

· 论 著 ·

实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠脑组织 HO-1 mRNA 表达

朱一飞¹, 郭力¹, 曹文珍², 赵晓云³, 檀国军^{1*}

(1. 河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000; 2. 河北省灵寿县医院儿科; 3. 河北省人民医院临床研究中心)

[摘要] 目的: 探讨脑组织血红素氧合酶 1(HO-1) 在实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE) 发病中的作用及可能的信号转导机制。方法: 健康成年雌性 Wistar 大鼠 78 只, 随机分为 3 组($n=26$): 对照组, 不做任何处理; EAE 组, 应用豚鼠脊髓匀浆-完全弗氏佐剂诱导大鼠 EAE 模型; 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC) 组, EAE 模型诱导前 1 h 腹腔注射 NF- κ B 特异性抑制剂 PDTC 100 mg/kg, 以后 1 次/d, 连续 7 d。诱导后 1、7、14、21 d 以 RT-PCR 法测定 EAE 大鼠脑组织中 HO-1 mRNA 表达的动态变化, 并观察其与症状之间的关系。结果: 对照组大鼠脑组织仅有少量 HO-1 mRNA 表达(0.27 ± 0.05); 诱导 EAE 后, 随着大鼠 EAE 症状的出现和加重, 脑组织 HO-1 mRNA 水平逐渐升高; 在发病潜伏期(免疫后 7 d) 达高峰(1.11 ± 0.12); 发病期(免疫后 14 d) 保持较高水平(1.06 ± 0.18); 恢复期(免疫后 21 d) 逐渐下降(0.37 ± 0.10), 大鼠 EAE 症状也逐渐恢复。应用 NF- κ B 特异性抑制剂 PDTC 后, 大鼠 EAE 症状明显减轻, 脑组织 HO-1 mRNA 水平显著下降, 显示脑组织 HO-1 mRNA 的动态变化与 EAE 病情密切相关; NF- κ B 特异性抑制剂可以调节 HO-1 mRNA 表达水平。结论: 脑组织 HO-1 mRNA 表达在 EAE 发病中起着重要的作用, 应用 NF- κ B 特异性抑制剂可能是防治该病的有效方法之一。

[关键词] 脑脊髓炎; 血红素氧合酶 1; 核因子 κ B; 脑

[中图分类号] R 744.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)09-0991-03

HO-1 mRNA expression in brain of rats with experimental allergic encephalomyelitis

ZHU Yi-Fei¹, GUO Li¹, CAO Wen-Zhen², ZHAO Xiao-Yun³, TAN Guo-Jun^{1*} (1. Department of Neurology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Pediatrics, Lingshou County Hospital of Hebei Province; 3. Clinical Research Center, People's Hospital of Hebei Province)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the role of heme oxygenase-1(HO-1) in molecular mechanism of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). **Methods:** Seventy-eight healthy female Wistar rats were randomly divided into 3 groups($n=26$): rats in control group received no treatment; rats in EAE group were induced with complete Freund's adjuvant and Guinea pig spinal cord homogenate(CFA-GPSCH); and rats in pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC) group received PDTC (100 mg/kg), a specific inhibitor of NF- κ B, 1 h before and after(once a day for 7 d) CFA-GPSCH treatment. HO-1 mRNA expression were analyzed with reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) on 1 d, 7 d, 14 d, and 21 d after EAE induction, respectively. The relationship between HO-1 and symptoms of EAE was also investigated. **Results:** The expression of HO-1 mRNA was very low in the brains of the control group (0.27 ± 0.05), whereas enhanced gradually with onset and development of EAE in EAE group, peaked on d 7 (1.11 ± 0.12), kept at a high level till d 14(1.06 ± 0.18) and decreased on d 21 (0.37 ± 0.10). HO-1 mRNA expression change was in parallel with severities of EAE. In PDTC group, the EAE symptoms were mitigated markedly and the expression of HO-1 mRNA reduced noticeably compared with that of EAE group. **Conclusion:** Brain HO-1 mRNA expression may play an important role in the pathogenesis of EAE, and application of some inhibitors of NF- κ B may be one of the potential therapies for prevention and treatment of EAE.

[KEY WORDS] encephalomyelitis; heme oxygenase-1; nuclear factor- κ B; brain

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 991-993]

* 实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE) 是研究人类中枢神经系统自身免疫性脱髓鞘疾病——多发性硬化的经典模型, 但是其发病的详细机制尚不清楚。近年研究发现, 氧化应激反应是 EAE 发病的重要因素之一, 其中尤以血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1) 作用至关重要^[1], 但在 EAE 发病中的变化及作用尚未见报道; 其次, 由于 HO-1 基因中存在核转录因

子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 结合位点, NF- κ B 活性抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 能否通过阻断二者的结合, 而达到调节 HO-1 的表达水平值得研究。

本研究动态观察了 EAE 大鼠脑组织 HO-1

* [基金项目] 河北省卫生厅科技攻关项目(01030)。

[作者简介] 朱一飞(1973-), 男(汉族), 硕士, 主治医师。

* Corresponding author. E-mail: ttangjun@hotmail.com

mRNA 在 EA E 发病中的变化,旨在了解其在 EA E 病理生理过程中的作用,为阐明 EA E 的发病机制提供理论依据,为临床治疗提供新的思路;同时,应用 PDTC 进行干预,以期观察 HO-1 和 NF- κ B 之间的关系,为阐明 HO-1 mRNA 被激活的信号转导机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 异硫氰酸胍、十二烷基肌酸钠、PDTC (Sigma); 核糖核酸酶抑制剂、逆转录酶、dNTP, Taq DNA 聚合酶、随机引物(Promega); GeneAmp 9600 型 PCR 仪(PE), GDS 凝胶扫描系统(Image), SCR 20B 高速低温离心机(日本,三洋)。

1.2 动物模型及分组 健康成年雌性 Wistar 大鼠 78 只, 体重 180~230 g, 由河北省实验动物中心提供。随机分为 3 组($n=26$): (1) 对照组, 不做任何处理; (2) EA E 组, 按我室方法应用豚鼠脊髓匀浆-完全弗氏佐剂诱导 EA E 模型并判定临床病情程度^[2]; (3) PDTC 组, 于免疫诱导 EA E 模型前 1 h 腹腔注射 PDTC (100 mg/kg), 以后每天 1 次, 至免疫后 7 d。各组在 1、7、14、21 d 后分别取 3 只大鼠, 断头处死, 迅速取脑(每份 100 mg), 4 DEPC 水中洗去血液, 于液氮中保存待测。各组其余大鼠用作临床病情观察($n=14$), 其中 EA E 组排除因麻醉死亡的 4 只大鼠($n=10$)。

1.3 RT-PCR 检测 HO-1 mRNA 表达 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取各组大鼠脑组织总 RNA ($n=3$); 取总 RNA 4 μ g 进行逆转录后, 取产物 6 μ l (25 μ l 体系), 在 Gene Amp PCR System 9600 (美国 PE 公司) 上进行 PCR。HO-1 cDNA 特异性片段的上游引物: 5'-TCT TAG CCT CTT CTG TCA CCC T-3', 下游引物: 5'-CTG GAA GAG GA G A TA GA G CGA A -3', 长度为 390 bp^[3]。同时扩增鼠 β actin 用作内参照, 94 2 min; 94 45 s, 56 45 s, 72 45 s, 循环 30 次, 72 延伸 5 min。取 RT-PCR 产物 8 μ l, 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 80 V, 45 min, 用 GDS 凝胶图像成像和分析系统(Gel-Pro Analyzer Ver 3.0) 分析结果。

1.4 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以均数比较的 t 检验统计分析, 组间比较用单因素方差分析(one way ANOVA), 均用 SPSS 9.0 统计软件分析; 发病率用 χ^2 检验; RT-PCR 产物半定量用凝胶

图像分析系统分析结果。

2 结果

2.1 实验各组大鼠的发病情况 对照组大鼠毛发光泽, 活动多, 进食正常。EA E 组大鼠免疫 1 d 后食欲减低, 免疫 7 d 后有 1/10 例发病, 14 d 时 6/10 例发病; 发病前 2~3 d 多出现活动减少, 食欲下降, 毛发失去光泽, 逐渐出现尾部肌张力降低, 后肢和前肢无力、瘫痪, 伴大小便失禁; 部分大鼠以下肢瘫为首发症状, 1~2 d 后迅速加重至 4 级。21 d 时病情大多恢复, 仍有 2/10 例发病。平均发病时间(12.22 ± 3.31) d, 总发病率 90%, 病情程度(2.40 ± 1.26) 级; EA E+PDTC 组大鼠发病的首发症状与 EA E 组大鼠相似, 但是其发病率 42.86% (6/14)、病情程度(0.78 ± 1.12) 级, 与 EA E 组比较均明显降低($P < 0.01$); 发病时间(15.11 ± 3.71) d, 与 EA E 组比较差异不显著。

2.2 RT-PCR 检测脑组织 HO-1 mRNA 表达 对照组大鼠脑组织仅有少量 HO-1 mRNA (390 bp) 表达(0.27 ± 0.05)。诱导大鼠 EA E 1 d 后, 即可见 HO-1 mRNA 表达升高, 7 d 达到高峰(1.11 ± 0.12), 14 d 时开始下降(1.06 ± 0.18), 至 21 d HO-1 mRNA 表达基本回落至对照组水平(0.37 ± 0.10), 分别为对照组的 1.98、4.05、3.86 和 1.35 倍。与同期 EA E 组比较, 应用 NF- κ B 特异性抑制剂 PDTC 后, 脑组织 HO-1 mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.01$), 分别为对照组的 0.529、2.774、2.628、0.803 倍。实验各组 β actin mRNA 的表达量在各组间无明显差异。

3 讨论

EA E 的发生是由于针对自身髓鞘特异性的 T 细胞激活为主的自身免疫性脱髓鞘疾病。近年研究认为, 氧化应激在 EA E 的发病中也起着不可忽视的作用。其中尤以 HO-1 的清除氧自由基, 保护脑细胞的作用最为显著。HO-1 是诱生型酶, 在组织病理发生中起着重要作用, 可被多种因素诱导, 如氧化应激、热休克、紫外线辐射、缺血再灌注、炎症细胞因子(如 L-1、TNF- α ^[4])、一氧化氮(NO)、血红素等^[5,6]。能催化具有强氧化活性的血红素最终生成等分子的胆绿素/胆红素、一氧化碳(CO)、游离铁。胆绿素/胆红素是一种强力的抗氧化剂; CO 既是重要的气体

信使分子,又可以抑制NO的活性,减轻其损害;游离铁可以刺激细胞表达铁蛋白,隔离游离铁,达到保护细胞的作用^[5]。

在脑中,HO-1能对应激因素作出快速强烈反应。可下调细胞免疫功能,包括NK细胞和T淋巴细胞介导的细胞毒,并可抑制淋巴细胞增生反应^[7]。其代谢产物CO和NO之间的作用也支持HO-1的抗炎性作用^[8]。HO-1对NO和(或)随后产生的氧化应激均表现出防御反应^[9]。本实验发现,随着EAE诱导后病程的延长,HO-1 mRNA水平迅速增高,其中HO-1 mRNA表达在发病7 d(潜伏期)即达到高峰,EAE 14 d(发病期)开始下降;EAE 21 d(恢复期)接近对照组水平,显示出与EAE病程明显相关,提示HO-1可能在调节神经系统的炎症反应中起着重要作用。由于HO-1启动子区含有NF- κ B结合位点,而NF- κ B正是调节炎症细胞因子的关键环节^[10,11],如TNF、L-1、L-2、IFN- γ 、ICAM-1、VCAM-1、炎性酶类(NOS)等,从而在EAE发病中起着关键的作用^[13]。

正常情况下NF- κ B以一种无活性的形式与其抑制性蛋白(I κ B)相结合存在于胞质中,应激、炎症、自由基、细胞因子等刺激因素可以通过一个或多个信号途径使I κ B磷酸化、泛素化、降解,NF- κ B与之解离并由胞质移位至胞核,与DNA上启动子区域相应的靶基因位点结合,从而启动一系列免疫相关基因(如L、TNF等)的转录程序,使其表达增多,从而引起或进一步加重体内炎症反应^[11,12]。但是有关NF- κ B和HO-1之间的相关性尚未见报道。

本研究发现,应用NF- κ B特异性抑制剂PDTC后,EAE大鼠发病率、病情程度显著降低,脑组织HO-1 mRNA水平也较同期EAE大鼠显著降低,说明PDTC可能通过阻断NF- κ B激活而部分抑制了HO-1的表达,减轻了脑组织的氧化损伤程度。提示HO-1可能是NF- κ B的下游作用元件,NF- κ B水平的高低可以调节HO-1的活性及其生物学作用,所以探索调节NF- κ B活性的药物及用量可能是临床治疗该病的新途径之一。

[参考文献]

[1] Emerson MR, Levine SM. Heme oxygenase-1 and NADPH cy-

tochrome P450 reductase expression in experimental allergic encephalomyelitis: an expanded view of the stress response [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(6): 2555-2562

[2] 檀国军, 杨天祝, 赵晓云, 等. 脑组织核因子- κ B激活对实验性变态反应性脑脊髓炎的作用研究[J]. *生理学报*, 2003, 55(1): 58-64

Tan GJ, Yang TZ, Zhao XY, et al. The role of activation of nuclear factor-kappa B of rat brain in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis [J]. *Shengli Xuebao (Acta Physiol Sin)*, 2003, 55(1): 58-64

[3] Shibahara S, Sato M, Muller RM, et al. Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter [J]. *Eur J Biochem*, 1989, 179(3): 557-563

[4] 郭建增, 周岐新. 脑血红素加氧酶系统的作用研究[J]. *生理科学进展*, 2002, 33(1): 26-29

Guo JZ, Zhou QX. The research into function of heme oxygenase system in brain [J]. *Shengli Kexue Jizhan (Prog Physiol Sci)*, 2002, 33(1): 26-29

[5] Wagener FA, Eggert A, Boem OC, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase [J]. *Blood*, 2001, 98(6): 1802-1811

[6] Ono S, Zhang ZD, Marton LS, et al. Heme oxygenase-1 and ferritin are increased in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage in monkeys [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(7): 1066-1076

[7] Woo J, Iyer S, Mori N, et al. Alleviation of graft-versus-host disease after conditioning with cobalt protoporphyrin, an inducer of heme oxygenase-1 [J]. *Transplantation*, 2000, 69(4): 623-633

[8] Hara E, Takahashi K, Takeda K, et al. Induction of heme oxygenase-1 as a response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(2): 227-236

[9] Huang LE, Wilmore WG, Gu J, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(13): 9038-9044

[10] 张凤蕴, 吕雪莹, 于伟玲, 等. 实验性变态反应性脑脊髓炎中几种细胞因子的测定 [J]. *中国神经免疫和神经病学杂志*, 2000, 7(1): 45-48

[11] Pahan K, Sheikh FG, Nambodiri AM, et al. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia and macrophages [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(11): 2671-2679

[12] Samoiova EB, Horton JL, Hilliard B, et al. L-6 deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of L-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells [J]. *J Immunol*, 1998, 161(12): 6480-6486

[收稿日期] 2004-01-30

[修回日期] 2004-05-20

[本文编辑] 孙岩