基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003460

新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型中 TRPC3 通路介导的神经自噬研究

薛　梅，杨　丽，樊晓艳，李　玲，钱金明
（南京医科大学附属泰州人民医院新生儿科，泰州　225300）

【摘　要】目的：探讨新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型中 TRPC3 通路介导的神经自噬作用。**方法：**7 日龄 Sprague-Dawley（SD）雄性幼鼠随机分为 4 组，每组 20 只，分别为 Sham 组、HIBD 组、HIBD+Vector 组和 HIBD+TRPC3 组。HIBD+Vector 组和 HIBD+TRPC3 组在诱导 HIBD 模型前 24 h，分别将 Vector 或 TRPC3 注射到左侧脑室中。评估各组幼鼠脑梗死面积、神经系统评分、脑水肿体积、神经元凋亡和线粒体自噬。体外将小鼠海马神经元细胞系（HT22）分为以下 6 组：Control 组、OGD/R 组、OGD/R+TRPC3 组、OGD/R+NC 组、OGD/R+si-Pink1 组和 OGD/R+TRPC3+si-Pink1 组。除 Control 组外，其他组使用氧气-葡萄糖剥夺/再灌注（Oxygen-glucose deprivation/reperfusion，OGD/R）方法建立体外脑缺血再灌注模型。通过线粒体膜电位的检测线粒体损伤情况。**结果：**与 Sham 组相比，HIBD 组和 HIBD+Vector 组显示出较大的梗死面积、脑含水量、神经学评分和神经元凋亡（$P<0.05$）。HIBD+TRPC3 组的梗死面积、脑含水量、神经学评分和神经元凋亡较 HIBD+Vector 组明显降低（$P<0.05$）。与 Sham 组相比，HIBD 组和 HIBD+Vector 组线粒体自噬相关蛋白 PTEN 诱导假定激酶 1（PTEN induced putative kinase 1，Pink1）、E3 泛素连接酶（Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase，Parkin）和微管相关蛋白轻链 3（light chain 3，LC3）Ⅱ的表达水平增加（$P<0.05$）。与 HIBD+Vector 组相比，HIBD+TRPC3 组 Pink1、Parkin 和 Lc3Ⅱ的表达水平进一步增加（$P<0.05$）。体外实验显示，TRPC3 上调可以强烈增加 Pink1、Parkin 的表达和 Lc3Ⅱ/Lc3Ⅰ比值，以及减少选择性自噬接头蛋白（sequestosome-1，p62）的表达。Pink1 沉默可以部分阻止 TRPC3 对线粒体自噬的影响。TRPC3 上调增加了健康线粒体的数量，减少了受损线粒体的数量，提高了 HT-22 细胞的生存率。然而，Pink1 沉默阻止了 TRPC3 对线粒体功能和增殖能力的恢复。**结论：**TRPC3 通过激活 Pink1/Parkin 通路介导的线粒体自噬，在 HIBD 早期阶段中发挥了重要的保护作用。

【关键词】新生儿；缺血缺氧性脑病；典型的瞬时受体电位 3；线粒体自噬
【中图分类号】R722　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-03-06

A study of neuro-autophagy mediated by the TRPC3 pathway in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage

Xue Mei，Yang Li，Fan Xiaoyan，Li Ling，Qian Jinming
（*Department of Neonatology，The Affiliated Taizhou People's Hospital of Nanjing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To explore neuro-autophagy mediated by the transient receptor potential channel 3（TRPC3）pathway in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage（HIBD）. ***Methods*：**Seven-day-old male Sprague-Dawley（SD）mice were randomly divided into four groups，with 20 rats in each group：sham group，HIBD group，HIBD+vector group，and HIBD+TRPC3 group. At 24 hours before the induction of the HIBD models，vector and TRPC3 were injected into the left ventricle of the young mice in the HIBD+vector and HIBD+TRPC3 groups，respectively. The mice in each group were assessed for brain infarct area，neurological score，cerebral edema volume，and neuronal apoptosis and mitophagy. The *in vitro* mouse hippocampal neuronal cell line（HT22）was divided into the following six groups：control group，OGD/R group，OGD/R+TRPC3 group，OGD/R+NC group，OGD/R+si-Pink1 group，and OGD/R+TRPC3+si-Pink1 group. The oxygen-glucose deprivation/reperfusion（OGD/R）method was used to establish an *in vitro* cerebral ischemia-reperfusion model in all groups except the control group. Mitochondrial damage was measured based on the mitochondrial membrane potential. ***Results*：**Compared with the sham group，the HIBD and HIBD+vector groups had greater infarct area，brain water content，neurological score，and neuronal apoptosis（$P<0.05$）. The infarct area，brain water content，neurological score，and neuronal apoptosis were significantly reduced in the HIBD+TRPC3 group

作者介绍：薛　梅，Email：shtnerpe2009@163.com，
研究方向：新生儿脑损伤。
基金项目：江苏省卫生健康委员会资助项目（编号：20212343）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240402.1137.004
（2024-04-03）

compared with the HIBD+vector group（$P<0.05$）. The expression levels of mitophagy-related proteins PTEN-induced putative kinase 1（Pink1）, Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase（Parkin）, and light chain 3（LC3）Ⅱ were significantly higher in the HIBD and HIBD+vector groups than in the sham group（$P<0.05$）. The expression levels of Pink1, Parkin, and LC3 Ⅱ were further increased in the HIBD+TRPC3 group compared with the HIBD+vector group（$P<0.05$）. *In vitro* experiments showed that TRPC3 upregulation significantly increased Pink1 and Parkin expression and the LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ ratio, and reduced sequestosome-1（p62）expression. Silencing Pink1 partially blocked the effect of TRPC3 on mitophagy. TRPC3 upregulation increased the number of healthy mitochondria, reduced the number of damaged mitochondria, and increased HT-22 cell survival rate. However, silencing Pink1 prevented TRPC3 from restoring mitochondrial function and proliferative capacity. ***Conclusion***: TRPC3 plays an important protective role in the early stages of HIBD by activating the Pink1/Parkin pathway-mediated mitophagy.

【Key words】neonatal; hypoxic-ischemic brain damage; typical transient receptor potential channels 3; mitophagy

缺氧缺血性脑损伤（hypoxic-ischemic brain damage, HIBD）是新生儿死亡和神经系统残疾的主要原因[1]。研究这种疾病的发病机制并开发更有效和实用的治疗方案是围产医学的研究重点。自噬是神经元的正常生理过程，阻断基底自噬会导致动物模型中的神经元死亡[2]。此外，自噬是维持神经元平衡的必要条件，在HIBD情况下，适度的线粒体自噬对神经系统有保护作用[3]。典型的瞬时受体电位3（transient receptor potential channels 3, TRPC3）作为Ca^{2+}通道，在脑细胞外间隙、神经元和血管平滑肌细胞中表达[4]。研究发现，敲除神经元TRPC3通道与脑血流受损和神经元活动的高度瞬间变化相关[5]。还有研究发现，TRPC3作为线粒体Ca^{2+}负荷的调控因子，其激活促进过量Ca^{2+}内流，导致线粒体内膜通透化，进而激活线粒体自噬将受损的线粒体清除[6-7]。然而，目前尚不清楚TRPC3介导的线粒体自噬是否参与HIBD病理过程。在本研究中，通过建立新生大鼠HIBD模型，初步研究了TRPC3是否参与了HIBD的病理过程及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7日龄Sprague-Dawley（SD）雄性幼鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，体质量（22±2）g，实验动物生产许可证编号：SCXK（上海）2019-005。将大鼠随机分为4组，每组20只，分别为Sham组、HIBD组（2只死亡）、HIBD+Vector组（3只死亡）和HIBD+TRPC3组（3只死亡）。所有大鼠置于温度（22±2）℃、湿度50%~60%，12 h/12 h明暗循环的标准环境中。

1.2 实验方法

1.2.1 分组处理 HIBD组、HIBD+Vector组和HIBD+TRPC3组参照文献方法建立HIBD模型[8]，具体操作为：幼鼠用异氟烷完全麻醉（3%~4%用于诱导，1%~2%用于维持），并在解剖显微镜下，分离左侧颈总动脉，用8~0缝线在近端和远端结扎，然后从中间切开以防止血管再生。手术后，将幼鼠置于37 ℃的暖室中30 min以恢复；随后，将它们放置在具有37 ℃绝缘垫的低氧室中，并以1 L/min的流速引入纯氮气，以将低氧的氧浓度保持在8%。缺氧60 min后，将幼鼠放回母亲身边休息，自由摄取母乳。相比之下，Sham组左侧颈总动脉不被结扎和不暴露于缺氧环境中，在37 ℃的暖箱中短暂休息后，将幼鼠放回其母亲身边，让其自由摄取母乳。

通过将TRPC3 cDNA克隆到pcDNA3.1载体（美国Invitrogen公司）中获得TRPC3表达载体pcDNA3-TRPC3质粒（TRPC3），构建的序列经DNA测序验证。HIBD+Vector组和HIBD+TRPC3组在诱导HIBD模型前24 h，将幼鼠麻醉并固定在定位器上，将Hamilton微型注射器插入脑桥后1.0 mm，中线侧2.0 mm，颅骨表面腹侧3.5 mm，将pcDNA3-NC载体（Vector）或TRPC3（20 nmol/L, 12 μL）在5 min内注射到左侧脑室中。注射前后幼鼠的行为无任何变化。

1.2.2 脑水肿的测量 HIBD后24 h，幼鼠在麻醉下被安乐死。迅速取出大脑，然后将大脑分为同侧和对侧半球。立即用电子秤测量2个半球的湿重；然后将半球在100 ℃的烤箱中加热48 h，得到干重。脑含水量的计算公式：脑含水量（%）=（1-干重/湿重）×100%。

1.2.3 梗死体积分析 采用2,3,5-三苯基氯化四氮唑（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC）（美国Sigma-Aldrich公司）评估脑梗死面积。HIBD后24 h，幼鼠在麻醉下被安乐死，并收集脑组织。在-20 ℃下冷冻15 min后，取成年大鼠的脑基质，切成5个3 mm厚的冠状切片。采集染色图像后，用Image J测量和分析白色梗死区和红色非梗死区的面积。梗死区的计算：梗死区百分比=（右半球尺寸-左半球红色尺寸）/右半球尺寸×100%。

1.2.4 神经系统缺损评分的评估 在幼鼠安乐死之前，对神经功能缺损评分进行评估[8]。0分反映了正常的行为；1分反映了未能完全伸出右前爪；2分表示向右盘旋；3分表示向右

跌倒；4分表示缺乏自发行走和意识水平低下；5分表示动物死亡。课题组在分析中排除了得分为0或5的实验性幼鼠。

1.2.5 苏木精和曙红（HE）染色、TUNEL细胞凋亡试验和电镜检查 HIBD后24 h，用正常生理盐水+4%多聚甲醛（0.1 mol/L磷酸盐缓冲液，pH 7.4）灌注心肌。将脑组织在上述固定器中放置48 h，嵌入石蜡中，然后切成切片（5 μm），根据操作手册进行HE染色。使用光学显微镜观察海马组织中神经细胞胞质水肿、染色疏松和核固缩情况。对于TUNEL检测，将切片与TUNEL检测液在37 ℃下孵育1 h，然后根据TUNEL检测法用DAPI对细胞核进行染色。在荧光显微镜下计算每组每个组织的TUNEL阳性核的数量和细胞凋亡率。从梗死区取出皮质，用2.5%戊二醛固定。使用JEM-1400PLUS透射电子显微镜（日本电子公司）获得大脑皮层神经细胞中线粒体周围自噬体的超结构图像。

1.2.6 细胞培养和处理 小鼠海马神经元细胞系（HT22）来自中国科学院上海细胞生物学研究所。将HT22细胞以2×10^5个/孔的密度平均接种于6/96孔板中，用于进一步研究。HT22细胞在含10%胎牛血清的Dulbecco's Modifified Eagle's Medium（DMEM，美国Hyclone公司）中培养。将细胞分为以下6组：Control组、OGD/R组、OGD/R+TRPC3组、OGD/R+NC组、OGD/R+si-Pink1组和OGD/R+TRPC3+si-Pink1组。除Control组外，其他组使用氧气-葡萄糖剥夺/再灌注（Oxygen-glucose deprivation/reperfusion，OGD/R）方法，建立体外脑缺血再灌注模型[9]。OGD/R+si-Pink1组在建立OGD/R模型前24 h，用Pink1特异性小干扰RNA（si-Pink1）序列（5′-CCAATTGACAGGCCATAAA-3′）转染HT22细胞。OGD/R+TRPC3组在建立OGD/R模型前24 h，用TRPC3质粒转染HT22细胞。OGD/R+TRPC3+si-Pink1组在建立OGD/R模型前24 h，用TRPC3质粒和si-Pink1转染HT22细胞。OGD/R+NC组在建立OGD/R模型前24 h，用Vector和si-NC转染HT22细胞。si-Pink1和si-NC均购自美国Invitrogen公司。

1.2.7 免疫荧光染色 对于动物实验，幼鼠的大脑在0.9%生理盐水灌注后迅速取出，用4%多聚甲醛在4 ℃固定24 h，在30%蔗糖溶液中脱水48 h，然后在-80 ℃冷冻。将大脑切片（20 μm）在4 ℃封闭缓冲液中用LC3B兔单克隆抗体（1∶2 000，英国Abcam公司）和HSP60兔多克隆抗体（1∶500，美国Servicebio公司）一起孵育过夜。用PBS洗涤后，将脑切片与相应的二抗在室温下孵育1 h。脑切片用DAPI（美国Servicebio公司）染色15 min，用PBS洗涤3次，每次5 min，对于细胞实验，细胞在固定、包埋、制备、透化和封闭后，在4 ℃封闭缓冲液中用Tomm20兔单克隆抗体（1∶2 000，英国Abcam公司）和Parkin兔单克隆抗体（1∶1 500，英国Abcam公司）一起孵育过夜。用PBS洗涤后，将样品在37 ℃下浸入二抗中1 h。用PBS冲洗样品3次，每次10 min，在37 ℃下用将细胞核染色2 h。然后用荧光显微镜观察结果（日本Nikon公司）。

1.2.8 体外线粒体膜电位的检测 根据制造商的说明[10]，JC-1可以在健康线粒体中聚集并发出红色荧光，而在去极化的线粒体中发出绿色荧光。用JC-1检测试剂（北京Solarbio公司）处理后，用荧光显微镜获得荧光图像。

1.2.9 体内和体外蛋白质印迹 体内和体外海马细胞在含PMDF的冷RIPA缓冲液中匀浆10 min，通过高速离心获得总蛋白。在通过比辛可宁酸分析（北京Solaibao公司）定量后，将30 μg蛋白质在10%~12%（w/v）硫酸盐-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上电泳2 h，然后转移到聚偏二氟乙烯膜（美国Millipore Corp公司）上约1.5 h。将膜在37 ℃下在5%脱脂乳中浸泡1.5 h。在含有吐温20的Tris缓冲盐水中洗涤10 min后将膜浸泡在抗线粒体自噬标志蛋白线粒体体外膜移位酶20（translocase of outer mitochondrial membrane20，Tomm20）（1∶5 000，英国Abcam公司）、微管相关蛋白轻链3（light chain 3，LC3）（1∶2 000，英国Abcam公司）、选择性自噬接头蛋白（sequestosome-1，p62）（1∶20 000，英国Abcam公司）、热休克蛋白-60（human heat shock protein 60，HSP60）（1∶500，美国Servicebio公司）、PTEN诱导假定激酶1（PTEN induced putative kinase 1，Pink1）（1∶5 000，美国Bio Vision公司）、E3泛素连接酶（parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase，Parkin）（1∶1 000，美国Cell Signaling公司）、TRAC3（1∶1 000，美国Proteintech公司）和β-actin（1∶2 000，北京ZSGB-BIO公司）稀释的初级抗体一起孵育过夜。将膜洗涤3次，并在37 ℃下用山羊抗兔IgG（1∶5 000，安诺伦（北京）生物科技有限公司）渗透1.5 h。用TBST洗涤3次，每次10 min，使用增强化学发光溶液和Amersham Imager 600检测膜上的蛋白质表达。

1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0进行所有的统计分析。采用Kolmogorov-Smirnov检验计量资料的正态性，检验结果确认为正态分布。计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）形式表达，多组间比较采用单因素方差分析，然后进行Tukey的多重比较检验。检验水准α=0.05。

2 结 果

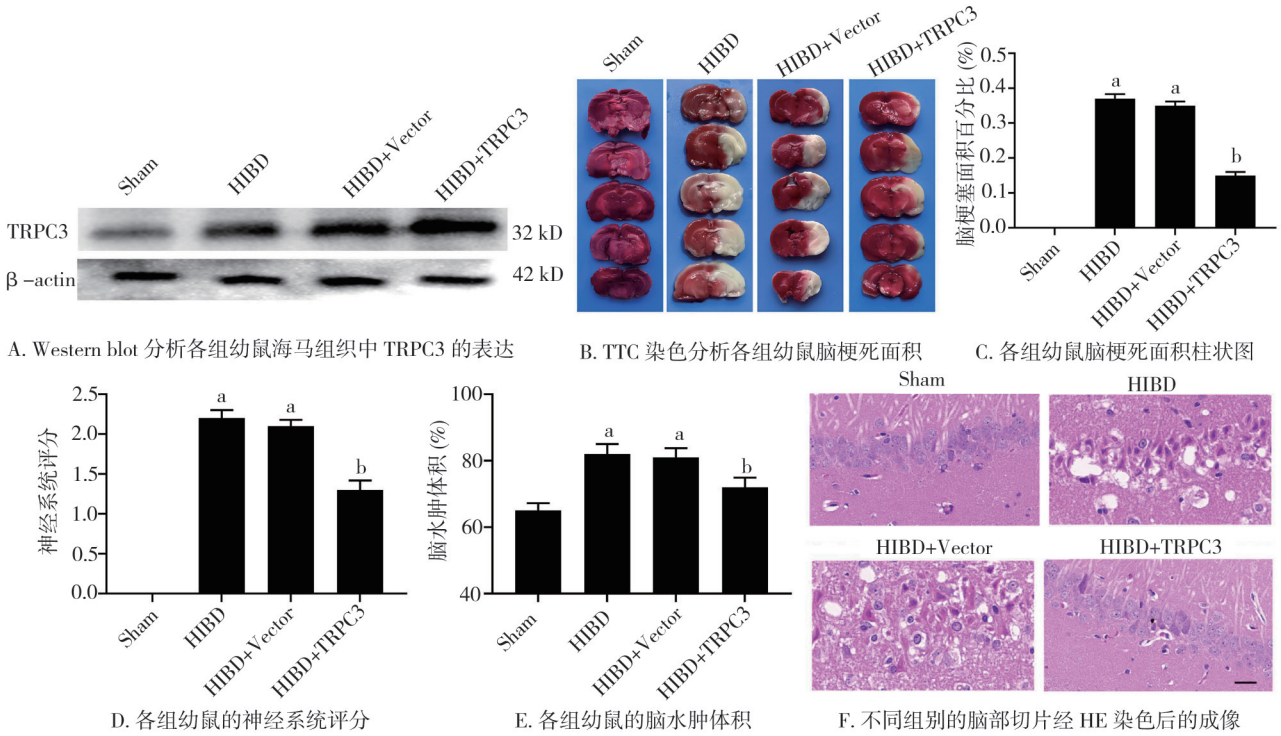
2.1 上调TRPC3改善HIBD幼鼠脑损伤

研究考察了上调TRPC3对大脑HIBD的影响。在HIBD幼鼠造模前注射质粒来上调海马组织中TRPC3的表达（图1A）。TTC染色结果证明，各组梗死面积存在统计学差异（F=71.950，P<0.001）；与Sham组相比，HIBD组和HIBD+Vector组显示出较大的梗死面积（P<0.05）。HIBD+TRPC3组的梗死面积较HIBD+Vector组明显降低（P<0.05）（图1B、C）。此外，各组脑含水量和神经学评分存在明显差异（F=

77.940、16.520，均 $P<0.001$）；与 Sham 组相比，HIBD 组和 HIBD+Vector 组显示出较大的脑含水量和神经学评分（$P<0.05$）。HIBD+TRPC3 组的脑含水量和神经学评分较 HIBD+Vector 组明显降低（$P<0.05$）（图 1D、E）。HE 染色显示，与 sham 组相比，HIBD 组和 HIBD+Vector 组的神经细胞胞质水肿、染色疏松和核固缩增加，HIBD+TRPC3 组这些病理改变得到改善（图 1F）。

2.2 TRPC3 上调减轻 HIBD 后的神经元凋亡

接下来研究考察了在上调 TRPC3 对神经元凋亡的影响。免疫荧光分析结果显示，各组神经元凋亡存在明显差异（$F=42.250$，$P<0.001$）；与 Sham 组相比，HIBD 组和 HIBD+Vector 组神经元凋亡明显增加（$P<0.05$），并且 HIBD+TRPC3 组神经元凋亡较 HIBD+Vector 组明显降低（$P<0.05$）（图 2A、B）。



A. Western blot 分析各组幼鼠海马组织中 TRPC3 的表达

B. TTC 染色分析各组幼鼠脑梗死面积

C. 各组幼鼠脑梗死面积柱状图

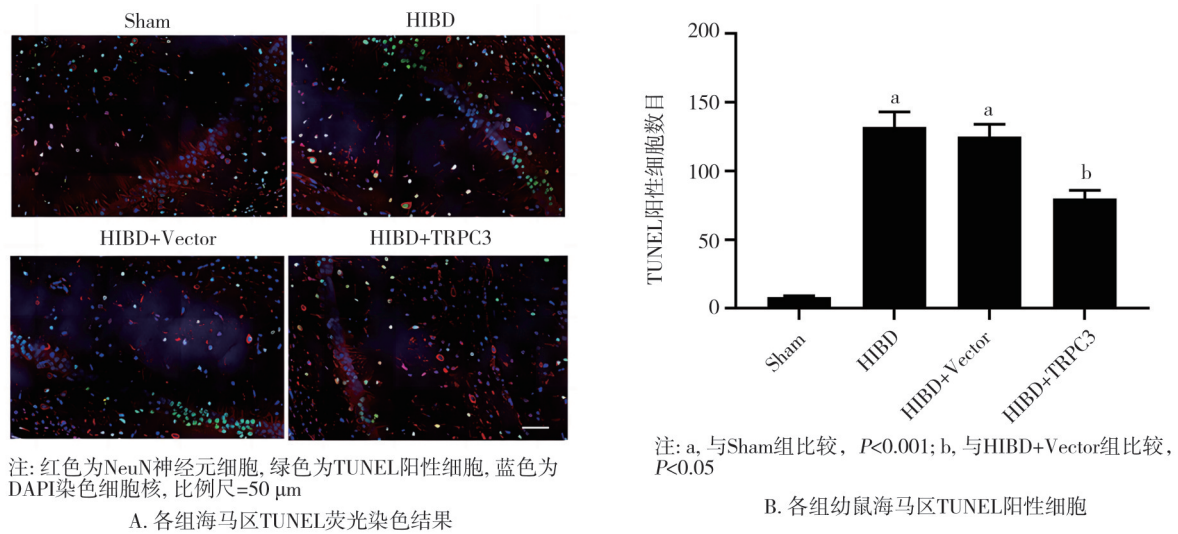
D. 各组幼鼠的神经系统评分

E. 各组幼鼠的脑水肿体积

F. 不同组别的脑部切片经 HE 染色后的成像（比例尺 =100 μm）

注：a，与 Sham 组比较，$P<0.001$；b，与 HIBD+Vector 组比较，$P<0.05$

图 1　上调 TRPC3 改善 HIBD 幼鼠脑损伤（$n=5$）



注：红色为NeuN神经元细胞，绿色为TUNEL阳性细胞，蓝色为DAPI染色细胞核，比例尺=50 μm

A. 各组海马区TUNEL荧光染色结果

注：a，与Sham组比较，$P<0.001$；b，与HIBD+Vector组比较，$P<0.05$

B. 各组幼鼠海马区TUNEL阳性细胞

图 2　TRPC3 上调减轻 HIBD 后的神经元凋亡（$n=5$）

2.3　TRPC3 增强 HIBD 后的线粒体自噬

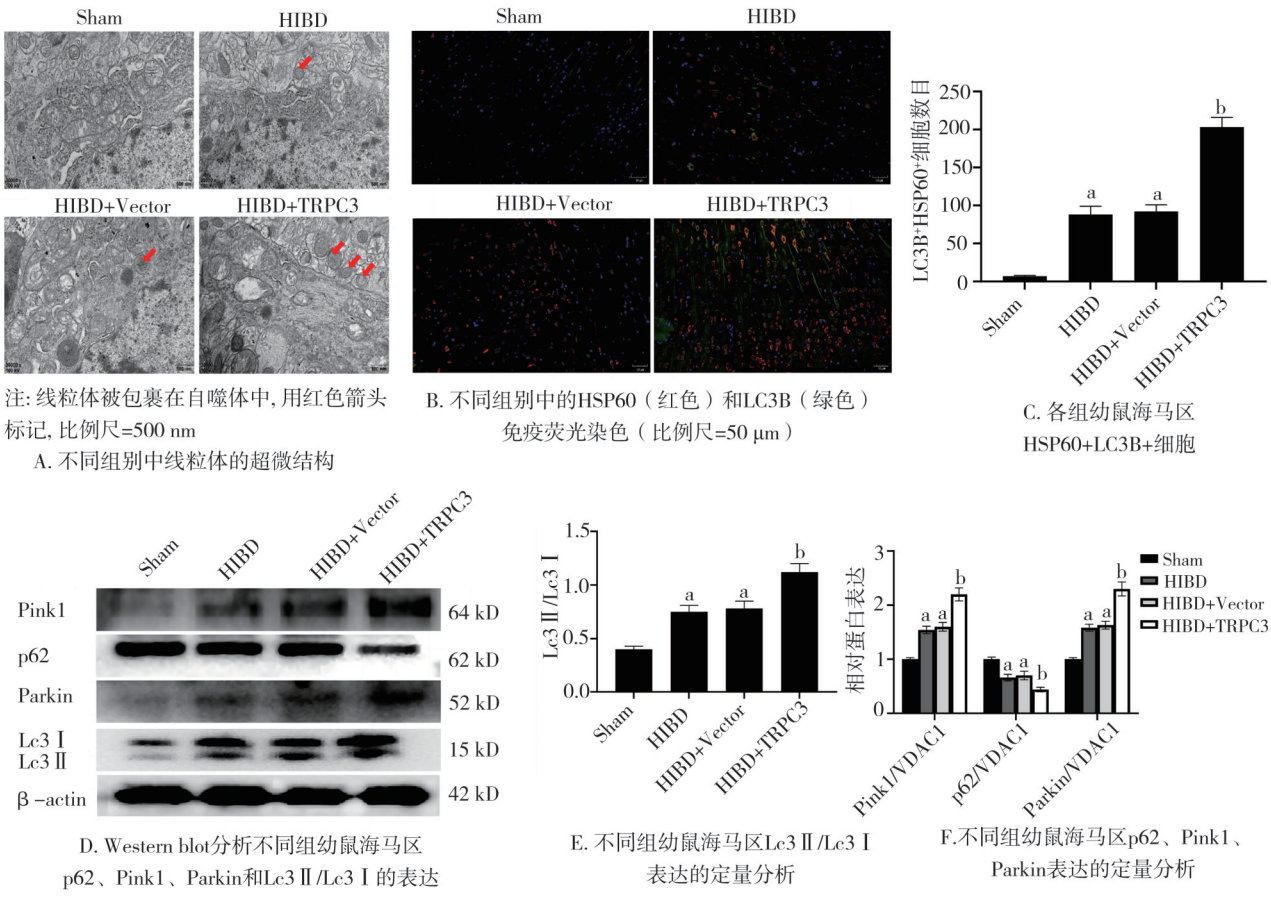
为了研究上调 TRPC3 对线粒体自噬的影响，用电子显微镜观察了大脑皮层神经细胞中线粒体的形态。Sham 组线粒体形态正常。在 HIBD 组和 HIBD+Vector 组中，许多线粒体被细胞溶酶体包围，表明存在线粒体自噬作用。在 HIBD+TRPC3 组中，越来越多的自噬小泡包裹线粒体，显示出更强的线粒体自噬活性（图 3A）。免疫荧光分析结果（图 3B、C）显示，各组 $LC3B^{+}HSP60^{+}$ 细胞数目差异有统计学意义（F=37.630，P<0.001）；与 Sham 组相比，HIBD 组和 HIBD+Vector 组 $LC3B^{+}HSP60^{+}$ 细胞数目明显增加（P<0.05）。与 HIBD+Vector 组相比，HIBD+TRPC3 组海马组织中 $LC3B^{+}HSP60^{+}$ 细胞数目进一步增加（P<0.05）。免疫印迹分析显示，各组细胞 Lc3 Ⅱ/Lc3 Ⅰ 比值和 p62、Pink1、Parkin 的表达差异有统计学意义（F=13.570、18.920、20.72、18.81，均 P<0.001）；与 Sham 组相比，HIBD 组和 HIBD+Vector 组线粒体自噬相关蛋白 Pink1、Parkin 和 Lc3 Ⅱ 的表达水平增加（P<0.05），和 p62 的表达水平降低（P<0.05）。与 HIBD+Vector 组相比，HIBD+TRPC3 组 Pink1、Parkin 和 Lc3 Ⅱ 的表达水平进一步增加（P<0.05），和 p62 的表达水平进一步降低（P<0.05）（图 3D～F）。

2.4　上调 TRPC3 通过 Pink1/Parkin 促进线粒体自噬

为了进一步验证 TRPC3 对线粒体自噬的激活是否依赖于 Pink1/Parkin 通路，在 HT-22 细胞中使用 Pink1 沉默来检测其在线粒体自噬中的作用。各组细胞 Tomm20 和 Parkin 之间的共定位存在明显差异（F=14.360，P<0.001）；用 TRPC3 处理可以明显增强 Tomm20 和 Parkin 之间的共定位，诱导 Parkin 在线粒体的积累。然而，Pink1 沉默可以减少 Tomm20 和 Parkin 之间的共定位（图 4A、B）。各组细胞 Lc3 Ⅱ/Lc3 Ⅰ 比值和 p62、Pink1、Parkin 的表达存在明显差异（F=24.170、15.260、21.540、22.830，均 P<0.001）；TRPC3 上调可以强烈增加 Pink1、Parkin 的表达和 Lc3 Ⅱ/Lc3 Ⅰ 比值（P<0.05），以及减少 p62 的表达（P<0.05）。此外，Pink1 沉默可以部分阻止 TRPC3 对线粒体自噬的影响（图 4C~E）。总之，这些结果表明，TRPC3 可以在体外以依赖 Pink1 的方式促进神经元的线粒体自噬。

2.5　TRPC3 通过 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬改善了 HT-22 的损伤

为了验证 Pink1/Parkin 通路在 TRPC3 激活的线粒体自噬中的积极作用，课题组检查了 HT-22 细胞在 OGD/R 后的



注：线粒体被包裹在自噬体中，用红色箭头标记，比例尺=500 nm

A. 不同组别中线粒体的超微结构

B. 不同组别中的HSP60（红色）和LC3B（绿色）免疫荧光染色（比例尺=50 μm）

C. 各组幼鼠海马区 HSP60+LC3B+细胞

D. Western blot分析不同组幼鼠海马区 p62、Pink1、Parkin和Lc3 Ⅱ/Lc3 Ⅰ 的表达

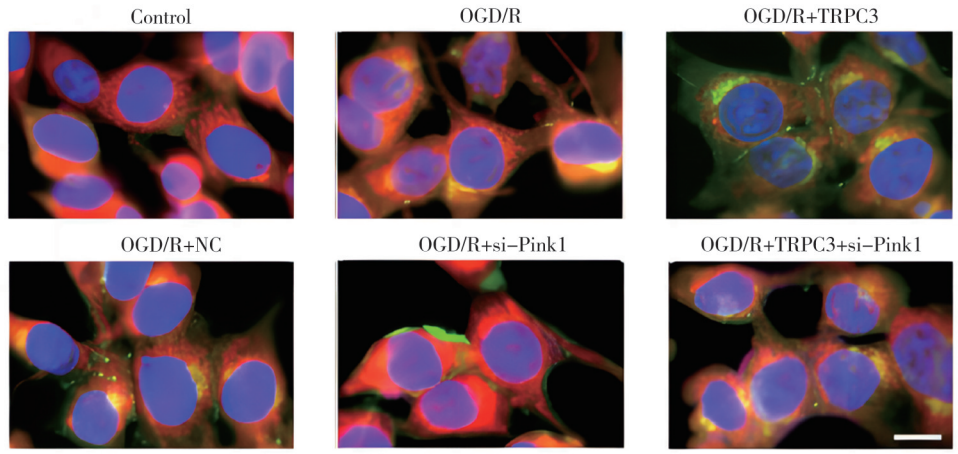
E. 不同组幼鼠海马区Lc3 Ⅱ/Lc3 Ⅰ 表达的定量分析

F.不同组幼鼠海马区p62、Pink1、Parkin表达的定量分析

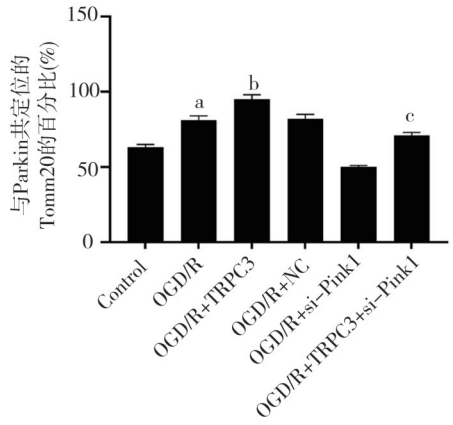
注：a，与Sham组比较，P<0.01；b，与HIBD+Vector组比较，P<0.05

图3　TRPC3增强HIBD后的线粒体自噬（n=5）

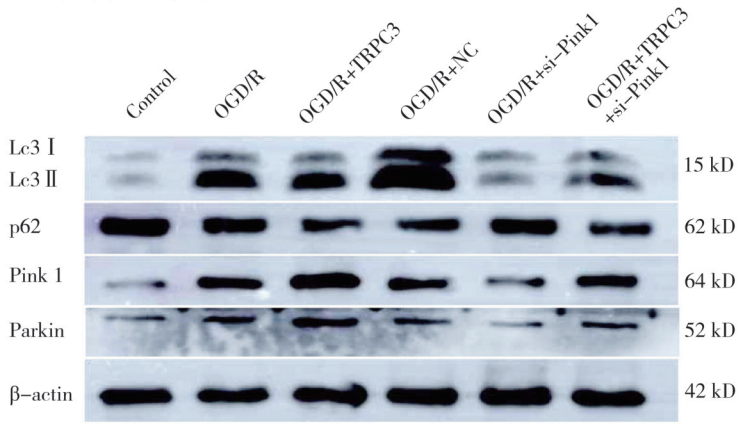
线粒体功能和细胞生存能力。TRPC3 上调增加了健康线粒体的数量（红色），减少了受损线粒体的数量（绿色）。各组细胞存活率存在明显差异（F=27.18，P<0.001）；与对照组相比，OGD/R 组 HT-22 细胞的存活率明显降低（P<0.05）。与 OGD/R 组相比，OGD/R+TRPC3 组 HT-22 细胞的存活率明显增加（P<0.05）。然而，Pink1 的沉默阻止了 TRPC3 对线粒体功能的恢复。同样，与 OGD/R+TRPC3 组相比，OGD/R+TRPC3+si-Pink1 组 HT-22 细胞的存活率明显降低（P<0.05）（图 5）。所有数据表明，TRPC3 的神经保护和 Pink1/Parkin 途径的增强参与了线粒体自噬的过程。



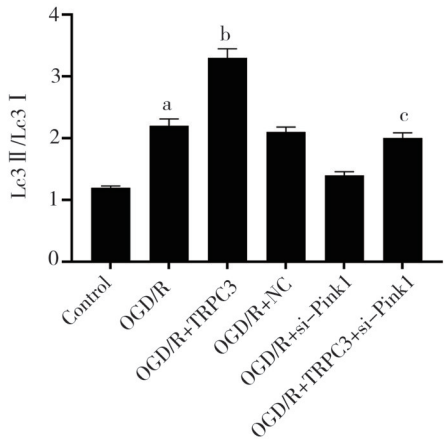
A. 海马神经元中DAPI（蓝色斑点）、Tomm20（红色斑点）和Parkin（绿色斑点）的代表性免疫荧光染色（比例尺=50 μm）



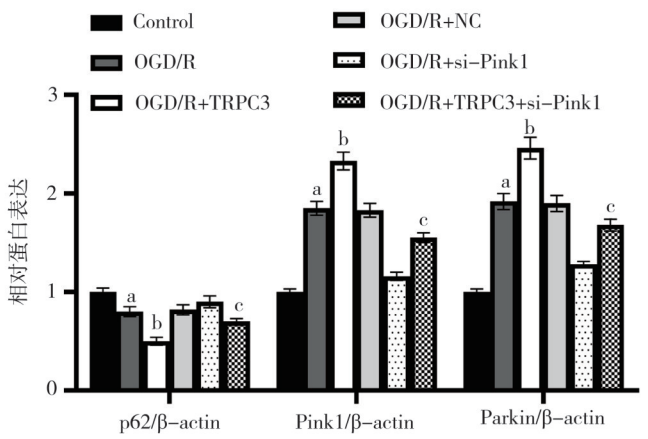
B. 与Parkin共定位的Tomm20的百分比



C. Western blot分析Pink 1、Parkin、Lc3 Ⅱ/Lc3 Ⅰ和p62的表达



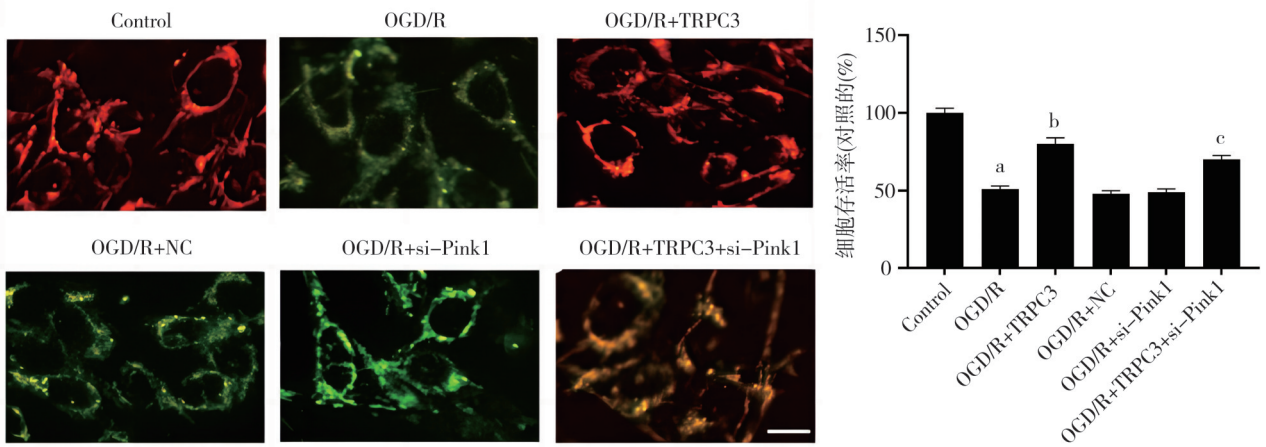
D. 不同组Lc3 Ⅱ/Lc3 Ⅰ表达的定量分析



E. 不同组p62、Pink1、Parkin表达的定量分析

注：a，与Control组比较，P<0.01；b，与OGD/R组比较，P<0.05；c，与OGD/R+TRPC3组比较，P<0.05

图 4　上调 TRPC3 通过 Pink1/Parkin 促进线粒体自噬（n=3）



A. HT-22中Aggregate（红色斑点）和Monomer（绿色斑点）的代表性免疫荧光染色（比例尺=50 μm）

B. 通过CCK-8试验确定细胞存活

注：a，与Control组比较，$P<0.01$；b，与OGD/R组比较，$P<0.01$；c，与OGD/R+TRPC3组比较，$P<0.05$

图5　TRPC3通过Pink1/Parkin介导的线粒体自噬改善了HT-22的损伤（n=3）

3　讨　论

线粒体功能障碍与各种中枢神经系统疾病（如HIBD）有关[11]。本研究建立了新生大鼠缺氧缺血模型，观察TRPC3是否参与了HIBD的过程。首先，TTC染色和HE染色确认成功建立了新生大鼠HIBD模型，并发现TRPC3上调减轻脑缺血缺氧损伤。通过电子显微镜观察到自噬体的形成，表明TRPC3上调后线粒体自噬活动更强，并且神经元凋亡减少。证据表明，TRPC3可以保护海马神经元免受体内和体外HIBD的影响[12]。因此，关注线粒体的神经保护作用可能是HIBD的一种新的治疗策略[3]。此外，相关研究表明，促进线粒体自噬可以通过改善线粒体功能来保护受损的神经元[13]。本研究探讨了TRPC3通过线粒体自噬治疗HIBD及其潜在的治疗机制。所有的研究结果与之前的研究一起支持了线粒体自噬作用可能是TRPC3治疗HIBD的潜在目标。

线粒体自噬是HIBD的一个重要病理变化，已成为研究的重点[14]。研究表明，不同器官的缺氧缺血可以诱发细胞凋亡，而细胞凋亡与自噬密切相关[15]。值得注意的是，线粒体损伤的程度往往决定了细胞的命运，对细胞凋亡的调节是一把“双刃剑”。有报道显示，在缺氧缺血的早期阶段，线粒体自噬在清除受损的线粒体方面起到保护作用[15]；但随着缺氧缺血时间的延长，线粒体自噬的过度降解会导致自噬样细胞坏死，进一步加重损伤[16]。最近，Feng J等[17]在脑缺血后的不同时间进行了实验，他们发现缺血大鼠在缺血24 h后，脑梗死的面积和自噬程度扩大。这些结果证明了缺血时间延长能够激活了过度线粒体自噬的有害影响。1项研究也证明，雷帕霉素在瞬时MCAO前同时治疗（I/2 h和R/22 h），能够增强线粒体自噬作用并削弱了脑缺血再灌注损伤[18]。基于上述实验现象，课题组认为本研究建立的HIBD处于脑损伤早期阶段，在这一阶段中激活线粒体自噬可以清除受损的线粒体，并有利于回收细胞成分回收，以维持细胞的平衡[19]。值得注意的是，Pink1和Parkin的蛋白表达也随着TRPC3的上调而增加，表明TRPC3对HIBD大鼠的神经保护作用可能与Pink1/Parkin介导的线粒体自噬的激活有关。

众所周知，线粒体自噬是由FUNDC1、BNIP3和Pink1/Parkin等多种途径介导[20]。其中，Pink1/Parkin是调节线粒体自噬的经典途径。Pink1位于Parkin的上游，它们之间的相互作用可以诱导线粒体自噬[16]。生理上，Pink1可在缺血条件下稳定积聚在受损线粒体外膜，并募集Parkin启动线粒体吞噬。随后，自噬体可以通过识别连接受损线粒体和自噬体的桥梁LC3和p62来吞噬受损线粒体。最终，受损的线粒体可被溶酶体降解[16]。在本研究中，Pink1沉默用于检测Pink1/Parkin信号通路在TRPC3上调对OGD/R损伤的HT22细胞的神经保护中的作用。结果表明，在OGD/R背景下，Pink1沉默可抑制TRPC3

上调对HT-22细胞的线粒体保护作用和增殖作用。

综上所述，本研究结果表明TRPC3上调促进的线粒体自噬作用可以保护神经元免受HIBD损伤，并且这一过程依赖于激活的Pink1/Parkin通路。然而，本研究未能抽提线粒体膜行WB验证，以及没有设计Trpc3基因敲除小鼠进行体内验证。在未来的研究中需要针对上述不足开展相关研究，进一步明确TRPC3通路介导的神经自噬作用。

这些结果表明，TRPC3通过激活Pink1/Parkin通路介导的线粒体自噬，在HIBD早期阶段中发挥了重要的保护作用。因此，选择性去除受损的线粒体被认为是HIBD的有效治疗策略。同时，本研究为TRPC3作为新生大鼠缺血缺氧后的治疗提供了一个新的治疗靶点。

参 考 文 献

[1] 朱凯驿. 铁死亡在新生儿缺氧缺血性脑损伤中的研究进展[J]. 中国当代儿科杂志，2021，23(5)：536-541.

Zhu KY. Research progress of iron death in neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. Chin J Contemp Pediatr，2021，23(5)：536-541.

[2] 苑爱云，孙向峰，侯 梅，等. 丰富环境对缺氧缺血脑损伤幼鼠空间记忆能力及海马区BDNF，自噬相关蛋白LC3表达的影响[J]. 中国康复医学杂志，2020，35(11)：1296-1301.

Yuan AY，Sun XF，Hou M，et al. Effects of rich environment on spatial memory ability and expression of BDNF and autophagy-related protein LC3 in hippocampus of young rats with hypoxic-ischemic brain injury [J]. Chin J Rehabilit Med，2020，35(11)：1296-1301.

[3] Fu CH，Lai FF，Chen S，et al. Silencing of long non-coding RNA CRNDE promotes autophagy and alleviates neonatal hypoxic-ischemic brain damage in rats[J]. Mol Cell Biochem，2020，472(1)：1-8.

[4] Chen X，Sooch G，Demaree IS，et al. Transient receptor potential canonical (TRPC) channels：then and now[J]. Cells，2020，9(9)：1983.

[5] Zhao Y，Li L，Lu Z，et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor canagliflozin antagonizes salt-sensitive hypertension through modifying transient receptor potential channels 3 mediated vascular calcium handling[J]. J Am Heart Assoc，2022，11(15)：e025328.

[6] Farfariello V，Gordienko DV，Mesilmany L，et al. TRPC3 shapes the ER-mitochondria Ca^{2+} transfer characterizing tumour-promoting senescence[J]. Nat Commun，2022，13(1)：956.

[7] Sukumaran P，Nascimento DA，Conceicao V，et al. Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis[J]. Cells，2021，10(8)：2125.

[8] Zhu J，Chu S，Peng Y，et al. Pyk2 inhibition attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice[J]. Acta Pharmacol Sin，2022，43(4)：797-810.

[9] Hu Z，Yuan Y，Zhang X，et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced microglial pyroptosis by promoting FOXO3a-dependent mitophagy[J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：6219715.

[10] Haque MN，Hannan MA，Dadh R，et al. The potential LXRβ agonist stigmasterol protects against hypoxia/reoxygenation injury by modulating mitophagy in primary hippocampal neurons[J]. Phytomedicine，2021，81：153415.

[11] Geng X，Wang M，Leng Y，et al. Protective effects on acute hypoxic-ischemic brain damage in mfat-1 transgenic mice by alleviating neuroinflammation[J]. J Biomed Res，2021，35(6)：474-490.

[12] Hao HB，Webb SE，Yyue J，et al. TRPC3 is required for the survival，pluripotency and neural differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs)[J]. Sci China Life Sci，2018，61(3)：253-265.

[13] Yang X，Wang M，Zhou Q，et al. Macamide B pretreatment attenuates neonatal hypoxic-ischemic brain damage of mice induced apoptosis and regulates autophagy via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Mol Neurobiol，2022，59(5)：2776-2798.

[14] Gupta R，Ambasta RK，Kumar P. Autophagy and apoptosis cascade：which is more prominent in neuronal death?[J]. Cell Mol Life Sci，2021，78(24)：8001-8047.

[15] Cai Y，Yang E，Yao X，et al. FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Redox Biol，2021，38：101792.

[16] Nair S，Leverin AL，Rocha-Ferreira E，et al. Induction of mitochondrial fragmentation and mitophagy after neonatal hypoxia-ischemia [J]. Cells，2022，11(7)：1193.

[17] Feng J，Chen X，Lu S，et al. Naringin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibiting peroxynitrite-mediated mitophagy activation[J]. Mol Neurobiol，2018，55(12)：9029-9042.

[18] Li W，Zhu Q，Xu X，et al. MiR-27a-3p suppresses cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting FOXO1[J]. Aging，2021，13(8)：11727.

[19] Zhang Y，He Y，Wu M，et al. Rehmapicroside ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via attenuating peroxynitrite-mediated mitophagy activation[J]. Free Radic Biol Med，2020，160：526-539.

[20] 张秦喆，薛 冲，张文斌. 线粒体自噬在脑缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. 神经解剖学杂志，2021，37(4)：470-474.

Zhang QZ，Xue C，Zhang WB. Research progress of mitochondrial autophagy in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Neuroanat，2021，37(4)：470-474.

（责任编辑：冉明会）