

## II相酶诱导剂 CPDT 对运动神经元损伤 保护作用的机制初探

李哲 刘晓云<sup>1,2</sup> 卜晖<sup>1,2</sup> 李斌<sup>1,2</sup> 郭艳苏<sup>1,2</sup> 李春岩<sup>1,2\*</sup>

(河北省人民医院癫痫科, 石家庄 050051; <sup>1</sup>河北医科大学第二医院, 石家庄 050000;

<sup>2</sup>河北省心脑血管病研究所, 石家庄 050000)

**摘要** 利用谷氨酸转运体抑制剂制备选择性运动神经元损伤的脊髓片培养模型, 在此基础上探讨 II 相酶诱导剂 5,6-二氢环戊烯并 1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮(CPDT)对运动神经元的保护作用及机制。乳大鼠脊髓片分为正常对照组、THA 模型组(100 μmol/L 苏-羟天冬氨酸; THA)和 II 相酶诱导剂 CPDT 干预组(15 和 30 μmol/L)。通过免疫组化方法对脊髓腹角 α 运动神经元进行计数, 并利用 RT-PCR 半定量方法、免疫印迹及酶活性检测等方法, 分析各组间醌氧化还原酶 1 (NQO1)和铁蛋白重链的表达。结果表明 CPDT (15 或 30 μmol/L)干预组脊髓腹角的运动神经元数明显增多, 与 THA 模型组相比差异显著( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 并且经 CPDT 干预可以有效的诱导 NQO1 以及铁蛋白重链的表达增加, 为下一步在肌萎缩侧索硬化(ALS)动物模型或 ALS 病人中进行临床干预打下了前期基础。

**关键词** 肌萎缩侧索硬化; II 相酶; 运动神经元

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是选择性侵犯上、下运动神经元的慢性进行性变性疾病。目前, 该病因不清、发病机制不明, 缺乏有效的治疗方法。但越来越多的证据提示, 谷氨酸兴奋毒和氧化应激在 ALS 的发病机制中发挥了重要作用, 氧化应激更被认为是发病机制中的一个中心环节<sup>[1]</sup>。文献报道 II 相酶诱导剂二噻环戊二烯硫酮类化合物可以在多种组织中激活 Nrf2/ARE 通路, 诱导下游的多种抗氧化酶和抗氧化蛋白协同表达, 发挥强大的抗氧化作用<sup>[2]</sup>。我们在前期实验中发现此类化合物中的 5,6-二氢环戊烯并 1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮(CPDT)对运动神经元损伤具有明显的保护作用, 本研究进一步探讨其保护作用的机制。在这一部分我们以 Nrf2/ARE 通路下游经典抗氧化酶 NQO1<sup>[3]</sup>和抗氧化蛋白铁蛋白重链(ferritin-H, FtH)为代表, 从转录水平、蛋白质水平以及酶活性上观察 CPDT 是否在脊髓薄片诱导了 Nrf2/ARE 通路下游 NQO1 和 FtH 的表达。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

实验动物采用 8 日龄 SD 乳鼠(河北医科大学实验动物中心)。培养液为 MS<sup>[4]</sup>。实验试剂包括 CPDT 纯品(美国 Rosewell Park 癌症研究院 Yuesheng Zhang

教授惠赠); 组化试剂: 一抗为小鼠抗非磷酸化神经丝单克隆抗体 SMI-32 (Sternberger Monoclonals 公司), 二抗为生物素化马抗鼠 IgG (Vector 公司)。反转录 PCR 试剂: RNA 提取试剂, 逆转录酶(AMV-RT), Taq DNA 聚合酶等购自 Promega 公司。免疫印迹试剂: PVDF 膜购自 Millipore 公司, 抗 NQO1、FtH 及 β-肌动蛋白抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 器官型脊髓薄片培养<sup>[4]</sup>** 将 8 日龄 SD 乳鼠快速断头, 分离脊髓, 显微镜下剪断神经根, 将脊髓切成 350 μm 厚的薄片。6 孔培养板内每孔放入 1 ml 培养基 MS, 并放置板插, 将脊髓片转移至板插上, 每个板插上放 5 片, 入 CO<sub>2</sub> 培养箱。

#### 1.2.2 选择性运动神经元死亡的脊髓片培养模型<sup>[5]</sup>

原理为通过谷氨酸转运体抑制剂苏-羟天冬氨酸(threo-hydroxyaspartate, THA), 造成胞外谷氨酸堆积从而对运动神经元造成选择性损伤。脊髓薄片培养 1 周、性状稳定后, MS 培养液中加入浓度为 100 μmol/L 的 THA, 共培养 4 周。

#### 1.2.3 II 相酶诱导剂干预(分两个时间点) 单纯

收稿日期: 2008-05-05 接受日期: 2008-08-05

国家自然科学基金资助项目(No.30670732)

\* 通讯作者。Tel: 0311-87222725, Fax: 0311-87064024, E-mail:

hblicy5@yahoo.com.cn

CPDT 干预 48 h 点: 将脊髓片随机分为 3 小组, 经过 1 周的损伤恢复期后开始干预。①正常对照组: 普通 MS 培养液; ② 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; ③ 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; 培养 48 h 后取出。

CPDT+THA 干预 3 周点: 将脊髓片随机分为 4 小组, 培养 1 周后开始干预。①正常对照组: 普通 MS 培养液; ② THA 模型组: MS 培养液中加入 100  $\mu\text{mol/L}$  THA; ③ 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组: 将 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 加入培养液预处理 48 h, 再加入 100  $\mu\text{mol/L}$  THA 和 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT; ④ 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组: 将 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 加入培养液预处理 48 h, 再加入 100  $\mu\text{mol/L}$  THA 和 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT。各组每周换液 2 次, 于培养 4 周后取出脊髓片。

CPDT+THA 干预 3 周点共 4 组, 每组留取 10 片, 以 4% 多聚甲醛固定后做免疫组化染色; 两个时间点共 7 组, 每组留取 15 片迅速保存于液氮中, 用来做 RT-PCR (每组重复 5 次); 每组 30 片, 用来做 Western 印迹 (每组重复 5 次); 每组 30 片, 用来做 NQO1 活性检测 (每组重复 5 次)。

**1.2.4 脊髓片免疫组化染色** CPDT+THA 干预 3 周点各组脊髓片取出后, 分别以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.6% Triton X-100 浸透 10 min, 5% 马血清 60 min 阻断非特异性染色, 单克隆抗体 SMI-32 (14 : 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜, 次日加生物素化马抗鼠 IgG (1 : 2 000) 60 min, SABC 60 min, DAB 显色 3~10 min, 脱水、透明、封固。具备 3 个标准者 (位于脊髓的腹侧、SMI-32 阳性、胞体直径 > 25  $\mu\text{m}$ ) 者被确定为  $\alpha$  运动神经元<sup>[6]</sup>。

**1.2.5 RT-PCR 检测 NQO1 和 FtH mRNA 的表达**

两个时间点的各组脊髓片取出后, 常规用 Trizol 试剂提取总 RNA 并逆转录为 cDNA, NQO1、FtH 引物序列依据文献报道设计<sup>[7,8]</sup>, NQO1: 上游 5'-AAA TGG CAT CCA ATC CTC CA-3', 下游 5'-AAG TTA GTC CCT CAG CCA TTG TTT-3'; FtH: 上游 5'-TGA CAA GAA TGA TCC CCA-3', 下游 5'-CTT AGC TCT CAT CAC CGT GT-3';  $\beta$ -肌动蛋白: 上游 5'-GCC ATG TAC GTA GCC ATC CA-3', 下游 5'-GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG-3' (上海生物工程公司合成)。目的基因的 PCR 扩增, 反应条件: 初始变性, 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min 1 个循环; 变性 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 退火, NQO1 58  $^{\circ}\text{C}$ 、FtH 51  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\beta$ -肌动蛋白 55  $^{\circ}\text{C}$  均 30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。采用 GBOX-HR 全自动凝胶成像系统对凝胶进行定量, 以 NQO1 或 FtH 与  $\beta$ -肌动蛋白的比值表示目的基因的相对表达量。

**1.2.6 Western 印迹检测 NQO1 和 FtH 的表达**

两个时间点的各组脊髓片取出后, 细胞裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度。取 100  $\mu\text{g}$  待测蛋白质, 加入等体积 5 $\times$  上样缓冲液, 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 3 min 变性; 12 000 r/min 离心; SDS-PAGE; 于 4  $^{\circ}\text{C}$  100 V 转膜 2 h; 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 分别加入抗 NQO1、FtH 及  $\beta$ -肌动蛋白一抗温育, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; 次日 IRDye TM700DX/800DX 标记的二抗温育, 室温 2 h; 显色条带扫描后以 Odyssey 红外图像分析系统分析, 以 NQO1 或 FtH 与  $\beta$ -肌动蛋白的比值表示目的蛋白的相对表达量。

**1.2.7 NQO1 活性的检测** 根据 NQO1 能够还原甲萘醌 (Vit K3), 还原态 Vit K3 使 MTT 非酶性还原成蓝色物质的原理, 以多功能酶标仪选择动力学程序, 610 nm 连续读 5 min, 测定胞内酶促反应速率。为排除非特异性酶活性, 以含 0.3 mmol/L 双香豆素的磷酸缓冲液代替常规缓冲液做平行孔检测, 具体步骤参见 Ye 等<sup>[9]</sup>的检测方法。

**1.3 统计学分析**

测定结果均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件分析。

## 2 结果

### 2.1 SMI-32 免疫组化染色

CPDT+THA 干预 3 周点正常对照组脊髓片两侧腹角有 15~20 个左右的  $\alpha$  运动神经元; 模型组  $\alpha$  运动神经元数目明显减少 ( $P < 0.01$ ); 经 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 提前干预  $\alpha$  运动神经元存活数量明显增加, 与模型组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ); 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组与 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组神经元数目相近 (表 1, 图 1)。

### 2.2 NQO1 和 FtH 重链转录水平的变化

在单纯 CPDT 干预 48 h 点, 15、30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组 NQO1 和 FtH mRNA 的表达较对照组明显升高, 并且呈剂量依赖性 (表 2, 图 2)。在 CPDT+THA 干预 3 周点, 15 和 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组 NQO1 和 FtH mRNA 的表达较 THA 模型组升高明显 ( $P < 0.01$ ) (表 3, 图 3); 模型组与对照组相比, NQO1 也有所升

表 1 CPDT+THA 干预 3 周点各组脊髓薄片腹角  $\alpha$  运动神经元数目

组别	$\alpha$ 运动神经元数
对照组 (MS)	16.8 $\pm$ 5.3**
模型组 (100 $\mu\text{mol/L}$ THA)	4.6 $\pm$ 2.5
15 $\mu\text{mol/L}$ CPDT 干预组	16.4 $\pm$ 5.8**
30 $\mu\text{mol/L}$ CPDT 干预组	15.6 $\pm$ 4.9*

与模型组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

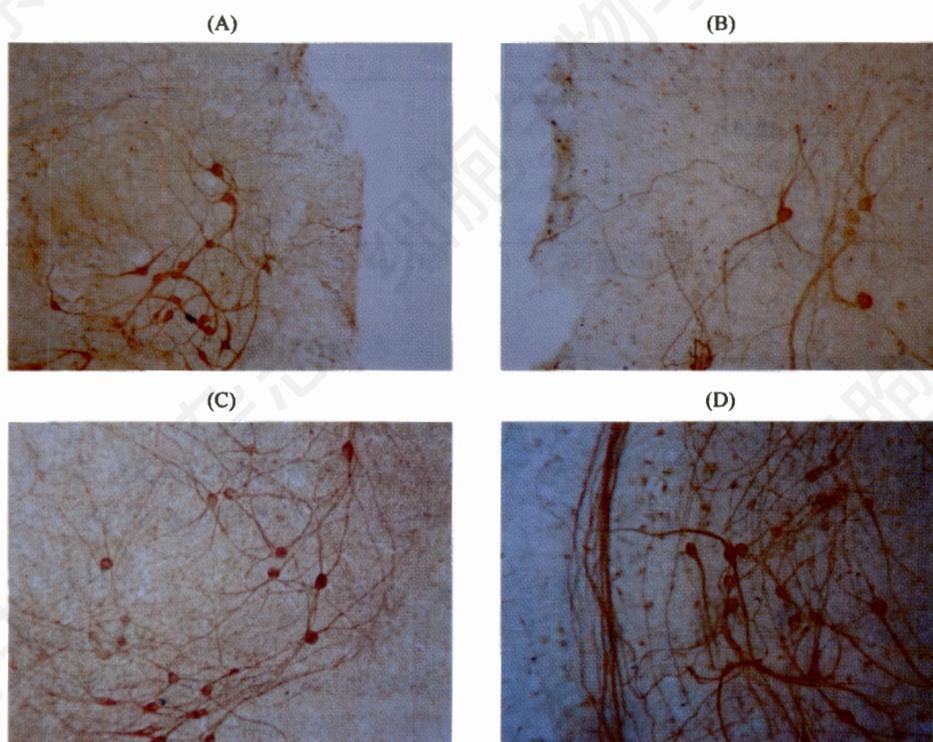


图1 CPDT+THA 干预3周点各组脊髓片腹角 $\alpha$ 运动神经元 SMI-32 免疫组化染色(100 $\times$ )  
A: 正常对照组; B: THA 模型组; C: 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; D: 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组。

表2 单纯 CPDT 干预 48 h 点各组脊髓薄片 NQO1 和 FtH 的表达

	对照组	15 $\mu\text{mol/L}$ CPDT	30 $\mu\text{mol/L}$ CPDT
NQO1 mRNA 水平	0.07 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.02*	0.27 $\pm$ 0.02**
NQO1 蛋白质水平	0.11 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.03*	0.32 $\pm$ 0.03* <sup>*</sup>
NQO1 活性	0.91 $\pm$ 0.14	1.37 $\pm$ 0.20*	2.38 $\pm$ 0.49* <sup>*</sup>
FtH mRNA 水平	0.05 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01*	0.16 $\pm$ 0.02**
FtH 蛋白质水平	0.07 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02*	0.15 $\pm$ 0.02**

$n=5$ ; NQO1 活性单位为  $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ; 与对照组相比, \* $P<0.01$ ; 与 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组相比, \* $P<0.05$ ; 与 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组相比, \* $P<0.01$ 。

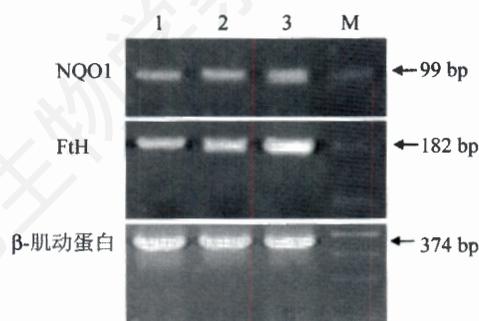


图2 RT-PCR 检测单纯 CPDT 干预 48 h 点各组脊髓薄片 NQO1 和 FtH mRNA 的表达

1: 正常对照组; 2: 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; 3: 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; M: marker。

高, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); FtH 略有增加, 但无统计学差异。

### 2.3 NQO1 和 FtH 的蛋白质水平变化

NQO1 和 FtH 的蛋白质表达与基因表达结果一致。在单纯 CPDT 干预 48 h 点, 经 15 和 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预, NQO1 和 FtH 的蛋白质表达较对照组明显升高, 呈剂量依赖性(表 2, 图 4) ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

在 CPDT+THA 干预 3 周点, 15 和 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组 NQO1 和 FtH 的蛋白质水平较模型组升高明显, 差异显著(表 3, 图 5) ( $P<0.01$ ); 模型组与对照组相比, NQO1 也有所升高, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); FtH 略有升高, 但无统计学差异。

### 2.4 抗氧化酶 NQO1 活性测定

在单纯 CPDT 干预 48 h 点, 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组 NQO1 活性较对照组升高 51% ( $P<0.01$ ), 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组较对照组升高 162% ( $P<0.01$ ), 15 和 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组相比, 差异有统计学意义

表3 CPDT+THA 干预3周点各组脊髓薄片NQO1和FtH的表达

	对照组	模型组	15 $\mu\text{mol/L}$ CPDT+THA	30 $\mu\text{mol/L}$ CPDT+THA
NQO1 mRNA 水平	0.18 $\pm$ 0.02*	0.40 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.03*	0.79 $\pm$ 0.02**
NQO1 蛋白质水平	0.32 $\pm$ 0.05*	0.58 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.03*	1.17 $\pm$ 0.05**
NQO1 活性	1.34 $\pm$ 0.27*	2.61 $\pm$ 0.42	3.84 $\pm$ 0.34*	5.49 $\pm$ 0.33**
FtH mRNA 水平	0.10 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.03*	0.57 $\pm$ 0.02**
FtH 蛋白质水平	0.04 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01*	0.24 $\pm$ 0.03**

$n=5$ ; NQO1 活性单位为  $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ; 与对照组相比, \* $P<0.01$ ; 与 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组相比, \*\* $P<0.01$ 。

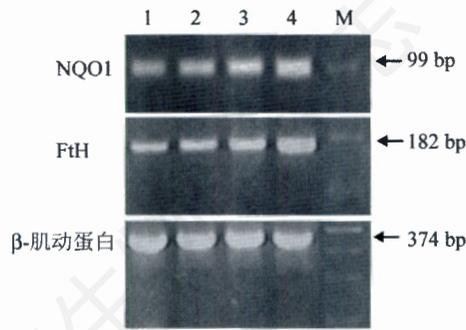


图3 RT-PCR 检测 CPDT+THA 干预3周点各组脊髓薄片NQO1和FtH mRNA 的表达

1: 正常对照组; 2: THA 模型组; 3: 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; 4: 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; M: marker。

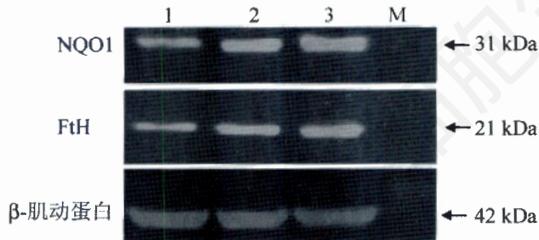


图4 免疫印迹分析单纯 CPDT 干预48 h 点各组脊髓薄片NQO1和FtH 的蛋白质表达

1: 正常对照组; 2: 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; 3: 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; M: marker。

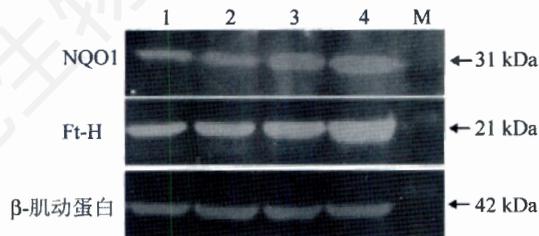


图5 免疫印迹分析 CPDT+THA 干预3周点各组脊髓薄片NQO1和FtH 的蛋白质表达

1: 正常对照组; 2: THA 模型组; 3: 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; 4: 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组; M: marker。

义( $P<0.01$ ) (表2)。

在 CPDT+THA 干预3周点, 15  $\mu\text{mol}$  CPDT 干预组较 THA 模型组 NQO1 活性升高 47.1%; 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组较模型组升高 110.3% ( $P<0.01$ ); THA 模型组与对照组相比, NQO1 活性也有所升高, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ) (表3)。

### 3 讨论

ALS 是一种慢性、进行性神经系统变性疾病。该病因和发病机制不明, 目前缺乏有效的治疗方法, 由美国 FDA 和欧盟批准用于治疗 ALS 的药物利鲁唑, 也只能延缓 ALS 的病程。因此, 对 ALS 有效治疗药物的筛选已成为神经科学领域的研究热点。

本研究以选择性运动神经元死亡的脊髓片培养模型为基础, 观察 II 相酶诱导剂 CPDT 对运动神经元的保护作用。谷氨酸转运体抑制剂 THA 使脊髓腹角 SMI-32 阳性的  $\alpha$  运动神经元数目明显减少, 经 15、30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预可完全抑制 THA 引起的选择性运动神经元的丢失,  $\alpha$  运动神经元数目明显增多, 与 THA 模型组相比差异显著, 说明 15  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预已对运动神经元损伤具有明显保护作用。并且, 我们在前期实验中发现经 15、30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预脊髓组织抗氧化能力明显增加(数据未显示)。我们进一步就 II 相酶诱导剂 CPDT 对运动神经元损伤保护作用的机制进行初步探讨。从转录水平、蛋白质水平及酶活性角度, 发现经 15、30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预, 脊髓组织中 NQO1 和 FtH 表达明显增加。推测二者的高表达增强了脊髓组织的抗氧化能力, 从而对抗了 THA 所致的运动神经元损伤。

文献报道, 每天用 II 相酶诱导剂 CPDT (125  $\mu\text{mol/kg}$ ) 给 SD 大鼠灌胃, 连续 5 天, 在大鼠心、肝、脾等不同的非神经系统脏器内, 都可激活 Nrf2/ARE 信号通路, 诱导 NQO1 活性升高(1.5~6.17 倍)<sup>[10]</sup>。本实验证实 CPDT 在神经组织中, 可诱导 Nrf2/ARE 信号通路下游靶基因表达显著增加。经 15、30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预 48 h 后, 体外培养的脊髓薄片组织中 NQO1 活性即为对照组的 1.51 倍(1.37/0.91)和 2.62 倍

(2.38/0.91); FtH 的蛋白质水平为对照组的 1.57 倍(0.11/0.07)和 2.14 倍(0.15/0.07)。在 CPDT+THA 干预 3 周后, 15 和 30  $\mu\text{mol/L}$  CPDT 干预组, NQO1 活性分别为 THA 模型组的 1.47 倍(3.84/2.61)和 2.62(5.49/2.61)倍; FtH 的蛋白质水平为 THA 模型组的 3.70 倍(0.37/0.10)和 5.70 倍(0.57/0.10)。

NQO1 和 FtH 都具有抗氧化应激的作用。NQO1 可催化体内的醌类化合物发生双电子还原反应生成氢醌, 对醌类物质的损伤形成一种保护机制; 它参与维生素 E 介导的抗氧化反应; 还能充当辅酶 Q(泛醌)的还原酶, 保护细胞膜组织不被氧自由基损伤。而铁蛋白是神经系统内主要的铁贮存蛋白, 由 24 个亚单位组成(包括重、轻肽链)。重肽链含有活性的铁氧化酶, 可促使  $\text{Fe}^{2+}$  转变为可贮存的  $\text{Fe}^{3+}$  形式, 减少氧化损伤。已有研究表明, 二噻环戊二烯硫酮类化合物对 NQO1 和 FtH 的诱导是通过 Nrf2/ARE 信号通路实现的。在 NQO1 和 FtH 基因的 5' 侧翼具有相同的增强子序列, 这段序列被称为抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)。此类化合物通过增加 Nrf2 转录因子的表达, 促进其核内移并与

顺式作用元件 ARE 结合, 诱导下游靶基因的表达, 协同加强了组织内的抗氧化能力<sup>[11]</sup>。

综上所述, 本实验证实 II 相酶诱导剂 CPDT 在脊髓组织内可诱导 Nrf2/ARE 通路下游的 NQO1 以及 FtH 表达显著增加, 对 THA 引起的选择性运动神经元损伤具有明显的保护作用。但 CPDT 是直接诱导了运动神经元本身抗氧化能力加强, 还是间接通过胶质细胞保护了运动神经元目前还不清楚, 有待进一步深入研究。

### 参考文献(References)

- [1] Simpson EP *et al. Curr Opin Rheumatol*, 2003, **15**: 730
- [2] Konwinski RR, *et al. Toxicol Lett*, 2004, **153**: 343
- [3] van Muiswinkel FL *et al. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005, **4**: 267
- [4] 刘晓云等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 135
- [5] 肖向建等. *基础医学与临床*, 2004, **24**: 687
- [6] Carriedo SG *et al. J Neurosci*, 1996, **16**: 4069
- [7] Gebely S *et al. Carcinogenesis*, 2004, **25**: 169
- [8] Yefimova MG *et al. Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, **41**: 2343
- [9] Ye L *et al. Carcinogenesis*, 2001, **22**: 1987
- [10] Munday R *et al. Chem Biol Interact*, 2006, **160**: 115
- [11] Kwak MK *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 8135

## Neuroprotective Effect of Phase II Enzyme Inducer CPDT on the Selective Motor Neuron Injury and Possible Mechanisms

Zhe Li, Xiao-Yun Liu<sup>1,2</sup>, Hui Bu<sup>1,2</sup>, Bin Li<sup>1,2</sup>, Yan-Su Guo<sup>1,2</sup>, Chun-Yan Li<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Epilepsy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China; <sup>2</sup>The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; <sup>3</sup>Hebei Province Institute of Cardiocerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract** On the basis of the model of selective motor neuron injury which induced by inhibitor of glutamate transporter, to investigate the neuroprotection effect and mechanism of phase II enzyme inducer 5,6-dihydrocyclopenta[C]-1, 2-dithiole-3-thione (CPDT). Organotypic spinal cord slices of rat pup were divided into normal control group, THA model group (THA 100  $\mu\text{mol/L}$ ) and phase II enzyme inducer CPDT (15, 30  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment groups. Ventral  $\alpha$  motor neurons' survival of spinal cord slices in each group was evaluated by immunohistochemical staining. The expression of NQO1 and ferritin in each group was evaluated by the method of RT-PCR, Western blot and assay of enzyme activity *et al.*. Compared with THA model group, the number of  $\alpha$  motor neurons significantly increased with intervention of CPDT (15  $\mu\text{mol/L}$  or 30  $\mu\text{mol/L}$ ). And the expression of antioxidant enzyme of NQO1 and heavy chain of ferritin increased significantly in CPDT treatment group. The result provided fundamental conditions for intervention on animal model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and ALS patients.

**Key words** amyotrophic lateral sclerosis; phase II enzyme; motor neuron

Received: May 5 2008 Accepted: August 5 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30670732)

\*Corresponding author Tel: 86-311-87222725, Fax: 86-311-87064024, E-mail: hblicy5@yahoo.com.cn