

- eralebreast cancer: a comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay[J]. *Pathol Res Pract*, 2006, 202(7): 491 - 495.
- 13 Wilcox RA, Sun DX, Novak A, et al. Inhibition of SYK protein tyrosine kinase induces apoptosis and blocks proliferation in T-cell non-Hodgkin, s lymphoma cell lines[J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 229 - 232.
- 14 Coppman PJ, Do MT, Barth M, et al. The SYK tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 742 - 747.
- 15 Chan AC, van Oers NS, Tran A, et al. Differential expression of ZAP-70 and SYK protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling[J]. *J Immunol*, 1994, 152(10): 4758 - 4766.
- 16 杨祖立, 王磊, 康亮, 等. 脾酪氨酸激酶基因甲基化与结肠癌临床病理特征之间的关系[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2008, 11(5): 458 - 461.
- 17 王华毅, 张兆祥, 胡余昌, 等. 乳腺癌和非癌组织中 SYK、Survivin 和 K-i67 的表达及其相关性[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2008, 24(2): 158 - 161.
- [收稿日期 2013-01-15][本文编辑 黄晓红 韦颖]

课题研究 · 论著

Caspase-9 和 Caspase-3 在血管性痴呆大鼠
海马 CA1 区的表达及意义

袁敏, 刘斌, 郑秀琪

基金项目: 唐山市科技局科技攻关计划应用项目(编号: 121302110a)

作者单位: 063000 唐山, 河北联合大学附属医院神经内一科(袁敏, 刘斌); 063021 唐山市开平医院医保科(郑秀琪)

作者简介: 袁敏(1974-), 女, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 脑血管病临床与基础研究。E-mail: yuanminzuiang@qq.com

通讯作者: 刘斌(1964-), 男, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 脑血管病临床与基础研究。E-mail: liubintsh@126.com

[摘要] 目的 探讨 Caspase-9 和 Caspase-3 在血管性痴呆大鼠海马 CA1 区的表达及意义。方法 将 100 只大鼠按随机数字法分为假手术组及模型组, 每组又分为 1、2、4、8 和 12 周 5 个亚组($n=10$ 只)。采用四血管阻断法制备血管性痴呆模型, 应用 Morris 水迷宫试验检测大鼠的学习记忆能力, TUNEL 检测细胞凋亡, 免疫组化法检测 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白的表达。结果 (1) 与假手术组比较, 在相同时间点模型组大鼠海马 CA1 区凋亡细胞数明显增多, 差异有统计学意义($P<0.05$); (2) 与假手术组比较, 模型组大鼠海马 CA1 区 Caspase-9、Caspase-3 阳性表达在 1 周开始增多, 2 周达到高峰, 4 周开始下降, 到 12 周仍增多, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 Caspase-9 及 Caspase-3 共同参与了血管性痴呆大鼠海马 CA1 凋亡的调控。

[关键词] 血管性痴呆; 大鼠; 凋亡; Caspase-9; Caspase-3

[中图分类号] R 749.1+3 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2013)05-0404-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.05.02

Expression and significance of Caspase-9 and Caspase-3 in CA1 area of hippocampus of vascular dementia rats YUAN Min, LIU Bin, ZHENG Xiu-Qi. First Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression and significance of Caspase-9 and Caspase-3 in CA1 area of hippocampus of vascular dementia rats. **Methods** One hundred mice were randomly divided into sham operation group and vascular dementia model group. The groups were divided randomly into 1, 2, 4, 8 and 12 w groups ($n=10$). Vascular dementia rat models were established by blocking four vessels. Learning and memory abilities were detected by Morris water maze. Apoptotic cells were detected by TUNEL. The expression of Caspase-9 and Caspase-3 were detected by immunohistochemistry. **Results** (1) Compared to sham operation group, apoptotic cells were increased in CA1 area of hippocampus, there were statistical significance at every time point of the model group ($P<$

0.05)。(2) Compared to sham operation group, the positive expression of Caspase-9 and Caspase-3 rose at 1 w, peaked at 2 w, at 4 w began to decline, to 12 w was higher still in vascular dementia model group, there were statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Caspase-9 and Caspase-3 participated to regulate apoptosis together in hippocampal CA1 area of vascular dementia rats.

[Key words] Vascular dementia; Rat; Apoptosis; Caspase-9; Caspase-3

细胞凋亡亦称程序性死亡(programmed cell death, PCD),是由基因控制的细胞主动死亡的一种过程^[1]。Caspases 是一大类凋亡调控基因,对神经元的凋亡起着非常关键的作用,凋亡是通过激活 Caspases 而实现。Caspase-9 属于上游起始 Caspase,主要在内源性细胞凋亡途径中被活化,然后激活效应 Caspase-3 最终导致细胞凋亡。Caspase-3 被称为死亡蛋白酶^[2],是 Caspases 家族中最重要的细胞凋亡执行者之一,在蛋白酶级联切割过程中 Caspase-3 发挥着重要的作用,一旦 Caspase-3 被激活就会导致细胞死亡。目前关于凋亡与血管性痴呆(VD)关系的研究还很少,本研究旨在观察 Caspase-9 和 Caspase-3 在血管性痴呆大鼠海马 CA1 区的表达情况,探讨凋亡与血管性痴呆的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 90 只,体质量 250 ~ 280 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司供给,合格证号 SCXK(京)2010-0013。在河北联合大学屏障环境动物实验室自由进食喂养,室温控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,自然光照,实验前适应喂养 2 周。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔抗鼠 Caspase-9 多克隆抗体、兔抗鼠 Caspase-3 多克隆抗体购自北京博奥森公司,SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、TUNEL 检测试剂盒均购自北京中杉金桥公司。Morris 水迷宫由淮北正华生物仪器设备有限公司提供,高频电刀由张家港市航天医疗电器有限公司提供,动物立体定位仪 ZH-ZLanxing KDS 由北京精密仪器厂提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 根据随机数字表法对大鼠进行随机化区组设计。将 SD 大鼠分为假手术组、血管性痴呆模型组(模型组),每组又分为 1、2、4、8 和 12 周 5 个亚组($n = 10$)。

1.2.2 动物模型制备 采用改良四血管阻断法^[3]建立 VD 大鼠模型,模型组用电凝针烧灼双侧翼小孔内的椎动脉,造成椎动脉永久性闭塞,24 h 后用动脉夹夹闭双侧颈总动脉 5 min,共夹闭 3 次,每次间隔 1 h。假手术组仅做手术,不进行椎动脉烧灼和颈总动脉夹

闭。术中大鼠肛温保持 $36.5 \sim 37.5^\circ\text{C}$,以防低温造成脑缺血损伤,术后连续肌注 3 d 庆大霉素预防感染。

1.2.3 学习记忆能力测试 在相应时间点前 5 d 随机抽选 6 只大鼠,分别对各组大鼠采用 Morris 水迷宫实验测试学习记忆能力^[4]。试验包括定位航行试验和空间探索试验。

1.2.4 标本制备 各组大鼠在进行行为学测试结束后,立即以致死量 100 g/L 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉后,仰卧位固定于手术台上,剪开胸腔,暴露心脏,从心尖插入灌注针至左心室,同时剪开右心耳,快速滴入 37°C 生理盐水 300 ml,无血污后改为滴入固定液 4°C 的多聚甲醛 400 ml。待大鼠尾巴完全僵直时迅速断头,取出脑组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中 12 ~ 24 h,进行脱水透明及石蜡包埋。冠状面连续切片,厚度约 $3\ \mu\text{m}$,用经多聚赖氨酸处理过的载玻片捞片,晾干后置于 60°C 的烤箱中烘烤备用。

1.2.5 TUNEL 检测 严格按照 TUNEL 试剂盒说明书操作要求进行检测,以细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞,每组从不同大鼠中随机选取 20 张切片,每张切片在 200 倍光镜下随机选取 5 个不同视野,计数后取平均值。

1.2.6 Caspase-9 和 Caspase-3 检测 采用免疫组化 SP 法检测 Caspase-9 及 Caspase-3 的表达,严格按照试剂说明书操作要求进行检测。Caspase-9 和 Caspase-3 阳性标准:光镜下观察 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白染色呈棕黄色颗粒,位于核膜或胞浆内。高倍镜下随机分别观察皮质缺血半暗带区不重叠的 6 个视野,进行 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白阳性细胞计数,计算阳性细胞平均数。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据作正态性 W 检验和方差齐性 Levene 检验,采用随机区组设计资料的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马 CA1 区凋亡细胞数表达结果 在($\times 200$ 倍)光学显微镜下,海马 CA1 区 TUNEL 染色阳性细胞为细胞核内出现棕色颗粒。相同时间组比较假手术组偶见阳性细胞;模型组与假手术组

比较,凋亡细胞显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 < 0.01)。见表1,图1。

2.2 各组大鼠海马 CA1 区 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达结果

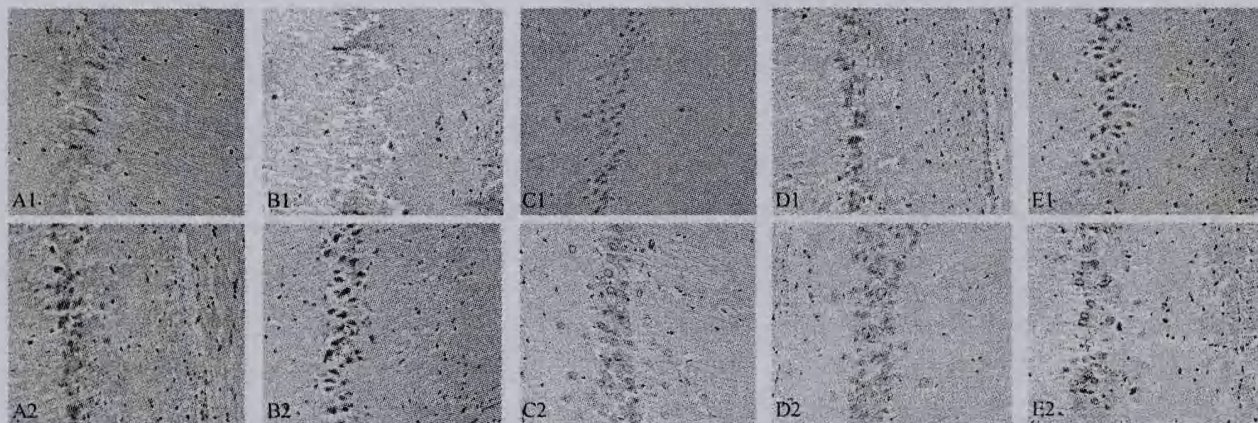
假手术组大鼠海马 CA1 区不同时间点可见少量 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白阳性表

达。与假手术组比较,模型组大鼠海马 CA1 在 1 周时 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白阳性表达增多,随着时间的延长逐渐增多,2 周达到高峰,4 周开始下降,至 12 周较假手术组仍较高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 < 0.01)。见表1,图2,3。

表1 各组大鼠海马 CA1 区不同时间点凋亡细胞数、Caspase-9 和 Caspase-3 阳性细胞数比较 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 6$]

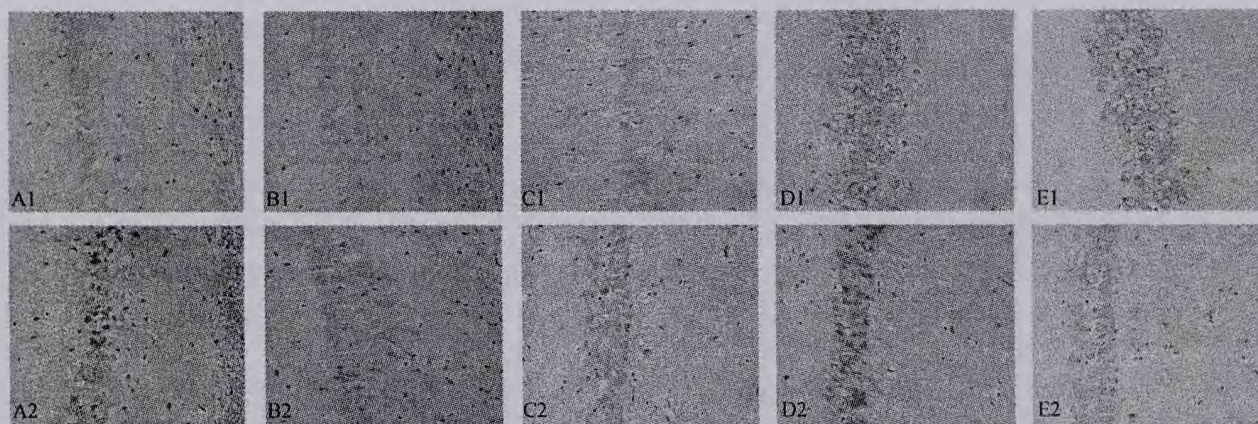
分 组	时 点	凋亡细胞数	Caspase-9 阳性细胞数	Caspase-3 阳性细胞数
假手术组	1 周	7.16 ± 1.47	11.16 ± 1.16	10.33 ± 1.21
	2 周	7.55 ± 2.16	10.00 ± 1.47	11.83 ± 1.47
	4 周	7.85 ± 1.87	10.16 ± 1.16	11.00 ± 1.41
	8 周	8.00 ± 2.12	10.66 ± 1.63	10.50 ± 1.87
	12 周	8.50 ± 1.16	12.16 ± 1.72	10.83 ± 1.47
模型组	1 周	$24.33 \pm 2.16^*$	$35.83 \pm 1.47^*$	$33.16 \pm 2.69^*$
	2 周	$41.60 \pm 2.16^{\#}$	$48.33 \pm 2.58^{\#}$	$53.16 \pm 3.18^{\#}$
	4 周	$29.50 \pm 1.87^*$	$31.00 \pm 2.36^*$	$31.16 \pm 2.63^*$
	8 周	$23.66 \pm 1.75^*$	$27.50 \pm 2.23^*$	$31.00 \pm 2.36^*$
	12 周	$20.00 \pm 2.36^*$	$20.16 \pm 1.47^*$	$26.50 \pm 1.04^*$
F_A	—	200.587	395.491	330.790
F_B	—	352.742	554.352	562.076
P_A	—	0.000	0.000	0.000
P_B	—	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较, * $P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$



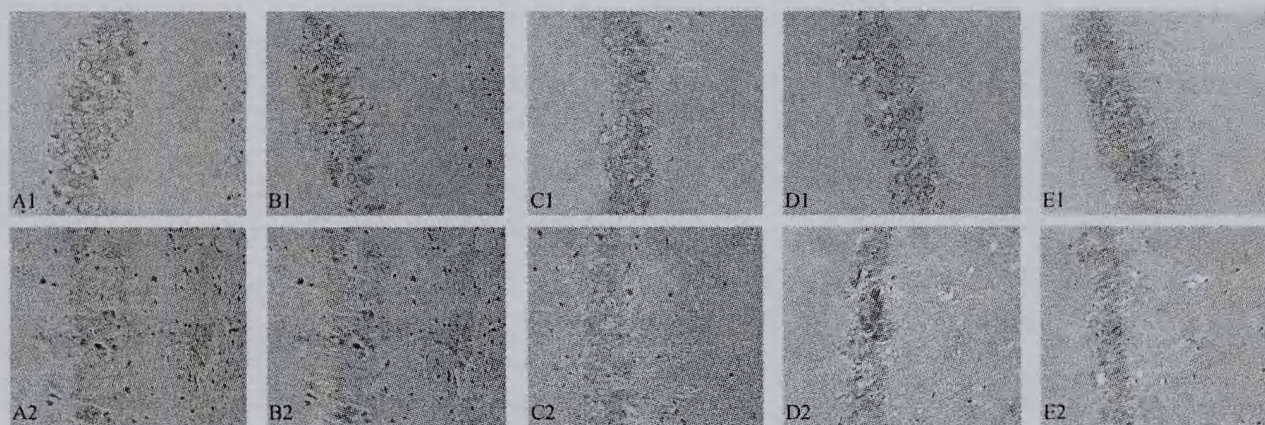
A1 假手术组 1 周; B1 假手术组 2 周; C1 假手术组 4 周; D1 假手术组 8 周; E1 假手术组 12 周;
A2 模型组 1 周; B2 模型组 2 周; C2 模型组 4 周; D2 模型组 8 周; E2 模型组 12 周

图1 各组大鼠海马 CA1 区不同时间点 TUNEL 染色所见 ($\times 200$)



A1 假手术组 1 周; B1 假手术组 2 周; C1 假手术组 4 周; D1 假手术组 8 周; E1 假手术组 12 周;
A2 模型组 1 周; B2 模型组 2 周; C2 模型组 4 周; D2 模型组 8 周; E2 模型组 12 周

图2 各组大鼠海马 CA1 区不同时间点 Caspase-9 免疫组化染色所见 ($\times 200$)



A1 假手术组 1 周; B1 假手术组 2 周; C1 假手术组 4 周; D1 假手术组 8 周; E1 假手术组 12 周;

A2 模型组 1 周; B2 模型组 2 周; C2 模型组 4 周; D2 模型组 8 周; E2 模型组 12 周

图3 各组大鼠海马 CA1 区不同时间点 Caspase-3 免疫组化染色所见 ($\times 200$)

3 讨论

3.1 Caspases 是一大类凋亡调控基因,对神经元的凋亡起着关键的作用。Caspases 蛋白酶家族有两类与细胞凋亡密切相关,一类为启动子 Caspases,其作用为接受上游的凋亡信号,并活化下游 Caspase,包括 Caspase-2、8、9 和 10 等,另一类为效应子 Caspases,包括 Caspase-3、6、7 等^[5,6]。Caspase 通常以无活性的酶原形式存在,上游的 Caspase 启动子接受各种凋亡信号后被激活,然后激活下游的 Caspase 效应子,对特定的底物进行切割,抑制 DNA 修复酶,激活核酸内切酶,从而破坏细胞核蛋白和骨架蛋白,使染色体断裂成小片段,这些不可逆的改变最终导致细胞死亡^[7]。

3.2 Caspase-9 是 Caspase-3 的上游调控蛋白,活化的 Caspase-9 能激活 Caspase-3,然后激活 Caspase 级联反应,从而诱导细胞凋亡。Caspase-9 的活性形式有 37 kD 和 35 kD 两种。活性的 Caspase-9 不仅从线粒体向下游 Caspase 传递凋亡信号,而且其本身也可发挥分解细胞骨架的作用^[8]。Caspase-9 是内源性凋亡通路中的非常关键的蛋白酶,当细胞接收到凋亡刺激信号后,线粒体就会释放凋亡蛋白酶活化因子(Apaf-1)及细胞色素 C(Cyt C),Caspase-9 与 Apaf-1、CytC 结合形成凋亡小体(apoptosome),共同激活 Caspase-9,活化的 Caspase-9 进一步激活其下游的效应 Caspase,从而参与凋亡过程^[9,10]。目前关于凋亡相关基因的研究较多,但关于 Caspase-9 和 Caspase-3 在血管性痴呆大鼠海马 CA1 区表达的变化国内外鲜见报道。本实验应用 TUNEL 和免疫组化法来观察在血管性痴呆大鼠海马 CA1 区中 Caspase-9 和 Caspase-3 的表达特征,探讨其在神经元凋亡中的

作用及相互关系。

3.3 正常情况下 Caspase-3 在胞质中是以无活性的酶原形式存在,一旦细胞凋亡信号出现就可导致 Caspase-3 活化。许多证据表明 Caspase-3 的活化与脑细胞缺血死亡有关^[11]。Lavrik 等^[12]证实 Caspase-3 在脑缺血再灌注神经元凋亡数与 Caspase-3 活性呈显著正相关。Caspase-3 是细胞凋亡的核心,各种引起凋亡的因子都是通过 Caspase-3 发挥作用而引起细胞不可逆的凋亡。Zhu 等^[13]证实急性脑出血形成的血肿周围在 24 h 出现 Caspase-3 阳性细胞,并认为急性脑出血后急性加重的神经系统症状可能与 Caspase-3 启动的继发性神经元损伤有关,Caspase-3 在蛋白酶级联切割过程中处于核心位置,其活化可使级联反应的信号放大,最终促使细胞走向死亡,因此 Caspase-3 被称为死亡蛋白酶,是细胞凋亡的必经之路。Eldadah 等^[14]证实 Caspase-3 表达的时空分布以及动态变化与凋亡细胞表达一致,几乎在相同时间和相同脑区出现,并且在同一时间达到高峰,提示 Caspase-3 的表达参与并促进脑缺血再灌注过程中细胞的凋亡。

3.4 本研究通过检测血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白的表达,发现与假手术组比较,模型组大鼠海马 CA1 区 1 周时 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白阳性表达增多,并随着时间的延长逐渐增多,2 周达到高峰,4 周开始下降,至 12 周时较假手术组仍较高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明在血管性痴呆大鼠海马 CA1 区凋亡明显增强,Caspase-9 和 Caspase-3 共同参与了血管性痴呆大鼠海马 CA1 凋亡的调控,对 Caspase 家族抑制剂的研究可能为血管性痴呆的药物治疗提供新

的思路。

参考文献

- 1 张运克. 补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注 SD 大鼠模型细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(6): 404-407.
- 2 Cain K, Bratton SB, Langlais C, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-KDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes [J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6067-6070.
- 3 Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia[J]. Ann Neurol, 1982, 11(5): 491-498.
- 4 陈罗西, 郭玲玲, 李 亮. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(8): 55-57.
- 5 Das A, Guyton MK, Matzelle DD, et al. Time-dependent increases in protease activities for neuronal apoptosis in spinal cords of lewis rats during development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(13): 2992-3001.
- 6 He A, Wang JA, Gui C, et al. Changes of mitochondrial pathway in hypoxia reoxygenation induced cardiomyocytes apoptosis[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2007, 45(4): 397-400.
- 7 Bratton SB, Macfarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascade in death receptor and stress-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 27-33.
- 8 Cheng HY, Hsieh MT, Wu CR, et al. Schizandrin protects primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 107(1): 21-31.
- 9 Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of Caspase-9 [J]. Structure, 2002, 10(3): 285-288.
- 10 Acehan D, Jiang X, Morgan DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, Procaspase-9 binding, and activation[J]. Mol Cell, 2002, 9(2): 423-432.
- 11 冯 涛. 血管性痴呆的诊断、影像学 and 药物治疗[J]. 中国全科医学, 2004, 7(4): 276-279.
- 12 Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death [J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2665-2672.
- 13 Zhu C, Wang X, Hagberg H, et al. Correlation between Caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia [J]. J Neurochem, 2000, 75(2): 819-829.
- 14 Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 811-829.

[收稿日期 2013-02-12][本文编辑 刘京虹 吕文娟]

课题研究·论著

两种不同方法提取人粪便进行 DNA 检测的有效性研究

何纯刚, 黄沁园, 陈利生, 吴鸿根, 邓洪强, 潘 云

基金项目: 广西教育厅科研课题(编号: 201012MS043); 广西卫生厅科研课题(编号: Z2012246)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院普外儿外科(何纯刚, 吴鸿根, 邓洪强, 潘 云); 530021 南宁, 广西医科大学护理学院(黄沁园); 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院结直肠肛门外科(陈利生)

作者简介: 何纯刚(1979-), 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 胃肠肿瘤的诊治。E-mail: chunganghe@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 分析两种不同方法提取人粪便进行 DNA 检测的效果。方法 收集 108 例研究者的粪便, 采用粪便 DNA 提取试剂盒及酚-氯仿法提取 DNA, 比较两种方法提取 DNA 的效果。结果 采用酚-氯仿的方法及试剂盒提取的 DNA 浓度分别为 $(232.51 \pm 41.24) \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $(67.35 \pm 13.17) \text{ ng}/\mu\text{l}$ ($P < 0.01$); 试剂盒提取粪便 DNA 在纯度 (OD_{260/280})、溶液澄清度及电泳结果等方面, 均高 (优于) 酚-氯仿提取的 DNA ($P < 0.01$)。酚-氯仿及试剂盒首次提取的 DNA 能进行 PCR 扩增的阳性率分别为 5% (1/20) 和 91.67% (99/108) ($P < 0.01$)。另有 9 例采用试剂盒未能提取足够的 DNA 量, 加大粪便量后, 再次提取的 DNA 能够满足实验要求。结论 试剂盒提取的 DNA 质量较高, 能满足 DNA 甲基化检测的条件。酚-氯仿的提取方法有待进一步研究才可能获得质量较高的 DNA。

[关键词] 结直肠癌; 早期诊断; 粪便 DNA 提取

[中图分类号] R 735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)05-0408-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.05.03