

文章编号:1000-5404(2012)23-2353-04

论著

瞬时受体电位通道6在大鼠大脑冲击伤后铁代谢中的作用

张礼均,胡荣,李飞,孟辉,林江凯,朱刚,王宪荣,冯华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨瞬时受体电位通道6(transient receptor potential channels 6, TRPC6)在大鼠大脑冲击伤后铁代谢中的作用。**方法** 健康成年雄性SD大鼠39只,分为假手术组、致伤组和DFO治疗组($n=13$)。参照Feeney法致伤,假手术组只开颅,不打击,致伤组和DFO治疗组开颅后,打击部位和打击量完全一致,2h后予以生理盐水及去铁胺100 mg/kg,间隔12h给药,持续28d。于28d取致伤灶周围脑组织进行脑铁含量检测,采用免疫荧光和Western blot检测方法,分别定性、定量检测瞬时受体电位通道6(TRPC6)在致伤灶周围的表达情况,并采用荧光双标检测TRPC6在神经元上的定位分布情况。**结果** 与假手术组比较,致伤组脑组织铁离子显著增加($P<0.05$),但DFO治疗组并未显著降低其含量($P>0.05$);免疫荧光检测结果显示致伤组TRPC6显著上调,DFO治疗组显著下调其表达;Western blot检测结果显示,与假手术组比较,致伤组TRPC6显著上调($P<0.05$),DFO治疗组显著下调其表达($P<0.05$);免疫荧光双标检测TRPC6与NeuN共表达情况,结果显示假手术组仅少量细胞表达TRPC6,且密度低,NeuN染色阳性的细胞胞体形态呈椭圆形,仅部分细胞共表达;致伤组致伤灶周围TRPC6表达明显增强,但却未见NeuN染色阳性的细胞;DFO治疗组可见NeuN染色阳性的细胞数量多,形态欠规则,与TRPC6共表达细胞数量增多。**结论** 大鼠TBI后铁离子具有神经毒性作用,能增加致伤灶周围神经元的损伤,而TRPC6可能在铁离子的神经毒性作用中扮演重要角色。

[关键词] 大脑冲击伤;非血红蛋白铁离子;瞬时受体电位通道6

[中图分类号] Q493.7; R362; R651.15

[文献标志码] A

Role of transient receptor potential channels 6 in iron metabolism in rats after traumatic brain injury

Zhang Lijun, Hu Rong, Li Fei, Meng Hui, Lin Jiangkai, Zhu Gang, Wang Xianrong, Feng Hua (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the role of transient receptor potential channels 6 (TRPC6) in iron metabolism after traumatic brain injury (TBI) in rats and investigate the underlying mechanism. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n=13$ for each group), that is, sham-operation group, TBI group and deferoxamine (DFO) treatment group. Modified Feeney's method was used to establish the rat model of experimental TBI with an impact of a weight of 30 g from 15 cm after craniotomy. The rats of DFO treatment group were treated with DFO (100 mg/kg, i. p., administered 2 h after TBI and then at 12-hour intervals for up to 28 d). Nonhemoglobin iron around the injury site was measured. Immunofluorescence staining was used to detect the expression and location of TRPC6 and NeuN, and Western blotting was also used to detect the expression of TRPC6. **Results** The volumes of nonhemoglobin brain iron was significantly decreased in injured group and DFO treatment group than sham-operation group ($P<0.05$), but there was no difference between TBI group and DFO treatment group. The expression of TRPC6 was up-regulated significantly after TBI compared with sham-operation group. DFO administration significantly down-regulated the expression of TRPC6. After TBI, there were more neurons positive to TRPC6, but few positive to NeuN around the injury site. However, DFO treatment resulted in more neurons positive to NeuN, which was coexpressed with TRPC6. **Conclusion** Over-loading of iron exerts neurotoxic effect in rats after TBI, which may deteriorate the damage of neurons around injury site. TRPC6 maybe play an important role in the neurotoxicity of the process.

[Key words] traumatic brain injury; nonhemoglobin iron; transient receptor potential channels 6

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872674, 30901545). Corresponding author: Feng Hua, E-mail: fenghua8888@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30872674,30901545)

[通信作者] 冯华, E-mail: fenghua8888@yahoo.com.cn

颅脑创伤(traumatic brain injury, TBI)致残率和病死率均高,挽救“半暗带”是神经外科关注的焦点。铁离子被认为是加重脑出血后脑损伤的重要因素^[1-2],是造成脑组织水肿重要原因。Gu等^[3]发现实验性小猪脑出血后予以去铁胺(deferoxamine, DFO)能显著减轻神经损伤程度。本课题组也发现脑室内注射铁离子可以增加脑积水的发生率,予以DFO治疗可以显著降低其发生率^[4]。有研究发现PC12可以通过瞬时受体电位通道6(transient receptor potential channels 6, TRPC6)摄取铁离子^[5],而神经元含有大量的TRPC6,但其扮演的角色尚不明确。本研究拟采用免疫荧光、免疫荧光双标和Western blot等实验方法,研究TBI后铁离子的作用,进一步采用DFO治疗进行干预,旨在认识TBI后铁离子的神经毒性作用,以及介导铁离子的TRPC6在TBI中扮演的角色,并探索其可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

体质量210~300g的健康成年雄性SD大鼠(第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)39只,分为假手术组、致伤组和DFO治疗组,每组13只大鼠。时相点设置为1、3、7、14、28d,分别观察各时相点体温、血糖、血红蛋白、死亡情况。

1.2 动物模型的制备及实验方法

参照文献^[6],按Feeney法建立致伤模型,1%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉,大鼠立体定向仪固定大鼠头部,正中切口开颅,钻孔位于冠状缝后2mm和矢状缝右侧2mm,扩大骨窗6mm,充分暴露脑组织,并保持硬膜完整,立体定向固定打击杆,打击杆质量30g,高度15cm,直径4.5mm,垂直脑表面进行打击,制备大鼠大脑冲击伤模型,打击后予以明胶海绵压迫止血,间断缝合头皮。致伤组和DFO治疗组于模型制备后2h分别给予生理盐水、去铁胺100mg/kg(用等量生理盐水溶解稀释)腹腔注射,间隔12h给药1次,直至28d实验结束。假手术组只开颅,不打击。

1.3 观察指标

1.3.1 一般情况 体温、血糖、血红蛋白及死亡情况观测方法见文献^[6]。

1.3.2 脑组织非血红蛋白铁离子含量检测 28d实验结束,采用生理盐水灌注大鼠($n=6$),直到灌注液流出清亮为止,迅速取致伤灶周围脑组织,蘸干脑组织表面液体,进行称量,然后匀浆、离心,取上清液,在原子分光光度计下采用535nm吸收光谱检测吸光度,并根据标准曲线计算出铁离子含量。

1.3.3 Western blot检测 蛋白裂解液裂解细胞提取细胞内蛋白,BCA法进行蛋白质定量,用SDS-PAGE进行电泳分离,转PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭1h,加一抗(1:400),4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,加辣根过氧化物酶标记二抗(1:500),室温孵育1h,TBST洗3次,用ECL显色并曝光显影($n=6$)。

1.3.4 免疫荧光检测TRPC6表达 取致伤灶周围脑组织进

行石蜡切片,脱蜡,梯度酒精(下行)入水,0.01mol/L PBS漂洗3次,加封闭血清,再用0.01mol/L PBS漂洗1次,加一抗(1:100, Santa Cruz),孵育1h,室温,过夜。0.01mol/L PBS漂洗3次,加荧光二抗(1:50,中杉公司),37℃,1~1.5h。0.01mol/L PBS漂洗3次,DAPI复染胞核,0.01mol/L PBS漂洗3次,甘油封片。对照实验:不加一抗,用正常血清代替免疫血清,其余步骤同上,结果为阴性($n=6$)。

1.3.5 TRPC6与NeuN的免疫荧光双标 在免疫荧光单标基础上,再用0.01mol/L PBS漂洗,封闭血清30min,加NeuN一抗(1:100, Sigma),孵育1h,室温,过夜。0.01mol/L PBS漂洗3次,加荧光二抗(1:50,中杉公司),37℃,1~1.5h。0.01mol/L PBS漂洗3次,DAPI复染胞核,0.01mol/L PBS漂洗3次,甘油封片。对照实验同上。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件进行 χ^2 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况

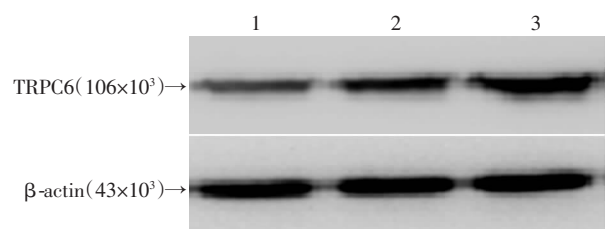
肛温、血红蛋白和血糖、死亡情况结果见文献^[6]。

2.2 脑铁含量检测

假手术组脑铁含量比较低(91.2 ± 5.3) $\mu\text{g/g}$,而致伤组(275.5 ± 7.9) $\mu\text{g/g}$ 和DFO治疗组(242.7 ± 6.4) $\mu\text{g/g}$ 致伤灶周围脑组织脑铁含量较假手术组显著升高($P < 0.05$),予以DFO治疗后,脑铁含量略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

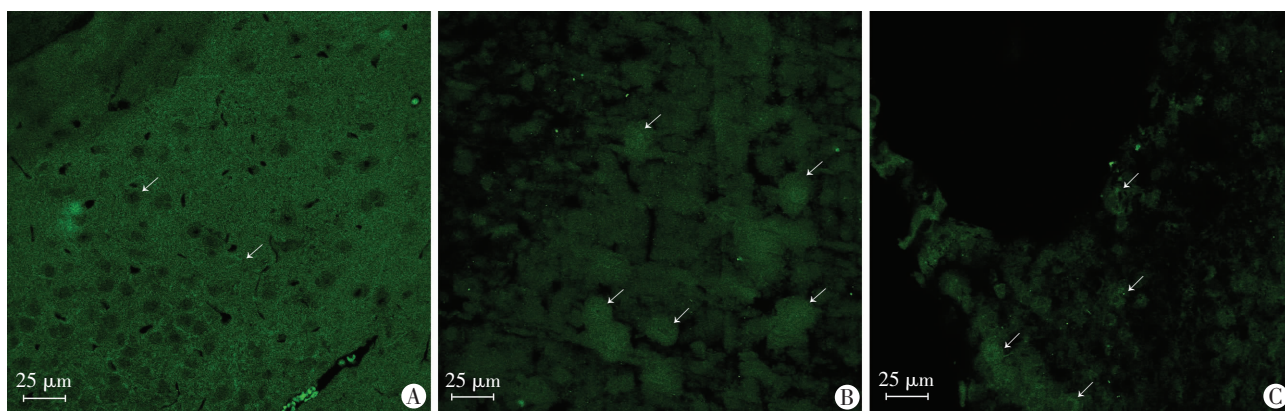
2.3 Western blot、免疫荧光、免疫荧光双标检测致伤灶周围脑组织TRPC6的表达

采用Western blot定量检测TRPC6表达情况,结果显示假手术组TRPC6表达较低(1.17 ± 0.04),致伤组较假手术组显著升高(1.50 ± 0.09 , $P < 0.05$),予以DFO治疗后显著下降(1.16 ± 0.04),与致伤组比较,差异显著($P < 0.05$,图1)。免疫荧光检测结果显示,假手术组仅有少量细胞表达TRPC6,且密度低;致伤组表达TRPC6阳性的细胞较多,且密度高;予以DFO治疗后,TRPC6阳性细胞数量和密度均显著下降(图2)。采用免疫荧光双标检测TRPC6与NeuN共表达情况,结果显示假手术组仅少量细胞表达TRPC6,且密度低,NeuN染色阳性的细胞胞体形态呈椭圆形,仅部分细胞共表达,呈橙色;致伤组致伤灶周围TRPC6表达明显增强,但却未见NeuN染色阳性的细胞;DFO治疗组可见NeuN染色阳性的细胞数量多,形态欠规则,与TRPC6共表达细胞数量增多,呈橙色(图3)。



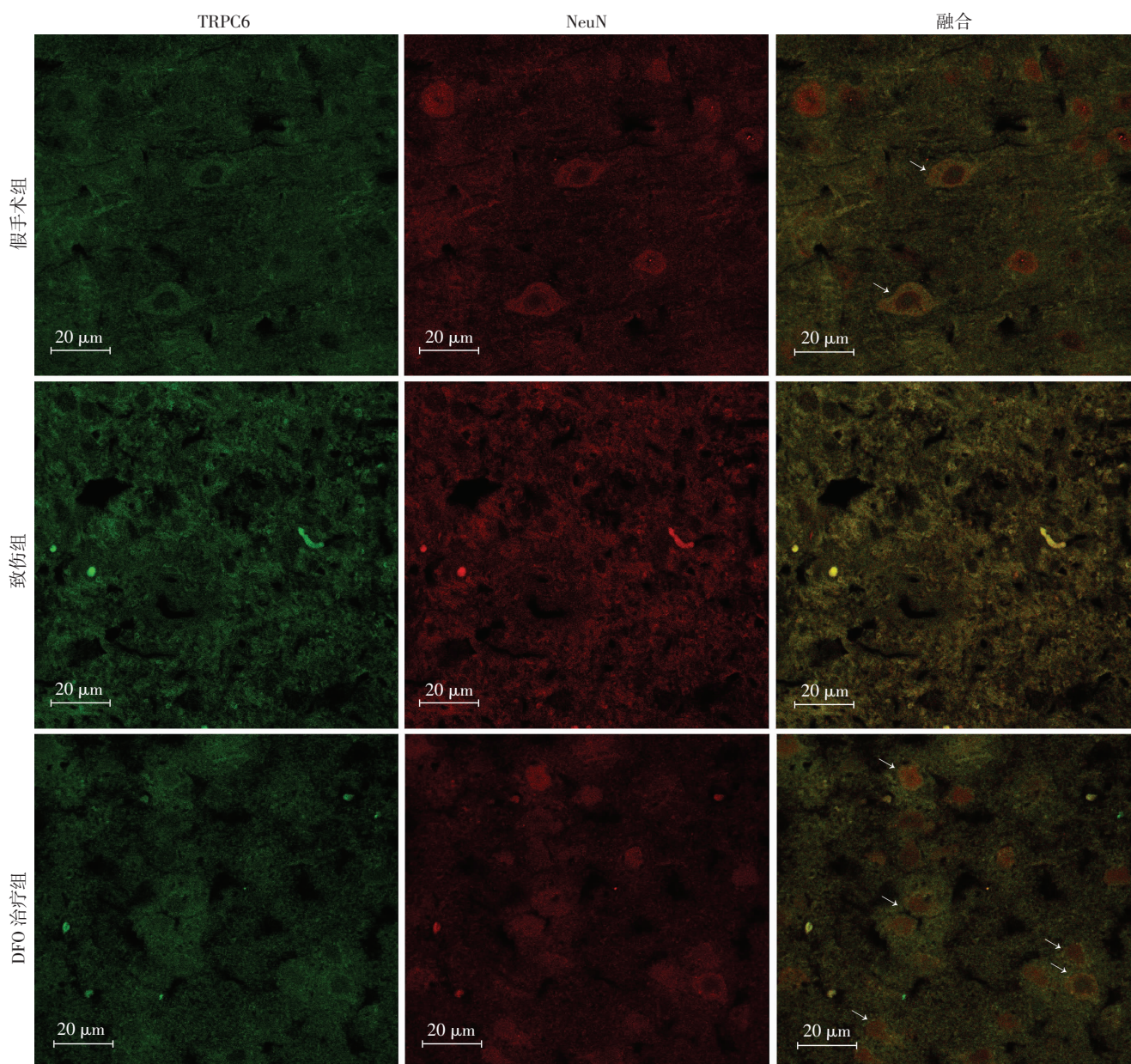
1:假手术组;2:DFO治疗组;3:致伤组

图1 Western blot检测各组大鼠致伤灶周围脑组织TRPC6的表达



A:假手术组;B:致伤组;C:DFO 治疗组 ↑:TRPC6 染色阳性的细胞

图2 免疫荧光检测各组大鼠致伤灶周围脑组织 TRPC6 的表达



↑:TRPC6 + NeuN 共表达阳性的细胞

图3 免疫荧光双标检测各组大鼠致伤灶周围脑组织 TRPC6 与 NeuN 共表达

3 讨论

铁离子是血红蛋白的主要降解产物,已有研究^[1]表明在实验性脑出血后脑水肿的形成中起着非常重要的作用,即使单纯给予铁离子也可模拟 ICH 后的神经功能损害,进一步采用 DFO 进行干预治疗,虽然非血红蛋白铁离子含量未减少^[7],却减轻了脑水肿^[3,8],减少了神经细胞凋亡^[9],减少了脑脊液游离铁离子含量,并改善脑出血大鼠的神经功能。本课题组采用脑室注血,成功制备大鼠慢性脑积水模型,进一步脑室内注射铁离子,同样可以制备脑积水模型,而采用 DFO 治疗,则可以降低其发生率^[4,10]。

铁离子螯合剂 DFO 是一种金属络合物,对铁离子有高度特异性亲和力,能快速与铁离子形成无活性或活性很弱的复合物排出体外,可减少局部铁离子的浓度,全身给药后能快速透过血脑屏障。同时, DFO 能降低血红蛋白诱导的脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶抑制作用和神经毒性作用^[11],还能清除自由基^[12],诱导脑组织缺血耐受^[13]。本实验结果提示 TBI 后脑铁含量显著增加,予以 DFO 治疗虽然不能降低脑铁含量,实验性脑出血的脑铁含量结果与本实验结果一致^[7],但 DFO 治疗组致伤灶周围神经元存活较致伤组显著增加,也同样提示运用 DFO 能保护 TBI 致伤灶周围神经元。

本实验结果还显示 TBI 后存在 TRPC6 表达较假手术组显著增加,Western blot 检测到 TRPC6 的表达增加有统计学差异 ($P < 0.05$),而采用 DFO 治疗后,TRPC6 表达则显著下调 ($P < 0.05$)。采用免疫荧光双标检测神经元上 TRPC6 表达情况,结果显示 TRPC6 在假手术组和 DFO 治疗组与 NeuN 共表达,而致伤组在致伤灶周围未发现 NeuN 染色阳性细胞,TRPC6 表达却显著增加 ($P < 0.05$),提示 TBI 后致伤灶周围神经元损害非常严重,而予以 DFO 治疗能有效地保护神经元,说明致伤灶周围存在铁离子过量导致的神经毒性作用,而 TRPC6 在 TBI 后铁离子过量造成的神经毒性作用中扮演重要角色。予以 DFO 可以显著下调 TRPC6 表达,提示过量铁离子可能是通过 TRPC6 介导进入神经元,导致神经元死亡,抑制 TRPC6 可能是治疗铁离子过量导致的神经毒性作用的一个新靶标。

本实验从动物性别、血糖、肛温以及血红蛋白水平等 4 个方面保证了实验可比性,提示上述结果是可靠的。

目前认为 DFO 治疗铁离子中毒、地中海贫血等不会影响正常铁离子代谢,那么全身长时间使用 DFO 治疗 TBI 是否会影响机体铁离子代谢呢? 本实验参照文献^[1,3]剂量给药,用药至 28 d,按不同时相点检测血红蛋白含量,各组大鼠血红蛋白含量均无明显异常,提示 DFO 对机体铁离子代谢无显著影响。那是否会影响死亡率呢? 比较 3 组实验动物死亡率,假手术组

无死亡动物,致伤组与 DFO 治疗组死亡率无显著统计学差异,提示 DFO 治疗不会影响到 TBI 动物的死亡率。Selim 等^[14]将运用 DFO 治疗急性脑出血,同样发现 DFO 治疗的安全性和耐受性。本实验结果提示予以 DFO 全身治疗 TBI,不会导致机体正常铁离子代谢紊乱,也不会增加动物死亡率。

综上所述,TBI 后致伤灶周围存在铁离子过量,导致神经元死亡,同时显著上调 TRPC6 表达,而予以 DFO 治疗,可以显著减少神经元死亡,并下调 TRPC6 表达,提示 TBI 后存在过量铁离子造成的神经毒性作用,而 TRPC6 在其中扮演重要角色,可能是治疗 TBI 后铁离子神经毒性作用的一个重要的新靶标。

参考文献:

- [1] Hua Y, Nakamura T, Keep R F, et al. Long-term effects of experimental intracerebral hemorrhage: the role of iron[J]. J Neurosurg, 2006, 104(2): 305-312.
- [2] Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. Prog Neurobiol, 2010, 92(4): 463-477.
- [3] Gu Y, Hua Y, Keep R F, et al. Deferoxamine reduces intracerebral hematoma-induced iron accumulation and neuronal death in piglets[J]. Stroke, 2009, 40(6): 2241-2243.
- [4] 宫国旗, 孟辉, 夏永智, 等. 大鼠实验性脑室出血后慢性脑积水动物模型的建立及病理学观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 969-972.
- [5] Mwanjewe J, Grover A K. Role of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) in non-transferrin-bound iron uptake in neuronal phenotype PC12 cells[J]. Biochem J, 2004, 378(Pt 3): 975-982.
- [6] 张礼均, 胡荣, 李飞, 等. 去铁胺对大鼠大脑冲击伤的治疗作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(23): 2349-2352.
- [7] Chen-Roetling J, Liu W, Regan R F. Iron accumulation and neurotoxicity in cortical cultures treated with holotransferrin[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(11): 1966-1974.
- [8] Wu H, Wu T, Xu X, et al. Iron toxicity in mice with collagenase-induced intracerebral hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(5): 1243-1250.
- [9] Selim M. Deferoxamine mesylate: a new hope for intracerebral hemorrhage: from bench to clinical trials[J]. Stroke, 2009, 40(3 Suppl): S90-S91.
- [10] 宫国旗, 孟辉, 冯华. 铁离子在大鼠实验性慢性脑积水发生中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2172-2175.
- [11] Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(8): 720-731.
- [12] Liu J, Tang T, Yang H. Protective effect of deferoxamine on experimental spinal cord injury in rat[J]. Injury, 2011, 42(8): 742-745.
- [13] Sorond F A, Shaffer M L, Kung A L, et al. Desferrioxamine infusion increases cerebral blood flow: a potential association with hypoxia-inducible factor-1[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(10): 771-779.
- [14] Selim M, Yeatts S, Goldstein J N, et al. Safety and tolerability of deferoxamine mesylate in patients with acute intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(11): 3067-3074.

(收稿:2012-06-21;修回:2012-09-12)

(编辑 王小寒)