文章编号:1000-5404(2006)10-1035-03

论著

氯化血红素对大鼠局灶性脑缺血组织的作用探讨

刘 娟,姚国恩,蒋晓江,叶 红,胡 银 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨氯化血红素(Hemin)在局灶性脑缺血脑组织中作用及其诱导脑红蛋白(Ngb)表达的可能机制。**方法** 将SD大鼠随机分为3组($n=20$),分别为假手术对照组、手术组、Hemin处理组,3组大鼠于术后24 h检测脑含水量、脑梗死体积、观察组织病理学改变,免疫组织化学技术了解脑红蛋白表达情况。**结果** Hemin处理组脑含水量、脑梗死体积较手术组有显著性差异($P<0.05$)。病理切片观察,Hemin处理组水肿程度较手术组减轻,变性神经元数量较手术组减少。免疫组化分析,Hemin处理组脑红蛋白阳性神经元数量较手术组增多。**结论** Hemin能减轻局灶性脑缺血时脑组织的损伤,其可能通过诱导脑红蛋白表达达到脑保护作用。

关键词: 氯化血红素;局灶性脑缺血;脑红蛋白
中图法分类号: R446.8;R743.31;R977.6 **文献标识码:** A

Effect of Hemin on focal ischemic brain tissues of rats

LIU Juan, YAO Guo-en, JIANG Xiao-jiang, YE Hong, HU Yin (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and possible mechanisms of Hemin on focal ischemic brain tissues. Methods Sixty SD rats were randomly divided into three groups: sham-operation control group, operation group and Hemin treatment group. Twenty-four hours after focal cerebral ischemia, the brain water content, infarcted tissue volume, neuropathologic changes and immunocytochemical expression of neuroglobin (Ngb) were examined. Results There was significant difference in brain water content and the infracted tissue volume between operation group and Hemin treatment group ($P<0.05$). Neuropathologic examination showed that there were fewer necrotic neurons, milder edema and more pronounced Ngb expression in the Hemin treatment group than the operation group. Conclusion Hemin may probably be beneficial to the protection of focal cerebral ischemia through inducing the expression of neuroglobin.

Key words: Hemin; focal cerebral ischemia; neuroglobin

Burmester等[1]于2000年在Nature上首次报道了人和小鼠脑中存在一种新型携氧球蛋白-脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)。研究证实,Ngb在急性脑缺血缺氧损伤中具有脑保护作用[2,3],而关于Ngb的诱导表达途径及机制尚不清楚。研究表明,如同血红蛋白(hemoglobin, Hgb)和肌红蛋白(myoglobin, Mgb)一样,经过氯化血红素(Hemin)诱导的离体神经细胞Ngb在蛋白及mRNA水平均呈增高趋势,并呈时间和浓度依赖性[4]。本研究着重观察大鼠脑缺血模型中Hemin对脑组织损伤的影响及其对脑损伤组织中Ngb表达的影响,探讨Ngb诱导表达的可能机制,以期为Hemin防治脑缺血缺氧损伤提供可靠的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 ①Hemin,购自上海丽珠生物技术有限公司,配制方法:先用NaOH溶解Hemin,再用磷酸盐缓冲液调节pH值至7.4,浓度为12.5 g/L。②氯化三苯四唑(TTC):购自国药集团化学试剂有限公司。③羊抗Ngb多抗血清:购自Santa cruz公司。④免疫组织化学染色试剂盒,购自北京中杉生物试剂有限公司。DAB为美国Sigma产品。

1.1.2 动物及分组 成年健康SD大鼠60只,来源于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心,雌雄不限,体质量200~250 g,分为3组(每组20只),即假手术对照组、手术组、Hemin处理组。假手术对照组仅切开颈部皮肤,分离颈总动脉及分支,不行动脉结扎及栓线;手术组仅行右侧大脑

基金项目:第三军医大学科研基金资助项目(2005-2006)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2005-2006)
作者简介:刘 娟(1978-),女,四川省资阳市人,硕士研究生,医师,主要从事脑血管疾病方面的研究。电话:13983733548
通讯作者:姚国恩,电话:(023)68757863
收稿日期:2005-11-11;修回日期:2006-03-24

中动脉闭塞;Hemin 处理组除行右侧大脑中动脉闭塞外,于术后 1 h 腹腔注射 Hemin(50 mg/kg)。每组大鼠均分为 4 小组(每个小组 5 只),在术后 24 h 分别进行 TTC 染色、组织含水量测定、病理切片和免疫组化分析。

1.2 方法

1.2.1 麻醉 予 1% 戊巴比妥钠腹腔注射(40 mg/kg),术中观察呼吸及心率。

1.2.2 MCAO 模型建立 参照 Longa 法复制右侧大脑中动脉闭塞模型[5],采用经右侧颈总支动脉分叉处插入线栓,以阻断右侧大脑中动脉血流。各组大鼠均于 24 h 后断头处死。

1.2.3 神经行为学评分 参照 Longa[5] 5 分制评分标准,于大鼠术后清醒后进行评分,0 分:无神经功能缺损;1 分:不能完全伸展左侧前爪;2 分:向左侧转圈;3 分:行走时向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,有意识障碍。

1.2.4 脑含水量测定 每组各选取 5 只大鼠,于术后 24 h 断头后,取出脑组织迅速称重(采用干湿重法),置烤箱烤干至恒重,计算脑含水量:脑组织含水量(%)=(湿重 - 干重)/ 湿重 ×100%。

1.2.5 脑梗死体积测定 每组各选取 5 只大鼠,于术后24 h 断头取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干,其余以 2 mm 间隔行连续冠状切片共 6 片,放入 2% TTC 磷酸盐缓冲液中(pH = 7.4),37 ℃水孵育恒温箱内避光孵育 30 min,正常脑组织着深红色,梗死脑组织呈苍白色。将切片扫描入扫描仪中,运行 Image Pro Plus 4.5(IPP)图像处理软件,计算脑梗死体积。

1.2.6 光镜观察 各组大鼠于术后 24 h,经左心室插管灌注固定,先以生理盐水快速冲洗,继之灌以 4% 多聚甲醛,立即取脑于 4 ℃下后固定,常规脱水、石蜡包埋,HE 染色,光镜观察。

1.2.7 免疫组织化学染色 采用 ABC 法进行免疫组织化学反应。具体步骤为:切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡后,置于 3% 过氧化氢中孵育 10 min,封闭内源性过氧化物酶活性,蒸馏水冲洗,0.01 mol/L PBS 浸泡 5 min,抗原热修复后,于正常山羊血清工作液 37 ℃孵育 15 min,倾去血清,加入羊抗 Ngb 多抗血清(工作浓度 1∶1 000),4 ℃中孵育过夜,0.01 mol/L PBS 中漂洗,5 min ×3 次,加入辣根过氧化物酶活性标记的兔抗羊 IgG 工作液,37 ℃孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 中漂洗,5 min ×3 次,DAB 显色液显色 3 ~ 5 min,苏木精复染,盐酸酒精分化,梯度脱水,中性树胶封片后照相分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 数据包进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 MCAO 模型

手术组、Hemin 处理组大鼠均于术后出现右侧 Horners 征,右前爪不能前伸,向左侧转圈或向左侧倾倒。假手术对照组未出现上述神经系统缺损症状。

2.2 脑含水量测定

手术组、Hemin 处理组脑含水量较假手术对照组有显著性差异($P<0.01$),Hemin 处理组较手术组含水量有显著性差异($P<0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠脑含水量和脑梗死体积比较($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	脑含水量(%)	脑梗死体积(cm^3)
假手术对照组	77.45 ± 0.04	0
手术组	79.27 ± 0.76[a]	0.402 ± 0.026
Hemin 处理组	78.11 ± 0.25[ab]	0.316 ± 0.024[b]

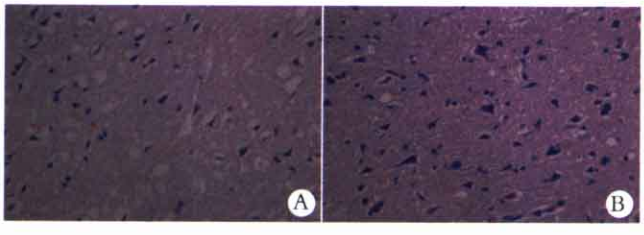
a: $P<0.01$,与假手术组比较; b: $P<0.05$, 与手术组比较

2.3 脑梗死体积测定

手术组、Hemin 处理组大鼠行脑 TTC 染色后,均出现右侧大脑半球皮质、皮质下苍白区,假手术组未见苍白区。利用 IPP 软件计算脑梗死体积,Hemin 处理组较手术组有显著性差异($P<0.05$)(表 1)。

2.4 组织病理学改变

假手术对照组未见组织水肿及神经元变性坏死。手术组、Hemin 处理组大鼠脑梗死灶均位于右侧额叶、顶叶、颞叶、部分枕区及基底节区。手术组:中重度水肿,表现为缺血区淡染,缺血局部可见神经元变性,锥体细胞呈三角形,顶树突延长,细胞周围间隙增大。细胞质均匀呈嗜酸性染色,胞核结构不清,染色加深。白质间隙增大,呈疏松状态。Hemin 处理组:显示出轻度缺血水肿改变,缺血范围减小,染色无明显变淡。虽可见神经元缺血改变,但变性的神经元数量减少,细胞周围间隙增大不明显,白质间隙略增大(图 1)。

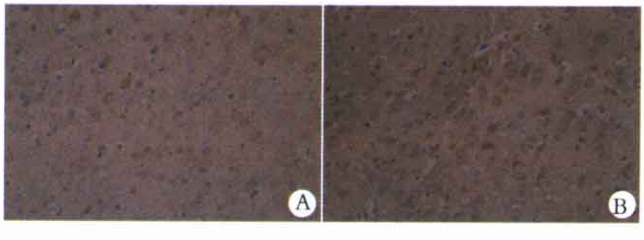


A:手术组; B: Hemin 处理

图 1 手术组、Hemin 处理组顶叶皮层表现 (HE ×400)

2.5 免疫组织化学检测结果

3 组大鼠脑切片免疫组织化学染色显示,Ngb 免疫阳性细胞呈棕色,阳性物质定位于神经元细胞质中,阴性对照片未见着色。其中,手术组、Hemin 处理组缺血区 Ngb 阳性神经元数量较假手术对照组对应区域明显减少,Hemin 处理组缺血区阳性神经元数量较手术组多(图 2)。



A:手术组; B: Hemin 处理

图 2 手术组、Hemin 处理顶叶皮层免疫组织化学检测 (ABC ×400)

3　讨论

Ngb 是德国学者 Burmester 等于 2000 年首次发现的第 3 类携氧球蛋白,因其主要在脑组织中表达,故称“脑红蛋白”。Zhang 等[6]用 RT-PCR 技术率先从大鼠脑组织中扩增出大鼠 Ngb 基因编码区,为进一步研究其结构功能提供了重要资料。原位杂交发现 Ngb mRNA 定位于神经元细胞质中,免疫组织化学技术提示大鼠 Ngb 阳性物质广泛分布于脑中,其在不同脑区分布密度不同,在缺氧耐受性越强的区域其 Ngb 表达越多[1]。目前关于 Ngb 生理功能假说较多,推测它主要是促进氧向神经元中的线粒体扩散,或是作为 NADH 氧化酶促进 ATP 产生,从而对正常神经细胞的功能维持起重要作用[7]。

近年来,动物实验证实,在急性脑缺血缺氧状态下,Ngb mRNA 表达增加,Sun 等[2]发现在培养的海马神经元中,Ngb 的过度表达能使神经元在缺氧状态下存活率增高,他们还以腺病毒相关载体将 Ngb cDNA 转染入急性缺血状态下的大鼠脑神经元中,发现脑梗死体积较对照组缩小约 50%,而利用反义寡核苷酸技术减少 Ngb 表达时,脑梗死体积较对照组增加 60%[3],提示在急性脑缺血缺氧损伤中诱导 Ngb 表达对神经元有重要保护作用。

然而,中枢神经系统基因治疗仍处于实验研究阶段,不但操作繁杂,而且蛋白表达时间较长,对于急性缺血缺氧状态下争取时机治疗是不现实的。因此,寻找一条有效的 Ngb 诱导表达的途径十分必要。

Zhu 等[4]通过实验证实,Hemin 对离体 Ngb 表达呈显著增强作用,且呈浓度和时间依赖性。Hemin 又名正铁血红素、血晶素,长久以来,它是一个被用于贫血治疗的药物,早在 1983 年美国 FDA 就批准其用于临床治疗。近年来,Hemin 在其他各系统中的保护作用逐渐得到重视。Hemin 作为血红素氧合酶(HO)的底物和诱导剂,可诱导 HO-1 表达,促进内源性 CO 产生,抵抗自由基损伤,减少兴奋性氨基酸毒性,在心、脑、肠等器官的缺血缺氧损伤中具有重要保护作用[8-11]。Takizawa 等[12]发现通过直接给药于短暂性前脑缺血大鼠,可以起到神经元保护作用,提高皮质和纹状体的神经元存活数目。

在对 Hemin 诱导 Ngb 表达的研究中,通过 8-溴-环鸟苷 3′,5′环腺苷一磷酸(8-bromo-cyclic3′,5′-monophosphate)来模拟其诱导作用,发现环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate,cGMP)水平可提高 10 倍以上,这种诱导作用可被蛋白激酶 G(PKG)抑制因子 KT5823 减弱,因此推测其诱导作用可能是通过 SGC-PKG 通路介导的,这与缺氧通过丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号转导调节激酶诱导 Ngb 途径有所不同[4],提示通过 Hemin 诱导 Ngb 表达可能与缺氧诱导 Ngb 具有协同作用。我们通过 Hemin 干预 MCAO 模型大鼠,发现大鼠脑含水量、脑梗死体积均有显著性下降,组织病理学观察脑水肿程度减轻,神经元变性坏死数量减少,说明在体注射 Hemin 能减少急性缺血脑组织损伤;免疫组织化学技术提示 Hemin 组大鼠 Ngb 阳性神经元较单纯缺血组大鼠增多,说明 Hemin 能诱导在体 Ngb 表达,所以我们猜想,除了诱导 HO-1 以外,Hemin 还可以通过诱导 Ngb 表达这条途径发挥其脑保护作用,然而,关于其诱导的具体机制过程仍不甚清晰,有待我们的进一步研究。

参考文献:

[1] BURMESTER T, WEICH B, REINHARDT S, *et al*. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. Nature, 2000, 407(6803): 520-523.

[2] SUN Y, JIN K, MAO X O, *et al*. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(26): 15306-15311.

[3] SUN Y, JIN K, PEEL A, *et al*. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6): 3497-3500.

[4] ZHU Y, SUN Y, JIN K, *et al*. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells[J]. Blood, 2002, 100(7): 2494-2498.

[5] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[6] ZHANG C, WANG C, DENG M, *et al*. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(5): 1411-1419.

[7] SOWA A W, DUFF S M G, GUY P A, *et al*. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(17): 10317-10321.

[8] HANGAISHI M, ISHIZAKA N, AIZAWA T, *et al*. Induction of Heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia/reperfusion *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(2): 582-588.

[9] ATTUWAYBI B O, KOZAR R A, MOORE-OLUFEMI S D, *et al*. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2004, 118(1): 53-57.

[10] CHEN K, GUNTER K, MAINES M D. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death[J]. J Neurochem, 2000, 75(1): 304-313.

[11] 符　荣, 赵甲山, 赵洪洋, 等. 内源性一氧化碳对局灶性脑缺血大鼠神经功能、梗死灶体积、脑含水量的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2004, 11(3): 139-142.

[12] 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.

(编辑　张大春)