

大鼠急性脑缺血后 Hephæstine 表达变化的研究

温仲民¹, 包仕尧¹, 王晓云², 常彦忠², 钱忠明²

(1. 苏州大学附属二院 神经内科, 江苏 苏州 215004; 2. 香港理工大学 应用生物与化学科技学系铁代谢实验室)

摘要: 目的 研究大鼠急性局灶性脑缺血后皮层和纹状体 hephaestine 表达的变化。方法 用线栓法制备大鼠急性大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注模型, 在再灌注后的不同时间点应用免疫组化及图像分析检测皮层和纹状体的表达。结果 MCAO 再灌注后大鼠出现大脑中动脉梗塞的神经系统损害体征, TTC 染色有白色梗死区。hephaestine 在正常大鼠的皮层、纹状体有表达, 在急性脑缺血再灌注后 12 h 缺血侧皮层、纹状体表达明显增加并持续到再灌注后 48 h, 在 24 h 达到高峰($P < 0.01$), 至 1 周时表达较正常明显减少($P < 0.01$)。结论 大鼠急性脑缺血再灌注后 hephaestine 的表达出现明显的变化, 在急性脑缺血的病理生理变化中可能起着重要的作用。

关键词: 急性脑缺血; hephaestine; 免疫组化

中图分类号: R743.302 文献标识码: A 文章编号: 1000-5749(2004)02-0147-03

The Expression of Hephæstine During Focal Cerebral Ischemia in Rats

WEN Zhong-min¹, BAO Shi-yao¹, WANG Xiao-yun², et al

(1. Department of Neurology, The Second Hospital Affiliated to Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215007, China; 2. Department of Applied Biology and Chemistry Technology, HK Polytechnic University, Hongkong, China)

Abstract: Objective To study the expression of hephaestine during acute focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. **Methods** The Expression of hephaestine in the cortex and striatum of rats during acute cerebral ischemia and reperfusion were investigated by using immunohistochemistry and computer image analysed. **Results** Hephæstine expression was observed in normal cortex and striatum of rats. With the ischemia and reperfusion time going on, the expression of hephaestine was obviously changed, peaked at the 12th and 24th hour ($P < 0.01$) after reperfusion, declined one week after ($P < 0.01$). **Conclusion** There was a change of expression of hephaestine in the cortex and striatum during acute cerebral ischemia and reperfusion, its mechanism of brain potecion remains unclear.

Key words: acute cerebral ischemia; hephaestine; immunohistochemistry

Hephæstine 是新近发现的脑铁代谢相关蛋白, 在脑铁代谢中起着重要作用^[1]。急性脑缺血再灌注后 hephaestine 表达变化的研究未见报道。我们采用大鼠急性大脑中动脉缺血再灌注模型, 用免疫组化和计算机图像分析技术, 检测了皮层和纹状体缺血再灌注后不同时间 hephaestine 的表达情况, 初步探讨 hephaestine 在急性局灶性脑缺血再灌注病理生理过程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 动物与实验分组 雄性健康 SD 大鼠 60 只,

体重 280~300 g, 由香港理工大学动物中心提供。饲养室室温保持在 25℃, 12 h/12 h 昼夜节律, 自由进食。实验在室温 25℃下的上午 9 时进行, 实验前 12 h 禁食。大鼠随机分为正常对照组、假手术组、大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注 12 h、24 h、48 h、72 h 和 1 周组, 每组 5 只。

1.2 MCAO 再灌注模型的制作和 TTC 染色 4-0 外科手术尼龙线, 头端 0.5 mm 靠近火加热成光滑球形, 距头端 18.5 mm 处作标记, 将球端 20 mm 尼龙线浸泡在多聚-L-赖氨酸(0.1% Sigma)中 1 h, 60℃恒温箱中烘干 1 h, 制成多聚-L-赖氨酸

包被尼龙线。大鼠腹腔注射 4% 水合氯醛 (1 ml/100 g) 麻醉后, 仰卧固定在手术台上, 75% 酒精消毒颈部皮肤, 正中颈部切口, 分离并暴露右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA)、颈内动脉 (ICA), 结扎 ECA 及其分支, 于 CCA 近心端、ICA 远心端分置动脉夹夹闭, 于 ECA 近分叉处用眼科手术剪作一小切口, 插入制备好的栓线, 扎紧备线, 松开 ICA 远心端动脉夹, 使栓线入 ICA, 根据动物大小确定插入深度在 18.0~20.0 mm 范围内, 阻断 MCA 血液供应制成 MCAO 动物模型, 松开 CCA 近心端动脉夹, 缝合皮肤切口, 栓线外留 1 cm。待缺血 60 min 后轻拉线头, 直到感到阻力, 即栓线头端至 ECA 切口处实现再灌注, 术中室温保持在 25℃。麻醉清醒后大鼠出现右侧 Horner's 综合征和左前肢不能前伸, 有运动旋转追尾现象作为模型制作成功的标志。

1.3 免疫组织化学染色 各组大鼠分别于缺血灌注后 12 h、24 h、48 h、72 h 和 1 周, 麻醉后, 开胸暴露心脏, 剪开右心房, 从左心室灌注肝素化 4℃ 生理盐水 300 ml, 将血液冲洗干净, 用 4% 多聚甲醛灌注固定, 断头取脑, 放入 10% 的福尔马林固定 24 h 后, 放入 20% 蔗糖溶液中。自视交叉处连续向后冠状切片, 片厚 10 μm, 根据 Vectastain Elite ABC 成套试剂盒 (Vector Laboratories) 的要求作免疫组化实验。一抗 (抗 hephaestine, Sigma 公司产品) 稀释度为 1:200。细胞被染成棕褐色为阳性结果。同时做空白对照实验。

1.4 图像分析和统计方法 免疫组化结果应用北航 CM-2000B 医学图像分析系统进行统计分析。每张切片随机分析皮层和纹状体各四个视野 (1×200)。分别计算阳性细胞着色的平均值。结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用组间均数 *t* 检验, 检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠 MCAO 再灌注后行为特征和 TTC 染色

动物麻醉清醒后出现局灶性脑缺血表现: 有侧 Horner 氏征, 左前肢不能前伸, 向前行走时向左侧转圈出现追尾现象, 甚至倾倒; TTC 染色右侧大脑半球 MCA 梗死区不染色, 呈白色 (图 1)。

2.2 Hephastine 表达免疫组化染色结果 在正常大鼠和实验性缺血大鼠的皮层和纹状体都有 hephaestine 阳性细胞分布, 阳性细胞着色较深, 呈弥散分布。在缺血再灌注后 12 h Hp 表达明显增加, 24~48 h 表达增加达高峰, 72 h 开始下降, 但是仍比

正常组织高 ($P<0.01$)。缺血 1 周后 Hp 表达明显降低, 较正常组明显减少 ($P<0.01$)。见表 1、图 2、图 3、图 4。

表 1 皮层和纹状体急性缺血后再灌注不同时间 Hephastine 表达的平均 A 值

分组	n	皮层	纹状体
正常组	5	0.050±0.011	0.058±0.012
假手术组	5	0.048±0.018	0.049±0.009
缺血再灌注组			
再灌注 12h	5	0.069±0.014 [△]	0.060±0.021 [△]
再灌注 24h	5	0.084±0.013 [△]	0.074±0.012 [△]
再灌注 48h	5	0.065±0.018 [△]	0.054±0.019 [△]
再灌注 1周	5	0.021±0.009 [▲]	0.031±0.014 [▲]

与正常组相比, [△] $P>0.01$, [▲] $P<0.01$



图 1 MCA 梗塞 TTC 染色

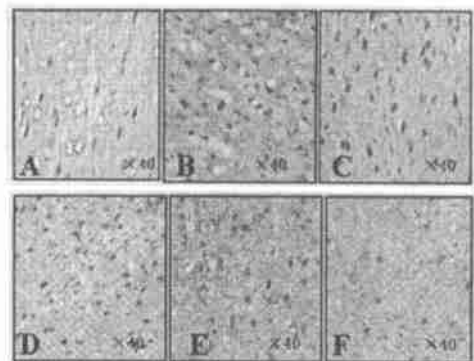


图 2 缺血侧皮层 Hp 的表达 (×40)
(A. 正常 B. 再灌注 12h C. 再灌注 24h
D. 再灌注 48h E. 再灌注 72h F. 再灌注 1 周)

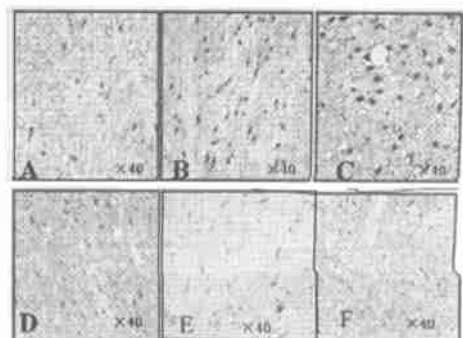


图 3 缺血侧纹状体 Hp 的表达 (×40)
(A. 正常 B. 再灌注 12h C. 再灌注 24h
D. 再灌注 48h E. 再灌注 72h F. 再灌注 1 周)

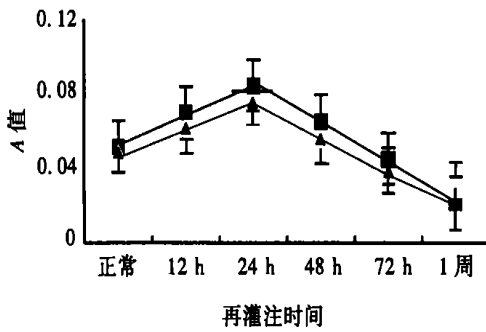


图4 大鼠急性脑缺血再灌注不同时间 Hp 表达的变化

■— 皮层 ▲— 纹状体

3 讨论

缺血性脑血管疾病可造成急性脑缺血、缺氧后铁代谢出现明显的变化, 细胞内铁使氧离子活化从而介导产生的自由基和脂质过氧化起着重要的作用^[2]。研究表明, 高铁可以加重缺血—再灌注损伤, 铁螯合剂或清除剂对神经损伤有保护作用^[3]。

脑铁的平衡取决于脑代谢蛋白的表达水平, 由于这些蛋白的正常表达和相互协作, 使脑铁水平维持在正常的生理水平。脑内铁的平衡要比脑外组织复杂得多, 除了以转铁蛋白受体介导的细胞转铁蛋白- $fe(Tf-fe)$ 为主要途径外, 新发现的铁代谢蛋白如二价金属转运体(DMT1)等参与了脑的铁代谢。hephaestine(Hp)是1999年发现的新的铁转运蛋白, 可将二价铁转化成三价铁, 具有铁氧化酶活性, 参与肠上皮细胞铁释放到血液循环中的作用。香港理工大学铁代谢实验室最近的研究^[4~6]发现, 在脑组织中Hp也广泛存在, Hp在脑铁代谢中的具体作用目前还不十分明确。

全脑缺血后, 皮质大部和皮质下区域的总铁含量升高。有关沙土鼠的研究证实, 大鼠短暂缺血5 min后再灌注, 4 d后海马CA₁区出现Tf阳性神经元和许多铁蛋白阳性胶质细胞, 7 d后纹状体上出现许多铁蛋白阳性的巨噬细胞(活化的小胶质细胞), 说明Tf和铁蛋白阳性巨噬细胞的动员与缺血后神经元的变性有关^[7]。大鼠大脑中动脉阻塞60 min后, Northern blot分析发现缺血皮层区L-铁蛋白和H-铁蛋白mRNA出现迟发的长时间的合成, 在再灌注后12 h出现明显升高, 并且持续2周升高, 高峰期定量分析H-铁蛋白和L-铁蛋白分别升高

2.5倍和6倍。免疫组化结果进一步显示, 60 min脑缺血可以引起铁在脑内的沉积, 与铁蛋白的表达有关, 特别是在巨噬细胞或小胶质细胞明显阳性的组织或细胞坏死区域。到目前为止, 脑缺血后hephaestine表达的变化及作用还未见研究报道。本实验研究发现, 在脑内广泛存在的铁相关蛋白Hp, 在60 min急性脑缺血再灌注后60 min时, 其表达明显增加, 在24 h时表达增加达最高峰, 随着再灌注时间的延长, Hp的表达增加持续48 h, 到72 h时恢复到正常水平, 在再灌注1周时发现, Hp的表达较正常水平明显下降, 缺血再灌注后Hp的表达变化, 可能与急性脑缺血影响Hp的合成有关, 也可能与缺血后脑铁代谢的变化, 二价游离铁的增加促进Hp的合成有关。关于Hp在急性脑缺血再灌注后的表达变化以及其在脑缺血后的病理生理中的具体作用, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 温仲民, 钱忠明. 脑铁代谢与急性脑缺血损伤[J]. 中华医学杂志, 2003, 12:1109~1111.
- [2] Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, *et al.* Mechanisms of ischemic brain damage[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2003, 5(2): 160~167.
- [3] Prass K, Ruscher K, Karsch M, *et al.* Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro[J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 2002, 22(5):520~525.
- [4] Qian Z M, Wang Q. Express of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders[J]. *Brain Res Rev*, 1998, 27:157~267.
- [5] David M Frazer, Christopher D Vulpe, Andrew T McKie, *et al.* Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestine: relationship to other iron transport proteins[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281:931~939.
- [6] Basharut A Syed, Nick J Beaumont, Alpesh Patel. Analysis of the human hephaestine gene and protein: comparative modelling of the N-terminus ecto-domain based upon ceruloplasmin[J]. *Protein Engineering*, 2002, 15:205~214.
- [7] Chi SL, Wang CK, Chen LY, *et al.* Different regulation of H- and L- ferritin messenger RNA subunits, ferritin protein and iron following focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Neuroscience* 2000, 100(3):475~484.