

·基础研究·

# Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 对大鼠 脊髓损伤后细胞凋亡的影响

王金光<sup>1</sup> 郑启新<sup>1</sup> 赵 铭<sup>1</sup> 郭晓东<sup>1</sup> 刘国辉<sup>1</sup>

**摘要** 目的:观察 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡的影响。方法:将 36 只 SD 大鼠以改良 Allen 法制作大鼠急性脊髓损伤(SCI)模型(脊髓中度损伤),分为对照组(单纯损伤 A 组 18 只,按时间段又分为 A1, A2, A3),治疗组(应用 Z-DEVD-FMK 治疗 B 组 18 只,按时间段又分为 B1, B2, B3)。损伤后 6h, 3d, 8d 对脊髓损伤区进行组织学 HE 染色,细胞凋亡 TUNEL 标记, Fas 凋亡因子检测,免疫组化检测 Caspase-3 的表达变化,同时采用 BBB 评分方法和斜板试验观察神经功能恢复情况。**结果:**对照组和治疗组均见 TUNEL 阳性的凋亡细胞和 Caspase-3 表达。Z-DEVD-FMK 治疗组神经细胞的凋亡数减少, Caspase-3 表达降低,神经功能增强,两组相比差异有显著性( $P < 0.05$ )。**结论:**Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 能减少继发性脊髓损伤细胞凋亡和促进神经功能的恢复。

**关键词** 脊髓损伤; 凋亡; Caspase-3; Z-DEVD-FMK

中图分类号:R681, R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-09-0792-04

**Effect of Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK on cell apoptosis after spinal cord injury in rats/WANG Jinguang, ZHENG Qixin, ZHAO Ming, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(9):792-795**

**Abstract Objective:** To investigate the effect of Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK on neural cell apoptosis after spinal cord injury in rats. **Method:** The models of acute spinal cord injury in 36 SD rats were made with the improved Allen's method to get middle-degree injured. The rats were divided into two groups including control group (injury without treatment), cured group (injury with Z-DEVD-FMK cured). The treated rats were executed at 6h, 3d and 8d. The samples were examined with HE dyeing, immunocytochemistry technique fas and TUNEL dyeing and the expression of Caspase-3 by immunohistochemistry. The neurofunction of spinal cord was measured by BBB score and Slope plate experiment. **Result:** The apoptosis cells positive for TUNEL and Caspase-3 expression were detectable in both two groups. In the cured group, the number of apoptotic cells and the express of Caspase-3 were decreased and the neurofunction of the spinal cord improved as compared with those in the control group. **Conclusion:** Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK can reduce the numbers of apoptotic cells and promote the nerve function recovery after spinal cord injury.

**Author's address** Dept. of Orthopedics, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022

**Key words** spinal cord injury; apoptosis; Caspase-3; Z-DEVD-FMK

脊髓损伤的病理过程包括原发性损伤和继发性损伤,而继发性损伤造成的损害超过原发性损伤<sup>[1]</sup>,神经细胞的凋亡在继发性损伤中发挥重要作用。Caspase 是一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,参与凋亡的各个时期, Caspase 家族成员在哺乳动物凋亡和炎症中担当重要角色,具有重要的调控和效应作用,目前认为凋亡可能就是 Caspase 蛋白酶级联反应切割底物的过程,其中 Caspase-3 是凋亡激链反应中最关键的酶,其受上游蛋白酶的切割活化,活化的 Caspase-3 又切割活化下游底物,参与 DNA 断裂和核固缩现象的发生,在凋亡过程中起着决定性的“总阀门”作用<sup>[2]</sup>。Z-DEVD-FMK 是 Caspase-3 的不可逆的和可渗透细胞的特异抑制剂。本实验通

过应用 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK,研究它对脊髓损伤后神经细胞的保护作用,为脊髓损伤的治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和分组

选择成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只,雌雄不限,购自同济医学院动物中心,体重 240—260g,随机分成:对照组(A 组,单纯损伤组,用生理盐水,按时间段分为 A1, A2, A3),治疗组(B 组,损伤后用

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科,武汉,430022

作者简介:王金光,男,副主任医师,博士

收稿日期:2005-11-28

Z-DEVD-FMK,按时间段又分为B1,B2,B3)。分别于伤后6h、3d、8d取材,每组6只;所用试剂:兔抗鼠Caspase-3 P20亚单位多克隆抗体(晶美公司),TUNEL试剂盒(德国Boehringer-Mannheim公司),Fas试剂盒(武汉博士德公司)。

## 1.2 动物模型制作

本研究采用Wrathall等改良的Allen's致伤方法<sup>[3]</sup>。以40mg/kg体重腹腔内注射3%戊巴比妥钠麻醉,将大鼠俯卧位固定于实验台上。选定T11为正中切口,切开皮肤及皮下,显露出T10至L1棘突及椎板并咬除之,暴露硬脊膜。根据Allen's重锤下坠打击法原理,用自制的9g重的重锤在玻璃导管的引导下行重力打击,给予3cm×9g强度的重力打击脊髓,以双下肢猛烈收缩为有效打击,造成大鼠脊髓中度损伤,即不完全性截瘫。显微镜下打开硬脊膜,显露脊髓,治疗组用浸100μl(含Z-DEVD-FMK 20μg)5mm×5mm×2mm大小的明胶海绵放在损伤的脊髓表面,对照组用生理盐水,逐层缝合伤口。截瘫动物膀胱区人工按压排尿,每天3次,防止并发症。记录大鼠双下肢的肌张力、反射,大小便及一般状态。

## 1.3 取材及切片准备

在SCI后各个时间点,麻醉后,打开胸腔自左心室插入静脉套管至升主动脉,快速灌注冰生理盐水行心脏灌注,切开右心房,待流出的液体清亮后,换用4%多聚甲醛缓冲液约100ml心脏灌注固定30min,而后自背部打开椎管,暴露脊髓,取损伤段脊髓约6mm长做脊髓标本,标本取出后用4%多聚甲醛缓冲液固定过夜。然后进行脱水,石蜡包埋,行横切面5μm厚度连续切片分别做HE染色,取材做免疫组化检测Fas凋亡因子,各个实验组切片按TUNEL标记法对凋亡细胞进行标记,免疫组化检测Caspase-3的表达。

## 1.4 TUNEL标记凋亡细胞

采用原位末端标记法(TdT-mediated x-dUTP nick end labeling,TUNEL法),所用标本同免疫组化检测标本,主要试剂是德国Boehringer-Mannheim公司In Situ Cell Death Detection试剂盒,各个实验组切片按TUNEL标记法对凋亡细胞进行标记。镜下观察阳性标记的细胞数,阳性标记的凋亡细胞核呈棕褐色,其他细胞核呈蓝色。

## 1.5 Fas神经细胞凋亡因子检测

取标本做免疫组织化学染色,检测细胞凋亡因子Fas。鼠抗人Fas多克隆抗体免疫组化试剂盒及二甲苯联苯胺(DAB)显色试剂盒购于北京中山公司。免疫组化操作过程按试剂盒说明书进行,经DAB

显色,苏木素复染,中性树脂胶封片,进行对照观察。阴性对照采用PBS或10%正常血清代替一抗;免疫组织化学染色方法。计数高倍视野内染色阳性细胞(阳性细胞呈棕色),计算阳性率。

## 1.6 免疫组化检测Caspase-3的表达

石蜡切片常规免疫组化处理,兔抗鼠Caspase-3 P20亚单位一抗;采用S-P法,主要步骤如下:石蜡切片常规脱蜡至水,微波修复抗原;滴加封闭液,室温10min;分别滴加1:100稀释的Caspase-3 P20亚单位一抗,4℃过夜,PBS冲洗,加入生物素化羊抗兔IgG,37℃ 20min,PBS冲洗,DAB染色,苏木素复染,脱水,中性树脂封片保存;镜下观察每张切片的阳性细胞数。

## 1.7 脊髓神经功能评价

**1.7.1 斜板实验:**将大鼠俯卧于一块40cm×80cm的平整木板上,头侧逐渐抬高,动物向下滑行时,木板与地面的夹角为斜板角度,以此观察大鼠的功能恢复情况。大鼠抓握能力决定角度的大小从而反映其神经功能恢复情况。按以上标准,在伤后6h、3d、8d分别由同一个实验者进行测定记录。

**1.7.2 BBB评分:**根据BBB运动评分法<sup>[3]</sup>,取左、右两肢平均值,作为每只大鼠每次功能的得分。将大鼠放入一固定场地,观察动物的臀、膝、踝关节与行走、躯干运动及其协调情况,BBB评分联合考察大鼠后肢的运动、躯干位置及稳定性、步态、协调性、爪的放置、足趾间隙及尾的位置。分别于伤后6h、3d、8d来测定。

## 1.8 统计学分析

由两名非本实验组并且熟悉凋亡细胞形态的实验人员,对所有免疫组化染色和TUNEL标记的切片计数其中阳性细胞。所有实验数据结果均来自每组所有动物标本切片阳性率的均值。数据用SPSS 11.5统计软件进行分析和t检验,以P<0.05为具有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 组织学观察

脊髓损伤后,在单纯损伤组表现损伤范围固定,损伤段变细,脊髓内有大部分坏死,囊腔及空洞形成,周围有炎性细胞浸润,大量胶质细胞增生,白质区仍有部分正常结构。在Z-DEVD-FMK治疗组中:脊髓灰、白质界限清楚,大多数神经组织(细胞及轴突)正常,少数神经细胞及轴突退变,白质中有大多数的正常轴突。

### 2.2 TUNEL标记及计数结果

脊髓损伤后两组均可观察到 TUNEL 标记的阳性凋亡细胞,具有典型的细胞凋亡特征性改变,凋亡细胞染色质固缩,呈斑块状聚集于核膜周边,胞浆浓染。6h 阳性细胞主要见于脊髓灰质后角,3d 阳性细胞在灰质和白质中均出现,8d 灰质的阳性细胞减少,阳性细胞主要在白质中,3d 阳性细胞数最高,8d 逐渐减少。治疗组大鼠脊髓损伤后凋亡的阳性细胞数明显低于对照组(图 1—2, 见后置彩色插页 1),  $P < 0.05$ 。见表 1。

### 2.3 Fas 凋亡因子检测

实验显示,对照组 Fas 阳性凋亡细胞表达较高,广泛分布于脊髓灰、白质中,在损伤早期 6h—3d 表达较高,8d 逐渐减少。在治疗组中,Fas 阳性凋亡细胞在各个相应时间点与对照组相比表达明显减少,(图 3—4, 见后置彩色插页 1), 两者比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.4 Caspase-3 的表达变化

Caspase-3 表达的阳性细胞胞浆棕黄色。在对照(单纯损伤)组,伤后 6h 开始有表达,阳性细胞主要

位于脊髓灰质背角的小神经元。伤后 3d 表达阳性细胞大量增加,阳性细胞主要位于白质的腹侧索、外侧索和背索(图 5, 见后置彩色插页 1)。8d 后表达阳性数逐渐减少。在治疗组 Caspase-3 表达的阳性细胞与对照组相比,在相应的时间点明显减少(图 6, 见后置彩色插页 1)。见表 1。

### 2.5 脊髓神经功能评价

**2.5.1 斜板实验:** 实验两组伤后各个时间点测量的斜板角度见表 4。在伤后 8d 两组大鼠的斜板角度均有部分上升,在相应的各个时间点 Z-DEVD-FMK 治疗组比对照组上升的斜板角度增大,两组比较差异有显著性意义  $P < 0.05$ 。见表 2。

**2.5.2 BBB 运动评分:** 按照 BBB 运动评分标准观测,伤后 3d 两组评分结果升高不明显,到 8d 两组的 BBB 运动评分升高较明显,Z-DEVD-FMK 治疗组比对照组上升幅度更大,两者比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表 3。可见 Z-DEVD-FMK 能够阻滞 Caspase-3 的活性从而使损伤后大鼠的运动功能有所恢复。

表 1 两组 TUNEL、Fas 标记的、Caspase-3 表达的阳性细胞数个数 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照组			治疗组		
	TUNEL 阳性细胞数个数	Fas 标记的阳性细胞数个数	Caspase-3 表达的阳性细胞数个数	TUNEL 阳性细胞数个数	Fas 标记的阳性细胞数个数	Caspase-3 表达的阳性细胞数个数
6h	65.0±9.6.0	28.0±3.6	69.0±5.6	53.0±11.7	19.0±1.7	58.0±7.8
3d	218.0±11.8 <sup>①</sup>	78.0±4.8 <sup>①</sup>	223.0±4.8 <sup>①</sup>	125.0±13.8	38.0±3.8	132.0±12.6
8d	138.0±12.5 <sup>①</sup>	33.0±4.5 <sup>①</sup>	95.0±4.5 <sup>①</sup>	70.0±15.3	18.0±3.3	45.0±8.6

①与同时间治疗组比较  $P < 0.05$

表 2 两组的斜板角度比较 ( $^{\circ}, \bar{x} \pm s$ )

时间	对照组	治疗组	P 值
6h	22.87±2.23	23.13±1.88	>0.05
3d	24.00±2.39	33.75±4.23	<0.05
8d	28.13±1.88	48.00±4.53	<0.05

表 3 BBB 运动评分结果表 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照组	治疗组	P 值
6h	5.8±2.7	6.2±1.7	>0.05
3d	6.7±3.3	7.4±2.6	<0.05
8d	8.5±3.2	12.7±4.5	<0.05

## 3 讨论

Caspase 家族是天门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶超家族。Caspase 家族成员在氨基酸序列、结构、底物特异性方面均有其相似性,它们在活体内存在方式均为含有 3 个区的前酶(30—50 KD):一个 NH<sub>2</sub> 末端区,一个大亚基(约 20 KD),一个小亚基(约 10 KD)。激活的方式是在三个区之间被水解后,大、小亚基结合形成杂键结合物异二聚体从而发挥作用。Caspase-3 是 Caspase 家族中较为活跃的成员,在正常情况下它是以无活性的酶原存在,它们要在毗邻天冬氨酸处切割而形成一个大亚基和一个小亚基,然后结合成为  $\alpha_2\beta_2$  四聚体,形成有活性的酶,当细胞得到起始凋亡信号后,Caspase-3 通过有序的切割而形成 P20 和 P11 两个亚基,活化的 Caspase-3 又

进一步切割不同的底物,导致蛋白酶级联切割放大,最终使细胞凋亡。许多研究证实在缺血和外伤性 SCI 动物模型中,Caspase-3 活性增强<sup>[4-5]</sup>,Emery 等<sup>[6]</sup>报道 15 例外伤性 SCI 后 3h 至 2 个月死亡患者的脊髓,发现胶质细胞凋亡与 Caspase-3 激活有关,而坏死的神经细胞没有观测到。本实验选择其为研究对象,是基于 Caspase-3 可能的生物功能特点,以及脊髓损伤后炎症和凋亡在继发性损害中可能起重要作用这两方面考虑的,我们以往也发现,Caspase-3 的活动时限和空间上与 SCI 凋亡细胞的出现相一致。

细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种死亡形式,亦称程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD),是在多种信号通路调控下的主动死亡程序,出现特

征性形态改变和 DNA 片段化是细胞凋亡的重要标志。Caspase 已被明确在细胞凋亡事件中起关键作用, 是细胞死亡的杀手, 凋亡特征的出现与 Caspase 的作用密切相关<sup>[7]</sup>。它们切断目标细胞与周围细胞的联系, 重组细胞骨架, 使 DNA 复制和修复能力降低, 阻断拼接, 破坏 DNA 和核结构, 诱导细胞释放吸引吞噬细胞的信号, 使细胞解体形成凋亡小体。已有实验证实, 在脊髓损伤模型中存在神经细胞凋亡并伴有 Caspase-3 基因表达上调和 Caspase-3 活性增强, 抑制 Caspase 活性可减少神经细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>。

本文结果显示 SCI 后 6h、3d 和 8d 时, 损伤的脊髓组织凋亡阳性细胞大量表达, 并且 Caspase-3 活动增强, 表明存在神经细胞凋亡, 并 Caspase-3 参与了 SCI 后细胞凋亡的调节。治疗组选用 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 治疗, 可见 Caspase-3 活性和表达均得到抑制, 同时减少神经细胞凋亡, 神经运动功能有所恢复。Caspase-3 与凋亡和炎症有关, 以 Caspase-3 为目标治疗神经系统疾病, 通过 Caspase-3 激活的调控从而调节凋亡或炎症反应, 达到治疗疾病的目的。

Z-DEVD-FMK 是根据 Caspase 的活性结构而设计小肽抑制物, 是 Caspase-3 的四肽抑制剂, 其作用机制是通过烷基化 Caspase-3 活性中心的半胱氨酸残基而抑制其活性, 动物实验显示, 应用 Caspase-3 抑制剂可显著减轻神经组织缺血损害及脊髓损伤<sup>[10-12]</sup>。本文免疫组织化学检测结果表明, Z-DEVD-FMK 能抑制 Caspase-3 的活性而其分解的 P20 亚单位的表达减弱, 从而阻断 Caspase-3 切割底物, 从而减少 SCI 后细胞的凋亡, 促进脊髓神经功能的恢复。本实验中抑制 Caspase-3 活性后大鼠神经运动功能均得到改善, 显示以 Caspase-3 为目标治疗脊髓损伤的价值。

## 参考文献

[1] Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research—a refined strategy for the international spinal research trust[J]. Spinal Cord, 2000, 38(8): 449—472.

[2] Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, et al. Activation of the CED/3—related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis [J]. J Neurosci, 1997, 17: 553—562.

[3] DM Basso, MS Beattie, JC Bresnahan, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability multicenter animal spinal cord injury study [J]. J Neurotrauma, 1996, 13(7): 343—359.

[4] Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the Caspase—3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury [J]. Nat Med, 1999, 5(8): 943—946.

[5] Wu KL, Chan SH, Chao YM, 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.

[6] Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys [J]. Nat Med, 1997, 3(3): 73—76.

[7] Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, et al. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis [J]. J Biol Chem, 1998, 273(16): 9357—9360.

[8] Liu L, Pei FX, Tang KL, et al. Expression and effect of Caspase-3 in neurons after tractive spinal cord injury in rats [J]. Chin J Traumatol, 2005, 8(4): 220—224.

[9] Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, et al. Rapid upregulation of Caspase—3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death [J]. Exp Neurol, 2000, 166(2): 213—226.

[10] Li M, Ona VO, Chen M, et al. Functional role and therapeutic implications of neuronal Caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury [J]. Neuroscience, 2000, 99(2): 333—342.

[11] Barut S, Unlu YA, Karaoglan A, et al. The neuroprotective effects of z-DEVD.fmk, a Caspase—3 inhibitor, on traumatic spinal cord injury in rats [J]. Surg Neurol, 2005, 64(3): 213—220; discussion 220.

[12] Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, et al. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats [J]. J Neurochem, 2000, 74(2): 740—746.

[13] Wrathall JR, Pettegrew RK, Harvey F. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups [J]. Exp Neurol, 1985, 88(1): 108—122.