

胶原酶诱导脑出血大鼠脑内氧化应激反应研究 *

唐 涛^{1,2} 罗团连^{2,3} 张花先² 黎杏群²

摘要 目的:检测含铁血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)蛋白的表达,以研究脑出血后红细胞崩解产物中含铁血红素介导的氧化应激反应。方法:以VII胶原酶诱导脑出血大鼠模型,采用免疫荧光双标技术检测了HO-1表达部位和表达细胞种类,用Western blot检测该蛋白的表达时程变化。结果:HO-1主要表达在模型组动物患侧基底节,假手术组动物未见明显阳性细胞;阳性细胞主要为小胶质细胞;Western blot显示:HO-1在脑出血后12h即有表达,2d达高峰,而后逐渐减弱。结论:VII胶原酶诱导脑出血大鼠模型脑内有强烈的含铁血红素介导的氧化应激反应,这可能为干预该反应提供了依据。

关键词 氧化应激;含铁血红素氧合酶-1;脑出血;大鼠;胶原酶

中图分类号:R743,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-01-0015-03

Oxidative stress in rat brains of collagenase-induced intracerebral hemorrhage/TANG Tao, LUO Tuanlian, ZHANG Huaxian, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(1):15—17

Abstract Objective:To assay expression of heme oxygenase-1 (HO-1) protein to investigate heme-mediated oxidative stress following intracerebral hemorrhage (ICH).**Method:**Collagenase VII induced ICH rat. The fluorescent double label was used to observe the site and cell sort of HO-1 positive cells, and western blot was employed to study the protein expression along the time course.**Result:**HO-1 mostly expressed in microglia at basal ganglion of ICH animals, while scarcely of sham animals; Western blot showed that HO-1 expression upregulated at 12h after the onset, peaking at 2d, then lowered gradually.**Conclusion:**There is intensive oxidative stress mediated by heme in collagenase VII induced-ICH rat brain, which may provide some evidence for affecting the reaction.

Author's address Institute of Neurology Research, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410008

Key words oxidative stress; heme oxygenase-1; intracerebral hemorrhage; rat; collagenase

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是脑血管病中的危重类型,亚洲人群中该病占脑卒中的比例远高于欧美人群,在中国南方某些社区的数据更是接近50%^[1]。此病在急性期的死亡率和后期的致残率都高于缺血性卒中,因此许多学者都很关注脑出血病程中的病理生理机制。

近年研究表明,脑出血后损伤组织的氧化应激(oxidative stress)反应在脑水肿的发生和神经元损伤过程中起重要作用,而且这种反应贯穿整个病程,与患者急性期的存活和后期的康复效果关系密切^[2-3];但是有证据表明应用氧自由基清除剂不足以防止脑水肿和细胞凋亡的发生^[4-5]。自由基产生的Fenton反应需要铁作为催化剂,出血后大量红细胞进入脑组织,细胞破坏释出血红蛋白,后者结构中的含铁血红素(heme),将成为铁的重要来源;含铁血红素氧合酶(heme oxygenase,HO)系统是含铁血红素主要的处理途径,对于维持组织内环境的稳态意义重要,其中HO-1将在各种应激反应时表达增高,含铁血红素就是主要激动剂,其表达与含铁血红素介导的氧化应激水平密切相关,因此HO-1已被认为是评价组

织氧化应激状态的新指标^[6-7]。本研究将检测HO-1蛋白表达的变化,以观察在VII胶原酶诱导脑出血大鼠脑内的氧化应激的动态变化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

健康雄性清洁级Sprague-Dwley大鼠60只,重250—300g,中南大学动物学部提供;VII型胶原酶(collagenase VII)、HO-1兔抗鼠多克隆抗体系Sigma公司产品;罗丹明标记的马抗小鼠二抗、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔二抗系进口分装产品,购自中山生物工程有限公司;OX42单克隆抗体系Secrotec公司产品;化学发光试剂盒系KPL公司产品;丙烯酰胺等电泳试剂及

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(39800189)

1 中南大学湘雅医院神经病学研究所,长沙,410008

2 中南大学湘雅医院中西医结合研究所

3 通讯作者:罗团连(中南大学湘雅医院中西医结合研究所,长沙,410008)

作者简介:唐涛,男,博士,主治医师

收稿日期:2005-08-27

设备系 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 脑出血模型:根据《大鼠脑立体定位图谱》定位^[8],选择前囟后 1.40mm,矢状缝向右 3.20mm,深 5.60mm 为注射点,位于近内囊的苍白球内。水合氯醛 $400\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 经腹腔麻醉大鼠,俯卧固定于鼠脑定位仪(STOELTING TL-2 型,美国产),经注射点注入 $2\mu\text{l}$ 含 0.4U VII型胶原酶的生理盐水溶液。假手术大鼠注入 $2\mu\text{l}$ 生理盐水。

1.2.2 动物分组与组织取材:60 只动物随机分成假手术组、模型组 2 组,各组分别为 20 只和 40 只;分别于术后 12h、24h、2d、4d、7d 随机抽取各组大鼠,其中假手术组、模型组各时间点随机抽取 3 只做免疫荧光双标组化,其余断头处死取脑(假手术组动物另 5 只于术后 2d 处死), -70°C 冻存。免疫组化取材:用水合氯醛深度麻醉,4%多聚甲醛常规灌注固定,经梯度 10%—20%—30%蔗糖溶液 (0.1M PB pH7.4) 至组织沉底。恒冷切片机做 $40\mu\text{m}$ 连续冠状切片,于血肿区随机每隔 6 片取一张切片,贴于明胶化玻片,室温下阴干, 4°C 保存。

1.2.3 免疫荧光双标组化:切片复温后, 0.01M PBS pH7.4 漂洗 $5\text{min}\times 3$,5%牛血清白蛋白封闭 30min,滴加 HO-1 兔抗鼠多克隆抗体(1:50)和 OX42 单克隆抗体 (1:200) 过夜,PBS 漂洗 $5\text{min}\times 3$,滴加 1:50 FITC 标记的山羊抗兔二抗、1:50 罗丹明标记的马抗小鼠二抗, 37°C 漂洗 1h,PBS 漂洗 $5\text{min}\times 3$,甘油明胶封固,用 Olympus BX 50 荧光显微镜分别在 490nm,580nm 波长及相应的滤色镜观察,FITC 呈绿色荧光,罗丹明呈红色荧光,FISH 软件摄取图像,将两个激发光下获得的图像叠加获得黄色信号为共表达信号。

1.2.4 蛋白质印迹法和光密度扫描:根据形态学结果,选取 HO-1 主要表达的基底节区,取组织匀浆后,根据紫外分光光度计结果,取 $100\mu\text{g}$ 总蛋白质,在 12.5% SDS-PAGE 胶电泳后,转膜,余按化学发光试剂盒说明完成(HO-1 浓度 1:50)。结果用 Qan-

tiscan 软件分析,获得光密度值。

1.3 统计学分析

各组数据均以均数±标准差表示,SPSS10.0 做统计分析,同组不同时间点均数比较采用方差分析。用 Excel 97 做统计图形。

2 结果

2.1 免疫荧光双标组化结果

脑出血大鼠脑内 HO-1 阳性细胞主要分布于血肿周围的基底节区,12h 时于脑实质针道行程可见个别阳性细胞;假手术组除针道外未见阳性细胞;阳性细胞围绕血肿,勾勒出其大致轮廓;HO-1 阳性信号呈绿色荧光(图 1A),主要在胞浆,胞核浅染,阳性细胞以形态多样,胞体小,有多个短突触的细胞为主,小胶质细胞表面标志 OX42 阳性信号呈红色荧光(图 1B),HO-1/OX42 双标结果,提示 HO-1 阳性细胞主要是反应性小胶质细胞(图 1C)。

2.2 HO-1 蛋白质半定量分析结果

根据形态学结果,由于假手术组动物未见明显阳性细胞,所以仅研究了模型组动物的 HO-1 蛋白表达情况。取鼠脑患侧血肿周围基底节区组织做检测,发现:脑出血后基底节组织 HO-1 阳性信号出现在 32kd 处,12h 可检测到较弱的信号,1d 时明显增强($P<0.05$),2d 达峰值($P<0.01$),4d,7d 信号逐渐减弱(图 2)。

3 讨论

HO 是 20 世纪 70 年代确认的一个微体蛋白家族。目前研究发现该家族包括三种同功酶:诱导型 HO-1(heat shock protein 32Hsp32,EC1.14.99.3),结构型 HO-2,以及新近发现的 HO-3,前两种由于发现较早,生物学功能研究较多,而 HO-3 则根据其蛋白结构中含有含铁血红素调控片段 (heme regulatory motif),推测它有含铁血红素依赖性调控作用^[9]。它们的主要功能就是作为含铁血红素代谢的限速酶,打断其结构中的四吡咯环结构,而使之转化为一氧化

A HO-1 阳性信号呈绿色荧光

B 小胶质细胞表面标志 OX42 阳性信号

呈红色荧光

C HO-1/OX42 双标结果,提示 HO-1 阳

性细胞主要是反应性小胶质细胞

图 1 免疫荧光双标组化显示的脑出血大鼠脑内 HO-1 阳性细胞(比例尺为 $50\mu\text{m}$)

动环节,寻找可上调其表达或与之功能类似的药物仍属必要,而且是有前途的。

参考文献

图2 HO-1 蛋白质半定量分析结果
①与前一时间点结果比较 $P<0.01$; ②与前一时间点结果比较 $P<0.05$ 。HO-1 阳性信号在 32kd 处,Sham-假手术组,1,2,3,4,5 泳道分别为代表模型组 12h,24h,2d,4d,7d

碳和胆绿素,直接效应在于使细胞免于 heme 分子作为过氧脂质化和氧自由基产生促进剂而带来的有害效应^[6]。生理条件下,HO 家族的这种功能主要由 HO-2 完成,清除因细胞衰老等原因产生的 heme,其表达水平是稳定的,它的水平仅受糖皮质激素调控,目前认为 Alzheimer's Disease 等衰老相关疾病与 HO-2 活性下降有关^[10];通常 HO-1 在体内的水平很低,这与本实验中假手术组动物没有明显阳性细胞的结果一致,但在许多病理条件下,特别是 heme 在组织大量产生时,HO-1 表达明显增高,在脑缺血和蛛网膜下隙出血中都出现这种现象^[11]。

本研究结果显示,以Ⅶ胶原酶诱导脑出血大鼠模型,HO-1 主要由小胶质细胞表达,小胶质细胞是脑内特有的巨噬细胞,这可能与这种细胞清除坏死组织的功能有关;患侧 HO-1 蛋白表达检测结果显示,出血后 12h 到 2d 蛋白表达逐渐增强,2d 达峰值,4d,7d 信号逐渐减弱,呈这样一个趋势可能由于 12h 到 2d 期间,进入脑实质的红细胞逐渐破坏,heme 的堆积对 HO-1 表达刺激作用不断增强,到 2d 时神经元受损和一氧化氮合酶等含 heme 的蛋白增多,NF-κB 等转录因子表达增高,都促使 HO-1 水平达到高峰,后期的下降则与 heme 大量降解有关^[6,12-15]。

我们通过检测 HO-1 的表达情况,观察了脑出血病程中氧化应激反应的特点,这可能将为药物干预的时间窗选择提供了线索;但是,虽然理论上脑出血后 HO-1 表达的反应性增高在一定程度上可减轻氧化应激的损伤,结合相关证据,却表明 HO-1 的自发调节不足以保护神经元和血脑屏障,脑水肿仍然严重^[2,4,16],所以考虑到 HO-1 作用在氧化应激的启

- [1] 杨期东,周艳红,刘运海,等.长沙社区人群脑卒中患者发病的监测研究[J].中华医学杂志,2003,83(4):302—305.
- [2] Nakamura T,Keep RF,Hua Y,et al. Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage [J]. Brain Res, 2005,1039(1): 30—36.
- [3] Alexandrova ML,Bochev PG. Oxidative stress during the chronic phase after stroke [J]. Free Rad Biol Med,2005,39(3): 297—316.
- [4] Peeling J,Yan HJ, Chen SG,et al. Protective effects of free radical inhibitors in intracerebral hemorrhage in rat [J]. Brain Res,1998,795(1): 63—70.
- [5] Peeling J,Del Bigio MR,Corbett D,et al. Efficacy of disodium 4 -[(tert - butylimino)methyl]benzene -1,3 -disulfonate N -oxide (NXY-059), a free radical trapping agent, in a rat model of hemorrhagic stroke[J]. Neuropharmacol,2001,40(3):433—439.
- [6] Kumar S,Bandyopadhyay U.Free heme toxicity and its detoxification systems in human [J]. Toxicol Letter,2005,157(1): 175—188.
- [7] Bertrand DMN,Prigent -Tessie A,Stanimirovic A,et al. Differential MnSOD and HO -1 expression in cerebral endothelial cells in response to sublethal oxidative stress [J]. Brain Res,2004,103(1-2): 151—158.
- [8] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].第1版.北京:人民卫生出版社,1991.56—58.
- [9] Scapagnini G,D'Agata V,Calabrese V,et al. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain [J]. Brain Res, 2002,954(1):51—59.
- [10] DOR' E S. Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: Implication in ischemia and in Alzheimer's Disease[J]. Free Rad Biol Med,2002,32(12): 1276—1282.
- [11] Regan RF , Guo Y, Kumar N. Heme oxygenase-1 induction protects murine cortical astrocytes from hemoglobin toxicity[J]. Neurosci Lett, 2000, 282(1):1—4.
- [12] 罗团连,黎杏群,脑溢安对出血性中风大鼠脑损伤保护作用[J].湖南医科大学学报,2000,25(3):245—247.
- [13] Litvinov DY,Prasolov VS,Bouton S,et al. Influence of antioxidants on NO-dependent induction of heme oxygenase-1 in U937 monocytes[J]. Mol Biol, 2005,39(1): 77—83.
- [14] Immenschuh S,Ramadori G. Gene regulation of heme oxygenase -1 as a therapeutic target [J]. Bioch Pharmacol, 2000,60(8):1121—1128.
- [15] Hickenbottom SL,Grotta JC,Strong R,et al. Neuclear factor- κB and cell death after experimental intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke,1999,30(11): 2473—2477.
- [16] Qureshi AI , Ling GS , Khan J , et al . Quantitative analysis of injured, necrotic ,and apoptotic cells in a new experimental model of intracerebral hemorrhage [J]. Crit Care Med,2001,29(1):152—157.