

· 实验研究 ·

TGF- β /SMAD/JNK 通路参与异氟醚后处理减轻大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤

殷姜文 葛明月 李燕 谢丽萍 秦新磊 王瑞雪 代志刚 王胜

【摘要】 目的 探讨异氟醚后处理通过调节转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路发挥脑缺血后神经保护效应,及其对下游 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)的影响。**方法** 雄性SD大鼠 50 只,体重 250~300 g,随机分为五组,每组 10 只:假手术组(S组)、脑缺血-再灌注损伤组(IR组)、异氟醚后处理组(ISO组)、TGF- β_1 抑制剂组(LY组)和 TGF- β_1 激动剂组(SR组)。S组仅做分离颈部血管的探查手术;IR组采用大脑中动脉栓塞模型(MCAO)建立脑缺血-再灌注损伤,缺血 90 min,再灌注 24 h;ISO组在 MCAO 再灌注即刻吸入 1.5%异氟醚后处理 60 min;LY组和 SR组分别在 MCAO 前 30 min 经脑立体定位仪侧脑室分别注射抑制剂(LY2157299)和激动剂(SRI-011381),总量为 50 μ l,注射 10 min,注射完成后常规行 MCAO 和异氟醚后处理。TTC 染色法及神经行为学评分判断神经损伤程度,采用 TUNEL 法检测神经元凋亡程度,免疫荧光染色法观察海马 CA1 区 TGF- β_1 的蛋白定位,Western blot 法检测海马 TGF- β_1 及 p-SMAD2/3、p-JNK1/2 蛋白含量。**结果** 与 S 组比较,IR 组和 ISO 组神经行为学评分明显升高,神经元凋亡明显加重,TGF- β_1 、p-SMAD2/3 和 p-JNK1/2 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。与 IR 组比较,ISO 组和 SR 组神经行为学评分明显降低,神经元凋亡明显减轻,TGF- β_1 和 p-SMAD2/3 蛋白含量明显升高,p-JNK1/2 蛋白含量明显降低($P < 0.05$)。与 ISO 组比较,LY 组神经行为学评分明显升高,神经元凋亡明显加重,TGF- β_1 蛋白含量明显降低,p-JNK1/2 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 异氟醚后处理可通过调节 TGF- β_1 /SMAD 信号通路进而抑制 p-JNK1/2 的表达,发挥对大鼠脑缺血-再灌注损伤的神经保护作用。

【关键词】 异氟醚;后处理;脑缺血-再灌注损伤;转化生长因子- β ;c-Jun 氨基末端激酶;TGF- β /SMAD/JNK 通路

TGF- β /SMAD/JNK pathway contributes to isoflurane against cerebral ischemia-reperfusion injury

YIN Jiangwen, GE Mingyue, LI Yan, XIE Liping, QIN Xinlei, WANG Ruixue, DAI Zhigang, WANG Sheng. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Corresponding author: WANG Sheng, Email: iamsheng2006@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of isoflurane postconditioning against cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury and investigated the role of TGF- β /SMAD/JNK pathway in neuroprotective mechanism. **Methods** Fifty male SD rats weighing 250–300 g, were randomly divided into five groups (10 rats in each group): sham group (group S), cerebral ischemia-reperfusion injury group (group IR), isoflurane group (group ISO), LY2157299 group (group LY), SRI-011381 group (group SR). In group S, only exploration surgery was performed. In group IR, cerebral IR injury was produced by middle cerebral artery occlusion for 90 min, followed by 24 h reperfusion. Group ISO were immediately treated with 1.5% isoflurane for 60 min at the starting time of reperfusion. Rats in groups LY and SR were injected inhibitors or agonists for 30 min before middle cerebral artery occlusion model (MCAO) through the lateral ventricle of the brain stereo locator for a total of 50 μ l for 10 min. MCAO and isoflurane postconditioning were routinely administered after injection. The protective effect was tested by neurological deficit scoring, TTC staining. Apoptosis cells in hippocampus was detected by TUNEL stain. The protein content were determined by immunostaining and western blot. **Results** Compared with group S, the neurobehavioral scores and the neuronal apoptosis in groups IR and ISO were increased. The protein content of TGF- β_1 and p-JNK1/2 were increased ($P < 0.05$). Compared with group IR, the neurobehavioral scores in groups ISO and SR were de-

DOI:10.12089/jca.2020.06.013

基金项目:国家自然科学基金(81860249, 81860209);石河子大学科研计划项目(ZZZC201709A)

作者单位:832000 新疆石河子大学医学院第一附属医院麻醉科(殷姜文、葛明月、李燕、谢丽萍、秦新磊、王瑞雪、代志刚);中国科学技术大学附属第一医院 安徽省立医院麻醉科(王胜)

通信作者:王胜,Email: iamsheng2006@163.com

creased, the neuronal apoptosis was reduced, TGF- β_1 and p-SMAD2/3 were increased, p-JNK1/2 was decreased ($P < 0.05$). Compared with group ISO, the neurobehavioral scores in group LY were increased, neuronal apoptosis was increased, TGF- β_1 was significantly decreased, p-JNK1/2 was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Isoflurane postconditioning can upregulate the expression of TGF- β_1 and downregulate p-JNK, which acts against cerebral IR injury.

【Key words】 Isoflurane; Postconditioning; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Transforming growth factor beta; c-Jun N-terminal kinase; TGF- β /SMAD/JNK pathway

围术期脑缺血损伤事件常造成患者预后不良,受麻醉科医师的高度重视^[1]。经典研究表明,异氟醚可以减轻脑缺血-再灌注损伤,但其激活内源性细胞保护机制尚未阐明。转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 是一类细胞因子超家族,其成员与信号转导分子 SMAD 形成复合物,与特异的 DNA 序列结合调节靶基因表达,在细胞内形成多信号通路网络,从而调控细胞增殖、凋亡与转化^[2-3]。本研究选用经典吸入性麻醉药异氟醚,旨在探究异氟醚后处理效应对 TGF- β 信号通路的调节作用,为围术期脑保护提供新的思路与方法。

材料与方法

实验动物与分组 成年 SD 雄鼠 50 只,体重 250~300 g,采用随机数字表法分为五组,每组 10 只:假手术组(S 组)、脑缺血-再灌注损伤组(IR 组)、异氟醚后处理组(ISO 组)、TGF- β_1 抑制剂组(LY 组)、TGF- β_1 激动剂组(SR 组)。

模型建立与给药方法 采用戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,建立大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery occlusion model, MCAO):颈部正中切口,分离左侧颈总、颈外、颈内动脉,结扎颈外动脉、颈内动脉近心端,在动脉分叉处剪口后插入直径为 0.25 mm 的线栓,深度为距动脉分叉口(18.0 $\pm$ 1.0) mm,栓塞 90 min 后拔除线栓造成再灌注。S 组仅做颈部血管探查手术,不放置线栓。IR 组采用 MCAO 建立脑缺血-再灌注损伤,缺血 90 min,再灌注 24 h。ISO 组大鼠在再灌注即刻放入吸入麻醉箱,调节压缩空气流量至 1 L/min,异氟醚挥发罐连接压缩气出口和吸入麻醉箱入口,调节刻度至 1.5%,全程使用麻醉气体监测仪监控异氟醚浓度,60 min 后取出放饲养笼复苏。LY 组和 SR 组分别在 MCAO 前 30 min 经脑立体定位仪侧脑室(坐标定位:距离囟门后 0.8 mm,横向 1.5 mm,深度 4.0 mm,分别注射 TGF- β_1 的抑制剂(LY2157299)和激动剂(SRI-011381),抑制剂和激动剂均按 5 μ g/kg 给药,注射总量为 50 μ l,注射 10 min。经侧脑室给药 30 min 后常规行 MCAO 和异氟醚后处理。

神经功能行为学评估 大鼠在再灌注 24 h 时进行神经行为学评分,评分方法^[4]:0 分,无神经损伤体征;1 分,不能完全伸展对侧前爪;2 分,提尾后向对侧转圈;3 分,提尾后向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。分值越高表明大鼠神经功能损伤越严重。

TTC 染色及脑损伤体积测定 神经功能评分后用戊巴比妥钠 60 mg/kg 腹腔注射深麻醉,断头取脑,-20 $^{\circ}$ C 冰箱中快速冰冻 15 min 后由前向后冠状切片,每片厚度约为 2 mm,置入 2% TTC 溶液中 37 $^{\circ}$ C 恒温遮光染色 30 min,福尔马林液中固定 24 h。用数码相机拍照,用 CM-2000B 医学图象分析系统测量脑片梗死体积(红色区为正常,苍白色为梗死区),计算梗死体积,梗死体积和脑体积之比为梗死体积百分比。

TUNEL 法检测海马组织 CA1 区细胞凋亡 再灌注 24 h 戊巴比妥钠深麻醉后,用 4% 多聚甲醛固定液经心脏实施灌注取脑,制备冰冻切片,切片经 5% BSA 封闭 30 min,加入 50 μ l TdT 酶反应液后与 50 μ l 的 Streptavidin-HRP 结合,镜下 DAB 控制显色,TUNEL 阳性神经元被染成棕黄色,显微镜下观察并采图,每张切片在 200 倍视野下随机选择 3 个不同视野。用 Image Pro Plus 6.0 进行阳性细胞分析。

免疫荧光染色法检测海马组织 TGF- β_1 蛋白含量 各组切片使用 5% BSA 封闭 1 h,滴加 TGF- β_1 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h,PBS 洗涤后,滴加 FITC 标记的生物素化 IgG 二抗,湿盒避光室温孵育 2 h,PBS 洗涤后暗室下用 0.5 μ g/ml 的 PI 溶液染细胞核 30 s,封片后激光共聚焦显微镜下观察。每张切片在 200 倍视野下随机选 3 个不同视野进行采图。用 Aim Image Examiner 图像分析系统进行荧光强度测定。

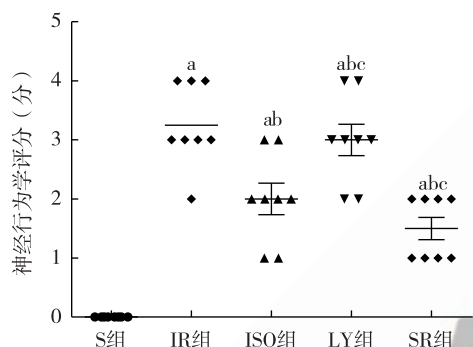
Western blot 法检测海马组织 TGF- β_1 及 p-SMAD2/3、p-JNK1/2 蛋白含量 各组于再灌注 24 h 时取脑,快速剥离海马组织,常规提蛋白法获得海马组织总蛋白样品。取 10 μ l 样品常规电泳、转膜。室温封闭后按浓度 1:500 进行内参及目的蛋白一抗孵育过夜,室温孵育二抗 2 h,暗室曝光。应用 Gel-pro 32 图像分析软件测定各组目的蛋白与内参

蛋白灰度值之比来分析各组蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 Bonferroni post-hoc 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

神经行为学评分 所有大鼠术前神经行为学评分均为 0 分,S 组术后 24 h 神经行为学评分均为 0 分。与 S 组比较,IR 组、ISO 组、LY 组、SR 组神经行为学评分明显升高($P<0.05$)。与 IR 组比较,ISO 组和 SR 组神经行为学评分明显降低($P<0.05$)。与 ISO 组比较,LY 组神经行为学评分明显升高,SR 组明显降低($P<0.05$) (图 1)。



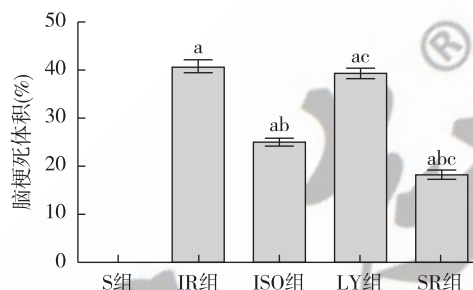
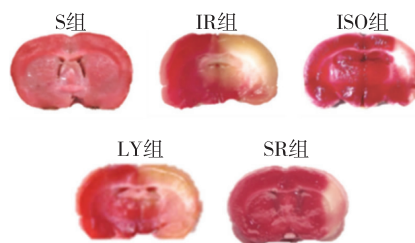
注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$;与 ISO 组比较,^c $P<0.05$

图 1 五组大鼠术后 24 h 神经行为学评分的比较

脑梗死体积 与 S 组比较,IR 组、ISO 组、LY 组、SR 组脑梗死体积明显增大($P<0.05$)。与 IR 组比较,ISO 组和 SR 组脑梗死体积明显减小($P<0.05$)。与 ISO 组比较,LY 组脑梗死体积明显增大,SR 组明显减小($P<0.05$) (图 2)。

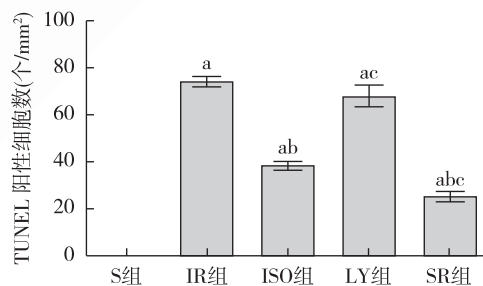
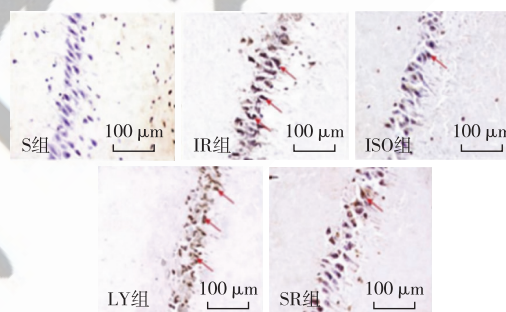
海马组织 CA1 区 TUNEL 凋亡阳性细胞数 与 S 组比较,IR 组、ISO 组、LY 组、SR 组凋亡阳性细胞数明显增多($P<0.05$)。与 IR 组比较,ISO 组和 SR 组凋亡阳性细胞数明显减少($P<0.05$)。与 ISO 组比较,LY 组凋亡阳性细胞数明显增多,SR 组明显减少($P<0.05$) (图 3)。

海马组织 TGF- β_1 免疫荧光结果 TGF- β_1 集中表达在海马 CA1 区的神经元细胞浆中。与 S 组比较,IR 组、ISO 组和 SR 组 TGF- β_1 蛋白含量明显升高,LY 组明显降低($P<0.05$)。与 IR 组比较,ISO 组和 SR 组 TGF- β_1 蛋白含量明显升高,LY 组明显降低($P<0.05$)。与 ISO 组比较,LY 组 TGF- β_1 蛋白



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$;与 ISO 组比较,^c $P<0.05$

图 2 五组大鼠脑 TTC 染色及梗死体积的比较

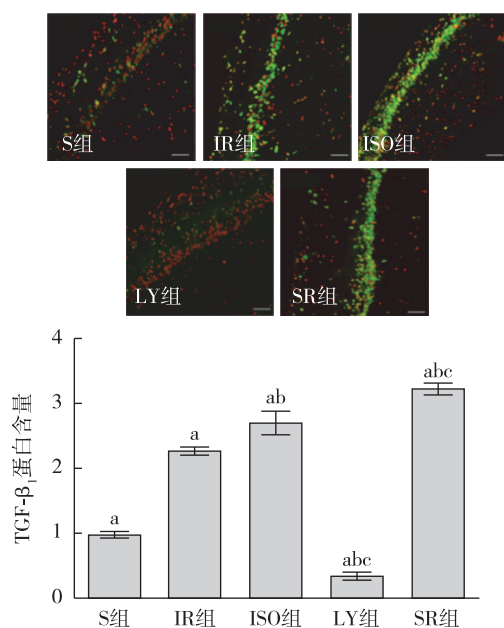


注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$;与 ISO 组比较,^c $P<0.05$

图 3 五组大鼠海马组织 CA1 区 TUNEL 染色图($\times 200$)及凋亡阳性细胞数的比较

含量明显降低,SR 组明显升高($P<0.05$) (图 4)。

海马组织 TGF- β_1 蛋白含量 与 S 组比较,IR 组、ISO 组、SR 组 TGF- β_1 蛋白含量明显升高($P<0.05$)。与 IR 组比较,ISO 组、SR 组 TGF- β_1 蛋白含量明显升高,LY 组明显降低($P<0.05$)。与 ISO 组比较,LY 组 TGF- β_1 蛋白含量明显降低,SR 组明显升高($P<0.05$) (图 5)。



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$;与 ISO 组比较,^c $P<0.05$

图 4 五组大鼠海马组织 CA1 区 TGF-β₁ 蛋白免疫荧光图 (×200) 及含量的比较

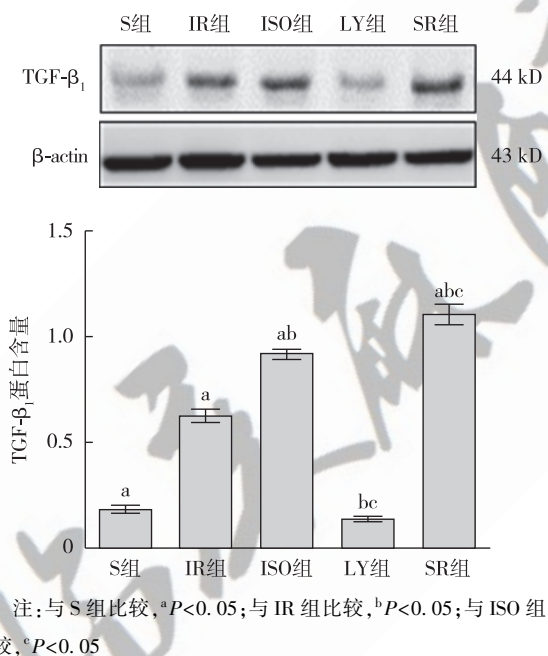
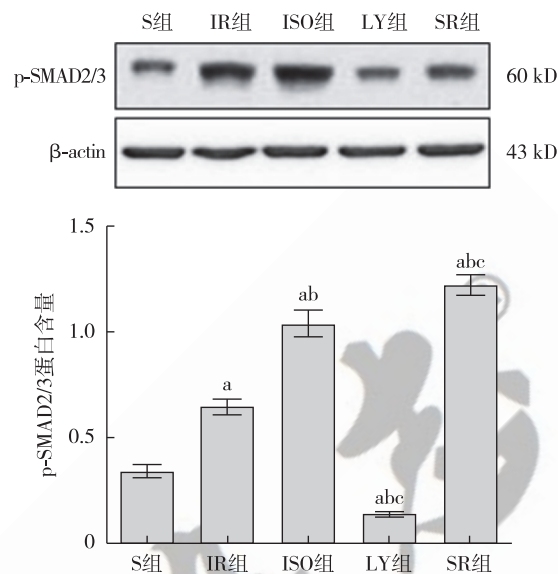


图 5 五组大鼠海马组织 TGF-β₁ 蛋白含量的比较

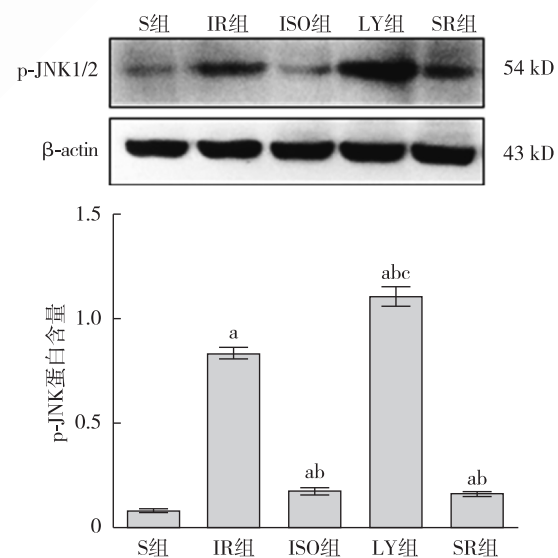
海马组织 p-SMAD2/3 蛋白含量 与 S 组比较, IR 组、ISO 组、SR 组 p-SMAD 蛋白含量明显升高, LY 组明显降低 ($P<0.05$)。与 IR 组比较, ISO 组、SR 组 p-SMAD 蛋白含量明显升高, LY 组明显降低 ($P<0.05$)。与 ISO 组比较, LY 组 p-SMAD 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$), SR 组明显升高 ($P<0.05$) (图 6)。



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$;与 ISO 组比较,^c $P<0.05$

图 6 五组大鼠海马组织 p-SMAD2/3 蛋白含量的比较

海马组织 p-JNK1/2 蛋白含量 与 S 组比较, IR 组、ISO 组、LY 组、SR 组 p-JNK1/2 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$)。与 IR 组比较, ISO 组、SR 组 p-JNK1/2 蛋白含量明显降低, LY 组 p-JNK1/2 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$)。与 ISO 组比较, LY 组 p-JNK1/2 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$), SR 组 p-JNK1/2 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。五组 JNK1/2 蛋白含量差异无统计学意义 (图 7)。



注:与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$;与 ISO 组比较,^c $P<0.05$

图 7 五组大鼠海马组织 p-JNK1/2 蛋白含量的比较

讨 论

吸入麻醉药异氟醚已被证实对缺血性脑损伤具有神经保护作用^[5],但其作用机制尚不明确。在本实验研究中,1.5%异氟醚后处理对大鼠脑缺血-再灌注损伤具有保护作用,可明显减小脑梗死体积,改善神经行为学评分,减少损伤侧海马 CA1 区细胞凋亡的数量。

当预先应用 TGF- β_1 特异性抑制剂 LY2157299 后,TTC 染色显示脑梗死体积明显增大,神经行为学评分明显升高,这一现象提示抑制 TGF- β_1 的表达可减弱异氟醚的保护作用。而给予 TGF- β_1 的激动剂 SRI-011381 则与异氟醚的保护效应发挥了叠加作用,因此推测 TGF- β 信号通路可能参与了脑缺血-再灌注损伤后的神经修复过程。在脑缺血-再灌注的 24 h,大鼠海马 TGF- β_1 的表达在 IR 组和 ISO 组均增加,免疫荧光显示 TGF- β_1 集中表达在对缺血缺氧最敏感的海马 CA1 区。TGF- β 信号通路包括 TGF- β s、激活素、骨形态发生蛋白等 30 多个因子,参与机体细胞增殖、分化、损伤修复等。许多研究已证实,TGF- β_1 是脑缺血期间在表达的主要亚型^[6-8],本研究也显示其下游活性的 p-SMAD2/3 蛋白含量呈相同的上调趋势,提示异氟醚后处理有助于诱导 TGF- β /SMAD 信号通路的激活。TGF- β_1 诱导下游受体调节型 SMAD 磷酸化并激活后转移到细胞核内,调节靶基因的表达^[9-10]。

TGF- β 信号通路存在一些非典型的信号通路途径,调节下游信号产生应答。最常见的非典型通路是 MAPK 信号通路,主要包括 ERK、JNK 等通路蛋白^[11-12]。本研究显示,p-JNK 蛋白含量在缺血-再灌注损伤后明显升高,但 ISO 组中蛋白含量均明显降低,而非磷酸化的总 JNK 蛋白含量在各组中无变化。JNK 作为 MAPK 信号转导途径之一,是脑缺血-再灌注损伤过程中细胞应激损伤应答的关键蛋白。对于 TGF- β_1 /JNK 信号转导通路相互作用是否参与异氟醚后处理对脑缺血-再灌注损伤的保护作用研究甚少。本研究中给予 TGF- β_1 抑制剂 LY2157299 后,p-JNK 蛋白含量明显升高,此时异氟醚后处理的保护作用被明显抑制。但当给予 TGF- β_1 通路的激动剂 SRI-011381 时,TGF- β_1 蛋白含量明显升高,异氟醚后处理的保护作用持续存在且增强,细胞凋亡数量明显降低,而 p-JNK 蛋白含量明显降低,说明 TGF- β_1 与 JNK 间存在着负性调节的作

用,即 TGF- β_1 可调控 JNK,使 JNK 信号通路过程不能完整地参与异氟醚后处理对脑缺血-再灌注损伤的保护作用。

综上所述,异氟醚后处理可通过调节 TGF- β_1 /SMAD 信号通路进而抑制 p-JNK1/2 的表达,发挥对大鼠脑缺血-再灌注损伤的神经保护作用。

参 考 文 献

- [1] Premat K, Clovet O, Frasca Polara G, et al. Mechanical thrombectomy in perioperative strokes: a case-control study. *Stroke*, 2017, 48(11): 3149-3151.
- [2] 张贵星,王胜,殷姜文,等.异氟醚后处理对局灶性脑缺血-再灌注大鼠海马神经损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(1): 66-71.
- [3] 罗云鹏,章放香,张竞超,等.异氟醚预处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马含 GluR1 亚基 AMPA 受体表达的影响. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(3): 300-304.
- [4] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*, 1996, 27(9): 1616-1622.
- [5] Wang N, Lu Y, Wang K, et al. Simvastatin attenuates neurogenetic damage and improves neurocognitive deficits induced by isoflurane in neonatal rats. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(2): 618-632.
- [6] Shirvani-Farsani Z, Behmanesh M, Mohammadi SM, et al. Vitamin D levels in multiple sclerosis patients: association with TGF- β_2 , TGF- β_{RI} , and TGF- β_{RII} expression. *Life Sci*, 2015, 134: 63-67.
- [7] Endo F, Komine O, Fujimori-Tonou N, et al. Astrocyte-derived TGF- β_1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell Rep*, 2015, 11(4): 592-604.
- [8] Conway SJ, Kaartinen V. TGF β superfamily signaling in the neural crest lineage. *Cell Adh Migr*, 2011, 5(3): 232-236.
- [9] Chen L, Yang T, Lu DW, et al. Central role of dysregulation of TGF- β /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 670-681.
- [10] Tang M, Bian W, Cheng L, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits keloid fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen synthesis in vitro via the TGF- β /Smad and ERK signaling pathways. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1487-1499.
- [11] Wang Q, Yin J, Wang S, et al. Effects of activin A and its downstream ERK1/2 in oxygen and glucose deprivation after isoflurane-induced preconditioning. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 535-543.
- [12] Yuan M, Ge M, Yin J, et al. Isoflurane post-conditioning down-regulates expression of aquaporin 4 in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury and is possibly related to bone morphogenetic protein 4/Smad1/5/8 signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 429-438.

(收稿日期:2019-08-02)