

甲基苯丙胺中毒大鼠相关脑区 Caspase-3 和 Bcl-2 表达的研究 *

段晓飞¹ 邓 冲² 曾晓锋¹ 赵永和¹ 王尚文¹ 李 桢^{1△}

(1 昆明医学院 云南 昆明 650500; 2 重庆市公安局 重庆 400060)

摘要 目的:研究凋亡相关因子 Caspase-3 和 Bcl-2 在甲基苯丙胺神经毒性机制中所发挥的作用。**方法:**40 只健康雄性 SD 大鼠随机分为对照组(n=10)和实验组(又分为 3 个亚组,分别为注射 1 天后、4 天后、7 天后,n=10)。实验组给予 20mg/kg 的甲基苯丙胺腹腔注射,对照组给予相同剂量的生理盐水注射。用免疫组化检测中毒大鼠相关脑区 Caspase-3 和 Bcl-2 的表达,用图像分析技术对检测结果进行分析。**结果:**Caspase-3 在中毒大鼠不同脑区表达逐渐增加并可见明显的阳性信号;Bcl-2 在中毒大鼠不同脑区表达逐渐减弱。**结论:**凋亡相关因子 Caspase-3 和 Bcl-2 参与了甲基苯丙胺神经毒性机制。

关键词:甲基苯丙胺;中毒;Caspase-3;Bcl-2

中图分类号:Q95-3,R969 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-432-03

Expressions of Caspase-3 and Bcl-2 in Related Encephalic Region of Rats with Poisoning of Methamphetamine*

DUAN Xiao-fei¹, DENG Chong², ZENG Xiao-feng¹, ZHAO Yong-he¹, WANG Shang-wen¹, LI Zhen^{1△}

(1 School of Forensic Medicine, Kunming Medical College, Kunming 650500, China; 2 Police in Chongqing, Chongqing 400060, China)

ABSTRACT Objective: To study the function of Caspase-3 and Bcl-2 protein in the methamphetamine mechanism. **Methods:** Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group (n=10) and experimental group (dividing it into the first, fourth and seventh group after the injection, n=10). Rats in the experimental group were intraperitoneal injected with methamphetamine hydrochloride (20mg/kg), and those in the control group were injected with saline with the same volume. Then examining the protein expression of Caspase-3 and Bcl-2 of poisoning rats in related encephalic region by immunohistochemistry technique and analyzing the test results through image. **Results:** Expression of Caspase-3 increased significantly in the related encephalic region in rat poisoning of methamphetamine where exist more clearly positive signal. Express of Bcl-2 the reduced gradually in the related encephalic region in rat poisoning of methamphetamine. **Conclusion:** The abnormal expression of Caspase-3 and Bcl-2 shows that they take part in the Methamphetamine-Induced Neurotoxicity.

Key words: Methamphetamine; Poisoning; Caspase-3; Bcl-2

Chinese Library Classification: Q95-3, R969 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-432-03

前言

甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)属于苯丙胺类中枢兴奋剂,是当前危害最大的毒品之一。研究表明:MA 对动物及人类大脑神经元具有毒性作用^[1,2],其毒性机制主要有①DA 的氧化作用;②神经元的兴奋性毒性;③线粒体功能紊乱;④诱导神经细胞发生凋亡。但 MA 对神经元的毒性机制并不完全清楚。甲基苯丙胺诱导神经细胞发生凋亡的毒性作用,是近年来国内外研究的热点^[3]。本实验通过观察甲基苯丙胺中毒大鼠的大脑额叶皮质、海马、纹状体脑区 Caspase-3 和 Bcl-2 表达情况,为研究甲基苯丙胺神经毒性机制提供帮助。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康 Sprague-Dawley 雄性大鼠 40 只,体重 180-220g,由南方医科大学实验动物中心提供。按随机数字表分组,将 40 只大鼠分为给药组和对照组。实验组:腹腔注射甲基苯丙胺,每天腹腔给药两次,给药剂量为 20mg/kg,给药体积为 10ml/kg,注射时间为 8:00、20:00,连续 4 天。对照组:腹腔注射生理盐水,每天两次,给药体积为 10ml/kg,注射时间为 8:00、20:00,连续 4 天。动物于实验前 7 天运至实验室饲养,每天抓取一次,保持实验室安静、清洁、恒温(18℃)、恒湿(相对湿度 50%),并在整个实验过程中给予动物自由进食和饮水。

1.2 实验仪器和试剂

病理图象分析处理系统(LEICA Leica 1150 1200),第一抗体(兔抗鼠 Caspase-3 和 Bcl-2 多克隆抗体)和 AEC 显色试剂

* 基金项目:国家自然科学基金项目(NO30660202);教育部春晖项目(NO2006-1-65003);云南省科技厅项目(NO2006GH22)

作者简介:段晓飞(1982-),男,硕士研究生,研究方向:毒品滥用的研。E-mail:duanxiaofei0186@sina.com

邓冲(1981-),男,硕士研究生,重庆市公安局

△通讯作者:李桢(1959-),女,教授,硕士生导师。E-mail:lizhenlaura@126.com

注:段晓飞,邓冲,同为第一作者,对本文皆有同等贡献

(收稿日期:2010-10-08 接受日期:2010-10-31)

盒购自 Thermo 公司, 盐酸缓冲液和柠檬酸抗原修复液购自昆明宝信生物有限公司。

1.3 取材

各组动物(实验组分别于给药 1 天后、4 天后、7 后天, 对照组时间同实验组)用 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)进行腹腔注射麻醉, 先经左心室先快速灌注温(37℃)生理盐水, 至右心耳切口流出液变清澈透亮, 再灌注 4%多聚甲醛溶液 500ml(0.1Mpbs 液配制, pH7.4) 1.5h 左右, 断头处死后开颅取脑, 取出全脑后置于 4%多聚甲醛缓冲液后固定 24 小时。按照大鼠脑立体定位图谱进行定位, 切大脑时, 分两个部位, 第一在视神经处横断, 向前切片至看见前联合, 额叶皮质、伏隔核、纹状体在一个层面上, 第二在小脑前方 0.2cm 处横断, 向前切片至看见明显海马, 并在这一切面上取海马。常规石蜡包埋, 制成厚度为 4μ m 连续切片备用。

1.4 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的免疫组织化学染色

采用 SP 法 (Sterptavidin-biotin immuno peroxidase method), 按试剂盒说明进行。

1.5 结果观察

光镜下对大鼠脑组织皮质、海马、纹状体的 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白阳性细胞反应强弱进行观察, 并用显微镜摄像系统对观察部分进行拍照采图, 每个标本每一观察部位随机取三个

视野 (× 400)。图像分析: 应用倒置生物显微镜 (Leica 1150 1200) 观察大鼠相关脑区 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白免疫组织化学表达结果, 并对 Caspase-3 和 Bcl-2 表达的阳性细胞进行计数。

1.6 统计学处理

数据均采用均数 + 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 应用 SPSS 11.5 软件包对实验结果进行单因素方差分析, 凡 $P < 0.05$, 差异被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

不同处理时间的 MA 组大鼠脑组织中可见 Caspase-3 和 Bcl-2 有不同程度的表达, 其中 Caspase-3 在不同脑区(额叶皮质 纹状体 海马)的表达规律基本相似: 在给药 1 天后, 可见少量阳性信号, 多位于胞浆内, 细胞核也可见, 以后渐增, 至给药 7 天后达到峰值, 但在不同脑区 Caspase-3 的表达又有所不同: 在海马表达最为明显, 而在纹状体表达最弱; Bcl-2 的表达规律与 Caspase-3 基本相反, 在给药 1 天后, 在不同的脑区可见较多的阳性细胞, 以后逐渐减少。对照组与 MA 组 Caspase-3 和 Bcl-2 表达存在显著差异 ($P < 0.05$)。

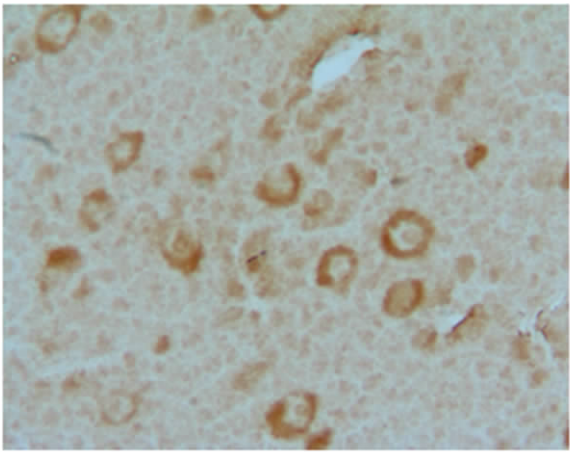


图 1 纹状体 caspase-3 阳性细胞的表达 (7d) × 400

Fig.1 Expression of caspase - 3 positive cells of the striatum

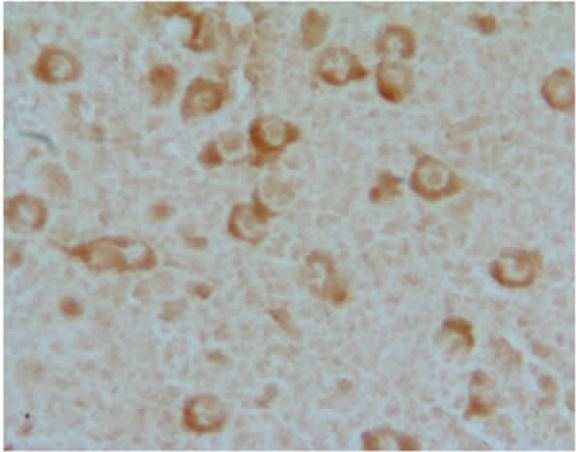


图 2 纹状体 Bcl-2 阳性细胞的表达 (1d) × 400

Fig.2 Expression of Bcl-2 positive cells of the striatum

2.2 免疫组化细胞计数结果

对照组和甲基苯丙胺中毒实验组的 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达检测结果用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分

析系统对图像进行采集并对阳性反应细胞计数。结果用 SPSS 统计软件包进行统计学处理。结果如下:

表 1 Bcl-2 和 Caspase-3 阳性细胞计数 ($\bar{X} \pm S$)
Table 1 Caspase -3 and Bcl-2 positive cell count ($\bar{X} \pm S$)

groups	n	Caspase-3 positive cell count			Bcl-2 positive cell count		
		PFC	Cpu	CA	PFC	Cpu	CA
Control	10	2.17± 0.76	1.90± 0.50	2.20± 0.59	2.33± 0.86	1.80± 0.32	2.14± 0.63
1d	10	26.37± 0.71*	17.53± 1.31*	33.40± 1.15*	29.72± 1.90*	20.67± 0.96*	30.30± 1.56
4d	10	27.43± 0.83*	22.30± 2.99*	36.67± 1.49*	23.40± 2.03*	14.53± 1.02*	25.57± 1.34
7d	10	30.33± 0.99*	23.87± 1.38*	42.47± 0.76*	17.57± 1.32*	13.07± 0.34	15.87± 1.06

Note: * $P < 0.05$, compared with the control

3 讨论

甲基苯丙胺属于阳离子脂溶性分子,很容易进入线粒体,且滞留在在线粒体中,正电荷在线粒体嵴的增多最终导致电子传递链电化学梯度的消失,从而引起线粒体功能紊乱,诱发 Caspases 级联反应,导致细胞死亡^[4]。实验结果表明,实验组额叶皮质、纹状体、海马部位神经细胞可见明显水肿、细胞固缩等病理改变,同时可见部分神经细胞溶解消失;而对照组额叶皮质、纹状体、海马部位神经细胞未见明显异常,并且随着注射 MA 时间的延长,在不同脑区 Caspase-3 的表达数量逐渐增加,说明凋亡因子 Caspase-3 参与了 MA 神经毒性机制。线粒体通过向胞浆释放 DytC 和 AIF 等途径参与各种凋亡过程,在进入胞液的 DytC 和 AIF/dATP 存在下由 AIF 等因子诱导 Caspase-9,又可激活 Caspase-3, Caspase-7,启动 Caspase 级联反应诱导凋亡^[5]。

Bcl-2 是细胞凋亡途径中的一个重要调节基因,主要在抑制凋亡中发生作用^[6]。Bcl-2 在各种正常细胞的发育过程中表达;而在成熟的或走向凋亡的细胞中不表达或低表达,但在受到各种损伤性刺激激发时,可以迅速表达,阻遏细胞凋亡,延长细胞寿命,进而保护机体。本实验结果显示,随着注射 MA 时间的延长,在不同脑区 Bcl-2 的表达数量逐渐下降,说明凋亡因子 Bcl-2 参与了 MA 神经毒性机制。研究表明,Bcl-2 表达量的减少与细胞凋亡指数成正比^[7],Bcl-2 可通过抑制内源性核酸内切酶活性,阻止细胞色素 C、黄素蛋白(AIF)从线粒体释放入细胞质,使凋亡效应蛋白酶链 Caspase-3 不能激活以及抗氧化活性等机制发挥抗凋亡作用^[8]。

综上所述,随着注射 MA 时间的延长,在不同脑区 Caspase-3 的表达数量逐渐增加,而 Bcl-2 的表达数量逐渐下降,凋亡相关因子 Caspase-3 与 Bcl-2 在甲基苯丙胺中毒后的异常表达,说明细胞凋亡在 MA 神经毒性机制起着重要作用,且凋亡相关因子 Caspase-3 与 Bcl-2 参与了 MA 诱导神经细胞发生凋

亡机制。

参考文献(reference)

- [1] Cadet J L, Jayanthi S, Deng X. Methamphetamine-induced neuro apoptosis involves the activation of multiple death pathys[J]. Neurotox Res, 2005,8(3-4):199-206
- [2] 刘胜,周文华,杨国栋. 成瘾药物行为敏化及机制[J]. 中国药物滥用防治杂志,2003,23(5):337-338
Liu Sheng, Zhou Wen-Hua, Yang Guo-Dong. Mechanism of addictive drugs behavioral sensitization [J]. Chinese Magazine of Drug Abuse Prevention, 2003,23(5):337-338
- [3] 陈汉,王慧君,李学锋,等. 甲基苯丙胺对大鼠脑组织中 NO,SOD 和 MDA 的影响[J]. 中国药物依赖性杂志,2007,16(2):102-104
Chen Han, Wang Hui-jun, Li Xue-Feng, et al. Change of NO, SOD and MDA in methamphetamine-treated rat brain and the correlation [J]. Chin J Drug Depend, 2007,16(2):102-104
- [4] Brocheriou V, Hagene AA, Oubenaissa A, et al. Cardial functional improvement by a human bcl - 2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury [J]. J Gene Med, 2000, 2(5): 326-333
- [5] X. Deng, Y. Wang, J. Chou, J.L. Cadet, Methamphetamine causes widespread apoptosis in the mouse brain: evidence from using an improved TUNEL histochemical method, Brain Res, 2001;(93)64-69
- [6] Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, et al. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/ reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl - 2/ Bax expression [J]. Cell Res, 2003, 13 (5) :385-391
- [7] Salt TE, Binns KE. Contributions of mGlu1 and mGlu5 receptors to interactions with N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses and nociceptive sensory responses of rat thalamic neurons. Neuroscience, 2000,100:375-380
- [8] Toshiyuki Kawasaki, Kotaro Ishihara, Yukio Ago. Protective effect of the radical scavenger edaravone against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mouse striatum [J]. European Journal of Pharmacology, 2006,542: 92-99