

· 基础研究 ·

大鼠脊髓损伤后细胞凋亡及 Caspase-3、Fas 的表达和意义

王金光¹ 郑启新¹ 赵 铭¹ 郭晓东¹

摘要 **目的:**研究脊髓损伤后神经细胞凋亡表达及 Caspase-3、Fas 的表达变化规律。**方法:**使用改良 Allen 法制作大鼠急性 SCI 模型,实验分对照组(脊髓未受打击)和损伤 5 个组,致大鼠脊髓(T9、T10)中度撞击损伤,损伤后 6h、1d、3d、7d、15d 取材,共分 6 组,采用 HE 染色、荧光 Hoechst33258 染色、原位末端脱氧核糖核酸转移酶介导 DUTP 标记法(TUNEL)对损伤脊髓组织进行标记;免疫组化方法测 Caspase-3 及凋亡因子 Fas,半定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)测定各时间段 Caspase-3 的表达变化。**结果:**大鼠急性损伤后 TUNEL 标记阳性凋亡细胞 6h 开始出现,多位于脊髓白质;3d 达到高峰,在灰质和白质均有表达,7d 后开始降低,持续 15d;免疫组化检测 Fas 表达的阳性细胞 6h 开始增高,2d 达到高峰,15d 下降;Caspase-3 mRNA 6h 开始增高,3d 达到高峰,7d 后恢复正常。免疫组化检测 Caspase-3 表达的阳性细胞与 TUNEL 标记阳性凋亡细胞出现的时限相似。**结论:**脊髓损伤后存在神经细胞凋亡现象发生,Caspase-3 参与了脊髓损伤细胞凋亡的调节。Caspase-3 的表达和 Fas 的变化有一定的相关性。

关键词 脊髓损伤;细胞凋亡;Caspase-3;Fas

中图分类号:R493,R651.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-04-0296-05

Neural cell apoptosis and significant expression of Caspase-3、Fas expression after spinal cord injury in rats/WANG Jinguang,ZHENG Qixin,ZHAO Ming,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21 (4): 296—300

Abstract Objective:To study the expressions of neural cell apoptosis and the changes of Caspase-3、Fas after spinal cord injury in rats.**Method:** With improved Allen's method, rats acute SCI at the level of T9, T10 in moderate degree were established. The study animals were divided into six groups including control group and injured 5 groups. The segments of injured spinal cord were collected for morphological studies at 6,24,48 hours and 7, 15 days after injury, including HE staining, Hoechst 33258 staining, and TUNEL methods. The expression of caspase-3 was detected by immunohistochemical staining and RT-PCR.**Result:** After injury, TUNEL-positive cells were found in the compression region after 6h and mostly located in the gray matter. TUNEL-positive cells were present both in the gray matter and white matter with a maximum presence at 3d after injury. Its decreased from 3d to 7d in the white and gray matter. Fas increased at 6h and peaked at 3d. Caspase-3 mRNA increased at 6h and peaked at 48h after trauma, it was decreased at 7d. The protein expression of caspase-3 by immunohistochemical staining was similar to the TUNEL time-course date.**Conclusion:** There are neuronal apoptosis after spinal cord injury, Caspase-3 mRNA and protein expressions are enhanced in combination with neuronal apoptosis. The expression of Caspase-3 have some certainty correlation with Fas' expression.

Author's address Dept. of Orthopedics, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022

Key words spinal cord injury; apoptosis; Caspase-3; Fas

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是外科较常见且严重的损伤,目前尚无明确有效的方法。脊髓损伤后,神经细胞和组织发生坏死和凋亡。细胞凋亡是一个复杂的病理生理过程,主要有 Caspase 家族成员介导的蛋白酶级联反应完成,其中 Caspase-3 起着关键作用, Caspase-3(CPP32)属于胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族,在凋亡执行阶段起中心作用。Caspase-3 能剪切和活化 Caspase-6, Caspase-7, Caspase-9。本身又受 Caspase-8、-9、-10 的剪切活化。

本研究 Caspase-3 在神经元细胞凋亡中的作用规律、表达情况及与细胞凋亡的关系,期望为抑制神经细胞凋亡,治疗脊髓损伤提供一种新的策略。

1 材料与方法

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科,武汉市,430022

作者简介:王金光,男,博士,副主任医师

收稿日期:2005-09-23

1.1 材料和分组

选择成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 42 只, 雌雄不限, 购自同济医学院动物中心, 体重 240—260g, 随机分成: 空白组 (假损伤组, 只切开椎板, 但不损伤脊髓), 损伤组于伤后 6h、1d、3d、7d、15d 取材, 共分 6 组, 每组 7 只; 所用试剂: 兔抗鼠 Caspase-3 P20 亚单位多克隆抗体 (晶美公司), TRIzol 液 (GIBCO 公司), 逆转录和 PCR 试剂盒 (武汉亚法公司), TUNEL 试剂盒 (武汉博士德公司), Fas 试剂盒 (武汉博士德公司), Hoechst33258 (Sigma 公司)。

1.2 动物模型制作

本研究采用 Wrathall 等改良的 Allen's 致伤方法。以 40mg/kg 体重腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠麻醉, 将大鼠俯卧位固定于实验台上。选定 T12 为正中切口, 无菌操作, 活力碘消毒, 切开皮肤及皮下, 显露出 T11 至 L2 棘突及椎板并咬除之, 暴露硬脊膜。根据 Allen's 重锤下坠打击法原理, 用自制的 9g 重的重锤在玻璃导管的引导下行重力打击, 给予 (3×9) gcm 强度的重力打击脊髓, 以双下肢猛烈收缩为有效打击, 造成大鼠脊髓中度损伤, 即不完全性截瘫。冲洗伤口, 用 1—0 号丝线缝合伤口, 无菌敷料覆盖。空白组只进行椎板切除, 不行脊髓损伤, 即行切口关闭缝合。动物室温饲养, 自由饮食。截瘫动物膀胱区人工按压排尿, 每天 3 次, 防止并发症。观察记录大鼠双下肢的肌张力、反射、大小便及一般状态。

1.3 取材及切片准备

在 SCI 后各个时间点, 麻醉后, 打开胸腔自左心室插入静脉套管至升主动脉, 快速灌注冰生理盐水行心脏灌注, 切开右心房, 待流出的液体清亮后, 换用 4% 多聚甲醛缓冲液约 100ml 心脏灌注固定 30min, 而后自背部打开椎管, 暴露脊髓, 取损伤段脊髓约 6mm 长做脊髓标本, 标本取出后用 4% 多聚甲醛缓冲液固定过夜。然后进行脱水, 石蜡包埋, 行横切面 5μm 厚度连续切片分别做 HE (苏木素-伊红) 染色, Hoechst33258 染色, 取材做免疫组化检测 Fas 凋亡因子, 各个实验组切片按 TUNEL 标记法对凋亡细胞进行标记, 免疫组化检测 Caspase-3 的表达。

RT-PCR 半定量测定 Caspase-3 mRNA 的表达: SCI 后各个时间点, 每组 3 只在冰上处死, 将损伤脊髓中心组织置入液氮灌中保存备用。

1.4 检测指标

1.4.1 Hoechst33258 染色: Hoechst33258 染料 1mg 用 20ml 蒸馏水溶解后, 滤过, 用蒸馏水稀释成染色液。石蜡切片脱蜡和水化后, 蒸馏水稍洗后, 点染色液 10min 后, 水洗, 封片剂封片后荧光显微镜观察。

1.4.2 Fas 神经细胞凋亡因子检测: 取标本做免疫组织化学染色, 检测细胞凋亡因子 Fas。鼠抗人 Fas 多克隆抗体免疫组化试剂盒及 DAB (二甲基联苯胺) 显色试剂盒购于北京中山公司。免疫组化操作过程按试剂盒说明书进行, 经 DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, 进行对照观察。阴性对照采用 PBS 或 10% 正常血清代替一抗; 免疫组织化学染色方法, 常规方法步骤省略。

观察与计数: 产物细胞内表达部位, 按形态测量学方法计数高倍视野内染色阳性细胞 (阳性细胞呈棕色), 计算阳性率。

1.4.3 TUNEL 标记凋亡细胞: 采用原位末端标记法 (TdT-mediated x-dUTP nick end labeling, TUNEL 法), 所用标本同免疫组化检测标本, 主要试剂是德国 Boehringer-Mannheim 公司 In Situ Cell death Detection 试剂盒, 各个实验组切片按 TUNEL 标记法对凋亡细胞进行标记, 步骤省略。镜下观察阳性标记的细胞数, 阳性标记的凋亡细胞核呈棕褐色, 其他细胞核呈蓝色。

1.4.4 免疫组化检测 Caspase-3 的表达: 石蜡切片常规免疫组化处理, 兔抗鼠 Caspase-3 P20 亚单位一抗; 实验步骤省略, 中性树脂封片保存; 镜下观察每张切片的阳性细胞数。

1.4.5 RT-PCR 半定量测定 Caspase-3 mRNA 的表达变化: ①引物合成: 依照 Caspase-3 mRNA, 设计下列引物:

上游引物: 5'-GGACTGCGGTATTGAG-3'

下游引物: 5'-TGACGACCTGGAACAT-3'

扩增片段为: 496bp。

以 β-action 为内参照,

上游引物: 5'-CCCCAGACGAGAACGAC-3'

下游引物: 5'-ACGCCCTGATTCCCACT-3'

扩增片段为: 271bp。

合成于上海生工生物工程技术有限公司。

②RNA 抽取: 动物按上述分组情况到规定时间后, 立即取出脊髓组织, 置于 -4℃ 冰箱约 3min, 放入冻存管, 液氮灌中保存。称取脊髓组织 50mg 置于匀浆器中。加入 TRIzol 试剂 1ml, 冰上作用 10min。加氯仿 0.4ml, 用力摇振 15s, 室温静置 10min; 12000r/min, 4℃ 离心 10min。仔细吸取上层水相, 移至另一 EP 管中, 加 0.5ml 异丙醇, 振荡混匀, 室温静置 10min。12000r/min, 4℃ 离心 10min。弃去上清液, 加 75% 乙醇 1ml, 洗涤 RNA 团块; 12000r/min, 4℃ 离心 5min。弃乙醇, 室温放置 5—10min 干燥, 加 DEPC 处理水 20μl, -70℃ 保存。

③RNA 质量和浓度测定: 取 5 μ l RNA+95 μ l DEPC 处理水, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 用 751 分光光度计在 260nm 处测定 RNA 含量: 浓度(μ g/ μ l)=A260 值 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 40/1000。

④RT 过程。采用 20 μ l 反应体系: Total RNA 3 μ l、Oligo(dt)primer 1 μ l、DEPC 处理水 8 μ l, 混合转动, 轻度离心 3—5s, 70 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 迅速移至冰中并保持 3min。随后依次加入下列组分: 5 $\times$ Buffer 4 μ l、4 $\times$ dNTP 2 μ l、Rnasin 1 μ l, 温和混匀, 点动离心。37 $^{\circ}$ C 水浴 5min。加入: 逆转录酶(M-MuLV)1 μ l, 至总体积为 20 μ l, 用吸头轻轻吹打混匀, 短暂低速离心。42 $^{\circ}$ C 水浴 60min 后, 加热至 70 $^{\circ}$ C 10min 后, 立即置于冰上。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。PCR 过程: 建立 50 μ l 的反应体系: 纯水、10 $\times$ Buffer 5 μ l、Mgcl₂ 3 μ l、4 $\times$ dNTP 4 μ l、上游引物 2 μ l、下游引物 2 μ l、内参上下游引物各 2 μ l、cDNA 5 μ l、Taq 酶 1 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 40s、55 $^{\circ}$ C 退火 1min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min。确定最适循环数和最适的模板量: 从第 18 循环起没间隔 3 个循环拿出 1 管至 33 循环。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 电泳结果用 GDS 800 凝胶成像分析系统进行电泳条带分析, 以 Caspase-3 与 β -action 吸收峰面积的比值对扩增循环数作图, 选择最适循环数, 此实验的最佳循环次数为 30 个循环。图像分析: 图像经 UVP GRAB-itIMAGEL 软件采集, Gelwords ID Advanced V4.01 软件处理分析。相对表达率=实验灰度值/内参灰度值。

1.5 统计学分析

由 2 名非本实验组并且熟悉凋亡细胞形态的实验人员, 对所有免疫组化染色和 TUNEL 标记的切片计数其中阳性细胞。其中 TUNEL 标记阳性细胞, 标准为细胞核被标记呈棕褐色为阳性。所有实验数据结果均来自每组所有动物标本切片阳性率的均值。

数据用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析和 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有显著性意义, Caspase-3 的表达和 TUNEL 标记结果采用直线相关分析。

2 结果

2.1 HE 染色

光镜下可见损伤段 8h 脊髓结构开始破坏, 损伤节段灰质内出现大片的出血灶, 较多的神经元死亡, 前角部分神经元尚存, 其中部分神经元可见核固缩。1—3d 脊髓破坏表现严重, 出血范围扩大, 损伤中心液化坏死, 灰质中仅存少量神经元, 主要位于后角; 白质中可见肿胀轴突和大量空泡。7—15d 损伤范围确定, 损伤段变细, 脊髓内有大部分坏死, 囊腔及空

洞形成, 周围有炎性细胞浸润, 大量胶质细胞增生, 白质区仍有部分正常结构(图 1)。

2.2 Hoechst 33258

正常细胞发出均匀淡的荧光, 凋亡的细胞可见核浓缩、亮度增加, 可见凋亡小体, 在灰质中凋亡细胞可见核碎裂成光滑小圆体, 白质以胞核浓聚为多(图 2)。

2.3 TUNEL 标记及计数结果

TUNEL 标记的阳性细胞胞核呈棕褐色, 对照组仅见偶染细胞, 6h 后开始阳性细胞, 主要位于灰质中; 1d 后凋亡阳性细胞逐渐增多, 灰质和白质中可见大量阳性细胞, 3d 达到高峰(图 3—4)。7d 后白质中凋亡染色的阳性细胞逐渐减少, 阳性细胞主要位于周围白质中, 15d 后可见少量的阳性细胞(表 1)。

2.4 Fas 凋亡因子检测

对照组脊髓组织各检查方法未见或仅见极少凋亡细胞。实验显示, 损伤组 Fas 阳性凋亡细胞在损伤组中表达较高, 广泛分布于脊髓灰、白质中, 在损伤早期 8h 至 24h 表达较高(图 5)。持续 2 周表达渐少(表 2)。

2.5 免疫组化

Caspase-3 表达的阳性细胞胞浆棕黄色。在对照组阳性细胞偶有表达。在损伤组, 伤后 8h 开始有表达, 阳性细胞主要位于脊髓灰质背角的小神经元。伤后 3d 表达较高, 阳性细胞主要位于白质的腹侧索、外侧索和背索(图 6—7), 与对照组比较 $P<0.01$ 。15d 可见少量的阳性细胞。结果采用直线相关分析, 神经细胞凋亡水平与 Caspase-3 表达水平呈正相关(相关系数 $r=0.923$)(表 3)。

2.6 RT-PCR Caspase-3 mRNA 的变化

实验各组 RT-PCR 显示得到两条 270bp 和 500bp 左右长度的扩增产物, 与预期大小一致(图 8)。损伤后 6h 脊髓组织 Caspase-3 mRNA 开始升

表 1 TUNEL 标记的阳性细胞数

	对照组	损伤组				
		6h	24h	3d	7d	15d
切片数	7	7	7	7	7	7
细胞数	3.1 $\pm$ 0.6	65 $\pm$ 9.6	108 $\pm$ 13.5	218 $\pm$ 11.8	138 $\pm$ 12.5	41 $\pm$ 6.3

表 2 Fas 标记的阳性细胞数

	对照组	损伤组				
		6h	24h	3d	7d	15d
切片数	7	7	7	7	7	7
细胞数	1.1 $\pm$ 0.6	29 $\pm$ 5.6	64 $\pm$ 11.5	78 $\pm$ 7.8	33 $\pm$ 4.5	21 $\pm$ 6.3

表 3 Caspase-3 表达变化

	对照组	损伤组				
		6h	24h	3d	7d	15d
切片数	7	7	7	7	7	7
细胞数	1.9 $\pm$ 0.5	69 $\pm$ 5.6 ^①	113 $\pm$ 12.5 ^①	223 $\pm$ 4.8 ^①	95 $\pm$ 4.5 ^①	51 $\pm$ 5.3

①与对照组比较 $P<0.01$

高,与对照组差异无显著性意义。2d 时达到高峰,之后开始下降。2 周后降至正常水平。实验结果采用直

线相关分析,神经细胞凋亡水平与 Caspase-3 mRNA 表达水平均呈正相关($r=0.712$)(表 4)。

表 4 Caspase-3 mRNA 的表达变化

	对照组	损伤组				
		6h	24h	3d	7d	15d
切片数	7	7	7	7	7	7
Caspase-3 mRNA	0.21±0.01	0.58±0.02 ^①	0.73±0.021 ^①	0.82±0.031 ^①	0.32±0.013 ^①	0.28±0.023

①与对照组比较 $P<0.05$

图 1 脊髓损伤 3d HE 染色
(×300)

图 2 脊髓损伤 3d Hoechst
33258 染色
(×300)凋亡细胞浓聚、发亮

图 3 对照组 TUNEL 标记的
阳性细胞少见

图 4 损伤 3d 后 TUNEL 标
记的阳性细胞在灰质、白质中
大量出现

图 5 脊髓损伤后 2d Fas 阳
性细胞有较多的表达

图 6 对照组 Caspase-3 免疫
组化未见阳性细胞

图 7 损伤组 3d Caspase-3
在白质中大量表达

图 8 各时间点 Caspase-3
mRNA 表达变化

3 讨论

3.1 关于脊髓损伤

SCI 后,除了创伤本身造成的机械性损伤外(神经细胞、轴突和血管的直接损伤,即原发性损伤),局部脊髓组织还会出现一系列继发性的病理改变,包括组织缺血、水肿、乳酸堆积、电解质紊乱、炎性改变、内皮素含量增高、自由基损害、儿茶酚胺和花生四烯酸衍生物的损伤、细胞凋亡、能量代谢紊乱等,为继发性损伤。原发性损伤被动地发生在损伤短时间内(一般为 3h 内),这种神经损伤是不可逆的。继发性损伤造成的损害超过原发性损伤,继发性损害因素是一种细胞和分子水平的主动调节过程,其发展过程达数小时,具有可逆性且可被控制^[1]。

3.2 脊髓损伤与细胞凋亡

近年来,许多实验研究证实脊髓损伤后不但有细胞坏死,还存在细胞凋亡。前者主要是在各种较为严重的因素(如损伤、缺血缺氧、高热、毒性物质等)作用下,细胞产生不可逆损伤。细胞凋亡的观念也引入了脊髓损伤,细胞凋亡是在各种因素作用下(如生长因子缺乏、造血因子缺乏、fasl、Ca²⁺过载、氧自由

基、兴奋性氨基酸等)而发生^[2]。凋亡是以核染色质固缩、DNA 断裂,电泳呈梯带分布为特征,是迟发性脊髓损伤后神经细胞死亡的重要方式。Fas 又称为“死亡受体”,FasL-Fas 结合,水解各种鞘磷脂酶产生神经酰胺,传递凋亡信号,通过活化 Caspase-8 继而活化 Caspase-3 而引发级联反应,最终引起 DNA 降解,细胞凋亡^[5]。Li 等^[4-5]观察在大鼠脊髓损伤后 4—9 天,在损伤部位白质有大量的胶质细胞凋亡,细胞主要是少突胶质细胞,而灰质的神经元不表现凋亡特征;在中、重度脊髓压迫损伤后,远离损伤节段在 4—9 天少突胶质细胞凋亡细胞数增加,推测压迫损伤引起凋亡信号传导,轴突脱髓鞘并引起功能丧失。Crowe 等^[6]研究猴脊髓损伤后在退变的纤维束可发现凋亡细胞,损伤部位的继发性退变和远离损伤部位的慢性脱髓鞘部分是由于凋亡引起。Emery 等^[7]检查 15 例外伤性脊髓损伤后 3h 至 2 月死亡患者的脊髓,发现凋亡细胞主要存在损伤部位、存活组织边缘,在损伤中心邻近节段发生华勒性变,白质主要可见少突胶质细胞凋亡,可见细胞凋亡是继发性脊髓损伤重要的病理变化,在本实验中我们观察到在脊

髓损伤的早期主要以坏死为主,在损伤后 6h 才开始出现大量的神经元、胶质细胞凋亡,Fas 凋亡因子大量表达,凋亡约持续 15 天,本实验与 Crowe 的报告相似^[6]。由于凋亡是一程序性过程,外界可以对这一过程进行干预,可见脊髓损伤的治疗时窗可以大大延长。从细胞凋亡出现的高峰时间来看,在损伤 8h 至损伤后 7d 是防止脊髓继发性损伤细胞凋亡的黄金时期^[8-9]。

3.3 脊髓损伤细胞凋亡的分子机制

凋亡与坏死发生机制不同,它是细胞表面接触到诱导刺激因子,将信号传入细胞内部,通过启动其自身内部遗传机制,形成由基因调控的主动细胞死亡过程。多个基因参与凋亡的调控,半胱氨酸蛋白酶 Caspase,也称 ICE 样蛋白酶被认为细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,它直接水解激活与 DNA 断裂等凋亡特征性改变密切相关的蛋白,又称为死亡蛋白酶^[10]。至今已发现 14 个家族成员,分为两类:一类参与 Caspase 家族其他成员的激活,包括 Caspase-1、2、4、5、8、9 和 10;另一类介导细胞凋亡下游的执行阶段,包括 Caspase-3、6、7、14。其中 Caspase-3 是凋亡过程中最重要的蛋白酶,是多种凋亡途径的共同下游效应部分,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。Caspase 效应的底物主要包括,聚腺苷二磷酸核糖多聚酶 (parp)、DNA 依赖性蛋白酶、核纤层蛋白 (lamin)、胞衬蛋白 (fodrin)、脱氧核糖核酸酶 (CAD) 及抑制物等,通过其结构改变或影响特定信号分子而参与细胞凋亡的发生。本实验 RT-PCR 检测到 Caspase-3 mRNA 从 6h 开始增高,而 TUNEL 标记的阳性凋亡细胞 6h 开始少有出现,72h 才达到高峰;Fas 凋亡阳性细胞在 24h 表达较高,Caspase-3 的表达和 Fas 的变化有一定的相关性^[11]。Caspase-3 的表达早于凋亡出现的时期,表明此时间某些细胞已有凋亡信号始动,Caspase-3 作为 Caspase 系统的最终效应酶而参与凋亡^[12-13]。

在正常情况下,Caspase-3 蛋白是以活性很低的酶原形式合成,包括氨基酸原域、大亚单位 (约 20KD)、小亚单位 (约 10KD) 组成,通过蛋白酶水解去除氨基酸的一段序列而被激活,本实验免疫组化所用的抗体特异的针对 Caspase-3 活化后酶解的 P20 亚单位,结果显示,正常的脊髓组织没有表达,表明在正常的脊髓组织 Caspase-3 是以活性很低的酶原形式存在,在脊髓损伤后 6h 开始大量表达,24—48h 达到高峰,与 TUNEL 所检测的阳性凋亡细胞、Fas 阳性凋亡细胞在时间上相重叠,从 Caspase-

3 阳性细胞先后出现的区域上看,与脊髓损伤阳性凋亡细胞一致,可见 Caspase-3 参与了脊髓损伤细胞凋亡的调节。

本实验可以看出,从脊髓损伤后到 Caspase-3 活化这段时间是脊髓损伤干预细胞凋亡、减轻继发性脊髓损伤治疗时窗,Caspase-3 在脊髓损伤后 48h 内显著增高,Caspase-3 的表达和 Fas 的变化有一定的相关性。可见应用特异性 Caspase-3 抑制剂应在 48h 内使用。总之,大鼠脊髓损伤后存在细胞凋亡现象发生,从损伤后 6h 开始,持续 2 周以上,可见脊髓损伤的治疗时窗可以大大延长^[14-15]。Caspase-3 参与了脊髓损伤细胞凋亡的调节,为应用 Caspase-3 阻滞剂和基因治疗提供了理论依据。

参考文献

- [1] Ramer MS,Harper GP,Bradbury EJ.Progress in spinal cord research: a refined strategy for the international spinal research trust[J]. Spinal Cord,2000,38(8):449—472.
- [2] Yong C,Arnold PM,Zoubine MN,et al.Apoptosis in cellular compartments of rats spinal cord after severe contusion injury[J]. J Neurotrauma,1998,15:459—471.
- [3] Zurita M,Vaquero J,Zurita I.Presence and significance of CD95 (Fas/ APO-1) expression after spinal cord injury [J]. J Neurosurg,2001,94:257.
- [4] Li GL,Brodin G,Farooque M,et al.Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord [J]. J Neuropathol Exp Neurol,1996,55:280—289.
- [5] Li GL,Farooque M,Olsson Y,et al.Changes of Fas ligand immunoreactivity after compression trauma to rat spinal cord[J]. Acta Neuropathol, 2000,100:75—81.
- [6] Crowe MJ,Bresnahan JC,Shuman SL,et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys [J]. Nat Med, 1997, 3:73—76.
- [7] Emery E,Aldana P,Bunge MB,et al.Apoptosis after traumatic human spinal cord injury[J]. J Neurosurg,1998,89: 911—920.
- [8] 刘世清,周华,彭昊,等. Fas 蛋白在鼠急性脊髓组织损伤中分布特点的初步研究[J].武汉大学学报(医学版),2004,25(1),16—19.
- [9] Lossi L,Tamagno I,Merighi A.Molecular morphology of neuronal apoptosis: analysis of caspase 3 activation during postnatal development of mouse cerebellar cortex [J]. J Mol Histol,2004,35(6):621—629.
- [10] Stennicke HR,Salvesen GS.Properties of caspase [J]. Biochim Biophys Acta,1998,1387:17.
- [11] Philipp S,Page I,Hohnel K,et al.Regulation of caspase 3 and Fas in pressure overload-induced left ventricular dysfunction [J].Eur J Heart Fail,2004,6(7):845—851.
- [12] Mueller TH,Kienle K,Behm A,et al.Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation[J]. Transplantation, 2004,78(9):1267—1273.
- [13] Lautrette C,Giraud S,Vermot-Desroches C,et al.Expression of a functional Fas death receptor by human foetal motoneurons[J]. Neuroscience, 2003,119(2):377—385.
- [14] Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury[J].Advan Physiol Educ,2002,26:238—255.
- [15] Ali-Khan SE,Hales BF.Caspase-3 mediates retinoid-induced apoptosis in the organogenesis-stage mouse limb[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol,2003, 67(10):848—860.