

· 基础研究 ·

脑缺血再灌注大鼠神经细胞 DNA 损伤与凋亡的时空关系分析

杨渊 张苏明 方思羽 张旻 江红 许康 常履华

【摘要】目的 探讨局灶性脑缺血再灌注大鼠神经细胞 DNA 损伤与凋亡的时空分布演变过程及两者间的联系。**方法** 共选取 72 只成年 Wistar 大鼠,将其随机分为正常组、假手术组、缺血 30 min 组及缺血 2 h 组;后 2 组大鼠又根据再灌注时间(再灌注 1, 6, 12, 24 及 48 h)不同,各细分为 5 个亚组。制作大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型(MCAO-R),应用免疫组化法观察脑缺血组织在不同缺血再灌注时间下,其 P53 表达在空间及程度上的改变,并结合 TUNEL 技术观察 P53 表达与细胞凋亡的时空关系。**结果** 脑缺血再灌注可诱导细胞凋亡及 P53 蛋白表达增强,并随着缺血或再灌注时间的延长,凋亡细胞数量与 P53 表达均逐渐增加,但 P53 蛋白的表达始终早于凋亡细胞的出现,且 P53 阳性细胞数量始终多于凋亡细胞数量($P < 0.05$),其分布范围也较凋亡细胞更广。**结论** 神经细胞缺血可引起 DNA 损伤, DNA 损伤后可诱导 DNA 修复,如修复失败则启动细胞凋亡程序。

【关键词】 DNA 损伤; P53; 细胞凋亡; 脑缺血再灌注

The spatiotemporal relationship of neuronal cell DNA damage and apoptosis after reversible focal cerebral ischemia in rats YANG Yuan, ZHANG Su-ming, FANG Si-yu, ZHANG Min, JIANG Hong, XU Kang, CHANG Lu-hua. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To investigate the spatiotemporal relationship between the magnitude and extent of cells undergoing DNA damage and apoptosis as a function of duration of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. **Methods** A total of 72 adult Wistar rats were recruited and divided into four groups: a normal two groups were subject to transient focal cerebral ischemia induced by intraluminal blockade of the left middle cerebral artery. After different periods of ischemia/reperfusion (1, 6, 12, 24 and 48 h), the number and anatomic distribution of P53 protein were detected by immunohistochemistry technique, and were compared with apoptotic cells examined with the technique of a terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated dUTP-fluorescein nick end-labeling (TUNEL) assay in adjacent sections. **Results** The dynamic progression of P53 protein expression was approximately consistent with that of apoptosis. Whereas the amounts of P53 immunoreactive cells were significantly higher, the presence was earlier and the distribution was more extended, as compared with those of the apoptotic cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Our data suggest that DNA damage is an early event after neuronal ischemia and may trigger DNA repair processes, and that the failure of repair of DNA damage may trigger apoptosis.

【Key words】 Apoptosis; Cerebral ischemia/reperfusion; DNA damage; P53

许多研究发现, DNA 损伤后可以启动细胞凋亡程序;同时还发现脑缺血再灌注后的细胞凋亡是一个具有时间依赖性的动态演变过程,因而推测在发生脑缺血再灌注后的一段时间内,可能存在一些 DNA 已发生损伤、但尚未凋亡的细胞,随着再灌注时间的延长和 DNA 损伤的逐渐累积而最终导致凋亡。如果能早期发现这些 DNA 已损伤、但尚未凋亡的细胞并积极采取措施使之逆转,则有可能为临床治疗缺血性脑损伤疾病提供一条新的途径。

通过对增殖细胞的研究发现, P53 蛋白是细胞内

的“基因组守护者”,它随时监视着细胞 DNA 的状态,防止其突变^[1]。一旦 DNA 受损即可很快激活 P53,从而启动 DNA 损伤信号转导途径,因此 P53 表达的强弱可以客观反映 DNA 损伤的程度。基于上述方面,本研究采用对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型进行研究,以观察缺血脑组织中 P53 蛋白表达的动态过程及其与神经细胞凋亡的时空分布情况,从而探讨 DNA 损伤机制在缺血性神经元损伤转归中的作用,为临床积极干预缺血性脑损伤提供实验依据。

材料与方法

一、动物及分组

共选取 2~3 月龄的清洁级健康 Wistar 大鼠 72 只

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科

(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),雌雄各半;体重 240~270 g。将上述大鼠随机分为正常组(6 只)、假手术组(6 只)、缺血 30 min 组(30 只)及缺血 2 h 组(30 只),后 2 组又根据再灌注时间的不同(再灌注 1,6,12,24 及 48 h)各分为 5 个亚组(每亚组各 6 只)。上述各组大鼠均在同等条件下饲养,手术前夜禁食,可自由饮水。

二、模型制作

参照 Koizumi 法制作大鼠左侧大脑中动脉阻塞及再灌注模型^[2]。采用 6% 水合氯醛(300 ml/kg 体重)进行腹腔注射以麻醉大鼠,随后分离、结扎其左侧颈总、颈外动脉及颈外动脉分支。将一前端涂有硅酮、直径达 0.25 mm 的 4-0 丝线作为线栓,将线栓从颈总动脉分叉处插入颈内动脉,当插入约 1.8~2.0 cm 时,略感阻力即停止插入,提示大脑中动脉阻塞成功。于阻塞 30 min 或 2 h 后,将线栓拔出约 5 mm 即可恢复血供(再灌注)。假手术组线栓仅插入 1.5 cm,持续 48 h。各组大鼠于术中及术后麻醉清醒前,均采用 100 W 白炽灯对其进行照射,维持肛温在 36.5~37.5℃。剔除出血较多、呼吸困难、取脑时发现蛛网膜下腔出血或提前死亡的大鼠。采用 Bedersons 等^[3]介绍的神经功能评分法对麻醉清醒后(术后约 30 min)的大鼠进行评分,如分值在 2 分或 2 分以上则认为模型制作成功并纳入实验研究。术后各组大鼠均在 20℃ 的环境下单笼饲养,自由进食、饮水。

三、组织切片制作

各缺血再灌注组大鼠分别于相应再灌注时间(再灌注 1,6,12,24 及 48 h)结束时取材,假手术组大鼠则于术后 48 h 时取材。各组大鼠采用 6% 的水合氯醛麻醉成功后,开胸并夹闭其降主动脉,然后经心脏插管至升主动脉,将 50 ml 生理盐水(37℃)快速注入以冲洗其血管床,再经 200 ml 多聚甲醛(4℃,4%)灌注固定后断头取脑。于视交叉后 1.5 mm 处冠状位切取脑组织(厚约 3 mm),将其置入 20% 蔗糖溶液(4℃)中过夜;随后在 -20℃ 恒冷条件下,将标本制成连续切片(厚约 8 mm)并置于 -80℃ 恒温冰箱中保存。相邻切片行 HE 染色或 TUNEL 标记(并行 HE 染色以界定梗死区)。

四、标本检测方法

1. 凋亡细胞原位检测(TUNEL):严格按照说明书操作进行。主要步骤依次如下:①室温下,将切片置入 PBS 液(0.01 M, pH 7.2~7.4)中平衡 20 min,然后用 3 μg/ml 的蛋白酶 K(20 mM Tris/HCl, pH 7.5)消化 15 min;②将切片置于 50 μl TUNEL 反应液中(TdT 与 dUTP-荧光素的混合物),于 37℃ 环境下反应 1 h。阳性对照另加 DNase I 50 μl,室温下反应 10 min;阴性对

照则在 TUNEL 反应液中剔除 TdT 成份,于 37℃ 环境下反应 1 h;③将切片再置于 Converter-AP(抗荧光素抗体-AP,37℃)中反应 30 min;④采用 BCIP/NBT 显色;上述每一步骤间均采用 PBS 液充分洗涤;⑤最后切片经常规脱水、透明、封片处理后待检。于光镜下观察切片,可发现凋亡细胞胞核呈蓝紫色(胞核可破裂成小碎片或出现凋亡小体);而坏死细胞一般为阴性着色。

2. 免疫组化法检测:严格按照经过氧化物酶标记的链霉卵白素试剂盒(由北京中山生物技术有限公司提供)说明进行操作。主要步骤依次如下:①在室温下,切片经 PBS 液平衡 20 min;②再置入 3% 的 H₂O₂ 中孵育 10 min;③将切片置于 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中,并经 700 W 微波炉(96~98℃)修复 10~20 min;④于室温下,将上述标本用正常血清封闭 10 min,随后倾去血清并加入 p53 兔多克隆抗体(由北京中山生物技术有限公司提供,1:50 稀释),于 4℃ 环境下孵育过夜;⑤滴加由生物素标记的二抗工作液,于 37℃ 环境下孵育 30 min;⑥将切片置入由辣根酶标记的链霉卵白素工作液中,于 37℃ 环境下孵育 30 min;⑦当显色(采用 DAB 显色)满意后,用自来水终止反应。上述各步骤间均采用 PBS 液洗涤,每步骤间均洗涤 3 次,每次洗 3 min;⑧最后进行脱水、透明及封片处理。常规设立阴性对照。通过光镜观察发现,p53 蛋白阳性细胞胞核呈棕褐色,阴性细胞不着色。

五、图像与统计学分析

1. 图像分析:采用 HPIAS-1000 型高清晰度图像处理系统(由同济千屏影像公司提供)进行分析。观察各再灌注时间点 P53 蛋白和凋亡细胞的表达及分布情况;每张切片均观察额叶皮质、顶叶皮质、脑岛皮质、梨状前皮质、外侧尾壳核及内侧尾壳核共 6 个区域,每个区域分别计数 2 处表达最强的阳性细胞数量 X₁ 和 X₂(注:在高倍镜视野下,×400 倍)。每张切片 P53 蛋白或凋亡细胞的阳性细胞数 = $\sum \left[\frac{(X_{i1} + X_{i2}) \times S_i}{2 \times \text{视野面积}} \right]$,注:i=1 区,2 区...6 区;S_i 为各区面积。

2. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 版统计学软件进行分析,实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,运用方差分析、q 检验及配对 t 检验对数据进行比较,P<0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、脑缺血再灌注后细胞凋亡的时空分布

正常组及假手术组偶可见凋亡细胞散在分布。当缺血 30 min 再灌注 1 h 时,未检测到凋亡细胞存在;缺血

血 30 min 再灌注 6 h 时,可见凋亡细胞散在分布于梨状皮质区内;缺血 2 h 再灌注 1 h 时,外侧尾壳核、梨状皮质内均可见凋亡细胞散在分布,并随着再灌注时间的延长,凋亡细胞数量逐渐增多;至再灌注 24 h(缺血 2 h)或 48 h(缺血 30 min)时,凋亡细胞数量达到高峰,而且其分布也逐渐向额顶叶皮质、内侧尾壳核处扩张,主要分布于梗死边缘区的内侧部位;与缺血 30 min 各亚组大鼠比较,缺血 2 h 各亚组大鼠在同一再灌注时间点时的神经细胞凋亡现象更加明显、分布范围亦更加广泛(具体数据详见表 1、图 1)。

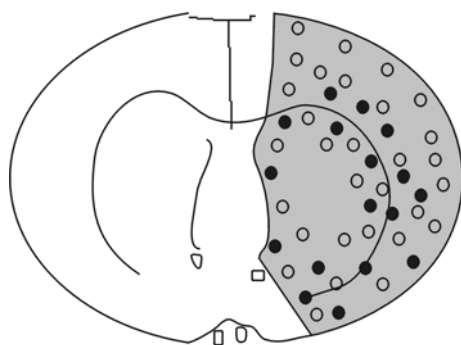


图 1 P53 蛋白阳性细胞与凋亡细胞空间分布示意图

注:灰色区域代表大脑中动脉缺血区,●代表凋亡细胞,○代表 P53 蛋白阳性细胞

二、脑缺血再灌注后 P53 蛋白表达的时空分布

正常组及假手术组大鼠脑内均未检测到 P53 蛋白表达,而缺血再灌注大鼠脑内 P53 蛋白表达则明显增强,主要位于细胞核内,胞浆中也可见少量表达。阳性细胞主要分布在梗死区的边缘及梗死区外的缺血区域内;在一些形态受损或形态完整的细胞中也可见表达。随着再灌注时间的延长,各缺血再灌注组大鼠 P53 蛋白表达逐渐增强(除缺血 2 h 再灌注 48 h 组),其分布也逐渐向四周扩展。如大鼠脑缺血 30 min 再灌注 1 h 时, P53 蛋白开始少量表达,其阳性细胞也仅仅分布于缺血半球的外侧尾壳核;随着再灌注时间延长,阳性细胞逐渐向脑岛皮质、梨状皮质及额顶叶皮质区扩展,于再灌注 48 h 时达到峰值。当大鼠脑缺血 2 h 再

灌注 1 h 时,可见凋亡细胞散在分布于外侧尾壳核及梨状皮质区内,此时 P53 蛋白表达已明显增强,于再灌注 24 h 时达到峰值,再灌注 48 h 后稍降低。进一步研究后还发现,无论是缺血 30 min 组,还是缺血 2 h 组,在上述各再灌注时间点时, P53 蛋白阳性细胞数量均较凋亡细胞数量显著增多;在脑梗死区边缘部分,凋亡细胞与 P53 蛋白阳性细胞重叠分布,但在梗死区外侧的缺血区域内,可见明显的 P53 阳性细胞表达,却很少见到凋亡细胞分布,即 P53 阳性细胞数量较凋亡细胞更多,分布也较凋亡细胞更广(表 1、图 1)。

讨 论

P53 蛋白在脑缺血中的作用机制一直存在争议,多数学者认为 P53 蛋白可介导缺血性神经元的死亡^[4,5];另有学者则发现, P53 蛋白可促进 DNA 修复,从而促进缺血后脑细胞的存活而并非诱导其死亡^[6]。笔者认为,这两种截然相反的结论可能并不矛盾,提示 P53 蛋白在脑缺血再灌注损伤过程中具有双重作用,既可引起神经元死亡,又可诱导 DNA 修复。从本研究结果可以看出,在脑缺血再灌注后各时间点上, P53 阳性细胞数量始终显著多于凋亡细胞数量;虽然在再灌注 24~48 h 期间,凋亡细胞数量达到峰值,但此时在 P53 外侧阳性表达区域内却很少发现凋亡细胞存在,而且 P53 蛋白在一些形态完整及受损的细胞中均有表达。上述结果进一步提示 P53 在脑缺血过程中的双重功效,这种双重作用可能受缺血程度、时间、部位及神经细胞耐受性(同时还包括 P53 的表达水平)等方面调控,所以可表现出不同效应。通过对增殖细胞的研究发现,各种因素诱导的 DNA 损伤均可很快激活作为“基因组监护者”的 P53^[7],而活化的 P53 一方面可诱导 P21 等基因表达,使细胞周期阻滞,以利于 DNA 修复;另一方面还可激活 bax 等凋亡相关基因的转录,从而诱导细胞发生凋亡^[8],以维护细胞基因组的稳定性及保证修复的忠实性。因此, P53 表达的强弱可以反映 DNA 损伤的程度,但不能简单地作为细胞死亡或存活的标志。

表 1 脑缺血再灌注后 P53 蛋白阳性细胞数与凋亡细胞数的动态变化比较(个/每切片, $\bar{x} \pm s$)

检测指标	正常组	缺血 30 min 组				
		再灌注 1 h	再灌注 6 h	再灌注 12 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h
凋亡细胞	1.2 ± 1.0 [#]	8.7 ± 2.2	64.3 ± 15.1	176.7 ± 26.6	218.5 ± 19.9	213.5 ± 20.8
P53 阳性细胞	0.0 ± 0.0 [#]	30.0 ± 2.8 [△]	139.3 ± 6.6 [△]	261.3 ± 37.9 [△]	393.5 ± 34.0 [△]	507.5 ± 53.5 [△]
检测指标	假手术组	缺血 2 h 组				
		再灌注 1 h	再灌注 6 h	再灌注 12 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h
凋亡细胞	1.5 ± 1.0 [#]	81.8 ± 17.6 [*]	210.3 ± 16.8 [*]	473.8 ± 28.0 [*]	618.3 ± 56.7 [*]	533.7 ± 38.0 [*]
P53 阳性细胞	0.0 ± 0.0 [#]	143.3 ± 10.8 ^{*△}	308.8 ± 44.9 ^{*△}	638.0 ± 78.4 ^{*△}	725.2 ± 96.1 ^{*△}	629.0 ± 75.2 ^{*△}

注: [#]与各缺血组大鼠比较, $P < 0.05$; ^{*}与缺血 30 min 组各相应再灌注时间点比较, $P < 0.05$; [△]与组内同一再灌注时间点的凋亡细胞数量比较, $P < 0.05$

相关研究还发现,当脑组织发生局灶性脑缺血再灌注后,其缺血周围区域内有大量氧自由基生成^[9],过表达的氧自由基可攻击核酸,从而引发 DNA 氧化性损伤(包括 DNA 单链、双链断裂、碱基修饰及 DNA 碱基缺失等等)^[9-12];DNA 氧化性损伤及 P53 蛋白也几乎同时在该区域内出现^[10,11],而且还发现这种 DNA 氧化性损伤具有可修复性,不同于凋亡细胞的 DNA 片段化^[13]。上述结果提示脑缺血再灌注后,可引起脑组织发生可逆性的 DNA 氧化性损伤,而后者可迅速激活 P53,故 P53 蛋白的表达强弱可反映细胞 DNA 氧化性损伤的严重程度。

本研究结果表明,脑缺血再灌注可诱导 P53 蛋白表达增强,并随着缺血或再灌注时间的延长,其表达亦逐渐增强,并且向四周扩展;同时凋亡细胞的数量亦逐渐增加,其时间变化趋势与 P53 蛋白相似,但相对滞后。P53 的表达早于凋亡细胞,而且在各个再灌注时间点,P53 阳性细胞数量始终多于凋亡细胞数量(均 $P < 0.05$),不仅在分布有凋亡细胞的梗死边缘区域内侧可见到 P53 阳性细胞,而且在很少有凋亡细胞分布的梗死区域外侧部分也能见到 P53 阳性细胞。这些结果均提示:①脑缺血再灌注后可很快发生 DNA 氧化性损伤,且早于细胞凋亡的发生^[10];②随着缺血再灌注时间的延长,DNA 损伤逐渐加重,神经细胞凋亡数量也相应增多,提示缺血早期的 DNA 氧化性损伤触发了神经元的迟发性凋亡机制^[10];③上述结果同时还提示,并不是所有的 DNA 损伤都可引起细胞凋亡。如脑缺血程度较轻,则神经元 DNA 损伤轻微,P53 蛋白可少量表达,从而阻滞细胞周期过程,使 DNA 修复基因处于优势,促进神经元存活,这可能也是超早期抢救缺血神经元有效的原因之一;如脑缺血程度较重,则其神经元 DNA 损伤严重,由于 DNA 的修复能力有限,P53 蛋白表达明显增多,促使未修复的 DNA 启动凋亡程序,导致细胞凋亡^[14]。

综上所述,当机体发生脑缺血再灌注后,可诱发 P53 表达增强、导致 DNA 损伤,机体首先对 DNA 进行修复,如修复失败才启动细胞凋亡程序,其确切机制还有待更进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997,88:323-331.
- 2 Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *J Stroke*, 1986,8:1-8.
- 3 Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986,17:472-476.
- 4 Schafer T, Scheuer C, Roemer K, et al. Inhibition of P53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J*, 2003,17:660-667.
- 5 Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, 2003,11:577-590.
- 6 Maeda K, Hata R, Gillardon F, et al. Aggravation of brain injury after transient focal ischemia in P53-deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001,31:54-61.
- 7 Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, et al. DNA damage induced phosphorylation of P53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 1997,91:325-334.
- 8 Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, et al. Bax involvement in P53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci*, 1998,18:1363-1373.
- 9 Peter AA, Back T, Lindauer U, et al. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000,18:196-205.
- 10 Cui J, Holmes EH, Greene TG, et al. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J*, 2000,14:955-967.
- 11 Nagayama T, Lan J, Henshall DC, et al. Induction of oxidative DNA damage in the peri-infarct region after permanent focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 2000,75:1716-1728.
- 12 Huang D, Shenoy A, Cui J. In situ detection of AP sites and DNA strand breaks bearing 3'-phosphate termini in ischemic mouse brain. *FASEB J*, 2000,14:407-417.
- 13 Jin K, Chen J, Nagayama T, et al. In situ detection of neuronal DNA strand breaks using the klenow fragment of DNA polymerase I reveals different mechanisms of neuron death after global cerebral ischemia. *J Neurochem*, 1999,72:1204-1214.
- 14 Chen D, Minami M, Henshall DC, et al. Upregulation of mitochondrial base-excision repair capability within rat brain after brief ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003,23:88-98.

(修回日期:2004-08-17)

(本文编辑:易 浩)

本刊恭祝广大读者、作者

圣诞快乐、新年吉祥