

血红素氧合酶-1/一氧化碳系统在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤中的作用

马利锋 初桂兰 郑荣秀

【摘要】 目的 观察新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 后血红素氧合酶-1/一氧化碳系统 (HO-1/CO) 变化, 探讨其在 HIBD 中的作用。方法 7 日龄 Wistar 新生大鼠按随机数字表法分为假手术组 (Sham 组)、缺氧缺血组 (HIBD 组) 及 HO 抑制剂锌原卟啉组 (Znpp 组), 每组 6 只。采用实时荧光定量 PCR 法、硫代巴比妥酸法 (TBA 法)、流式细胞术 (FCM) 和双波长定量测定法分别检测脑组织中 HO-1 mRNA 的表达、丙二醛 (MDA) 含量、脑组织细胞凋亡率及血中 CO 浓度。结果 与 Sham 组比较, HIBD 组、Znpp 组 HO-1 mRNA 表达均增强 (分别为 0.166 ± 0.042 、 2.289 ± 0.333 、 1.839 ± 0.322), CO 浓度升高 [分别为 $(0.460 \pm 0.009)\%$ 、 $(1.026 \pm 0.145)\%$ 、 $(0.735 \pm 0.079)\%$], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但与 HIBD 组比较, Znpp 组 HO-1 mRNA 表达明显减少, CO 浓度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, HIBD 组、Znpp 组 MDA 含量及细胞凋亡率均明显升高 [MDA 含量分别为 (1.016 ± 0.210) nmol/mg prot、 (1.945 ± 0.312) nmol/mg prot、 (3.202 ± 0.693) nmol/mg prot, 凋亡率分别为 $(0.108 \pm 0.009)\%$ 、 $(1.412 \pm 0.307)\%$ 、 $(2.458 \pm 0.565)\%$], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 HIBD 组比较, Znpp 组 MDA 含量及细胞凋亡率明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 缺氧缺血性脑损伤后 HO-1/CO 系统可能在脑损伤的恢复中起到一定的保护作用。

【关键词】 血红素氧合酶-1; 一氧化碳; 脑缺氧; 脑缺血

【中图分类号】 R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)04-0347-04

Role of heme oxygenase-1/carbon monoxide in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

MA Li-feng, CHU Gui-lan, ZHENG Rong-xiu. Department of Pediatrics, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Corresponding author: CHU Gui-lan, Email: malfsophia@yahoo.cn

【Abstract】 Objective To observe the changes of brain heme oxygenase-1/carbon monoxide (HO-1/CO) in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) injury and investigate the role of HO-1/CO in the recovery of HIBD. **Methods** Eighteen 7-day-old Wistar rats were randomly divided into sham-operated group, HIBD group and HIBD with zinc protoporphyrin (ZnPP) treatment group ($n=6$). In the latter two groups, HIBD model was established by unilateral carotid ligation followed by timed exposure to 8% oxygen. Real-time fluorescent quantitative PCR was performed to determine the expression of HO-1 mRNA and thiobarbituric acid (TBA) method was used to assay malondialdehyde (MDA) content in the brain tissue of the rats. The cell apoptosis in the brain after HIBD was analyzed using flow cytometry, and the blood CO concentration was detected by the absorbance at 420 nm and 432 nm. **Results** Compared to the sham-operated group, HO-1 mRNA expression and blood CO concentration were significantly increased in HIBD group and ZnPP group ($P < 0.05$). The rats with ZnPP group had significantly lower HO-1 mRNA expression and blood CO concentration than those in HIBD group ($P < 0.05$). HIBD resulted in significantly increased MDA content and cell apoptosis rate in the rat brain as compared to those in the sham-operated group ($P < 0.05$), and ZnPP treatment further increased the MDA content and cell apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusions** Increased brain HO-1 mRNA expression and blood CO concentration in neonatal rats with HIBD are probably associated with the spontaneous recovery of neural tissue injury.

【Key words】 Heme oxygenase-1; Carbon monoxide; Cerebral hypoxia; Cerebral ischemia

近来研究发现,缺血性脑损伤中,血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1,HO-1)/ 一氧化碳(carbon monoxide,CO)系统具有抗氧化、稳定细胞膜和线粒体膜、抑制细胞凋亡等作用^[1]。但 HO-1/CO 系统在未成熟脑组织缺氧缺血性损伤中的作用目前还不清楚。为此,本实验以新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage,HIBD)模型为对象,观察脑组织中 HO-1 的表达、血浆中 CO 浓度及丙二醛(MDA)含量、脑细胞凋亡率的变化,探讨 HO-1/CO 系统在未成熟脑组织缺氧缺血性损伤中的作用,为临床治疗提供新方向。

材料和方法

一、实验动物及分组

7 日龄新生 Wistar 大鼠 18 只(天津放射科研究所动物室提供),体质量 10~16 g,雌雄不限,按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、缺氧缺血组(HIBD 组)和 HO 抑制剂锌原卟啉组(Znpp 组),每组 6 只。

二、动物模型的制备

参照 Rice 方法,HIBD 组及 Znpp 组大鼠仰卧固定于操作板上,行颈正中切口切开颈部皮肤,分离结扎左侧颈总动脉,缝合切口后恢复 2 h,然后置于 37℃ 恒温水浴 2500 mL 密闭玻璃容器中,以 1.5~2.5 L/min 的速度输入体积浓度 8% 的氧气和 92% 氮气的混合气体,2 h 后取出送回母鼠身边继续哺乳喂养。Znpp 组于结扎左侧颈总动脉及低氧处理后立即腹腔注射 Znpp 50 mg/kg。Sham 组只分离左侧颈总动脉不结扎,亦不作低氧处理。模型制备 24 h 后断头,取血置于肝素管中待测 CO 浓度,并分离结扎侧脑皮质,-80℃ 冰箱保存,用于检测 HO-1 mRNA 及 MDA,余脑组织立即进行凋亡率测定。

三、实时荧光定量 PCR 法测定 HO-1 mRNA 水平

按照 TRIzol 试剂说明书在脑组织中抽取总 RNA 后用于逆转录反应得到 cDNA,-20℃ 保存待用。HO-1 mRNA 采用两步法实时荧光定量 PCR 法测定,反应体系为 20 μL,反应参数为预变性:95℃,10 s;变性:95℃,5 s;退火:60℃,34 s;循环 40 次。用 GenAmp5700 SDS 软件分析结果及 PCR 扩增产物生成曲线。以上所用试剂和实时荧光定量 PCR 反应试剂均由大连宝生物工程有限公司提供。引物设计:HO-1 上游引物为 5'-ACCGCCTTCCTGCTCAA

CAT-3',下游引物为 5'-GGGCGTCTCTGCAGAGGTAG-3',扩增产物长度 147 bp,HO-1 引物序列检索自 GeneBank NM 012580;内参照 β-actin 上游引物为 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCC-3',下游引物为 5'-CTGGGGTGTGAAGGTCTC-3',扩增产物长度为 217 bp。以上引物均由北京奥科生物工程公司合成。

四、双波长定量测定法检测 CO 浓度

参照乐宏元等^[2]方法,新鲜血标本加入 Na₂S₂O₄,使样品中多组分血红蛋白转化成 Hb 和碳氧血红蛋白(COHB)2 个组分,在紫外分光光度计上用 420 nm 和 432 nm 两个波长测定吸光度值,依比尔定律建立综合方程式,求出全血 COHb 百分比(代表内源性 CO 水平)。

五、硫代巴比妥酸法测定脑组织中 MDA 含量

具体操作按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒操作说明进行。

六、流式细胞术测定脑组织细胞凋亡率

将新鲜的脑组织立即置于冷 PBS 中剪碎,按美国 Beckman coulter 公司提供的 Annexin V-FITC Kit 试剂盒说明操作,应用流式细胞计量仪检测细胞凋亡率。

七、统计学处理

统计学方法采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 *q* 检验,统计处理在 SPSS 13.0 统计软件包上完成,*P*≤0.05 示差异有统计学意义。

结 果

一、脑组织中 HO-1 mRNA 的表达水平及全血 CO 浓度

与 Sham 组比较,HIBD 组、Znpp 组 HO-1 mRNA 表达水平增加,CO 浓度升高,差异有统计学意义 (*P*<0.05);但与 HIBD 组比较,Znpp 组 HO-1 mRNA 表达水平明显下降,CO 浓度降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。(表 1)

二、脑组织中 MDA 含量及细胞凋亡率

与 Sham 组比较,HIBD 组、Znpp 组 MDA 含量及细胞凋亡率均明显升高,差异有统计学意义(*P*<0.05);与 HIBD 组比较,Znpp 组 MDA 含量及细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义(*P*<0.05)。(表 2)

讨 论

CO 是继 NO 分子之后又一被研究的气体信使

表 1 大鼠脑组织 HO-1 mRNA 表达水平和血中 CO 浓度变化($\bar{x}\pm s$)Tab.1 Changes in brain HO-1 mRNA expression and blood CO concentration in the rats (Mean \pm SD)

组别	HO-1 mRNA(相对表达量)	CO浓度(%)
Sham组	0.166 \pm 0.042	0.460 \pm 0.009
HIBD组	2.289 \pm 0.333 ^a	1.026 \pm 0.145 ^a
Znpp组	1.839 \pm 0.322 ^{ab}	0.735 \pm 0.079 ^{ab}
F值	143.170	70.306
P值	0.000	0.000

与 Sham 组比较, ^aP<0.05; 与 HIBD 组比较, ^bP<0.05表 2 大鼠脑组织 MDA 含量及细胞凋亡率变化($\bar{x}\pm s$)Tab.2 Changes in brain MDA content and cell apoptosis rate after HIBD and Znpp treatment (Mean \pm SD)

组别	MDA(nmol/mg prot)	细胞凋亡率(%)
Sham组	1.016 \pm 0.210	0.108 \pm 0.009
HIBD组	1.945 \pm 0.312 ^a	1.412 \pm 0.307 ^a
Znpp组	3.202 \pm 0.693 ^{ab}	2.458 \pm 0.565 ^{ab}
F值	46.465	80.444
P值	0.000	0.000

与 Sham 组比较, ^aP<0.05; 与 HIBD 组比较, ^bP<0.05

分子,其作为一种新型的神经递质,在细胞功能和通讯的调节中发挥重要的信号转导作用。内源性 CO 主要来源于 HO 催化血红素分解代谢产生。HO 是血红素代谢中的关键酶,在哺乳类动物中是唯一产生 CO 的酶。HO 在生物体内有两型:HO-1 和 HO-2, HO-1 为诱导型,HO-2 为结构型。生理情况下,脑中 HO 主要表达为 HO-2,HO-1 则表达很少。在应激情况下,如缺氧缺血,细胞因子、内毒素等作用时,HO-1 在脑内表达增加,而 HO-2 则不受这些因素影响,可能因为 HO-1 5' 非转录区即基因启动子区存在一些增强子和调节片段,如金属反应片段、抗氧化反应片段、热休克和血红素反应片段、肿瘤基因杂二聚体结合位点等,转录因子(如氧化应激反应转录因子 NF- κ B 和 AP-1 等)与这些特殊位点结合可致 HO-1 基因激活。因此,本实验中主要检测 HO-1 的表达。结果显示,HIBD 组 HO-1 mRNA 表达增加,考虑与缺血缺氧所致氧化应激反应因子激活 HO-1 基因表达有关,也说明 HO-1 的调控在基因水平已经发生。

Znpp 是 HO-1 的强烈抑制剂,腹腔内注射后 HO-1 mRNA 表达减少,推测原因在于 Znpp 能影响调节 HO-1 基因片段的活性,进而抑制 HO-1 表达。

血红素降解途径是体内内源性 CO 的主要来源,此种来源的 CO 少部分以原型经肺部呼吸排出,

绝大部分以 COHb 的形式存在。因此本实验测定血中 COHb 浓度来反映内源性 CO 的浓度。CO 作为 HO-1 的催化产物亦可反映 HO-1 的活性。

在脑缺氧缺血过程中,氧自由基生成增多,膜结构破坏及细胞凋亡是造成脑损伤的重要因素,因此本实验通过检测脑组织中 MDA 的含量和细胞凋亡率来反应脑组织的损伤程度。

结果显示,给予 HO-1 抑制剂 Znpp 处理后,新生鼠脑组织 HO-1 mRNA 表达减少,血浆 CO 浓度明显降低;而内源性 CO 降低后,脑组织中 MDA 含量及细胞凋亡率明显增加,表明缺氧缺血性脑损伤时 HO-1 的表达增加和内源性 CO 浓度升高能够减少氧自由基的产生,减少细胞死亡,对脑组织起到一定的保护作用。

HO-1 又称热休克蛋白 -32(HSP-32),是热休克蛋白家庭成员之一,属于小分子量 HSPs 家庭,能稳定细胞组织蛋白,稳定线粒体膜及细胞膜,减轻神经细胞损伤。应激后 HSP 常分布于核周及浆膜周围,并与质膜结合,起到稳定质膜的作用。脑细胞的功能与结构的稳定依赖于细胞膜的结构正常及功能稳定。有研究表明 HO-1 表达增加可抵抗谷氨酸介导氧化应激所致的神经元死亡,膜损伤、核聚集均明显减轻,并证明当 HO-1 水平增高时,静息细胞内钙离子浓度降低,氧自由基产生速度大大下降^[3]。另有研究发现 HO-1 与原癌基因 bcl-2 和 p53 家族的激活有关,这些基因的产物在细胞的存活/凋亡中起重要作用^[4]。冯新红等^[5]发现 HO-1/CO 系统参与了脑缺血后血脑屏障通透性的改变,并可能具有保护作用。另有研究表明 HO-1 蛋白能增加星型胶质细胞、灶周神经元和巨噬细胞内各种生物酶的活性,而神经胶质细胞有利于内皮细胞间的紧密联结的形成并具有保护血脑屏障的作用。本实验通过应用 Znpp 抑制 HO-1 的表达及活性后,脑组织氧自由基增多,细胞凋亡增加,说明 HO-1 表达减少及活性降低会加重缺氧缺血性脑组织的损害,从反面表明缺氧缺血后 HO-1 的表达增加可能对脑组织具有一定的保护作用。

在缺氧缺血应激状态下,HO-1 产生相对高浓度的 CO,并由胶质细胞弥散至脑微小血管。CO 已被证实为鸟苷酸环化酶(sGC)的激动剂,其与 sGC 的亚铁血红素部位结合,激活 sGC,从而使环磷酸鸟苷水平增加,进而发挥一系列生物学效应。CO 不仅存在于外周组织中调节血管张力,而且存在于脑组织中,能使血管扩张,抑制血小板聚集,调节脑血流量,传递细胞间信息。有研究报道 CO 还可通过激

活 P38 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路及抑制细胞色素 C 氧化酶,保持细胞内 ATP 水平和线粒体膜的稳定性,实现抗炎、抗氧化及保护细胞的作用^[6];另有研究认为内源性 CO 可通过影响细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性保护神经元及胶质细胞,减轻脑水肿,降低 BBB 通透性^[7]。本实验中 HIBD 组可见缺氧缺血诱导 HO-1 高表达,CO 作为下游产物浓度相应增加,提示缺氧缺血不仅诱导 HO-1 的表达增加,亦诱导 HO-1 活性的增强。

综上所述,缺氧缺血时损伤的脑组织表达 HO-1,在 HO-1 自身及其下游产物 CO 的作用下,微血管扩张,有利于调节局部脑组织血供,改善脑组织缺氧,细胞膜结构的稳定使能量代谢紊乱程度降低,氧自由基产生减少,细胞死亡减少。也有研究认为在 CO 水平过量增加时,可导致脑血管持续扩张及脑血流的过度灌注;同时过量 CO 可能干扰脑的神经递质功能,使神经元处在一种过度兴奋状态,造成神经元受损^[8]。这说明 HO-1/CO 系统在 HIBD 发病过程中可能存在双重作用,而其发挥保护作用的最佳浓度、时机还需进一步探讨,但是调控 HO-1/CO 系统或实施基因治疗为减轻新生儿缺氧缺血性脑损伤提供了新靶点,有望成为治疗新生儿缺氧缺血性脑病的新方法。

参 考 文 献

[1] Nader G, Abraham, Kappas A, et al. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase [J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60 (1): 79-127.

[2] 乐宏元, 宋小兴, 刘和平. 一氧化碳血红蛋白双波长定量测定[J]. *临床检验杂志*, 1996, 14(2): 87-88.

[3] Schulz E, Chen k, John F, et al. Suppression of the JNK Pathway by Induction of a Metabolic Stress Response Prevents Vascular Injury and Dysfunction[J]. *Circulation*, 2008, 118(13): 1347-1357.

[4] Parfenova H, Basuroy S, Raymond F, et al. Glutamate induces Oxidative Stress and Apoptosis in cerebral vascular endothelial cell: contribution of HO-1 and HO-2 to cytoprotection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(5): C1399-C1410.

[5] 冯新红, 袁伟, 沈霞, 等. 血红素氧合酶 -1 对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的影响 [J]. *中国临床康复*, 2003, 7 (31): 4188-4190.

[6] Brian S, Bilban M, Timothy R, et al. Carbon monoxide signals inhibition of cytochrome oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen specise[J]. *FASEB*, 2007, 21(4): 1099-1106.

[7] Tcheranova D, Charles W, Leffler CW, et al. Ca²⁺ signaling in glutamate-stimulate CO production by newborn pig astrocyte [J]. *FASEB*, 2008, 22(5): 1151-1160.

[8] Leszl-Ishiguro M, Horvath B, Johnson RA, et al. Influence of the heme-oxygenase pathway on cerebrocortical blood flow [J]. *Neuroreport*, 2007, 18(11): 1193-1197.

(收稿日期:2008-11-03)
(本文编辑:张玲)



(上接 343 页)

[3] Kang SK, Lee DH, Bae YC, et al. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral is chomia in rats [J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2):355-366.

[4] 杨立业, 郑佳坤, 汪朝阳, 等. 人脂肪组织来源的基质细胞分化为神经元样细胞的体外研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20 (8): 783-786.

[5] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. human adipose tissue is a source of imultipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13 (12): 4279-4295 .

[6] Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, et al. In vitro differentiation of human processed lipoasporate cells into early neural progenitors Plast[J]. *Reconstr Surg*, 2003, 111(6): 1922-1931.

[7] Yang LY, Liu XM, Sun B, et al. Adipose tissue-derived stromal cells express neuronal phenotypes[J]. *Chin Med (Engl)*, 2004, 117 (3):425-429.

[8] 郭再玉, 姜晓丹, 徐如祥, 等. 骨髓基质细胞源性神经干细胞体外分化及电生理特性研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(6):

545-550.

[9] 杨忠旭, 栾国明, 历俊华. 胚胎大鼠神经干细胞分离培养的实验研究[J]. *临床神经外科杂志*, 2004, 1(2): 74-76.

[10] 雷德强, 赵洪洋, 邓兴力, 等. 胎鼠脊髓神经干细胞的分离培养、鉴定与诱导分化[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2008, 25(3): 265-268.

[11] Safford KM, Safford SD, Gimble JM, et al. Characterization of neuronal glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells[J]. *Exp Neurol*, 2004, 187(2): 319-328.

[12] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. *Neurosci Res*, 2000, 61(4): 364-370.

[13] Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact?[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77(2): 174-191.

[14] Croft AP, Przyborski SA. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(8): 1841-1851.

(收稿日期:2009-01-30)
(本文编辑:卢丽玉)