

大鼠脑缺血再灌注损伤过程中 TRAF6 的表达变化*

袁平,何晓英,李小刚

(泸州医学院附属医院神经内科,四川泸州 646000)

[摘要] 目的 观察肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用。方法 将 40 只成年健康 SD 大鼠按照随机对照的原则,分成 5 组,每组 8 只;假手术组,缺血组,缺血再灌注 2 h 组(R2 h 组),缺血再灌注 12 h 组(R12 h 组),缺血再灌注 24 h 组(R24 h 组)。构建大鼠脑缺血再灌注损伤模型,RT-PCR 和 Western blot 检测 TRAF6 的表达变化。免疫组化检测定位 TRAF6 蛋白。结果 与假手术组比较,缺血组和 R2 h 组、R12 h 组、R24 h 组 TRAF6 表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TRAF6 主要定位于神经元细胞胞质。结论 大脑遭受缺血再灌注损伤时,活化的 TRAF6 参与脑细胞死亡。

[关键词] 肿瘤坏死因子受体相关肽和相关蛋白质类;脑缺血;再灌注损伤;细胞死亡

[中图分类号] R743.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1314-03

Change of TRAF6 expression in rat cerebral ischemia reperfusion injury*

Yuan Ping, He Xiaoying, Li Xiaogang

(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the potential role of tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 (TRAF6) in the rat cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** 40 healthy adult SD rats were divided into 5 groups ($n=8$) according to the random control principle: sham operation group, ischemia group, reperfusion 2 h group (R2 h), reperfusion 12 h group (R12 h) and reperfusion 24 h group (R24 h). The rat cerebral ischemia-reperfusion injury model was constructed. The change of TRAF6 expression was examined by RT-PCR and Western-blot. Then, the immunohistochemistry was adopted to locate the TRAF6 protein. **Results** Compared with the sham group, the expression of TRAF6 in the ischemia group and the R2 h, R12 h and R24 h groups was obviously increased, but the difference had no statistical significance ($P < 0.05$). TRAF6 was mainly located in the cytoplasm of neuronal cells. **Conclusion** Activated TRAF6 is involved in the brain cell death induced by cerebral ischemia-reperfusion.

[Key words] tumor necrosis factor receptor-associated peptides and related proteins; brain ischemia; reperfusion injury; cell death

缺血性脑卒中仍旧是全球主要致死和致残的疾病之一,其病理、生理特点是脑血管的缺血以及再灌注,伴随血流的减少以及再灌注时自由基等的生成,最终导致脑细胞的损伤以及死亡^[1]。有研究发现,Toll 样受体信号通路介导的炎症免疫反应参与脑缺血再灌注损伤过程,但具体的分子机制不清楚^[2]。本研究通过构建大鼠脑缺血再灌注损伤(ischemic-reperfusion injury, I/R)模型,检测 Toll 样受体下游关键接头蛋白肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor-associated 6, TRAF6) 的表达变化,旨在探讨脑 I/R 的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 成年健康 SD 大鼠 40 只,体质量 220~260 g,购于泸州医学院实验动物中心。2,3,5-triphenyletetrazolium chloride (TTC) 染色试剂购自美国 Sigma 公司,Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司,Reagents 试剂盒购自宝生物工程公司,荧光定量仪 iCycler iQ 购自美国 Bio-Rad 公司,蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。一抗购自美国 Upstate 公司,二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 将 40 只成年健康 SD 大鼠按照随机对照的原则,分成假手术组、缺血组、缺血再灌注 2 h 组(R2 h 组),缺血再灌注 12 h 组(R12 h 组),缺血再灌注 24 h 组(R24

h 组),每组 8 只。

1.2.2 建立大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)动物模型 应用 Zea Longa 线栓法经左侧颈外-颈内动脉插线建立大鼠大脑中动脉 I/R 模型,在脑缺血 1 h 后,抽去线恢复血流灌注,分别于再灌注 2、12、24 h 处死动物,取脑组织和外周血备用^[3]。

1.2.3 TTC 染色和脑梗死面积的计算 脑组织切片,TTC 染色,37 ℃ 20 min,梗死区变白色,非梗死区变红色。计算梗死面积,为校正脑水肿带来梗死体积的偏差,梗死体积以所占大脑半球的百分率来表示,梗死体积百分比=脑梗死体积/对侧正常脑组织体积×100%。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 TRAF6 mRNA 表达 每只大鼠取约 50 mg 脑组织,在 Trizol 中提取总 RNA 按照说明书进行,cDNA 合成按 Reagents 试剂盒说明书。引物、荧光探针由中国大连 TaKaRa 公司合成,TRAF6 上游引物:5'-TCT GCT TGA TGG CTT TAC G-3',下游引物:5'-ACC GTC AGG GAA AGA ATC T-3',探针序列:5'-FAM-AGC AGT GCA AAC ACC ATG TGG C-ECLIPSE-3',片段长度为 181 bp;β-actin 上游引物:5'-CGT GAA AAG ATG ACC CAG AT-3',下游引物:5'-ACC CTC ATA GAT GGG CAC A-3',探针序列:5'-FAM-TCA ACA CCC CAG CCA TGT ACG

T-TAMRA-3', 片段长度为 158 bp。RT-PCR 检测: 30 μ L 反应体系, PCR 反应为 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 51 $^{\circ}$ C (TRAF6) 退火 20 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环, β -actin 作为内参照基因, 所有反应均在荧光定量仪 iCycler iQ 上进行。PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳。

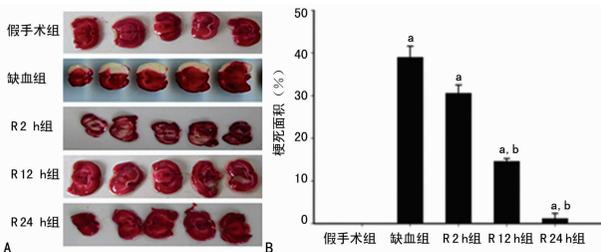
1.2.5 Western blot 检测 TRAF6 蛋白表达 取 100 g 脑组织进行匀浆, 4 $^{\circ}$ C 下离心 5 min, 取上清液。用蛋白定量试剂盒进行蛋白定量; 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白, 根据各样品蛋白浓度计算上样体积进行上样, 经分离、电泳后将蛋白电转移至硝酸纤维素膜, 用丽春红染色, 蒸馏水冲洗, 以含脱脂奶粉的 1 \times 三羟甲基氨基甲烷缓冲液水吐温 (TBST) 溶液封闭, TBST 洗涤。加入一抗, 孵育, TBST 冲洗, 加入 1:5 000 辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育, 再冲洗, 加入化学发光剂显影。将硝酸纤维素膜用图像分析仪分析, 以相应蛋白条带面积的平均灰度值来表示 TRAF6 活化水平的相对水平。

1.2.6 免疫组化 (IHC) 定位 TRAF6 蛋白 常规石蜡切片, 二甲苯脱蜡 2 次; 乙醇浸泡, PBS 冲洗。滴加 50 μ L 山羊血清封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。甩去封闭血清, 按 1:25 滴加羊抗鼠 TRAF6 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。PBS 冲洗。滴加 50 μ L 生物素标记兔抗羊 IgG (二抗), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次。滴加 50 μ L 辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 冲洗。DAB 显色后, 及时终止显色。苏木素复染, 自来水冲洗, 酸乙醇分化。将所有切片分批在 80%、90%、95%、100% 乙醇中脱水, 二甲苯透明, 加拿大树脂封片。高倍显微镜下观察, 细胞膜或细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性表达。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS11.5 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较用独立样本的 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑梗死面积 在缺血组和 R2 组、R12 h 组、R24 h 组都发现脑梗死, 而假手术组未发现脑梗死。计算脑梗死面积发现, 缺血组梗死最严重, 再灌注组随着时间推移, 梗死程度逐渐减轻, 见图 1。



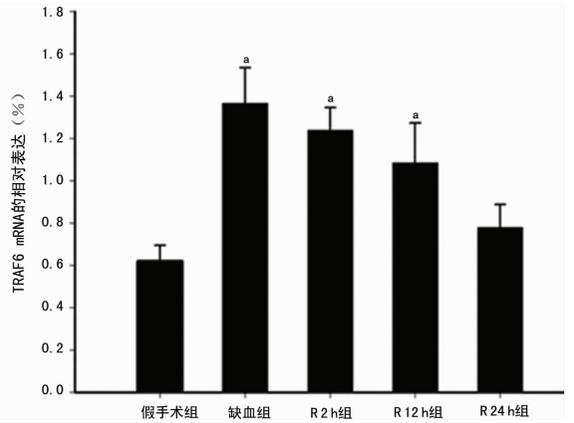
A: TTC 染色结果; B: 脑梗死面积柱状图; ^a: $P < 0.05$ 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, 与缺血组比较。

图 1 各组大鼠脑组织梗死面积比较

2.2 各组大鼠脑组织 TRAF6 表达比较 与假手术组比较, 缺血组、R2 h 组、R12 h 组脑组织 TRAF6 mRNA 明显升高 ($P < 0.05$)。Western blot 检测也证实, TRAF6 蛋白水平在缺血组、R2 h 组、R12 h 组明显升高, 见图 2、3。

2.3 IHC 定位 TRAF6 蛋白 与 RT-PCR、Western blot 检测结果相似, 在假手术组脑组织中, TRAF6 蛋白呈低表达, 在缺血组以及各再灌注组, TRAF6 表达明显升高。且 TRAF6 蛋

白主要分布在神经元细胞胞质, 部分分布在血管内皮细胞。与假手术组比较, 缺血组和各再灌注组阳性细胞率明显升高, 其中缺血组最高, R2 组、R12 h 组逐渐减低, 而 R24 h 组又再度升高, 见图 4、5。



^a: $P < 0.05$ 与假手术组比较。

图 2 各组大鼠脑组织 TRAF6 基因表达比较

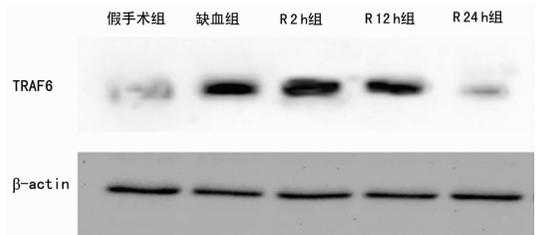


图 3 Western blot 检测各组脑组织 TRAF6 蛋白表达

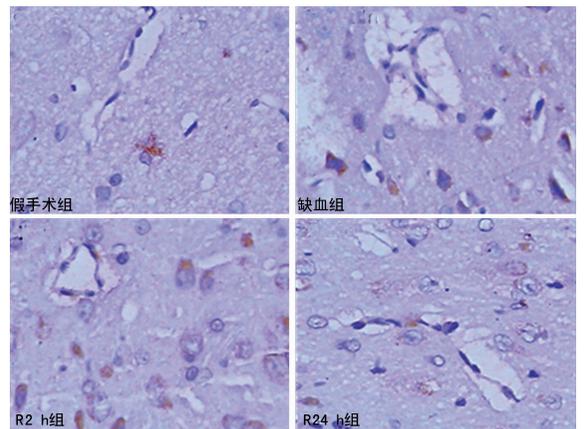


图 4 IHC 检测各组脑组织 TRAF6 蛋白表达

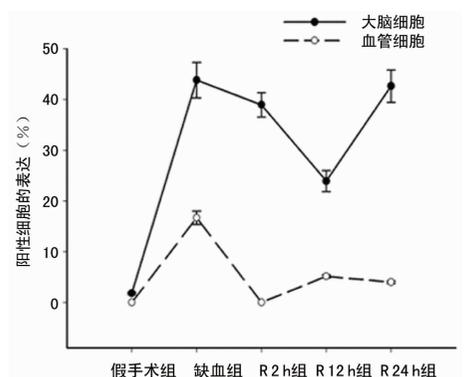


图 5 各组 TRAF6 阳性细胞率比较

3 讨 论

临床上,脑梗死及溶栓后血管再通所引起的 I/R 是加剧脑损伤及功能障碍的主要原因^[4]。Toll 样受体介导的炎症免疫在脑 I/R 过程中的作用日益受到重视^[5-6],本研究通过观察其下游接头分子 TRAF6 表达变化,以探讨 TRAF6 在大鼠脑缺血和再灌注过程中的作用。

本研究采用经典的大鼠脑 I/R 模型,缺血组和各再灌注组大鼠脑组织都有不同程度梗死灶存在,证实建立模型成功,且梗死的面积随着再灌注的恢复逐渐减少。从基因水平和蛋白水平分别检测 TRAF6 表达,结果发现,无论缺血还是再灌注早期(12 h),TRAF6 表达均明显升高,表明 TRAF6 参与了大鼠脑 I/R 病理、生理过程。TRAF6 在大脑遭受缺血和再灌注打击时,明显激活,其变化趋势与脑梗死面积变化相似,表明 TRAF6 参与介导了大脑细胞的死亡信号。

TRAF6 是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族重要的成员,其不但能介导 TNFR 家族信号,还能介导 TLR 家族信号^[7-8]。所以,TRAF6 可能通过介导不同信号通路,调控炎症免疫和凋亡效应。TRAF6 的缺失将导致信号的缺失,NF- κ B 去激活以及下游细胞因子的减少^[9-10]。有研究证实,TRAF6 可能广泛参与各种细胞的死亡,尤其是细胞凋亡^[11-12]。Liu 等^[13]证实 TRAF6 可以通过 Caspase-8 依赖的方式介导细胞死亡。在 LPS 诱导的兔肾小管细胞,通过抑制 TRAF6 表达可以抑制肾炎症反应,其机制为抑制 Caspase-3 活化,证实 TRAF6 通过介导 Caspase-3 信号参与细胞凋亡^[14]。有研究还证实,TRAF6 通过介导细胞凋亡参与了中枢神经系统的发育过程^[15]。本研究认为,在大脑遭受缺血和再灌注损伤以后,TRAF6 可能通过介导细胞凋亡信号来参与调控脑细胞死亡,但具体的机制还有待进一步的探讨。

免疫组化用来定位 TRAF6 在脑组织中的表达,结果与 RT-PCR、Western blot 检测结果相似,在缺血期和再灌注期,TRAF6 表达明显升高的。着色强的 TRAF6 主要位于神经元细胞胞质,较弱的 TRAF6 着色在脑血管内皮细胞被发现。因此,本研究推测在 TRAF6 介导脑细胞死亡过程中,神经元细胞是主要的靶细胞。

本研究结果表明,在大鼠脑 I/R 过程中,TRAF6 可能参与了调节脑损伤的炎症过程,可能的机制是介导脑细胞的死亡信号。进一步的研究需要证实 TRAF6 与脑细胞凋亡的相互作用机制。

参考文献

- [1] Fisher M. Acute ischemic stroke therapy: current status and future directions[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2013,11(9):1097-1099.
- [2] Zhang J, Fu B, Zhang X, et al. Neuroprotective effect of bicyclol in rat ischemic stroke; Down-regulates TLR4, TLR9, TRAF6, NF- κ B, MMP-9 and up-regulates claudin-5 expression[J]. *Brain Res*, 2013,1528(8):80-88.
- [3] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke; overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007,87(1):179-197.

- [4] Chang R, Wang Y, Chang J, et al. LPS preconditioning ameliorates intestinal injury in a rat model of hemorrhagic shock[J]. *Inflamm Res*, 2014,63(8):675-682.
- [5] Li H, Jin M, Lv T, et al. Mechanism of focal cerebral ischemic tolerance in rats with ischemic preconditioning involves MyD88- and TRIF-dependent pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2013,6(6):1375-1379.
- [6] Wang L, Li Z, Zhang X, et al. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke; attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF- κ B, TNF- α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability[J]. *Neurochem Res*, 2014,39(1):97-106.
- [7] Liang Y, Lei Z, Zhang H, et al. Toll-like receptor 4 is associated with seizures following ischemia with hyperglycemia[J]. *Brain Res*, 2014,8993(14):1229-1233.
- [8] Moraga A, Pradillo JM, Cuartero MI, et al. Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia[J]. *FASEB J*, 2014,28(11):4710-4718.
- [9] Gohda J, Matsumura T, Inoue J. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling[J]. *J Immunol*, 2004,173(5):2913-2917.
- [10] Song Z, Jin R, Yu S, et al. Crucial role of CD40 signaling in vascular wall cells in neointimal formation and vascular remodeling after vascular interventions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012,32(1):50-64.
- [11] Bruneau S, Datta D, Flaxenburg JA, et al. TRAF6 inhibits proangiogenic signals in endothelial cells and regulates the expression of vascular endothelial growth factor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012,419(1):66-71.
- [12] He L, Wu X, Siegel R, et al. TRAF6 regulates cell fate decisions by inducing caspase 8-dependent apoptosis and the activation of NF-kappaB[J]. *J Biol Chem*, 2006,281(16):11235-11249.
- [13] Liu S, Lutz J, Chang J, et al. TRAF6 knockdown promotes survival and inhibits inflammatory response to lipopolysaccharides in rat primary renal proximal tubule cells[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010,199(3):339-346.
- [14] Lomaga MA, Henderson JT, Elia AJ, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) deficiency results in exencephaly and is required for apoptosis within the developing CNS[J]. *J Neurosci*, 2000,20(19):7384-7393.
- [15] Yeiser EC, Rutkoski NJ, Naito A, et al. Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in traf6-/- mice[J]. *J Neurosci*, 2004,24(46):10521-10529.