

p53、BCL-2、Caspase-3 等凋亡相关蛋白在大鼠脑损伤中的表达及意义

顾 奕¹ 于明琨² 吕立权³ 孙克华³ 卢亦成² 侯立军^{1△}

(上海第二军医大学附属长征医院神经外科 上海 200003)

摘要 目的:检测脑外伤大鼠中 p53、bcl-2 及 caspase-3 表达,并分析其与脑外伤之间的关系,为脑损伤患者预后提供部分参数依据。方法:建立脑外伤大鼠实验动物模型,用免疫组化方法检测 p53、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达。结果:脑创伤后在创伤周围区的神经元会发生凋亡,凋亡的发生可能与 p53、bcl-2、caspase-3 等基因及蛋白的调节有关。结论:脑创伤后在创伤周围区的神经元会发生凋亡,凋亡的发生可能与 p53、bcl-2、caspase-3 等基因及蛋白的调节有关。

关键词 脑外伤 p53 bcl-2 caspase-3 免疫组化

中图分类号 Q95-3 R651.15 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)11-2030-04

Expression of p53, Bcl-2 and Caspase-3 in Rats with Brain Injury

GU Yi¹, YU Ming-kun², LV Li-quan³, SUN Ke-hua², LU Yi-cheng³, HOU Li-jun^{1△}

(Shanghai Second Military Medical University attached Long March hospital neurosurgery department Shanghai 200003)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of p53、Bcl-2 and Caspase-3 in brain injury rat and analyze its relationship with brain damage, to provide some parameters according for the prognosis of patients with brain damage. **Methods:** Establish brain injury rat experimental animal model, detected the expression of p53, Bcl-2 and Caspase-3 by immunohistochemistry. **Results:** The immunohistochemical results in brain injury rat experimental animal model: the brain injury model group compared with the normal group and sham operation group, p53 and Caspase-3 expression increased significantly, Bcl-2 expression dropped significantly, differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion:** After brain trauma, apoptosis of the neurons around the trauma will happen and it is possibly concerned with the regulation of genes and proteins p53, BCL-2 or caspase-3.

Key words: Brain injury; p53; BCL-2; Caspase-3; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R651.15 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2030-04

前言

在过去的十多年间,凋亡在神经系统损伤中的作用逐渐为人们认识。1993 年 Tominaga 等^[1]首次证实缺血性脑损伤可引起神经细胞凋亡,Rink 等^[2]1995 年发现大鼠脑外伤后伤侧皮质、白质、海马、齿状回等区域出现细胞凋亡。与凋亡相关的基因有很多种,如 p53、bcl-2、bax、caspase-3、c-fos、c-jun 等,而 p53 是其中关键的环节。p53 蛋白在细胞周期的调控、维持细胞基因组的完整性、诱导细胞分化和凋亡中起着重要的作用^[3-10]。本文旨在检测脑外伤大鼠中 p53、bcl-2 及 caspase-3 表达,并分析其与脑外伤之间的关系,为脑损伤患者预后提供部分参数依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 Sprague-Dawley 大鼠,共 60 只,清洁级,雌雄各半,体重 250g-300g,由上海第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

10%水合氯醛(湖北大学化工厂);4%多聚甲醛(中国第二化工研究所);PBS 磷酸盐缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司);枸橼酸盐缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司);苯巴比妥钠(天津金耀氨基酸有限公司);SP9001 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥);p53 兔抗鼠多克隆抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司(分装 SantaCruz 公司);bcl-2 兔抗鼠多克隆抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司(分装 SantaCruz 公司);Caspase-3 P20 兔抗鼠多克隆抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司(分装 SantaCruz 公司)。

1.3 实验器材

大鼠固定器,无损伤动脉夹,眼科剪,咬骨钳,病理切片机;微波炉,plymus BC60 光学显微镜;计算机图像分析(HPLSA-100 病理图文报告系统);数码相机(OLYMPUS-DP10,日本)。

2 实验方法^[11-20]

2.1 动物分组

健康成年 SD 大鼠 60 只,随机分为 3 组,每组雌雄各 10 只,正常对照组,假手术组和脑外伤模型组。

2.2 麻醉与手术方法

麻醉:采用苯巴比妥钠 120mg/kg 腹腔内注射麻醉。

脑外伤模型制作:采用改进 Finney'S 自由落体硬膜外撞击

作者简介:顾奕,电话:13651928410 E-mail: gys19781@126.com

△通讯作者:侯立军,主任医师, Tel: 13801740560,

E-mail: dj_hou@yahoo.com

(收稿日期:2011-03-05 接受日期:2011-03-30)

方法致重度脑挫裂伤模型。动物麻醉后,俯卧位固定于手术台上,无菌条件下暴露左顶骨,钻一骨孔扩大成直径约为 6.0mm 的类圆形骨窗(骨窗内缘距矢状缝 2mm、前缘位于冠状缝后 1.5mm)保持硬脑膜完整,将打击垫片(底板直径 1cm,边厚约 1mm,中心圆台顶直径 2.5mm,底直径 5mm,高度 2.5mm)置于骨窗上,鼠头稍右旋,以保持打击垫片与打击方向垂直,将 259 砣码于颅骨 40cm 高处呈自由落体撞击在垫片上,打击力再经垫片圆台传递至硬膜及脑组织,造成局灶性重度脑挫裂伤。假手术组除不予以撞击外、其余操作相同,正常组不做处理。

术后处理:所有动物的切口均按如下程序处理:先用过氧化氢溶液、庆大霉素生理盐水(160μ/ml)冲洗,然后缝合,再用 75%酒精擦洗伤口。术毕所有动物均腹腔内注射庆大霉素生理盐水 6ml/kg,旨在预防感染和补充液体,并置于接食物与水源的鼠笼中自由饲养。

2.3 标本采集与保存

分别在撞击(脑外伤造模)后第 3 天观察结束时间点采集。动物麻醉后,打开胸腔,暴露心脏,在心尖部将灌注用针插入心脏并向前送达主动脉出口处固定,剪开右心耳,用 37℃生理盐水(约 200ml)经左心室灌注至右心耳流出清亮液体,继之,用 4%多聚甲醛溶液 200ml 灌注内固定。然后断头取脑置于 4%多聚甲醛中固定 24 小时,常规石蜡包埋、切片,厚度为 4μm,以备免疫组化染色。

2.4 免疫组化染色

严格按照 SP9001 免疫组化试剂盒说明书操作,具体步骤如下:(1)脱蜡、水化:二甲苯 I、II、III 中各浸泡 20 分钟,100%乙醇 I、100%乙醇 II、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇中各浸泡 10 分钟。(2)PBS 洗 3 次,每次各 3 分钟。(3)微波热抗原修复:在微波炉里加热放有玻片的 0.01M 枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0)至沸腾 10 分钟后断电,间隔 5 分钟,再次加热至沸腾。自然冷却至室温。(4)PBS 洗 3 次,每次各 3 分钟。(5)3% H₂O₂ 滴加在玻片组织上,室温静置 15 分钟,以消除内源性过氧化物酶活性。(6)PBS 洗 3 次,每次各 3 分钟。(7)滴加正常山羊血清封闭液,室温 15 分钟,甩去多余液体,不洗。(8)滴加稀释的 I 抗 50μl,4℃过夜。(9)4℃过夜后,PBS 洗 3 次,每次各 3 分钟。(10)滴加

生物素化羊抗兔 IgG 二抗 40-50μl,37℃孵箱 15 分钟。(11)PBS 洗 3 次,每次各 3 分钟。(12)滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 40μl,37℃孵箱 15 分钟。(13)PBS 洗 3 次,每次各 3 分钟。(14)DAB 显色,在显微镜下掌握染色程度,显色 5 分钟。自来水充分冲洗。(15)苏木精复染 30 秒,自来水冲洗 30 分钟反蓝。(16)脱水、透明、中性树脂封片,镜检。(17)以 BPS 替代一抗做为阴性对照。

2.5 免疫组化的结果判定

p53 的阳性染色位于细胞核上,在细胞核上呈棕黄色或褐色颗粒,伴有少量的胞浆表达。每张切片计数 10 个不重叠视野内(x400)阳性细胞数,取平均值。采用图像分析系统对免疫组织切片进行分析,计算阳性细胞百分比。

Bcl-2 阳性表达部位在胞浆,胞浆内出现棕黄色或棕褐色。在高倍镜视野(x400)下计数 Bcl-2 表达阳性的细胞。每张切片计数 10 个不重叠视野内阳性细胞数,取平均值作为每个标本平均每高倍视野内的统计数据。

Caspase-3 阳性表达部位在胞浆,阳性反应物部位呈棕黄色或棕褐色。利用图像分析系统测定阳性细胞的灰度值,从而将图象转化为数值,以使用计量资料的统计方法进行统计分析。阳性细胞灰度值测定:在计算机屏幕上,将切片背景灰度统一调至 200,每张切片随机选择 10 处阳性细胞测定其灰度值,取其平均值为该切片阳性细胞灰度值(灰度值高表明阳性产物含量少,阳性染色强度弱;灰度值低表明阳性产物含量多,阳性染色强度强)。

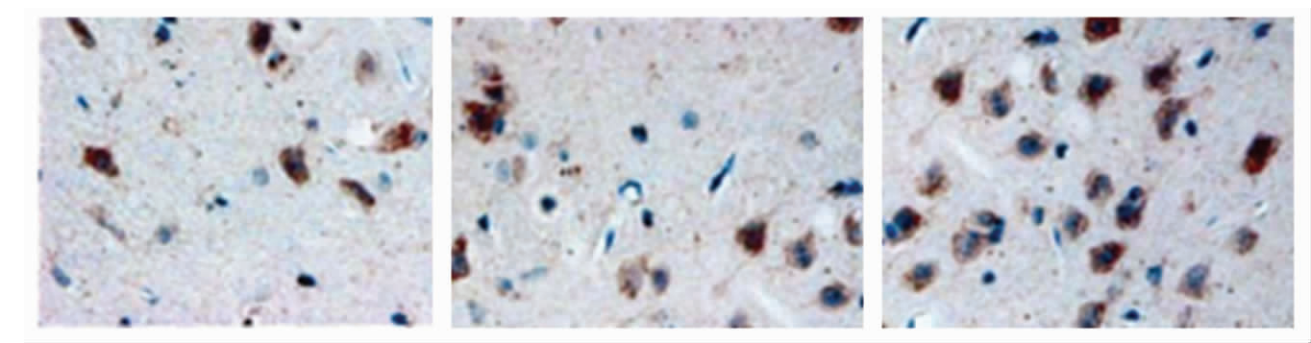
2.6 结果统计分析

采用 SPss13.0 软件系统进行处理,所有数据以 X± S 表示,各组间比较采用 t 检验, P<0.05 有统计学意义。

3 结果分析

3.1 p53 的表达

p53 在正常组和假手术组有少量表达,脑外伤模型组可见明显的阳性表达,其与对照组和假手术组比较 p53 表达明显升高,见图 1 差异具有统计学意义(P<0.01)。见表 1。



左:正常组;中:假手术组;右:脑外伤模型组

Left: Normal group ;Middle: Sham operation group ;Right :Traumatic brain injury model group

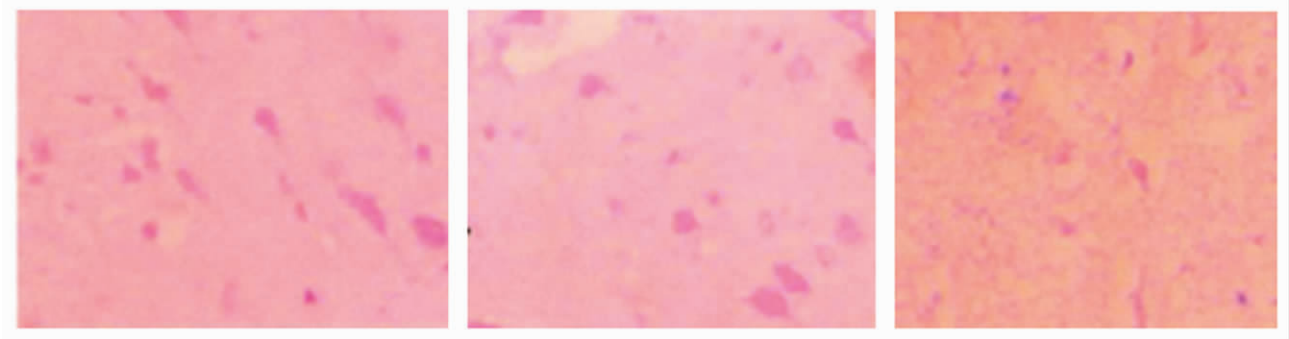
图 1 p53 免疫组化染色图

Figure 1 p53 Immunohistochemistry map

表 1 p53 免疫组化染色阳性表达
Table 1 p53 Expression of immunohistochemical staining

组别 Group	阳性细胞百分比 The percentage of positive cells
正常组 Normal group	4.66± 1.37
假手术组 Sham operation group	4.75± 1.35
脑外伤模型组 Traumatic brain injury model group	85.21± 7.34

3.2 Bcl-2 的表达 常组和假手术组 Bcl-2 均有较高表达 ,脑外伤模型组表达即明
用免疫组化方法测 Bcl-2 阳性表达细胞数显示 :见图 2。正 显下降 ,与正常组比较 ,差异有统计学意义(P<0.01)。见表 2。



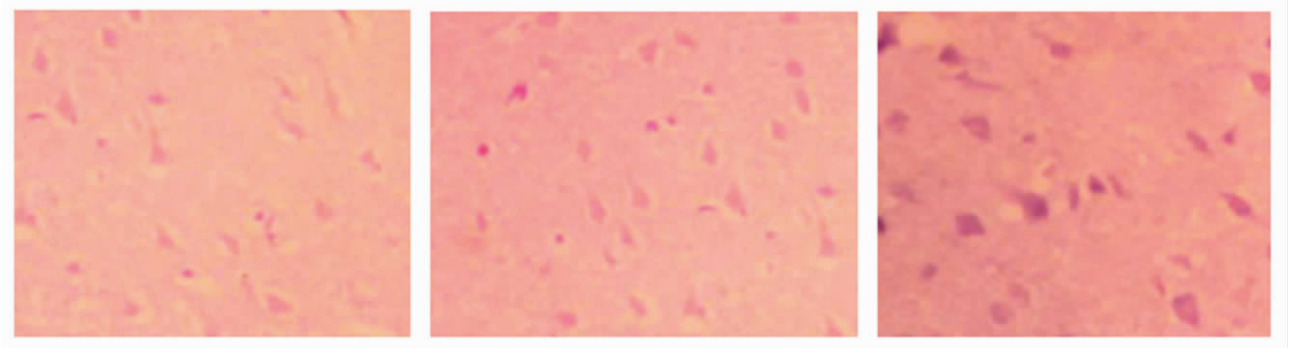
左 :正常组 ;中 :假手术组 ;右 :脑外伤模型组
Left :Normal group ;Middle :Sham operation group ;Right :Traumatic brain injury model group

图 2 Bcl 免疫组化染色图
Figure 2 Bcl Immunohistochemistry map

表 2 Bcl 免疫组化染色阳性表达
Table 2 Bcl Expression of immunohistochemical staining

组别 Group	阳性细胞 The percentage of positive cells
正常组 Normal group	34.66± 3.69
假手术组 Sham operation group	35.14± 4.33
脑外伤模型组 Traumatic brain injury model group	7.52± 1.53

3.3 Caspase-3 的表达 组明显增高 ,见图 3。差异有统计学意义(P<0.01)。见表 3。
Caspase-3 的表达正常组和假手术组较低 ,在脑外伤模型



左 :正常组 ;中 :假手术组 ;右 :脑外伤模型组
Left :Normal group ;Middle :Sham operation group ;Right :Traumatic brain injury model group

图 3 Caspase-3 免疫组化染色图
Figure 3 Caspase-3 Immunohistochemistry map

表 3 Caspase-3 免疫组化染色阳性表达
Table 3 Caspase-3 Expression of immunohistochemical staining

组别 Group	灰度值 Gray value
正常组 Normal group	195.87± 5.89
假手术组 Sham operation group	187.92± 6.24
脑外伤模型组 Traumatic brain injury model group	82.88± 7.23

4 结论

p53 蛋白主要功能为引起细胞周期阻滞,诱导凋亡和促进分化。以往研究显示 p53 是脑损伤后的关键调控因子,局灶性脑缺血后 p53 表达上调,p53 无效突变可以明显减轻由缺血、兴奋性毒性诱导的脑损伤^[21]。脑创伤后 p53 表达是一个复杂的分子机制。当 DNA 受到各种病因毒剂损伤时,野生型 p53 诱导细胞进入 G1 期,抑制细胞增殖,直到 DNA 修复。如果损伤不能修复,p53 就激活那些诱导程序性细胞死亡(PCD)的基因转录,使细胞进入 PCD 状态。p53 通过与 bcl-2 和 bax 基因的相互作用,来调节细胞凋亡的发生。p53 可能作为 bax 的转录活性因子,诱导 bax 表达的增加,促使细胞发生凋亡。

本次试验建立脑外伤大鼠实验动物模型,用免疫组化方法检测 p53、Bcl-2 和 Caspase-3 的表达。实验结果表明 p53 的阳性染色位于细胞核上,在细胞核上呈棕黄色或褐色颗粒,伴有少量的胞浆表达。与正常组和假手术组比较,脑外伤模型组 p53 的阳性表达明显升高,差异具有统计学意义(P<0.01)。Bcl-2 阳性表达部位在胞浆,胞浆内出现棕黄色或棕褐色。正常组和假手术组 Bcl-2 均有较高表达,脑外伤模型组表达明显下降,差异有统计学意义(P<0.01)。Caspase-3 阳性表达部位在胞浆,阳性反应物部位呈棕黄色或棕褐色。Caspase-3 的表达,与正常组和假手术组比较,脑外伤模型组明显增高,差异有统计学意义(P<0.01)。颅脑创伤后在创伤周围区大量神经元会发生凋亡,凋亡的发生与 p53、bax、bcl-2、caspase-3 等基因及蛋白的调节有关。其发生凋亡机制中,可能存在一条 p53 诱导的通过 bax 依赖的 caspase-3 酶活性的途径来实现。

参考文献(References)

[1] Tominaga T, Kure S, Narisawa K, et al. Evidence of apoptosis cell death after focal cerebral ischemia[J]. Brain Res 1993, 624(1):32

[2] Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptosis cell death after experience traumatic brain injure in rat[J]. Am J Pathol 1995, 147(6):1575-1583

[3] Stewart CJ, Bukre GM.Value of P53 immunostaining in pancreatico-biliary bursh cytology specimens[J]. Diagn CytoPathol, 2000, 23:308-313

[4] Harada H, Grant S. Apoptosls regulators [J]. Rev Clin Exp Hematol, 2003, 7(2):117-138

[5] Figueroa BJ, Sauerwald TM, Oyler GA, et al. A comparision of the properties of a Bdx1 variant to the wild typean tiapo ptosisinhibitor inmammalian cell cultures [J]. Metab Eng, 2003, 5(4):230-245

[6] Bails O, Savagner F, Nasser V, et al. Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genesin thyroid oncocyctic tumors [J]. J Clin Enodoerinol Metab. 2004, 89 (2): 994-1005

[7] CosulichSC, Savory PJ, ClarkePR, et al. BCL-2 regu. latesamplification of caspase activationby cyto chromec [J]. CurtBiol, 1999, 9(2):147-149

[8] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. BCL-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cyto chromec by the mitochondrial channel VDAC [J]. Nature, 1999, 399(1):483-487

[9] Stanimirovic A, Cupic H, Bosnjak B, et al. Expression of p53, bcl-2 and growth hormone receptor in atrophic type of actinic keratosis [J]. J Dem~tol Sci, 2004, 34(1):49-53

[10] Hughes PE, Alexi T, Yoshida T, Schreiber SS, Knusel B. Excitotoxic lesion of rat brain with quinolinic acid induces expression of p53 messenger RNA and protein and p53-inducible genes Bax and Gadd-45 in brain areas showing DNA fragmentation[J]. Neuroscience 1996, 7(4):1143-1160

[11] Lu J, Moochhala S, Kauri C, et al. Changes in apoptosis related protein (p53, Bax, bcl-2 and Fos)expression with DNA fragmentation in the central nervous system in rats after closed head injury [J]. J Neurosislett, 2000, 290(2):89-92

[12] Yan J, Chen C, Hu Q, et al. The role of p53 in brain edema after 24h of experimental subarachnoid hemorrhage in a rat model [J]. Exp Neurol 2008, 214(2):37-46

[13] Pravdenkova SV, Bsan AG, James SI, et al. DNA fragmen tation and nuclear endonuclease activity in rat brain after severe closed head iniury [J]. Braln Res, 1996, 729(1):151-155

[14] Clark RS, ChenJ, Watkins SC, et al. Apoptosis suppressot gene BCL-2 expression after traumatic brain iniury in rats [J]. J N l, 1997, 17(2):9172-9182

[15] Yang SY, Cui JZ. Expression of the basic fibroblast growth factor gene in mild and more severe head injury in the rat [J]. J NeIlm, 1998, 89(1):297-302

[16] 朱诚, 卢亦成, 江基尧, 等. 大脑创伤后细胞凋亡的变化规律研究 [J]. 上海医学, 2002, 25(2):77-79

Zhu Cheng, Lu Yicheng, Jiang Jiyao, et al. Apoptosis after traumatic brain Variation[J]. Shanghai Medical, 2002, 25 (2) :77-79

[17] Kaya SS, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Goksel M, Chopp M Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain[J]. Brain Res, 1999, 8(18):23-33

(下转第 2010 页)

- scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(6): 511-521
- [7] L.C. van Susante, P. Buma, H. M. van Beuningen, et al. Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2000, 18(1):68-77
- [8] Guo JF, Jourdian GW, MacCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads [J]. *Connect Tissue Res*, 1989, 19(2):142-150
- [9] Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads [J]. *Plast. Reconstr. Surg*, 1991, 88(1):753-758
- [10] Kim SE, Park JH, Cho YW, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- β 1: Implications for cartilage tissue engineering [J]. *Journal of Controlled Release*, 2003; 91(10):365-374
- [11] Cai DZ, Zeng C, Quan DP, et al. Biodegradable chitosan scaffolds containing microspheres as carriers for controlled transforming growth factor- β 1 delivery for cartilage tissue engineering [J]. *Chin-Med J (Engl)*, 2007; 120(3):197-203
- [12] Forslund C, Rueger D, Aspenberg P. A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2003, 21(4):617-621
- [13] Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, et al. Erlacher. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 and protein-2 are endogenously expressed in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulate matrix synthesis [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002, 10(5):394-401
- [14] Zalzal GH, Tomaski SM. Enlarged vestibular aqueduct and sensorineural hearing loss in childhood [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995, 121(1):23-28
- [15] Alleyne KR, Galloway MT. Management of osteochondral injuries of the knee [J]. *Clin Sports Med*, 2001, 20(2):343-364
- [16] 赵名艳, 李立华, 周长忍, 等. 可注射海藻酸钙水凝胶的制备研究[J]. *功能材料* 2010, 41(8):1353-1356
- Zhao Ming-yan, Li Li-hua, Zhou Chang-ren, et al. Preparation and characterization of calcium alginate hydrogels as injectable cartilage scaffolds [J]. *Journal of functional materials*, 2010, 41(8):1353-1356 (In Chinese)
- [17] Nordtveit RJ, Vårum KM, Smidsrød O. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1994, 23(4):253-260
- (上接第 2033 页)
- [18] Zhou C, Yamaguchi M, Colohan AR, et al. Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(5):572-582
- [19] Napieralski JA, Raghupathi R, McIntosh TK. The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain region following experimental traumatic brain injury[J]. *Brain Res*, 1999, 71(1):78-86
- [20] McCullers DL, Sullivan PG, Sellef SW, et al. Mifepristone protects Cal hippocampal neurons following traumatic brain injury in rat [J]. *J Neurosci*, 2002, 109(2):219-230
- [21] Martinez-Lucas P, Moreno-Cuesta J, Sanchez-Sanchez F, et al. Relationship between the Arg72Pro polymorphism of p53 and outcome for patients with traumatic brain injury [J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31(9):1168-1173