

本文引用: 石计朋, 唐成和, 尚云, 等. 硫化氢和胱硫醚 β 合酶在脑室周围白质软化新生大鼠脑组织中的表达[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(1): 15-18.

【基础研究】

硫化氢和胱硫醚 β 合酶在脑室周围白质软化新生大鼠脑组织中的表达

石计朋, 唐成和, 尚云, 曹银利, 高俊, 杨卫红

(新乡医学院第一附属医院新生儿科, 河南 卫辉 453100)

摘要: 目的 探讨缺氧缺血对3日龄大鼠脑白质细胞硫化氢(H_2S)及胱硫醚 β 合酶(CBS)表达的影响, 以及其在3日龄大鼠脑白质损伤(WMD)发病过程中的作用。方法 将3日龄大鼠按照随机数字表法分为实验组和对照组, 建立新生大鼠WMD模型, 分别在缺氧缺血后第12、24、48、72 h和7 d处死大鼠, 脑组织取材后行苏木精-伊红(HE)染色, 并观察其病理变化。采取免疫组织化学法检测脑组织CBS的表达水平; 用分光光度计法测大鼠血浆中 H_2S 水平。结果 在新生大鼠脑白质中, 缺氧缺血后实验组大鼠脑组织CBS的表达和血浆 H_2S 水平在12 h开始增强, 24 h达高峰, 7 d仍可见表达; 实验组大鼠脑组织CBS的表达和血浆 H_2S 水平在缺氧缺血后12、24、48、72 h和7 d均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 新生大鼠脑组织CBS和血浆 H_2S 表达水平于缺氧缺血后显著增强, 二者可能与新生大鼠WMD的病理生理过程有关。

关键词: 新生大鼠; 缺氧缺血; 脑室周围白质软化; 胱硫醚 β -合酶; 硫化氢

中图分类号: R338.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)01-0015-04

Expression of hydrogen sulphide and cystathionine-beta-synthase in immature rats with periventricular leukomalacia

SHI Ji-peng, TANG Cheng-he, SHANG Yun, CAO Yin-li, GAO Jun, YANG Wei-hong

(Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of hypoxia-ischemia (HI) on expressions of hydrogen sulfide (H_2S) and cystathionine-beta-synthase (CBS) protein in alba of 3 days old rats, and to explore the possible role of them in pathogenesis of white matter damage (WMD). **Methods** The 3 days old rats were randomly divided into experimental group and control group. The model of WMD was established, then the rats were sacrificed at 12, 24, 48, 72 hours and 7 days after HI. The pathological change of brain tissue was observed by haematoxylin-eosin. Immunohistochemical technic was applied to investigate the change of CBS expression of in the brain tissue of the rats. The plasma level of H_2S was detected by the spectrophotometer. **Results** In the experimental group, the expression of CBS in the brain tissue of 3 days old rats and the level of H_2S increased at 12 hours and reached the peak at 24 hours after HI, which still could be found 7 days after HI. The expression of CBS in the brain tissue of 3 days old rats and the level of H_2S at 12, 24, 48, 72 hours and 7 days after HI in experimental group were higher than those in control group, there were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The expressions of CBS and H_2S in the brain tissue of 3 days old rats increase significantly after HI, and they may be involved in the pathophysiological process in the WMD.

Key words: neonate rat; hypoxia-ischemia; periventricular leukomalacia; cystathionine-beta-synthase; hydrogen sulfide

缺氧缺血导致的脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)在早产儿大脑白质损伤(white matter damage, WMD)中较为常见, 危害患儿

的神经系统, 甚至遗留严重的神经系统后遗症如脑瘫等。硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是一种新发现的可调节神经功能的气体信号分子, 对神经系统功能特别是海马的功能具有调节作用^[1]。内源性 H_2S 主要由胱硫醚 β -合酶(cystathionine-beta-synthase, CBS)参与合成; CBS在神经系统高度表达^[2]。已有大量研究证实, CBS/ H_2S 体系参与了众多神经系统疾病的发病过程, CBS/ H_2S 体系在脑缺血再灌注损

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.01.004

收稿日期: 2013-11-14

基金项目: 河南省卫生厅资助项目(编号: 200804053)

作者简介: 石计朋(1981-), 男, 河南太康人, 硕士, 住院医师, 研究方向: 新生儿疾病。

通信作者: 唐成和(1968-), 男, 河南安阳人, 硕士, 硕士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 新生儿疾病。

伤中被激活,对脑损伤产生拮抗作用^[3]。本研究以3日龄大鼠缺氧缺血性WMD模型为研究对象,观察大鼠缺氧缺血过程中不同时间点脑白质区CBS和血浆中H₂S的表达,探讨CBS/H₂S体系在3日龄大鼠缺氧缺血WMD病理生理过程中的变化规律,为防治早产儿WMD提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 80只3日龄清洁级Sprague-Dawley (SD)大鼠,体质量6.5~10.5 g,雌雄不限(新乡医学院实验动物中心提供)。链霉亲和素-生物素-过氧化物酶(streptavidin-biotin-peroxidase complex method, SABC)试剂盒、Rabbit Anti-CBS购自武汉博士德生物工程有限公司;二氨基联苯胺(diaminobezidin, DAB)显色试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立及实验分组 80只SD新生大鼠按照随机数字表法随机分为实验组(40只)和对照组(40只),新生大鼠WMD模型建立参照Back等^[4]的方法。2组大鼠乙醚麻醉后行颈正中切口,实验组大鼠分离并双线结扎右侧颈总动脉;对照组大鼠手术线穿过右侧颈总动脉但不结扎(即不予缺氧处理);随后将大鼠放于37℃水浴箱中恢复2 h,接着放入透明密封箱,输入混合气体(含体积分数6% O₂和体积分数94% N₂),气体流量为1.5 L·min⁻¹,箱内O₂体积分数设置为6%。4 h后将大鼠取出,继续在原饲养环境中母乳喂养。处死2组大鼠(各时间点每组8只)时间点:缺氧缺血后12、24、48、72 h及7 d。

1.2.2 标本取材及制备 新生大鼠吸入乙醚麻醉后,留取肝素化抗凝血1 mL, 3 000 r·min⁻¹,离心20 min,取血浆-70℃冰箱保存,待测H₂S。然后打开胸腔,心脏暴露后经左心室灌注20 mL肝素化生理盐水,同时右心耳处剪一切口,直至有清澈液体流出;继而灌注30 mL质量分数为4%冰多聚甲醛,待肺脏显著水肿、肝脏显著变白及四肢完全僵直后,亚甲蓝标记前囟位置,脑组织取出后用质量分数为4%冰多聚甲醛固定12 h;固定大鼠脑组织后,对照大鼠脑立体定位图谱,以视交叉为中心前后3 mm取材,固定后做病理切片。

1.2.3 脑组织苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosinstaining, HE)和免疫组织化学法检测CBS 石蜡切片、二甲苯透明和脱蜡各10 min,梯度乙醇水化,苏木精染色5 min,自来水冲洗5 min,盐酸乙醇分色5~10 s,自来水冲洗5 min,伊红复染3~5 min,梯度乙醇脱水,二甲苯二级透明,中性树脂胶封片,制备的HE染色切片进行常规病理观察。采用SABC方法检测脑组织内CBS的表达。切片常规脱蜡后采用枸橼酸缓冲液修复,体积分数为10%正常山羊血清工作液封闭抗原,37℃温箱、湿箱内孵育30 min;弃去山羊血清,不冲洗。加入适当稀释后的一抗(CBS稀释浓度为1:100),4℃冰箱孵育过夜,加入生物素标记的山羊抗兔IgG,37℃温箱、湿箱内再次孵育30 min;加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃温箱、湿箱内孵育30 min;DAB显色。阴性对照用PBS代替一抗,剩余步骤同上。

1.2.4 CBS阳性结果判定 CBS主要显色于细胞质,有明确棕色或棕黄色染色者为阳性细胞。每组每个时间点观察8只大鼠,每只大鼠取2张相邻的切片,光镜下观察组织切片呈棕黄色阳性部分,在10×40倍显微镜下,切片脑室旁白质和胼胝体部位分别随机取不重叠的2个视野,CBS平均光密度值采用Image pro plus 5.0图像分析软件测定。

1.3 血浆H₂S检测 采用去蛋白法^[2]检测血浆H₂S水平。在提前准备好的玻璃试管内加入0.5 mL质量分数1%的醋酸锌,均匀混入0.1 mL血浆,待血浆中硫化锌胶体形成后,加入0.5 mL 20 mmol·L⁻¹对苯二胺盐酸盐和0.5 mL 30 mmol·L⁻¹三氯化铁,室温下孵育20 min使之充分反应、显色,加入1.0 mL质量分数10%的三氯醋酸沉淀蛋白,加入蒸馏水至体积为5 mL,6 000 r·min⁻¹离心5 min,留取上清液,使用分光光度计在波长665 nm处检测光密度值,参照H₂S标准曲线测定H₂S水平。

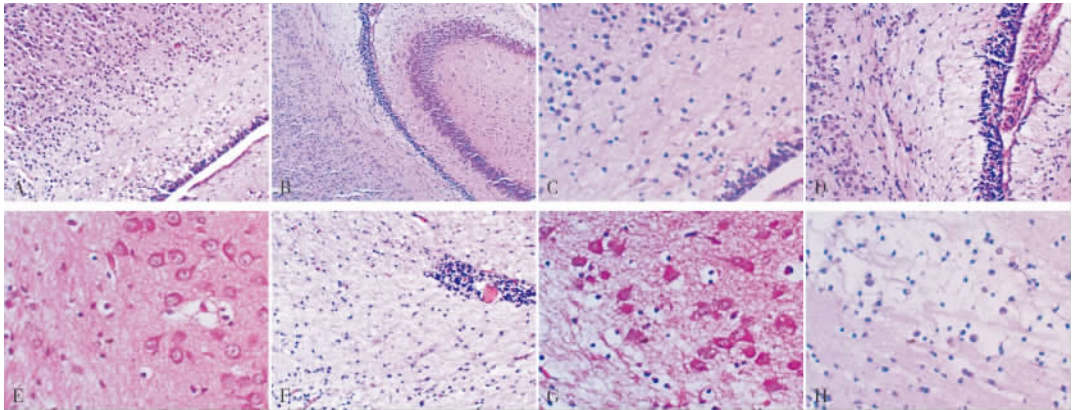
1.4 统计学处理 应用SPSS 20.0软件分析数据。各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一时间点比较采用 t 检验;不同时间点比较采用单因素方差分析;两两比较采用LSD检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理形态学改变 结果见图1。光镜

下 ,对照组大鼠侧脑室旁白质和胼胝体细胞排列有序 ,细胞核圆形、染色淡 ,双侧脑室对称 ,染色清晰 (图 1A、图 1B) 。随缺氧缺血时间延长 ,实验组大鼠病理改变呈加重趋势 ,缺氧缺血 12 h 侧脑室旁白质内胶质细胞出现肿大(图 1C) ;缺氧缺血 24 h 小胶质

细胞增生(图 1D) ;缺氧缺血 48 h 侧脑室旁白质和胼胝体胶质细胞排列紊乱 ,细胞核固缩变圆 ,胼胝体细胞稀疏(图 1E) ;缺氧缺血 72 h 可见侧脑室旁白质广泛疏松(图 1F) ;缺氧缺血 7 d 胼胝体胶质细胞可见坏死 ,侧脑室旁白质区见筛网状坏死(图 1G、图 1H) 。



A: 对照组侧脑室旁白质(×200) ; B: 对照组胼胝体(×100) ; C: 实验组 12 h 胶质细胞肿胀(×400) ; D: 实验组 24 h 胶质细胞肥大(×200) ; E: 实验组 48 h 侧脑室旁白质胶质细胞排列紊乱(×400) ; F: 实验组 72 h 侧脑室旁白质广泛疏松、紊乱、核固缩(×200) ; G: 实验组 7 d 胼胝体胶质细胞坏死(×400) ; H: 实验组 7 d 侧脑室旁白质筛网状坏死(×400) 。

图 1 2 组大鼠脑室周围白质结构改变(HE 染色)

Fig.1 Structural changes in periventricular white matter of the rats in the two groups(HE staining)

2.2 CBS 在缺氧缺血 WMD 过程中的表达及其动态变化 结果见表 1。CBS 的表达在对照组大鼠脑室周围白质和胼胝体表达较弱 ,不随时间变化而变化 ,组内各时间点比较差异无统计学意义($P > 0.05$) 。实验组大鼠在脑室周围白质和胼胝体区

表 1 2 组大鼠脑室周围白质和胼胝体区 CBS 表达的比较

CBS 于缺氧缺血 12 h 表达开始增加 ,24 h 达到高峰 ,72 h 和 7 d 降低 ,组内各时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$) 。实验组大鼠脑室周围白质和胼胝体区 CBS 表达在 12、24、48、72 h 和 7 d 均高于对照组 ,差异有统计学意义($P < 0.05$) 。

Tab.1 Comparison of expression of CBS in periventricular white matter and corpus callosum of the rats between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d	F	P
对照组	40	43.87 ± 8.38	44.83 ± 10.84	40.23 ± 8.85	42.18 ± 9.32	42.37 ± 8.80	2.311	>0.05
实验组	40	64.53 ± 9.23	122.89 ± 11.34	92.79 ± 9.24	51.98 ± 10.02	53.37 ± 11.36	4.782	<0.05
t		5.911	13.432	11.580	2.231	2.161		
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05		

2.3 缺氧缺血 WMD 过程中血浆 H₂S 水平表达及其动态变化 实验组大鼠血清中 H₂S 缺氧缺血后不同时间点表达不同 ,呈动态变化 ,于缺氧缺血 12 h 表达开始增加 ,24 h 达到高峰 ,72 h 和 7 d 时降低 ,

表 2 2 组大鼠血浆 H₂S 水平表达比较

但仍高于对照组 ,组内各时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$) 。实验组大鼠血清中 H₂S 水平表达在 12、24、48、72 h 和 7 d 均高于对照组 ,差异有统计学意义($P < 0.05$) ;见表 2。

Tab.2 Comparison of H₂S level in plasma of the rats between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d	F	P
对照组	40	22.34 ± 7.46	21.83 ± 6.84	23.13 ± 7.85	23.08 ± 9.32	22.69 ± 8.92	2.981	>0.05
实验组	40	31.24 ± 8.32	62.19 ± 12.45	54.65 ± 8.64	38.78 ± 9.88	26.38 ± 6.95	5.021	<0.05
t		4.770	10.321	9.272	2.251	2.612		
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05		

3 讨论

内源性 H_2S 是继一氧化氮和一氧化碳之后新近发现的第 3 类气体信号分子,在中枢神经系统中发挥着重要的生理作用^[6]。有实验证实,CBS/ H_2S 体系对组织缺血再灌注损伤有拮抗作用^[7]。 H_2S 能显著减少氧化应激造成的细胞死亡,在这一过程中对神经元起保护作用^[8]; CBS 是血红素蛋白,在人和动物正常生理条件下表达水平较低,研究表明,在全脑缺血再灌注损伤中前脑皮质中 CBS mRNA 表达呈动态变化^[9],参与了全脑缺血再灌注损伤的病理生理过程。

本实验检测了 WMD 过程中脑室周围白质不同时间点 CBS 和血浆中 H_2S 表达水平的变化。实验组大鼠脑室周围白质 CBS 和血浆 H_2S 的表达均于 12 h 开始增加,24 h 达到峰值,48 h 表达有所下降,72 h 和 7 d 仍高于对照组的表达水平。同时研究表明,脑缺氧缺血损伤后细胞外半胱氨酸升高^[10],半胱氨酸为合成内源性 H_2S 的底物,而 CBS 为脑组织内合成 H_2S 的酶,此时生成的 H_2S 可能参与了 WMD 的保护作用;脑缺血损伤后内源性 H_2S 可发挥清除自由基和减轻兴奋性氨基酸的毒性损伤作用^[11]。

CBS/ H_2S 体系缺氧缺血后被激活的可能机制:

(1) 细胞内钙离子超载,缺氧缺血时细胞内钙离子水平增加,钙调蛋白活性提高,与 CBS 的 C 末端钙调蛋白结合区结合后可激活 CBS 以生成 H_2S ^[2];
(2) 兴奋性氨基酸增加及其受体激活,谷氨酸和 α -氨基羟甲基- β -丙氨酸可促进脑细胞产生 H_2S ,此外,电生理刺激和 L-谷氨酰胺可增加皮层 H_2S 的产生^[2];
(3) 神经内分泌调节作用,缺氧缺血性脑损伤发生时机体呈应激状态,CBS/ H_2S 体系活性提高^[1];
(4) 其他途径。已有文献报道, H_2S 有拮抗缺氧缺血所致的脑损伤、抑制缺氧缺血性脑损伤的神经细胞凋亡的作用^[12]。本研究通过动物实验模型,发现 CBS/ H_2S 体系表达增加,揭示了在脑缺氧缺血阶段出现 CBS/ H_2S 体系的活化,可能参与了缺氧缺

血生理病理过程。

参考文献:

- [1] Gupta Y K, Dahiya A K, Reeta K H. Gaso-transmitter hydrogen sulphide: potential new target in pharmacotherapy [J]. *Indian J Exp Biol* 2010, 48(11): 1069-1077.
- [2] Eto K, Ogasawara M, Umemura K *et al.* Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation [J]. *J Neurosci* 2002, 22(9): 3386-3391.
- [3] Ren C, Du A, Li D *et al.* Dynamic change of hydrogen sulfide during global cerebral ischemia-reperfusion and its effect in rats [J]. *Brain Res* 2010, 1245: 197-205.
- [4] Back S A, Riddle A, McClure M M. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth [J]. *Stroke*, 2007, 38(2): 724-730.
- [5] Follett P L, Deng W, Dai W *et al.* Glutamate receptor mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate [J]. *J Neurosci* 2004, 24(18): 4412-4420.
- [6] Pong W W, Stouracova R, Frank N *et al.* Comparative localization of cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase in retina: differences between amphibians and mammals [J]. *J Comp Neurol* 2007, 505(2): 158-165.
- [7] 朱俊超, 邵建林, 马虹, 等. 心肌缺血再灌注损伤大鼠胱硫醚 β -合酶/硫化氢和血红素氧合酶-1/一氧化碳的相互作用 [J]. *中华医学杂志* 2008, 88(45): 3222-3225.
- [8] Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria [J]. *Antioxid Redox Signal* 2010, 12(1): 1-13.
- [9] 任彩丽, 李东亮, 赵红岗, 等. 全脑缺血-再灌注大鼠脑组织内源性硫化氢的动态变化 [J]. *中国脑血管病杂志* 2008, 5(4): 177-181.
- [10] Slivka A, Cohen G. Brain ischemia markedly elevates levels of the neurotoxic amino acid cysteine [J]. *Brain Res* 1993, 608(1): 33-37.
- [11] Chen C Q, Xin H, Zhu Y Z *et al.* Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2007, 28(11): 1709-1716.
- [12] 邓芳帆, 周细中, 方素珍, 等. 硫化氢对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后神经细胞凋亡的影响 [J]. *临床儿科杂志* 2011, 29(11): 551-556.

(本文编辑: 杨 博 英文编辑: 杨 博)