

## 左旋四氢巴马汀对脑缺血/再灌注大鼠脑组织 血红素氧化酶-1 及内源性一氧化碳的影响

韩遵义, 杨光田

(华中科技大学同济医学院附属同济医院急诊科, 湖北 武汉 430030)

**【摘要】** 目的: 观察全脑缺血/再灌注大鼠全血碳氧血红蛋白(COHB)含量、脑组织血红素氧化酶-1(HO-1)活性的变化及左旋四氢巴马汀(L-THP)对其的影响。方法: 77 只 SD 大鼠随机分为假手术组(S 组,  $n=7$ )、脑缺血/再灌注组(I 组,  $n=35$ )及 L-THP 治疗组(T 组,  $n=35$ )。I 组和 T 组建立大鼠全脑缺血/再灌注模型, 分别于脑缺血/再灌注 1、3、12、24 和 48 h 各时间点检测脑组织匀浆 HO-1 活性、环磷酸鸟苷(cGMP)及血中 COHB 含量, 并与 S 组比较。结果: ①I 组在脑缺血/再灌注后 HO-1 活性、COHB 含量及 cGMP 水平均明显高于 S 组( $P$  均  $<0.01$ )。②T 组的 HO-1 活性及 COHB 在脑缺血/再灌注 1、12、24 和 48 h 时均显著低于 I 组( $P$  均  $<0.01$ ), 3 h 时略低于 I 组, 差异无显著性; HO-1 活性在各时间点均高于 S 组( $P$  均  $<0.01$ ); COHB 含量在 24 h 和 48 h 时略低于 S 组, 但差异无显著性, 其余各时间点均高于 S 组( $P$  均  $<0.01$ ); cGMP 水平均显著低于 I 组( $P$  均  $<0.01$ ), 但高于 S 组( $P$   $<0.01$ )。③苏木素-伊红(HE)染色 I 组海马 CA1 区存活神经元数目在脑缺血/再灌注 3 h 后显著减少( $P$   $<0.01$ ), 应用 L-THP 后存活神经元数目明显高于 I 组( $P$   $<0.01$ )。结论: L-THP 可通过抑制 HO-1 活性使一氧化碳(CO)和 cGMP 水平下降, 减少神经元丢失, 提高存活神经元数目, 减轻脑缺血/再灌注损伤。

**【关键词】** 血红素氧化酶; 一氧化碳; 缺血/再灌注损伤; 脑; 左旋四氢巴马汀

中图分类号: R285.5; R277.7 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)02-0089-04

**Effects of L-tetrahydropalmatine on hemeoxygenase-1 in cerebral tissue of rats and endogenous carbon monoxide during global cerebral ischemia/reperfusion** HAN Zun-yi, YANG Guang-tian. Department of Emergency, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

**【Abstract】** Objective: To observe the changes of hemeoxygenase-1 (HO-1) activity in cerebral tissue, carboxyhemoglobin (COHB) level in blood of rats during global cerebral ischemia/reperfusion (I/R) and the influence of L-tetrahydropalmatine (L-THP) on them. Methods: Seventy-seven Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham-operated group (S group,  $n=7$ ), I/R group (I group,  $n=35$ ) and L-THP treatment group (T group,  $n=35$ ). Cerebral I/R model was reproduced in SD rats of I group and T group. HO-1 activity, cyclic GMP (cGMP) in the brain and COHB in blood were evaluated respectively at 1, 3, 12, 24, and 48 hours after global cerebral I/R and compared to those of the S group. Results: ① HO-1 activity, COHB content and cGMP level in I group increased as compared with those in S group after global cerebral I/R (all  $P$   $<0.01$ ). ② HO-1 activity and COHB content of T group were significantly lower than those of I group at 1, 12, 24, and 48 hours after cerebral I/R (all  $P$   $<0.01$ ), at 3 hours they were slightly lower than those of I group, the difference being not significant; HO-1 activities at all time points were higher than those of S group (all  $P$   $<0.01$ ); COHB contents at 24, 48 hours were slightly lower than those of S group, the difference being not significant, and at all the other time points the COHB contents were higher than those of S group (all  $P$   $<0.01$ ). cGMP level of T group was significantly lower than that of I group at all time points (all  $P$   $<0.01$ ), but higher than those of S group (all  $P$   $<0.01$ ). ③ Hematoxylin and eosin (HE) stain showed that the number of surviving neurons in hippocampus CA1 region of I group was decreased at 3, 12, 24, and 48 hours after cerebral I/R (all  $P$   $<0.01$ ), but there was no significant change at 1 hour. The number of surviving neurons in T group was much higher than that in I group ( $P$   $<0.01$ ). Conclusion: L-THP could decrease carbon monoxide content and cGMP level by inhibiting HO-1 activity. The mechanism of neuro protective effect of L-THP is via increasing the number of survival neurons and ameliorating the I/R injury.

**【Key words】** hemeoxygenase-1; carbon monoxide; cerebral ischemia/reperfusion; L-tetrahydropalmatine

一氧化碳(carbon monoxide, CO)被认为是继一氧化氮(nitric oxide, NO)之后又一重要的血管舒张因子和气体信使分子。血红素氧化酶(hemeoxygenase, HO)是血红素降解的起始和限速酶,分解血红素产生胆绿素、铁离子和 CO。近年研究表明,脑损伤后 HO-1 在星形胶质细胞中表达异常增高,并与脑损伤的严重程度有关<sup>[1]</sup>;新生儿缺氧缺血性脑损伤后血液 CO 水平显著升高,且与病情严重程度密切相关<sup>[2]</sup>。故阻止脑损伤后内源性 CO 的过度升高有利于减轻脑损伤。为此,我们采用改良的四血管阻塞法建立大鼠全脑缺血/再灌注模型,以中药延胡索主要有效成分延胡索乙素的左旋物左旋四氢巴马汀(L-terahydropalmatine, L-THP)进行干预,探讨其是否通过降低 HO-1 活性、减少内源性 CO 的产生,对脑缺血/再灌注损伤发挥保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要药品及试剂:**L-THP 注射液由九州药业公司生产,批号:0409291;血红素及还原型辅酶 I (NADPH Na<sub>4</sub>) 购自美国 Sigma 公司;环磷酸鸟苷(cGMP)放射免疫试剂盒由上海中医药大学提供。

**1.2 实验动物及分组:**SD 大鼠 77 只,雌雄不拘,体重 180~220 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。实验动物随机分为假手术组(S 组)7 只,脑缺血/再灌注组(I 组)、L-THP 治疗组(T 组)各 35 只,其中 I 组、T 组又各分为 1、3、12、24 和 48 h 5 个亚组,每个亚组 7 只。T 组动物于缺血前 10 min 开始腹腔注射 10 mg/kg L-THP 注射液,以后每隔 6 h 注射 1 次;I 组采用同样方法注射等量生理盐水作为对照。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 动物模型制备:**采用傅震等<sup>[3]</sup>改良的四血管阻塞法建立大鼠脑缺血/再灌注模型。S 组动物仅作第一颈椎双侧翼小孔和颈总动脉的解剖暴露而不阻断血管。

**1.3.2 脑缺血/再灌注模型成功标准:**手术操作中无大出血,双侧颈总动脉夹闭 20 min 内翻正反射消失,吊尾圆锥运动无挣扎,脑电图平直,存活期内未见癫痫发作为模型成功;否则为失败,弃去不用。

**1.3.3 实验标本的制备:**I 组与 T 组在模型制备后分别于 1、3、12、24 和 48 h 断颈处死,取新鲜血立即

测碳氧血红蛋白(CO<sub>Hb</sub>)含量,并自丘脑中 1/3 水平取左侧大脑半球组织约 100 mg 制备脑组织匀浆,用于 HO-1 活性和 cGMP 水平的测定;同时取大鼠肝组织,按要求制备标本。右侧大脑用于取海马组织行苏木素-伊红(HE)染色,作病理切片。

**1.3.4 CO 含量的间接测定:**参照文献<sup>[4]</sup>方法,采用双波长测定,用全血中 CO<sub>Hb</sub> 的比值来代表内源性 CO 的水平。

**1.3.5 HO-1 活性的测定<sup>[5]</sup>:**根据 HO-1 可降解血红素生成胆红素和 CO 的原理,通过测定样品反应物中胆红素的生成量便可反映 HO-1 的活性,HO-1 活性表示法:单位为每小时每毫克蛋白生成胆红素量(nmol·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>);脑组织匀浆上清液总蛋白含量采用考马斯亮蓝法。

**1.3.6 脑组织匀浆上清液 cGMP 水平测定:**采用<sup>125</sup>I 标记的 cGMP 放射免疫竞争抑制分析法检测,按试剂盒说明操作,单位以每毫克蛋白生成量表示(nmol/mg)。

**1.3.7 海马 CA1 区神经元数目测定:**光镜下用尺型计数器计数海马 CA1 区每毫米长度区域存活神经元数目。

**1.4 数据处理及统计分析:**数据用 SPSS 13.0 软件包处理。各组数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组脑组织 HO-1 活性的变化(表 1):**I 组 HO-1 活性在 1 h 即达高峰,3 h 最低,以后逐渐升高,到 48 h 再次达高峰,各时间点与 S 组比较差异均有显著性( $P$  均  $< 0.01$ )。T 组在 1、12、24 和 48 h 均显著低于 I 组( $P$  均  $< 0.01$ ),3 h 时略低于 I 组,但差异无显著性( $P > 0.05$ );各时间点仍高于 S 组( $P$  均  $< 0.01$ )。

表 1 脑缺血/再灌注后不同时间点各组脑组织 HO-1 活性变化( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 1 Changes of HO-1 activity in brain tissue of each group at different time points

组别	$(\bar{x} \pm s, n=7)$ nmol·mg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>				
	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
I 组	18.62±0.59*	9.88±0.28*	10.20±0.53*	15.55±0.48*	17.23±1.40*
T 组	12.05±0.78*△	8.97±1.23*	7.34±0.42*△	6.33±0.62*△	7.34±0.68*△

注:S 组 HO-1 为(5.71±0.50)nmol·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>;与 S 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 I 组同时间点比较,△ $P < 0.01$

**2.2 各组全血 CO<sub>Hb</sub> 含量变化(表 2):**全血 CO<sub>Hb</sub> 的变化类似于 HO-1 活性的变化。I 组在 1 h 达高峰,3 h 最低,以后逐渐升高,在 48 h 又达高峰,各时

基金项目:湖北省医药卫生科技计划项目(WJ01518)

通讯作者:杨光田,教授,博士研究生导师,从事心肺脑复苏的基础与临床研究

作者简介:韩遵义(1971-),男(汉族),湖北武汉人,主治医师。

表 2 脑缺血/再灌注后不同时间点各组全血 COHb 含量变化( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 2 Changes of COHb level in blood in brain tissue of each group at different time points( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
I 组	(73.46±0.72)%*	(55.68±1.02)%*	(56.90±4.09)%*	(65.46±2.12)%*	(71.84±1.92)%*
T 组	(57.51±1.91)%* <sup>△</sup>	(51.42±2.36)%*	(44.52±5.12)%* <sup>△</sup>	(38.10±2.52)% <sup>△</sup>	(37.00±1.56)% <sup>△</sup>

注: S 组 COHb 为 (38.23±1.16)%; 与 S 组比较: \* $P < 0.01$ ; 与 I 组同时时间点比较: <sup>△</sup> $P < 0.01$

间点与 S 组相比差异均有显著性 ( $P$  均  $< 0.01$ )。T 组 COHb 含量逐渐下降, 至 24、48 h 略低于 S 组, 但差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); 其中 3 h 时虽略低于 I 组, 但差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 其余各时间点与 I 组比较差异均有显著性 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

2.3 各组脑组织匀浆 cGMP 水平的变化 (表 3): I 组脑组织匀浆 cGMP 水平在 1 h 达高峰, 3 h 最低, 随后逐渐上升, 至 48 h 再次达高峰, 各时间点与 S 组相比差异均有显著性 ( $P$  均  $< 0.01$ )。T 组大致呈逐渐递减趋势, 3 h 时水平最高, 以后逐渐降低, 各时间点较 I 组均显著降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 但仍高于 S 组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

表 3 脑缺血/再灌注后不同时间点各组脑组织匀浆 cGMP 水平变化( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 3 Changes of cGMP level in brain tissue of each group at different time points

组别	( $\bar{x} \pm s, n=7$ )				
	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h
I 组	876.3±26.2*	653.4±37.5*	749.3±27.3*	766.9±44.0*	907.0±17.0*
T 组	480.4±38.2* <sup>△</sup>	569.3±52.6* <sup>△</sup>	479.2±50.7* <sup>△</sup>	417.5±27.4* <sup>△</sup>	400.1±19.3* <sup>△</sup>

注: S 组 cGMP 为 (303.7±15.6)nmol/mg; 与 S 组比较:

\* $P < 0.01$ ; 与 I 组同时时间点比较: <sup>△</sup> $P < 0.01$

### 2.4 脑组织病理改变

2.4.1 HE 染色: 光镜下可见 I 组神经元细胞数量减少, 残存的神经元细胞大多肿胀变性、核固缩、嗜酸性变 (图 1)。而 T 组神经元变性者较少, 少见坏死细胞, 仅个别呈嗜酸性变 (图 2)。

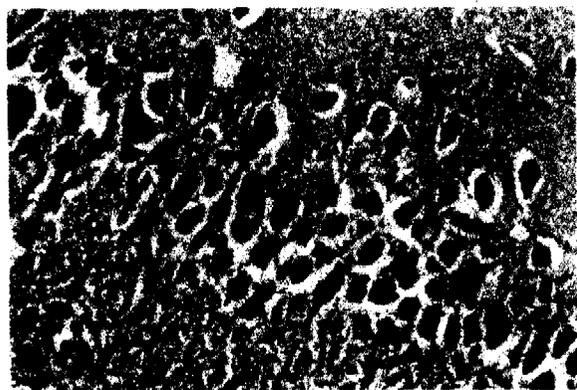


图 1 I 组海马 CA1 区病理学变化 (HE, ×400)

Figure 1 Pathological changes of CA1 region in hippocampus in group I (HE, ×400)

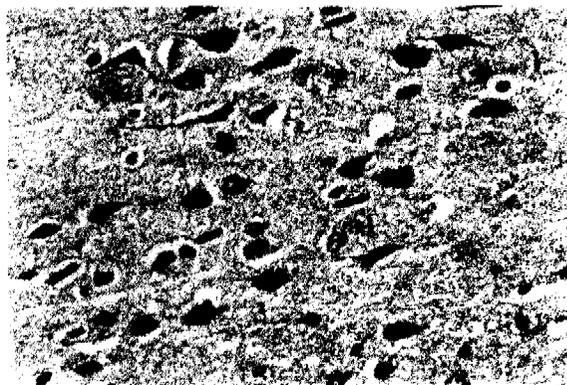


图 2 T 组海马 CA1 区病理学变化 (HE, ×400)

Figure 2 Pathological changes of CA1 region in hippocampus in group T (HE, ×400)

2.4.2 海马 CA1 区存活神经元数目 (表 4): I 组 1 h 存活神经元数目与 S 组无明显减少, 3 h 以后显著减少 ( $P < 0.01$ )。应用 L-THP 后可减少 3 h 后各时间点神经元的丢失, 提高神经元存活数目, 与 I 组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。

表 4 脑缺血/再灌注后不同时间点各组海马 CA1 区存活神经元数目变化( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 4 Changes of surviving neuron number in hippocampus CA1 of each group at different

组别	time points ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )					个/mm
	1 h	3 h	12 h	24 h	48 h	
I 组	159.70±2.48	62.10±3.12*	39.89±5.43*	38.21±4.33*	41.97±7.96*	
T 组	158.99±3.42	98.11±5.34* <sup>△</sup>	86.30±2.47* <sup>△</sup>	79.20±4.37* <sup>△</sup>	84.91±3.65* <sup>△</sup>	

注: S 组存活神经元数目为 (166.98±3.36)个/mm<sup>2</sup>; 与 S 组比较: \* $P < 0.01$ ; 与 I 组同时时间点比较: <sup>△</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

关于 HO 在缺血、缺氧性损伤中的作用已引起国内外学者的广泛关注。一般认为, HO/CO 系统在脑缺血、缺氧损伤中具有双重作用: 即在较轻的损伤以及较严重的损伤早期, HO/CO 系统起保护作用, 但这种保护作用十分有限; 随着病情的进展, 很快为 HO/CO 系统所产生的诸多损害作用所抵消, 并表现出不同程度的损伤, 这种损伤作用主要是通过其与血红素作用的产物 CO、胆红素及铁离子来实现的。Takeda 等<sup>[6]</sup>研究发现, 短暂性前脑缺血后, 大脑皮质、海马和丘脑处 HO-1 蛋白明显增高, HO-2 蛋白无明显变化, 因而认为 HO-1 mRNA 表达增

加可能参与了神经元凋亡。我们在研究中发现,在大鼠全脑缺血/再灌注后脑组织 HO-1 活性明显升高的同时,海马 CA1 区存活神经元数目明显减少,说明 HO-1 活性升高与脑缺血/再灌注损伤有关。HO-1 生成的铁离子虽通过铁蛋白上调减轻脑损伤,但同时铁离子为氧自由基和脂质过氧化物形成的强有力的催化剂,生成的自由基氧化离子通道和离子泵的膜蛋白,抑制谷氨酸的摄取并促进其释放,出现毒性作用,参与细胞的坏死和凋亡过程<sup>[7]</sup>。血红素代谢的另一产物 CO 具有扩张血管及神经递质的作用。在脑缺血、缺氧早期,CO 可使脑血管扩张,一定程度上改善了脑组织缺血、缺氧状态,但在晚期或较重的缺血、缺氧时,血管持续过度扩张,引起血液淤滞,有效血流量减少,使缺氧缺血性脑损伤进一步加重。同时过量的 CO 可能干扰脑的神经递质功能,使神经元处于一种过度兴奋状态,神经细胞受损,并且影响以后的学习、认知功能<sup>[8]</sup>。有研究表明,内源性 CO 通过激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC),使细胞内 cGMP 升高,发挥一系列生物学作用。cGMP 作为细胞内第二信使,在扩张脑血管、改善脑血流的同时,也可能促进 Ca<sup>2+</sup> 内流,激活 Ca<sup>2+</sup> 依赖性的神经元型(nNOS)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS),产生大量的 NO,过量的 NO 导致神经细胞功能紊乱和迟发性神经细胞死亡<sup>[9]</sup>。我们在研究中发现,随着脑缺血/再灌注后 HO-1 活性升高,CO 及 cGMP 水平亦升高,表明脑缺血/再灌注后体内 CO 水平的升高与 HO-1 活性的增加密切相关,而升高的 CO 可通过 CO-cGMP 通路发挥生物学作用。

Kadoya 等<sup>[7]</sup>分别在大鼠大脑中动脉闭塞前后应用 HO 抑制剂锌原卟啉(ZnPP)治疗,发现能明显缩小梗死体积、减轻脑水肿,说明脑缺血/再灌注后若能采取措施抑制过度升高的 HO-1 活性,可以降低脑组织 CO 含量及 cGMP 水平,对抗脑缺血/再灌注损伤。在本研究中应用 L-THP 干预后,HO-1 活性明显受到抑制,CO 及 cGMP 亦随之下调,海马 CA1 区存活神经元数目明显高于 I 组,脑损伤减轻。其可能的机制为:①HO-1 基因 5'端启动子有许多调节元素,其中重要的有核转录因子-κB(NF-κB)位点、激活蛋白-1 样结构位点、Fos/Jun 即刻早期基因等,L-THP 能减少脑缺血/再灌注时 NF-κB、c-Fos<sup>[10,11]</sup>,从而抑制 HO-1 蛋白表达;②L-THP 还能减少脑缺血/再灌注时产生的氧自由基、脂质过氧化物<sup>[12]</sup>,从而使上述物质诱导产生的 HO-1 减

少;③脑缺血/再灌注时所产生的白细胞介素-1(IL-1)、IL-5 等<sup>[13]</sup>炎性因子可诱导 HO-1 的表达,而 L-THP 能抑制上述因子的产生;④脑缺血/再灌注时细胞内过多的 Ca<sup>2+</sup> 亦可诱导 HO-1 表达,但 L-THP 能使细胞 Ca<sup>2+</sup> 内流减少;⑤HO/CO 与 NOS/NO 系统可以互相调节,L-THP 能减少缺氧/复氧早期脑动脉内皮 NO 的生成<sup>[14]</sup>,因而推测 L-THP 可通过影响脑缺血/再灌注后 NO 的生成间接调节 CO 的生成。

本实验结果表明:L-THP 可以抑制 HO-1 的活性,降低脑内 CO 及 cGMP 水平,显著减少神经元丢失数目,提高其存活数目,发挥脑保护作用。

#### 参考文献:

- [1] Fukuda K, Panter S S, Sharp F R, et al. Induction of hemeoxygenase-1(HO-1) after traumatic brain injury in rat[J]. *Neurosci Lett*, 1995, 199:127-130.
- [2] 史源,李华强,潘凤,等.新生儿缺血缺氧性脑病内源性一氧化碳的变化[J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37:499-500.
- [3] 傅震,赵君,周建平.大鼠全脑缺血再灌注模型方法的改进及其在热休克蛋白 70 方面的应用[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21:108-109.
- [4] 乐宏元,宋小兴,刘和平.一氧化碳血红蛋白双波长定量测定[J]. *临床检验杂志*, 1996, 14:87-88.
- [5] Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle smooth-derived carbon monoxide[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96:2676-2682.
- [6] Takeda A, Onodera H, Sugimoto A, et al. Increased expression of hemeoxygenase mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia[J]. *Brain Res*, 1994, 19:1247-1255.
- [7] Kadoya C, Domino E F, Yang G Y, et al. Preischemic but not postischemic zone protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia rats[J]. *Stroke*, 1995, 26:1035-1038.
- [8] 毛健,刘兆良,韩玉昆.新生儿缺血缺氧性脑病脑血流动力学变化及其临床意义[J]. *中华儿科杂志*, 1997, 35:64-67.
- [9] Suttner D M, Sridhar K, Lee C S, et al. Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276:L443-451.
- [10] 陈燕启,刘德红,杨光田.左旋四氢巴马汀抗脑缺血再灌注损伤之作用研究[J]. *中国全科医学*, 2004, 7:713-715.
- [11] 夏中元,刘颖涛,万德宁.全脑缺血再灌注大鼠大脑 c-fos 基因表达的研究[J]. *中国危重病急救医学*, 1998, 10:210-212.
- [12] 梁健,王富强.延胡索乙素抗脂质过氧化作用及对脑缺血再灌注大鼠行为及病理改变的保护[J]. *中国药理学通报*, 1999, 15:167.
- [13] 陈燕启,刘德红,杨光田.葛根素在大鼠全脑缺血/再灌注时对核因子-κB 表达的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11:21-24.
- [14] 宋振举,杨光田,陆德琴,等.缺氧与复氧对脑动脉内皮细胞一氧化氮合酶Ⅱ表达的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15:535-537.

(收稿日期:2005-11-12 修回日期:2006-03-10)

(本文编辑:李银平)