

血红素加氧酶系统在高脂和糖尿病小鼠脑组织的表达

野战鹰¹, 王培¹, 张振芳¹, 李铮¹, 钱涛¹, 邢邯英²

(河北省人民医院 1 神经外科, 2 老年病实验室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 糖尿病; 血红素加氧酶 1; 血红素加氧酶 2 脑

[摘要] 目的 观察和比较高脂与糖尿病小鼠脑组织中血红素加氧酶 1 和血红素加氧酶 2 的表达水平。方法 应用逆转录聚合酶链反应、Western Blotting 和免疫组织化学技术分别检测高脂饲养、高脂饲养 + 链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠脑组织血红素加氧酶 1 和血红素加氧酶 2 的 mRNA 及蛋白的表达。结果 高脂组和糖尿病组血红素加氧酶 1 的 mRNA 和蛋白表达均明显升高, mRNA 表达水平分别是相应对照组的 1.63 倍和 1.60 倍 ($P < 0.01$); 但血红素加氧酶 2 表达仅在糖尿病组升高 ($P < 0.01$), 其蛋白表达水平为对照组的 1.83 倍 ($P < 0.01$)。结论 糖尿病小鼠脑组织血红素加氧酶系统高水平表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Heme Oxygenase System in the Brain of High Fat and Diabetic Mouse

YE Zhan-Ying¹, WANG Pei¹, ZHANG Zhen-Fang¹, LI Zheng¹, QIAN Tao¹, and XING Han-Ying²

(1 Department of Neurosurgery, 2 Geriatric Key Laboratory, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

[KEY WORDS] Diabetes; Heme Oxygenase-1; Heme Oxygenase-2; Brain

[ABSTRACT] **Aim** To observe and compare the expression of heme oxygenase-1 and -2 in the brain of high fat and diabetic mouse. **Methods** Heme oxygenase expression was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western Blotting and immunohistochemistry. **Results** More significant heme oxygenase-1 mRNA and protein expression were observed both in the brain of high fat mouse and diabetic mouse, and the mRNA expression were 1.63 times and 1.60 times of those of control group. Elevated expression of heme oxygenase-2 were observed only in the brain of diabetic mouse, and the quantitative evaluation showed that heme oxygenase-2 protein was increased 1.83-fold in the diabetic group compared with that of control group. **Conclusion** Heme oxygenase was over-expressed in the brain of diabetic mouse.

糖尿病可以影响中枢神经系统, 其中氧化损伤是重要因素之一, 已证实在实验性糖尿病动物脑组织中存在广泛的氧化应激和代谢紊乱, 导致神经元退行性改变以及胶质细胞形态和功能异常^[1, 2]。血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO) 为血红素分解过程的限速酶, 其诱导型 HO-1 可被多种氧化应激因素所诱导, 是机体的一种自身保护性蛋白, 其表达增高可能为体内抗氧化应激系统提供一个代偿机制^[3, 4]; HO-2 虽为固有型, 但在脑组织中高表达并可被糖皮质激素所诱导。HO-1 是灵敏反应组织的氧化应激水平及组织本身抗氧化反应能力的极好指标, 本研究拟通过建立高脂及糖尿病小鼠模型, 观察脑组织 HO 系统的变化趋势, 以了解主要组织器官

在高脂、高糖状态下的氧化应激状态。

1 材料和方法

1.1 试剂

链脲佐菌素为美国 Sigma 公司产品, Trizol 为 Invitrogen 产品, HO-1、HO-2 兔多抗为北京博奥森公司产品, GAPDH 单抗购自上海康成, PCR 扩增体系为 Promega 产品。

1.2 模型制备和分组

健康雄性 BCBL/B57 小鼠 48 只, 体重 15~20 g, 随机分成 4 组: ①高脂组: 饲养标准高脂饲料 8 周 (美国 Research Diets 公司提供, 热量组成为碳水化合物 20%、脂肪 60%、蛋白质 20%, 总热量为 5.24 kcal/g); ②糖尿病组: 饲养标准高脂饲料 6 周后按 180 mg/kg 总剂量分 3 次 (隔日) 腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病模型, 4 天后剪尾测血糖, 以血糖 $> 11.1 \text{ mmol/L}$ 确定为糖尿病小鼠, 链脲佐菌素注射 4 周后处死动物; ③高脂对照组: 用正常饲料饲养 8 周 (由美国 Research Diets 公司提供, 热量组成为碳水

[收稿日期] 2010-08-11 [修回日期] 2010-10-13

[基金项目] 河北省科技厅科技支撑项目 (072761171); 河北省医学科学研究重点课题 (20090240)

[作者简介] 野战鹰, 硕士, 主治医师, 研究方向为血管病理生理, Email 为 yezy33@tm.com。通讯作者邢邯英, 博士, 主治医师, 主要从事糖尿病病理生理学研究。

化合物 70%、脂肪 10%、蛋白质 20%，总热量为 3 85 kcal/g); 糖尿病对照组:用正常饲料饲喂 10周。

1.3 实验取材

10%水合氯醛(3.0~3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉小鼠,断头处死,冰盘上迅速取脑,以冰冷生理盐水洗净组织表面血液。取左侧脑组织 4%多聚甲醛固定用于免疫组织化学观察;分离右侧大脑皮层组织,液氮中速冻后放于-80℃冰箱保存用于 RT-PCR 和 Western Blotting 检测。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测脑组织血红素加氧酶 mRNA 的表达

Trizol 一步法提取各组脑组织总 RNA。逆转录反应总体积为 25 μ L,包括 RNA 10 μ g,取逆转录反应液,分别进行 HO-1、HO-2 和内参照 β -actin 基因的 PCR 扩增。扩增引物及条件参见文献[5]。用目的基因与 β -actin 吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。

1.5 Western Blotting 检测脑组织血红素加氧酶蛋白的表达

提取各组总蛋白,定量后各取 100 μ g 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将蛋白转移至硝酸纤维素膜。再分别与一抗(HO-1及 HO-2 兔多克隆抗体按 1:200 稀释, GAPDH 单抗为 1:10 000 稀释)和二抗(羊抗兔或兔抗鼠 IgG 抗体按 1:20 000 稀释)4℃过夜和室温孵育 2 h, ECL 显色、照相,图像分析仪分析结果。以特异性条带吸光度值/GAPDH 条带吸光度值纠正上样量的偏差。用此吸光度比值反映 HO-1 和 HO-2 蛋白表达情况。

1.6 免疫组织化学法检测血红素加氧酶蛋白表达

常规制作组织蜡块。组织石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢(甲醇稀释)常温下孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗 2 次,磷酸盐缓冲液漂洗 1 次,10%正常羊血清(PBS 稀释)在 37℃温箱、湿盒内孵育 30 min,用滤纸将血清吸干后,加入 HO-1、HO-2 抗血清(PBS 1:100 稀释),4℃冰箱孵育 24 h,漂洗后加入生物素标记的羊抗兔 IgG,在 37℃温箱、湿盒内孵育 60 min,加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(1:200 稀释),在 37℃温箱、湿盒内孵育 60 min。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用 0.05% DAB-0.01% 过氧化氢显色 5 min,蒸馏水停显。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 软件进行统计学分析。组间差异比较采用单因素方差分析,差异有显著性者用最小显著差法进行两两比较,以 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织血红素加氧酶的 mRNA 表达

高脂组和糖尿病组的 HO-1/ β -actin 的 OD 比值明显提高,分别是高脂对照组和糖尿病对照组的 1.63 倍和 1.60 倍(P 均 < 0.01);但 HO-2 表达仅在糖尿病组升高($P < 0.01$),高脂组 HO-2/ β -actin 的 OD 比值与高脂对照组相比差异无统计学意义(图 1 和表 1)。

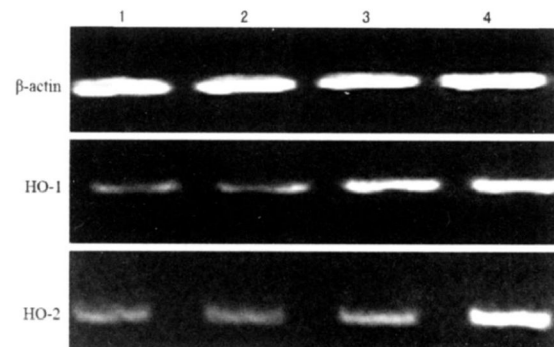


图 1 脑组织血红素加氧酶 mRNA 的 RT-PCR 扩增图片 1 为高脂对照组,2 为糖尿病对照组,3 为高脂组,4 为糖尿病组。

表 1 脑组织血红素加氧酶 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	HO-1	HO-2
高脂对照组	37.18 \pm 7.71	37.36 \pm 7.42
高脂组	60.43 \pm 10.95 ^a	40.81 \pm 8.79
糖尿病对照组	43.91 \pm 8.11	35.18 \pm 5.17
糖尿病组	70.19 \pm 10.80 ^b	54.11 \pm 10.27 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与高脂对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与糖尿病对照组比较。

2.2 Western Blotting 检测脑组织血红素加氧酶蛋白表达

检测各组脑组织 GAPDH 蛋白均见明显的 36 kDa 条带,各组 OD 值与对照组相比差异均无显著性($P > 0.05$),证实各组蛋白上样量相同;高脂组和糖尿病组 HO-1 蛋白相对表达量明显增高,与高脂对照组和糖尿病对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$);HO-2 蛋白相对表达量仅糖尿病组显著升高,其 OD 值是糖尿病对照组的 1.83 倍($P < 0.01$),高脂组与高脂对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2 和表 2)。

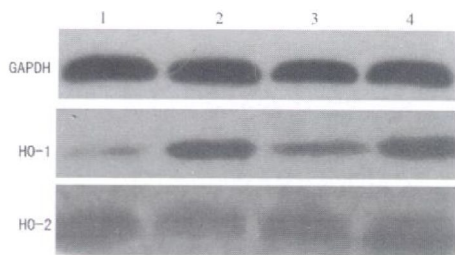


图 2 Western Blotting检测脑组织血红素加氧酶蛋白表达

1为高脂对照组, 2为高脂组, 3为糖尿病对照组, 4为糖尿病组。

2.3 免疫组织化学法观察脑组织血红素加氧酶蛋白表达

高脂对照组和糖尿病对照组脑组织仅见少量弱

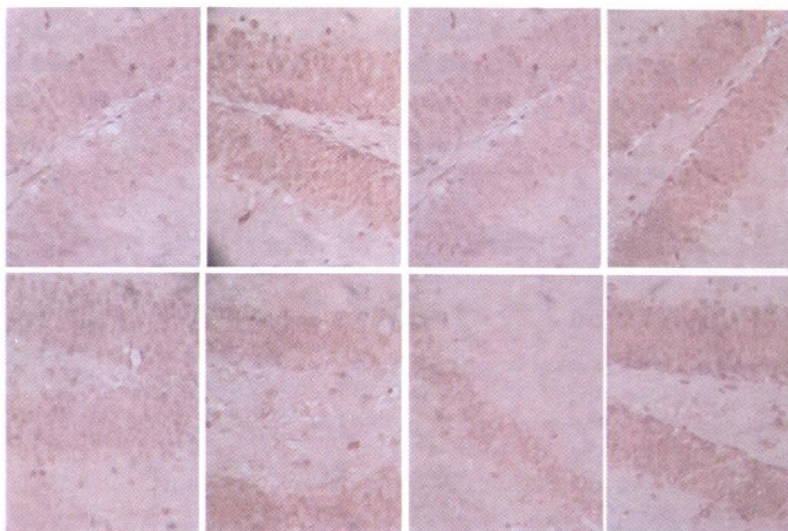


图 3 免疫组织化学法观察脑组织血红素加氧酶 1(上图)和血红素加氧酶 2(下图)蛋白表达 从左到右依次为高脂对照组、高脂组、糖尿病对照组和糖尿病组。

3 讨论

血红素加氧酶是血红素降解的起始酶和限速酶, 长期以来, 人们对 HO 的认识只局限于其维持血红素代谢平衡, 但近年来越来越多的资料表明, HO 及其代谢产物对机体多种生理和病理过程的发生、发展具有重要意义, 尤其对于 HO 的诱导型即 HO-1 的研究证实它就是热休克蛋白 32, 是目前发现的受最多因素诱导的应激蛋白, 是细胞对抗氧化应激的重要组成部分^[6-8]。HO 包括三种同工酶, 即 HO-1、HO-2 和 HO-3。它们是不同的基因编码的产物, 虽然都参与血红素代谢, 但一级结构、氨基酸组成、组织分布、调节因素以及功能等方面均有很大差异。HO-2 属于结构型, 存在于大多数组织细胞中, 但在

的 HO-1 和 HO-2 黄染阳性信号, 散在分布于组织之间; 而糖尿病组和高脂组脑组织内棕黄色阳性信号明显增多、增强, 其中海马区细胞可见强阳性信号(图 3)。

表 2 脑组织血红素加氧酶蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	HO-1	HO-2
高脂对照组	26.15 ± 5.69	36.10 ± 6.37
高脂组	51.23 ± 6.98 ^a	33.06 ± 8.23
糖尿病对照组	32.22 ± 5.56	32.55 ± 6.12
糖尿病组	58.96 ± 8.92 ^b	59.88 ± 5.23 ^b

a为 $P < 0.01$, 与高脂对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与糖尿病对照组比较。

脑组织中高表达, 在生理状况下组织中的 HO 活性主要由 HO-2 决定(但是脾脏除外)。HO-2 表达稳定, 几乎不受外界刺激因素的影响, 目前仅知大脑组织中 HO-2 的转录受肾上腺皮质激素的调节^[9-10]。因此, HO-2 对正常人体内环境的稳定起重要作用。

一般来讲, 氧化应激因素往往诱导 HO-1 的表达增加, 具有增加机体抵抗力、维持机体生存等重要作用。其下游产物一氧化碳、游离铁和胆绿素(胆绿素随即被还原为胆红素)具有抗炎、抗凋亡和抗氧化作用, 在许多疾病中都发挥重要作用^[11-13]。但是 HO 的过度表达将会加重氧化应激而产生细胞损伤作用, 其下游产物尤其是游离铁对脑细胞是有害的^[14]; 胆绿素、胆红素既可作为一种抗氧化剂, 同时也可通过抑制突触神经递质运输发挥神经毒性作

用^[15,16],由此可见探讨糖尿病脑损伤中HO的作用具有积极的意义,而确定其表达水平是第一步的工作。我们发现高脂组和糖尿病组的HO-1表达均增高,但仅在糖尿病小鼠脑组织中发现HO-2增高,这证实了高糖加高脂因素的刺激对脑组织HO系统的过度诱导,提示适时、适量的应用HO抑制剂对脑组织可能会存在一定的保护作用。而在高脂组仅发现HO-1的轻度增高,我们判断这是脑组织氧化应激反应的表现,此时是否应用HO抑制剂有待商榷。

近来有关HO与糖尿病及其并发症的研究备受重视,研究涉及细胞、器官和整体各层次水平,但是研究者并未对糖尿病时HO尤其是HO-1的表达改变趋势达成共识。我们考虑这正是糖尿病疾病复杂性的体现,是机体病理发展多因素参与的结果。需要注意的是针对各重要脏器而言,HO的表达水平存在组织特异性,如果能够借助转基因技术定向调控HO表达,避免在其它脏器中HO-1过度或消减表达引起可能的负面作用,这将是HO-1的最佳应用方案。

[参考文献]

- [1] Arrick DM, Sharpe GM, Sun H, et al. Diabetes-induced cerebrovascular dysfunction: role of poly(ADP-ribose) polymerase [J]. *Microvasc Res* 2007; **73** (1): 1-6
- [2] Biessels GJ, Heide LP, Kannal A, et al. Ageing and diabetes: implications for brain function [J]. *Eur J Pharmacol* 2002; **441** (1-2): 1-14
- [3] Wagener FA, Volk HD, Willis D, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation [J]. *Pharmacol Res* 2003; **55** (3): 551-571
- [4] Cheng PY, Lee YM, Shih NL, et al. Heme oxygenase-1 contributes to the cytoprotection of alpha-lipoic acid via activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells [J]. *Free Radic Biol Med* 2006; **40** (8): 1313-322
- [5] 邢郁英,野战鹰,赵晓云,等. 血红素加氧酶-1对糖尿病大鼠胸主动脉功能的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2007; **15** (11): 684-686
- [6] 牟娇,何作云,王晓兵,等. 血红素氧合酶1-一氧化碳和一氧化氮合酶1-一氧化氮系统在动脉粥样硬化中的作用及其相关性研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; **13** (4): 403-405
- [7] Zeynalov E, Shah ZA, Li RC, et al. Heme oxygenase 1 is associated with ischemic preconditioning-induced protection against brain ischemia [J]. *Neurobiol Dis* 2009; **35** (2): 264-269
- [8] Zheng Y, Liu Y, Ge J, et al. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression [J]. *Mol Vis* 2010; **16**: 1467-474
- [9] Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2000; **46** (3): 573-585
- [10] Zhao H, Wong RJ, Nguyen X, et al. Expression and regulation of heme oxygenase isozymes in the developing mouse cortex [J]. *Pediatr Res* 2006; **60** (5): 518-523
- [11] Lim, Peterson S, Husney D, et al. Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin [J]. *Antioxid Redox Signal* 2007; **9** (7): 855-863
- [12] Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, et al. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels [J]. *Atherosclerosis* 2002; **160** (2): 449-456
- [13] 刘大男,吴立荣,方颖,等. 血红素氧合酶1/一氧化碳系统对球囊损伤后内膜增殖及内皮功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010; **18** (6): 425-429
- [14] Nakatsuka I, Maeda S, Andoh T, et al. Oxidative changes in the rat brain by intraperitoneal injection of ferric nitrilotriacetate [J]. *Redox Rep* 2009; **14** (3): 109-114
- [15] 何院娟,李凤菊,李静,等. 血清总胆红素与动脉硬化性脑梗死发病率的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010; **18** (2): 157-158
- [16] Chen-Roetling J, Li Z, Chen M, et al. Heme oxygenase activity and hemoglobin neurotoxicity are attenuated by inhibitors of the MEK/ERK pathway [J]. *Neuropharmacology* 2009; **56** (5): 922-928

(此文编辑 许雪梅)