色素 C, 激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 导致细胞凋亡^[1]。及早终止反复惊厥发作, 对于减少神经细胞损伤, 防止疾病进一步恶化, 改善疾病预后, 都具有重要的临床意义^[2]。已有实验证实, 银杏叶提取物可抑制细胞凋亡, 从而起到对神经细胞的保护作用^[3]。本研究旨在通过制备大鼠惊厥模型, 观察银杏叶提取物对 caspase-3 表达的影响, 探讨银杏叶提取物对惊厥性脑损伤的可能保护机制。

1 材料与方

1.1 主要试剂及引物: 银杏叶提取物由山西泰盛制药有限公司提供 (批号: 14020748), TRIzol 试剂由美国 Invitrogen 公司提供, 逆转录试剂盒由美国 MBI 公司提供, TaqDNA 聚合酶由北京天为时代科技有限公司提供, 免疫组化染色试剂盒、3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒及 caspase-3 抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供, dNTP Mix 脱氧核苷酸混合物、caspase-3 及内参引物由上海生物工程技术有限公司提供, caspase-3 引物序列 (扩增片断长度 210 bp), 上游 5'-TGGCCCTGA AATACGAAGTC-3', 下游 5'-GGCAGTAGTCGC CTCTGAAG-3'。

1.2 实验动物及分组: 20 日龄健康 SD 大鼠 108 只 (本院实验动物中心提供), 体重 (53.74 ± 1.04)g。按随机数字表法分为对照组、惊厥组及银杏叶提取物干预组 3 组。干预组在每次惊厥后立即腹腔注射银杏叶提取物 50 mg/kg, 12 h 后再重复注射 1 次; 对照组和惊厥组大鼠腹腔注射等量生理盐水。于末次惊厥后 1、3 和 7 d 随机选取 6 只动物断头取脑。

1.3 三氟乙醚致大鼠惊厥模型的制备: 将大鼠放入一个长方形的实验舱 (30 cm × 20 cm × 20 cm) 内, 通过舱顶注射孔将三氟乙醚液体 (美国 Aldrich 公司) 0.1 ml 滴在舱内滤纸上, 封闭舱顶, 从大鼠出现惊厥开始记时, 30 min 取出, 观察大鼠恢复情况。每日诱导大鼠惊厥 1 次, 连续 6 d。各组动物断头处死后开颅, 分离左侧海马组织, 液氮中冻存备用。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫组化法检测海马区 caspase-3 蛋白表达: 采用过氧化物酶标记的链霉卵白素 (SP) 免疫组化法, 以 1 : 100 稀释的 caspase-3 抗体为一抗, 按 SP 方法进行染色, 以细胞质或细胞核呈棕色或棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。每只鼠随机选取 2 张切片, 在每张切片的海马区选择 5 个 400 倍视野, 运用 Image-pro plus 5.0 图像分析软件测定阳性反应细

胞平均吸光度 (A) 值, 代表目的蛋白表达水平。

1.4.2 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测海马区 caspase-3 mRNA 表达: 采用 TRIzol 总试剂进行海马组织总 RNA 提取后逆转录合成 cDNA 第一链, 在 DNA 循环合成仪上进行 caspase-3 的 PCR 扩增, 经质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。应用凝胶成像对条带扫描分析, 计算 caspase-3 RT-PCR 产物条带平均 A 值及相对含量。

1.5 统计学分析: 使用 SPSS 10.0 统计软件包。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠海马 caspase-3 的蛋白表达 (表 1; 彩色插图 1, 图 2): caspase-3 免疫组化染色阳性信号主要位于神经细胞胞核内, 部分位于胞质, 呈棕色或棕黄色。对照组大鼠海马组织中未见 caspase-3 蛋白表达; 末次惊厥后 1、3 和 7 d 海马组织中 caspase-3 蛋白广泛表达, 3 d 达高峰 (P 均 < 0.01); 干预组各时间点海马 caspase-3 蛋白表达较惊厥组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠海马 caspase-3 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) A 值

组别	1 d	3 d	7 d
对照组	0	0	0
惊厥组	126.80 ± 3.90 ^a	159.40 ± 3.03 ^a	130.10 ± 3.30 ^a
干预组	86.00 ± 2.24 ^b	98.50 ± 1.87 ^c	74.16 ± 1.47 ^c

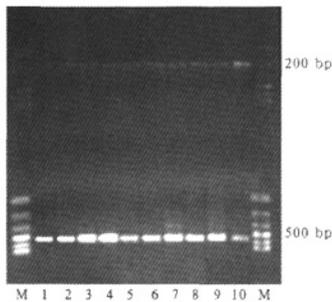
注: 与对照组同期比较, ^a $P < 0.01$; 与惊厥组同期比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

2.2 大鼠海马 caspase-3 mRNA 表达 (表 2; 图 3): RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外透射仪下观察, caspase-3 RT-PCR 产物片断大小为 210 bp。对照组海马组织无 caspase-3 mRNA 表达; 末次惊厥后 1 d caspase-3 mRNA 已有明显表达, 3 d 达高峰, 以后有所下降 (P 均 < 0.01); 干预组各时间点 caspase-3 mRNA 表达均较惊厥组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠海马 caspase-3 mRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) A 值

组别	1 d	3 d	7 d
对照组	0	0	0
惊厥组	0.48 ± 0.15 ^a	0.65 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.03 ^a
干预组	0.36 ± 0.01 ^b	0.39 ± 0.02 ^c	0.19 ± 0.02 ^c

注: 与对照组同期比较, ^a $P < 0.01$; 与惊厥组同期比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$



M:Marker, 1~5:干预组 1、7、3、3 和 7 d;
6~10:惊厥组 3、1、7、7 和 3 d

图 3 各组大鼠海马 caspase-3 mRNA 表达

3 讨论

细胞凋亡是一个有启动子、各种效应因子和抑制因子参与的复杂蛋白酶级联反应过程。Caspase 家族半胱氨酸蛋白酶是目前发现的与细胞凋亡有关的炎症介质之一,其中 caspase-3 是一个直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统,在细胞凋亡的分子网络中居中心位置,其活化是凋亡执行阶段的中心环节。有研究表明,caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,被称为死亡蛋白酶^[4]。在脑缺血/再灌注及脑挫裂伤模型中存在神经细胞凋亡并伴有 caspase-3 活性增强,抑制 caspase 活性可减少神经细胞凋亡^[5-6]。本课题组前期研究发现,反映机体炎症反应程度的 caspase-1 在海马组织中表达明显增加^[7]。本研究结果显示,在正常大鼠海马区未发现 caspase-3 表达;但在末次惊厥后 1 d 发现海马 caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达均明显增加,3 d 达峰值,以后逐渐下降,提示 caspase-3 参与了惊厥性脑损伤病理过程。Caspase-3 表达在惊厥性脑损伤中持续一定时间,提示惊厥性脑损伤在损伤发生后一段时间内持续进展,并逐渐加重,与 caspase-3 表达可能有密切关系。

银杏的主要成分为二萜内酯、黄酮苷及有机酸等,其药理作用是各种相对固定组成成分共同作用的结果,主要包括调节血管、增强认知力、缓解压力和基因调整四大作用。研究表明银杏叶提取物能显著抑制各种细胞凋亡,而细胞凋亡是脑缺血/再灌注损伤的重要形式之一,参与缺血后梗死灶发展。有研究表明,大鼠局灶性脑缺血/再灌注 24 h 后,缺血侧脑组织可见较多凋亡细胞,主要分布在缺血半暗带内;给予银杏叶提取物治疗后脑梗死面积减小,神经功能缺损减轻,缺血边缘区神经细胞凋亡数目明显

减少,坏死程度减轻^[8]。本研究发现,银杏叶提取物干预组海马 caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达较惊厥组相应时间点明显下调,提示海马组织 caspase-3 表达的上调在惊厥性脑损伤过程中发挥了重要作用,而银杏叶提取物对脑损伤的保护机制可能与抑制海马组织 caspase-3 的异常表达有关。这不仅从分子机制上阐明了银杏叶提取物对婴幼儿期脑损伤的保护作用,同时为银杏叶提取物对婴幼儿期脑损伤的临床干预治疗提供了理论依据。

神经细胞凋亡受 Bcl-2、Bax 等多种相关凋亡基因调控,银杏叶提取物能上调嗜铬细胞瘤(PC12)细胞的 Bcl-2 表达,降低 Bax 表达,使 Bcl-2/Bax 比值升高,进一步抑制 caspase-3 激活,下调 caspase-12,减少细胞色素 C 释放和 DNA 断裂^[9]。推测其可能通过上调 Bcl-2,下调 Bax 表达,改变 Bcl-2/Bax 比值,从而减少神经细胞凋亡数量,起到神经保护作用^[3,10]。Tamatani 等^[11]将神经元和星形细胞在缺氧条件下共同培养,发现在产生一氧化氮(NO)的星形细胞环境中,皮质神经元中存在着 Bcl-2 表达下调,Bax 表达增加及 caspase-3 活性增强,引起神经元凋亡;用 L-单甲基-精氨酸(NOSI)可抑制神经元的凋亡,并同时改变 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平及 caspase-3 活性,提示星形细胞产生 NO 导致神经元凋亡的机制涉及 Bcl-2 下调及 Bax 蛋白增高后 caspase-3 激活。研究表明 caspase-3 的激活是神经元凋亡执行过程中的关键,细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素- 1β (IL- 1β)等可以上调 caspase-3 表达,导致脑损伤后的神经元凋亡^[12]。本研究结果也证明银杏叶提取物可抑制 caspase-3 的表达,从而减轻神经细胞损伤,具体调节机制有待深入研究。

参考文献

- [1] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell, 1997, 91(4): 479-489.
- [2] 郭艺, 蒋莉, 苑爱云, 等. 惊厥持续时间对惊厥后海马神经元凋亡及其对早期事件变化的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(6): 343-345.
- [3] 李玉梅, 郭世杰, 饶明俐. 凋亡基因在缺氧缺血新生大鼠脑组织中的动态变化及银杏叶提取物的保护效应[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(1): 42-43.
- [4] 李小明, 孙志贤. 细胞凋亡中的关键蛋白酶——caspase-3[J]. 国外医学分子生物学分册, 1999, 21(1): 6-8.
- [5] 郭燕舞, 杨鹏飞, 徐如祥. caspase-3 在脑损伤时的作用[J]. 广东医学, 2004, 25(9): 1026-1028.
- [6] Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, et al. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke[J]. Cell Death Differ, 2001, 8(7): 679-686.

[7] 刘利群,毛定安,薄涛,等. 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[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(1): 19-22.

[8] 王雪松,阮旭中,王伟. 银杏叶提取物对缺血再灌注致鼠脑损伤的脑保护作用研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2003, 32(5): 500-502.

[9] Smith J V, Burdick A J, Golik P, et al. Anti-apoptotic properties of ginkgo biloba extract EGb 761 in differentiated PC12 cells[J]. Cell Mol Biol, 2002, 48(6): 699-707.

[10] 张继龙,翁方中,陈国华,等. 银杏叶对缺血性脑损伤后 Bcl-2 和 Bax 基因表达的作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(1): 56-59.

[11] Tamatani M, Ogawa S, Niitsu Y, et al. Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis[J]. J Neurochem, 1998, 71(4): 1588-1596.

[12] Kay L H, Samuel H H, Chao Y M, et al. Expression of pro-inflammatory cytokine and caspase genes promotes neuronal apoptosis in pontine reticular formation after spinal cord transection[J]. Neurobiol Dis, 2003, 14(1): 19-31.

(收稿日期: 2007-11-07 修回日期: 2008-01-29)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

肺癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化

王世瑜, 江 雁

(天津第一中心医院检验科, 天津 300192)

【关键词】 肺癌; T 淋巴细胞亚群; 化疗; 免疫支持治疗

中图分类号: R734.2 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2008)02-0084-01

化疗的同时附加免疫支持药物是临床医生针对恶性肿瘤患者采取的一个生物治疗手段。就化疗联合免疫支持治疗对肺癌患者机体免疫功能的影响进行研究, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例: 40 例肺癌患者诊断均符合国际抗癌联盟(UICC)颁布的恶性肿瘤诊断标准, 经 X 线胸片、CT、病理证实。其中男 27 例, 女 13 例; 年龄 46~87 岁, 平均(62.71±9.08)岁。根据病理分为低分化组与高分化组, 每组 20 例; 另以同期住院的肺感染患者 20 例为对照。

1.2 标本采集及检测方法: 分别于治疗前后抽血, 采用免疫荧光染色及流式细胞术分析检测 T 淋巴细胞亚群。

1.3 统计学分析: 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用方差分析、q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 结果(表 1): 与肺感染组和肺癌高分化组比较, 肺癌低分化组患者治疗前的 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显降低, CD8⁺ 明显升高 (P 均 < 0.05); 而肺癌高分化组与肺感染组比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。对肺癌患者在化疗的同时根据病情的不同加免疫支持

表 1 各组患者免疫支持治疗前后 T 细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值
肺癌低分化组	治前	20 67.68±11.11	36.85±6.69 ^{ab}	53.40±6.33 ^{ab}	0.69±0.20 ^{ab}
	治后	4 69.11±10.31	37.79±7.64 ^b	43.88±9.42 ^b	0.87±0.63 ^b
肺癌高分化组	治前	20 62.77±6.00	60.32±7.80	39.84±6.73	1.55±0.57
	治后	14 60.45±9.45	68.67±6.59	34.68±8.83	1.98±0.61
肺感染组	治前	20 64.16±12.58	60.44±6.50	34.31±6.01	1.76±0.53

注: 与肺感染组比较, ^a $P < 0.05$; 与肺癌高分化组同期比较, ^b $P < 0.05$

药物艾迪、岩舒、紫金龙等进行治疗, 治疗 7 d 后, 肺癌低分化组患者 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值显著低于肺癌高分化组, CD8⁺ 高于高分化组 (P 均 < 0.05), 但两组 CD3⁺ 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 讨论

按照现代肿瘤免疫学说, 细胞免疫应答对肿瘤的消灭和监控占有重要的主导地位, 其中特异性细胞免疫主要与 T 淋巴细胞的功能有关, T 淋巴细胞亚群中的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞在活性、数量、比例上的变化与肿瘤的发展、演变及抗肿瘤反应均有密切关系。

然而化疗在对恶性肿瘤细胞起杀伤作用的同时, 对敏感性高的淋巴细胞也有杀伤作用, 可使其比例和数量异常、功能不全, 对机体产生不同程度的免疫系统抑制或损伤, 甚至使治疗不能继续。结果显示, CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值

较化疗前升高, CD8⁺ 降低。表明免疫支持药物可改善化疗所造成的损伤, 通过调节 T 淋巴细胞亚群促进患者免疫功能恢复, 减轻化疗的不良反应, 提高近期疗效及远期生存率。而低分化组 CD8⁺ 高于高分化组, CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值低于高分化组, 可能是因为低分化的恶性肿瘤恶性程度最高, 肿瘤细胞倍增时间短, 生长速度较快, 对化疗药物敏感性低, 预后较差, 所以患者相应的免疫功能紊乱及受抑制的程度也最为严重。高分化的恶性肿瘤由于肿瘤细胞分化较好, 且生长速度较慢, 药物的治疗效果较显著, 预后较好, 所以患者机体的免疫功能损伤较轻, T 淋巴细胞亚群的变化不像低分化者那样明显。因此, T 淋巴细胞亚群的检测结果可以作为诊断肺癌患者恶性程度的辅助指标。

(收稿日期: 2008-02-10)

(本文编辑: 李银平)

作者简介: 王世瑜(1973-), 男(汉族), 天津市人, 主管技师。

参附注射液对大鼠肠缺血/再灌注期间肾保护作用机制的研究

(正文见67页)

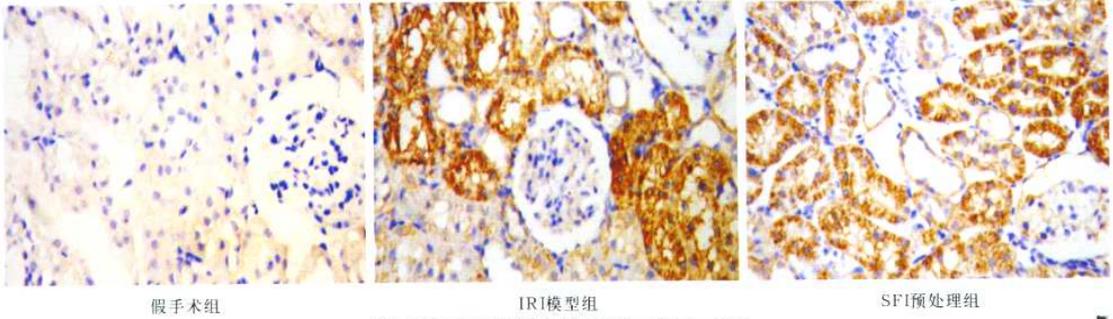


图1 各组大鼠肾组织HO-1的表达(免疫组化, ×400)

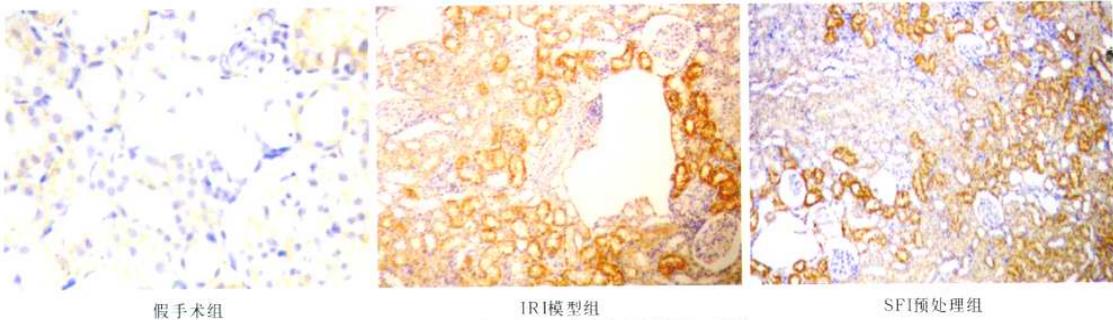


图2 各组大鼠肾组织iNOS的表达(免疫组化, ×400)

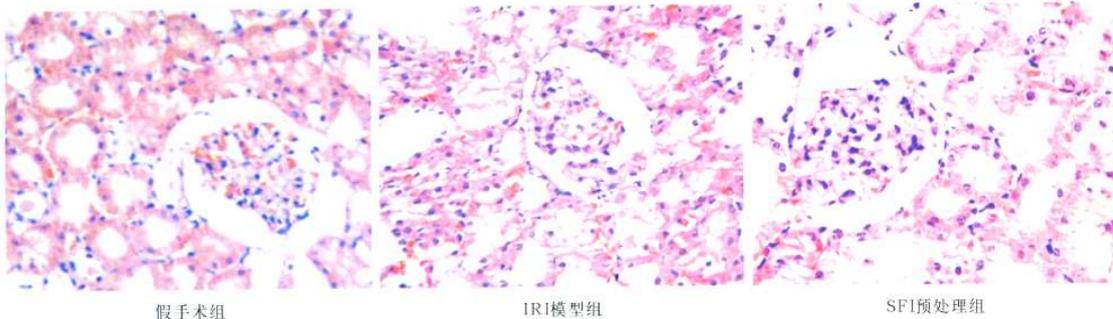


图3 各组大鼠肾组织形态学变化(HE, ×200)

银杏叶提取物对惊厥性脑损伤大鼠天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3表达的影响及意义

(正文见81页)

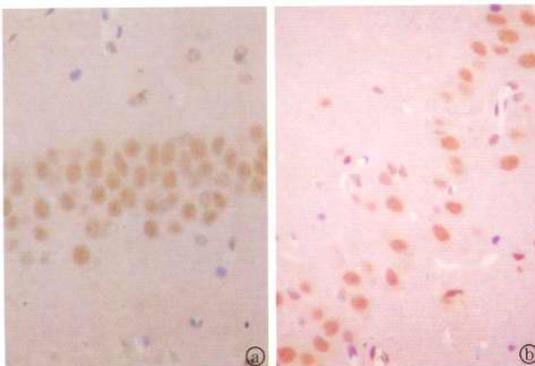


图1 惊厥组(a)和干预组(b)末次惊厥后1 d海马 caspase-3的表达(免疫组化, ×400)

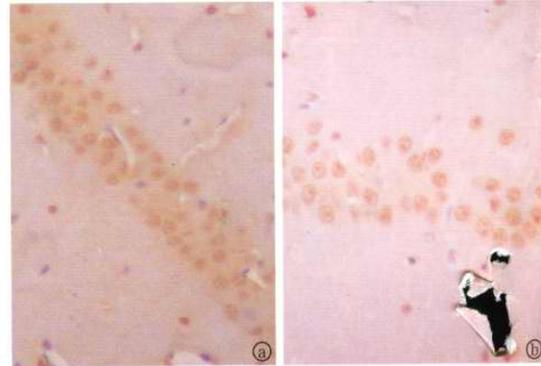


图2 惊厥组(a)和干预组(b)末次惊厥后7 d海马 caspase-3的表达(免疫组化, ×400)