

## 外源性一氧化碳对脑缺血-再灌注损伤大鼠海马气体信号分子的影响

周银燕<sup>1)</sup>, 万晓红<sup>2)</sup>, 赵国良<sup>1)</sup>, 邵建林<sup>1)</sup>

(1) 昆明医学院第一附属医院手术麻醉科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医学院第二附属医院 SICU, 云南昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 研究外源性一氧化碳(CO)对脑缺血-再灌注损伤大鼠海马气体信号分子的影响, 探讨脑保护策略。**方法** 24只Wister大鼠随机分为四组(n=6): 对照组(I组)、脑缺血-再灌注组(II组)、脑缺血-再灌注+低浓度CO组(III组)、脑缺血-再灌注+高浓度CO组(IV组)。采用四血管阻断方法制作大鼠全脑缺血-再灌注模型, I组行假手术, III组和IV组夹闭两侧颈总动脉前30min腹腔分别注射CO 20 mL/kg或40 mL/kg, I组和II组腹腔注射等量生理盐水。缺血20min再灌注6h后处死大鼠取海马, 检测大鼠海马组织中H<sub>2</sub>S、NO和CO的量和CBS、HO和iNOS酶活性变化, 以及CBS-mRNA、iNOS-mRNA和HO-1-mRNA表达水平。**结果** II组与I组相比大鼠海马中H<sub>2</sub>S、NO和CO的量增高, CBS、HO和iNOS酶活性增加, CBS-mRNA、iNOS-mRNA和HO-1-mRNA表达增高(P<0.05或P<0.01); III组与II组比大鼠海马中H<sub>2</sub>S和CO的量增高, NO的量降低, CBS酶活性增加, iNOS和HO酶活性降低, CBS-mRNA表达增加, iNOS-mRNA和HO-1-mRNA表达降低(P<0.05或P<0.01); IV组与II组相比大鼠海马中H<sub>2</sub>S和CO的量显著增高, NO的量降低, CBS酶活性增加, iNOS和HO酶活性降低, CBS-mRNA表达增加, iNOS-mRNA和HO-1-mRNA表达降低(P<0.05或P<0.01)。**结论** 外源性CO能够诱导脑缺血-再灌注后大鼠海马CBS-mRNA的表达, 激活CBS, 抑制iNOS-mRNA和HO-1-mRNA的表达, 抑制iNOS和HO, 对HO-1/CO、CBS/H<sub>2</sub>S和iNOS/NO系统产生调节作用。

**[关键词]** 外源性; CO; 气体信号分子; 缺血/再灌注; 海马

**[中图分类号]** R614 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2011)01-0030-06

## Effect of Exogenous Carbon Monoxide on Gaseous Signaling Molecules in Hippocampus of Rats with Cerebral Ischemic-Reperfusion Injury

ZHOU Yin-yan<sup>1)</sup>, WAN Xiao-hong<sup>2)</sup>, ZHAO Guo-liang<sup>1)</sup>, SHAO Jian-lin<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Anesthesiology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of SICU, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of exogenous carbon monoxide on gaseous signaling molecules in hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury, and find brain protection methods.

**Methods** 24 Wister male rats aged 3~4 months were randomly even divided into 4 groups: (I) control group,

---

**[基金项目]** 云南省科技厅面上基金资助项目(2008CD120); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(08C0110); 昆明医学院第一附属医院博士科研启动基金资助项目(2007bs10)

**[作者简介]** 周银燕(1970~), 女, 云南文山州人, 医学学士, 主治医师, 主要从事临床麻醉工作。

**[通讯作者]** 邵建林. E-mail:cmushaojl@yahoo.com.cn

(II) ischemia-reperfusion group, (III) ischemia-reperfusion+20 mL/kg CO group, ischemia-reperfusion + 40 mL/kg CO (IV) group. Global cerebral ischemia-reperfusion model was established by 4-vessel occlusion. Rats in group I was carried out sham operation. Rats in Group III and Group IV were respectively intraperitoneally injected 20 mL/kg CO or 40 mL/kg CO before 30 min of clamping bilateral carotid artery. Rats in group I and group II were injected equation of saline. The carotid clasps were removed after 20 min of 4-vessel occlusion and rats were killed after 6h of reperfusion. The concentration of H<sub>2</sub>S, NO and CO, the activity of CBS, HO and iNOS, as well as the expression levels of CBS-mRNA, iNOS-mRNA and HO-1-mRNA in hippocampus of rats were measured. **Results** The concentration of H<sub>2</sub>S, NO and CO was increased, the activity of CBS, HO and iNOS was increased, CBS-mRNA, iNOS-mRNA and HO-1-mRNA expression was increased in group II as compared with group I ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The concentration of H<sub>2</sub>S and CO was increased, but NO was decreased, the activity of CBS was increased, iNOS and HO was decreased, iNOS-mRNA and HO-1-mRNA expression was decreased but CBS-mRNA was increased in group III as compared with group II ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The concentration of H<sub>2</sub>S and CO were significantly increased, but NO were significantly decreased, the activity of CBS was increased, iNOS and HO was decreased, iNOS-mRNA and HO-1-mRNA expression was decreased but CBS-mRNA was increased in group III as compared with group II ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Exogenous CO can induce CBS-mRNA expression and inhibit HO-1-mRNA and iNOS-mRNA expression, activate CBS and inhibit HO and iNOS during global cerebral ischemia-reperfusion in rats. CO can affect HO-1/CO, CBS/H<sub>2</sub>S and iNOS/NO systems during global cerebral ischemia-reperfusion in rats.

[**Key words**] Exogenous; CO; Gaseous signaling molecule; Ischemia-reperfusion; Hippocampus

气体信号分子具有广泛而复杂的生理和病理作用. 研究证明气体信号分子 H<sub>2</sub>S、NO 和 CO 参与了脑损伤的病理生理过程<sup>[1-3]</sup>, 但该过程中气体信号分子网络间是否相互调节尚未阐明. 基于以上问题, 笔者观察了外源性 CO 对脑缺血-再灌注损伤大鼠海马胱硫醚 β-合酶 (cystathionine beta synthase, CBS) / 硫化氢 (H<sub>2</sub>S) 体系、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) / 一氧化氮 (NO) 体系和血红素氧合酶-1 (HO-1) / 一氧化碳 (CO) 体系的影响, 研究脑缺血-再灌注损伤过程中气体信号分子网络间的相互作用和相互调节, 探讨脑保护策略.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

Biometra PCR 扩增仪 (德国)、Kodak 2D 凝胶成像分析系统 (德国)、UV 1201 紫外分光光度计 (日本)、RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 生物工程有限公司)、总 RNA 抽提试剂盒 (Trizol Reagent, Gib Co)、低温离心机 (SORVALL SUPER T21)、722S 分光光度计 (上海分析仪器总厂)、电热恒温水浴箱 (上海医疗器械七厂)、电子天平 (Denver

Instrument Company, 美国); 检测 H<sub>2</sub>S、CO、CBS 活性和 HO 活性的试剂 (Sigma-Aldrich, 美国); NO、iNOS 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); CO 纯品气体 (99.95%, 北京康福气体公司).

### 1.2 动物模型

按 Pulsinelli 等<sup>[4]</sup>报道的四动脉阻断法略加改变建立脑缺血-再灌注动物模型: 3%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠颈后正中切开暴露第一颈椎, 找到翼状孔, 直径 0.5 mm 大头针热凝双侧翼状孔处的椎动脉. 次日再次麻醉, 分离暴露两侧颈总动脉, 用动脉夹夹闭两侧颈总动脉, 20 min 后再通血流建立脑缺血-再灌注模型.

### 1.3 实验分组

Wister 雄性大鼠 24 只, 日龄 90 ~ 120 d, 体重 180 ~ 220 g, 由中国医科大学实验动物中心提供. 随机分为对照组 (I 组)、脑缺血-再灌注组 (II 组)、脑缺血-再灌注 + 低浓度 CO 组 (III 组)、脑缺血-再灌注 + 高浓度 CO 组 (IV 组), 每组 6 只大鼠. 对照组手术方法同上, 但不凝椎动脉和夹闭颈总动脉. 脑缺血-再灌注 + 低浓度 CO 组夹闭两侧颈总动脉前 30min 腹腔注射 CO 20 mL/kg, 脑缺血-再灌注 + 高浓度 CO 组夹闭两侧颈总动脉前 30 min 腹腔注射 CO 40 mL/kg, 对照

组和脑缺血 - 再灌注组腹腔注射等量生理盐水。再通血流后 6 h 脱颈处死大鼠取海马。实验过程中用加温灯保持大鼠直肠温度在 36.5 °C ~ 37.5 °C。

#### 1.4 标本制作

在冰面上迅速分离大鼠海马，一半液氮冷冻后放 -72 °C 冰箱保存备用。1/2 (100 mg 左右) 海马组织剪碎后放入 10 mL 的烧杯内按质量 / 体积 (W/V) 1/10 加入预冷的生理盐水，用捣杆研磨 5 ~ 8 min，充分研碎使组织匀浆化。将准备好的 10% 匀浆用低温离心机 3 000 r/min 离心 10 min，取上清液待测。

#### 1.5 海马组织中 NO 含量和 iNOS 活性的测定

NO 含量的测定：NO 化学性质活泼，在体内很快转化为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>，而 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 又进一步转化为 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>。用专门的试剂盒利用硝酸还原酶特异性将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原为 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>，通过显色深浅测定其浓度的高低。

iNOS 活性的测定：iNOS 催化 L-精氨酸和分子氧反应生成 NO，NO 与亲核性物质生成有色化合物，在 530 nm 波长下测定吸光度，根据吸光度的大小可计算出 NOS 的活性。

#### 1.6 海马组织中 H<sub>2</sub>S 含量和 CBS 活性的测定

海马组织中 H<sub>2</sub>S 含量的测定<sup>[9]</sup>：将含 100 mmol/L pH7.4 的磷酸钾缓冲液、10 nmol/L L-半胱氨酸、2 mmol/L 5'-磷酸吡哆醛和 10g/L 的海马组织匀浆共 1 mL 加入 25 mL 锥形瓶中进行反应。

$$\text{海马组织匀浆 CO (mg/L 组织匀浆)} = \frac{\text{HbCO (\%)} \times \text{Hb (mg/L)} \times 4 \times 0.028 \times 1\,000}{64\,456 \times 100 \times X}$$

式中 X 为所测海马组织匀浆的容积 (mL)，64 456 为 Hb 分子量。

HO 活性的测定<sup>[9]</sup>：取脑海马组织微粒体 0.5 mg，加入胆绿素还原酶 4 mg、NADPH (终浓度 0.8 mol/L)、6-磷酸葡萄糖 (终浓度 4 mmol/L)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (1U)、血红素 (终浓度 20 μmol/L)，加入 pH7.4 磷酸钾缓冲液至 1 mL，充分混匀，于 37 °C 水浴，避光反应 20 min，冰浴终止反应。然后用分光光度计测定波长 463 nm 和波长 530 nm 的吸光度差值，以生成的胆红素 nmol/(mg.pro.h) 来表示 HO 活性单位。对照管以磷酸钾缓冲液替代脑海马组织微粒体。

#### 1.8 海马组织 CBS-mRNA、iNOS-mRNA 和 HO-1-mRNA 检测

加入 10 g/L 的醋酸锌 0.5 mL 后用氮气将锥形瓶充盈 30 s 后石蜡膜封口，转移到 37 °C 水浴摇床中开始反应。90 min 后向其中注入 500 g/L 的三氯醋酸 0.5 mL 止反应，继续水浴 60 min 后将中央室的内容物转移到含 3.5 mL 蒸馏水的试管中，加入 20 mmol/L 对苯二胺盐酸盐 0.5 mL 和 30 mmol/L 三氯化铁 0.4 mL。室温孵育 20 min 后用分光光度计在波长 670 nm 处检测溶液吸光度值。根据 H<sub>2</sub>S 标准曲线查出溶液中 H<sub>2</sub>S 的产量。

CBS 活性的测定<sup>[9]</sup>：胱硫醚 β-合酶催化同型半胱氨酸与丝氨酸缩合成胱硫醚，后者经茚三酮显色后在 465 nm 波长处有最大吸收峰，而底物丝氨酸和同型半胱氨酸与茚三酮的反应产物在此波长吸收很低，因此可用酶促反应后 465 nm 吸光度的增加值检测胱硫醚 β-合酶活性的高低。

#### 1.7 海马组织中 CO 含量和 HO 活性的测定

CO 含量的测定<sup>[9]</sup>：将 100% 碳氧血红蛋白 (HbCO) 和 100% 氧合血红蛋白 (HbO<sub>2</sub>) 按不同比例配制成不同百分比浓度的 HbCO，根据 HbCO 和 HbO<sub>2</sub> 吸收光谱的差异，选择了 HbCO 吸光度之差最大而 HbO<sub>2</sub> 吸光度之差为零的两个波长 568 nm 和 581 nm，应用分光光度计测定不同浓度的 HbCO 在这两个波长下的吸光度之差 (ΔD)，用不同百分比浓度的 HbCO 和相应的 ΔD 绘制标准曲线，用标准曲线查出相应的 HbCO 百分比浓度。根据公式计算：

应用 Trizol 抽提大鼠海马组织总 RNA，用紫外分光光度仪测定 RNA 的浓度，琼脂凝胶电泳证实 RNA 的完整性，CBS-mRNA、HO-1-mRNA 和 iNOS-mRNA 水平以 β-actin 为内参对照，采用半定量 RT-PCR 法测定，逆转录参照 TaKaRa 公司试剂盒说明书进行，cDNA 的 PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。CBS 引物大小为 408 bp，上游引物：5'-ACC AGA CGG AGC AAA CAG-3'；下游引物：5'-AGG TGA CAG TGG GCA ACA-3'。iNOS 引物大小为 418 bp，上游引物：5'-CTA CCT ACCTGG GGA ACA CCT GGG G-3'；下游引物：5'-GGA GGA GCT GAT GGA GTA GTA GCG G-3'。HO-1 引物大小为 441 bp，上游引物：5'-ACA GAA GAG GCT AAG ACC G-3'；下游引

物: 5'-CAG GCA TCT CCT TCC ATT-3'.  $\beta$ -actin 引物大小 690 bp, 上游引物: 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3'; 下游引物: 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3'. 阴性对照用每个样本直接行 PCR, 不加引物和模板. 扩增产物经琼脂凝胶电泳, 紫外灯下照像, 在图像分析系统上进行密度扫描, 用 CBS、iNOS 和 HO-1 基因扩增产物的密度与  $\beta$ -actin 基因扩增产物的密度比值表示 CBS、iNOS 和 HO-1 的基因表达水平.

### 1.9 统计学处理

SPSS 统计软件, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较用单因素方差分析 (F 检验), 两两比较用  $q$  检验.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 海马组织中 NO 含量和 iNOS 活性的变化

与对照组相比脑缺血-再灌注组大鼠海马中 NO 含量和 iNOS 活性升高 ( $F = 12.946$  和  $F = 4.033$ ,  $P = 0.000$  和  $P = 0.005$ ); 与脑缺血-再灌注组相比脑缺血-再灌注+低浓度 CO 组大鼠海马中 NO 含量和 iNOS 活性降低 ( $F = 12.946$  和  $F = 4.033$ ,  $P = 0.069$  和  $P = 0.389$ ), 脑缺血-再灌注+高浓度 CO 组大鼠海马中 NO 含量和 iNOS 活性降低 ( $F = 12.946$  和  $F = 4.033$ ,  $P = 0.002$  和  $P = 0.036$ ), 见表 1、表 2.

### 2.2 海马组织中 H<sub>2</sub>S 含量和 CBS 活性的变化

与对照组相比脑缺血-再灌注组大鼠海马中

H<sub>2</sub>S 含量和 CBS 活性升高 ( $F = 26.787$  和  $F = 16.738$ ,  $P = 0.003$  和  $P = 0.030$ ); 与脑缺血-再灌注组相比脑缺血-再灌注+低浓度 CO 组大鼠海马中 H<sub>2</sub>S 含量和 CBS 活性增加 ( $F = 26.787$  和  $F = 16.738$ ,  $P = 0.030$  和  $P = 0.167$ ), 脑缺血-再灌注+高浓度 CO 组大鼠海马中 H<sub>2</sub>S 含量和 CBS 活性增加 ( $F = 26.787$  和  $F = 16.738$ ,  $P = 0.000$  和  $P = 0.002$ ), 见表 1、表 2.

### 2.3 海马组织中 CO 含量和 HO 活性的变化

与对照组相比脑缺血-再灌注组大鼠海马中 CO 含量和 HO 活性升高 ( $F = 32.752$  和  $F = 7.174$ ,  $P = 0.025$  和  $P = 0.000$ ); 与脑缺血-再灌注组相比脑缺血-再灌注+低浓度 CO 组大鼠海马中 CO 含量和 HO 活性 ( $P < 0.05$ ), 脑缺血-再灌注+高浓度 CO 组大鼠海马中 CO 含量和 HO 活性 ( $P < 0.05$ ), 见表 1、表 2.

### 2.4 海马组织 iNOS-mRNA、CBS-mRNA 和 HO-1-mRNA 的变化

与对照组相比脑缺血-再灌注组大鼠海马中 iNOS-mRNA、CBS-mRNA 和 HO-1-mRNA 表达升高 ( $F = 127.788$ ,  $F = 11.958$  和  $F = 92.725$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.009$  和  $P = 0.000$ ); 与脑缺血-再灌注组相比脑缺血-再灌注+低浓度 CO 组大鼠海马中 CBS-mRNA 表达升高 ( $F = 11.958$ ,  $P = 0.358$ ), iNOS-mRNA 和 HO-1-mRNA 表达降低 ( $F = 127.788$  和  $F = 92.725$ ,  $P = 0.044$  和  $P = 0.383$ ), 脑缺血-再灌注+高浓度 CO 组大鼠海马中 CBS-mRNA 表达升高 ( $F = 11.958$ ,  $P = 0.007$ ), iNOS-mRNA 和 HO-1-mRNA 表达降低 ( $F = 127.788$  和  $F = 92.725$ ,  $P = 0.000$  和  $P = 0.015$ ), 见表 3、见图 1~3.

表 1 各组大鼠海马组织中 CO、H<sub>2</sub>S 和 NO 的水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The levels of CO, H<sub>2</sub>S and NO of rsts in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	H <sub>2</sub> S (nmol/min.g.prot)	NO ( $\mu$ mol/g.prot)	CO (mg/L)
I 组	6	24.00 $\pm$ 5.79	0.23 $\pm$ 0.04	2.45 $\pm$ 0.66
II 组	6	38.50 $\pm$ 7.28**	0.49 $\pm$ 0.09**	3.53 $\pm$ 0.81*
III 组	6	48.33 $\pm$ 7.52 $\Delta$	0.41 $\pm$ 0.07	4.64 $\pm$ 0.77 $\Delta$
IV 组	6	60.33 $\pm$ 8.28 $\Delta\Delta$	0.34 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$	6.68 $\pm$ 0.84 $\Delta\Delta$

与 I 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 II 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ .

表 2 各组大鼠海马组织中 CBS、iNOS 和 HO 的水平 ( $\bar{x} \pm s$ )  
 Tab. 2 The levels of CBS, iNOS and HO of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	CBS (U/mg.prot)	iNOS (U/mg.prot)	HO (U/mg.prot)
I 组	6	0.32 ± 0.05	0.33 ± 0.06	27.33 ± 7.06
II 组	6	0.47 ± 0.07**	0.50 ± 0.09**	46.83 ± 7.25**
III 组	6	0.54 ± 0.08	0.45 ± 0.10	37.67 ± 8.31 <sup>△</sup>
IV 组	6	0.63 ± 0.09 <sup>△△</sup>	0.38 ± 0.08 <sup>△</sup>	33.50 ± 7.25 <sup>△△</sup>

与 I 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 II 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

表 3 各组大鼠海马组织中 CBS-mRNA、iNOS-mRNA 和 HO-1-mRNA 表达的水平 ( $\bar{x} \pm s$ )  
 Tab. 3 The levels of CBS, iNOS and HO of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	CBS-mRNA	iNOS-mRNA	HO-1-mRNA
I 组	6	0.96 ± 0.05	0.28 ± 0.06	0.26 ± 0.05
II 组	6	1.12 ± 0.10**	1.23 ± 0.11**	1.10 ± 0.09**
III 组	6	1.16 ± 0.10	1.12 ± 0.09 <sup>△</sup>	1.05 ± 0.12
IV 组	6	1.28 ± 0.11 <sup>△△</sup>	0.98 ± 0.09 <sup>△△</sup>	0.95 ± 0.10 <sup>△</sup>

与 I 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 II 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

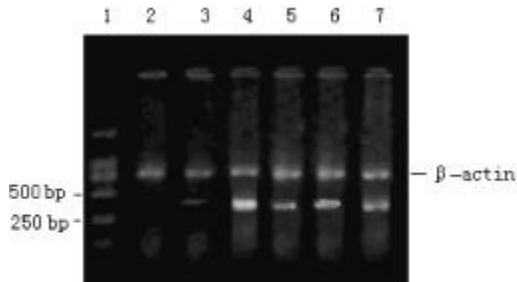


图 1 各组 iNOS-mRNA 的表达

Fig. 1 The expression of iNOS-mRNA in each group

1:Marker; 2: Negative Control; 3: Group C; 4: Group I/R; 5: Group I/R+Z; 6: Group I/R+H; 7: Group I/R+Z+H.

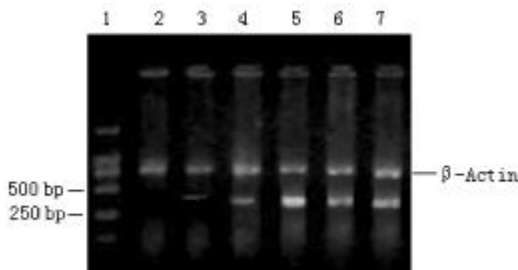


图 2 各组 CBS-mRNA 的表达

Fig. 2 The expression of CBS-mRNA in each group

1:Marker; 2: Negative Control; 3: Group C; 4: Group I/R; 5: Group I/R+Z; 6: Group I/R+H; 7: Group I/R+Z+H.

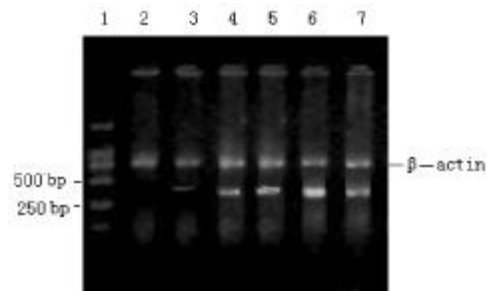


图 3 各组 HO-1-mRNA 的表达

Fig. 3 The expression of HO-1-mRNA of rats in each group

1:Marker; 2:Negative Control; 3:Group C; 4:Group I/R; 5: Group I/R+Z; 6:Group I/R+H; 7:Group I/R+Z+H.

### 3 讨论

在脑缺血 - 再灌注损伤中是否存在 iNOS/NO 体系和 HO-1/CO 体系间的相互调节, NO 和 CO 都能激活鸟苷酸还化酶 (GC) 的活性通过第二信使 cGMP 发挥其生物学作用. 一些研究表明 NO 能增强 HO-1 酶的活性, 诱导 HO-1-mRNA 的表达<sup>[9,10]</sup>. 也有研究发现 HO 能抑制 NOS, 使 NO 生成减少; CO 能与 NOS 结合使其钝化从而影响 NO 的产生<sup>[11]</sup>. 实验中笔者发现脑缺血 - 再灌注后大鼠海马中 NO 和 CO 的量都增加; 当提前给予 CO 后, 随着给予 CO 浓度的增加, 脑缺血 - 再灌注后大鼠海马中 CO 的量增加, iNOS 酶活性和 iN-

OS-mRNA 表达降低, 同时 NO 的量降低. 提示在脑缺血-再灌注损伤过程中 CO 对 iNOS/NO 系统有调节(抑制)作用.

Kashiba<sup>[12]</sup>提出既然 H<sub>2</sub>S 可作为轴配体的辅基与血红素蛋白结合, H<sub>2</sub>S 肯定能调节 HO 的活性. 在脑缺血-再灌注损伤中 CO 对 CBS 的影响研究尚未见报道. 实验中笔者发现脑缺血-再灌注后大鼠海马中 H<sub>2</sub>S 和 CO 的量都增加, 当提前给予 CO 后, 随着给予 CO 浓度的增加, 脑缺血-再灌注后大鼠海马中 CO 的量增加, CBS 酶活性和 CBS-mRNA 表达增加, 同时 H<sub>2</sub>S 的量增加. 提示脑缺血-再灌注损伤过程中 CO 对 CBS/H<sub>2</sub>S 系统有调节作用. 在脑缺血-再灌注损伤中增加的 CO 能够诱导 CBS-mRNA 的表达, 激活 CBS 酶的活性, 结果使 H<sub>2</sub>S 的量增加.

人类对 CO 的认知是从其毒性开始. 近年来发现生理浓度的 CO 和其生成酶 HO 在许多生理和病理过程中起重要的调节作用, 尤其对组织器官的保护作用. 目前已知诱导型 HO 亚型 HO-1 是细胞对抗应激反应的重要组成部分, HO-1/CO 体系在高氧性损伤、缺血/再灌注损伤、器官移植等方面对器官起保护作用<sup>[3]</sup>. 实验中笔者发现大鼠脑缺血-再灌注后海马 HO-1-mRNA 表达增加, HO 活性增加, CO 增加. 提前给予 CO 后, 随着给予 CO 量的增加, 脑缺血-再灌注后大鼠海马中 CO 的量增加, 但 HO-1-mRNA 表达降低, HO 活性降低. 说明脑缺血-再灌注损伤过程中 CO 对 HO 具有负反馈调节作用, 提示在脑缺血-再灌注损伤过程中适当激活 HO 产生适当 CO 参与抗损伤的过程, 同时避免大量的 CO 产生使机体中毒.

综上所述, 外源性 CO 能够诱导脑缺血-再灌注后大鼠海马 CBS-mRNA 的表达, 激活 CBS, 抑制 iNOS-mRNA 和 HO-1-mRNA 的表达, 抑制 iNOS 和 HO; 在脑缺血-再灌注损伤过程中外源性 CO 能对 CBS/H<sub>2</sub>S、iNOS/NO 和 HO-1/CO 系统产生调节作用.

## [参考文献]

- [1] KIMURA Y, KIMURA H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress[J]. *FASEB J*, 2004, 18(10): 1165 - 1167.
- [2] MORO M A, CARDENAS A, HURTADO O, et al. Role of nitric oxide after brain ischaemia [J]. *Cell Calcium*, 2004, 36(3-4): 265 - 275.
- [3] MORSE D, CHOI AUGUSTINE M K. Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(1): 8 - 16.
- [4] PULSINELLI W A, BRIERLEY J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10: 267 - 272.
- [5] ABE K, KIMURA K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator [J]. *J Neurosci*, 1996, 16: 1066 - 1071.
- [6] 郑斌, 韩梅, 温进坤. 胱硫醚 β-合酶活性的测定及应用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7(4): 351 - 353.
- [7] 石云, 杜军保, 曾超美, 等. 内源性一氧化碳/血红素氧合酶体系在缺氧性肺动脉高压形成中的作用[J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40(4): 230 - 234.
- [8] 王耀宏, 赵金垣, 崔书杰, 等. 外源性一氧化碳对大鼠脑内源性气体信使系统的影响[J]. *中国工业医学杂志*, 2003, 16(5): 261 - 263.
- [9] DURANTE W, KROLL M H, CHRISTODOULIDES N, et al. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1997, 80: 557 - 564.
- [10] HARTSFIELD C J, ALAM L, COOK J L, et al. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273: L980 - L988.
- [11] ZUCKERBRAUN B S, BILLIAR T R, OTTERBEIN S L, et al. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide induced heme oxygenase [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(11): 1707 - 1716.
- [12] KASHIBA M, KAJIMURA M, GODA N, et al. From O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>S: a landscape view of gas biology [J]. *Keio J Med*, 2002, 51(1): 1 - 10.

(2010-11-21 收稿)