

癫痫大鼠海马硫氧还蛋白还原酶活性及 cleaved caspase-3 表达检测*

魏学文, 张晓伟(江苏省徐州市第一人民医院体检中心 221002)

【摘要】 目的 研究海人酸诱导癫痫大鼠海马组织硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性及 cleaved caspase-3 表达变化。**方法** Sprague-Dawley 大鼠随机分为癫痫对照组(NS组)和癫痫组(KA组)。采用脑室注射海人酸制作大鼠癫痫模型。海人酸注射 6 h 取海马组织匀浆,应用 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)还原法对海马 TrxR 活性进行测定,采用 western blotting 法检测 cleaved caspase-3 表达。**结果** NS组、KA组 TrxR 活性分别为:(71±19)、(116±40)U/mg;KA组 cleaved caspase-3 的表达较 NS组明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 癫痫大鼠海马组织 TrxR 活性明显增加,引起 caspase-3 裂解,导致神经元凋亡。

【关键词】 癫痫; 海人酸; 硫氧还蛋白还原酶; cleaved caspase-3

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.22.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)22-2695-02

Detection of thioredoxin reductase activity and the expression of cleaved caspase-3 in hippocampus of seizure rats WEI Xue-wen, ZHANG Xiao-wei (Physical Examination Center, The First People's Hospital of Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

【Abstract】 Objective To detect and analyze the thioredoxin reductase(TrxR) activity and the expression of cleaved caspase-3 in hippocampus of seizure rats induced by kainic acid(KA). **Methods** Adult male Sprague-Dawley rats were allotted into 2 groups as followed: control group(NS) and seizure group(KA). Seizures were induced by intracerebroventricular injection of KA dissolved in sterile saline. TrxR activity was detected by dithio-bis-nitrobenzoic acid reduction assay. Western blotting was used to analyze the expression of cleaved caspase-3. **Results** Thioredoxin reductase activity were (71±19)U/mg, (116±40)U/mg respectively. Compared with the control group, the expression of cleaved caspase-3 increased significantly in the seizure group($P<0.05$). **Conclusion** TrxR activity increases in hippocampus of seizure rats induced by KA, subsequently activates caspase-3 and ultimately results in neuronal apoptosis.

【Key words】 seizure; kainic acid; thioredoxin reductase; cleaved caspase-3

癫痫是由于多种病因引起的慢性脑部疾病,以脑部神经元过度放电所致的突然、反复和短暂的中枢神经系统功能失常为特征。近年来研究表明,癫痫病灶处有能量、氧及血流量相应的变化,特别是缺氧和缺血后再灌注损伤,可产生大量的氧自由基并形成自由基连锁反应。自由基与癫痫的发生、发展与治疗有着十分密切的关系^[1]。

硫氧还蛋白还原酶(TrxR EC 1.6.4.5)是一种还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)依赖的包含黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结构域的二聚体硒酶,属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族成员。它和 Trx、NADPH 共同构成硫氧还蛋白系统。TrxR 有很多生物学功能,与人类某些疾病的发病机制也密切相关^[2],是未来临床治疗与氧化应激相关性疾病研究的热点对象^[3]。

caspase 家族是一组高效蛋白水解酶,与细胞凋亡密切相关,其中 caspase-3 是最关键的效应蛋白酶,通过裂解而活化。

本实验用海人酸制作大鼠癫痫模型,通过观察癫痫大鼠海马组织 TrxR 活性及 cleaved caspase-3 表达变化,探讨癫痫导致神经元凋亡,为临床癫痫发病机制研究及其诊断治疗提供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 材料 健康成年 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠,体质量

200~300 g, SPF 级,购自中科院上海实验动物中心(证书号 005)。cleaved caspase-3(Asp175)(#9661)抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。actin(H-300)(sc-10731)抗体为 SANTA CRUZ 公司产品。anti-rabbit IgG(T6778)、胰岛素、Trx、盐酸胍、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)为 Sigma-aldrich 公司产品。海人酸为 Biomol 公司产品。

1.2 脑室注射海人酸诱导癫痫 将实验 SD 大鼠随机分为两组:癫痫对照组(NS组)($n=12$)、癫痫组(KA组)。大鼠用乙醚麻醉,定位左侧脑室:前囟后开 0.8 mm,旁开 1.5 mm,颅骨表面向下 3.5 mm。海人酸溶于灭菌生理盐水中,浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,注射体积为 10 μL ;NS组注射相同体积的灭菌生理盐水。大鼠癫痫按改进的 Racine 分级法^[4]分级。前驱症状:凝视、点头和湿狗样抖动。1级:面部肌肉痉挛表现为咀嚼运动;2级:颈部肌肉痉挛表现为点头运动;3级:一侧前肢阵挛;4级:站立伴双前肢阵挛;5级:在 4 级的基础上身体向后倒下。选取 4~5 级,脑电图显示痫样放电者 12 只供研究使用。

1.3 样品制备 海人酸注射 6 h 断头快速取脑,分离双侧海马,置液氮中冻存储备用。以下操作均在冰水浴中进行:从液氮中取出海马加匀浆缓冲液用匀浆器高速匀浆(10 s×10 次),4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 000 r/min 离心 15 min,小心移取上清液,测蛋白后分装,置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

* 基金项目:徐州市科技发展项目(NO. XF10C058)。

1.4 TrxR 活性的测定 采用 DTNB 还原法,根据 Holmgren A 描述的方法^[5]测定 NS 组($n=12$)和 KA 组($n=12$)样品 TrxR 的酶活性。

1.5 cleaved caspase-3 的表达检测 应用免疫印迹法检测 NS 组($n=4$)和 KA 组($n=4$)cleaved caspase-3 的表达,氯化硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐显色。免疫印迹显色条带扫描后以 LabWorks 软件分析处理。

1.6 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。KA 组与 NS 组比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

NS 组和 KA 组 TrxR 活性分别为:(71 ± 19)、(116 ± 40) U/mg,KA 组 TrxR 活性明显高于 NS 组,差异有统计学意义($t=3.52, P < 0.05$)。海人酸诱导癫痫大鼠海马组织 cleaved caspase-3 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

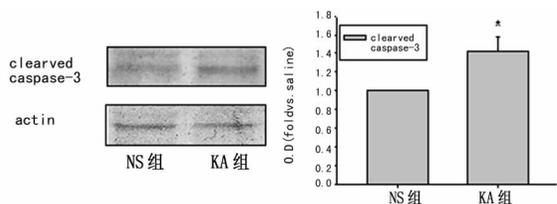


图 1 海人酸诱导的 cleaved caspase-3 表达

3 讨 论

海人酸是脑内兴奋性氨基酸递质-谷氨酸的结构类似物,在脑内它作用于谷氨酸或门冬氨酸能神经元末梢突触上的海人酸受体,刺激内源性兴奋性氨基酸释放,抑制其再摄取,引起癫痫发作,造成线粒体功能障碍和脑内多区域特别是海马神经元凋亡。海人酸模型应用广泛,其特点是具有理想的颞叶癫痫的共同特征,是模拟人类颞叶癫痫理想的动物模型^[6]。

癫痫发病中痫性活动的产生及神经细胞死亡与自由基息息相关,癫痫反复发作时,自由基的生成也许是造成细胞死亡的原因之一^[1]。在癫痫发作后的脑组织中,与凋亡相关的各种基因表达增加,表明癫痫发作后神经元损伤与细胞凋亡密切相关。在诸多凋亡的诱因中,体内代谢或外源性因素产生的自由基均被证实可诱导细胞凋亡,清除自由基,阻断自由基反应,可以抑制由于癫痫发作导致的细胞毒性反应,抑制细胞的凋亡和死亡,保护神经元,抑制疾病的进展。

TrxR、Trx 和 NADPH 三者构成 Trx 系统,其普遍存在于所有生物细胞中。主要作用是通过二硫键-巯基的交换反应维持细胞内外氧化还原平衡及在氧化应激反应中具有抗氧化和清除自由基作用。已有研究发现该系统在多种神经疾病,如脑缺血、缺氧及脑外伤中有神经保护作用^[7]。

TrxR 是一种 NADPH 依赖的包含 FAD 结构域的二聚体硒酶,属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族成员,催化 Trx 还原反应,其活性决定着 Trx 作为二硫化物氧化还原酶的功能。它通过催化 NADPH 将小分子蛋白质 Trx 上的-S2 还原成(-SH)₂ 的反应,即维持 Trx 的还原型,而 Trx 在氧化还原调节和抗氧化防御中有着重要作用。氧化态 Trx 不仅在消除自由基方面,更在缺血时通过信号转导下调 caspase-3 的表达,从而抑制细胞凋亡的发生^[8-9]。

caspase-3 是细胞凋亡信号转导通路的关键性效应酶,是

细胞凋亡的 executor,其正常以酶原的形式存在,依靠裂解而活化,活化后的 caspase-3 裂解相应的胞浆胞核底物,如 ADP-核糖聚合酶,最终导致细胞凋亡。caspase-3 的活化是神经细胞凋亡的最后共同通路,它的活化意味着凋亡的不可避免,caspase-3 检测为细胞发生凋亡的分子水平检测指标。

本实验检测了 TrxR 活性和裂解的 caspase-3 情况。结果显示,海人酸明显诱导了 TrxR 活性增强。TrxR 活性增强,更多氧化态硫氧还蛋白(Trx-S₂)被还原为 Trx(-SH)₂,进一步促进了 caspase-3 的活化^[9-10]。活化的 caspase-3 在癫痫大鼠海马诱导神经元凋亡。因此,通过抑制海人酸诱导的癫痫导致的 TrxR 活性增强,减少 Trx(-SH)₂ 的生成,进而抑制 caspase-3 的裂解,减少它的活化,可以对神经元起到保护作用,TrxR 可能成为癫痫治疗的潜在靶点;癫痫对神经元的损伤并未因其发作停止而终止,在发作停止后神经元凋亡还会持续一段时间。因此,TrxR 活性监测则可能成为癫痫诊断与疗效考核及预后的指标,这方面的研究有待进一步深入。

参考文献

- [1] Gulati K, Ray A, Vijayan VK. Free radicals and theophylline neurotoxicity: an experimental study[J]. Cell Mol Biol, 2007, 53(5): 42-52.
- [2] Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1780(11): 1368-1382.
- [3] Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005, 14(2): 149-153.
- [4] Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase[J]. Methods Enzymol, 1995, 252: 199-208.
- [5] Akbar MT, Lundberg AM, Liu K, et al. The Neuroprotective Effects of Heat Shock Protein 27 Overexpression in Transgenic Animals against Kainate-induced Seizures and Hippocampal Cell Death[J]. J Biol Chem, 2003, 278(22): 19956-19965.
- [6] Cross DJ, Cavazos JE. Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model[J]. Epilepsy Res, 2007, 73(2): 156-165.
- [7] Patenaude A, Murthy MR, Mirault ME. Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(10): 1063-1080.
- [8] Mitchell DA, Marletta MA. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine[J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(3): 154-158.
- [9] Holmgren A. Biochemistry: SNO removal[J]. Science, 2008, 320(5879): 1019-1020.
- [10] Benhar M, Forrester MT, Hess DT, et al. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins[J]. Science, 2008, 320(5879): 1050-1054.

(收稿日期: 2011-07-08)