

钙激活氯通道参与七氟醚对大鼠脑缺血后神经血管单元的保护机制研究

顾朋¹, 秦新刚², 魏童^{3*}

1. 新疆医科大学附属肿瘤医院 介入诊疗科, 新疆 乌鲁木齐 830000
2. 新疆医科大学第五附属医院 麻醉科, 新疆 乌鲁木齐 830000
3. 新疆医科大学第五附属医院 血管介入科, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要:目的 探究钙激活氯通道参与七氟醚对大鼠脑缺血后神经血管单元的保护机制研究。方法 将 TMEM16A 局部脑内基因敲除大鼠分为假手术组、模型组、沉默 TMEM-16A (LV-shTMEM16A) 组、七氟醚组、七氟醚+LV-shTMEM16A 组。除假手术组外, 其余各组大鼠建立中动脉脑缺血模型, 七氟醚组与七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠中动脉缺血期间, 持续吸入 3%七氟醚治疗。大鼠脑缺血 2 h 后, 拔除线栓, 检测神经元中 Ca^{2+} 与 Cl^{-} 含量。3 d 后评估神经功能。将大鼠处死, 取大鼠脑组织分别开展 TTC 染色分析各组大鼠脑梗死区面积, TUNEL 染色观察大鼠脑组织中 TUNEL 染色阳性细胞率, CD31 免疫组化法检测新生血管生成标记物 CD31, Western blotting 检测凋亡和神经营养相关蛋白表达。结果 与模型组相比, 七氟醚组大鼠神经元中 Ca^{2+} 与 Cl^{-} 浓度降低, 神经功能评分降低且脑梗死面积明显减少。七氟醚组大鼠脑组织中 CD31 水平与 VEGF 蛋白表达进一步升高, TUNEL 染色阳性细胞率减少, 凋亡相关蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、活化的半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3) 表达量降低, 神经营养相关蛋白转化生长因子- β (TGF- β)、脑源性神经营养因子 (BDNF) 与酪氨酸激酶受体 B (TrkB) 蛋白表达量升高。与七氟醚组相比, 七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠神经元中虽然 Cl^{-} 没有变化, 但 Ca^{2+} 浓度增加, 神经功能评分升高且脑梗死面积增加, 大鼠脑组织中 CD31 水平与 VEGF 蛋白表达减少, TUNEL 染色阳性细胞率增加, Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达量增加, 而 TGF- β 、BDNF 与 TrkB 蛋白表达量减少。结论 七氟醚可能通过抑制 TMEM16A 蛋白表达, 降低 Ca^{2+} 与 Cl^{-} 电流, 一方面抑制了神经元凋亡, 另一方面促进了神经血管单元的新生, 最终达到减轻神经功能损伤的作用。

关键词: 七氟醚; 钙激活氯通道; 中动脉缺血; 神经血管单元; 神经功能

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)01-0008-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.002

Calcium-activated chloride channels are involved in the protective mechanism of sevoflurane on neurovascular units after cerebral ischemia in rats

GU Peng¹, QIN Xin-gang¹, WEI Tong²

1. Department of Interventional Treatment, Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China
2. Department of Anesthesiology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China
3. Department of Vascular Intervention, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Abstract: Objective To explore the protective mechanism of calcium-activated chloride channels involved in sevoflurane on neurovascular units after cerebral ischemia in rats. **Methods** TMEM16A local brain knockout rats were divided into sham operation group, model group, LV-shTMEM16A group, sevoflurane group, sevoflurane + LV-shTMEM16A group. Except for the sham operation group, the middle artery cerebral ischemia model was established in other groups. During the middle artery ischemia, sevoflurane group and sevoflurane +LV-shTMEM16A group were treated with continuous inhalation of 3% sevoflurane. The content of Ca^{2+} and Cl^{-} in neurons was detected after 2 h of cerebral ischemia. Neurological function was assessed after 3 days. The rats were killed, and the brain tissues of the rats were analyzed by TTC staining. TUNEL staining was used to observe the TUNEL staining positive cell rate in the brain tissues of the rats, and CD31 immunohistochemical method was used to detect the neovascularization marker CD31. The expressions of apoptosis-related and neurotrophic proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the concentrations of Ca^{2+} and Cl^{-} in the neurons of sevoflurane group were decreased, the neural function scores were decreased, and the cerebral infarction size was significantly reduced. In sevoflurane group, the expressions of CD31 and VEGF protein

收稿日期: 2022-09-29

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2021D01C429)

作者简介: 顾朋, 男, 副主任医师, 硕士研究生, 研究方向为介入放射学。E-mail: 38404311@qq.com

*通信作者: 魏童, 男, 硕士, 研究方向为脑血管缺血后保护机制。E-mail: 17224235@qq.com

were further increased, the rate of TUNEL stained positive cells was decreased, the expressions of apoptosis-related proteins Bax and cleaved Caspase-3 were decreased, and the expressions of neurotrophic proteins TGF- β , BDNF and TrkB were increased. Compared with sevoflurane group, although there was no change in Cl^- in sevoflurane + LV-shTMEM16A group, there was an increase in Ca^{2+} concentration, an increase in neural function score, an increase in cerebral infarction area, a decrease in the expression of CD31 and VEGF protein, and an increase in the rate of TUNEL staining positive cells. Expression of apoptosis-associated proteins Bax and cleaved Caspase-3 increased, while expression of neurotrophic proteins TGF- β , BDNF, and TrkB decreased. **Conclusion** Sevoflurane may inhibit the expression of TMEM16A protein and reduce the Cl^- and Ca^{2+} concentration. It inhibits neuronal apoptosis and promotes the regeneration of neurovascular units, which finally achieves the effect of reducing neurological damage.

Key words: sevoflurane; calcium-activated chloride channel; middle artery ischemia; neurovascular unit; neurological function

脑梗死是常见的中枢血管性疾病,常发于围术期间。据世界卫生组织公布,每年脑卒中患者病死率约 10%,总数高达 570 万^[1]。由于神经功能修复能力有限,脑梗死可引起暂时甚至永久的运动功能障碍^[2]。随着麻醉学的进步,通过吸入麻醉延长脑缺血耐受时间、减轻神经功能损伤得到了更多的关注与研究。七氟醚可以明显减轻脑梗死大鼠神经功能损伤,其机制主要涉及调控凋亡相关基因、抑制炎症、诱导效应因子增强缺血耐受等方面^[3-4]。脑梗死损伤贯穿了早期细胞能量耗竭至细胞程序性坏死,到达神经血管单元丢失等一系列事件。研究表明,七氟醚可激活转化生长因子- β (TGF- β) 超家族上游信号,通过 Smad 分子依赖途径调控下游丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、水通道蛋白 (AQP) 发挥促神经血管单元生成作用^[5]。血管内皮细胞内广泛分布着钙激活氯通道 (calcium-activated chloride channels, CaCCs),可被胞浆内升高的 Ca^{2+} 离子电流激活^[6]。跨膜蛋白 16A (TMEM16A) 是 CaCCs 的分子基础,研究曾报道 TMEM16A 活化产生的 Cl^- 离子电流会引起细胞肿胀,这是造成的血脑屏障破坏、脑细胞水肿的重要原因^[7]。以上文献报道提示 CaCCs 可能参与了缺血性脑卒中的脑损伤过程中神经血管单元的损伤。基于此,本研究探讨了七氟醚对脑缺血大鼠神经血管单元的保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物

75 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,由新疆医科大学动物实验中心提供,实验动物许可证编号 430022031002,8 周龄,体质量 170~180 g。入组后饲养于新疆医科大学动物实验中心 SPF 级动物房中,饲养条件温度 22~26 $^{\circ}C$,湿度 30%~70%,12 h/12 h 固定昼夜循环,充足的食物和水源。本研究经新疆医科大学动物实验伦理委员会批准,批准文号 XJMU202203010015。

1.2 试剂与仪器

七氟醚(质量分数: $\geq 98.0\%$,深圳瑞沃德生命科技有限公司,批号 R302091);脑缺血模型线栓(广州佳灵生物技术公司,批号 20190483);2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色试剂盒(TTC,北京索莱宝公司,批号 s7832);TUNEL 染色试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 1003-1938);Anti-rat TMEM16A(英国 abcam 公司,批号 ab1736)、血小板内皮细胞黏附分子(CD31,英国 abcam 公司,批号 ab1184)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax,北京博奥森生物技术公司,批号 bs8742)、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2,武汉博士德生物技术公司,批号 746323)、活化的半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved-Caspase-3,武汉博士德生物技术公司,批号 764531)、Caspase-3(北京博奥森生物技术公司,批号 bs8732)、TGF- β (武汉博士德生物技术公司,批号 876113)、脑源性神经营养因子(BDNF,英国 abcam 公司,批号 ab1364)、酪氨酸激酶受体 B(TrkB,英国 abcam 公司,批号 ab7263)、血管内皮生长因子(VEGF,北京博奥森生物技术公司,批号 bs7163)、 β -actin 抗体(北京博奥森生物技术公司,批号 bs1093)。

R500 小动物麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司);脑立体定位注射仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司);SN0192876 微透析采样系统(北京铭泰佳信科技有限公司);DM500 生物显微镜(德国徕卡公司);Mini-protean Tetra 凝胶电泳装置(美国 Biorad 公司);化学发光成像仪(上海天能生物公司)。

1.3 TMEM16A 基因敲除大鼠制备、分组及给药

靶向 TMEM16A 的 shRNA 序列与对照 LV-shNC 均由上海吉凯生物有限公司设计与提供。将合成的寡核苷酸插入到慢病毒表达质粒中,分别由 pGC-LU 载体、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体 3 质粒组成。使用 Lipofectamine 3000 试剂盒进行高

纯度无内毒素抽提, 转染 293T 细胞, 收集细胞上清液, 浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液。转染 72 h 后, 收集含重组慢病毒的培养基, 检测病毒滴度。将大鼠麻醉, 固定在立体定向仪上, 颅骨钻孔, 坐标 (-0.3 mm、±1.0 mm、-2.2 mm)。将微细套管置入单侧侧脑室, 分别注入靶向沉默 TMEM16A 慢病毒 (LV-shTMEM16A)、非靶向慢病毒干扰液 (LV-shNC), 钢丝封闭套管外口预防颅内感染, 牙科用水泥固定。每天注射干扰病毒液 1 次, 连续 3 d, 即可得到 TMEM16A 局部脑内基因敲除的大鼠。将脑室注射 LV-shNC 大鼠分为假手术组、模型组、七氟醚组; 将脑室注射 LV-shTMEM16A 组大鼠分为 LV-shTMEM16A 组、七氟醚+LV-shTMEM16A 组, 每组 15 只。取各组大鼠构建脑缺血模型, 脑缺血期间, 七氟醚组、七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠持续吸入体积分数为 3% 的七氟醚-氧气混合气体用于神经功能保护。

1.4 中动脉脑缺血模型的构建

采用戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 麻醉大鼠, 仰卧位固定在恒温 (37 °C) 手术台上, 参照文献改良的方法建立中动脉脑缺血模型^[8]。颈部正中备皮、消毒、切口, 分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 结扎颈外动脉及颈总动脉近心端。在颈总动脉近动脉分叉处剪一小口, 插入线栓, 阻断中动脉血流。插入深度为距分叉 (18.0±1.0) mm 处, 固定线栓。假手术组仅颈部正中备皮、消毒、切口, 分离各个颈动脉。阻断中动脉血流 120 min 后, 小心取出线栓, 逐层缝合颈部皮肤。

1.5 神经元微环境中离子浓度检测

造模 2 h 后, 随机取 6 只大鼠, 通过在体脑微透析技术检测神经元微环境中 Ca²⁺/Cl⁻ 离子浓度。先立体定位大鼠脑皮质, 植入微透析探针, 坐标 (-0.3 mm, ±1.0 mm, -2.2 mm)。大鼠恢复 1 周后, 将微透析探针与 PE 管和微量进样器连接, 微灌注人工脑脊液, 即在微透析探针中灌注 Cl⁻、Ca²⁺ 离子交换树脂, 自尾端分别灌入 100 mmol/L CaCl₂, 用电极拉制仪拉制 Cl⁻、Ca²⁺ 离子电极。梯度增加 Ca²⁺ 浓度, 达到与组织内 Ca²⁺ 和 Cl⁻ 进行透析交换, 获得待测样本。应用基因编码 Ca²⁺ 探针 (AAV5•GCamp6f) 和 Cl⁻ 荧光探针 (MQAE), 通过共聚焦显微镜成像观察脑内 Ca²⁺ 和 Cl⁻ 浓度的变化。

1.6 神经功能评分

造模后, 将大鼠放回笼中恢复, 3 d 后评估各组

大鼠神经功能。参考文献评分标准对大鼠进行神经功能评定^[8]。评分方法如下: 0 分为大鼠无神经损伤体征; 1 分为大鼠不能完全伸展对侧前爪; 2 分为大鼠提尾后向对侧转圈; 3 分为大鼠提尾后向对侧倾倒; 4 分为大鼠不能自发行走, 意识丧失; 5 分为大鼠死亡。分值越高说明神经功能损伤越严重。

1.7 TTC 染色

将所有大鼠处死, 各组取 3 只大鼠全脑 TTC 染色。取脑组织冷冻后切片, 浸没于质量分数 2% TTC 溶液中, 37 °C 避光孵育 30 min, 每 5 分钟翻动 1 次切片。将切片依次排列、拍摄, 分析各组大鼠脑梗死区面积。

1.8 免疫组化染色与 TUNEL 染色

各组取 3 只大鼠, 灌注后取全脑包埋切片后进行免疫组化染色、TUNEL 染色。免疫组化染色: 大鼠吸入 CO₂ 处死, 取脑组织固定于多聚甲醛中。梯度乙醇脱水, 石蜡包埋、切片。取切片脱蜡至水, 滴加二甲苯孵育 10 min。将切片在微波炉中高温烘烤 5 min, 放入 3% H₂O₂ 清洗槽中孵育 10 min, 消除内源性过氧化物酶活性。PBST 清洗, 切片上滴加 5% 山羊血清封闭 1 h。PBST 清洗, 切片上滴加 Anti-CD31 抗体稀释液 (1:100), 放入湿盒中孵育过夜。取出切片, PBST 清洗, 滴加偶联生物素二抗稀释液 (1:200), 室温孵育 30 min。PBST 清洗, 滴加 streptavidin-HRP, 孵育 30 min。PBST 清洗, 滴加 DAB 显色液, 孵育 10 min。双蒸水清洗, 苏木精复染 10 s, 中性树脂封片, 显微镜下观察、记录。

TUNEL 染色: 取切片脱蜡至水, 滴加二甲苯孵育 10 min。将切片在微波炉中高温烘烤 5 min, 放入 H₂O₂ 清洗槽中孵育 10 min, 消除内源性过氧化物酶活性。取试剂盒中生物素标记液, 混合后滴加在切片上, 37 °C 水浴 60 min。PBS 洗涤切片, 滴加标记反应终止液, PBS 清洗, 滴加偶联生物素二抗稀释液 (1:200), 室温孵育 30 min。PBST 清洗, 滴加 streptavidin-HRP, 孵育 30 min。PBST 清洗, 滴加 DAB 显色液, 孵育 10 min。双蒸水清洗, 苏木精复染 10 s, 中性树脂封片, 进行显微镜下观察、记录。

1.9 Western blotting 检测相关蛋白表达

收集剩余大鼠脑组织, 取海马组织, 加入组织裂解液研磨、静置 30 min。离心取上清液、测定大鼠脑组织神经元新生相关蛋白浓度。加入上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 完成样品制备。取 SDS-PAGE

凝胶, 加入等量样品, 开启凝胶电泳, 待上样缓冲液到达凝胶底部时, 取出凝胶。根据预染蛋白 Marker 截取目标蛋白条带, 开始湿法转膜。PBST 清洗蛋白条带, 在 2% BSA 溶液中封闭 2 h。取蛋白条带, 4 °C 孵育不同一抗 1 : (1 000~2 000) 稀释液。次日取蛋白条带, PBST 清洗, 滴加 HRP 单抗兔/鼠 IgG (H+L) 二抗稀释液, 室温孵育 2 h。蛋白条带上滴加发光液, 成像仪下获得蛋白条带, 使用 Image J 软件进行量化统计, 以目标蛋白灰度值与 β -actin 蛋白灰度比值作为最终统计结果。

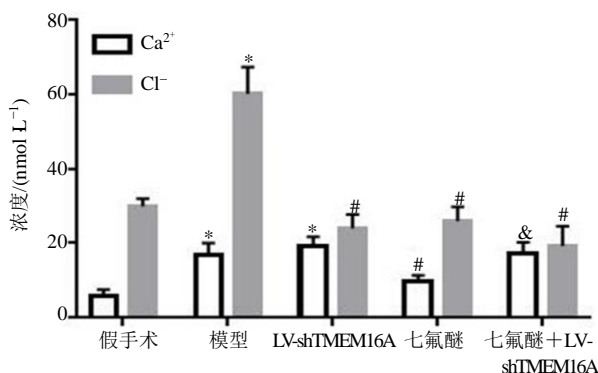
1.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件分析, 所有数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据之间采用单因素方差分析 (One way Anova), 通过 Tukey 检验两组之间统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织神经元中 Ca^{2+} 、 Cl^{-} 的浓度

与假手术组相比, 模型组与 LV-shTMEM16A 组大鼠脑组织神经元中 Ca^{2+} 浓度明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 七氟醚组大鼠脑组织神经元中 Ca^{2+} 浓度明显减少 ($P < 0.05$); 与七氟醚组相比, 七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠脑组织神经元中 Ca^{2+} 浓度明显增加 ($P < 0.05$)。与假手术组相比, 模型组大鼠神经元中 Cl^{-} 浓度明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, LV-shTMEM16A 组、七氟醚组、七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠神经元中 Cl^{-} 浓度均明显减少 ($P < 0.05$), 见图 1。



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与七氟醚组比较: & $P < 0.05$

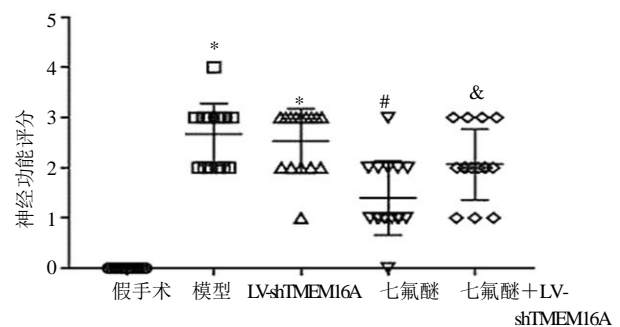
* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs sevoflurane group

图 1 各组大鼠脑组织神经元中 Ca^{2+} 、 Cl^{-} 浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 1 Ca^{2+} and Cl^{-} concentrations in neurons of brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

2.2 各组大鼠神经功能评分和脑梗死面积

假手术组大鼠没有插线栓阻断中动脉血流, 所有大鼠行为表现正常, 评分为 0, 且没有脑梗死区域; 与假手术组相比, 模型组与 LV-shTMEM16A 组大鼠出现明显的神经功能障碍, 评分显著增加, 且出现明显的梗死区域, 而七氟醚组大鼠神经功能评分降低, 脑梗死面积减少 ($P < 0.05$); 与七氟醚组相比, 七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠神经功能评分提高, 脑梗死面积增加 ($P < 0.05$), 见图 2、3。



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与七氟醚组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs sevoflurane group

图 2 各组大鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 2 Neurological function scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

2.3 各组大鼠脑组织中神经元 TUNEL 染色

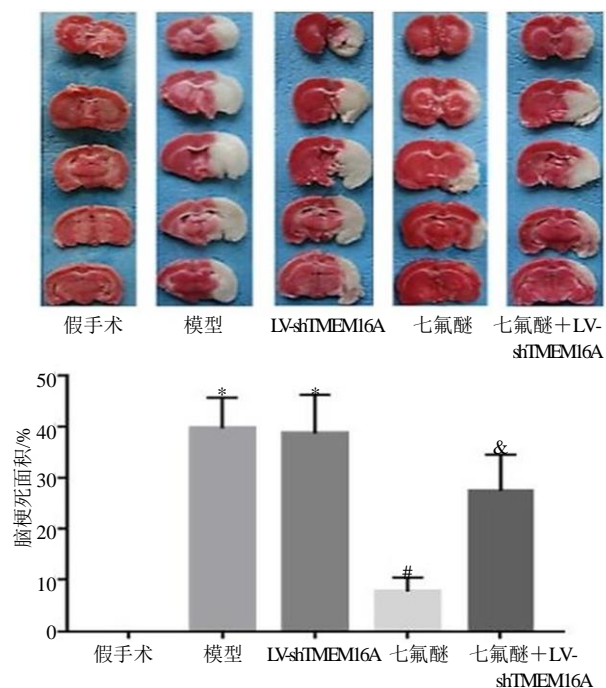
与假手术组相比, 模型组和 LV-shTMEM16A 组大鼠脑组织中 TUNEL 染色阳性细胞率增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 七氟醚组大鼠脑组织中 TUNEL 染色阳性细胞率降低 ($P < 0.05$); 与七氟醚组相比, 七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠 TUNEL 染色阳性细胞率增加 ($P < 0.05$), 见图 4、5。

2.4 各组大鼠脑组织中 CD31 表达情况

假手术组大鼠脑组织血管没有损伤, 新生血管生成标记物 CD31 几乎没有表达; 与假手术组相比, 模型组和 LV-shTMEM16A 组大鼠脑组织中 CD31 表达明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 七氟醚组大鼠脑组织中 CD31 表达进一步增加 ($P < 0.05$); 与七氟醚组相比, 七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠 CD31 表达却明显减少 ($P < 0.05$), 见图 6、7。

2.5 七氟醚通过 TMEM16A 对凋亡相关蛋白和神经营养相关蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组 TMEM16A 表达明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 七氟醚组 TMEM16A



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与七氟醚组比较: & $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs sevoflurane group

图 3 各组大鼠脑梗死面积 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 3 Cerebral infarction size of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

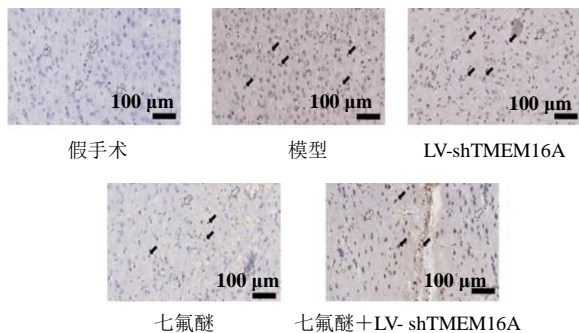
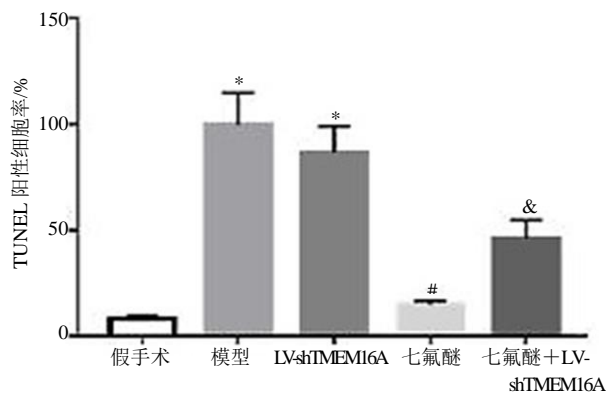


图 4 各组大鼠脑组织神经元 TUNEL 染色结果

Fig. 4 TUNEL staining results of brain tissue of rats in each group

表达明显减少 ($P < 0.05$); 与此同时, LV-shTMEM16A 组和七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠脑组织中 TMEM16A 表达几乎没有。

凋亡相关蛋白检测中, 与假手术组相比, 模型组和 LV-shTMEM16A 组 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显增加, Bcl-2 蛋白表达减少 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 七氟醚组 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与七氟醚组比较: & $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs sevoflurane group

图 5 各组大鼠脑组织神经元 TUNEL 染色阳性细胞率 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 5 TUNEL staining positive cell rate of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

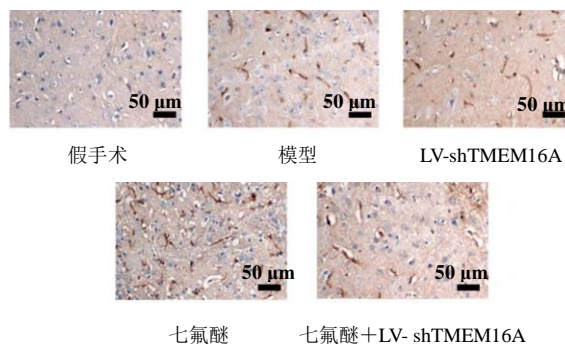


图 6 各组大鼠脑组织神经元 CD31 染色结果

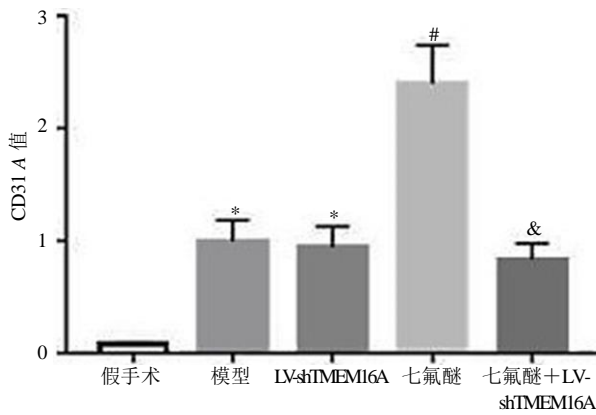
Fig. 6 CD31 staining results of neurons in brain tissue of rats in each group

白表达明显减少, Bcl-2 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$); 与七氟醚组相比, 七氟醚+LV-shTMEM16A 组 Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显增加, Bcl-2 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$), 见图 8。

神经营养相关蛋白检测中, 与假手术组相比, 模型组和 LV-shTMEM16A 组的 TGF- β 、BDNF、TrkB 蛋白表达明显减少, VEGF 表达增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 七氟醚组 TGF- β 、BDNF、TrkB 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$), 且 VEGF 蛋白表达进一步增加 ($P < 0.05$); 与七氟醚组相比, 七氟醚+LV-shTMEM16A 组 TGF- β 、BDNF、TrkB、VEGF 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$), 见图 9。

3 讨论

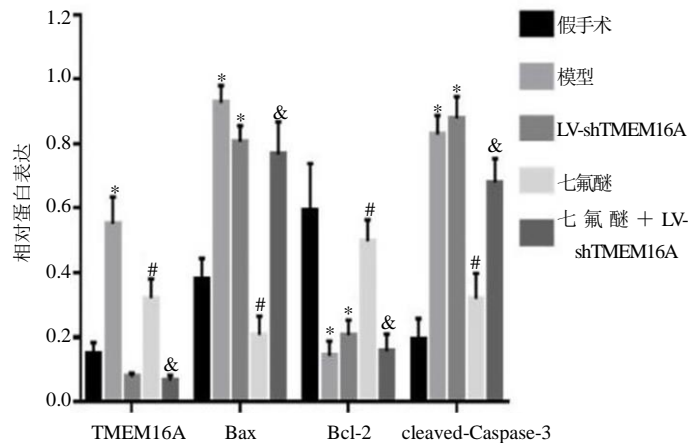
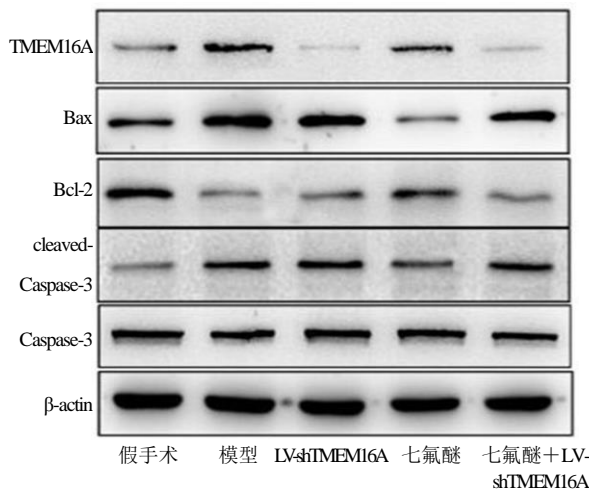
脑梗死患者常出现口眼歪斜、思维迟缓、四肢



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与七氟醚组比较: & $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs sevoflurane group

图 7 各组大鼠脑组织神经元 CD31 量化统计结果 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 7 Quantitative statistical results of CD31 in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 15$)



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与七氟醚组比较: & $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs sevoflurane group

图 8 各组大鼠脑组织神经元凋亡相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

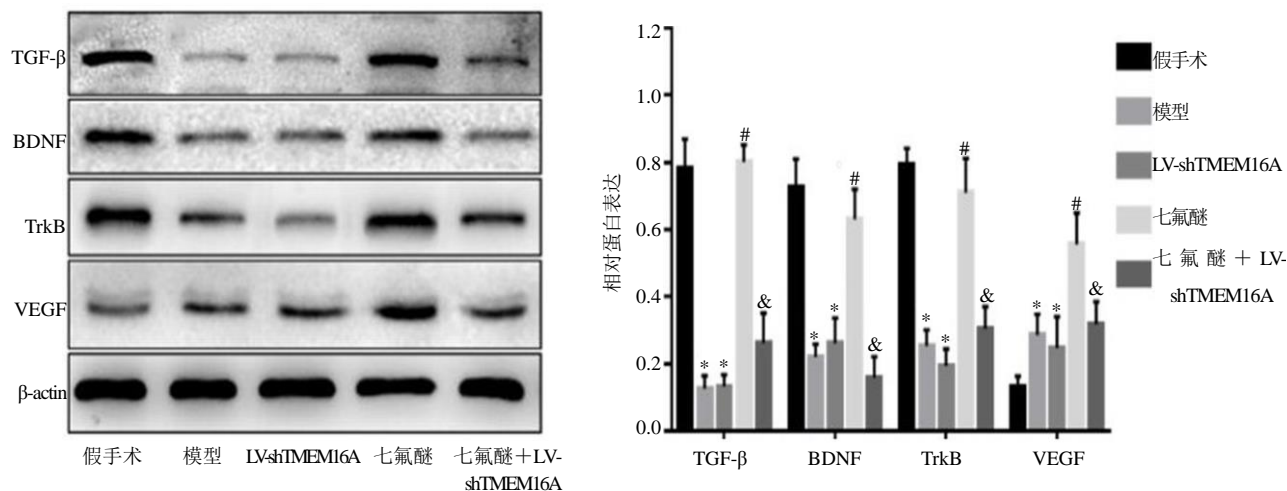
Fig. 8 Expression and quantitative statistics of apoptosis-related proteins in rat brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

功能区域。然而神经血管单元在脑缺血进展中却表现为两面性。前期研究显示, TGF- β 通过负反馈调节 JNK 和 p38MAPK 的表达, 促进神经元附近血管修复, 从而维护神经元之间营养物质传递, 缩小缺血面积、改善近期神经功能^[10-11]。然而, 脑梗死后期, 当 TGF- β 过度表达, 会导致星形胶质细胞过度活化, 介导梗死区域纤维化和胶质瘢痕形成, 同时大量新生的神经血管单元允许促炎及促凋亡因子

运动功能障碍等症状。CT 平扫缺血侧脑区常出现大脑中动脉高度密集, 豆状核密度降低、脑沟消失; 患者病情加剧后, 可出现片状低密度梗塞^[9]。本研究结果显示, 模型组大鼠神经功能评分增加, 普遍出现单侧前肢无法完全伸缩, 身体向一侧偏瘫或部分出现瘫痪的情况。此外, TTC 染色中也有显示, 模型组大鼠单侧出现明显的梗塞区域。以上结果提示本研究脑梗死模型构建成功。与模型组相比, LV-shTMEM16A 组大鼠神经功能评分与脑梗死区域面积没有明显改变, 提示沉默 TMEM16A 基因表达对脑梗死大鼠没有明显影响。而七氟醚明显降低了大鼠神经功能评分与脑梗死区域面积, 发挥了正向调节作用。与七氟醚组相比, 七氟醚 + LV-shTMEM16A 组大鼠神经功能评分与脑梗死区域面积增加, 提示七氟醚发挥脑梗死改善作用可能与 TMEM16A 基因相关。

目前研究认为神经血管单元是由神经元、胶质细胞和附近微血管组成的功能和形态相互影响的

在细胞间扩散, 反而加速了神经损伤进程^[12]。本研究结果显示, 模型组中血管新生标记蛋白 CD31 表达增加, 提示内源性保护机制在受到缺血的影响后激活。然而, 内源性保护机制无法减轻脑缺血的损伤作用, TUNEL 染色中表现为凋亡神经元比例增加。七氟醚治疗后, 脑组织中神经营养蛋白 TGF- β 、BDNF、TrkB 蛋白表达增加, 血管内皮生长因子 VEGF 表达提高, 且 CD31 表达进一步增加且凋亡



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与七氟醚组比较: & $P < 0.05$
 $^*P < 0.05$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs sevoflurane group

图 9 各组大鼠脑组织神经元新生相关蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 9 Expression and quantitative statistics of neurogenesis related proteins in brain tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

神经元比例降低,提示七氟醚不仅通过提高神经营养蛋白表达促进了神经元血管新生,还提高了神经元对缺血环境的耐受,抑制的神经元凋亡。由于本次研究观察时间周期较短,增加的神经血管单元并没有表现出诱导炎症,加速损伤的情况。

进一步研究结果显示,与模型组相比,七氟醚组大鼠脑组织中 TMEM16A 蛋白表达明显降低,且七氟醚+LV-shTMEM16A 组大鼠脑组织中 CD31 表达没有增加,神经元凋亡比例较高。因此,七氟醚极有可能是通过调控 TMEM16A 蛋白表达提高神经血管单元修复。TMEM16A 是阴离子通道的重要组成部分,属于 CaCCs 的分子基础,参与脑缺血后的脑水肿和脑梗死区域的形成^[13]。TMEM16A 存在钙离子或钙调蛋白结合位点, Sirianant 等^[14]提出 TMEM16A 可以作为细胞容量调节性 Cl⁻通道,会被胞内外排的 Ca²⁺经瞬时受体电位通道激活。当 Ca²⁺浓度升高时,一方面会导致线粒体相关的凋亡信号通路蛋白活化,造成神经元凋亡^[15]。另一方面, TMEM16A 活化会介导细胞中过量的 Cl⁻离子内流,导致细胞肿胀^[16]。然而,通过抑制剂干预降低 TMEM16A 基因表达能够明显抑制细胞内钙依赖的氯离子分泌,减轻细胞肿胀。本研究结果也有显示,与假手术组相比,模型组大鼠神经元中 Cl⁻浓度明显增加, TMEM16A 蛋白表达升高;但与模型组相比, LV-shTMEM16A 组、七氟醚组、七氟醚+LV-shTMEM16A 组神经元中 Cl⁻浓度明显减少。这提示

七氟醚可能通过抑制 shTMEM16A 蛋白表达降低 Cl⁻浓度。与此同时,与假手术组相比,模型组与 LV-shTMEM16A 组大鼠脑组织中 Ca²⁺浓度明显增加,且 Bax、cleaved-Caspase-3 等凋亡相关蛋白表达明显增加, Bcl-2 等抗凋亡蛋白表达明显减少。与模型组相比,七氟醚组大鼠脑组织中 Ca²⁺浓度明显减少,且 Bax、cleaved-Caspase-3 等凋亡相关蛋白表达明显减少, Bcl-2 等抗凋亡蛋白表达明显增加。

综上所述,本研究证实了钙激活氯通道活化在脑缺血模型诱发损伤中扮演着重要角色。七氟醚通过抑制钙激活通道的分子基础蛋白 TMEM16A 蛋白表达,降低 Cl⁻与 Ca²⁺电流,一方面抑制了神经元凋亡,另一方面促进了神经血管单元的新生,最终达到减轻缺血性卒中诱发神经功能损伤的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Premat K, Clovet O, Frasca P G, et al. Mechanical thrombectomy in perioperative 15 strokes: A case-control study [J]. *Stroke*, 2017, 48(11): 3149-3151.
 [2] Zhao L R, Willing A. Enhancing endogenous capacity to repair a stroke-damaged brain: An evolving field for stroke research [J]. *Prog Neurobiol*, 2018(163-164): 5-26.
 [3] Zhu Y M, Gao X, Ni Y, et al. Sevoflurane postconditioning attenuates reactive astrogliosis and glial scar formation after ischemia-reperfusion brain injury [J]. *Neuroscience*, 2017, 356: 125-141.

- [4] Hwang J W, Jeon Y T, Lim Y J, *et al.* Sevoflurane postconditioning-induced anti-inflammation via inhibition of the toll-like receptor-4/nuclear factor kappa B pathway contributes to neuroprotection against transient global cerebral ischemia in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2347.
- [5] Wang D, Fang B, Wang Z, *et al.* Sevoflurane pretreatment regulates abnormal expression of MicroRNAs associated with spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(9): 752.
- [6] Peters C J, Gilchrist J M, Tien J, *et al.* The sixth transmembrane segment is a major gating component of the *tmem16a* calcium-activated chloride channel [J]. *Neuron*, 2018, 97(5): 1063-1077.
- [7] Liu P Y, Zhang Z, Liu Y, *et al.* TMEM16A inhibition preserves blood-brain barrier integrity after ischemic stroke [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 360.
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] 张哲宇, 徐良额, 江秉泽, 等. 基于 CT 灌注成像评估侧支循环在急性缺血性脑卒中取栓前后脑梗死进展及预后评估中的应用 [J]. *中华神经医学杂志*, 2021, 20(1): 8-15.
- [10] Yang Y, Chen L, Si J, *et al.* TGF- β 3/Smad3 contributes to isoflurane postconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury by upregulating MEF2C [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(8): 1353-1365.
- [11] Zhang G X, Ge M Y, Han Z W, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling pathway contributes to isoflurane postconditioning against cerebral ischemia reperfusion injury and is possibly related to the transforming growth factor β 1/Smad3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 420-430.
- [12] Ondacova K, Moravcikova L, Jurkovicova D, *et al.* Fibrotic scar model and TGF- β 1 differently modulate action potential firing and voltage-dependent ion currents in hippocampal neurons in primary culture [J]. *Eur J Neurosci*, 2017, 46(6): 2161-2176.
- [13] Yang G, Tang X, Tan L, *et al.* Upregulation of miR-144-3p protects myocardial function from ischemia-reperfusion injury through inhibition of TMEM16A Ca^{2+} -activated chloride channel [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(2): 360-371.
- [14] Sirianant L, Ousingasawat J, Wanitchakool P, *et al.* Cellular volume regulation by anoctamin 6: Ca^{2+} , phospholipase A2 and osmosensing [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(2): 335-349.
- [15] Wang M, Tan J, Miao Y, *et al.* Role of Ca^{2+} and ion channels in the regulation of apoptosis under hypoxia [J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(3): 237-246.
- [16] Korte N, Ilkan Z, Pearson C L, *et al.* The Ca^{2+} -gated channel TMEM16A amplifies capillary pericyte contraction and reduces cerebral blood flow after ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(9): e154118.

[责任编辑 高源]