

硫化氢预处理对大鼠全脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制

秦 浩¹, 顾丽泽¹, 高 丽², 郭 军¹

南京医科大学¹ 基础医学实验教学中心² 附属脑科医院神经内科, 南京 210029

通信作者: 郭 军 电话: 025-86862882, 电子邮件: Guoj69@yahoo.com.cn

摘要: **目的** 探讨硫化氢对大鼠全脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制。**方法** 采用双侧颈总动脉夹闭合并低血压方法建立全脑缺血/再灌注大鼠模型。将30只大鼠随机分为6组: (1) Sham组 ($n=5$): 大鼠接受假手术, 仅暴露双侧颈总动脉和翼小孔, 不作缺血处理; (2) 脑缺血组 ($n=5$): 电凝针烧灼两侧翼小孔内的椎动脉, 使椎动脉闭塞, 术后24h 闭塞双侧颈总动脉10min 至脑缺血; (3) 硫化氢预处理组 ($n=15$): 双侧颈总动脉闭塞30min 前, 进行腹腔注射硫化氢, 分别为12、24、48 $\mu\text{mol/kg}$ 剂量组, 以上各组给药时均将药物按所需剂量溶解于0.5ml/100g 生理盐水中; (4) NaCl 预处理组 ($n=5$): 双侧颈总动脉闭塞30min 前, 腹腔注射等量生理盐水。观察硫化氢对海马组织超氧化物歧化酶(SOD) 活性和丙二醛(MDA) 含量的影响, 进行脑水肿测定, 并检测脑内热休克蛋白70 (HSP70) 在海马组织中的表达水平。**结果** 硫化氢低 ($P=0.042$)、中 ($P=0.002$)、高剂量组 ($P=0.000$) 海马组织中的SOD 含量较脑缺血组明显增高, 脑缺血组海马组织中的SOD 活性较Sham 组明显降低 ($P=0.003$); 硫化氢中 ($P=0.026$)、高剂量组 ($P=0.015$) 海马组织中的MDA 含量较脑缺血组明显降低; 硫化氢中 ($P=0.018$)、高剂量组 ($P=0.008$) 的脑组织含水量较脑缺血组明显降低, 脑缺血组脑组织含水量较Sham 组明显增高 ($P=0.009$); 硫化氢中剂量组的HSP70 表达较脑缺血组明显减少 ($P=0.000$), 脑缺血组的HSP70 表达较Sham 组明显增加 ($P=0.000$), NaCl 预处理组与Sham 组的HSP70 表达差异有统计学意义 ($P=0.000$)。**结论** 硫化氢对全脑缺血/再灌注损伤的保护作用机制可能与提高SOD 活性, 清除氧自由基, 抑制脂质过氧化, 下调HSP70 蛋白在海马内的表达有关。

关键词: 硫化氢预处理; 全脑缺血/再灌注; 热休克蛋白70; 氧化应激; 脑水肿

中图分类号: R743.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2013)03-0249-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.03.002

Protective Effect of H₂S Pretreatment on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury and Its Mechanisms in Rats

QIN Hao¹, GU Li-ze¹, GAO Li², GUO Jun¹

¹Laboratory Center for Basic Medical Science, ²Department of Neurology, Nanjing Brain Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: GUO Jun Tel: 025-86862882, E-mail: Guoj69@yahoo.com.cn

ABSTRACT: Objective To investigate the protective effect of H₂S pretreatment after cerebral ischemia/reperfusion injury and its mechanisms in rats. **Methods** The rat model of global cerebral ischemia/reperfusion injury was established by bilateral common carotid arteries occlusion combined with hemorrhagic hypotension. 30 rats were randomly divided into four groups: (1) sham group ($n=5$), in which rats received sham surgery on-

ly, with their bilateral vertebral artery and bilateral common carotid artery exposed but without ischemia treatment; (2) global cerebral ischemia/reperfusion model group (IR group, $n=5$), in which the global cerebral ischemia was induced by 10-min occlusion of bilateral common carotid arteries combined with hypotension; (3) H₂S pretreatment group ($n=15$), in which H₂S (12, 24, 48 $\mu\text{mol/kg}$) was intraperitoneally injected before operation; (4) NaCl pretreatment group ($n=5$), in which the rats were intraperitoneally injected with saline 30 minutes before operation. The activities of superoxide dismutase (SOD) and the levels of malondialdehyde (MDA) in brain were measured by spectrophotometry. Brain water content was detected. The expression of heat shock protein 70 (HSP70) in the hippocampus was determined by Western blotting. **Results** The SOD activities were significant increased in groups pretreated with 12 $\mu\text{mol/kg}$ H₂S ($P=0.042$), 24 $\mu\text{mol/kg}$ H₂S ($P=0.002$), and 48 $\mu\text{mol/kg}$ H₂S ($P=0.000$), and the SOD activity was significantly lower in the ischemia group than in the Sham group ($P=0.003$). The MDA activities in the 24 $\mu\text{mol/kg}$ group ($P=0.026$) and the 48 $\mu\text{mol/kg}$ group ($P=0.015$) groups were significantly lower than in the IR group. The brain water content was decreased in H₂S pretreatment group (24 $\mu\text{mol/kg}$ and 48 $\mu\text{mol/kg}$) compared with IR group ($P=0.018$, $P=0.008$), and it was also significantly higher in the IR group than in the sham group ($P=0.009$). The expression of HSP70 were decreased in H₂S pretreatment group (24 $\mu\text{mol/kg}$) compared with the IR group ($P=0.000$), and the expression of HSP70 were significantly higher in the IR group than in HSP70 group ($P=0.000$). The expression of HSP70 also significantly differed between NaCl group and HSP70 group ($P=0.000$). **Conclusion** H₂S has protective effects on cerebral ischemia and reperfusion, which may be achieved by improving SOD activity, removing oxygen free radicals, inhibiting lipid peroxidation, and down-regulating the expression of HSP70 in the hippocampus.

Key words: H₂S pretreatment; cerebral ischemia/reperfusion; heat shock protein 70; oxidative injury; brain water content

Acta Acad Med Sin. 2013,35(3):249-253

硫化氢是继一氧化氮和一氧化碳之后的又一气体信号分子,具有抗氧化应激损伤的作用,早期研究多集中在大脑毒性方面^[1-4]。近来研究显示,硫化氢在脑缺血中具有一定的保护作用,机制与硫化氢对脑内的血管平滑肌、炎症因子细胞凋亡、下调 c-Fos 蛋白、促进肌浆网摄取 Ca²⁺ 和促进 Na⁺/Ca²⁺ 体将 Ca²⁺ 排出细胞外等因素的影响有关^[5-9]。本研究初步探讨了硫化氢对大鼠全脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制。

材料和方法

材料 SD 大鼠 30 只,体质量 220~250g,分笼饲养,自由饮水饮食,标准颗粒饲料,室温 18~22℃,由南京医科大学基础医学实验教学中心提供。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20110715)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20110714) 由南京建成生物工程研究所提供,抗热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司,抗 β -actin 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,硫化氢由南

京医科大学基础医学实验教学中心周红老师提供。

动物分组及给药 将 30 只大鼠随机分为 6 组: (1) Sham 组 ($n=5$): 大鼠接受假手术,仅暴露双侧颈总动脉和翼小孔,不作缺血处理; (2) 脑缺血组 ($n=5$): 电凝针烧灼两侧翼小孔内的椎动脉,使椎动脉闭塞,术后 24h 后闭塞双侧颈总动脉 10min 至脑缺血; (3) 硫化氢预处理组 ($n=15$): 双侧颈总动脉闭塞 30min 前,进行腹腔注射硫化氢,分别为低 (12 $\mu\text{mol/kg}$)、中 (24 $\mu\text{mol/kg}$)、高剂量组 (48 $\mu\text{mol/kg}$),以上各组给药时均将药物按所需剂量溶解于 0.5ml/100g 生理盐水中; (4) NaCl 预处理组: 双侧颈总动脉闭塞 30min 前,腹腔注射等量生理盐水。

大鼠全脑缺血再灌注模型的建立 采用 Pulsinelli 法^[10]略加改良制作大鼠四动脉结扎模型,10% 水合氯醛 (350mg/kg) 麻醉大鼠,颈正中切口并分离双侧颈总动脉,置 4 根丝线备用。颈背部正中切口,分离肌层,暴露第一颈椎两侧的翼小孔,电凝闭塞其下的椎动脉,缝合,回笼。24h 后,清醒状态下固定大鼠,提起双侧颈总动脉,用无创性小动脉夹夹闭,造成全脑缺血。模型成功标准: 翻正反射消失,呼吸加快,

竖毛, 双侧瞳孔放大, 眼发白。缺血 10 min, 松开动脉夹使之再灌 6h, 回笼饲养, 自由饮水饮食^[11]。

大鼠海马组织匀浆 SOD 和 MDA 含量的测定 再灌注 6h 后断头取脑, 在冰浴中取出部分左大脑半球海马组织, 以 4℃ 的生理盐水冲洗, 并用 4℃ 的生理盐水制成 10% 的匀浆液, 4℃ 离心 10min, 3000r/min ($r=3.5\text{cm}$)。剩余部分海马组织称重后于冰浴下按照重量体积比 1:9 加入生理盐水用玻璃匀浆器制备 10% 海马组织匀浆供 Western blot 法测定 HSP70 表达。用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量: 分别配制标准管、标准空白管、测定管以及测定空白管, 漩涡混匀器混匀, 试管口用保鲜薄膜扎紧, 用针头刺一小孔, 95℃ 水浴 40 min, 取出后流动水冷却, 然后 4℃ 离心 10 min, 4000r/min ($r=3.5\text{cm}$)。取上清液, 用 751 分光光度计于波长 532nm 处, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值, 根据计算公式计算各样本 MDA 含量。黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性: 分别配制测定管、对照管。用漩涡混匀器充分混匀, 置 37℃ 恒温水浴 40 min, 用 751 分光光度计于波长 540nm 处, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值, 按公式计算各样本 SOD 含量。

脑水肿测定 将右脑组织烘干 (100℃, 24h), 称重, 按照 Elliott 公式, 求出脑组织含水量。脑组织含水量计算公式: 脑组织含水量 (%) = (脑湿重 - 脑干重) / 脑湿重 × 100%。

Western blot 法测定脑组织 HSP70 表达 取左大脑半球海马组织剩余部分制备的海马匀浆, 4℃ 下离心 10min, 12 000r/min ($r=3.5\text{cm}$), 收获上清蛋白质, 取 20 μg 样品蛋白质点样于 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳分离后转移至硝酸纤维素膜, 分别用羊抗 HSP70 多克隆抗体 (1:1000) 及 HRP 标记的兔抗羊 IgG (1:2000) 进行孵育, 用 DAB 进行显色。

统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 实验数据以均数 ± 标准差表示, 先行方差分析, 组间比较采用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

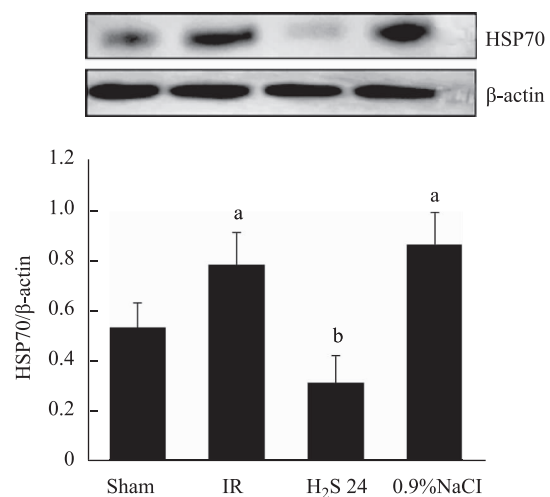
结 果

硫化氢对全脑缺血/再灌注模型大鼠海马组织 SOD 和 MDA 含量变化的影响 Sham 组, 脑缺血组, 硫化氢低、中、高剂量组和 NaCl 预处理组海马组织中的 SOD 含量分别为 (233.47 ± 5.38)、(221.32 ± 1.88)、(225.88 ± 2.03)、(233.09 ± 3.21)、(232.62 ± 1.49) 和 (225.36 ± 6.86) U/mg, 其中, 硫化氢低

($P = 0.042$)、中 ($P = 0.003$)、高剂量组 ($P = 0.000$) 明显高于脑缺血组, 脑缺血组明显低于 Sham 组 ($P = 0.003$)。Sham 组, 脑缺血组, 硫化氢低、中、高剂量组和 NaCl 预处理组海马组织中的 MDA 含量分别为 (0.607 ± 0.019)、(0.924 ± 0.015)、(0.897 ± 0.013)、(0.886 ± 0.011)、(0.879 ± 0.009) 和 (0.938 ± 0.003) $\mu\text{mol/g}$, 其中, 硫化氢中 ($P = 0.026$)、高剂量组 ($P = 0.015$) 明显低于脑缺血组。

硫化氢对全脑缺血/再灌注模型脑组织含水量的影响 Sham 组, 脑缺血组, 硫化氢低、中、高剂量组和 NaCl 预处理组脑组织的含水量分别为 (76.21 ± 0.46)%、(79.68 ± 1.29)%、(79.00 ± 0.29)%、(78.51 ± 0.81)%、(77.04 ± 0.21)% 和 (79.25 ± 0.45)% , 其中, 硫化氢中 ($P = 0.018$)、高剂量组 ($P = 0.008$) 的脑组织含水量较脑缺血组明显降低, 脑缺血组脑组织含水量较 Sham 组明显增高 ($P = 0.009$)。

硫化氢对全脑缺血/再灌注模型脑组织 HSP70 蛋白的影响 Sham 组的 HSP70 蛋白水平明显低于脑缺血组 ($P = 0.000$) 和 NaCl 预处理组 ($P = 0.000$), 硫化氢中剂量组的 HSP70 蛋白水平明显低于 Sham 组 ($P = 0.001$)、脑缺血组 ($P = 0.000$) 和 NaCl 预处理组 ($P = 0.000$) (图 1)。



IR: 脑缺血再灌注组; H₂S 24: 硫化氢中剂量组 (24 $\mu\text{mol/kg}$)
 IR: ischemia/reperfusion injury group; H₂S 24: H₂S (24 $\mu\text{mol/kg}$) pretreatment group
 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.01$
^a $P < 0.01$ compared with Sham group; ^b $P < 0.01$ compared with IR group

图 1 Western blot 检测 HSP70 蛋白在大鼠海马组织中的表达量
Fig 1 Expression of HSP70 protein in rat hippocampi (Western blotting)

讨 论

脑缺血再灌注导致脑组织损伤,其病因学机制涉及自由基损伤、炎症反应、白细胞的作用、神经细胞凋亡和星形细胞水肿改变显著等病理学过程^[12]。在生理条件下,体内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除处理动态平衡。当ROS产生过多或抗氧化系统出现障碍时,ROS蓄积而攻击机体,即为氧化应激。氧化应激不但直接导致细胞坏死,而且还通过线粒体通路、DNA修复酶和转录因子等介导细胞凋亡^[13-15]。正常情况下,在体内存在清除自由基和抑制自由基反应的酶系统,如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等清除ROS,使之维持自由基产生和清除的动态平衡,起到保护线粒体和细胞膜结构和功能完整的作用。脑缺血后血流的再通对缺血组织非常重要,而再灌注本身可导致级联反应对脑组织损伤。再灌注过程中,分子氧再次进入缺血组织增加了ROS的产量,当ROS的水平超过了内源性抗氧化酶活性后就导致细胞的氧化损伤^[16]。在某些病理情况下抗氧化系统出现障碍时,ROS蓄积而攻击机体,直接引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白及酶变性、DNA损害,最后导致细胞死亡或凋亡、组织损伤、疾病发生,目前认为,氧化应激损伤是脑缺血/再灌注损伤的重要原因,并在脑缺血/再灌注损伤急性期的各个环节中起重要作用。

SOD作为内源性氧自由基清除剂的代表,其活力在一定程度上反映了内源性氧自由基的清除活力,MDA是SOD引发脂质过氧化反应的终产物,它可损伤生物膜脂质双分子层结构,其浓度增高反映了细胞膜上脂质过氧化反应增强。因而,MDA的含量可反映体内脂质过氧化损伤和氧化应激的水平。

脑缺血引起一系列应急反应,能够引起HSP70在脑中的表达和分布^[17-18],HSP70家族在原核及真核细胞内含量最为丰富且最为保守^[19]。正常生理情况下,HSP70蛋白在脑内呈低水平,各种应激情况如热休克或缺血缺氧等刺激可迅速诱导HSP70蛋白的增加^[20],HSP70蛋白与神经损伤程度有密切关系,其表达强度可作为判断神经细胞损伤程度的一种分子生物学指标^[21]。

硫化氢的脑缺血保护机制有多种,硫化氢联合浅低温可通过上调海马磷酸化环腺苷酸反应元件结合蛋白(phosphorylated cAMP responsive element binding pro-

tein, p-CREB)和海马神经元脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA的表达,减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。本研究发现,硫化氢对脑缺血有明显的保护作用,可显著提高脑缺血/再灌注损伤大鼠脑组织中SOD活性,减少脂质过氧化产物MDA的生成,保护细胞膜免受自由基的损害。研究中脑缺血组SOD活性明显下降MDA含量升高,与Sham组比较差异显著,说明脑缺血再灌注的急性期可产生大量的自由基,使MDA含量升高,并消耗SOD使其活性下降,对脑组织具有明显的破坏作用。

此外,本研究从蛋白水平探讨了缺血再灌注后HSP70蛋白在脑内含量及硫化氢对其含量的影响,结果显示,缺血再灌注损伤可明显诱导HSP70蛋白在海马区的含量,硫化氢预处理可显著抑制HSP70蛋白含量的增加,提示硫化氢可能通过抑制HSP70蛋白在脑内的含量而对脑缺血再灌注损伤产生保护效应。

综上,本研究证实了硫化氢对脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制与抗氧化应激损伤、降低HSP70蛋白在海马中表达有关,为脑缺血损伤的预防,治疗提供了一种新的思路。

参 考 文 献

- [1] Boehning D, Snyder SH. Novel neural modulators [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2003, 26:105-131.
- [2] Moore PK, Bhatia M, Mochhala S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(12):609-611.
- [3] Wang R. Two's company, three's a crowd; can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter [J]. *FASEB J*, 2002, 16(13):1792-1798.
- [4] 唐小卿, 冯鉴强. 第3种内源性气体信号分子 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(9):961-964.
- [5] Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(2):670-678.
- [6] Ji Y, Pang QF, Xu G, et al. Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 587(1-3):1-7.
- [7] Pan TT, Neo KL, Hu LF, et al. H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(1):C169-C177.

- [8] Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(11):917-935.
- [9] Yong QC, Lee SW, Foo CS, et al. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(3):H1330-H1340.
- [10] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3):267-272.
- [11] 吴国翠, 李静, 李卫平, 等. 黄芪提取物对大鼠全脑缺血再灌注损伤后 NF κ Bp65、ICAM-1 和 TNF- α 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2008, 43(4):406-410.
- [12] 郭玉璞, 严徽瑾, 杨蜀莲, 等. 急性脑缺血超微结构观察大鼠颈动脉结扎后病理改变 [J]. *中国医学科学院学报*, 1990, 12(2):150-152,158-159.
- [13] Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke [J]. *Int J Stroke*, 2009, 4(6):461-470.
- [14] Schattenberg JM, Worns MA, Zimmermann T, et al. The role of death effector domain-containing proteins in acute oxidative cell injury in hepatocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(9):1911-1917.
- [15] White LE, Santora RJ, Cui Y, et al. TNFR1-dependent pulmonary apoptosis during ischemic acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(5):L449-L459.
- [16] GirnHR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, et al. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies [J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2007, 41(4):277-293.
- [17] MullerGJ, Lassmann H, Johansen FF. Anti-apoptotic signaling and failure of apoptosis in the ischemic rat hippocampus [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25(3):582-593.
- [18] Ouyang YB, Xu LJ, Sun YJ, et al. Overexpression of inducible heat shock protein 70 and its mutants in astrocytes is associated with maintenance of mitochondrial physiology during glucose deprivation stress [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11(2):180-186.
- [19] Bailey CK, Andriola IF, Kampinga HH, et al. Molecular chaperones enhance the degradation of expanded polyglutamine repeat androgen receptor in a cellular model of spinal and bulbar muscular atrophy [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(5):515-523.
- [20] Molvarec A, Tamasi L, Losonczy G, et al. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15(3):237-247.
- [21] 马宏仲, 薛荣亮. 热休克蛋白与脑缺血再灌注损伤 [J]. *国外医学: 麻醉学与复苏分册*, 2004, 25(1):20-21.

(收稿日期: 2012-08-15)