

· 论 著 ·

血红素氧合酶-1 对大鼠脑外伤后细胞凋亡的影响

刘中洪,冯家龙,蒋涛,冉春雷

(武警重庆市总队医院神经外科,重庆 400061)

摘要:目的 探讨血红素氧合酶-1(HO-1)对大鼠颅脑外伤后细胞凋亡的作用。方法 72 只成年雄性 SD 大鼠,随机分为血晶素组、生理盐水组和锌原卟啉组。采用液压冲击伤复制颅脑外伤的动物模型,伤后予以 45 mg/100 mg 体质量腹腔注射诱导剂血晶素、抑制剂锌原卟啉、生理盐水干预 HO-1 的表达。SP 免疫组织化学法测定 HO-1 和抗凋亡蛋白(Bcl-2)的表达以及 TUNEL 法检测凋亡细胞。结果 血晶素组 HO-1 表达较生理盐水组和锌原卟啉组显著增加($P < 0.01$)。血晶素组 Bcl-2 表达较生理盐水组和锌原卟啉组显著增加($P < 0.01$)。同时,血晶素组凋亡指数较生理盐水组和锌原卟啉组显著降低($P < 0.01$)。结论 HO-1 在颅脑外伤中的表达,具有上调 Bcl-2 的表达,抗细胞凋亡的作用。

关键词:血红素加氧酶-1;脑损伤;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)30-3132-02

Effect of heme oxygenase-1 in the central nervous system after brain trauma

Liu Zhonghong, Feng Jialong, Jiang Tao, Ran Chunlei

(Department of Neurosurgery, Chongqing Corps Hospital of Chinese Peoples Armed Police Forces, Chongqing 400061, China)

Abstract: Objective To explore the roles of heme oxygenase-1(HO-1) on apoptosis in the central nerve cells after Brain Trauma. **Methods** 72 adult Sprague Dawley male rats were divided in three groups: brain trauma+hemin group, brain trauma + saline group and brain trauma+ zinc protoporphyrin group. The rat craniocerebral traumatic model was imitated by the device of hydraulic pressure percussion. To interfere in the expression of HO-1, hemin, zinc protoporphyrin and saline(45 mg/100 mg) were injected into every traumatic rat abdominal cavity respectively after craniocerebral trauma. Every rat was detect Apoptotic index and the expression of heme HO-1 and Bcl-2 by SP immunohistochemistry. **Results** Expression of HO-1 in hemin group remarkably increased compared with salinegroup rats and zinc protoporphyrin group rats($P < 0.01$), Expression of Bcl-2 in hemin group remarkably increased compared with salinegroup rats and zinc protoporphyrin group rats($P < 0.01$). Apoptotic index of nerve cells in hemin group rats remarkably decreased compared with salinerats and zinc protoporphyrin group. **Conclusion** The expression of HO-1 after brain trauma can up-regulation expression of Bcl-2 and play antiapoptotic role.

Key words: heme oxygenase-1; brain injuries; apoptosis

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)对神经细胞的损伤分原发性和继发性两种,细胞凋亡是继发性损伤的一种重要细胞死亡方式,它是由一系列基因控制的迟发性神经元死亡,对继发性脑损伤起着重要的作用,并直接影响 TBI 的预后。血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是血红素代谢的一个关键酶及限速酶,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡及神经保护作用。为深入研究 HO-1 对脑外伤后脑组织的保护作用,本实验观察大鼠脑外伤 HO-1 对神经细胞凋亡是否有抑制作用,以期临床颅脑外伤开辟新的治疗途径。

1 材料与方

1.1 材料 血晶素(hemin)、锌原卟啉(ZnPP)购自 Sigma 公司,牙托粉、牙托水、多聚甲醛等常规试剂购自重庆试剂公司,兔抗 HO-1(1 抗)、抗凋亡蛋白(Bcl-2)(1 抗)、ABC 试剂盒均购自南京博士德生物公司。TUNEL 法凋亡检测试剂盒购于 Boehringer 公司,液压伤模型采用 Dixon 装置。

1.2 方法

1.2.1 复制动物模型及取材 实验动物及分组:72 只雄性 SD 大鼠购自第三军医大学实验动物中心,体质量 280~300 g,采用随机数字表完全随机分为血晶素组、生理盐水组和锌原卟啉组各 24 只,然后再将每组动物又随机分为灌注组和非灌注组。采用液压伤复制脑外伤动物模型,动物致伤后按 45 mg/100 mg 体质量腹腔注射血晶素,生理盐水和锌原卟啉按同样

量注射。伤后每天注射 1 次,喂养 72 h 后处死。切取以损伤灶为中心前后 5 mm 的大脑冠状切面,固定 24 h 后,做冰冻切片行 SP 免疫组织化学及 TUNEL 染色。

1.2.2 脑组织免疫组织化学检测 HO-1 和 Bcl-2 的表达 灌注组取标本前进行脑灌注固定,断头取脑组织,继续在 4%多聚甲醛中固定 6 h 以上。然后在 30%的蔗糖多聚甲醛液里脱水。作冰冻切片进行免疫组织化学观察 HO-1 和 Bcl-2 的表达情况,具体操作按试剂盒说明进行。每只动物观察受伤周围 5 个视野,计数阳性细胞,然后求平均值,作为每个动物的 HO-1 和 Bcl-2 阳性细胞数。

1.2.3 神经细胞凋亡检测 按照 TUNEL 凋亡细胞检测试剂盒说明书操作。细胞核中有绿色荧光者为阳性细胞,即凋亡细胞,每组选 5 张切片,每张切片在脑损伤侧皮层计数 5 个不重叠视野,计数 100 个神经细胞中的凋亡细胞,取平均值,为该切片凋亡指数。

1.3 统计学处理 所有试验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用 SPSS15.0 软件进行处理分析,对不同处理因素及不同时间因素进行方差分析,组间比较采用 Dunnet 法进行。

2 结 果

2.1 HO-1、Bcl-2 的表达和凋亡指数的比较 见表 1。

2.2 HO-1 的表达 通过计数相同视野、相同部位的血红素氧合酶阳性细胞数,结果发现,诱导剂血晶素组血红素氧合酶

阳性细胞数较生理盐水组及锌原卟啉组显著增加($P<0.01$)。抑制剂锌原卟啉组血红素氧合酶阳性细胞数较生理盐水组显著减少,提示对血红素氧合酶表达的干预比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 HO-1、Bcl-2 的表达和凋亡指数的比较($\bar{x}\pm s, n=24$)

组别	HO-1 的表达	Bcl-2 的表达	凋亡指数
生理盐水组	100.60±12.32	30.2±7.3	22.3±2.7
血晶素组	125.50±14.39	64.9±10.1	7.9±1.8
锌原卟啉组	95.38±13.66	12.1±1.3	39.2±5.3

2.3 Bcl-2 的表达 通过计数相同视野、相同部位的 Bcl-2 阳性细胞数,结果发现,诱导剂血晶素组 Bcl-2 阳性细胞数较生理盐水组及锌原卟啉组显著增加($P<0.01$)。抑制剂锌原卟啉组 Bcl-2 阳性细胞数较生理盐水组显著减少,提示对血红素氧合酶表达的干预后,Bcl-2 的表达水平比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 细胞凋亡的检测结果 TUNEL 染色见细胞核呈绿色荧光颗粒即凋亡细胞,伤侧大脑皮质即可见凋亡细胞,分布于损伤区及周缘。HO-1 诱导组细胞凋亡较生理盐水组及锌原卟啉组显著减少,而 HO-1 抑制组细胞凋亡较生理盐水组则显著增多,提示对血红素氧合酶表达的干预后,神经细胞的凋亡比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

脑外伤包括一系列病理生理过程,主要是机械损伤、脑水肿、脑缺血、出血等^[1],从而伴随血红蛋白分解和亚铁血红素释放到脑组织细胞外^[2]。颅脑创伤所致的神经细胞损伤主要有 3 种形式:(1)原发性损伤(物理性的打击)所致的神经细胞直接死亡;(2)伤后出血、压迫、缺血缺氧等继发性损伤因素所引起的神经细胞坏死;(3)炎性介质、细胞因子、兴奋性递质、Ca²⁺ 超载、氧自由基等因素所诱发的神经细胞凋亡。自 1995 年美国学者 Rink 首先证明颅脑创伤后神经细胞存在凋亡现象以来,越来越多的证据表明凋亡在颅脑创伤所引起的神经细胞损伤中起着重要的作用,并对其机制进行了深入的研究。急性颅脑外伤后神经细胞常发生迟发性损伤,主要表现为神经细胞凋亡。夏磊等^[3]发现脑外伤后 1 h 即可出现神经细胞凋亡。细胞凋亡过程受到严格的基因调控。Bcl-2 基因是目前公认的内源性抗凋亡因子^[4],它对维持颅脑损伤后神经细胞的生存具有重要作用,并且不同的干预和刺激可上调 Bcl-2 mRNA 在中枢神经系统的表达及其蛋白合成,抑制神经细胞凋亡,促进轴突再生,从而提高神经细胞的存活能力。其机制可能通过抑制 Bax 的促凋亡作用、维持细胞钙稳定、抑制细胞色素 C 进入细胞质等,最终抑制凋亡蛋白酶(caspase)激活所介导的细胞凋亡。研究表明,Bcl-2 的表达能抑制多种因素诱导的细胞凋亡,抑制 Bcl-2 的表达具有促进凋亡的作用^[5-6]。HO-1 作为亚铁血红素代谢的关键酶,HO-1 在细胞抗氧化应激损伤方面起重要调节作用^[7-8]。研究表明 HO-1 不仅能催化血红素生成一氧化碳、铁、胆红素,还具有多种生物活性:抗炎、抗氧化、抗凋亡、调节微循环的作用^[9-11]。同时,HO-1 的抗凋亡作用也逐渐成为研究的热点^[12-14]。Botros 等^[12]、Imuta 等^[13]研究发现 HO-1 可以降低 caspase 的活性、促进 Bcl-2 的表达,从而抑制细胞凋亡。Parfenova 等^[15]研究也发现,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凋亡中起重要作用。

本课题组采用通过干预 HO-1 的表达,检测细胞凋亡指数

和 Bcl-2 表达,观察 HO-1 能否对抗脑外伤后神经细胞凋亡。实验结果提示,脑外伤后 HO-1、Bcl-2 表达,可以检测大量凋亡细胞。可以发现不同因素的干预 HO-1 的表达,Bcl-2 表达的表达水平随之出现变化,同时改变脑组织凋亡指数,HO-1 的表达越高,Bcl-2 的表达也越高,大鼠的凋亡指数越低,反之亦然。由此可以推测,外伤后 HO-1 可能促进 Bcl-2 表达,从而抑制神经细胞的凋亡,发挥对神经系统的保护作用。同时,在颅脑外伤后,它还可能通过减轻脑水肿、降低脑组织自由基的产生,发挥抗炎、抗氧化、抗凋亡、调节微循环的作用,从而减少神经细胞凋亡,保护血脑屏障,改善神经行为,最终改善脑损伤的预后。因此,在将来的颅脑外伤治疗中,可以通过改变血红素氧合酶的表达,从而改变颅脑外伤的预后,这将可能为颅脑外伤的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Chang EF, Claus CP, Vreman HJ, et al. Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and developing brain[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(11): 1401-1417.
- [2] Wagner KR, Sharp FR, Ardizzone TD, et al. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(4): 629-633.
- [3] 夏磊,姜正林,王国华,等. 人参皂苷对大鼠脑外伤后神经细胞凋亡的影响[J]. *中华神经医学杂志*, 2010, 9(9): 888-892.
- [4] Tsujimoto Y. Cell death: regulation by the Bcl-2 protein family[J]. *Psychogeriatrics*, 2006, 6(1): 64-70.
- [5] 陈江利,刘伟国,方乃成,等. 大鼠脑外伤后神经细胞凋亡与 Bcl-2 蛋白的关系[J]. *浙江创伤外科*, 2006, 11(5): 377-379.
- [6] Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanism, physiological roles, and therapeutic opportunities[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1378-1386.
- [7] Liu X, Wei J, Peng DH, et al. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice[J]. *Diabetes*, 2005, 54(5): 778-784.
- [8] Takahashi T, Morita K, Akagi R, et al. Protective role of heme oxygenase-1 in renal ischemia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(6): 867-877.
- [9] Aequaviva R, Campisi A, Raetti G, et al. Propofol inhibits Caspase-3 in astroglial cells; role of heme oxygenase-1[J]. *Curt Neurovasc Res*, 2005, 2(2): 141-148.
- [10] Volti GL, Sacerdoti D, Sangras B, et al. Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(6): 704-711.
- [11] Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular system[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39(1): 1-8.
- [12] Botros FT, Olszanecki R, Prietocarrasquero MC, et al. Induction of heme oxygenase-1 in renovascular hypertension is associated with inhibition of apoptosis[J]. *Cell Mol Biol(Noisy-le-grand)*, 2007, 53(1): 51-60.
- [13] Imuta N, Hori O, Kitao Y, et al. Hypoxia- (下转第 3137 页)

了这一病理机制^[14]。

本研究检测的是金黄色葡萄球菌肠毒素基因,而非肠毒素蛋白本身。基因在翻译、表达为蛋白质的过程中会受到机体内环境及外界多种因素的影响,也就是说,虽然在本实验的菌株中检测到某种肠毒素基因的存在,但在复杂的鼻腔微环境中由于受到多种因素的调控,并不是金黄色葡萄球菌所携带的每个肠毒素基因都会表达为具有功能的毒素蛋白。最后这些基因是否会转录、翻译成肠毒素蛋白质,而且表达的量是多少,目前,蛋白质组学方法的灵敏度还不能够完整、准确地检测出。因此,对慢性鼻-鼻窦炎(伴和不伴鼻息肉)中实际表达存在的金黄色葡萄球菌肠毒素蛋白质谱的分析将更有意义,这也是作者今后的探索和挑战^[15],而且随着金黄色葡萄球菌在宿主免疫系统及局部微环境作用下产生的各种基因突变,更多新的肠毒素基因也有待去发现^[16]。

参考文献:

- [1] Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007 [J]. Rhinol Suppl, 2007, 20(1):132-136.
- [2] 董震. 慢性鼻及鼻窦炎的病理本质及对策 [J]. 中国医学文摘耳鼻咽喉科学, 2006, 21(3):137-140.
- [3] Ferry T, Thomas D, Genestier AL, et al. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock [J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(6):771-775.
- [4] Conley DB, Tripathi A, Seiberling KA, et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis II: analysis of T-cell receptor V beta domains in nasal polyps [J]. Amer J Rhinol, 2006, 20(4):451-453.
- [5] Bachert C, Van Zele T, Gevaert P, et al. Superantigens and nasal polyps [J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2003, 3(6):523-531.
- [6] 樊韵平, 许庚, 左可军, 等. 鼻息肉组织中抗金黄色葡萄球菌肠毒素 IgE 的检测及超抗原学说分析 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 41(11):825-829.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS

document M1002S15 [S]. Wayne Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005, 25 (1): 165-167.

- [8] Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, et al. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection [J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(3): 381-385.
- [9] 赵建, 丁水军, 陆扁, 等. 48 株金黄色葡萄球菌的肠毒素分布及其耐药性研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(7): 841-842.
- [10] Stenz L, Francois P, Fischer A, et al. Impact of oleic acid (cis-9-octadecenoic acid) on bacterial viability and biofilm production in *Staphylococcus aureus* [J]. Fems Microbiol Lett, 2008, 287(2):149-155.
- [11] Van Zele T, Vanechoutte M, Holtappels G, et al. Detection of enterotoxin DNA in *Staphylococcus aureus* strains obtained from the middle meatus in controls and nasal polyp patients [J]. Amer J Rhinol, 2008, 22(3):223-227.
- [12] Clement S, Vaudaux P, Francois P, et al. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis [J]. J Infect Dis, 2005, 192(6):1023-1028.
- [13] Min YG, Oh SJ, Won TB, et al. Effects of staphylococcal enterotoxin on ciliary activity and histology of the sinus mucosa [J]. Acta Otolaryngol, 2006, 126(9):941-947.
- [14] Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps [J]. Laryngoscope, 2005, 115(9):1580-1585.
- [15] Kos MI, Stenz L, Francois P, et al. Immuno-detection of *Staphylococcus aureus* biofilm on a cochlear implant [J]. Infection, 2009, 37(5):450-454.
- [16] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Lancet, 2001, 357(11):1225-1228.

(收稿日期:2012-04-03 修回日期:2012-05-21)

(上接第 3133 页)

mediated induction of heme oxygenase type I and carbon monoxide release from astrocytes protects nearby cerebral neurons from hypoxia-mediated apoptosis [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(5):543-552.

- [14] Choi BM, Lim DW, Lee JA, et al. Luteolin suppresses cis-platin induced apoptosis in auditory cells: possible mediation through induction of heme oxygenase-1 expression

[J]. J Med Food, 2008, 11(2):230-236.

- [15] 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):1399-1410.

(收稿日期:2012-04-09 修回日期:2012-05-21)