

## caspase-3 在脑室内低温动物模型脑组织中的表达

隋宇玲<sup>1</sup>,傅志坚<sup>1</sup>,王运杰<sup>1△</sup>,姚长义<sup>1</sup>,贾志军<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院神经外科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 内蒙古赤峰市宁城县医院急诊科)

**[摘要]** **目的:**对家兔急性脑出血模型进行脑室内低温保护,通过对动物行为和对出血灶周围脑组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)表达的观察,探讨脑室内低温对家兔急性脑出血模型细胞凋亡的影响。**方法:**4~6月龄雄性家兔12只,随机分为等温组、低温组各6只。于右侧内囊点注入耳中动脉血0.5 ml制作脑出血模型。用双腔微导管穿刺左侧侧脑室,建立脑室内灌注装置,以等温/低温等渗盐水灌注2 h。术后24 h观察其肢体运动后取材、固定、染色,观察脑组织 caspase-3 表达情况。**结果:**经脑室内低温保护的动物肢体偏瘫程度轻,血肿周围脑组织内出现的 caspase-3 阳性细胞数量较少,与对照组的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**对家兔急性脑出血模型进行脑室内低温脑保护可以减少血肿周围脑组织的细胞凋亡,脑室内低温作为选择行脑部低温的一个新的思路值得关注。

**[关键词]** 继发性神经元损伤;细胞凋亡;天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3;脑室内低温

**[中图分类号]** R651.1      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 0258-4646(2007)05-0548-03

### Expression of caspase-3 in the brain tissue of rabbit model of ventricular hypothermia

SUI Yu-ling<sup>1</sup>,FU Zhi-jian<sup>1</sup>,WANG Yun-jie<sup>1△</sup>,YAO Chang-yi<sup>1</sup>,JIA Zhi-jun<sup>2</sup>

(1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Emergency, Ningcheng County Hospital, Chifeng)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of ventricular hypothermia on the cell apoptosis in rabbit model of acute intracerebral hemorrhage (ICH) by observing the animals' behavior and the expression of caspase-3 in the brain tissues immediately adjacent to the hematoma. **Methods:** Twelve male rabbits of 4 to 6 months old were randomly and equally divided into normothermia group and hypothermia group. The ICH model was established by injecting 0.5 ml of self-arterial blood obtained from middle ear artery into the right internal capsule. A double-cavity cannula was punctured into the left lateral ventricle, and then the normothermic or hypothermic normal saline was perfused into the lateral ventricle for 2 hours. The animals' behavior was observed after 24 hours, and the brain tissues were sampled, fixed in 4% paraformaldehyde, and stained. The expression of caspase-3 was detected. **Results:** Compared with normothermia group, the number of caspase-3-positive cells was smaller and the neurological deficits were less severe in hypothermia group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Ventricular hypothermia can reduce the brain injury associated with ICH, which provides a promising therapeutic method for treating acute ICH.

**[Key words]** secondary neuronal injury; apoptosis; caspase-3; ventricular hypothermia

神经元损伤分为原发性神经元损伤和继发性神经元损伤<sup>[1,2]</sup>。继发性损伤可导致神经元死亡,也可在治疗过程中被修复<sup>[3]</sup>。继发性神经元死亡在病理形式上主要表现为坏死和凋亡。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)是神经元凋亡的关键酶。在目前的抗凋亡治疗中,亚低温治疗应用比较广泛。目前,通过全身性降温来达到降低脑温,仍有发生严重并发症的报道<sup>[3]</sup>。选择性脑部低温<sup>[4]</sup>(selective brain cooling, SBC)通过动物实验结果显示,其同样能显著减轻脑缺血及实验性脑损伤的继发性脑损害和脑水肿,保护神经功能,减少有害物质的生成,提高存活率<sup>[5]</sup>。DIETRICH认为,选择性脑

部亚低温具有比全身亚低温并发症少等优点<sup>[6]</sup>。脑室内低温(intro-ventricle hypothermia, IVH)作为一种新型SBC方法应用于脑出血动物模型目前尚未见报道。本试验对家兔急性脑出血模型进行IVH保护,通过对动物行为和对出血灶周围脑组织caspase-3表达的观察,来探讨IVH对家兔急性脑出血模型细胞凋亡的影响。

### 1 材料与方法

1.1 脑出血模型的建立 实验动物由中国医科大学实验动物部提供。选用4~6月龄雄性家兔12只,体质量2.8~3.2 kg,随机分为2组:等温组(CH+等温液)、低温组(CH+低温液)各6只。对实验动物采用全麻,实验前动物禁食12 h,不禁水。麻醉时应用氯胺酮(7 mg/kg)及氟哌利多(0.8 mg/kg)肌肉注射。维持麻醉时采用半量肌肉注射。参照Sawyer兔脑定位

**[作者简介]** 隋宇玲(1974-),女,主治医师,硕士。现工作于沈阳市沈洲医院。

△Corresponding Author's E-mail: neurosurgery@163.com

图谱确定右侧内囊点,2% Lidocaine 在两眶后缘连线与正中线交点处局麻,在皮丘上纵行切开头皮 2.0 cm,暴露前凶骨缝。在矢状缝右 6 mm、冠状缝前 1 mm 处,颅钻钻开颅骨。用 1ml 注射器取耳中动脉血 0.5 ml,接 5 号头皮针向脑内垂直进针 14 mm,将血液先注入 0.1 ml,停针 2 min 后缓慢注入剩余 0.4 ml,2 min 后退针。血肿沿针道反流以及进入脑室者弃用。

1.2 脑室低温模型建立 脑出血模型建立后,于对侧取矢状缝左 6 mm、冠状缝前 1 mm 处,颅钻钻开颅骨,用双腔微导管(5 Fr 双腔中心静脉导管,佛山南海百合公司)穿刺侧脑室,固定导管,以等渗盐水进行灌注。导管一端为液体入口,另一端为脑室内液体流出口。等温组输入等温(38 ℃)等渗盐水。低温组输入冷却的 20 ℃等渗盐水,缓慢滴注,维持出入量的平衡,灌注持续 2 h。灌注结束后缝合切口皮肤。

1.3 术后动物行为观察 动物麻醉清醒后置于室温饲养,24 h 后判断其肢体运动情况。

1.4 取材 24 h 后氯胺酮过量麻醉下处死,迅速开颅取脑,4%多聚甲醛固定。脑组织固定 72 h 后,洗涤,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,常规石蜡包埋,做 7 μm 厚连续切片,切片常规脱蜡至水。

1.5 caspase-3 染色 新鲜配制 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温处理 10 min。蒸馏水洗 3 次。将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),加热至沸腾,隔 5 min 后反复 2 次。冷却后 PBS(pH 7.4)洗涤 2 次。抗原修复液 I 滴加在切片上,室温 10 min 后,PBS 洗涤 2 次。滴加正常山羊血清封闭液,室温 30 min。甩去多余液体,不洗。滴加适当稀释的一抗(兔 IgG),4 ℃过夜。PBS 洗 2 min×3 次。滴加生物素化羊抗兔 IgG,37 ℃ 30 min。PBS 洗 2 min×3 次。滴加试剂 SABC,37 ℃ 30 min。PBS 洗 5 min×4 次。使用 DAB 显色试剂盒,取 1 ml 蒸馏水,加试剂盒中 A,B,C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色 10 min,蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染。脱水,透明,封片。显微镜观察。

1.6 图像采集 采用中国医科大学仪器设备处的显微镜和数码相机(OLYMPUS-BX51、OLYMPUS-DP10,日本)和显微照相系统 Coolsnapfx(Roper,日本)拍照。每个标本在高倍镜(×400)下随机观察 8 个不重叠视野,计算平均每个高倍视野的阳性细胞数。

1.7 统计分析 将数据输入 SPSS12.0 软件,同一指标的组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为有显著

差异。

## 2 结果

2.1 动物行为观察 等温组完全瘫痪 4 只,能爬行者 2 只;低温组能爬行者 4 只,能跳跃者 2 只。低温组神经系统损害症状较常温组明显减轻。

2.2 脑组织细胞 caspase-3 表达的检测结果 caspase-3 染色阳性细胞胞浆着色呈棕黄色。等温组 caspase-3 染色阳性细胞数为  $128.38 \pm 7.30$ ;低温组 caspase-3 染色阳性细胞数为  $102.63 \pm 1.51$ 。低温组 caspase-3 染色阳性细胞数明显低于等温组,差异有显著意义( $P < 0.05$ )。见图 1,2。

图 1 等温组 caspase-3 表达 ×400

Fig.1 The expression of caspase-3 in normothermic ICH group ×400

图 2 低温组 caspase-3 表达 ×400

Fig.2 The expression of caspase-3 in IVH group ×400

## 3 讨论

临床上我们常常可以发现这样一些现象:病人在发生急性脑出血后的数天内神经系统症状可能逐渐加重,而复查头 CT 却往往没有发现血肿扩大,但病变侧脑组织多存在明显肿胀,血肿周围有半暗带存在。脑出血作为一种破坏性脑血管病,其病死率接近 50%。针对降低该病发病率和致死率的治疗目

前还很不理想,而相应的研究却远落后于缺血性脑血管病。继发于出血的组织损伤包括缺血、水肿、剧烈的炎性反应,以及最终的细胞死亡。急性脑出血导致的细胞死亡是一个包括多个不同路径的复杂过程。急性脑出血后细胞凋亡的特征性表现为:出血灶周围半暗带区域出现急剧增多的 TUNEL 阳性细胞和活化的 caspase,这种半暗带的神经损伤如果不能被及时逆转则凋亡将不可避免<sup>[7]</sup>。

本实验中我们观察到:血肿形成 24 h 后血肿周围确实发现 caspase-3 阳性细胞。这证实了急性脑出血形成的血肿不仅破坏局部脑组织,还造成血肿周围脑组织发生继发性损伤,启动凋亡程序并出现细胞凋亡。这一方面说明急性脑出血发病后进行性加重的神经系统症状与继发性神经元损伤有关;另一方面,由于继发性神经元损伤可以在治疗过程中被修复,因此如何能及时挽救濒于凋亡的半暗带细胞对于改善急性脑出血病人的预后具有重要意义。

目前,在众多的抗凋亡治疗手段中,亚低温治疗的作用不容忽视。根据脑温降低的同时是否伴有中心体温的降低,低温疗法可分为全身性低温疗法和选择性低温疗法两种。而 SBC 有报道的实施方法主要有以下 3 种:经头部物理降温;经血管降温;脑室内低温。戈惠林等以新西兰白兔为实验对象,对大脑中动脉夹闭的脑缺血模型,经微导管向侧脑室内注入冷却的等渗盐水,结果显示脑皮质温度 20 min 内即可降至 35℃ 以下,并可维持在 34.5~35.0℃ 间,肛温保持不变。经低温保护的动物,缺血后发生肢体活动障碍的比例小,神经细胞损害程度明显减轻。实验证明,该方法对全身温度几乎无影响,在短时间内即可使脑皮质温度下降至所需水平,具备有效、快速、稳定、简便等特点<sup>[8]</sup>。

本实验在戈惠林等的 IVH 动物模型基础上,建立家兔急性脑出血 IVH 动物模型,对急性脑出血动物模型进行 IVH 保护干预。结果显示,未经 IVH 保护的动物肢体偏瘫程度重,血肿周围脑组织内出现数量较多的 caspase-3 阳性细胞;经 IVH 保护的动物肢体偏瘫程度轻,血肿周围脑组织内出现的 caspase-3 阳性细胞数量较少,两者的差异具有统计学意义。从本实验的结果来看,对家兔急性脑出血模型进行 IVH 脑保护可以减少血肿周围脑组织细胞凋亡,同时也可以改善动物的神经系统症状。这提

示 IVH 与以往其他已知的降温方法一样具有比较确切的神经保护作用。

而 IVH 作为一种 SBC 模式,在可能发生的并发症上与全身低温相比具有明显的优势。与经头部物理降温相比,由于 IVH 的降温效果是从相当于脑的中心部位(脑室)开始逐步向四周扩展,因此不会发生头皮或颅骨的损害。在经血管降温过程中,首先需要建立特定的血管降温旁路,操作复杂,并且需要特殊仪器设备。此外,病人还因此需要进行额外的抗凝治疗,对于急性脑出血的病人来说可能会增加其血肿扩大或继发性消化道出血加重的危险。在进行 IVH 操作时需在脑室内置管,属于有创操作,但这种损伤较小,在本实验中无一例动物因脑室穿刺而出现相应神经系统损害症状。而且,临床上在脑出血手术治疗中,对于那些血肿破入脑室的病例,往往开颅前行对侧侧脑室穿刺置管放液,降低颅压<sup>[9]</sup>。在这种情况下,IVH 治疗不需要额外的有创操作即可进行。因此对于急性脑出血的治疗,脑室内低温作为 SBC 的一个新的思路值得关注。

#### 参考文献:

- [1] MARTIN LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2001, 7(4):455-478.
- [2] LEKER RR, SHOHAMI E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms:neuroprotective opportunities [J]. *Brain Res Rev*, 2002, 39(1):55-73.
- [3] BERNARD SA, MAC C JONES B, BUIST MD. Experience with prolonged induced hypothermia in severe head injury [J]. *Crit Care*, 1999, 3(6):167-172.
- [4] HORN M, SCHLOTE W, HENRICH HA. Global cerebral ischemic and subsequent selective hypothermia [J]. *Acta Neuropathol*, 1991, 81(4):443-452.
- [5] GELMAN B, SCHLEIN CL, LOHE A, et al. Selective brain cooling in infant piglet after cardiac arrest and resuscitation [J]. *Crit CareMed*, 1996, 24(6):1009-1017.
- [6] DIETRICH WD. The importance of brain temperature in cerebral injury [J]. *J Neurotrauma*, 1992, 9(2):475-485.
- [7] STEER, C. Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10):6087-6092.
- [8] 戈惠林, 史继新, 吴伟, 等. 脑内局部低温动物模型的建立 [J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(2):122-124.
- [9] 王忠诚. *神经外科学* [M]. 第 1 版, 武汉:湖北科技出版社, 1998:686-690.

[收稿日期] 2006-09-06