

钴 - 原卟啉对大鼠脑损伤区域血红素氧合酶 -1 及损伤周边区脑含水量的影响

张志峰¹ 刘绍明^{2△} 修彬华² 田 刚² 张德峰²

(1 石河子大学医学院 新疆 石河子 832002 2 兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 研究探讨钴 - 原卟啉对大鼠脑损伤的保护作用。方法 用钴 - 原卟啉灌(50mg/kg)胃处理后,建立液压脑损伤模型,采用免疫组织化学 SP 三步法检测大鼠脑损伤区域血红素氧合酶 -1 (HO-1) 的表达情况,用干湿重法测定损伤周边区脑含水量的变化。结果 正常组、假手术组大鼠 HO-1 均无表达。模型组脑损伤区域的 HO-1 阳性细胞数为 (3.45 ± 0.47) 。实验组 12h、24h、3d 和 7d HO-1 的阳性细胞数分别为 (10.9 ± 1.35) 、 (10.62 ± 1.88) 、 (12.4 ± 1.57) 和 (10.99 ± 2.42) 。正常组、假手术组脑损伤周边区脑含水量分别为 $(78.7 \pm 0.4)\%$ 和 $(78.6 \pm 0.7)\%$ ；模型组脑含水量 $(89.3 \pm 0.3)\%$ ；实验组 12h、24h、3d 和 7d 脑含水量分别为 $(83.1 \pm 0.3)\%$ 、 $(83.6 \pm 0.6)\%$ 、 $(83.9 \pm 0.4)\%$ 和 $(83.2 \pm 0.3)\%$ 。结论 钴 - 原卟啉 (CoPP) 能够诱导大鼠脑损伤区域 HO-1 的表达,减轻脑损伤周边区域的水肿程度,故钴 - 原卟啉对大鼠脑损伤具有保护作用。

关键词 脑损伤 血红素氧合酶 -1 钴 - 原卟啉 脑含水量

中图分类号 Q95-33, R651.1+5 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)23-4429-04

An Effect of Cobalt Protoporphyrin on Heme Oxygenase-1 of Brain Injuries Zone and Brain Contents of Injury Ambitus Zone in Rats

ZHANG Zhi-feng¹, LIU Shao-ming^{2△}, XIU Bin-hua², TIAN Gang², ZHANG De-feng²

(1 Medical college of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832002;

2 Department of Neurosurgery, Urumqi General Hospital, Lanzhou Command, PLA, Urumqi, Xinjiang, 830000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of cobalt protoporphyrin on brain injuries in Rats. **Methods:** We built hydraulic brain injuries model after intragastric administration of 50 mg/kg cobalt protoporphyrin. We checked out expression of heme oxygenase-1 of brain injuries zone in Rats with immunohistochemistry SP three-step method, and detected changes of brain water content of brain injury ambitus zone with dry-wet weight regulation. **Results:** Normal group and sham operation group had no expression of HO-1. HO-1 positive cell count was (3.45 ± 0.47) in model group, and (10.9 ± 1.35) , (10.62 ± 1.88) , (12.4 ± 1.57) and (10.99 ± 2.42) at 12 h, 24 h, 3 d and 7 d in experimental group respectively. Brain water content were respectively $(78.7 \pm 0.4)\%$ and $(78.6 \pm 0.7)\%$ in normal group and sham operation group, and was $(89.3 \pm 0.3)\%$ in model group, and respectively $(83.1 \pm 0.3)\%$, $(83.6 \pm 0.6)\%$, $(83.9 \pm 0.4)\%$ and $(83.2 \pm 0.3)\%$ in experimental group at 12 h, 24 h, 3 d and 7 d. **Conclusions:** Cobalt protoporphyrin can induce the expression of HO-1 of brain injuries zone in rats, and alleviate brain edema of injury ambitus zone. Thus, cobalt protoporphyrin plays a protective role in hydraulic brain injuries in rats.

Key words: Brain injuries; Heme oxygenase-1; Cobalt protoporphyrin; Brain water content

Chinese Library Classification (CLC): Q95-33 R651.1+5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 23-4429-04

前言

目前对脑损伤的非手术治疗措施主要包括甘露醇等药物控制颅内压、亚低温和高压氧治疗,但这些都不能完全满足外伤非手术治疗的需要。脑损伤后继发脑出血进一步加重了脑水肿等损伤,增加了病人的死亡率和致残率。研究表明,红细胞对继发性脑水肿的形成起着决定性的作用^[1,2]。体外研究发现,将

神经元暴露于血红蛋白可造成神经元死亡,从而证实了血红蛋白对神经元的毒性作用^[3]。血红素氧合酶 -1 (HO-1) 催化血红素生成胆绿素、铁和 CO。HO-1 被各种物理因素和化学因素所诱导。在许多组织,钴 - 原卟啉就是一种强有力的 HO-1 诱导剂^[4,5]。本实验应用液压损伤装置造成 SD 大鼠脑损伤模型,通过免疫组织化学方法测定损伤部位 HO-1 的表达,同时测定了损伤周边区域脑含水量的情况,研究了钴 - 原卟啉对 HO-1 的诱导作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及试剂

健康雄性 SD 大鼠 42 只,体重 300~350g,参照统计学随机

作者简介 张志峰(1983-),男,硕士研究生,研究方向:脑损伤及脑保护。Tel:15276821273, E-mail:zzfmqh@163.com

△通讯作者 刘绍明,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:脑损伤及脑保护研究。Tel:13809947663, E-mail:sa-rstone@yahoo.com
(收稿日期 2012-02-23 接受日期 2012-03-20)

数字表将大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和实验组。正常组 (n=6) 正常喂养,不做处理;假手术组 (n=6) 头部钻孔,但不予以液压打击;模型组 (n=6) 头部打孔,给予液压打击,造成脑损伤模型;实验组 (n=24): 实验组又随机分为 12h、24h、3d、7d 四个亚组,每亚组 SD 大鼠 6 只。实验组用液压装置造成脑损伤模型前,用钴 - 原卟啉连续灌胃 5 天,每天早晚各一次,每只每次 50mg/kg 体重。大鼠由乌鲁木齐疾病控制中心提供。钴 - 原卟啉购于美国 Sigma 公司,HO-1 试剂盒、PBS 缓冲液、DAB 显色剂均购自于北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠脑损伤模型的建立 将实验大鼠称重后,以 2% 的戊巴比妥钠 (40mg/kg 体重) 经腹腔注射麻醉,待大鼠失去自动活动能力后将大鼠俯卧位头部固定于立体定位仪上。剪去头顶顶部皮毛,碘伏酒精消毒皮肤,于正中中线切开头皮约 4 cm,分离皮下肌肉组织及骨膜,暴露冠状缝和人字缝及其间的顶骨。用立体定位仪在左侧顶部矢状缝旁 3.5 mm,冠状缝后 4.0 mm 处标记定位,在手术显微镜下,用颅骨电钻行颅骨钻孔,磨出一直径约 5mm 的圆形骨窗,并保持硬脑膜完整 (如图 1 所示)。将圆形骨孔与液压损伤装置相连接,造成脑损伤模型。

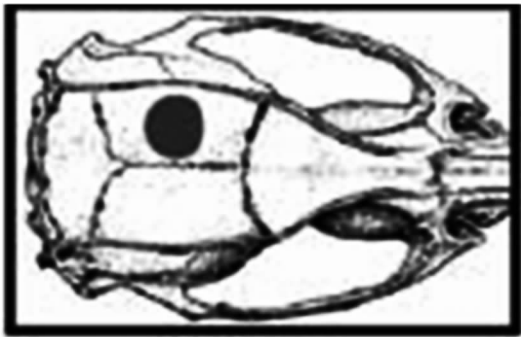


图 1 侧位液压打击示意图

Fig.1 Lateral position hydraulic strike schematic diagram

1.2.2 组织学研究 在大鼠脑损伤后,在设定的时间点,经心脏灌流 4%多聚甲醛,取出大脑,损伤区域标本用石蜡包埋、切片处理,进行 HO-1 免疫组织化学染色。

1.2.3 免疫组化染色 采用 SP 三步法。基本步骤 石蜡切片,常规脱蜡至水。抗原修复,3% H_2O_2 去离子水孵育 5 min,用 PBS 液冲洗 3 次,滴加封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育 10 min,倾去。滴加一抗 (兔抗 -HO-1,1:500,美国 ZYMED 公司),40℃孵育过夜 (12 h),PBS 液冲洗 3 次,滴加生物素化二抗工作液 (IgG/Bio),室温孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP),室温孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次。加 DAB 显色剂显色,光镜下观察显色后,立即自来水冲洗,复染,脱水,透明,封片。

1.2.4 免疫组织化学染色结果判断 细胞浆和细胞膜染成棕黄色为阳性,着色定位准确视为阳性结果,其阳性细胞表达个数进行半定量分析。每张切片随机选取 10 个高倍镜视野,计数细胞数,然后取其平均数进行统计学分析。

1.2.5 脑含水量测定 取损伤周围区域脑组织 (200± 50) mg,在分析天平上称湿重,随之将标本放置于 1100C 烘箱连续烘干 72h 至恒重,称干重,脑含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 X%。

1.2.6 统计学方法 使用 SPSS17.0 软件包,组间比较采用 SNK-q 检验,实验数据均以均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 大鼠脑损伤区域 HO-1 的表达

正常组和假手术组 HO-1 均无表达。模型组 HO-1 的表达量为 3.45± 0.47。实验组 12 h、24 h、3 d 和 7 d 的表达量分别为 10.9± 1.35、10.62± 1.88、12.4± 1.57 和 10.99± 2.42。模型组分别与实验组 12 h、24 h、3 d 和 7 d 比较,HO-1 的表达差异具有显著性 ($P<0.05$ 表 1)。

表 1 实验组、正常组、假手术组和模型组 HO-1 阳性细胞数

Table 1 The number of HO-1 positive cells in experimental group, normal group, sham operation group and model group

Groups	N	Positive cells ($\bar{x} \pm s$)
Nomal group	6	—
Sham operation group	6	—
Model group	6	3.45± 0.47
12h group	6	10.9± 1.35*
24h group	6	10.62± 1.88*
3d group	6	12.4± 1.57*
7d group	6	10.99± 2.42*

注 正常组、假手术组无 HO-1 表达,实验组各组 (12h、24h、3d 和 7d) 与模型组相比,* $P<0.05$ 。

Note: There is no expression of HO-1 in Nomal group and Sham operation group. Experimental group (12 h, 24 h, 3 d and 7 d) were compared with Model group, * $P<0.05$.

2.2 SD 大鼠损伤周边区域脑含水量的变化

正常组、假手术组和模型组的脑含水量分别为 (78.7± 0.4) %、(78.6± 0.7) %和(89.3± 0.8)%;实验组 12 h、24 h、3 d 和 7

d 的脑含水量分别为 (83.1± 0.3) %、(83.6± 0.6) %、(83.9± 0.4) %和 (83.2± 0.3) %。实验组各组分别与模型组比较,脑含水量的差异性具有显著性 ($P<0.05$ 表 2)。模型组分别与正常组和

表 2 实验组、正常组、假手术组和模型组脑含水量的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of brain water content in Experimental group,Nomal group, Sham operation group and Model group($\bar{x} \pm s$)

Groups	N	脑含水量 (%)
Nomal group	6	78.7± 0.4*
Sham operationgroup	6	78.6± 0.7*
Model group	6	89.3± 0.8
12h group	6	83.1± 0.3**
24h group	6	83.6± 0.6**
3d group	6	83.9± 0.4**
7d group	6	83.2± 0.3**

注 正常组、假手术组分别与模型组比较 *P<0.05;实验组(12h、24h、3d 和 7d)各组分别与模型组比较 **P<0.05。

Notes:Model group was compared with Nomal group and Sham operation group, *P<0.05. Experimental group (12h,24h,3d and7d) were compared with Model group, *P<0.05.

假手术组比较,脑含水量的差异具有显著性 (P<0.05 表 2)。

3 讨论

本实验用钴 - 原卟啉灌胃后,采用了液压损伤装置造成脑损伤模型,应用免疫组织化学的方法测定损伤区域 HO-1 的表达,应用干湿重法测定了损伤周边区域脑含水量的变化。结果显示,正常组、假手术组 HO-1 无表达,模型组、12 h、24 h、3 d 和 7 d 组 HO-1 均有表达。模型组分别与 12 h、24 h、3 d 和 7 d 组比较,HO-1 的表达有显著性差异 (P<0.05) ;脑含水量的变化 模型组分别与正常组、假手术组比较,含水量有显著性差异 (P<0.05) ;模型组分别与 12 h、24 h、3 d 和 7 d 组比较,脑含水量有显著性差异 (P<0.05) 。

HO-1 是血红素分解代谢的限速酶^[6-9]。它催化血红素生成胆绿素、Fe²⁺ 和 CO。HO-1 具有细胞保护、氧化应激、抗炎和免疫调节的特性^[10-12]。组织损伤、热休克、缺氧、氧化因子、血红素、金属卟啉等因素都可以诱导 HO-1 的表达。有研究表明,金属卟啉化合物可以上调小鸡 HO-1 启动子的活性,尤其是血红素和钴 - 原卟啉^[13]。钴化合物现在已经被应用于实验室动物和人类疾病的治疗。无机钴被用于刺激红细胞的生成,从而可以治疗与肾疾病有关的贫血。另外,钴 - 原卟啉可以影响细胞色素 P-450 的新陈代谢,从而可以影响实验动物的内分泌状态和体重的增加。在众多系统中,血红素和钴 - 原卟啉都是 HO-1 活性的有效诱导剂^[14-17]。钴 - 原卟啉并非血红素氧合酶 -1 底物,也不能催化分解细胞内的活性氧类物质,但它是迄今为止被证明是 HO-1 活性最有效的金属卟啉诱导剂。它的诱导作用主要通过非应激途径发生。应用血红素催化 HO-1 的活性,随着血红素的分解代谢,它的有效催化浓度逐渐降低,可能不足以激活 HO-1 的活性调节位点。钴 - 原卟啉不能够被 HO-1 分解代谢,它能够扩散且保持到 HO-1 高活性结合位点,因此其催化活性不能被减弱。至此,在不增加氧化应激的前提下,钴 - 原卟啉上调 HO-1 的作用比血红素似乎更有前途。相对于其他金属卟啉化合物 (如 CrMP、ZnMP、SnMP 和 SnPp),CoPP 的作用似乎更强,其他这些金属卟啉化合物均抑制 HO-1 的活性,其中一些遇光容易被分解 (如 SnMP 和 SnPp)。YingShan 等^[18]肝细胞瘤细胞体外培养研究发现,0.5μMCoPP 最低有效浓度使肝细胞

瘤细胞 HO-1mRNA 量显著提高了 3.5 倍;用 10μM-25μM-CoPP 处理 4 小时,HO-1mRNA 的表达被上调了 35-40 倍;当 CoPP 的浓度 >25μM 时,肝细胞瘤细胞 HO-1 的表达反而降低,此时,CoPP 已经引起了细胞毒性。Helena Parfenova 等^[19]发现,CoPP 在体内外均可影响大脑微循环 HO-1 的表达和活性。在脑微血管的细胞培养过程中,加入 10-50μM CoPP 作用 17-24 h,HO-1 的表达明显增加,并且呈剂量依赖性,HO-2 的表达并不增加。同时,CoPP 并不能诱导 iNOS 或 COX2 的表达,表明 CoPP 选择性的作用于 HO-1 的表达。另外,他们还发现,给予新生小猪 50mg/kg 的 CoPP,24 h 内脑组织和脑微血管的 HO-1 的表达明显增加,但 HO-2 的表达并不增加。Angelo A. Chora 等^[20]在自身免疫神经炎症研究发现 ,CoPP 能够诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中枢神经系统 HO-1 的表达从而发挥脑保护作用;然而在 HO-1-/- 的小鼠应用 CoPP 并不能发挥脑保护作用。我们的实验研究发现,正常组和假手术组用免疫组织化学方法未检测到 HO-1 的表达 模型组和实验组可以观察到 HO-1 的表达,这说明在液压脑损伤后,损伤区域有 HO-1 的表达 ,实验组 12 h、24 h、3 d 和 7 d 分别与模型组相比,差异具有显著性 (P<0.05) ,证实了在脑损伤过程中 CoPP 能够诱导 HO-1 的表达,但是其具体的分子诱导机制还有待于进一步研究。对于损伤周边区域脑含水量的情况,实验组各组与模型组相比亦具有显著性 (P<0.05) ,这可能是由于 CoPP 诱导了 HO-1 的增加,有效的抑制了氧化应激和血脑屏障的破坏,从而减轻了脑细胞水肿。本实验证明了 CoPP 可以诱导脑损伤区域 HO-1 的表达,同时可以减轻脑损伤周边区域脑水肿程度。

参 考 文 献 (References)

[1] Wagner KR, Sharp FR. Heme and iron metabolism:role in cere- bral hemorrhage[J].J Cerebral Blood Flow Metab,2003,23(6):629-652
[2] Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain [J]. Cell Mol Biol,2000,46:573-585
[3] Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide:review,new hepothesis, and proposed treated [J]. Pharmacol Ther,2005,105 (1): 23-56
[4] Shan,Y., Pepe,J. Upstream regulatory elements in chick heme oxygen- ase-1 promoter: a study in primary cultures of chick embryo live cells

- [J]. Mol. Cell Biochem, 2000, 209: 17-27
- [5] Shan, Y., Pepe, J. Induction of heme oxygenase-1 reporter gene constructs by metalloporphyrins in cultured cells [J]. Hepatology, 1999, 30: 512A
- [6] Jung-Woo Bae, Mi-Jeong Kim. Protective effects of heme oxygenase-1 against MPP⁺-induced cytotoxicity in PC-12 cells [J]. Neurol Sci, 2010, 31: 307-313
- [7] Cuadrado A, Rojo AI. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14: 429-442
- [8] Anne R. Kinderlerer, Isabel Pombo Gregoire. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin [J]. Blood, 2009, 113(7): 1598-1607
- [9] Hill-Kapturczak, Chang. Heme oxygenase and the kidney [J]. DN A Cell Biol, 2002, 21: 307-321
- [10] Elbirt, K. K., Bonkovsky. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role [J]. Proc. Assoc. Am. Physicians, 1999, 111: 438-447
- [11] Bonkovsky, Elbirt, K. K. Heme oxygenase: its regulation and role [J]. World Scientific, River Edge, NJ, USA, 2002: 690-706
- [12] Dore S, Ferris CD. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 96: 2445-2450
- [13] Shan, Y., Pepe, J. Mapping of the chick heme oxygenase-1 promoter for responsiveness to metalloporphyrins [J]. Arch. Biochem. Biophys, 2002, 399: 159-166
- [14] Abraham, N. G. Differential effect of cobalt protoporphyrin on distributions of heme oxygenase in renal structure and on blood pressure in SHR [J]. Cell Mol. Bio. (Noisy-le-grand), 2002, 48: 895-902
- [15] Fu, S. H. Cobalt-protoporphyrin treatment enhances murine islets engraftment [J]. Transplant. Proc, 2004, 36: 2205-2206
- [16] Glanemann, M., Schirmeire. Cobalt proporphyrin induce heme oxygenase overexpression and its impact on liver regeneration [J]. Transplant. Proc, 2005, 37: 3223-3225
- [17] Hsu, B. R. A single-dose of cobalt-protoporphyrin protects islet Beta cells from glucocorticoid suppression [J]. Transplant. Proc, 2005, 37: 1826-1827
- [18] Ying shan, Richard W. Lambrecht, et al. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin [J]. The FASEB Journal, 2006, 20: 2258-2267
- [19] Helena Parfenova, Pierluigi Carratu. Epileptic seizure cause extended postcal cerebral vascular dysfunction that is prevented by HO-1 overexpression [J]. Heart, 2005, 288(6): 2843-2850
- [20] Angelo A. Chora, Paulo Fontoura. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2007, 117(2): 438-447

(上接第 4418 页)

- [8] 李建武, 肖能庆, 于瑞元等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京大学出版社, 2004, 174-176
- Li Jian-wu, Xiao Neng-qing, Yu Rui-yuan, et al. The principle and method of biochemistry experiment [M]. Beijing University Press, 2004, 174-176
- [9] 秦大鹏. 高淀粉玉米籽粒淀粉机理的生理生化机制 [D]. 山东农业大学硕士论文, 2008, 19-20
- Qin Da-peng. Physiological and biochemical mechanisms of starch accumulation in high-starch maize [D]. Shandong Agricultural University Master Thesis, 2008, 19-20
- [10] 国家药典委员会, 中国药典 (一部) [S]. 中国医药科技出版社, 2010: 附录 52
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (vol.1) [S], China Medical Science Press, 2010: appendix 52
- [11] 国家药典委员会, 中国药典 (一部) [S]. 中国医药科技出版社, 2010: 附录 53
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (vol.1) [S], China Medical Science Press, 2010: appendix 53
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 高等教育出版社, 2000: 225-227
- Li He-sheng. Experimental principles and techniques of plant physiology and biochemistry [M]. Higher Education Press, 2000: 225-227
- [13] Wang LZ, Xu CZ, Qu ML, et al. Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from Zea mays ssp. mexicana into cultivated maize [J]. J Cereal Sci, 2008, 48: 387-393
- [14] Wallace JC, Lope MA, Paiva E, et al. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified opaque-2 maize [J]. Plant Physiol, 1990, 92: 191-196
- [15] 分子克隆实验指南 [M]. (第三版), 萨姆布鲁克. 科学出版社, 2008, 1713-1720
- Molecular Cloning: A laboratory manual on the WEB [M]. (Third Edition). SAMBROOK J. Science Press, 2008, 1713-1720
- [16] Qin F, Li J, Li X, et al. AFLP and RFLP linkage map in Coix [J]. Genet Resour Crop Ev, 2005, 52: 209-214
- [17] Ma K, Kim K, Dixit A, et al. Assessment of genetic diversity and relationships among Coix lacryma-jobi accessions using microsatellite markers [J]. Biol Plantarum, 2010, 54(2): 272-278
- [18] Zhou L, Huang B, Meng X, et al. The amplification and evolution of orthologous 22-kDa α -prolamin tandemly arrayed genes in coix, sorghum and maize genomes [J]. Plant Mol Biol, 2010, 74: 631-643
- [19] Figueira TRS, Serrano GCM, Arruda P. Evolution of the genes encoding seed storage proteins in Sugarcane and maize [J]. Tropical Plant Biol, 2008, 1: 108-119
- [20] Ottoboni LMM, Leite A, Targon MLN, et al. Characterization of the storage protein in seed of Coix lacryma-jobi var. Adlay [J]. J Agric Food Chem, 1990, 38: 631-635