文章编号:1000-5404(2005)17-1739-03

论著

血晶素促进缺血缺氧大鼠脑组织诱导型血红素氧合酶基因的表达

余 刚[1],王 莉[2],彭国光[1],董为伟[1] (重庆医科大学:[1]第一医院神经内科,[2]基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 研究血晶素对全脑缺血再灌注Wistar大鼠脑保护作用及机制。**方法** 成功建立成年Wistar大鼠全脑缺血再灌注模型后,于全脑缺血10 min再灌注24、48、72 h 3个时相点观察缺血再灌注对大鼠脑组织血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白表达及皮质神经元的作用及变化规律;并于模型成功建立后5 min,1、2 d侧脑室内注射25 mg/kg的血晶素,观察血晶素对缺血再灌注大鼠脑HO-1蛋白表达及皮质神经元的影响。**结果** 大鼠脑组织HO-1蛋白表达在全脑缺血10 min再灌注48 h达高峰($P<0.05$);血晶素可促进脑HO-1蛋白表达($P<0.05$),并减轻了全脑缺血再灌注所导致的皮质损害。**结论** 血晶素对缺血再灌注大鼠脑缺血有保护作用,其可能的机制是通过上调脑HO-1蛋白表达,启动一系列的内源性的神经保护机制来发挥脑保护作用。

关键词:脑缺血;血晶素;HO-1;神经元坏死
中图法分类号:R345.41;R349.21;R743.302 **文献标识码**:A

Neuroprotective effect of heme oxygenase-1 induced by hemin in the brain of rats suffered from ischemia-reperfusion injury

YU Gang[1], WANG Li[2], PENG Guo-guang[1], DONG Wei-wei[1] ([1] Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, [2] Department of Pathology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the neuroprotective effect of heme oxygenase-1 induced by hemin on the rat brain after ischemia-reperfusion. **Methods** The global cerebral ischemia-reperfusion model in 48 Wistar rats was surgically prepared by four-vessel occlusion method (4-VO) and another 8 rats underwent sham-operation as normal control. Hemin was injected over 5 min at the lateral ventricle at 15 min, 24 h and 48 h after reperfusion in 24 ischemia-reperfusion rat models and normal saline was applied to another 24 rat models at the same time points as negative control. The effect of hemin was evaluated on the pathologic outcome and on the immuohistochemical reaction for HO-1 after 10-minute global cerebral ischemia followed by 24 h, 48 h and 72 h reperfusion. **Results** The peak level of HO-1-like immunoreactivity was found at 48 h after the reperfusion as compared with the matched rats in normal saline group ($P<0.05$). Hemin significantly increased viable neurons in the cortex and striatum as compared to that of normal saline group ($P<0.05$). **Conclusion** The induction of HO-1 protein by the administration of hemin may contribute to cellular defense against ischemic damage in brain regions where potential ability to synthesize HO-1 is retained in ischemia.

Key words: cerebral ischemia; hemin; heme oxygenase-1; neuron necrosis

随着全球老龄化进程的加剧,卒中的发病率逐年增加,然而其防治一直是临床工作中难以解决的难题,其最根本的原因是脑缺血损伤的机制极其复杂。近年来研究表明,脑卒中后脑内发生一系列应激反应,尤其在伴有缺血的情况下,这种应激反应可以诱导多种特殊基因表达,并合成相关的应激蛋白,如HO-1、热休克蛋白70(HSP70)等。HO-1可催化降解血红素生成的胆绿素和具有生物活性的一氧化碳(carbon monoxide, CO)[1]。目前认为HO-1基因水平的改变是缺血性损害时可靠且敏感的指标之一,缺血应激时HO-1蛋白表达的上调可阻止缺血刺激对神经元的损害。血晶素可诱导HO-1基因表达,促进内源性CO产生[2]。本实验旨在探讨血晶素对缺血性脑损害时HO-1蛋白表达的影响及是否发挥缺血脑保护作用,并初步探讨其发生的可能机制。

作者简介:余 刚(1971-),男,四川省达州市人,硕士,主治医师,主要从事脑血管疾病的基础与临床等方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)89012873

收稿日期:2004-07-23;修回日期:2004-12-03

1 材料与方法

1.1 材料

雄性成年 Wistar 大鼠 56 只，体质量 250～300 g 由重庆医科大学实验动物中心提供。血晶素购自美国 Sigma 公司。抗 HO-1 抗体（山羊抗鼠/兔 IgG）购自美国 Sigma 公司（1∶200 稀释），二抗生物素化兔抗山羊 IgG 购自美国 Maxim 公司（即用型）。

1.2 方法

1.2.1 全脑缺血再灌注动物模型制备 大鼠短暂全脑缺血再灌注动物模型参照 Chen 等[3] 报道的方法：采用 Pulsinelli-Brierley 4 血管阻塞法进行改良，大鼠于手术前 1 d 禁食，不禁饮；手术前用 3% 戊巴比妥钠 20 mg/kg 腹腔内注射麻醉；行颈部正中切口，暴露第 1 颈椎横突，找到双侧翼小孔，分离出双侧椎动脉，用双极电凝器永久性凝闭双侧椎动脉；24 h 后用套有硅胶的动脉夹夹闭暴露的双侧颈总动脉，夹闭 30～60 s 内昏迷，翻正反射消失、双侧瞳孔放大、竖毛、自主呼吸加快为模型成功标准，缺血 10 min，此为全脑缺血期，10 min 后放开双侧颈总动脉夹为再灌注期。假手术组不做颈总动脉断流和椎动脉电凝，其余过程与实验组相同。

1.2.2 动物分组 A 组：对照组即假手术组（$n=8$），B 组：血晶素组分为缺血 10 min 再灌注（I/R）24（B1）、48（B2）、72 h（B3）3 组（$n=8$）。给药时相点：B1 组：缺血 10 min，再灌注 5 min 给药；B2 组：缺血 10 min，分别于再灌注 5 min、24 h 给药两次；B3 组：缺血 10 min，分别于再灌注 5 min、24、48 h 给药 3 次。给药方式：侧脑室内注射 25 mg/kg 血晶素（侧脑室定位：前囟向后 1 mm，旁开 1.5 mm，距硬脑膜 3.5 mm；无菌条件下，用普通无菌注射器于侧脑室打孔，并缓慢注入血晶素，注射结束后缝合皮肤，下次注射以同一部位进针。）[4,5]（美国 Sigma 公司）；C 组：单纯缺血再灌注组 分为缺血 10 min 再灌注 24（C1）、48（C2）、72 h（C3）3 组（$n=8$），于再灌注 5 min、24、48 h 侧脑室内注射等体积的生理盐水［注射时间及方法同血晶素组，按动物的体质量（kg）计算］。

1.2.3 脑组织制备 各组大鼠在完成实验过程后给予 3% 戊巴比妥钠过量腹腔麻醉，肝素钠生理盐水从左心室灌注，然后用 4% 多聚甲醛固定脑组织，将脑组织浸于相同固定液 48 h，标本常规脱水、透明、浸蜡、包埋。采用尾状核平面脑切片（视神经末端冠切）作为观察对象，行 5 μm 厚连续冠状切片。切片分 3 组：分别行 HO-1 免疫组化染色，其它相邻两组行 HE 染色及 Nissl 染色。

1.2.4 免疫组化、Nissl 染色方法及常规 HE 染色 采用免疫组化 S-P 法，二氨基联苯胺显色系统显色，流水终止反应，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片观察；用 PBS 代替一抗作阴性对照。神经元坏死染色采用缓冲亚甲蓝法（根据 pischin-gert 法）Nissl 染色；由于神经元坏死后细胞崩解或被吞噬细胞吞噬，这部分神经元不能计数，而且大脑皮质锥体细胞对缺血性损伤最为敏感，因而本实验采用计数大脑皮质残存的正常锥体细胞作为神经元计数。400 倍光学显微镜下计数单侧皮质阳性神经元细胞数（5 个视野取均值）。

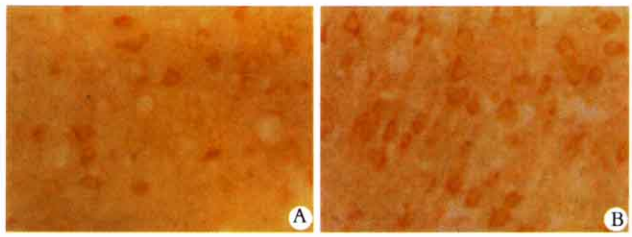
1.3 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 10.5 统计软件 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 HO-1 免疫组化染色情况

HO-1 免疫阳性细胞呈棕黄色，位于细胞浆和细胞膜；阴性对照染色阴性。HO-1 在正常脑组织均有弱阳性表达，散在分布；与正常对照比较 I/R 24 h 逐渐升高（$P<0.01$），48 h 达高峰（$P<0.05$，与 I/R 24 h 比较），72 h 开始下降（$P<0.05$，与 I/R 48 h 比较），但仍高于正常对照（$P<0.01$）；主要分布于皮质、纹状体等缺血敏感区，海马也有少量表达。血晶素处理各组能明显上调 HO-1 免疫阳性细胞数（$P<0.05$，与对应时相点比较），但血晶素处理各组组间比较无显著性差异（$P>0.05$）（图 1，表 1）。



A: ischemia/reperfusion; B: treated with hemin after ischemia/reperfusion

图 1 缺血再灌注 48 h Wistar 大鼠皮质 HO-1 阳性表达 （S-P×400）

Fig 1 HO-1 positive cells in the cortex of Wistar rats in 48 h （S-P×400）

表 1 实验各组 HO-1 免疫阳性细胞数（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

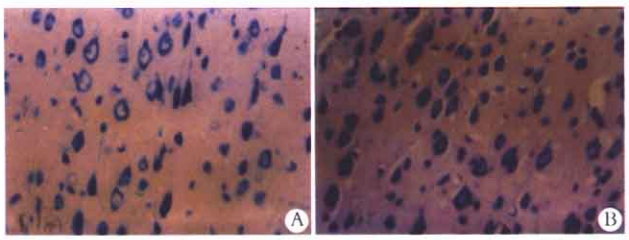
Tab 1 The number of HO-1 positive cells in each group ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Normal control	I/R24 h	I/R48 h	I/R72 h
A	12.25±5.38*	—	—	—
B	—	78.67±5.70	83.37±7.31	80.73±6.82
C	—	57.90±5.04△◆	69.80±5.98◆	60.53±3.64△◆

*：$P<0.01$，*vs* B，C；△：$P<0.05$，*vs* I/R48 h；◆：$P<0.05$，*vs* B

2.2 Nissl 染色情况

大鼠受缺血再灌注刺激，大脑皮质锥体细胞最易受损，神经元发生缺血坏死，表现为：细胞体缩小，变成三角形，Nissl 小体溶解、消失，胞浆呈均匀蓝色，胞核浓缩深染，结构消失。由于坏死神经元细胞可发生崩解，且能被吞噬细胞吞噬，故本实验计数病变区残存的正常神经元细胞。本研究用缓冲亚甲蓝法（Pischingert 法）对缺血脑组织作尼氏染色，观察到：缺血再灌注各组大脑皮质锥体细胞数量较正常对照组明显减少（$P<0.01$），血晶素处理各组大鼠大脑皮质形态基本正常的锥体细胞数较单纯缺血再灌注组多，与单纯缺血再灌注对应时相点比较有显著性差异（$P<0.05$），与 HO-1 免疫阳性细胞数的变化规律基本一致。但血晶素各处理组间比较无显著性差异（$P>0.05$），见图 2，表 2。



A: ischemia/reperfusion; B: treated with hemin after ischemia/reperfusion

图 2　单纯缺血再灌注 48 h Wistar 大鼠大脑皮质神经元　(Nissl ×400)

Fig 2　The cortex in Wistar rats in 48 h after ischemia/reperfusion　(Nissl ×400)

表 2　单纯缺血及血晶素各时相点残存正常神经元数目(Nissl 染色)(n =8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　The number of normal neuron cells after I/R and the effects of Hemin(Nissl staining) (n =8, $\bar{x} \pm s$)

Group	Normal control	I/R24 h	I/R48 h	I/R72 h
A	95.03 ±6.99	—	—	—
B	—	36.75 ±4.99△	40.67 ±4.85△	37.85 ±6.14△
C	—	25.01 ±7.60△▲	36.5 ±2.74△*	26.04 ±2.59△▲*

△: P <0.01, *vs* Normal control A; ▲: P <0.05, *vs* I/R48 h; *: P <0.05, *vs* B

2.3　大鼠脑组织 HE 染色

单纯缺血 10 min/再灌注组各时相点光镜下可见全脑广泛的神经元出现缺血性损害：细胞数目明显减少，胞浆空泡变性，核固缩均质化，核周体消失，血管周围间隙明显增大。血晶素处理各组，缺血性损害程度较相应时相点单纯缺血再灌注组明显减轻。

3　讨论

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是血红素分解代谢过程中的限速酶，它能使细胞内的血红素降解成胆绿素、游离铁和 CO。迄今为止，已发现 3 种 HO 同工酶，其中 HO-1 为诱导型，可被多种应激诱导。在生理状况下，脑组织中 HO-1 的表达水平较低，当细胞和组织处于应激状态时如缺血、炎症因子、氧化应激、热应激等，HO-1 可作为保护性蛋白被诱导，以防御体内由细胞因子介导的凋亡[1]。

近年的研究提示 HO-1 在脑缺血、动脉粥样硬化、缺氧性肺损伤及器官移植排斥反应中具有细胞保护作用。当脑内发生缺血缺氧刺激时，HO-1 则在脑内星形胶质细胞、神经元及血管内皮细胞等显著表达，且以某些脑区表达明显。国外研究表明，HO-1 在缺血缺氧应激状态的过度表达与机体的自身保护机制有关。以转基因鼠为实验材料的实验证明，过表达 HO-1 转基因鼠在脑缺血性损伤及永久局灶性脑缺血损伤中都表现出较野生型明显缩小的梗死灶[2]；本实验显示，HO-1 在全脑缺血再灌注大鼠脑组织中的皮质和纹状体表达显著，48 h 达高峰，和国外学者的研究基本一致[6]。

血晶素又名氯化血红素，可诱导血红蛋白和其他红细胞系统特异蛋白激酶的基因转录、翻译，并提供铁和血红素以供组装血红蛋白[7]，已用于治疗间歇性血卟啉病。血晶素即是 HO 的底物，又是 HO 的促进剂，可诱导 HO-1 基因表达，促进内源性 CO 产生，催化血红素产生胆绿素、CO 和 Fe^{3+}。其中 CO 是重要的信使分子，而胆绿素是有效的抗氧化抗自由基物质，这对脑卒中过程中(如缺血、再灌注等)所产生的大量自由基恰好起了拮抗作用，从而对缺血性脑损害起到很好的保护作用[7]。

本实验显示，血晶素能明显减轻缺血性脑损害，Nissl 染色显示皮质形态基本完整的锥体细胞明显多于单纯缺血再灌注组，血晶素处理各组 HO-1 免疫阳性细胞数明显上调。因此我们认为血晶素可能通过诱导 HO-1 因子蛋白表达而发挥脑保护作用，但血晶素通过哪些 HO-1 下游分子发挥脑保护作用还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Alcaraz M J, Fernandez P, Guillen M I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(30): 2541 - 2551.

[2] Panahian N, Yoshiura M, Maines M D. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice[J]. J Neurochem, 1999, 72(3): 1187 - 1203.

[3] Chen J, Graham S H, Nakayama M, *et al*. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(1): 2 - 10.

[4] Lindenblatt N, Bordel R, Schareck W, *et al*. Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation *in vivo* [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(3): 601 - 606.

[5] Park E M, Joh T H, Volpe B T, *et al*. A neuroprotective role of extracellular signal-regulated kinase in N-acetyl-O-methyldopamine-treated hippocampal neurons after exposure to *in vitro* and *in vivo* ischemia[J]. Neuroscience, 2004, 123(1): 147 - 154.

[6] Takizawa S, Hirabayashi H, Matsushima K, *et al*. Induction of heme oxygenase protein protects neurons in cortex and striatum, but not in hippocampus, against transient forebrain ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(5): 559 - 569.

[7] Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, *et al*. Possible protective mechanisms of heme oxygenase-1 in the brain[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 977: 501 - 506.

(编辑　刘洪娥)