DOI:10.16016/j.1000-5404.201408071

论著

铁离子致大鼠实验性脑室出血后急性脑损伤的初步研究

张建波[1],唐 俊[2],杨力铭[2],陈前伟[2],郭 靖[2],陈 志[2],朱 刚[2] (510000 广州,广州军区联勤部门诊部[1];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,全军神经系统疾病微创诊治专科中心,全军神经创伤防治重点实验室[2])

[摘要] **目的** 观察大鼠脑室内注入铁离子后早期脑损伤的基本病理特点,探讨铁离子在大鼠脑室出血后急性期脑损伤中的作用。**方法** 通过立体定向侧脑室注射法建立脑室出血后铁损伤模型,侧脑室注射二氯化铁或生理盐水,采用干湿质量法测定损伤后24 h脑组织含水量变化,伊文思蓝染色法观察血脑屏障损伤,Fluoro-Jade C(FJC)、TUNEL染色及透射电镜观察海马神经元变性、凋亡情况,采用透射电镜观察脑室壁纤毛损伤,并于损伤后7 d采用整体脑室剥离法观察大体标本脑室壁含铁血黄素沉积。**结果** 铁损伤组在24 h时大脑半球含水量较对照组明显升高($P<0.05$)、血脑屏障破坏、海马神经元大量变性、凋亡,脑室室管膜纤毛及微绒毛大量脱落;7 d时侧脑室壁大量含铁血黄素沉积。**结论** 铁离子脑室内沉积可导致脑水肿、血脑屏障损伤、脑室壁损伤等急性脑损伤效应,可能在脑室出血后急性期脑损伤中起重要作用。

[关键词] 二氯化铁;脑水肿;血脑屏障;大鼠
[中图法分类号] R363.13; R742; R743.34 [文献标志码] A

Iron ion-induced acute brain injury in rats with intraventricular hemorrhage

Zhang Jianbo[1], Tang Jun[2], Yang Liming[2], Chen Qianwei[2], Guo Jing[2], Chen Zhi[2], Zhu Gang[2] ([1]Department of Outpatient, Logistics Department of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong Province, 510000; [2]Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Specialized Center of Minimally Invasive Diagnosis and Treatment for Nervous System Diseases, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the pathological features of intraventricular injection of iron ion in rats with intraventricular hemorrhage (IVH) and explore the role of iron in acute brain injury after IVH. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were given an injection of 100 μL either normal saline (Control) or ferrous chloride ($FeCl_2$, the iron group) into the right lateral ventricle, and were euthanized at different time points. Brain edema was evaluated by wet-dry weighting in 24 h after injury. Evans blue (EB) staining was used to investigate blood brain barrier (BBB) injury. Terminal-deoxynucleotidyl transferase Mediated nick end labeling (TUNEL), Fluoro-Jade C (FJC) staining and transmission electron microscopy (TEM) were carried out to test the degeneration and apoptosis of hippocampus neurons and observe the damage in ventricular cilia. Hemosiderin deposition was investigated by stripping the whole cerebral ventricles in 7 d after injury. **Results** The iron group had significantly increased brain water content ($P<0.05$), damaged BBB, large amount of hippocampal neurons degenerated and apoptotic, and a great deal of cilia and microvilli shedding from ventricular ependyma in 24 h after the injury, and lot of hemosiderin deposition on the lateral ventricular wall in 7 d as well when compared to control group. **Conclusion** Intraventricular deposition of iron causes brain edema, BBB damage, injury of ventricular wall and other symptoms of acute brain injury, suggesting that iron

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271281,81070929);国家重点基础研究发展计划(973计划,2014CB541606)
[通信作者] 朱 刚,E-mail:gangzhu6666@sina.com
陈 志,E-mail:zhichentmmu@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1534.111.html(2014-12-03)

may play an important role in the acute injury after IVH.

[**Key words**] $FeCl_2$; brain edema; blood brain barrier; rats

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81271281, 81070929) and the National Key Basic R&D Plan of China (973 Program, 2014CB541606). Corresponding author: Zhu Gang, E-mail: gangzhu6666@sina.com; Chen Zhi, E-mail: zhichentmmu@gmail.com

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是常见的脑血管疾病,具有高发病率、高致残率和高致死率的特点,脑出血合并脑室出血(Intraventricular hemorrhage, IVH)较单独的脑出血具有更高的致残、致死率,且给家庭和社会带来巨大的经济负担及其他问题。目前,脑室出血损伤机制研究逐步受到关注,但详细机制仍不清楚,亦缺乏针对性治疗措施。既往大量研究证实ICH后存在铁超载[1-3],且ICH后脑组织内与铁相关蛋白表达增多[4-5],铁螯合剂如去铁敏等药物治疗ICH有效[6-7],以上研究结果证实铁在ICH后脑损伤中发挥重要作用。我们前期研究发现脑室出血后同样存在脑室内铁蓄积[8],且铁与IVH慢性脑积水发生关系密切[9],但铁在IVH后急性脑损伤的作用不清楚。我们近期研究发现IVH后急性期脑损伤存在弥漫性脑水肿、血脑屏障(blood brain barrier, BBB)损伤等基本病理特点[10],故推测IVH后血液降解产物铁离子可能在IVH后急性期脑损伤中也发挥重要作用,本研究拟通过建立大鼠IVH后铁损伤模型,对铁离子在IVH后大鼠急性期脑损伤的作用进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性SD(Sprague-Dawl)大鼠55只,体质量250~300 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心[许可证号:SCXK(渝)2007-0005]和第三军医大学西南医院实验动物中心[许可证号:SYXK(渝)2012-0012]提供。先将大鼠在实验室适应性喂养3 d,自由进食、进水,按随机数字表法分为对照组(生理盐水组,$n=21$)和铁损伤组(二氯化铁组,$n=21$),术后24 h采用干湿质量法测定脑组织含水量(对照组,$n=5$;铁损伤组,$n=5$);采用伊文思蓝染色法(对照组,$n=5$;铁损伤组,$n=5$)和透射电镜(对照组,$n=3$;铁损伤组,$n=3$)观察血脑屏障损伤情况,采用末端标记法观察大鼠海马神经元变性凋亡情况(对照组,$n=5$;铁损伤组,$n=5$),术后7 d仍存活的大鼠剥离脑室观察含铁血黄素的沉积(对照组,$n=3$;铁损伤组,$n=3$)。若大鼠造模后死亡,补充至实验设计数量($n=13$)。

1.2 试剂与器材

主要试剂:二氯化铁(429368-1G,美国Sigma公司),伊文思蓝(E2129-10G,美国Sigma公司),TUNEL试剂盒(11684817910-50T,美国罗氏公司),2.5%戊二醛(第三军医大学生物医学分析测试中心提供),组织包埋剂(OCT Compound-4583,日本樱花公司)。仪器:脑立体定位仪(ZH-蓝星B型,淮北正华生物仪器设备公司),透射电子显微镜(TECNAI10型,荷兰飞利浦公司),冰冻切片机(CM1850,德国徕卡公司),手术显微镜(Pico,德国卡尔蔡司公司),荧光显微镜(X-cite Seris 120Q,德国徕卡公司),舒锐无菌胰岛素注射器(29G,美国BD公司),电子天平(赛多利斯仪器系统有限责任公司),动物颅骨钻(瑞沃德生命科技有限公司)等。

1.3 大鼠模型制作

按本研究组既往方法建立大鼠脑室出血模型[8,10],简述如下:以水合氯醛(5%,7 mL/kg)麻醉大鼠后将其固定在脑立体定位仪上,保持颅顶位置水平,沿颅顶中线用手术刀切开约0.5 cm皮肤,用镊子钝性分离暴露前囟,以前囟点为基准,向右1.6 mm、向后0.6 mm处颅骨钻钻孔。将29G胰岛素注射器夹持在脑立体定位仪上抽取铁损伤组溶液100 μL,沿颅骨钻孔位置,从颅骨表面垂直缓慢进针,深度约4.5 mm;根据实验分组分别将100 μL二氯化铁溶液(铁损伤组)或100 μL生理盐水(对照组)匀速缓慢注入右侧脑室(20 μL/min),注射完毕后留针5 min再缓慢退针,用医用骨腊封骨孔后缝合切口。术后将大鼠放置在饲养笼中恢复。

1.4 脑组织含水量测定

脑组织含水量的测定采用干湿质量法。模型制作24 h后,水合氯醛(5%,7 mL/kg)再次麻醉2组大鼠,断头取脑,将取得脑组织迅速分为左右两侧大脑半球及小脑三部分,分别称取湿质量,然后放入电热恒温干燥箱(100 ℃)中烘烤,24 h后称取脑组织干质量。脑组织含水量计算公式:脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.5 伊文思蓝检测

模型制作后23 h,水合氯醛(5%,7 mL/kg)麻醉2组大鼠,采用尾静脉注射法注射EB(2%,4 mL/kg),体循环1 h,然后以生理盐水250 mL心内灌注排净血液;断头取脑,生理盐水冲净表面血液,滤纸沾干;大体标本直接置于显微镜绿色激发光($\lambda=540$ nm)下观察拍照;随后将脑组织在冰冻切片机上制成10 μm厚冰冻切片,并在荧光显微镜绿色激发光下观察。当BBB

被破坏时,与血液中小分子物质白蛋白结合的伊文思蓝会通过破坏的 BBB 渗出到脑组织中,绿色激发光下在显微镜下呈现斑片状红色荧光。

1.6 透射电镜观察

模型制作后 24 h,水合氯醛(5%,7 mL/kg)再次麻醉 2 组大鼠,生理盐水约 250 mL 心内灌注排净血液,换用 2.5% 戊二醛加 4% 多聚甲醛 250 mL 体内循环固定,断头取脑,切取海马及脑室壁组织(约 1 mm × 1 mm × 1.5 mm 大小)置于 2.5% 戊二醛固定,按透射电镜标本制样步骤制成超薄切片、铀染、铅染色,透射电镜下观察、拍照。

1.7 Fluoro-Jade C(FJC)染色

为了解侧脑室注射二氯化铁溶液对海马神经元的影响,实验者使用 FJC 方法检测海马神经元变性情况。模型制作后 24 h,水合氯醛(5%,7 mL/kg)再次麻醉 2 组大鼠,生理盐水约 250 mL 心内灌注排净血液,换用预冷的 4% 多聚甲醛 250 mL 体内循环固定,取脑置于 4% 多聚甲醛中后固定 24 h,梯度蔗糖脱水,沉底后将脑组织取出使用包埋剂(OCT∶30% PBS 蔗糖 = 1∶1)在干冰上包埋,后置于冰冻切片机制取 20 μm 厚的切片行 FJC 染色。FJC 染色步骤:①冰冻切片 50 ℃烤箱烤片 1 h,后取出室温冷却 20 min;②蒸馏水浸洗 2 min,含 1% NaOH 的 80% 酒精溶液中透明 5 min;③70% 酒精中浸泡 2 min,蒸馏水中洗涤 2 min;④置入 0.06% 高锰酸钾溶液中 10 min;⑤蒸馏水冲洗 2 min 后入 FJC 工作液 15 min;⑥蒸馏水冲洗 2 次,每次 1 min;⑦将玻片置于 50 ℃烤箱内,烤干;⑧切片入二甲苯中 5 min,后用中性树脂封片;⑨荧光显微镜观察、拍照。

1.8 TUNEL 细胞凋亡检测

模型制作后 24 h,水合氯醛(5%,7 mL/kg)再次麻醉 2 组大鼠,生理盐水约 250 mL 心内灌注排净血液,换用预冷的 4% 多聚甲醛 250 mL 体内循环固定,然后取脑置于 4% 多聚甲醛中 24 h,后转入梯度蔗糖脱水,沉底后行将组织制成石蜡组织块,石蜡切片机上制取厚度为 10 μm 的切片。TUNEL 染色严格按照罗氏 TUNEL 说明书上步骤进行。TUNEL 染色完毕后,显微镜下拍照,观察海马区神经元的变化。

1.9 含铁血黄素沉积观察

7 d 时仍存活的大鼠,水合氯醛(5%,7 mL/kg)再次麻醉 2 组大鼠,将大鼠头部置于冰水混合物中片刻,取脑,勿损伤脑组织,然后按照 Mirzadeh 等[11]的方法剥离暴露右侧脑室,观察含铁血黄素在脑室壁上的沉积,佳能相机微距拍取 4 倍照片。

1.10 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行正态分布和方差齐性检查,数据比较采用两独立样本 t 检验。

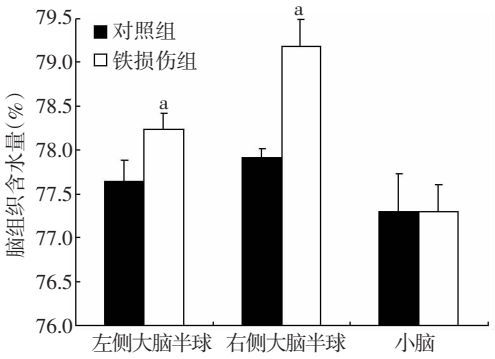
2 结果

2.1 动物术后情况死亡率及体质量变化

对照组未见动物死亡,铁损伤组动物 24 h 死亡率 29.17%(7/24),7 d 时死亡率 57.14%(4/7)。对照组动物术后 24 h 体质量较术前体质量减轻(2.05 ± 0.85)%,铁损伤组减轻(14.39 ± 4.03)%,铁损伤组动物体质量较对照组减轻更明显($t = -13.052$,$P < 0.01$)。

2.2 脑组织含水量测定

24 h 时,铁损伤组双侧大脑半球脑组织含水量均较对照组明显升高(左侧 $P < 0.05$,右侧 $P < 0.05$),显示侧脑室注射后铁离子超载可导致双侧大脑半球急性脑水肿(图 1)。



a:$P < 0.05$,与对照组比较

图 1 脑室注射后脑组织含水量测定结果

2.3 伊文思蓝染色

24 h 时,对照组大体脑组织及冠状切片显微镜红色荧光(λ = 540 nm)下未观察到脑组织伊文思蓝染液渗出,铁损伤组大体脑组织及冠状切片可见大量伊文思蓝红色斑片样荧光表达,显示铁离子侧脑室注射可导致 BBB 损伤(图 2)。

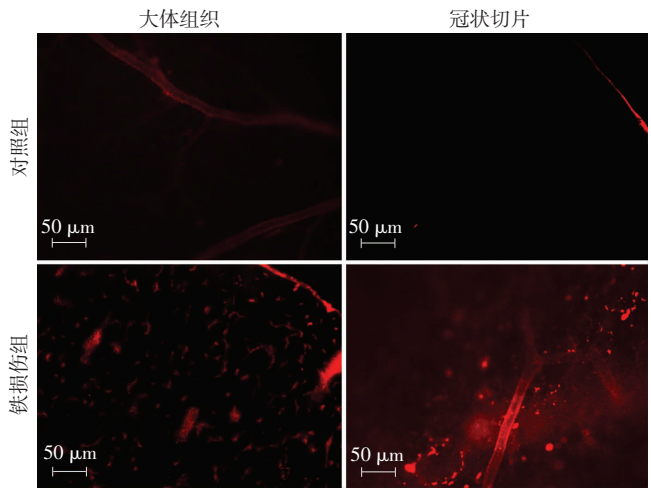


图 2 侧脑室注射二氯化铁溶液后伊文思蓝脑组织染色

2.4 透射电镜观察

24 h时,对照组脑室壁室管膜细胞排列整齐,纤毛和微绒毛及纤毛横断面微管的9+2结构清晰可见;铁损伤组脑室壁结构紊乱,室管膜与室管膜下区分离,组织水肿,纤毛及微绒毛大量脱落。对照组中海马神经元染色质均匀分布、无损伤;铁损伤组海马区可见铁离子渗透到神经元间隙中,神经元内染色质浓聚,结构消失,显示铁损伤组存在室管膜组织水肿、纤毛及微绒毛的脱落、神经元变性(图3)。

2.5 Fluoro-Jade C (FJC)染色

24 h时,对照组海马区未见FJC染色阳性神经元,铁损伤组海马CA1、CA3及齿状回区域可见大量FJC神经元阳性表达,且CA3区域组织呈现空泡化,齿状回区域组织断裂,显示铁离子侧脑室注射可导致海马区神经元损伤(图4)。

2.6 TUNEL细胞凋亡检测

24 h时,对照组海马神经元分布密集,未见TUNEL阳性染色,铁损伤组可见海马大量TUNEL染色阳性神经元表达($P<0.01$),显示铁离子侧脑室注射可导致海马区神经元损伤(图5)。

2.7 含铁血黄素沉积观察

7 d时,对照组脑室剥离暴露后,未见含铁血黄素在脑室表面的沉着,铁损伤组可见大量黄褐色含铁血黄素的沉积物(图6)。

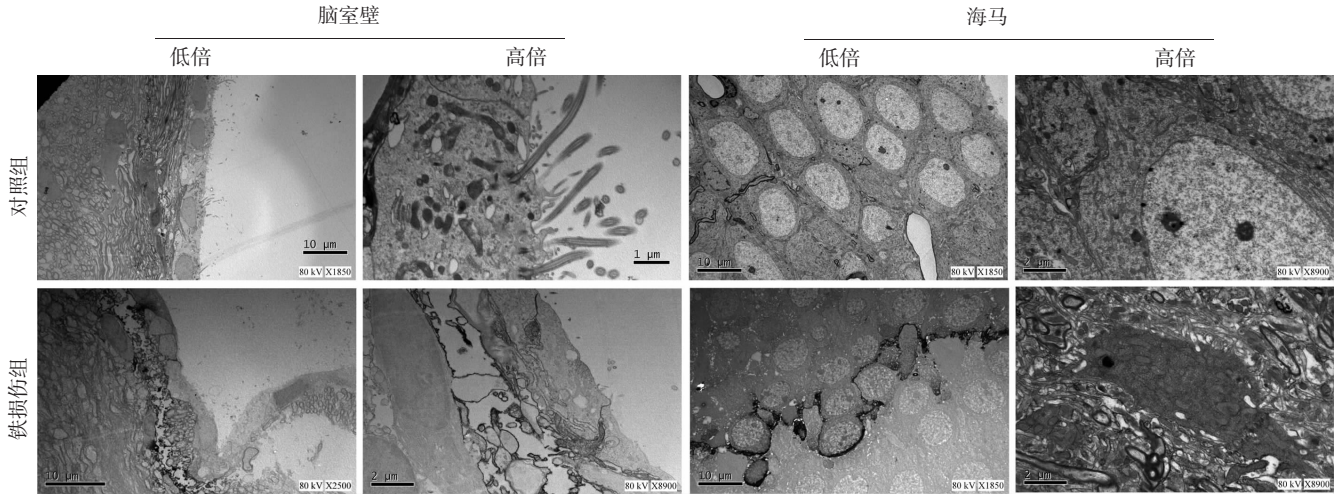


图3 侧脑室注射二氯化铁溶液后脑室壁及海马透射电镜观察

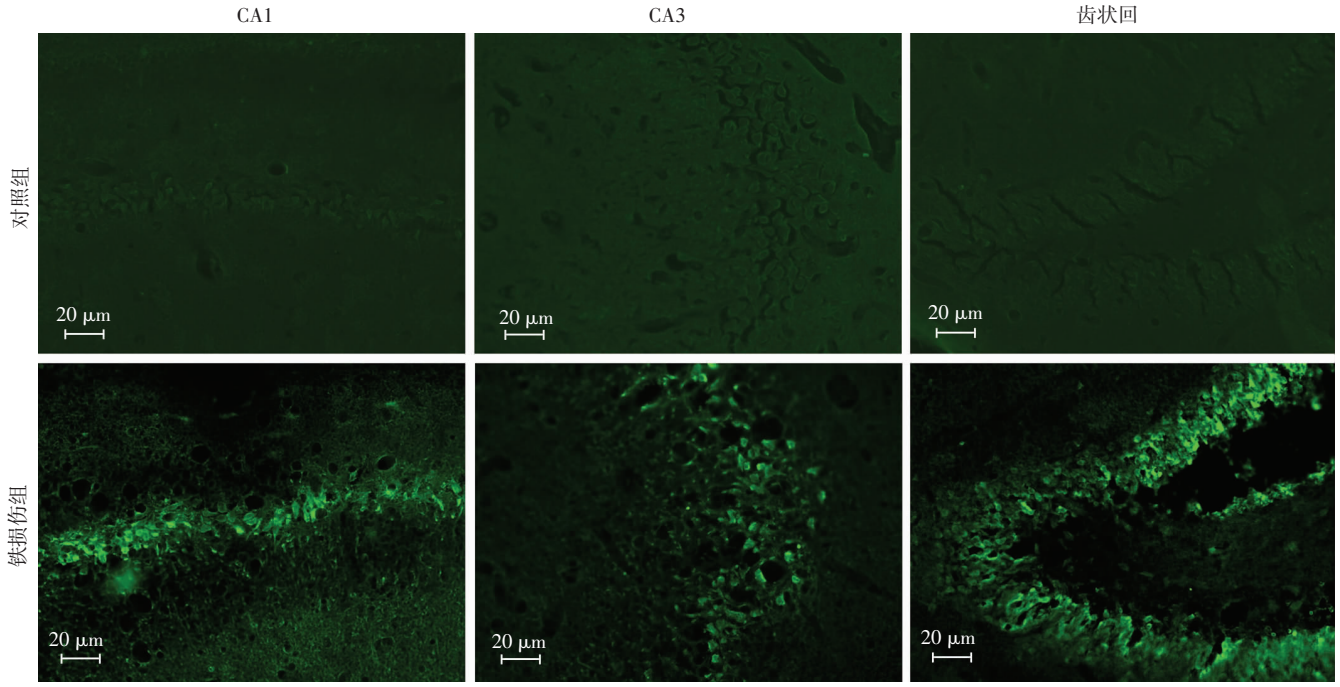
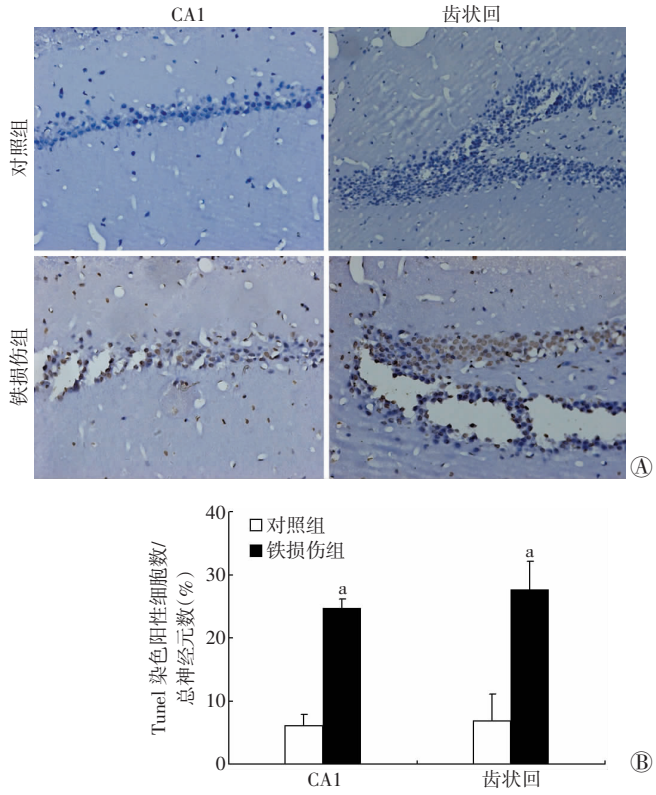
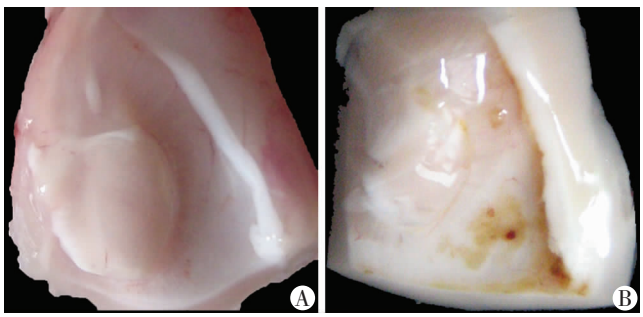


图4 侧脑室注射二氯化铁溶液后海马神经元FJC染色阳性(绿色)神经元



A:TUNEL 染色结果　蓝色:正常神经元;褐色:凋亡神经元;B:TUNEL 染色定量分析结果　a:$P<0.01$,与同区对照组比较

图 5　侧脑室注射二氯化铁溶液后海马神经元凋亡



A:对照组;B:铁损伤组

图 6　侧脑室注射后含铁血黄素沉积

3　讨论

本研究通过大鼠侧脑室注射二氯化铁溶液建立了 IVH 铁损伤模型,并对急性期脑损伤特征进行了初步观察,研究结果显示脑室内铁蓄积可导致早期脑水肿,血脑屏障损伤,海马神经元变性、凋亡及脑室壁损伤等效应。上述研究结果与我们前期研究发现的 IVH 后急性期脑损伤的特点[8]有相同或相似之处,进一步证实了铁在 IVH 后可导致急性期脑损伤,我们推测铁离子可能是潜在的治疗 IVH 急性期脑损伤的干预或治疗靶点。

既往对 IVH 研究相对 ICH 研究来说匮乏,我们及其他研究机构对 IVH 的研究主要关注 IVH 脑积水的方面,对 IVH 急性期研究重视不够。本课题组的前期对脑积水形成的机制及防治策略进行研究[8-10,12],该研究发现其未能显著改善早期脑水肿及血脑屏障损伤。同时,临床试验结果亦显示早期纤溶及引流能快速清除脑室内积血并降低脑积水的发生率,但不能显著降低总体病死率及提高预后[13],提示 IVH 后除脑积水外,尚有影响预后的其他因素。我们近期研究发现 IVH 后存在弥漫性脑水肿、血脑屏障损伤等基本病理特点[10],但具体致伤机制不明。ICH 后存在铁超载[1-3],且 ICH 后脑组织内与铁相关蛋白表达增多[4]。ICH 后脑脊液及血清中铁的含量明显升高,铁通过过氧化作用攻击脂肪形成自由基,自由基攻击 DNA 引起脑氧化损伤[14],此外,铁离子产生的自由基也破坏了细胞内钙离子的稳态,导致细胞凋亡。ICH 后与铁相关的转铁蛋白及促进血红素降解的血红素加氧酶(HO-1)表达增加,并且这些产物表达增加与脑组织水肿高峰 3 d 相一致[15]。以上均说明铁离子超载在 ICH 脑损伤中发挥重要作用。我们前期的研究发现 IVH 同 ICH 一样也存在铁超载[8]。本研究证实铁离子侧脑室注射可以导致双侧大脑半球的脑水肿,BBB 损伤,海马神经元的变性、凋亡,也首次通过剥离脑室的方法观察到脑室壁大量含铁血黄素的沉积。我们既往研究证实铁离子与 IVH 后脑积水关系密切[8-9],从而推测铁离子不但在 ICH 后脑损伤中发挥重要作用,而且在 IVH 后急性期脑损伤中发挥重要作用。

纤毛是维持脑脊液运动及正常功能的重要结构,纤毛结构异常或缺失可导致脑脊液循环障碍[16-18]。本研究中,我们观察到铁离子侧脑室注射后急性期可导致脑室壁纤毛及微绒毛的剥脱、脱落及室管膜组织的水肿。我们推测脑室壁纤毛损伤,可能在早期导致脑脊液正常循环发生障碍,继而参与了 IVH 后继发性脑积水的形成。既往研究发现,IVH 后继发脑积水与海马区神经元损伤可导致学习记忆功能障碍,本研究发现铁离子侧脑室注射后急性期,大鼠海马区神经元变性、凋亡,侧脑室扩张,我们推测这些病理改变和远

期学习功能障碍密切相关。

综上所述,侧脑室注射二氯化铁溶液后产生的铁离子蓄积、超载可导致IVH后急性期脑损伤。铁离子可能是IVH后脑损伤潜在的治疗靶点,针对铁离子超载相关干预和策略研究可能产生治疗IVH脑损伤的新方法。本研究虽证实铁离子在IVH后可导致急性期脑损伤,但具体机制不明,需进一步研究其机制及作用通路。

参考文献:

[1] Xi G, Keep R F. Intracerebral hemorrhage: mechanisms and therapies[J]. Transl Stroke Res, 2012, 3(Suppl 1): 1-3.

[2] Yoshida K. Iron metabolism in the central nervous system [J]. Rinsho Shinkeigaku, 2012, 52(11): 943-946.

[3] Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 202(2): 199-211.

[4] 刘韶华, 姜亚军, 吴颢昕, 等. 大鼠脑出血后脑组织转铁蛋白表达的实验研究[J]. 临床神经病学杂志, 2004, 17(6): 438-440.

[5] Rouault T A, Cooperman S. Brain iron metabolism[J]. Semin Pediatr Neurol, 2006, 13(3): 142-148.

[6] 袁轶恺, 陈志, 朱海涛, 等. 大鼠脑室出血后脑铁代谢与脑积水发生关系的研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2012, 17(1): 28-31.

[7] 方郁丹, 宋水江. 铁离子在脑出血中的损伤机制及铁螯合剂的神经保护作用[J]. 国际脑血管病杂志, 2006, 14(8): 630-632.

[8] Chen Z, Gao C, Hua Y, *et al*. Role of iron in brain injury after intraventricular hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(2): 465-470.

[9] 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.

[10] 张建波, 陈志, 张渊, 等. 大鼠脑室出血后急性期脑损伤病理特点的初步探讨[J]. 中华神经医学杂志, 2013, 12(7): 665-669.

[11] Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto K, *et al*. The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow [J]. J Vis Exp, 2010(39): 1938.

[12] 孟辉, 刘国龙, 唐荣锐, 等. 大鼠实验性脑室出血后水通道蛋白1在脑内的表达及意义[J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(1): 11-14, 19.

[13] Gaberel T, Magheru C, Parienti J J, *et al*. Intraventricular fibrinolysis versus external ventricular drainage alone in intraventricular hemorrhage: a meta-analysis [J]. Stroke, 2011, 42(10): 2776-2781.

[14] Wu J, Hua Y, Keep R F, *et al*. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage[J]. Brain Res, 2002, 953(1/2): 45-52.

[15] Wu J, Hua Y, Keep R F, *et al*. Iron and iron-handling proteins in the brain after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2003, 34(12): 2964-2969.

[16] Rudnick S N, McDevitt J J, First M W, *et al*. Inactivating influenza viruses on surfaces using hydrogen peroxide or triethylene glycol at low vapor concentrations[J]. Am J Infect Control, 2009, 37(10): 813-819.

[17] Banizs B, Pike M M, Millican C L, *et al*. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus[J]. Development, 2005, 132(23): 5329-5339.

[18] Hirst R A, Rutman A, O'Callaghan C. Hydrogen peroxide at a concentration used during neurosurgery disrupts ciliary function and causes extensive damage to the ciliated ependyma of the brain[J]. Child Nerv Syst, 2009, 25(5): 559-561.

(**收稿**:2014-08-11;**修回**:2014-10-27)

(编辑　王小寒)