



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R743

U D C 616.8

密 级 公开

博士学位论文

UPS/SUMO 系统参与异氟烷预处理
诱导神经保护作用的机制研究

 仝 黎

培 养 类 别	<u> 全日制 </u>
学 位 类 型	<u> 学术学位 </u>
一级学科(专业类)	<u> 临床医学 </u>
二级学科(专业)	<u> 麻醉学 </u>
研 究 方 向	<u> 脑保护 </u>
指 导 教 师	<u> 熊利泽教授(主任医师) </u>
培 养 单 位	<u> 西京医院麻醉科 </u>

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	- 1 -
中文摘要	- 4 -
ABSTRACT	- 9 -
前 言	- 15 -
文献回顾	- 16 -
1 中枢神经系统缺血损伤的机制研究现状	- 16 -
2 吸入性麻醉剂预处理诱导中枢缺血耐受的研究进展	- 20 -
3 UPS/SUMO 途径在神经系统生理及病理条件下的作用机制	- 24 -
4 SUMO 途径与缺血性脑损伤的关系研究	- 28 -
正 文	- 36 -
实验一 异氟烷预处理对细胞氧糖剥夺损伤具有神经保护作用	- 36 -
1 材料	- 36 -
2 方法	- 38 -
3 结果	- 41 -
4 讨论	- 44 -
实验二 异氟烷预处理对大鼠局灶性脑缺血损伤具有脑保护作用	- 46 -
1 材料	- 46 -
2 方法	- 47 -
3 结果	- 49 -
4 讨论	- 51 -
实验三 异氟烷预处理通过逆转结合型泛素蛋白聚集诱导脑缺血耐受	- 53 -
1 材料	- 53 -
2 方法	- 53 -

3 结果	- 55 -
4 讨论	- 57 -
实验四 SUMO 系统介导参与异氟烷预处理诱导的神经保护作用	- 59 -
1 材料	- 59 -
2 方法	- 60 -
3 结果	- 62 -
4 讨论	- 71 -
实验五 下调 UBC9 表达可以逆转异氟烷预处理的神经保护作用	- 73 -
1 材料	- 73 -
2 方法	- 74 -
3 结果	- 79 -
4 讨论	- 85 -
小 结	- 86 -
参考文献	- 87 -
个人简历和研究成果	- 103 -
致 谢	- 106 -

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
3-MA	3-methyladenine	3-甲基腺嘌呤
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine	8-羟基脱氧鸟苷
AD	Alzheimer's disease	阿尔茨海默病
AMPA	aminomethyl phosphonic acid	氨甲基磷酸
APP	amyloid precursor protein	淀粉样前体蛋白
A β	amyloid beta protein	β -淀粉样蛋白
CaMKII	calcium/calmodulin-dependent kinase II	钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II
CBR	cannabinoid receptors	大麻素受体
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease	纹状体脊髓变性病
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	无血清细胞冻存培养基
DRP	dynammin-related protein	动力相关蛋白
DUBs	deubiquitinating enzymes	去泛素化酶
EAAT	excitatory amino acid transporter	星型胶质细胞谷氨酸转运体
ER	estrogen receptor	雌激素受体
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases	细胞外信号调节激酶
GLUTs	glucose transporters	葡萄糖转运体
GPCRs	G-protein coupled receptors	G 蛋白偶联受体
GSH-Px	glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 β	糖原合成酶激酶

HD	Huntington's disease	亨丁顿舞蹈病
HDACs	histone deacetylases	组蛋白去乙酰化酶
HIF	hypoxia inducible factor	低氧因子
HIPK	homeodomain-interacting protein kinase	同源结域相互作用蛋白激酶
HNE	4-hydroxy-trans-2-nonenal	羟基壬烯醛
HSF	heat shock factor	热休克因子
IL-1	interleukin-1	白介素 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-JunN 端蛋白激酶
K2P	two-pore-domain potassium channel	双孔钾离子通道
KARs	kainate receptors	氨酸受体
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
LTP	long-term potentiation	长时程抑制
MAPK	mitogen activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MDA	malondialdehyde	丙二醛
mGluRs	metabotropic glutamate receptors	代谢型谷氨酸受体
MLK	mixed lineage kinase	混合性谱系激酶
NFκB	nuclear factor kappa B	核转录因子
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-甲基-D-天冬氨酸
NO	nitric oxide	一氧化氮
PD	parkinson disease	帕金森病
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	磷酸肌醇 3-激酶
PIAS	protein inhibitor of activated STAT	激活 STAT1 的 SUMO E3 连接酶蛋白抑制剂

PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
NOS	nitric oxide synthase type	一氧化氮合酶
PSD	postsynaptic density	突触后致密物
RanBP2	Ran binding protein-2	Ran 结合蛋白
ROS	reactive oxygen species	活性氧族
SENPs	septrin-specific proteases	SUMO 特异性蛋白酶
STAT	signal transducer and activator of transcription	信号转导和转录激活因子
SUMO	small ubiquitin-like modifier	小泛素相关修饰物
tFCI	transient focal cerebral ischemia	短暂性脑缺血损伤
UBE1L	ub-activating enzyme E1-like protein	泛素激活 E1 类似蛋白质
UFM	ubiquitin-fold modifier	泛素折叠蛋白
ULMs	ubiquitin-like protein modifiers	泛素相关蛋白修饰物
UPS	ubiquitin/proteasome system	泛素蛋白酶体系统

UPS/SUMO 系统参与异氟烷预处理 诱导神经保护作用的机制研究

博士研究生： 仝 黎

导 师： 熊利泽 教授

辅 导 老 师： 董海龙 教授

Xia Zhang 教授

第四军医大学西京医院麻醉科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（30972853）

中文摘要

近年来，针对包括围术期脑损伤在内的脑缺血损伤的研究已成为神经科学领域的研究重点，如何防治脑缺血损伤也成为科学界急需解决的重大医学问题，因此充分调动神经系统的内源性保护机制，进一步探索理想有效的神经保护措施显得尤为关键。我们课题组早在前期研究中发现，在缺血损伤前给予吸入性麻醉药例如异氟烷、七氟烷等，可减小脑梗死面积诱导缺血耐受，从而发挥神经保护作用。然而，异氟烷预处理神经保护效应的作用机制尚未明确，蛋白质的合成、翻译及修饰作为细胞生存及功能实现的重要途径，是否介导脑缺血损伤及异氟烷预处理过程呢？

泛素-蛋白酶体系统（UPS）与其衍生的 SUMO 系统，分别介导泛素化和 SUMO 化这两个重要的蛋白调控途径，与细胞命运密切相关。研究发现异常泛素化蛋白聚集与神经细胞损害密切相关，然而 SUMO 蛋白并不促使蛋白质降解，而是加强蛋白稳定性。有研究者对冬眠动物的研究中发现，损伤或应激状态下神经元内结合型 SUMO 蛋白的增加可能对提高细胞对缺血缺氧等损伤的耐受具有重要意义。那么我们进一步思考，作为细胞调节中的两个重要系统 UPS 和 SUMO，二者在脑缺血损伤

及预处理神经保护效应中是如何发挥作用并相互调节的？

本课题旨在揭示 UPS/SUMO 系统参与脑缺血损伤及神经保护效应的机制，将有助于提高我们对脑缺血损伤的认识，并为未来寻找基于 UPS/SUMO 系统的新的药物或干预措施应用于临床神经保护奠定基础。

实验一 异氟烷预处理对神经细胞

氧糖剥夺损伤具有保护作用

目的：研究异氟烷预处理对培养的一类神经元细胞缺氧损伤的神经保护效应。

方法：采用 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞系经过视黄酸刺激后，诱导分化成为类神经元细胞，通过检测神经元标志物 NeuN 和 β III-Tublin 的表达变化，确定诱导分化成类神经元细胞的时间。进一步观察异氟烷预处理对氧糖剥夺（Oxygen-glucose deprivation, OGD）损伤细胞的神经保护作用。细胞分为 4 组：Sham 组、Iso 组（单纯吸烷组）、OGD 组（氧糖剥夺组）、IsoPC 组（异氟烷预处理组）。Iso 组和 IsoPC 组均给予 2% 异氟烷单次吸入 2 h，OGD 组和 IsoPC 组均进行氧糖剥夺损伤 4 h，并且在异氟烷预处理 24 h 后进行。分别在复氧后 24 h 后进行 MTT 比色法、流式细胞仪以及检测 caspase-3 含量以判断各组细胞活性和细胞凋亡，证实异氟烷预处理对细胞氧糖剥夺损伤的保护作用。

结果：加入视黄酸刺激诱导分化 7 天后的 SH-SY5Y 神经标志物表达最强，因此在后续实验中选择诱导分化 7 天的细胞进行检测。缺氧损伤后 24 h，细胞凋亡率增加，细胞活性降低，给予单次异氟烷预处理可以增加细胞存活率，减少细胞凋亡。

结论：视黄酸刺激可以诱导 SH-SY5Y 细胞分化成类神经元细胞；单次异氟烷预处理对氧糖剥夺损伤模型的细胞具有神经保护作用。

实验二 异氟烷预处理对大鼠局灶性脑缺血

损伤具有脑保护作用

目的：研究异氟烷预处理诱导的大鼠缺血耐受效应。

方法：SD 大鼠随机分为 4 组：Sham 组（空白对照组）、Iso 组（单纯吸烷组）、

MCAO 组（缺血损伤组）、IsoPC 组（异氟烷预处理组）。Iso 组和 IsoPC 组连续 5 天每天吸入 2%异氟烷 1 h；MCAO 组和 IsoPC 组进行大脑中动脉阻闭模型（Middle cerebral artery occlusion, MCAO），缺血时间为 120 min，缺血模型在异氟烷预处理后 24 h 进行。缺血再灌注后不同时间点 24 h、48 h、72 h、7 d 分别进行神经功能学评分（Neurological behavioral score, NBS）以及 TTC 染色评估脑梗死容积百分比，证实异氟烷预处理对大鼠局灶性脑缺血损伤模型的神经保护作用。

结果：在局灶性脑缺血损伤后 24 h，大鼠神经功能学评分相比 Sham 组降低，脑梗死容积明显，随着再灌注时间延长，脑梗死容积逐渐缩小。给予异氟烷预处理可以明显减小脑梗死容积百分比，提高神经功能学评分，减轻大脑中动脉阻塞模型对脑组织的损伤作用。说明异氟烷预处理对于局灶性脑缺血损伤具有脑保护作用。

结论：异氟烷预处理对局灶性脑缺血损伤具有短期神经保护效应。

实验三 异氟烷预处理通过抑制结合型泛素 蛋白聚集诱导脑缺血耐受

目的：研究泛素系统在脑缺血损伤和异氟烷预处理中的作用。

方法：SD 大鼠随机分为 5 组：Sham 组（空白对照组）、MCAO 24 h 组（缺血损伤后 24 h 组）、IsoPC 24 h 组（预处理保护 24 h 组）、MCAO 72 h 组（缺血损伤后 72 h 组）、IsoPC 72 h 组（预处理保护 72 h 组）（每组 8 只）。除了 Sham 组以外，其它 4 组均进行 MCAO 模型，IsoPC 24 h 组和 IsoPC 72 h 组在 MCAO 模型前 24 h 给予连续 5 天 2%异氟烷吸入每天 1 h。分别在损伤后 24 h 和 72 h 进行取材，分别进行 Ubiquitin 蛋白 Western blot 和免荧组化染色，了解泛素蛋白系统在脑缺血损伤及异氟烷预处理后不同时相的变化趋势和分布特点。

结果：免疫荧光结果显示局灶性脑缺血损伤后 24 h 即可观察到异常泛素蛋白的聚集，并且在损伤后 72 h 均维持在高表达，异氟烷预处理可以明显减少泛素蛋白的表达。Western blot 结果也显示，损伤后结合型泛素蛋白表达增加，游离型泛素蛋白减少，异氟烷预处理可以完全逆转泛素蛋白的表达，从而发挥神经保护作用。

结论：异氟烷预处理抑制缺血后结合型泛素蛋白的聚集，发挥脑保护作用。

实验四 异氟烷预处理通过改变 SUMO 系统

蛋白表达诱导神经保护作用

目的：研究异氟烷预处理对 SUMO 系统蛋白和 Ubc9 蛋白表达的影响。

方法：实验分为离体实验和在体实验。离体实验中，采用诱导分化成功的 SH-SY5Y 细胞系进行实验，细胞共分为 4 组：Sham 组、Iso 组、OGD 组、IsoPC 组，在复氧后 24h 进行免疫荧光染色和 Western blot 检测，观察 SUMO-1、SUMO-2/3、Ubc9 蛋白的细胞分布特点及表达变化。在体实验中，将第四军医大学实验动物中心的 SD 大鼠随机分为 6 组：Sham 组、Iso 组、MCAO 4 h 组、IsoPC 4h 组、MCAO 24 h 组、IsoPC 24 h 组(每组 8 只)。在再灌注后 4 h 和 24 h 分别进行免疫荧光染色和 Western blot 检测，观察 SUMO 系统和 Ubc9 蛋白在脑组织中的表达及蛋白含量变化。明确 SUMO 系统以及 SUMO 连接酶 Ubc9 参与缺血损伤和神经保护作用的机制。

结果：离体实验中，在 OGD 损伤后 24 h，结合型 SUMO-1 表达减少，游离型 SUMO-1 表达增加，异氟烷预处理可以上调结合型 SUMO-1 蛋白表达，抑制游离型 SUMO-1 水平；然而结合型 SUMO-2/3 在损伤后表达升高，异氟烷预处理可减少 SUMO-2/3 表达；复氧 4 h 和 24 h 后 Ubc9 的表达均明显减少，且在 4 h 达到最低，异氟烷预处理可以增加 Ubc9 的表达，但是在损伤后 24 h 影响不明显，无统计学意义。在体实验中 SUMO-1 的表达减少，在 24 h 基本恢复到正常水平，异氟烷预处理可以逆转缺血对 SUMO-1 表达的抑制作用；缺血损伤可以增加结合型 SUMO-2/3 蛋白的聚集，但是异氟烷预处理对结合型 SUMO-2/3 的表达没有影响；Ubc9 在缺血后表达下调，异氟烷预处理可以增加 Ubc9 的表达。说明 SUMO 系统参与缺血损伤及异氟烷预处理作用。

结论：异氟烷预处理通过调节 SUMO 蛋白和 Ubc9 蛋白的表达调控神经保护作用。

实验五 调控 Ubc9 对异氟烷预处理的神经保护作用影响研究

目的：研究调控 SUMO 化的 E2 酶 Ubc9 蛋白异氟烷预处理诱导神经保护效应的影响。

方法：实验分为离体实验和在体实验两部分。离体实验中，采用慢病毒转染的

方法构建稳定过表达 Ubc9 的 SH-SY5Y 细胞系，用 siRNA 下调细胞 Ubc9 的表达，之后再进行异氟烷预处理和 OGD 模型。实验分为 8 组：Sham 组、Iso 组、OGD 组、IsoPC 组、Lenti+OGD 组（过表达慢病毒+氧糖剥夺损伤组）、Lenti+IsoPC 组（过表达慢病毒组+异氟烷预处理组）、siRNA+OGD 组（小干扰 RNA+氧糖剥夺损伤组）、siRNA+IsoPC 组（小干扰 RNA+异氟烷预处理组）。复氧后 24 h 通过 MTT 比色法和检测 caspase-3 的含量观察类神经元在氧糖剥夺损伤后和异氟烷预处理后细胞活性和细胞凋亡程度。在体实验中，给予大鼠侧脑室微注射 siRNA，下调大鼠脑组织中 Ubc9 的表达，随后进行异氟烷预处理和大脑中动脉阻闭模型。实验分为 6 组：Sham 组、Iso 组、MCAO 组、IsoPC 组、siRNA+MCAO 组、siRNA+IsoPC 组（每组 8 只）。在再灌注损伤后 24 h 评估神经功能学评分和观察脑梗死容积百分比，证实 SUMO 连接酶 Ubc9 在异氟烷预处理诱导缺血耐受中的作用机制。

结果：慢病毒过表达载体可以增加细胞 Ubc9 和 SUMO-1 的表达，siRNA 可以抑制 Ubc9 和 SUMO-1 的蛋白水平，但是二者对 SUMO-2/3 的表达均没有影响。上调 Ubc9 的表达可以模拟神经保护作用；下调 Ubc9 蛋白可以增加细胞对氧糖剥夺损伤的敏感性，并且逆转异氟烷预处理的神经保护作用。给予大鼠侧脑室微注射 siRNA-Ubc9 可以下调大鼠脑组织 Ubc9 的表达，使大鼠脑梗死容积增加，神经功能学评分降低，说明 Ubc9 表达的抑制可以减弱异氟烷预处理的脑保护作用。

结论：上调 Ubc9 可以模拟神经保护作用，下调 Ubc9 可逆转异氟烷预处理的神经保护效应。

关键词：异氟烷预处理，脑缺血，脑保护，泛素，SUMO

UPS/SUMO system mediates the neuroprotection induced by isoflurane preconditioning

Candidate for Ph.D: Tong Li

Supervisor: Xiong Lize

Tutor: Dong Hailong

Zhang Xia

Department of Anesthesiology, Xijing Hospital,

Fourth Military Medical University

Xi'an 710032, China

Sponsored Program: National Natural Science Foundation of China (Grant 20972853)

Abstract

In recent years, perioperative stroke has become one of the most serious complications of cardio-cerebral surgery, since it causes severe disability and high mortality. There is an urgent need for developing feasible and effective approach to prevent ischemic/ reperfusion insults during the perioperative period. In previous study, our research group has found the volatile anesthetics including isoflurane and sevoflurane could induce the ischemic tolerance against ischemic and reperfusion injury. However, the mechanism of isoflurane preconditioning has not been fully understood yet.

Ubiquitinating proteasome system (UPS) and small ubiquitin-related modifier (SUMO) system were found to play a crucial role in protein ubiquitination and sumoylation. Previous studies demonstrated that accumulation of ubiquitinated protein promoted intracellular protein degradation, but conjugated-sumo proteins were essential for maintaining protein stability and integrity. A previous study reported that cellular SUMO protein modification was massive increased in the ground squirrel during hibernation torpor, which demonstrated

that sumoylation process might be involved in the neuroprotective effect against ischemic injury. We speculate that UPS and SUMO pathway mediates the neuroprotection induced by isoflurane preconditioning.

Therefore, the current study is to further investigate the role of UPS/SUMO protein regulation in the isoflurane preconditioning neuroprotection, hopefully to provide a new theoretical basis and research direction for the development of new drug and approaches.

Experiment 1

Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against oxygen-glucose deprivation injury in SH-SY5Y cells

Objectives: To study the neuroprotective effect of single isoflurane preconditioning.

Methods: All-trans-retinoic acid (RA) stimulated the human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) to differentiate into neuron-like cells. The expression of neuron marker NeuN and β III-Tublin were evaluated by Western blot and immunofluorescence staining. And then the differentiated neuron-like cells were used in the subsequent experiments. The cells were divided into four groups: Sham group, Iso group (single isoflurane inhale), OGD group (oxygen-glucose deprivation model), IsoPC group (isoflurane preconditioning protection). The cells in Iso group and IsoPC group were exposed to 2% isoflurane for 2 hrs, and the cells in OGD group and IsoPC group were challenged by oxygen-glucose deprivation for 4 hrs at 24 hrs after isoflurane preconditioning. The cell in the sham group was cultured without any treatment. Cell viabilities were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and cell apoptosis was measured by flow cytometry and caspase-3 expression at 24 hrs after reoxygenation.

Results: Expression of neuronal protein marker were measured in RA-stimulated SH-SY5Y cells at different times, and the expression of NeuN and β III-Tublin was highest at 7 days after stimulation. Therefore, RA-stimulated cells for 7 days were used in the following experiments. Oxygen-glucose model reduced the cell viabilities and increased the cell apoptosis of neuron-like cells. Preconditioning of isoflurane could elevate the cell

survival rate.

Conclusion: RA stimulated the human neuroblastoma cells to differentiate into neuron-like cells. Isoflurane preconditioning attenuated the injury induced by oxygen-glucose deprivation.

Experiment 2

Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against cerebral ischemic-reperfusion injury on rats

Objectives: To study the neuroprotection by isoflurane preconditioning against ischemic-reperfusion injury.

Methods: The SD rats were randomly divided into 4 groups: Sham group, Iso group (isoflurane inhale without MCAO model), MCAO group (ischemic-reperfusion damage group), IsoPC group (isoflurane preconditioning plus MCAO model). The rats in Iso group and IsoPC group were inhaled with 2% isoflurane 1 h for 5 days; the rats in MCAO group and IsoPC group were received middle cerebral artery occlusion model (MCAO) for 120 min at 24 hrs after isoflurane preconditioning. The neurological behavior scores and infarct volume were evaluated at 24, 48, 72 hrs and 7 days after reperfusion injury.

Results: The neurological deficits and infarct volume were worse after ischemic-reperfusion damage, and isoflurane preconditioning significantly improved the neurological behavioral scores and reduced the infarct volume at 24, 48, 72 hrs and 7 days after MCAO.

Conclusions: Isoflurane induced short-term neuroprotection against ischemic-reperfusion injury.

Experiment 3

Isoflurane preconditioning induces ischemic tolerance via attenuating conjugated-ubiquitin protein aggregation

Objectives: To study the role of UPS system in the process of isoflurane preconditioning and ischemic-reperfusion damage.

Methods: The SD rats were randomly divided into 5 groups: Sham group, MCAO 24h group, IsoPC 24h group, MCAO 72h group, IsoPC 72h group (n=8). All animals were subjected to ischemic injury except Sham group. Preconditioned animals were exposed to 2% 1h-isoflurane preconditioning for 5 days at 24 hrs before MCAO model. The expression of conjugated-ubiquitin and free-ubiquitin protein were measured at 24 and 72 hrs after reperfusion by Western blot and immunohistochemistry staining respectively.

Results: Ischemic injury increased the accumulation of conjugated-ubiquitin protein and isoflurane preconditioning inhibited the ubiquitination protein. The activities of conjugated ubiquitin immunohistochemistry staining in the IsoPC group was significantly lower than MCAO group.

Conclusions: Attenuation of conjugated-ubiquitin protein aggregation may be involved in the neuroprotective induced by isoflurane preconditioning in cerebral ischemic-reperfusion injury model.

Experiment 4

SUMO system is involved in the neuroprotection induced by isoflurane preconditioning

Objectives: To study the role of SUMO system in the ischemic tolerance induced by isoflurane preconditioning.

Methods: *In vitro*, the neuron-like cells were divided into 4 groups: Sham group, Iso group, OGD group and IsoPC group. The levels of SUMO-1, SUMO-2/3 and Ubc9 protein expression were assessed by Western blot and immunofluorescence staining at 24

hrs after reoxygenation. *In vivo*, the SD rats were randomly divided into 6 groups: Sham group, Iso group, MCAO 4h group, IsoPC 4h group, MCAO 24h group, IsoPC 24h group (n=8). The expression of SUMO system and Ubc9 protein were measured by Western blot and immunofluorescence staining at 4 hrs and 24 hrs after reperfusion injury.

Results: *In vitro*, the level conjugated-SUMO1 protein was decreased and the expression of free-SUMO protein was decreased after oxygen-glucose deprivation, and isoflurane preconditioning could elevate conjugated-SUMO1 expression and inhibit free-SUMO1 protein. Isoflurane preconditioning could attenuate the increase of conjugated-SUMO2/3 protein induced by hypoxia injury. The expression of Ubc9 was decreased at 4 hrs and 24 hrs after reoxygenation, isoflurane preconditioning could reverse this decrease at 4 hrs after OGD. *In vivo*, the expression of conjugated-SUMO1 was decrease and the conjugated-SUMO2/3 was increased after ischemic-reperfusion damage. Isoflurane preconditioning could elevate the conjugated-SUMO1 protein expression but had no effect on SUMO2/3 protein level. The expression of Ubc9 protein was higher in IsoPC group than MCAO group.

Conclusions: Isoflurane preconditioning induced ischemic tolerance by regulation of SUMO system and Ubc9 protein.

Experiment 5

Down-regulation of Ubc9 attenuated the neuroprotective effect of isoflurane preconditioning against ischemic-reperfusion injury

Objectives: To study the regulative mechanism of Ubc9 in the process of ischemic damage and isoflurane preconditioning.

Methods: *In vitro*, the differentiated SH-SY5Y cells were divided into 8 groups: Sham group, Iso group, OGD group, IsoPC group, Lenti+OGD group (Lentivirus-Ubc9 + oxygen-glucose deprivation model), Lenti+IsoPC group (Lentivirus-Ubc9 + isoflurane preconditioning group), siRNA+OGD group (siRNA-Ubc9 + oxygen-glucose deprivation model), siRNA+IsoPC group (siRNA-Ubc9+isoflurane preconditioning group). The

viabilities and apoptosis of cells were measured by MTT assay and caspase-3 expression at 24 hrs after reoxygenation. *In vivo*, siRNA-Ubc9 was intracerebroventricular microinjected at 24 hrs before MCAO model. The SD rats were divided into 6 groups: Sham group, Iso group, MCAO group, IsoPC group, siRNA+MCAO group (siRNA-Ubc9 + MCAO model group), siRNA+IsoPC group (siRNA-Ubc9+isoflurane preconditioning group) (n=8). The neurological deficits and infarct volume were assessed at 24 hrs after reperfusion injury.

Results: *In vitro*, Ubc9 lentivirus-transfected cells showed the increase of SUMO-1 and Ubc9 protein expression. The expressions of SUMO-1 and Ubc9 protein were decreased in siRNA-Ubc9 transfected cells. Up-regulation of Ubc9 has the similar neuroprotective effect, inhibition of Ubc9 protein could attenuate the neuroprotection of isoflurane preconditioning. *In vivo*, intracerebroventricular microinjection of siRNA-Ubc9 could inhibit the expression of Ubc9 protein level. The neurological behavioral score and infarct volume were worse in siRNA+IsoPC group than IsoPC group.

Conclusions: Over-expression of Ubc9 alleviated the ischemic-reperfusion injury, but knockdown of Ubc9 protein markedly attenuated the neuroprotection of isoflurane preconditioning.

Key words: Isoflurane preconditioning, neuroprotection, cerebral ischemia, ubiquitin, SUMO

前 言

近些年来，如何防治包括围术期损伤在内的脑缺血损伤的研究已经成为神经科学领域亟待解决的重大科学问题。在早期研究中我们课题组及其他研究者已经发现吸入性麻醉药等非缺血预处理等措施能够诱导脑和脊髓缺血耐受^[1,2]，对其神经保护机制研究发现吸入性麻醉药等预处理可以通过激活体内的内源性保护通路，调节细胞内信号转导和蛋白质调控发挥缺血耐受的作用^[3,4]。随着对神经系统缺血缺氧损伤保护机制的深入研究，有关缺血再灌注损伤的产生机制也存在各种各样的学术争论^[5]。除了传统认为的能量耗竭、细胞生存信号转导通路失调之外，是否还有更为重要的机制发挥着决定性作用？作为细胞生存及功能实现的主要途径，蛋白质在合成、翻译、修饰之外，是否有其他途径介导脑缺血损伤？

Avram Hershko 等科学家对于泛素-蛋白酶体系统（Ubiquitin-proteasome system, UPS）的发现获得了 2004 年诺贝尔化学奖^[6]，UPS 系统作为二十世纪末最为重要的生物学发现之一，开创了蛋白细胞内调控的新纪元。研究发现异常泛素化蛋白聚集与神经细胞损害密切相关^[7-9]，在对 UPS 系统研究的基础上发现泛素类蛋白家族的重要成员之一小泛素相关修饰物（small ubiquitin-like modifier, SUMO）^[10]，SUMO 化修饰并不促使蛋白质降解，而是与泛素化蛋白的功能相反，加强蛋白质功能的稳定性^[11, 12]。对冬眠动物以及脑缺血损伤的动物模型研究显示，损伤或应激状态下神经元内 SUMO 与蛋白结合的增加可能对提高细胞对缺血缺氧等损伤的耐受具有重要意义^[13, 14]。我们开始思考，作为细胞调节中的两个重要系统 UPS 和 SUMO，二者如何在脑缺血损伤中发挥作用并相互调节？UPS/SUMO 系统蛋白相互作用的特异性调控可否减轻脑缺血再灌注损伤，成为防治措施的新靶点？

我们推测 UPS 及 SUMO 系统功能的变化和相互调节可能是脑缺血损伤和异氟烷预处理保护效应形成过程中的重要条件。系统阐明 UPS/SUMO 系统参与脑缺血损伤及预处理保护作用的机制，将有助于提高我们对脑缺血损伤及中枢神经保护作用的认识，并为未来寻找基于 UPS/SUMO 系统的新药物或干预措施应用于临床保护奠定基础。我们将从离体和在体两方面，利用分子生物学和病毒转染等技术证实 UPS 和 SUMO 系统在异氟烷预处理诱导神经保护作用中的机制研究。

文献回顾

据美国心脏协会（AHA）的统计^[15]，从 2001 年到 2011 年脑卒中发病的死亡率虽然已经减少了 35.1%，但是在美国每年还是有约 80 万人口发生脑卒中，其中有约 76% 的患者是首次发病，其它为复发性脑梗死。然而中国的发病人口更多，接近 200 万。据 2011 年数据统计，在美国每 40 秒就有一人发生脑卒中，每 4 分钟就有人因为脑卒中去世。脑卒中已经成为神经系统最主要的疾病之一，也成为世界上主要的经济负担^[16]。预计到 2030 年，有约 340 万的成年人会出现脑卒中，与 2012 年相比发病率增长 20.5%。随着人口老龄化现象的出现，脑卒中疾病更值得重视。随着对脑缺血损伤的深入研究，我们致立于寻找一种可以在临床上广泛使用的措施或药物进行缺血前干预，模拟缺血预处理效应，从而发挥中枢神经保护作用。

1 中枢神经系统缺血损伤机制研究现状

根据 WHO 数据统计，脑卒中是世界死亡率最高的第二大死因，其致残率仅排在心脏病和癌症之后，其中 87% 的患者都是由于血管堵塞而引起缺血性脑卒中。如果是在婴幼儿期出现脑缺血则会引起永久脑损伤，导致认知功能和运动功能障碍^[17]。缺血缺氧损伤范围主要取决于脑损伤的严重性以及损伤的持续时间，在缺血脑卒中的发病机制中，会出现明显的脑血流下降出现氧糖剥夺现象导致神经元损伤，关于中枢神经系统缺血损伤和功能障碍的机制学说较多，一直以来也是医学界研究的难点及热点。

1.1 氧化应激反应和抗氧化酶

在脑缺血再灌注损伤期间，氧自由基大量产生，多功能酶体系统失活，消耗大量抗氧化物，这些病理反应都会引起正常抗氧化防御能力的破坏^[18]。氧化应激程度可以通过检测大分子量的氧化产物进行评估，包括核酸，脂质和蛋白质。8-羟基脱氧鸟苷（8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG）是一种脱氧鸟苷的氧化产物，它广泛用

于检测氧化 DNA 损伤的生物学标志物。一氧化氮 (NO) 和 $O_2^{\cdot-}$ 在脑缺血再灌注损伤后大量产生, NO 诱导蛋白质亚硝基化生成 $ONOO^-$ 。SOD 可以通过过氧化氢酶 (catalase) 或谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 解毒 $O_2^{\cdot-}$ 转变为 H_2O_2 。来自于 H_2O_2 的 $\cdot OH$ 可引起脂质、蛋白质、DNA 和 RNA 的过氧化作用, 导致细胞损伤出现死亡 (见图 1)。

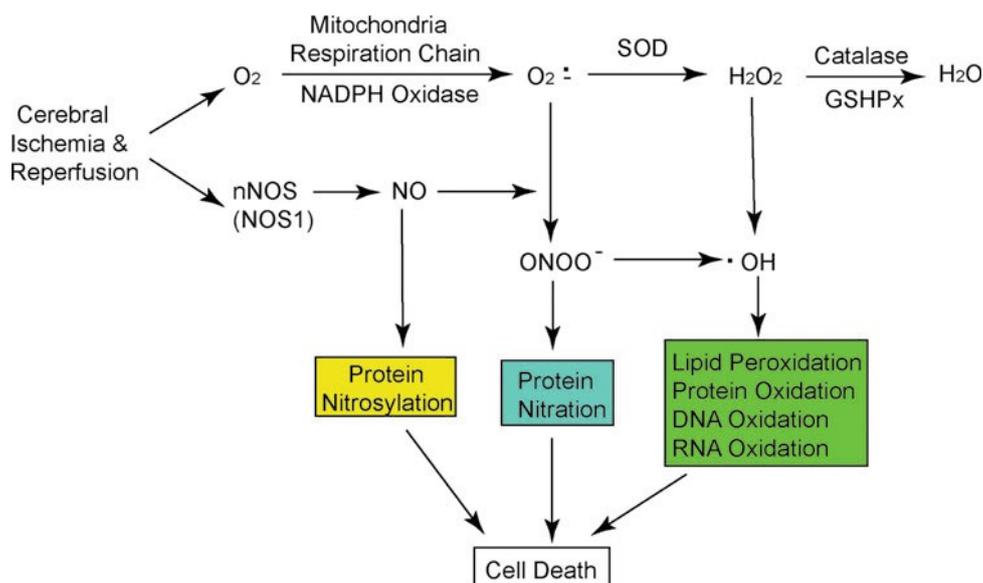


图 1 缺血后氧自由基产生导致细胞死亡机制图^[20]

在短暂性脑缺血损伤 (transient focal cerebral ischemia, tFCI) 后, 8-OHdG 含量在再灌注早期 3-6 h 开始增加, 并且在损伤后 24 h 其水平含量依然维持高表达^[19]。脂质过氧化反应在缺血损伤后进行重构, 胞膜流动性的改变可引起细胞膜通透性增加, 抑制胞膜上 ATP 酶的活性, 最终导致细胞死亡。不饱和脂肪酸在脂质过氧化后结构不稳定, 可分解形成一系列的复合物包括丙二醛 (malondialdehyde, MDA), 羟基壬烯醛 (4-Hydroxy-trans-2-nonenal, HNE), 有研究显示脑缺血损伤后在缺血半暗带 MDA 和 HNE 含量明显增加^[19, 20]。

1.2 自噬

脑缺血引起脑梗死区大量神经元死亡, 脑血流的下降诱发一系列生理病理反应出现, 导致细胞膜上蛋白质大量降解, 形成血栓诱导脑组织损伤^[21, 22]。有研究显示

急性缺血性脑卒中患者在脑组织发生缺血损伤后每小时约有 1200 万神经元死亡^[21]，其中坏死和凋亡通路是诱导脑缺血再灌注损伤的主要机制^[23]。细胞坏死及凋亡在形态学和分子生物学水平不同，取决于胞内 ATP 水平的变化。细胞坏死发生在应激状态和极度能量缺失条件下产生，缺血导致神经元细胞坏死主要发生在脑梗死核心区^[24]，当胞膜完整性受到破坏则导致大量炎性因子释放导致周围脑组织损伤。最新研究显示，缺血损伤后出现线粒体功能障碍，ROS 产生增多，ATP 缺失，钙蛋白酶和组织蛋白酶介导蛋白质水解均是调控组织坏死及发展过程的主要因素。

细胞凋亡的主要机制是在充足 ATP 保证下，维持离子通道功能和细胞完整性^[27]。因此，凋亡并不伴有炎性反应的发生及周边组织损伤^[28]。在缺血损伤后，神经元凋亡主要发生在缺血半暗带^[29]。

有研究分别报道了在短暂性脑缺血^[30]和前脑缺血^[31, 32]后自噬蛋白的表达。前脑缺血引起的神经元自噬主要发生在大脑皮层、海马和纹状体。缺血损伤后自噬通路生物学标志物 Beclin 1 表达上调并激活 Caspase-3^[27]，说明凋亡通路和自噬通路被激活后可引起神经元一系列反应。重要的是，在海马 CA1 和 CA2 区，表达 Beclin 1 和坏死标志物（popidium iodide, PI）的阳性细胞明显增加激活凋亡通路^[33]，导致神经元死亡。围术期窒息的大鼠模型可出现更为严重的自噬和凋亡特征^[34]。这些研究也证实自噬-凋亡的发生与缺血损伤的脑组织区域密切相关。

脑缺血与自噬的关系主要表现为神经轴突降解，Adhami 等研究者在缺血缺氧损伤后 24h 观察到皮层神经元轴突快速出现大量降解^[32]，其中 AMPK 介导自噬可能导致损伤加重及脑梗死面积增加^[35, 36]。与野生型小鼠相比，Atg7 基因（Atg7^{flax/fox}, nestin-Cre）缺失的转基因小鼠在缺血损伤后一周海马锥体神经元损伤减轻，并且缺血损伤区功能有所改善^[37]，用药理学方法抑制自噬过程可以逆转前脑缺血引起的神经元损伤^[38]。此外，Wen^[31]等人研究发现侧脑室注射一种 Vps34 蛋白激酶抑制剂 3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine, 3-MA）可减轻 MCAO 损伤后脑梗死容积及神经元坏死，诱导神经保护作用。此外，胶质细胞源性神经营养因子（lithium and glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF）均证实有较强的抗自噬和抗凋亡作用^[39, 40]。

自噬在缺血诱导的内源性神经保护机制中扮演重要角色。血清剥夺模型的海马 HT22 细胞系给予蛋白酶抑制剂 3-MA 和自噬溶酶体抑制剂洛霉素 A1 可以增强活化 caspase-3 蛋白表达水平以及增加细胞死亡率^[41]。心肌缺血损伤的大鼠注射自噬诱导

剂雷帕霉素 (rapamycin) 可以引起大鼠皮层和海马 Beclin 1 表达增加, 减轻神经元死亡和脑组织损伤^[42], 其机制可能是通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路以及转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 磷酸化^[43]介导产生。永久性脑缺血损伤的大鼠在注射丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 GSK-3 β 抑制剂 SB216763 可以减轻神经炎症反应激活自噬反应, 改善大鼠神经功能^[44]。

1.3 钙超载

在正常生理条件下, 胞内钙离子维持在较低浓度。缺血损伤后, 由于酶体系统例如钙蛋白酶过度激活使胞内钙离子超载, 导致蛋白质、脂质和核酸的崩解, 使神经元死亡^[45, 46]。钙离子也可以激活脂酶增加氧自由基生成, 使氧化亚氮合酶 (Nitric oxide synthase, NOS) 激活增加 NO 过度合成导致神经元死亡^[48]。

除了谷氨酸受体诱导引起钙离子超载, 其它通道也可以在兴奋性毒性损伤条件下介导钙离子内流, 例如 TRPM 通道 (transient receptor potential melastatin) 的激活也参与氧化应激反应^[49, 50]。缺血损伤反应的另一个关键因素就是当大脑氧供减少导致酸平衡被破坏, 钙离子内流增加, 致使乳酸盐堆积和糖酵解增加, 最终组织 pH 值降低^[51]。

1.4 内质网应激

钙离子消耗会引起内质网应激, 给予 NO 合酶抑制剂预处理可明显减少脑缺血引起的内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 钙离子损耗, 说明在再灌注损伤早期 NO 产物增加使内质网钙离子贮存能力缺失^[52]。再灌注期间 ER 氧化损伤使内质网蛋白质进一步修饰产生内质网应激。

抑制内质网应激可以避免异常蛋白质合成, 它的神经保护作用被认为和 PKR 样 ER 合酶 (PKR-like ER kinase, PERK) 的激活相关, 其中 eEF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) 的磷酸化可以抑制蛋白质合成^[53]。上调 *chop* mRNA 认为是激活内质网压力和非折叠蛋白质反应 (unfolded protein response, UPR) 的关键因素, 有研究者在脑缺血损伤后的纹状体和海马区均观察到这种现象^[54, 55], 并且 CHOP 基因敲除小鼠的海马区神经元与野生型小鼠相比, 在缺血损伤后死亡率明显降低, 显示 CHOP 基因介导参与短暂性脑缺血诱导的神经元死亡^[56]。

1.5 免疫炎症反应

脑缺血损伤激活的局部或系统炎症反应具有双向性特点：一方面可以加重缺血损伤，另一方面可以改善缺血组织的修复^[57, 58]，炎症反应通路可以激活内源性神经保护机制诱导缺血耐受，促进组织再生及修复。

研究显示 TLR2 和 TLR4 均参与了缺血后炎症反应，但是仅 TLR4 参与缺血预处理保护作用^[63, 64]。TLR4 通路激活核转录因子 NF- κ B 导致 TNF、iNOS 和 COX-2 表达增加，诱导神经保护作用。NF- κ B 的激动剂 TNFR1 也同样可以诱导缺血耐受的产生^[65]。

2 吸入性麻醉剂预处理诱导中枢缺血耐受研究进展

神经保护措施主要注重于能够更好的激活内源性的神经保护机制以防止神经损伤，抑制神经损伤后的二次打击，从而减小组织器官的损伤以及使受到亚致死性损伤的组织得以恢复。预处理是在组织受到伤害性刺激之前先给予一种低于伤害性损伤的亚致死性刺激，诱导激活机体的内源性保护机制，可以使组织或者器官对于刺激和损伤产生更高耐受的一种保护性措施，从而产生对抗之后的致死性打击的现象。我们和国际上的许多研究者都证实吸入麻醉药及其它一些气体均可以对中枢神经系统产生不同程度的缺血耐受。

2.1 氙气

氙气作为一种惰性麻醉气体被化学家 Sir William Ramsay 发现至今已有一百多年历史，并且在 1951 年正式作为麻醉药正式进入临床使用。与其它麻醉气体相比氙气具有许多优势，比如低血气分配系数（0.115）、起效和清除快速、心血管系统抑制较轻、较强的镇痛作用以及较易通过血脑屏障，这些多元化特点使氙气广泛应用于临床上麻醉的快速诱导。

氙气的神经保护作用已经在离体 OGD 模型以及在体前脑及全脑缺血模型上证实，并且发现氙气对缺血耐受的保护作用呈剂量依赖关系，其有效浓度在 20-75%，但是在有效浓度之外，氙气也是具有毒性作用的。有离体实验证实，OGD 模型引起

的 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受体的激活随后引起细胞的凋亡, 给予 75% 氙气预处理 2 小时可以明显增加细胞活力与活性^[66]。Wilhelm 的实验证明^[67], 氙气预处理产生神经保护作用离体与在体实验需要浓度不同, 分别为 20-75% 和 40-75%。在大鼠的 MCAO 模型中, 50% 的氙气明显减少 MCAO 所引起的皮层神经元的死亡, 而 70% 可以进一步减少纹状体的缺血损伤^[68]。然而, 如果氙气浓度达到 75% 则会引起神经元的死亡。研究证实, 氙气可以通过抑制 NMDA 受体的活性逆转由于缺血缺氧引气的细胞损伤, 并且它可以抑制由于其它 NMDA 受体拮抗剂引起的神经毒性作用。

在脑缺血再灌注损伤过程中, 胞外大量释放的兴奋性谷氨酸会激活相应的神经元受体, 引起胞外钙离子水平的升高, 从而引起大量线粒体功能障碍、DNA 损伤, 从而导致下游凋亡信号通路的级联反应, 例如 P38 和 JNK, 最终导致细胞死亡。氙气不仅可以直接抑制兴奋性氨基酸的受体, 也可以直接抑制兴奋性神经元活性, 通过调控钾离子通道的开放从而加强神经系统缺血耐受效应。

NMDA 受体认为是氙气的作用靶点, 抑制 NMDA 受体的激活以及它下游的神经转导通路被认为是氙气诱导神经保护作用的主要机制。此外, 氙气可以抑制前额叶皮质 NMDA 受体和 AMPA 受体介导的突触递质的释放^[69]。

钾通道的抑制。除了抑制兴奋性氨基酸受体的激活, 氙气也可以通过调节钾通道的开放抑制神经元兴奋性从而增强缺血耐受^[66, 70]。麻醉剂量的氙气可以使 ATP 依赖的钾离子通道开放增加 50%。除了 ATP 依赖的钾通道, 也发现氙气可以激活双孔钾离子通道, 从而导致细胞膜超级化并且降低神经元兴奋性。

抑制炎症反应。氙气可以明显增加 LPS 激活的 IL-1b 的 mRNA 和蛋白质水平, 而引起的这种保护效应是通过抑制磷酸化水平, 减弱 LPS 刺激后产生的 ERK1/2 活化和 IL-1b 表达的增强^[71]。因此, 氙气可以通过调控免疫炎症过程发挥神经保护作用。

其它机制。在心脏系统, 激活 PKC-e 和 p-38 MAPK-ERK1/2 通路是介导氙气发挥心脏缺血耐受的重要分子机制。之后也有实验证实, K_{ATP} 和 PI3K/PDK-1 通路也通过 PKC-e 的磷酸化作用参与氙气介导的心脏保护效应。但是 K_{ATP} -PKC-e 和 PI3K/PDK-1-PKC-e 是否参与氙气的中枢神经保护作用并未证实。

2.2 NO

1799年由英国化学家 Humphry Davy 发现氧化亚氮的麻醉作用，由于吸入 NO 的人感到欣快并发笑，因此也称为“笑气”。NO 的 MAC 值很高麻醉效能很低，因此需要与其它麻醉药物复合使用。

最近有研究证实，在大鼠的新生儿缺血缺氧性脑病（HIE）模型中，吸入氧化亚氮可以在脑缺血损伤后增加脑血流量，并减少脑梗死容积和神经元损伤^[72]。之后，研究者在小鼠的 MCAO 模型中也观察到相同的结果^[73]。从缺血损伤开始直到再灌注损伤后 60 min 持续给予氧化亚氮吸入可以明显增加脑血流量并且抑制缺血损伤后的炎症反应^[74]。NO 其化合物和多种 NO 合酶亚型的生理病理作用也是研究领域的热点和难点。有研究发现上调神经系统中 NO 合酶的表达可诱发保护作用^[75]。

抑制 NMDA 受体和神经元兴奋性损伤可能是氧化亚氮诱导神经保护作用的主要机制，双孔钾通道亚家族 TREK-1 也可以被 NO 激活，表达明显增加^[76]。NO 可以抑制 AMPA 受体介导的兴奋性电流，并且延长 GABA_A 受体引起的突触电流。这些结果都显示氧化亚氮可以直接抑制神经元兴奋性发挥神经保护作用^[77]。此外，与其它气体相同，氧化亚氮可以引起过高热^[78]，减少谷氨酸和甘氨酸释放从而抑制氧化应激反应^[79]。

2.3 氟烷类麻醉剂

早在上世纪八十年代，有研究发现异氟烷可以增加脑缺氧后小鼠的存活率^[80,81]。后续有研究发现无论是预处理、缺血中以及后处理，异氟烷均可诱导不同程度的短期神经保护作用，并呈剂量依赖关系。此外，在离体实验中也观察到同样的神经保护作用，给予海马切片 1.5%异氟烷预处理可显著减轻 90 min 氧糖剥夺模型引起的神经元损伤^[82]；皮层异氟烷后处理的神经保护作用也同样在大脑皮层切片的 OGD 模型中得到证实^[83]。

我们的课题研究组自 2003 年起开始探索异氟烷预处理神经保护作用的机制研究，发现异氟烷预处理可以减轻缺血再灌注损伤后脑梗死容积改善神经功能并呈剂量依赖关系^[84]；异氟烷预处理还可以增加脊髓缺血再灌注损伤后脊髓前角神经元存活率以及提高运动功能^[85]。此外，给予 1%异氟烷吸入可以逆转脑外伤（traumatic brain injury, TBI）引起的海马 CA1 区神经元损伤，减轻由外伤后糖酵解引起的兴奋性毒性，

改善神经功能^[86]。然而，给予高浓度异氟烷（1.67 MAC）诱导则会引起神经退行性变从而加重神经功能损伤^[87]。

2.3.1 减少兴奋性损伤

全麻药物可以显著抑制神经系统大脑皮层谷氨酸受体活性^[88]，之后有研究者发现异氟烷预处理的神经保护作用通过减少 NMDA/AMPA 受体数量和活性，抑制缺血缺氧过程中大量释放的兴奋性氨基酸，减轻毒性物质的损伤作用^[89,90]。吸入 2%浓度七氟烷可以增加星型胶质细胞兴奋性氨基酸的摄取，减少胞外兴奋性氨基酸含量，抑制对神经元的毒性作用^[91]。给予 2.5%七氟烷吸入可以显著减少 Ca^{2+} 的谷氨酸释放，这些结果都证实氟烷类吸入性麻醉剂的神经保护作用可能通过减少兴奋性损伤介导的。

2.3.2 抑制凋亡

Kawaguchi 第一次研究发现神经元凋亡通路介导异氟烷预处理诱导脑保护作用^[92]，其机制是抑制凋亡分子 caspase-3 和 caspase-8^[93,94]，以及通过增加 Ca^{2+} 激活 MAPK p42/44 通路和抗凋亡因子 Akt 减少细胞凋亡^[95]，并且与野生型小鼠相比，Akt-1 基因敲除小鼠的异氟烷预处理作用被逆转^[96]。此外，异氟烷预处理通过介导 Akt，上调胞内 Ca^{2+} 含量激活 p38 MAPK Pyk2 和 p42/44 (ERK)信号通路诱导缺血耐受^[97]。这条经典通路可以使 p38 和 JNK 磷酸化后，抑制细胞凋亡因子 Bad 和 p90RSK，从而抑制细胞凋亡。

2.3.3 氧化应激反应和维持线粒体膜稳定性

在局灶性脑缺血损伤及兔脊髓缺血损伤实验中发现，吸入性麻醉气体异氟烷或七氟烷处理均可降低由缺血损伤引起的皮层神经元-胶质细胞氧自由基的生成，逆转氧化应激损伤。但是在异氟烷预处理前注射羟基自由基清除剂二甲基硫脲可逆转异氟烷对脊髓缺血再灌注损伤的缺血耐受作用^[85]，提示这些挥发性麻醉剂对缺血缺氧损伤可能是通过触发氧自由基生成，从而增加缺血损伤期间对氧化应激损伤的抵抗力而实现的。应用 iNOS 特异性拮抗剂 1400W 明显减轻异氟烷作用^[98]。ATP 调控钾离子可以维持线粒体膜稳定性，抑制氧化应激反应，介导异氟烷预处理的神经保护作用^[84,99]。

2.3.4 抗炎性反应

最近的一些研究显示，氟烷类麻醉剂可通过调节非受体酪氨酸激酶 Notch 等信

号通路，抑制炎症因子激增，减少神经元死亡而发挥神经保护作用。

异氟烷的抗炎性作用包括前脑缺血^[100]、SAH^[101]和 TBI^[102]，通过介导炎性细胞以及由于炎性因子聚集产生的免疫细胞，包括 TNF- α , ICAM-1, E-selectin。研究中发现，异氟烷可以显著逆转炎性标志物的生成，包括小胶质细胞的激活。然而，在神经元缺氧缺血模型和^[103] AD 模型^[104]中，异氟烷也可表现出促炎性作用。研究证实在不同的模型中，异氟烷可以引起不同程度的炎性反应。如果是急性损伤例如前脑缺血、SAH 或 TBI，异氟烷可诱导短暂的促炎性作用；相反，如果是非急性损伤包括缺血缺氧和 AD，则会引起较轻微的炎性反应。

3 UPS/SUMO 途径在神经系统生理及病理条件下的作用机制

泛素蛋白酶体系统的发现，是人们认识细胞内蛋白活动的一次飞跃，开创了蛋白细胞内调控的新纪元，对生命科学产生了深远影响^[105]，作为二十世纪末最为重要的生物学发现之一获得了 2004 年诺贝尔奖^[106]

3.1 UPS/SUMO 系统的构成

在生物体内，蛋白质泛素化途径介导蛋白质的降解过程。泛素系统的主要功能就是降解在应激反应和损伤过程中大量产生的变性蛋白质^[107]。蛋白质泛素途径需要有 E1、E2 和 E3 三种酶类的参与，E3 连接酶可以与蛋白质底物进行特异性结合，调节蛋白质泛素化，泛素化蛋白转运到蛋白酶体（proteasome）中可以被完全降解（如图 2），这个体系称为泛素-蛋白酶体系统^[9]。泛素的 Lys 端残基也可以与其它的泛素的 c-末端 Gly 残基共价结合，形成多聚泛素化链，作为蛋白酶体的靶向信号。泛素依赖性蛋白质降解过程通过与不同的泛素激活酶和泛素连接酶或连接酶复合体结合来进行精确的调节，同时，大量的去泛素化酶（deubiquitylating enzymes）可将泛素与底物分离，游离的泛素可循环利用。泛素-去泛素循环对于 UPS 系统正常功能的维持具有重要作用，一旦循环被阻断，将造成异常泛素化蛋白聚集，引起细胞功能失常或死亡^[10]。

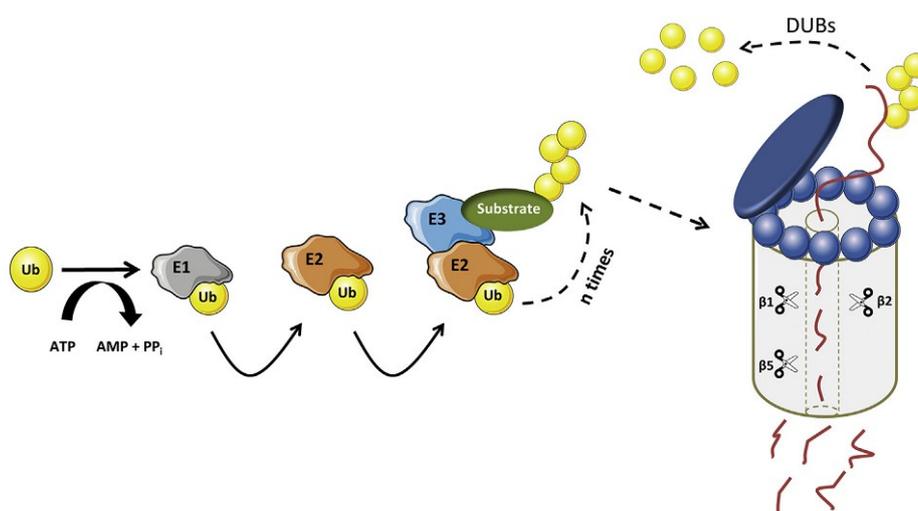


图 2 泛素蛋白酶系统的主要组成部分

作为泛素类蛋白家族的重要一员，SUMO 系统蛋白广泛存在于多种生物体内，包括真菌、植物、原生动物和后生动物中，说明 SUMO 系统蛋白在生物进化中高度保守的特点。研究发现在哺乳动物体内的 SUMO 系统具有三种亚型：SUMO-1、SUMO-2 和 SUMO3。所有的 SUMO 家族成员在 C 末端都有一个向外伸展的突出端，而泛素则没有这一突出端。SUMO 从前体合成、水解活化到共价结合底物蛋白的过程和泛素化过程类似，涉及一系列酶的级联反应，但是参与的酶却完全不同。SUMO-1 的 E1 活化酶和 E2 结合酶都只有一种，而 E3 酶已经发现的就有三种：抑制 STAT 活化蛋白的 PIAS 家族、RanBP2 (Ran binding protein-2) 和 Pc2 (human ploycomb group protein)。有实验证实 SUMO 修饰的蛋白质比经泛素修饰的蛋白要少很多，其可能原因为 Ubc9 是 SUMO 系统中唯一 E2 结合酶，具有高度特异性。SUMO 化蛋白质与泛素化蛋白质不同，蛋白质泛素化容易被蛋白酶体水解促进蛋白质降解；然而，蛋白质 SUMO 可增加其自身的稳定性。SUMO 系统蛋白质的生物学功能主要为调节各类蛋白之间的相互作用，调节蛋白的定位，调节蛋核浆间蛋白的转运，调节蛋白质转录活性以及泛素化过程等^[108]。这些功能都是相互联系相辅相成的。

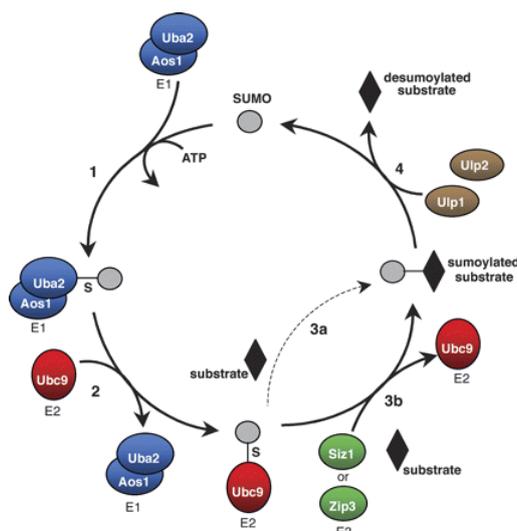


图 3 SUMO 蛋白的修饰过程

3.2 UPS/SUMO 系统与神经系统相关疾病

细胞生存重要条件之一是必需蛋白质的稳定表达，即蛋白质代谢和分解过程的平衡，而这种平衡一旦被破坏则会导致细胞损伤甚至死亡。UPS 主要降解短寿命蛋白和部分长寿命蛋白^[109]。UPS 在正常细胞的新陈代谢中起着不可替代的作用，它调控许多重要蛋白质的稳定性，从而保证体内各类蛋白质平衡。UPS 可以控制例如调蛋白和骨架蛋白（肌动蛋白、肌球蛋白），同时为保持蛋白质准确性，可以降解折叠错误的异常蛋白质。

一些最新的研究已提示 UPS/SUMO 不仅与过去已知死亡、凋亡直接相关，而且与被称为“第二种程序死亡”的自噬有着千丝万缕的联系^[110]。这些研究表明，作为细胞内蛋白调控的重要途径，UPS/SUMO 已经成为决定细胞命运的决定性因素。

3.3 UPS 系统与神经系统疾病

大量研究显示，UPS 系统在神经发育生长、维持突触可塑性方面发挥重要作用。UPS 调控许多突触后反应蛋白，如离子型谷氨酸受体、突触后致密物（PSD）构成蛋白。动作电流抑制可通过影响 UPS 蛋白降解引起 SHANK，NR2B，Protein phosphatase 1 等 PSD 蛋白增加，同时减少另一些 PSD 蛋白，如 PSD95，NR2A，CaMKII。这些发现揭示 UPS 途径在突触重塑中发挥重要作用。目前已证实许多神经退行性疾病是由于细胞外或细胞内错误折叠蛋白形成的聚集体所引起的脑损伤，其

中包括人的纹状体脊髓变性病 (creutzfeldt-jakob disease, CJD, 即疯牛病), 老年痴呆症 (Alzheimer's disease, AD), 以及由含异常扩展多聚谷胺酰胺片断蛋白聚集引起的疾病, 如亨丁顿舞蹈病 (Huntington's disease, HD), 各类帕金森病 (Parkinson disease, PD) 等。UPS 通过泛素依赖的蛋白质水解处理受损害的蛋白质, 其功能障碍将导致异常蛋白的聚积和细胞死亡。研究发现, PARK2 基因突变是造成一种常见的家族性 PD 的遗传学基础, 而 PARK2 基因编码泛素 E3 结合酶 Parkin。此外, 一些 UPS 水解酶 (DUB) 的异常也是造成神经退行性疾病原因, 如 UCHL1 基因突变会导致 ubiquitin 解离功能出现障碍, 从而引起异常蛋白质例如 α -synuclein 聚集, 最终导致家庭性 PD。一项最新发表在 Nat neurosci 上的研究显示, 利用转基因技术成功构建 α -synuclein 突变小鼠 (A30P-mutant), 泛素化蛋白水平在无症状小鼠可达对照水平的 2-3 倍, 而在有症状小鼠则高达 4-5 倍, 已有研究致力于利用药物干预手段对 UPS 进行调节, 从而治疗神经退行性疾病。

3.4 SUMO 系统与神经系统疾病

SUMO 化修饰与许多人类神经系统退行性疾病的发生与发展密切相关^[111]。有研究证实, SUMO3 结合对淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 向 β 淀粉样蛋白 (beta amyloid, A β) 的转变过程具有调节作用, 而后者的聚集是造成一些神经退行性疾病的重要物质。Li 等的研究证实, 在细胞过表达 SUMO3 可明显抑制 APP 向 A β 转换^[112]。SUMO 化对许多转录因子的翻译后修饰与基因转录抑制有关。最近的研究表明, 转录抑制因子如 HDACs 之间的 SUMO 化依赖性的相互作用, 可能是 SUMO 对转录进行调控的一种机制。HDACs 是 SUMO 化的效应器、修饰底物和调节器, 说明 SUMO 化与乙酰化之间复杂的相互作用可能对调控许多基因的表达都非常重要。虽然许多研究证实 SUMO 结合抑制许多转录因子, 但其可明显激活低氧因子-1 (HIF1 α) 及热休克因子 (HSF1) 的活性, 对核转录因子 κ B (NF κ B) 具有激活和抑制双重作用^[113]。近期在神经系统被发现的 SUMO 结合目标蛋白多为胞膜和胞浆蛋白, 而并非核内的蛋白, 例如谷氨酸受体亚单位 6 (glutamate receptor subunit 6)。SUMO 与谷氨酸受体亚单位 6 结合后减弱 Kainate 受体介导的电流以及减少负责轴突 mRNA 传递、G 蛋白调节、磷酸化信号等相关蛋白含量, 这些作用可能在神经细胞的正常生理调节中发挥重要作用。

4 SUMO 途径与缺血性脑损伤的关系研究

4.1 SUMO 系统与缺血耐受

有研究者以冬眠动物为对象观察发现，动物进入极度低温期，其脑血流量降低致足以引起死亡的情况下，其脑、肝等重要器官及组织细胞内结合型 SUMO 蛋白水平明显增加，动物苏醒后神经系统或其它脏器没有任何损伤，这个现象提示 SUMO 系统在冬眠状态下低温对动物的神经保护效应具有至关重要的作用。该研究小组进一步在动物缺血再灌注模型及离体氧糖剥夺实验中证实，缺血缺氧损伤后结合型 SUMO 表达水平增高，并且主要表现在 SUMO-2/3。构建全脑过表达 SUMO 的转基因小鼠对缺血损伤的耐受性明显增强。

SUMO 化过程是通过激活 Ubc9 的结合过程或者通过抑制 SUMO 的特定酶。我们分析 Ubc9 的激活可以增加 SUMO 化，我们也观察到 Ubc9 而并非 SENP1 (SUMO 主要酶) 表达增加在动物冬眠期间。哺乳动物的 SUMO 系统有六种异肽酶 (SENPs: sentrin-specific proteases)，其中 SENP3 主要参与缺血损伤过程。并且在最近的一个研究中发现 SENP3 参与了脊髓缺血损伤，在缺血损伤早期脊髓神经元出现明显的 SUMO-2/3 的核转移，都是由于 SENP3 的降解引起。当敲除 SENP3 增加细胞 SUMO 蛋白表达，dynamin-related GTPase Drp1 调控细胞色素 C (cytochrome C) 释放。线粒体膜上的 Drp1 的 SUMO 化使 Drp1 进入胞浆且抑制线粒体解离、细胞色素 C 释放及细胞凋亡。然而在再灌注阶段，SENP3 水平升高，Drp1 的去 SUMO 化使线粒体解离，细胞色素 C 释放增加导致细胞凋亡。因此，当 SENP3 水平升高导致蛋白的去 SUMO 化是细胞发生凋亡的主要因素，SENP3 的降解使蛋白 SUMO 化水平增加是诱导缺血耐受维持细胞存活的主要分子机制。

近些年，超过十种泛素相关蛋白修饰物 (ubiquitin-like protein modifiers, ULMs) 逐渐被人们认识，发现通过发变表面构象影响蛋白与其它分子结合，影响蛋白酶活性，亚细胞定位及其它功能。例如 ISG15 (Interferon-stimulated gene-15) 参与免疫防御机制，最近也发现^[114]在前脑缺血模型的大鼠皮层蛋白质 ISGylation 明显增加，并且 ISG-/- 转基因小鼠与野生小鼠相比缺血后脑梗死面积明显增加，神经功能学评分降低，说明对缺血损伤的敏感性增加。此外，UBE1L (ub-activating enzyme E1-like

protein, ISG 化酶) 缺失小鼠也同样对缺血损伤敏感性增加, 表明蛋白质 ISG 化水平增加可能是脑卒中后减少神经系统损伤程度的一种内源性保护机制。NEDD8 是一个 9kDa 的小分子蛋白, 主要功能是调控泛素连接酶导致蛋白酶体降解, FUB1 (Fau ubiquitin-like protein) /MNSF (monoclonal non-specific suppressor factor) 也属于 ULM 家族发挥抗炎性作用。泛素折叠蛋白 (ubiquitin-fold modifier, UFM) 在内质网应激反应 (endoplasmic reticulum stress response) 中发挥关键因素。Lee^[13]等研究发现在动物冬眠期间, 全脑结合型 ULMs 的水平明显增加, 进一步说明泛素系统参与神经系统内源性保护机制。在这期间, 伴随 ULMs 水平增高的还有 miRNAs 两种家族的下调, 它们被认为主要是用于调控 ULMs 修饰物的表达。抑制这两种 miRNA 水平可以增加全脑结合型 ULMs 水平, 并且提高神经元对缺血缺氧损伤的耐受程度, 表达蛋白质的 SUMO 化具有神经保护作用。

4.2 SUMO 系统与内源性保护机制

与 ATP 依赖的凋亡过程不同, 自噬是细胞发生发展过程中的正常环节, 它是由双膜自噬体作用于溶酶体参与形成。在缺血损伤, 纹状体的细胞死亡比梗死区发展速度慢, 有研究者认为是由于自噬过程参与其中导致的^[27]。Pamenter 等人通过电解质、pH、氧糖等环境模拟缺血状态从而激活自噬和凋亡过程, 发现星型胶质细胞比神经元的损伤更为严重。在这个过程中, SUMO 化参与了蛋白质修饰以及 DNA 修复。

线粒体通过解离过程可以增加线粒体自身数量及能量, 这个过程称为线粒体自噬, 通过溶酶体对损伤的线粒体进行再次循环利用。最近文献报道线粒体自噬参与脑卒中及缺血再灌注损伤过程^[115]。Harder 第一次证实 DRP1 蛋白质 SUMO 化参与线粒体解离^[116]。SUMO-1 通过维持 DRP1 稳定性阻止其降解。随后有研究发现, SENP5 参与线粒体解离的调控过程^[117], 敲除 SENP5 导致活性氧 (ROS, reactive oxygen species) 水平增高, 从而使线粒体解离加速。这些研究证实蛋白质 SUMO 化通过维持正常线粒体功能以及再循环来调控抗氧化应激反应过程中发挥主要作用。对于心脏缺血再灌注的动物模型研究中发现, SUMO 介导线粒体功能调控参与心肌内源性保护作用^[118]。最近的体外研究发现 SUMO-2/3 特定蛋白酶 SENP-3 在 OGD 损伤过程中通过 cathepsin B 依赖途径发生降解, SENP3 水平的降低可以延长 DRP1 的 SUMO 化过程, 反之抑制 DRP1 的 SUMO 化过程会介导细胞色素 C 大量释放最终导致细胞

死亡。这些研究都进一步证实蛋白 SUMO 化过程可以增加细胞自身对于缺血损伤凋亡的耐受从而激活内源性保护机制。

缺血损伤可以激活小胶质和星型胶质细胞引起炎症反应，而 SUMO 化过程同样对胶质细胞具有保护作用。最新有研究报道 SUMO-1 过表达可以阻止星型胶质细胞反应性的 beta 淀粉样蛋白聚集^[119]。在星型胶质细胞中，增强子结合蛋白 beta 转录因子（CCAAT/enhancer-binding protein beta transcription factor）可以通过调控促炎一氧化氮合酶 2 型的表达最终调节 SUMO 蛋白和核受体 LXRalpha 和 LXRbeta 的 SUMO 化过程，最终发挥抗炎性的保护作用。这些研究证实星型胶质细胞的三重突触结构也是 SUMO 的重要靶点从而发挥抗炎性的神经保护作用。

4.3 缺血损伤中 SUMO 的靶点

在生理状态下，SUMO 蛋白处于一个相地稳定的状态，仅虽然只有一小部分，但也有超过一百多种的蛋白发生 SUMO 化修饰^[120]。尽管大多数的研究都发现在细胞损伤情况下，例如脑卒中，细胞的 SUMO 水平增高是激活细胞内源性保护机制，但是 SUMO 化也取决于特定的 SUMO 靶点。与磷酸化过程类似，不同蛋白的 SUMO 化其功能也截然不同，当一些特定蛋白 SUMO 化可以产生保护作用防止细胞凋亡，而其它一些 SUMO 化蛋白可以加剧细胞的病理过程。全脑 SUMO 化水平的增高并非是干预脑缺血损伤的最有效的途径，因此，研究 SUMO 化特定靶点蛋白的不同功能至关重要。

SUMO 通过修饰核蛋白直接参与转录过程，SUMO 化参与了转录的各个过程，包括将转录因子的启动子转变为阻遏物，或是调控转录因子的定位及稳定性。胞外蛋白的 SUMO 化主要包括 CNS 转运体，离子通道以及受体，表明结合型 SUMO 蛋白的活性依赖于神经元代谢、糖稳态以及对兴奋性毒性反应以介导神经保护作用（见表 1）。

表 1 缺血损伤后中枢神经系统转运体、离子通道和受体 SUMO 化序列

膜蛋白	SUMO 蛋白	调控位点	SUMO 化作用	脑缺血中作用	参考文献																																											
葡萄糖转运体	GLUT1	SUMO-1	未知	Ubc9 降低 GLUT1 蛋白表达	SUMO 介导的 GLUTs 的上调可以维持神经系统的能量供应	Giorgino ^[121] et al. 2000; Liu ^[122] et al. 2007;																																										
	GLUT4	SUMO-1	未知	Ubc9 增加 GLUT4 蛋白表达			谷氨酸转运体	EAAT2	SUMO-1	K571	Caspase 3 C 末端片段 SUMO 化	SUMO 上调 EAAT2 可增加谷氨酸清除减少兴奋性毒性作用	Chao ^[123] et al.2010; Gibb ^[124] et al.2007;	K2P1	SUMO-1	K274	SUMO 化导致该通道沉默	K2P1 的抑制可能调控细胞核内信号转导	Plant ^[125] et al. 2012;	钾离子通道	K _v 1.5	SUMO-1	K221 或 K536	去 SUMO 化导致超级化在电压依赖通道的稳定状态下	敲除 K _v 1.5 通道可引起缺血耐受; SUMO 化引起通道钝化也可以诱导神经保护作用	Stapels ^[126] et al. 2010; Benson ^[127] et al.2007;	SUMO-2 SUMO-3		K _v 2.1 通道有促凋亡作用, SUMO 化引起通道钝化也可以诱导神经保护作用	Dai ^[128] et al. 2009; Plant ^[129] et al. 2011;	红藻氨酸受体	GLUK2	SUMO-1	K886	GluK2 SUMO 化的内化	SUMO 化诱导 GluK2 下调可以减少兴奋性毒性作用	Zhu ^[130] et al. 2012; Konopacki ^[131] et al. 2011;	谷氨酸受体	mGluR8	SUMO-1	K882	未知	mGluRs 调控兴奋性神经递质传递, 发挥神经保护作用	Caraci ^[132] et al. 2012 Dutting ^[133] et al. 2011;	大麻素受体	CB1	SUMO-1	未知
谷氨酸转运体	EAAT2	SUMO-1	K571	Caspase 3 C 末端片段 SUMO 化	SUMO 上调 EAAT2 可增加谷氨酸清除减少兴奋性毒性作用	Chao ^[123] et al.2010; Gibb ^[124] et al.2007;																																										
	K2P1	SUMO-1	K274	SUMO 化导致该通道沉默	K2P1 的抑制可能调控细胞核内信号转导	Plant ^[125] et al. 2012;																																										
钾离子通道	K _v 1.5	SUMO-1	K221 或 K536	去 SUMO 化导致超级化在电压依赖通道的稳定状态下	敲除 K _v 1.5 通道可引起缺血耐受; SUMO 化引起通道钝化也可以诱导神经保护作用	Stapels ^[126] et al. 2010; Benson ^[127] et al.2007;																																										
		SUMO-2 SUMO-3			K _v 2.1 通道有促凋亡作用, SUMO 化引起通道钝化也可以诱导神经保护作用	Dai ^[128] et al. 2009; Plant ^[129] et al. 2011;																																										
红藻氨酸受体	GLUK2	SUMO-1	K886	GluK2 SUMO 化的内化	SUMO 化诱导 GluK2 下调可以减少兴奋性毒性作用	Zhu ^[130] et al. 2012; Konopacki ^[131] et al. 2011;																																										
谷氨酸受体	mGluR8	SUMO-1	K882	未知	mGluRs 调控兴奋性神经递质传递, 发挥神经保护作用	Caraci ^[132] et al. 2012 Dutting ^[133] et al. 2011;																																										
大麻素受体	CB1	SUMO-1	未知	CB1 SUMO 化参与 p53 调控	P53 的失活可能导致缺血后神经死亡	Gowran ^[134] et al.2009; Yonekura ^[135] et al.2006;																																										

4.4 转录因子

SUMO 化直接修饰信号级联反应介质使细胞适应低氧环境, 包括低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1), 可以调节基因使血管再生, 细胞存活和维持葡萄糖平衡^[136]。HIF-1 亚型分为氧依赖的 α 亚型和持续存在的 β 亚型, 可以通过 SUMO-1 和 SUMO-2/3 进行翻译后修饰^[137]。现今大多数的研究都主要关注于缺氧损伤后 HIF-1 α 经过 SUMO 化修饰后稳定性和活性的改变, 但其机制尚未明确。一种解释认为 HIF-1 α 在缺氧损伤过程中发挥主要作用, 但也有学说认为缺氧信号转导通路中不仅 HIF-1 其它蛋白也进行 SUMO 化修饰, 例如 CREB 结合蛋白/p300 共激活剂

和泛素 E3 连接酶肿瘤抑制因子^[138]。

此外,上述提到的缺氧反应产生的 ROS 也可以调控 SUMO 通路,从而对转录因子产生作用。ROS 含量降低可以诱导部分转录因子发生去 SUMO 化 (de-SUMOylation),包括 c-Jun。氧化应激反应后生成的热休克蛋白(heat shock factor 1, HSF1)经过 SUMO 化可以使 DNA-binding form 转化为热休克基因转录因子^[139]。压力诱导的 HSF1 经过 SUMO-1 修饰后在 lysine residue 298(K298)位点可以增加其 DNA binding 活性^[140]。HSF-1 的磷酸化过程对 SUMO 蛋白发挥重要作用,说明 HSF1 的这两种翻译后修饰之间存在联系,随后也有实验证实 HSF1 的磷酸化修饰依赖于结合型 SUMO 蛋白^[141]。构建过表达 HSF1 过表达小鼠,缺血损伤后其神经元凋亡及脑梗死面积都明显改善。然而敲除 HSF1 后,高温对于心肌的保护作用被逆转^[142]。因此,我们认为 HSF1 的 SUMO 化过程在神经保护中发挥重要作用。

结合型 SUMO 蛋白可以间接调控核转录因子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)。在正常情况下, NF- κ B 与 I κ B 结合在胞浆内维持一种稳定的状态,当遇到缺氧的条件下, I κ B 经过磷酸化和泛素化后降解,使 NF- κ B 发生核转位^[143]。I κ B α 是 SUMO-1 的靶蛋白,结合型 SUMO-1 可以阻止 I κ B α 发生泛素化降解。最近有研究发现, SUMO-2/3 同样可以作用于 I κ B α , 并且结合型 SUMO-2/3 可以加速 NF κ B 与 I κ B α 的解离,导致缺血后 NF κ B 激活带来的损伤^[144]。NF κ B 存在多种亚型包括 p50, p52, RelA, RelB, cRel, 其功能至今仍存在争议。在缺血损伤模型中, NF κ B 亚型 p50 敲除的转基因的小鼠的脑梗死面积减小^[145], 可是有其它研究发现,在永久脑缺血模型中, NF κ B 亚型 p50 敲除小鼠的脑梗死面积和凋亡细胞都明显增加。这些结果都显示 NF κ B 的 SUMO 化修饰在神经保护中具有至关重要的作用。

4.5 信号转导通路蛋白激酶

糖原合成酶激酶 (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 是广泛存在于中枢神经系统内的丝氨酸/苏氨酸激酶,它可以调控胞内多条信号转导通路。GSK-3 β 在脑缺血过程中也扮演重要角色,当其受到抑制表达减少可以使神经元凋亡减少,脑梗死面积缩小,最终抑制神经炎症的发生。GSK-3 β 的 SUMO 化修饰可以使其发生核转位而维持蛋白质稳定性,从而减少蛋白激酶的活性^[146]。随后有研究发现雌激素受体 β

(estrogen receptor β , ER β) 作为 SUMO-1 靶蛋白, 结合型 SUMO-1 通过与泛素竞争相同的位点, 从而增加 ER β 的稳定性防止其降解^[147]。ER β 在雌激素介导的神经保护作用中发挥重要作用, 并且 ER β 的激活可以减轻缺血损伤后大脑的损伤程度以及血脑屏障的破坏^[148]。

c-Jun 的氨基末端蛋白激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 调控多种生理过程包括神经降解性紊乱, 尤其是介导缺血损伤的凋亡过程^[149]。过表达 SUMO-1 增强 JNK 的激活, 从而加速细胞死亡, 然而过表达去 SUMO 酶 SENP-1 可以抑制 JNK 激活, 逆转 H₂O₂ 对 SHSY5Y 细胞的损伤作用^[150]。相反, 热应激损伤诱导细胞使 p38 表达减少及 JNK 激活, 从而 ROS 表达增加加速死亡, 而过表达 SUMO-1 会逆转这种损伤作用^[151]。这种保护作用也可以通过细胞膜上的 NADPH 氧化酶的 SUMO 化修饰介导。此外, 激活 STAT1 的 SUMO E3 连接酶蛋白抑制剂 (protein inhibitor of activated STAT1, PIAS1) 对于 JNK 依赖的氧化应激反应具有双向调控作用: PIAS1 可以作为 JNK 的负性调节剂^[152]。是否 SUMO 化介导 JNK 在脑缺血损伤中扮演什么样的角色需要进一步研究。

凋亡蛋白激酶其中的同源结构域相互作用蛋白激酶 (homeodomain-interacting protein kinase 2, HIPK2) 的 SUMO 化保护可以阻止 HIPK2 由 ROS 引起的乙酰化, 相反, ROS 增加则会使 HIPK2 的 SUMO 化程度降低, 减少保护作用^[153]。

4.6 转运体

葡萄糖在血液和胞浆主要通过葡萄糖转运体 (glucose transporters, GLUTs) 进行交换, GLUTs 在包括神经元在内的多数细胞中高表达。GLUT1 和 GLUT4 通过 Ubc9 作用也可以进行 SUMO 化修饰。研究结果显示结合型 SUMO 可以降低基础葡萄糖转运体, 然而 Ubc9 的过表达使 GLUT 亚型的变化不同, 表现为 GLUT1 减少, 但是 GLUT4 增加^[122]。表达上调的 GLUT4 可以维持神经系统的能量摄取从而减轻脑卒中引起的缺血损伤。

另一种可以进行 SUMO 化修饰的为星型胶质细胞谷氨酸转运体 (excitatory amino acid transporter 2, EAAT2), 对于清除突触间隙释放的谷氨酸减轻兴奋性毒性具有重要作用。在小鼠的肌萎缩性脊髓侧索硬化症模型中, EAAT2 与 SUMO-1 结合影响下游信号转导通路, 并且 SUMO 化的 EAAT2 片段主要聚集在脊髓星型胶质细

胞核内^[154]。EAAT2 上调可以增加谷氨酸摄取减少兴奋性毒性作用，最终发挥神经保护效应。因此，EAAT2 的 SUMO 化修饰在缺血诱导的兴奋性损伤中的作用需要进一步探讨^[123]。

4.7 离子通道

对于离子通道 SUMO 化修饰的研究主要集中在钾离子通道(potassium channel)，K 离子主要作用是介导兴奋性神经元动作电位的产生和静息电位的维持。双孔钾离子通道(K2P channels)调控背景离子流，维持神经元的兴奋性。研究证实结合型 SUMO 蛋白可以抑制 K2P1 通道，然而去 SUMO 化可以维持通道活性。结合型 SUMO 蛋白 C 端赖氨酸位点沉默可以阻止 K2P1 的 SUMO 化修饰，使 K2P 通道维持活性^[125]。相同的研究小组在随后的研究中发现，K2P1 的 SUMO 化修饰会抑制酸敏感的其它钾离子通道 K2P3 和 K2P9 亚型^[155]。

电压依赖的 Kv1.5 通道也被发现可以与 SUMO 的三种单体结合进行 SUMO 修饰。过表达 SENP-2 减少结合型 SUMO 表达使电压依赖的通道超级化，导致稳态失活。另一种电压依赖钾离子通道 Kv2.1 被证实在 SUMO-1 过表达条件下被抑制，并且这种效应可以被 Ubc9 增强和 SENP-1 逆转。SUMO 化修饰对电压依赖钾离子通道的激活进行正向调控。结合型 SUMO 蛋白可以增强海马神经元的兴奋性，相反的 SENP-1 可以抑制其兴奋性，并且 Kv2.1 过表达可以增加结合型 SUMO 蛋白的表达，然而在 Kv2.1 敲除小鼠中这种作用被完全逆转^[156]。

以上的研究证明不同的钾离子通道在 SUMO 化修饰的条件下其功能各不相同，因此神经元兴奋性损伤作用的机制研究要取决于特定神经元的特定离子通道。例如 K2P 通道的激活可以诱导缺血耐受^[157]，然而在缺血耐受条件下 Kv1.5 的表达下调^[126]。

4.8 受体

氨酸受体(kainate receptors, KARs)是促离子型谷氨酸受体，广泛表达于中枢神经系统中，从而调节突触前及突触后神经递质的释放。KAR 的一种亚型 GluK2 的 SUMO 修饰导致受体内化^[158]，减少 KAR 介导的突触后兴奋性电流的产生，当去 SUMO 化时这种作用被增强。最近有研究发现，GluK2 磷酸化介导 SUMO 依赖的

GluK2-KARs 受体内化^[131]。结合型 SUMO 激活 KAR 使突触谷氨酸释放增加，激活 AMPAR (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) 受体内吞^[159]。KARs 也参与神经系统的缺血与神经保护作用，有研究结果显示全脑缺血可以增加 GluK2 的 SUMO 化修饰，并且结合型 SUMO 蛋白诱导 GluK2 氨酸受体内吞。结合型 SUMO 可以诱导 GluK2 介导的兴奋性损伤减少，发挥神经保护作用，通过绝建 GluK2 敲除转基因小鼠也证实敲除 GluK2 产生神经保护作用^[130] (Zhu 2012)。然而，GluK2 受体内化增加与 MLK3 (mixed lineage kinase 3) 结合，激活下游 MLK3-JNK3 通路，介导缺血损伤作用。最近研究发现过表达负性 Ubc9 或 SENP-1 可以阻止长时程抑制 (long-term potentiation, LTP) 的产生，使 AMPAR 表达增加^[160]。因此我们也认为 SUMO 系统是 LTP 介导 AMPAR 内吞的关键因素。

代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptors, mGluRs) 也是 SUMO 系统的重要靶蛋白。SUMO-1 通过结合 mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8 和其它 G 蛋白偶联受体 (G-protein coupled receptors, GPCRs) 调控神经元突触兴奋性神经递质的释放从而介导神经保护作用^[132]。

大麻素受体 (Cannabinoid receptors, CB1R) 属于 G 蛋白偶联受体广泛存在于中枢神经系统中。有趣的是 CB1 在基础条件下即呈现 SUMO 化修饰，当给予激动剂激活 CB1R 则表达为去 SUMO 化^[134]，从而抑制肿瘤抑制因子 p53，逆转缺血损伤作用。

正 文

实验一 异氟烷预处理对神经细胞氧糖剥夺损伤具有保护作用

本实验旨在通过对氧糖剥夺损伤的类神经元的神经母细胞瘤细胞模型，在离体实验中探讨异氟烷预处理对缺血缺氧损伤后神经保护作用的影响。

1 材料

1.1 细胞

神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y)，购于美国 Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)。

1.2 主要试剂

试剂	公司
异氟烷	美国 Baxter Healthcare
胎牛血清	杭州四季清公司
二甲基亚砜 (DMEM)	美国 Sigma 公司
胰蛋白酶	美国 Sigma 公司
L-多聚赖氨酸	美国 Sigma 公司
神经生长因子 (NGF)	美国 USbio 公司
青链霉素合剂	美国 Sigma 公司
B27	美国 Invitrogen 公司
MTT 试剂盒	美国 Sigma 公司
视黄酸 (Retinoic Acid)	美国 Sigma 公司
鼠 β III-Tublin 单克隆抗体	美国 RD 公司
兔 NeuN 单克隆重抗体	美国 RD 公司

β -actin	美国 Abcam 公司
羊抗兔 IgG-FITC 二抗	中国中杉金桥公司
羊抗小鼠 IgG-Cy3 二抗	中国 CWBIO 公司
DAPI	美国 Sigma 公司
SDS-PAGE 凝胶试剂盒	中国碧云天公司
细胞裂解液	中国碧云天公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	中国碧云天公司
蛋白梯度	Fermentas 公司
PMSF	中国碧云天公司
化学发光检测试剂盒	北京 CWBIO 公司

1.3 主要仪器及耗材

仪器	公司
超净工作台	吴江净化设备总厂
隔水电热恒温培养箱	重庆万达仪器公司
低温高速离心机	美国 Eppendorf 公司
CO ₂ 恒温孵育箱	德国 Hereaus 公司
低氧孵育箱	德国 Hereaus 公司
数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
倒置显微镜	日本 Olympus 公司
激光共聚焦荧光显微镜	日本 Olympus 公司
酶标仪	美国 Eppendorf 公司
麻醉监护仪	美国 Phillip 公司
麻醉机	英国 Penlon 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
凝胶成像系统	美国 Bio-Rad 公司
蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
制冰机	美国 Eppendorf 公司
煮沸机	美国 Eppendorf 公司

2 方法

2.1 实验计划和分组

2.1.1 验证视黄酸诱导神经母细胞瘤细胞分化成为类神经元细胞，给予细胞培养基中进入视黄酸，分别在处理后 1, 4, 7, 12 天进行取材。

2.1.2 验证异氟烷预处是对氧糖剥夺损伤细胞的神经保护作用。分组如下：

- A. 空白对照组 (Sham group): 诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞接受 98% 氧气吸入，不进行氧糖剥夺损伤；
- B. 单纯吸烷组 (Iso group): 诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞给予 2% 异氟烷与氧气混合吸入预处理 2 h，不进行氧糖剥夺损伤，24 h 后进行细胞活性和凋亡检测；
- C. 氧糖剥夺损伤组 (OGD group): 将诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞接受 98% 氧气吸入 2 h，之后进行氧糖剥夺损伤 4 h 处理，复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测；
- D. 异氟烷预处理组 (IsoPC group): 诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞接受 2% 异氟烷与 98% 氧气混合吸入预处理 2 h，之后进行氧糖剥夺 4 h，复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测。

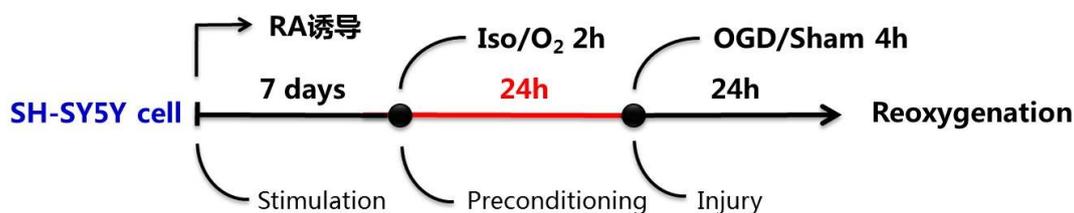


图 4 实验一实验方案

2.2 细胞培养和诱导分化

将神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 种于培养瓶中培养，细胞培养为包含 10% 胎牛血清的 DMEM。当密度长至 70-80% 加入培养液总体积 1% 的视黄酸 (RA) 刺激细胞诱导分化成为类神经元细胞，培养液每隔 2 天更换。

2.3 氧糖剥夺损伤 (Oxygen-glucose deprivation, OGD)

诱导分化成功的类神经元细胞在培养皿中培养，当细胞密度为 70-80% 后弃培养

液，用无菌 PBS 清洗 3 次，加入提前预热好的无糖无血清 OGD 培养液，并放入密闭的 37 度低氧培育箱中，孵育 3 小时，期间实时监测培养箱中气体浓度变化。OGD 培养液配方为：116mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8mM MgSO₄, 1.0mM NaH₂PO₄, 1.8mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃，培养液提前用 5%CO₂ 和 95%N₂ 通气处理。随后将培养皿移出恒温低氧孵箱，更换正常培养液放于恒温恒氧培养箱中，进行后续实验。

2.4 细胞异氟烷预处理

自制密闭的塑料透明箱，输入口连接麻醉挥发罐输出含 2%异氟烷的气体，输出口连接麻醉监测仪确定异氟烷麻醉浓度。将类神经元细胞异氟烷预处理 2 h，处理后再取出各组培养瓶，更换新鲜的细胞培养液，恢复至正常环境继续细胞培养。

2.5 Western blot 检测

2.5.1 细胞全蛋白提取

弃去细胞培养液，加入 PBS 洗涤 3 次，用细胞刮刮取细胞移入离心管中。放置 4℃低温离心机离心 5 min，转速为 12000 rpm 后弃去上清。加入预冷的 RIPA 裂解液 100ul 置于冰盒内，反复抽吸使细胞均匀混于裂解液中，冰浴 30 min 后放入 4℃低温离心机离心 15 min，转速为 12000 rpm。取上清进行蛋白定量后按体积加入上样缓冲液（loading buffer）共煮 10 min，置于-20℃保存。

2.5.2 BCA 法蛋白定量

将蛋白标准品用 PBS 稀释为 1-9 号共 9 个浓度梯度（0,25,125,250,500,750,1000,1500,2000 μg/ml）。将稀释好的蛋白标准品加入 96 孔板中，每孔上样 10 μl，再加入工作液 200 μl（工作液配比为：A 液:B 液=1:50）。将 96 孔板置于 37℃孵箱反应 30 min。利用酶标仪在 560 nm 的波长下检测吸光值。根据梯度浓度蛋白标准品吸光值绘制标准曲线回归方程。

2.5.3 蛋白免疫印迹

配置 SDS-PAGE 凝胶，上层浓缩胶为 5%，下层分离胶为 10%，固定好放置入电泳槽加入电泳缓冲液。每孔上样 20 μl，将凝胶在 120V 电压下进行电泳。电泳完成后在 90 mA 恒流下进湿转 120 min。5%脱脂奶粉 37℃条件下封闭 1 h。加入 Tublin 和 NeuN 单克隆抗体（1:2000, Abcam）和 β-actin（1:1500, Santa Cruz）4℃孵育过

夜。TBS 洗膜 3 次（10 min/次）后，加入二抗（抗体稀释浓度见表 2）室温摇床孵育 1 h，TBS 洗膜 3 次（10 min/次），在凝胶成像系统中进行化学发光，最后根据灰度值进行分析。

表 2 抗体稀释浓度比

抗体	稀释浓度比
鼠 β III-Tublin 单克隆抗体	1:1000, Abcam
兔 NeuN 单克隆重抗体	1:1000, Abcam
β -actin	1:2000, Abcam
羊抗小鼠 HRP	1:5000, CWBIO
羊抗兔 HRP	1:5000, CWBIO

2.6 免疫荧光染色

加入 RA 诱导分化后 1, 4, 7, 12 天后的类神经元细胞，弃去细胞培养液，加入 4%多聚甲醛室温固定 1 小时，再用 PBS 洗涤 3 次。加入一抗 4℃过夜。PBS 洗涤 3 次后，加入二抗 37℃避光孵育 1 小时。PBS 洗涤 3 次后加入 DAPI 孵育 5 min。再用 PBS 清洗 3 次后甘油封片，荧光共聚焦显微镜观察。

表 3 抗体稀释浓度比

抗体	稀释浓度比
鼠 β III-Tublin 单克隆抗体	1:100, Abcam
兔 NeuN 单克隆重抗体	1:100, Abcam
β -actin	1:100, Abcam
羊抗兔 FITC	1:200, CWBIO
羊抗小鼠 Cy3	1:299, CWBIO

2.7 MTT 比色法

将类神经元细胞以 1×10^5 cell/ml 的密度接种于 96 孔板中，弃去细胞培养液，加入黄色 5 mg/ml 的 MTT 液液 2 μ g/孔后，37℃条件下孵育 4 h 后，上清变为紫色结晶液。吸去上清后加入 DMSO 溶液 120 μ l/孔，轻微振荡 10 min。在 490 nm 波长条件下

用酶标仪检测吸光值(OD值)。每个样本设3个附孔,并重复3次。细胞存活率(%) = (实验组细胞吸光值/正常对照组细胞吸光值) × 100%。

2.8 流式细胞仪检测

将细胞用胰蛋白酶消化后离心(1000 r/min, 5 min),弃去上清,加入少量PBS重悬细胞,加入200 μl Annexin V-FITC再次重悬细胞,混匀。在室温条件下避光孵育10 min,离心5 min(1000 r/min)弃去上清,再加入190 μl Annexin V-FITC结合液混匀,重悬细胞。将10 μl 碘化丙啶染色液,混匀后冰浴避光放置,随后进行流式细胞仪检测。

2.9 统计学分析

采用SPSS13.0统计软件进行数据统计分析。所有数据均用均数±标准误(Mean±SEM)显示,用单因素方差方法(One-way ANOVA)进行统计分析,两组间比较用t检验(t-test)。P<0.05时说明有统计学差异。

3 结果

3.1 视黄酸将神经母细胞瘤细胞诱导分化成为类神经元细胞

在细胞培养液中加入1%体积的视黄酸,在处理1, 4, 7和10天进行观察发现,Western blot结果显示加入视黄酸后1天神经元标志物βIII-Tublin和NeuN的表达均明显增加(图5),并且在第7天神经元标志物表达最高。在处理第7天进行免疫荧光染色结果显示,Tublin和NeuN在细胞胞浆内表达较高,并且和DAPI显示共定位(图6)。普通显微镜结果显示,加入视黄酸后7天,神经母细胞瘤细胞形态已向类神经元细胞转变(图7)。因此采用诱导分化7天的SH-SY5Y细胞进行后续实验中。

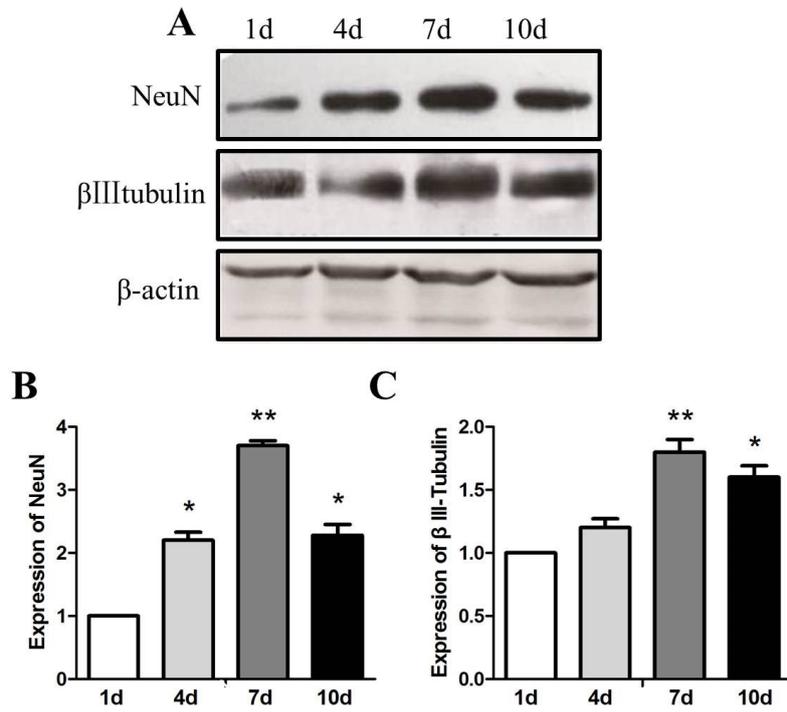


图 5 加入 RA 后神经元标志物 NeuN 和 Tubulin 蛋白的表达

(A) Western blot 检测 RA 刺激后 1, 4, 7, 10 天后神经元标志物表达; (BC) NeuN 和 Tubulin 蛋白表达的相对值。(* $P < 0.05$ vs 1 d 组, ** $P < 0.01$ vs 1 d 组)

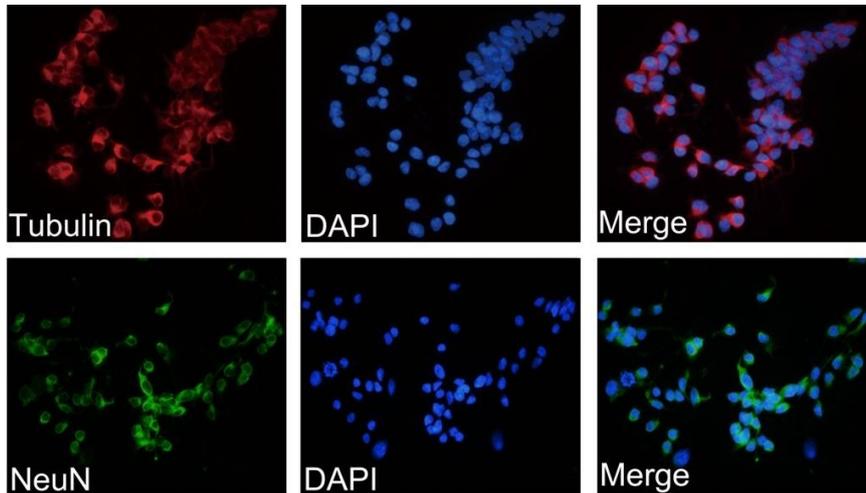


图 6 RA 刺激 7d 后 NeuN 和 Tubulin 免疫荧光染色
红色为 Tubulin, 绿色为 NeuN, 蓝色为 DAPI。

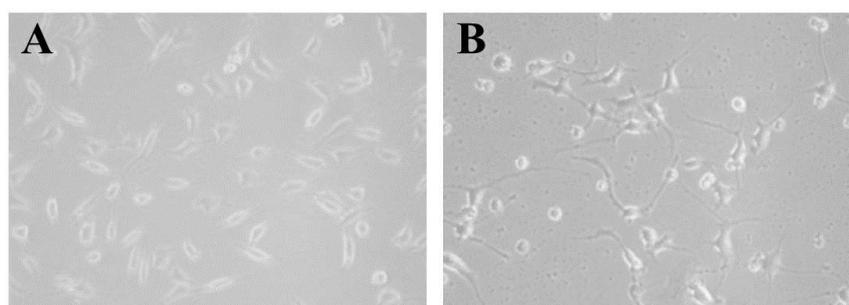


图 7 RA 刺激后 SH-SY5Y 细胞形态变化

(A) RA 刺激之前 SH-SY5Y 细胞形态；(B) RA 刺激之后 SH-SY5Y 细胞形态。

3.2 异氟烷预处理对缺血缺氧损伤细胞具有神经保护作用

我们采用 MTT、流式细胞仪和检测 Caspase-3 的表达来检测 SH-SY5Y 细胞系在氧糖剥夺损伤后的细胞活力与活性，从而验证异氟烷预处理的神经保护作用。在 OGD 损伤 24 小时后结果显示，细胞活力与细胞活性都明显下降（图 8），并且 caspase-3 的表达增加（图 9），说明氧糖剥夺损伤对细胞的活力与活性均有影响。但是 Iso 组的结果发现，单纯吸入异氟烷对细胞没有影响（ $P>0.05$ ）。在氧糖剥夺损伤前 24 小时给予 2 小时异氟烷预处理可以明显改善 SH-SY5Y 细胞的损伤程度，表现为细胞活性和细胞活力增强，并且 Western blot 结果也显示 caspase-3 的表达下降（ $P<0.05$ ）。说明单次给予异氟烷吸入可以逆转氧糖剥夺及复氧对细胞的损伤程度。

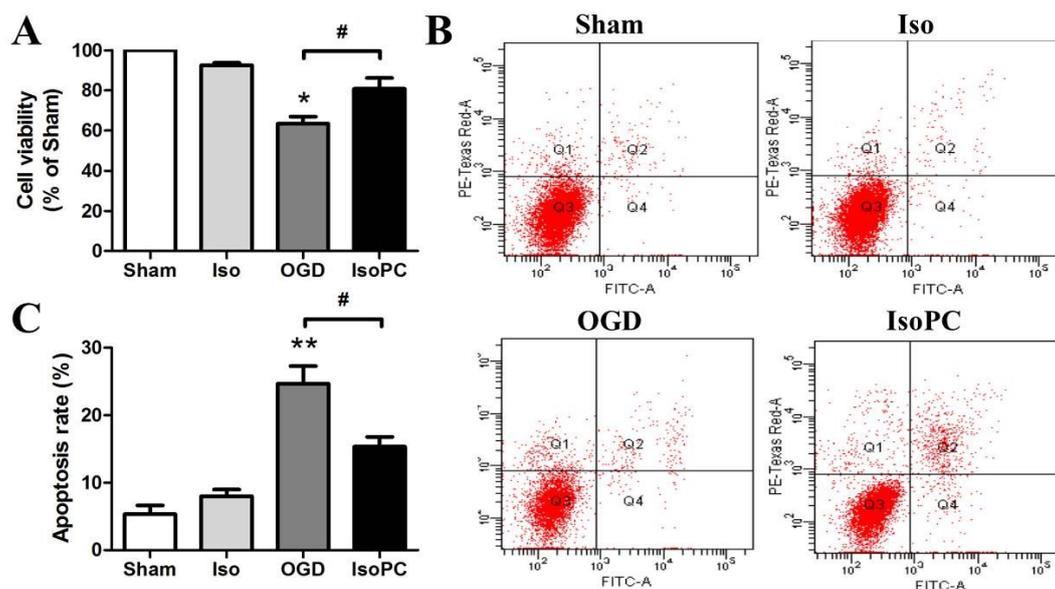


图 8 异氟烷预处理对 OGD 损伤细胞的神经保护作用

(A) MTT 方法检测细胞活力; (B) 流式细胞仪检测细胞活性。(* $P<0.05$ vs Sham 组, ** $P<0.01$ vs Sham 组, # $P<0.05$ vs OGD 组)

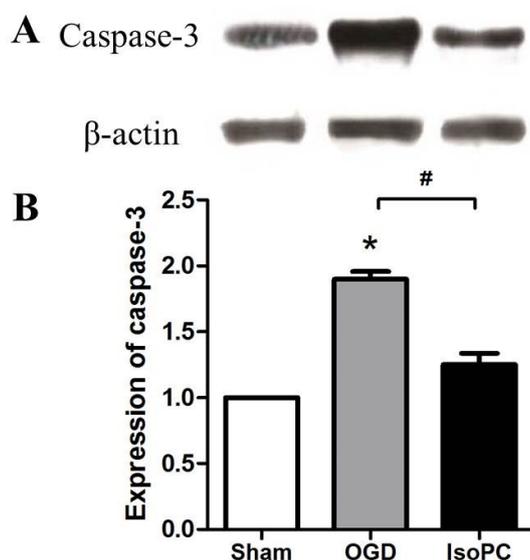


图9 OGD 损伤 24h 后 caspase-3 的表达

(A) Western blot 检测 OGD 损伤后 caspase-3 的蛋白表达; (BC) Caspase-3 蛋白表达的相对值。(* $P<0.05$ vs Sham 组, # $P<0.05$ vs OGD 组)

4 讨论

实验一的研究结果显示:神经母细胞瘤细胞系在视黄酸刺激后可诱导分化成类神经元细胞,并且在诱导分化 7 天时神经元标志物表达最强。通过流式细胞仪、MTT 比色法和检测 Caspase-3 含量观察 OGD 损伤后 SH-SY5Y 细胞活性和细胞的凋亡程度发现,单次给予异氟烷预处理对氧糖剥夺及再复氧损伤的细胞具有神经保护作用。

为研究神经系统缺血损伤机制,我们需要通过离体实验建立神经细胞氧糖剥夺损伤模型,以模型体外缺血缺氧过程。OGD 模型可以模拟神经元细胞缺血再灌注损伤过程,并且可以排除在体实验中复杂的病理生理环境。有文献采用 PC12 细胞系,观察不同时长氧糖剥夺损伤模型对细胞的损伤程度,通过 MTT 比色法对细胞存活率检测,结果显示氧糖剥夺损伤时间越长,神经细胞损伤更为严重,细胞存活率越低。OGD 暴露 3、6、9、12、16、24 h 所对应的细胞存活率分别为 97.23%、88.29%、76.54%、

70.26%、66.43%、40.19%和 9.08%。因此,在实验一我们选择给予诱导分化的 SH-SY5Y 进行氧糖剥夺损伤 4h。

虽然已有大量文献证实异氟烷吸入具有神经毒性作用^[161],但是也有文献报道无论是离体还是在体实验均证实,在低剂量条件下异氟烷吸入对心肌^[162]、肾脏^[163]及神经系统^[164]均具有保护作用。Wei 等^[165]研究小组研究发现异氟烷预处理对于神经元的作用具有双向性,当给予大鼠原代神经元 1.2%或 2.4%浓度异氟烷预处理 60 min,可以产生保护作用;然而暴露于 2.4%异氟烷 24 h 则会产生神经毒性作用,说明异氟烷处理暴露浓度不同或时间不同可以产生截然相反的神经毒性或神经保护作用。在实验一中,我们选择 2%浓度的异氟烷预处理 2 小时。在复氧后 24 h 进行细胞存活率检测,结果显示异氟烷预处理对氧糖剥夺损伤具有神经保护作用。

实验二 异氟烷预处理对大鼠局灶性脑缺血损伤具有脑保护作用

本实验旨在通过对局灶性脑缺血的大鼠模型，在在体实验中探讨异氟烷预处理对缺血缺氧损伤后神经保护作用的影响。

1 材料

1.1 实验动物

280-320 g 的 SD 大鼠，购于第四军医大学实验动物中心，并按照第四军医大学动物实验中心指南严格操作。

1.2 主要试剂

试剂	公司
TTC	美国 Sigma
异氟烷	美国 Baxter Healthcare
碱石灰	英国 Molecular Products Limited

1.3 主要仪器

仪器	公司
栓线	中国北京沙东
麻醉机	英国 Penlon AV600s
大鼠脑槽	美国 AS- II
数码相机	日本 Nikon D90
麻醉监护仪	荷兰 MP-60
恒温水浴箱	广东汕头 HW-W21-Cr600
血气分析系统	英国 Rapidlab 1260
激光多普勒监测单元	瑞士 PeriFlux 5000

2 方法

2.1 实验计划和分组

2.1.1 验证异氟烷预处理对局灶性脑缺血再灌注损伤的脑保护作用。分组如下：

- A. 假手术组 (Sham group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 不进行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型;
- B. 单纯吸烷组 (Iso group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 每天 1 h, 但不进行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型;
- C. 缺血损伤组 (MCAO group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120min;
- D. 预处理保护组 (IsoPC group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120min, 恢复再灌注。

2.1.2 在缺血再灌注损伤后 24h、48 h、72 h、7 d 分别行神经功能学评分 (NBS), 评分后断头取脑行 TTC 染色并分析脑梗死容积百分比, 评估异氟烷预处理的脑保护作用。

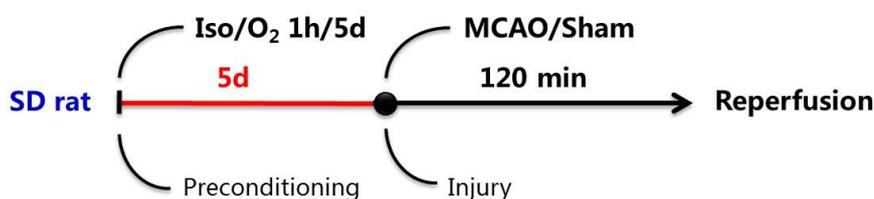


图 10 实验二实验方案

2.2 异氟烷预处理

将单纯吸烷组和预处理组放入密闭的透明塑料箱内, 箱体下部隔板与箱体间放置有用于吸收 CO_2 的钠石灰。箱体一端通入 1.5%异氟烷和 98%氧气的混合气体, 另一端连接麻醉气体监测仪; 假手术组和缺血损伤组通入 98%氧气和 2%氮气。连续 5 天, 每天处理 1 小时, 在整个预处理过程中都进行麻醉气体浓度监测并进行及时调整。

2.3 大鼠大脑中动脉阻塞模型 (MCAO)

动物在术前禁食 12 小时, 参照 Longa^[166]文献报道的方法制备大鼠局灶性脑缺血

再灌注损伤模型。大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 (300mg/kg) 进行麻醉, 监测动物心率及平均动脉压, 并在缺血前 5min 开始进行动脉血气分析。待动物麻醉稳定后, 仰卧固定进行颈部正中切口, 暴露和分离右侧颈总动脉和颈内外动脉, 结扎颈动脉根部, 于颈总动脉近分叉处切一小口, 将直径为 0.38 mm 包被有多聚赖氨酸的栓线由颈外向颈内动脉方向插入, 插入长度约为 18-19 mm 感动有阻力时停止, 固定线栓并缝合皮肤。在整个缺血再灌注过程中动物都置于加热板上, 随时监测动物体温。缺血 90 min 后, 将线栓拔出, 进行再灌注损伤。通过监测手术过程中脑血流量的变化以判断是否造模成功。假手术组不插入线栓, 其它步骤与上面相同。

2.4 脑血流监测

在大鼠前囟的 bregma 点向右旁开 6 mm, 向后旁开 1 mm 处用颅骨钻钻孔, 小心不要刺破硬脑膜, 用牙科胶对基座进行固定, 再放入激光多普勒探头。在缺血损伤阶段, 如脑血流下降至术前基础值的 30% 以下说明局灶性脑缺血模型构建成功; 再灌注阶段脑血流量恢复至缺血时 3 倍以上, 说明再灌注损伤成功。

2.5 动物神经行为学评分 (NBS)

根据分组, 分别在再灌注后 24 h、48 h、72 h 和 7 d, 参考 Garcia^[167]所报道的评分体系, 采用盲法评估记录动物神经功能障碍评分, 神经功能越差则评分越低。(表 4 为神经功能评分体系)

表 4 神经功能评分

试验	0	1	2	3
自主运动 (将大鼠放入鼠笼中观察 5min)	无自主运动	很少运动	运动并触及至少一侧笼壁	运动并触及至少三侧笼壁
体态的对称性 (提起尾部使之悬空, 观察四肢状态)	患侧无运动	患侧轻微运动	患侧运动较迟缓	双侧体态对称
前肢伸展运动 (悬尾使后肢悬空, 前肢移向桌子, 使之仅靠前肢行走, 观察前肢伸展运动)	左前肢无伸展动作	左前肢轻微伸展	左前肢有伸展运动但不及右侧	两侧伸展对称
网屏实验	-	不能爬上	左侧劣势	左侧i
同侧身体触觉反射	-	左侧无反应	左侧反应弱于右侧	反应性相同
两侧胡须触觉反射	-	左侧无反应	左侧反应弱于右侧	反应性相同

2.6 脑梗死容积

各组大鼠在神经功能学评分后断头取脑，行 TTC 染色。根据以往文献报道（文献），切除小脑、嗅脑和低位脑干后放入脑槽，从额极到枕极将脑组织切成厚度为 2 mm 的脑切片，将其放入 2%TTC 染料（2,3,5-氯化三苯基四氮唑）中进行染色，后放入 10%的福尔马林溶液中固定 24 h。用求积图像分析系统计算脑梗死容积，再按照 Swanson 方法（文献）进行分析。梗死容积（ mm^3 ）= 梗死面积（ mm^2 ） \times 厚度（mm）。脑梗死容积百分比：（正常对侧脑组织容积-正常同侧脑组织容积）/正常对侧脑组织容积 \times 100%。

2.7 统计学分析

所有资料数据采用 SPSS13.0 进行统计学分析，其中计量数据资料（除神经功能学评分）用平均数 \pm 标准误（Mean \pm SEM）表示，神经行为学评分（NBS）以中位数（median）四分位间距表示。采用单因素方差分析（ONE-WAY ANOVA）方法进行组间比较，神经功能学评分采用非参数 t 检验，若存在组间差异则用 Mann-Whitney U 检验 Bonferroni 进行两两比较。当 $P < 0.05$ 时表示有统计学意义。

3 结果

3.1 脑血流变化

在手术前 5min 前采用激光多普勒探头开始监测脑血量变化，MCAO 组和 IsoPC 组动物在术中脑血流下降至术前基础值的 30%以下，说明局灶性脑缺血模型构建成功；再灌注阶段脑血流量恢复至缺血时 3 倍以上，说明再灌注损伤成功（图 11）。

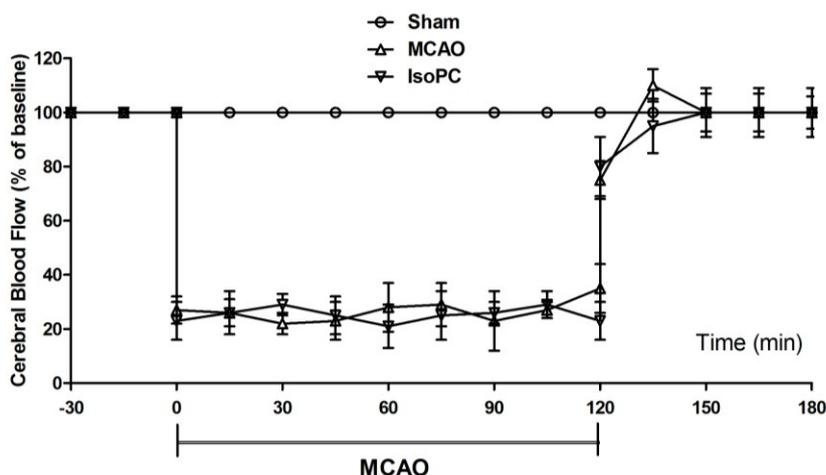


图 11 MCAO 手术期间脑血流变化

3.2 生理指标变化

共收集 16 只（每组 8 只，共 2 组）大鼠生理学参数，包括 pH, PaO₂, PaCO₂ 值，分别在缺血前、缺血期间及缺血后再灌注期间时间点进行测量，各组间无明显统计学差异（见表 5）。

表 5 局灶性脑缺血模型期间生理参数变化

	缺血前		缺血期间		缺血后	
	MCAO	IsoPC	MCAO	IsoPC	MCAO	IsoPC
pH	7.44(0.02)	7.46(0.01)	7.46(0.01)	7.45(0.03)	7.44(0.01)	7.46(0.01)
PaO ₂ (kPa)	18.0(0.8)	17.9(0.6)	17.7(0.7)	18.0(0.7)	17.6(0.7)	17.8(0.6)
PaCO ₂ (kPa)	5.05(0.20)	4.8(0.15)	6.2(0.2)	4.8(0.2)	4.7(0.2)	4.9(0.2)

3.3 异氟烷预处理对大鼠缺血性脑损伤具有短期神经保护作用

从图 12 可见，Sham 组 TTC 染色结果显示无缺血梗死灶，并且神经功能学评分为 18 分。其中预处理保护 IsoPC 组术前连续 5 天每天吸入 2% 异氟烷 1 小时，缺血再灌注后 24 h 观察发现脑梗死容积百分比明显低于缺血损伤组 ($P < 0.05$)。我们在再灌注后 24 h、48 h、72 h 进行大鼠神经功能学评分，发现在不同时间点 IsoPC 组 NBS 评分均高于 MCAO 组 ($P < 0.05$)。说明异氟烷预处理对于大鼠缺血再灌注损伤具有短期的神经保护作用。

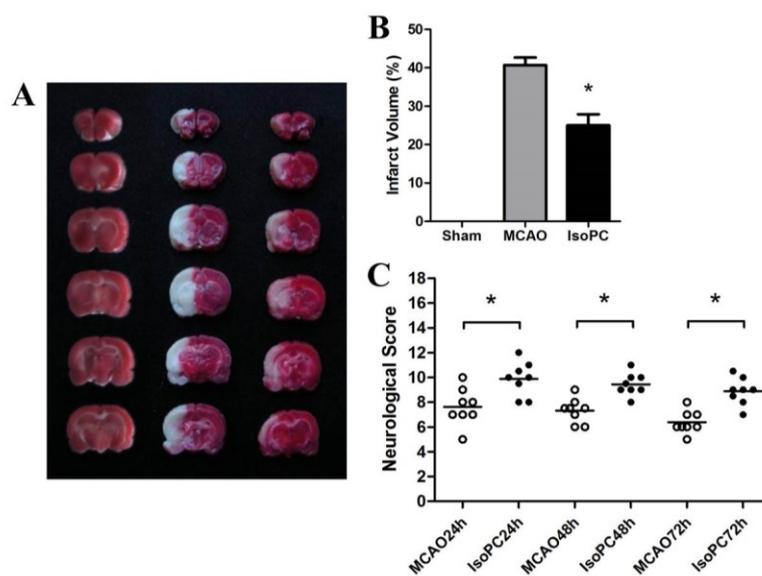


图 12 异氟烷预处理对大鼠缺血再灌注后短期脑保护作用的影响。(A) 再灌注 24h 后大鼠脑组织 TTC 染色；(B) 缺血再灌注后 24 h 大鼠脑梗死容积百分比；(C) 再灌注后 24 h、48 h、72 h 神经功能学评分。（* $P < 0.05$ vs. MCAO group）

3.4 异氟烷预处理对大鼠长期缺血再灌注脑损伤具有脑保护作用

在这一部分实验中，我们同样在 MCAO 手术前 1 天给予异氟烷预处理连续吸入（1 小时/天）5 天，观察缺血再灌注损伤后 7 d 大鼠神经功能学评分以及脑梗死容积，进一步验证异氟烷预处理的长期神经保护作用。图 13 结果显示在再灌注 7 d 后，预处理保护组神经功能学评分高于缺血损伤组（ $P < 0.05$ ），并且给予异氟烷预处理后 TTC 染色显示脑梗死容积百分比明显减少（ $P > 0.05$ ）。

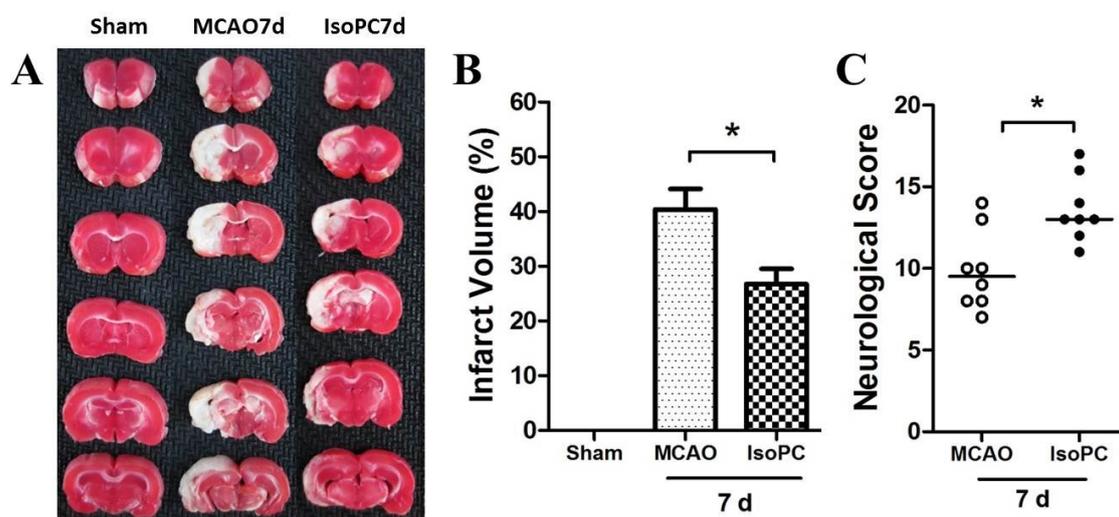


图 13 异氟烷预处理对大鼠局灶性脑缺血长期神经保护作用的影响

(A) 再灌注 7 d 后大鼠脑组织 TTC 染色；(B) 缺血再灌注后 7 d 大鼠脑梗死容积百分比；(C) 再灌注后 7 d 神经功能学评分。（* $P < 0.05$ vs. MCAO group）

4 讨论

脑缺血再灌注损伤是由于损伤区域的脑组织缺血缺氧和血液供应不足等原因导致神经元细胞缺血性坏死，从而造成严重的神经功能障碍^[168]。当脑组织缺氧时会导致神经元出现功能代谢障碍，引起细胞的离子交换功能障碍，并产生脑水肿^[169]。而当脑水肿情况加重会使颅内压持续增高，出现继发性病理改变，加一步损害大脑的功能结构，最终引起脑细胞死亡^[170]。为了模拟脑卒中等缺血再灌注损伤，实验中采用大脑中动脉阻塞模型（MCAO）模拟局灶性脑缺血再灌注损伤，在模型制作期间，动物的各项生理参数稳定，缺血损伤组和预处理保护组之间没有明显统计学差异，说明造模成功且操作稳定。而异氟烷预处理可以有效的减小脑梗死面积，减轻脑水肿的严重程度，并且提高神经系统的功能。

我们的研究课题组在前期已经在大鼠和兔子的实验中证实非缺血预处理可以诱导脑和脊髓的神经保护作用，例如高压氧^[171]、电针^[172]以及吸入性麻醉气体^[173]。在离体实验过程中给予异氟烷预处理为单次吸入，并且实验证明单次异氟烷预处理对氧糖剥夺再复氧损伤的类神经元细胞具有神经保护作用。然而，在体实验中动物病理生理机制复杂，以往文献报道多采用异氟烷多次连续吸入。因此实验二中，我们采用给予 2%异氟烷连续吸入 5 天，每天 1 h，在缺血再灌注损伤后不同时间点 24 h、48 h、72 h、7 d 观察神经功能学评分，之后进行 TTC 染色评估脑梗死容积百分比。

我们的研究结果显示：大鼠局灶性脑缺血 2 h，再灌注后 24 h 脑梗死容积百分比可以达到将近 40%，给予异氟烷预处理其脑梗死容积百分比下降到 26%。随着再灌注时间的延长，缺血再灌注后 24h、48h、72h 和 7d 后脑梗死面积百分比明显缩小，神经功能学评分相比损伤组有明显改善，因此在再灌注损伤后氟烷预处理显现出明显的保护效应。在再灌注损伤 7 d 后，缺血损伤组和异氟烷预处理组无论是从脑梗死容积百分比比较还是神经功能学评分，均有统计学意义。说明异氟烷预处理对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用时间窗为 7 d。尽管如此，如果能在临床上预处理可以为患者提供 7 d 的神经保护时间窗则具有重大的临床意义。

虽然证实吸入性麻醉气体异氟烷预处理可以诱导神经保护效应，但是其机制尚未明确。我们前期研究认为这种神经保护作用机制多样，包括线粒体上钾离子通道^[85]、抗氧化应激分子^[84]或者腺苷 A1 受体的激活^[174]。其它研究认为异氟烷预处理的神经保护效应是由 P38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinase）或一氧化氮合酶（nitric oxide synthase）引起^[175]。然而吸入麻醉药是如何影响蛋白质降解过程这一机制尚未明确。

在后续实验中，我们会分别从在体和离体实验进一步探索异氟烷预处理诱导神经保护效应的机制研究，有可能为临床上更有效的干预缺血再灌注脑损伤提供新的策略。

实验三 异氟烷预处理通过抑制结合型泛素蛋白聚集诱导脑缺血耐受

本实验旨在通过 MCAO 局灶性脑缺血模型,确立 UPS 途径在脑缺血损伤及异氟烷预处理不同时相的变化趋势及分布特点,明确 UPS 系统参与缺血损伤形成及神经保护作用的时程关系。

1 材料

1.1 实验动物

280-320 g 的 SD 大鼠,购于第四军医大学实验动物中心,严格按照第四军医大学实验动物中心实验操作指南进行。

1.2 主要试剂

试剂	公司
Mouse anti-conjugated ubiquitin antibody	美国 Chemicon 公司
Rabbit anti-free ubiquitin antibody	美国 Chemicon 公司
Rabbit anti- β -actin antibody	美国 Abcam 公司
羊抗兔 HRP 二抗	中国 CWBIO 公司
羊抗小鼠 HRP 二抗	中国 CWBIO 公司

其余同实验二。

1.3 主要仪器

同实验二。

2 方法

2.1 实验计划与分组

2.1.1 验证异氟烷预处理对局灶性脑缺血损伤 UPS 系统蛋白表达的时相变化。分组如下:

- A. 假手术组 (Sham group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 不进行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型;
- B. 缺血损伤 24 小时组 (MCAO 24 h group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 再灌注后 24 小时取材观察脑组织 ubiquitin 蛋白变化;
- C. 预处理保护 24 小时组 (IsoPC 24 h group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 恢复再灌注后 24 小时取材观察脑组织 ubiquitin 蛋白变化;
- D. 缺血损伤 72 小时组 (MCAO 72 h group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 再灌注后 72 小时取材观察脑组织 ubiquitin 蛋白变化;
- E. 预处理保护 72 小时组 (IsoPC 72 h group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 恢复再灌注后 72 小时取材观察脑组织 ubiquitin 蛋白变化;
- 2.1.2 在缺血再灌注后 24 h 和 72 h 动物断头取脑, 取海马 CA1 区进行免疫组化染色和 Western blot 检测, 观察在缺血损伤后不同时相结合型泛素和游离型泛素蛋白的表达变化。

2.2 异氟烷预处理

同实验二。

2.3 大鼠大脑中动脉阻塞模型 (MCAO)

同实验二。

2.4 脑血流监测

同实验二。

2.5 免疫组化染色

在再灌注损伤后 24 h、72 h 将大鼠灌注固定, 根据解剖学结构取含有海马 CA1

区脑组织，常规石蜡包埋进行切片。分别在每组和每个时间点都取 6 张石蜡切片进行免疫组化染色。PBS 冲洗加入 Ubiquitin 抗体，再用 PBS 洗涤加入二抗，进行显色。

2.6 Western blot

在缺血损伤后 24h 和 72h 时间点将动物麻醉后断头取脑，根据解剖学结构分离出皮层半暗带区，并利用液氮迅速冷冻。随后进行 BCA 方法进行蛋白定量以及 SDS 凝胶电泳、转膜、抗体孵育和发光（具体步骤参见实验一），抗体稀释浓度见下表。

表 6 实验三抗体稀释浓度比

抗体	抗体稀释比
Mouse anti-conjugated ubiquitin antibody	1:500
Rabbit anti-free ubiquitin antibody	1:500
Rabbit anti- β -actin antibody	1:3000
羊抗兔 HRP 二抗	1:4500
羊抗兔 HRP 二抗	1:4500

2.7 统计学分析

各组数据均以 Mean \pm SEM 表示，采用 SPSS13.0 进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）方法进行分析，组间的两两比较采用 Bonferroni Test。P<0.05 说明有统计学意义。

3 结果

3.1 异氟烷预处理可以减少由缺血损伤引起泛素蛋白的聚集

从海马 CA1 区脑组织切片的免疫组化染色结果显示，在 MCAO 手术后 24 h 和 72 h 后，泛素蛋白免疫活性明显增强，说明缺血再灌注损伤可以增加泛素蛋白的聚集（P<0.05）。然而在异氟烷预处理组中观察到，相比各自对应时间点的损伤组，其泛素蛋白免疫活性明显减少（P<0.05）。说明异氟烷预处理可以逆转由缺血损伤引起的泛素蛋白的聚集（图 14）。

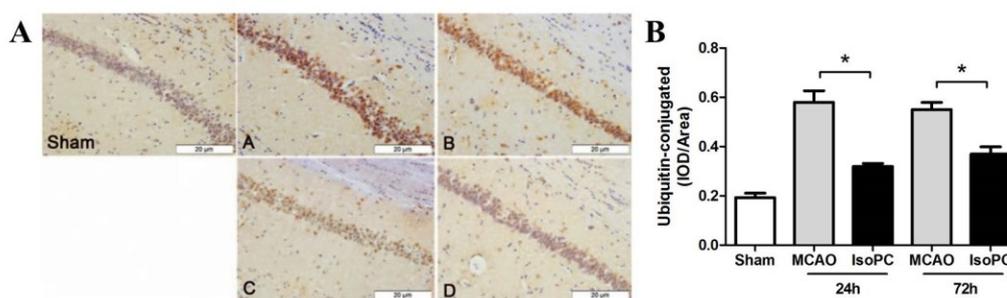


图 14 结合型泛素蛋白的免疫组化染色

(A) 再灌注损伤后 24 h 和 72 h 结合型泛素蛋白表达变化。A 为 MCAO 24 h 组, B 为 IsoPC 24 h 组, C 为 MCAO 72h 组, D 为 IsoPC 72 h 组; (B) 各组间 IOD/Area (integrated optical density) 比值。(* $P < 0.05$ vs. MCAO 组)

3.2 异氟烷预处理可以抑制结合型泛素蛋白而上调游离型泛素蛋白的表达

如图 15 所示, 大分子量的泛素蛋白为结合型泛素, 小分子量泛素蛋白为游离型泛素。在缺血损伤 24 小时和 72 小时后, 结合型泛素蛋白明显增加, 然而在异氟烷预处理组, 相比缺血损伤其结合型泛素表达有所下降 ($P < 0.05$)。然而, 相反的是, 在缺血再灌注损伤后, 小分子的游离型泛素蛋白的表达受到抑制, 异氟烷预处理可以上调游离型泛素蛋白的表达情况 ($P < 0.05$)。

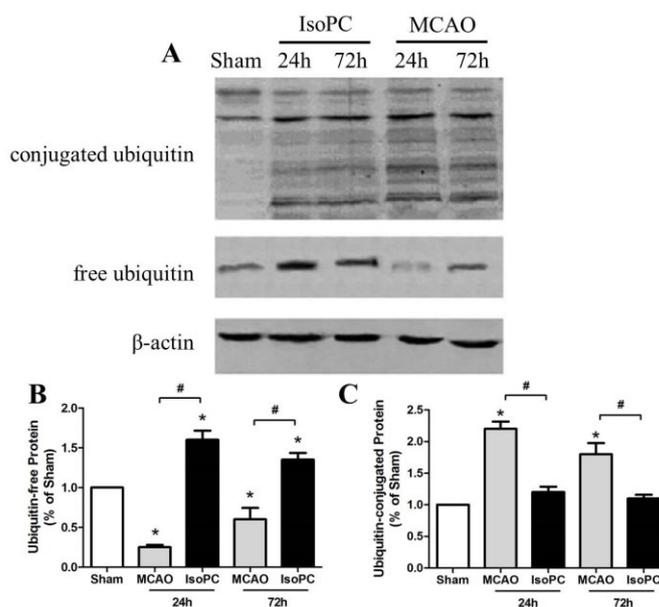


图 15 结合型泛素和游离型泛素在缺血损伤后的蛋白表达变化

(A) 再灌注损伤后 24 h 和 72 h 泛素系统蛋白表达变化; (B) 游离型泛素蛋白与内参蛋白的相对比值; (C) 结合型泛素蛋白与内参蛋白的相对比值。(* $P < 0.05$ vs. Sham 组; # $P < 0.05$ vs. MCAO 组)

4 讨论

实验三结果证实异氟烷预处理可以减少由缺血再灌注损伤引起的结合型泛素蛋白的聚集以及游离型泛素蛋白的减少。这些结果可能说明结合型泛素蛋白的聚集可能是异氟烷诱导神经保护效应的关键因素。

在缺血缺氧等应激状态下,细胞主要的信号转导通路就是常规蛋白质降解。泛素蛋白酶体系统是一些错误折叠蛋白质、异常蛋白质水解的主要途径。之前已有研究发现在脑缺血损伤后结合型泛素蛋白表达增加 60%^[176],最近也有研究者证实在应激状态下,泛素蛋白的聚集可以导致自噬的产生^[177],而缺血预处理可以抑制结合型泛素蛋白聚集,从而减少缺血半暗带泛素的表达^[178]。

实验三结果显示在再灌注损伤后 24h 出现脑组织内结合型泛素蛋白开始聚集,并且可以维持到损伤后 72h,重复给予异氟烷预处理可以明显减少结合型泛素蛋白表达而增加游离型泛素蛋白水平,说明多泛素化蛋白在异氟烷预处理诱导神经保护作用中发挥重要作用。

缺血再灌注损伤后多泛素化蛋白的聚集可能是导致神经元死亡的关键因素^[179, 180]。有关脑缺血所致 UPS 系统功能障碍的机制目前还不明确。脑缺血损伤后,缺血区脑组织中 E3 泛素连接酶 Parkin 表达明显减少,在缺血再灌注损伤后 1h, 3h, 6h 和 24h 该蛋白的表达分别降低到空白对照组的 60%, 36%, 33%和 25%。而缺血性损伤并未引起泛素 E2 连接酶 Ubc6 和 Ubc7 的表达变化,说明脑缺血再灌注期间神经元迟发性死亡与 Parkin 活性降低相关;相反的是,上调 Parkin 蛋白表达可具有神经保护作用^[181]。

已有文献报道,短暂性全脑缺血后海马等缺血敏感区多泛素化蛋白在突触后堆积的时间延长^[178],通过 UPS 途径影响突触可塑性,从而引起神经元蛋白酶体系统的功能障碍^[182, 183],导致选择性神经细胞损害。Yamashiro 等的研究显示,沙土鼠在短暂性全脑缺血后海马 CA1 区锥体神经元突变的泛素蛋白(Ubiquitin-B, UBB⁺)免疫活性增强,说明缺血后 CA1 区泛素蛋白表达增加,且与细胞发生死亡密切相关,因此推测突变泛素的选择性聚集与迟发性神经细胞损伤有关^[182]。

泛素蛋白酶体系统调控胞内信号转导通路多种功能蛋白之间的互相作用,脑缺

血损伤使信号转导通路异常，从而影响线粒体功能和蛋白质的合成，导致缺血性脑损伤。有证据结果显示，信号转导通路中各种蛋白激酶的磷酸化^[184]、去磷酸化^[185]与靶向调节蛋白的泛素化有直接关系，如蛋白激酶 C^[186]、Ca²⁺钙调素依赖性蛋白激酶^[187]、细胞周期素依赖性激酶^[188]等。因此，UPS 正常功能对维持细胞的长期生至关重要。

脑缺血损伤后的 UPS 蛋白系统功能障碍、蛋白酶体活性降低与细胞内蛋白聚集和迟发性神经元变性、死亡有关。虽然多数文献均证实缺血损伤后多泛素化蛋白聚集增加^[189]，但是结合型泛素蛋白表达增加是如何产生神经毒性导致神经元死亡，以及引起多泛素化蛋白聚集的机制并不清楚。实验三的结果也证实了异氟烷预处理是通过泛素蛋白酶体系统增强蛋白质的稳定性，从而发挥神经保护作用。

实验四 SUMO 系统介导参与异氟烷预处理诱导的神经保护作用

本实验旨在通过离体氧糖剥夺模型和在体局灶性脑缺血模型，确立 SUMO 途径在神经系统缺血缺氧损伤及异氟烷预处理后不同时相的表达变化情况及胞内分布特点，明确 SUMO 系统参与缺血缺氧损伤形成及神经保护作用的时程关系。

1 材料

1.1 细胞与实验动物

神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y),购于美国 Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)。

280-320 g 的 SD 大鼠，购于第四军医大学实验动物中心，严格按照第四军医大学实验动物中心实验操作指南进行。

1.2 主要试剂

试剂	公司
Rabbit anti-ubc9 antibody	美国 Epitomics 公司
Rabbit anti-conjugated sumo1 antibody	美国 Epitomics 公司
Rabbit anti-free sumo1 antibody	美国 Epitomics 公司
Rabbit anti-conjugated sumo2/3 antibody	美国 Abcam 公司
Rabbit anti-free sumo2/3 antibody	美国 Abcam 公司
Mouse anti- β -actin antibody	美国 Abcam 公司
羊抗兔 HRP 二抗	中国 CWBIO 公司
羊抗兔 HRP 二抗	中国 CWBIO 公司

其余同实验二。

1.3 主要仪器

其余同实验二。

2 方法

1.4 实验计划与分组

1.4.1 离体实验验证异氟烷预处理对氧糖剥夺损伤模型 SUMO 系统蛋白的时相变化趋势。分组如下：

- A. 假手术组 (Sham group): 细胞接受 98%氧气吸入 2 h, 不进行 OGD 氧糖剥夺损伤模型;
- B. 单纯吸烷组 (Iso group): 细胞接受 2%异氟烷和 98%氧气混合气体孵育 2 h, 24 h 后取材进行蛋白检测, 不进行 OGD 氧糖剥夺损伤模型;
- C. 氧糖剥夺损伤组 (OGD group): 细胞接受 98%氧气吸入 2 h, 24 h 后进行 OGD 氧糖剥夺损伤模型, 复氧 24 h 后取材进行蛋白检测;
- D. 异氟烷预处理保护组 (IsoPC group): 细胞接受 2%异氟烷和 98%氧气混合气体孵育 2 h, 24 h 后进行 OGD 氧糖剥夺损伤模型, 复氧 24 h 后取材进行蛋白检测;

1.4.2 在体实验验证异氟烷预处理对大鼠局灶性脑缺血损伤模型 SUMO 系统蛋白的时相变化趋势。分组如下：

- A. 假手术组 (Sham group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1h, 不进行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型;
- B. 单纯吸烷组 (Iso group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 24h 后断头取脑观察脑组织 SUMO 蛋白变化;
- C. 缺血损伤 4 小时组 (MCAO 4h group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1h, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120min, 再灌注后 4 小时取材观察脑组织 SUMO 蛋白变化;
- D. 预处理保护 4 小时组 (IsoPC 4h group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 恢复再灌注后 4 小时取材观察脑组织 SUMO 蛋白变化;

- E. 缺血损伤 24 小时组 (MCAO 24h group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1h, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 再灌注后 24 小时取材观察脑组织 SUMO 蛋白变化;
- F. 预处理保护 24 小时组 (IsoPC 24h group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 恢复再灌注后 24 小时取材观察脑组织 SUMO 蛋白变化;

1.5 异氟烷预处理

同实验二。

1.6 大鼠大脑中动脉阻塞模型 (MCAO)

同实验二。

1.7 脑血流监测

同实验二。

1.8 免疫荧光染色

表 6 实验四抗体稀释浓度比

抗体	抗体稀释比
Rabbit anti-ubc9 antibody	1:200, Abcam
Rabbit anti-conjugated sumo1 antibody	1:200, Abcam
Rabbit anti-free sumo1 antibody	1:200, Abcam
Rabbit anti-conjugated sumo2/3 antibody	1:100, Abcam
Rabbit anti-free sumo2/3 antibody	1:100, Abcam
羊抗兔 FITC 二抗	1:200, CWBIO
羊抗小鼠 Cy3 二抗	1:299, CWBIO

1.9 Western blot

同实验三。抗体稀释浓度见下表：

表 7 实验四抗体稀释浓度比

抗体	抗体稀释比
Rabbit anti-ubc9 antibody	1:1000, Abcam
Rabbit anti-conjugated sumo1 antibody	1:1000, Abcam
Rabbit anti-free sumo1 antibody	1:1000, Abcam
Rabbit anti-conjugated sumo2/3 antibody	1:1500, Abcam
Rabbit anti-free sumo2/3 antibody	1:1500, Abcam
Mouse anti- β -actin antibody	1:3000, Abcam
羊抗兔 HRP 二抗	1:4500, CWBIO
羊抗小鼠 HRP 二抗	1:4500, CWBIO

1.10 统计学分析

所有计量资料数据均以 Mean \pm SEM 表示，采用 SPSS13.0 进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）方法进行分析，组间的两两比较采用 Bonferroni Test。P<0.05 说明有统计学意义。

3 结果

3.1 离体实验

3.1.1 异氟烷预处理和氧糖剥夺损伤对 SUMO 系统蛋白表达的影响

3.1.1.1 在 OGD 损伤后 SUMO1 蛋白表达变化

如图所示，结合型 SUMO1 分子量为 90 kDa，游离型 SUMO1 分子量为 17 kDa。Western blot 结果显示单纯给予异氟烷吸入对 SUMO 含量没有明显影响（P>0.05），在 OGD 损伤后游离型 SUMO1 水平明显增加，但是异氟烷预处理组其表达水平有所下降；结合型 SUMO1 在氧糖剥夺损伤后的表达明显受到抑制，在 IsoPC 组异氟烷预处理可以上调结合型 SUMO1 蛋白的表达（P<0.05）。

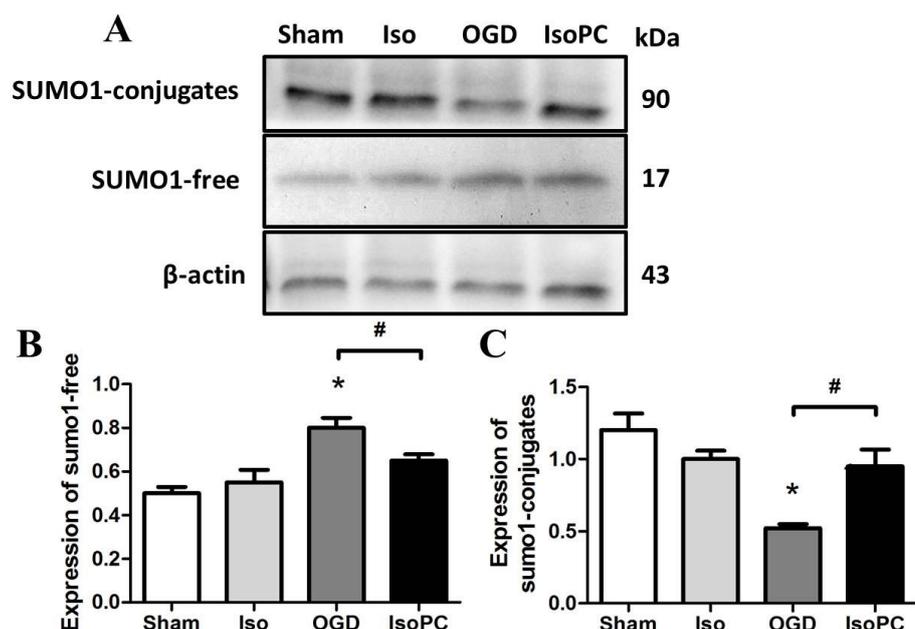


图 16 SUMO1 在缺血损伤后蛋白表达情况

(A) 再灌注损伤后 24 h 检测 SUMO-1 蛋白水平变化；(B) 游离型 SUMO-1 与内参蛋白的相对比值；(C) 结合型 SUMO-1 与内参蛋白的相对比值。（* $P < 0.05$ vs. Sham 组；# $P < 0.05$ vs. OGD 组）

3.1.1.2 在 OGD 损伤后 SUMO2/3 蛋白表达变化情况

SUMO2/3 与 SUMO1 的水平含量表达情况类似，大分子为结合型 SUMO2/3，小分子量为游离型 SUMO-2/3。Western blot 结果显示，在缺氧损伤后，游离型 SUMO-2/3 和结合型 SUMO2/3 的表达均明显升高（ $P < 0.05$ ），在异氟烷预处理后可以逆转氧糖剥夺损伤对 SUMO2/3 的聚集作用，呈下降趋势，具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。然而，单纯给予异氟烷吸入相对于 Sham 组相比，细胞 SUMO2/3 的表达没有明显的统计学差异（ $P > 0.05$ ）。

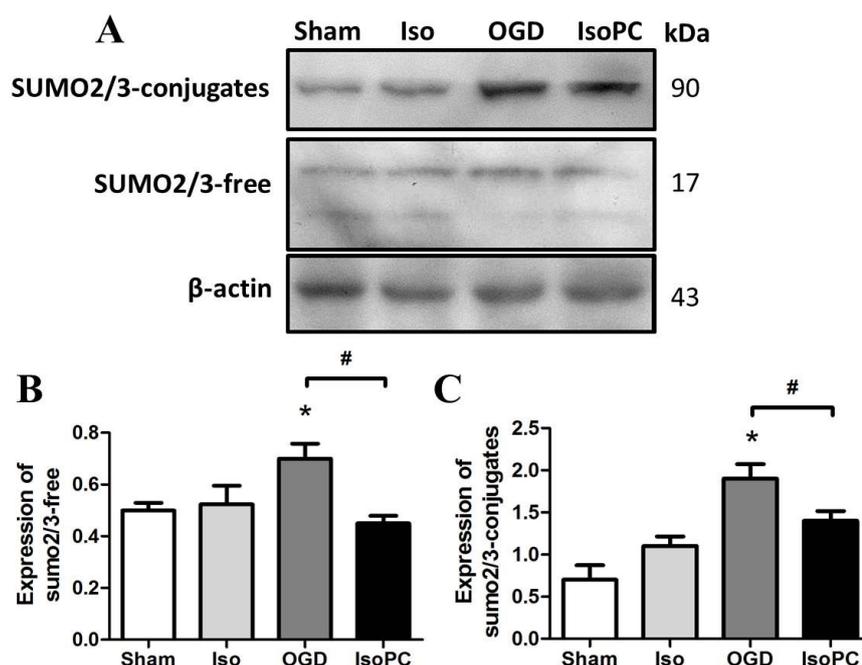


图 17 SUMO2/3 在缺血损伤后 24h 蛋白表达变化

(A) 再灌注损伤后 24h 检测 SUMO-2/3 蛋白表达变化; (B) 游离型 SUMO-2/3 蛋白与内参蛋白的相对比值; (C) 结合型 SUMO-2/3 蛋白与内参蛋白的相对比值。(* $P < 0.05$ vs. Sham 组; # $P < 0.05$ vs. OGD 组)

3.1.1.3 免疫荧光方法检测 SUMO 系统在神经元细胞的分布情况

如下面免疫荧光图所示, A 图为 SUMO1 蛋白表达分布情况, 通过 DAPI 对细胞核染色进行共定位, 可见 SUMO1 主要在胞核表达, 并且在 OGD 损伤后 SUMO1 免疫荧光活性减弱, 但是给予异氟烷预处理后 SUMO1 的表达恢复至正常水平。B 图为 SUMO2/3 分布情况, 可以 SUMO-2/3 与 SUMO1 不同, 主要在胞浆表达, 但是其变化趋势与 SUMO1 相同, 即氧糖剥夺损伤后 SUMO2/3 表达下降, 而异氟烷预处理可以逆转该蛋白受抑制的程度。

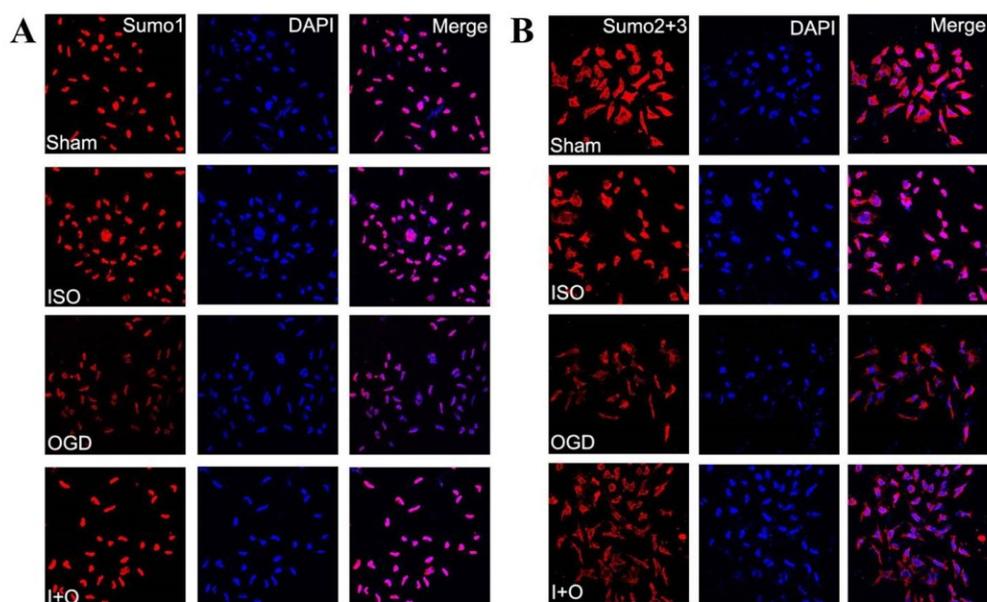


图 18 SUMO 蛋白系统在缺血损伤及异氟烷处理后的表达变化

(A) 再复氧损伤后 24h 检测 SUMO-1 蛋白表达分布； (B) 再复氧损伤后 24 h 检测 SUMO-2/3 蛋白表达分布。（红色荧光为 SUMO 蛋白，蓝色荧光为 DAPI）

3.1.2 氧糖剥夺损伤和异氟烷预处理对 Ubc9 蛋白时相表达变化的影响

3.1.2.1 Western blot 检测 Ubc9 蛋白的表达变化情况

单纯给予异氟烷吸入而不进行氧糖剥夺损伤，Ubc9 蛋白的表达与 Sham 组相比没有明显变化 ($P>0.05$)，说明异氟烷预处理对 Ubc9 蛋白表达没有影响。在细胞氧糖剥夺损伤后 Ubc9 表达明显下调 ($P<0.05$)，并且再灌注后 4 h 下降最为明显，而 OGD 24 h 组 Ubc9 的蛋白表达相较 4 h 组有所恢复。在 IsoPC 4 h 组比 OGD 4 h 组 Ubc9 的表达有所升高 ($P<0.05$)，但是并没有恢复到损伤前 Ubc9 的基础值；然而在缺血再灌注后 24 h，Ubc9 蛋白的表达在 IsoPC 24 h 组和 OGD 24 h 组比较没有明显统计学差异 ($P>0.05$ ，图 19)。

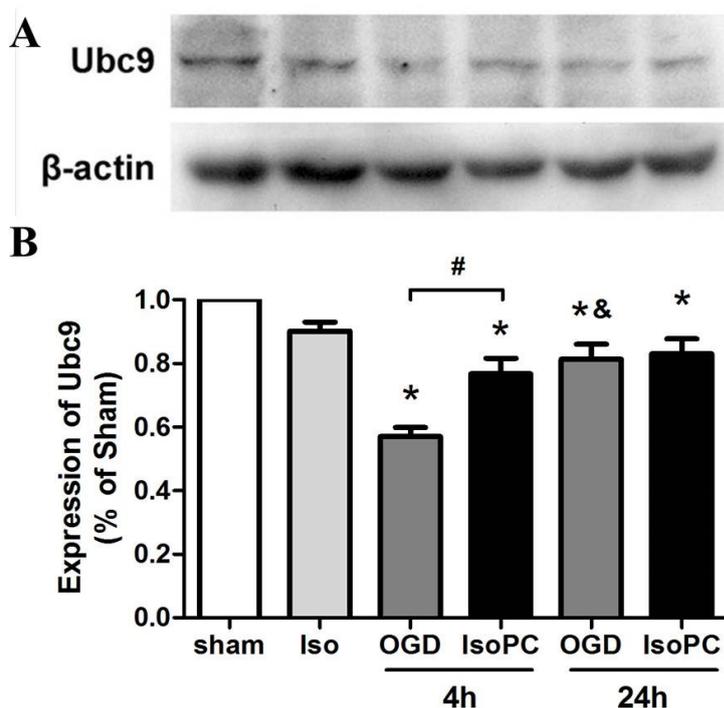


图 19 在缺血损伤后不同时间点 Ubc9 蛋白时相变化趋势

(A) 在复氧后 4 h 和 24 h 检测 Ubc9 蛋白时相表达变化；(B) Ubc9 蛋白与内参蛋白的相对比值。（* $P < 0.05$ vs. Sham 组；# $P < 0.05$ vs. OGD 4h 组；& $P < 0.05$ vs. 相对应时间点 OGD 组）

3.1.2.2 免疫荧光检测

如图 20 所示，绿色荧光 Ubc9 蛋白，与 DAPI 共定位显示 Ubc9 在胞浆和胞核均有所表达。从 A 图观察发现 OGD 损伤后，Ubc9 的表达明显减少，而异氟烷预处理可以逆转 Ubc9 的抑制作用。B 图是高倍镜图，可以观察到与 Sham 组相比，在单纯吸烷组，如白箭头所示，Ubc9 蛋白发生核转位，细胞核内 Ubc9 的免疫荧光活性明显增强；然而在 OGD 损伤后，出现核固缩等细胞形态的改变，而异氟烷预处理可以明显改善这种损伤作用。

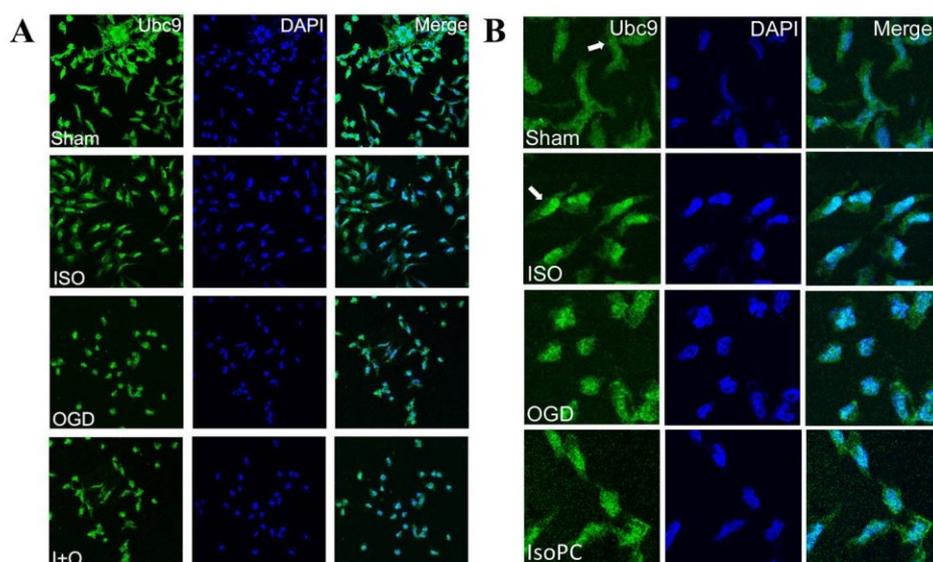


图 20 Ubc9 蛋白在缺血损伤及异氟烷处理后的细胞分布情况
(绿色荧光为 Ubc9 蛋白, 蓝色荧光为 DAPI)

3.2 在体实验

3.2.1 异氟烷预处理和局灶性脑缺血损伤对 SUMO 系统蛋白表达的影响

3.2.1.1 缺血损伤后不同时间点 SUMO-1 蛋白表达趋势的变化情况

与离体实验结果类似, 单纯给予异氟烷吸入没有明显改变结合型 SUMO-1 的表达, 在局灶性脑缺血再灌注损伤后 4 h 和 24 h, SUMO-1 的表达均有所下降, 并且在 4 h 达到最低峰 ($P < 0.05$), 给予异氟烷吸入保护作用可以上调 SUMO-1 的蛋白表达, 甚至在损伤 4 h 后恢复到正常水平 ($P < 0.05$)。然而, 在再灌注损伤后 24 h, 缺血损伤组和异氟烷预处理组 Ubc9 的表达没有明显的统计学差异 ($P < 0.05$, 图 21)。

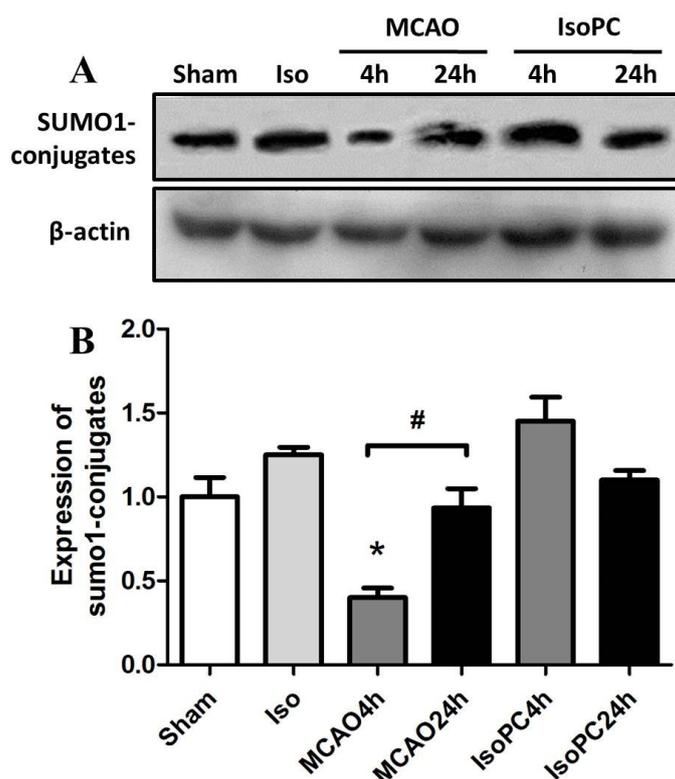


图 21 缺血再灌注损伤后 4 h 和 24 h 观察 SUMO-1 蛋白变化

(A) 再灌注损伤后不同时间点检测 SUMO-1 蛋白时相表达变化; (B) SUMO-1 蛋白与内参蛋白的相对比值。(* $P < 0.05$ vs. Sham 组; # $P < 0.05$ vs. MCAO 4h 组)

3.2.1.2 局灶性脑缺血损伤后结合型 SUMO2/3 在不同时相蛋白的表达变化

与离体实验的 Western blot 结果类似, Sham 组与 Iso 组之间结合型 SUMO-2/3 蛋白的表达无明显变化 ($P > 0.05$)。在缺血再灌注损伤 4 h, SUMO-2/3 蛋白的表达明显增加, 并达到高峰, 缺血后 24 h 有所下降, 但依然高于 Sham 组的蛋白表达 ($P < 0.05$)。然而在异氟烷预处理保护组, SUMO-2/3 的蛋白表达与缺血损伤组相比无明显统计学差异 ($P > 0.05$), 说明缺血损伤可以抑制结合型 SUMO-2/3 蛋白表达, 而异氟烷预处理对结合型 SUMO-2/3 蛋白表达没有明显影响。(图 22)

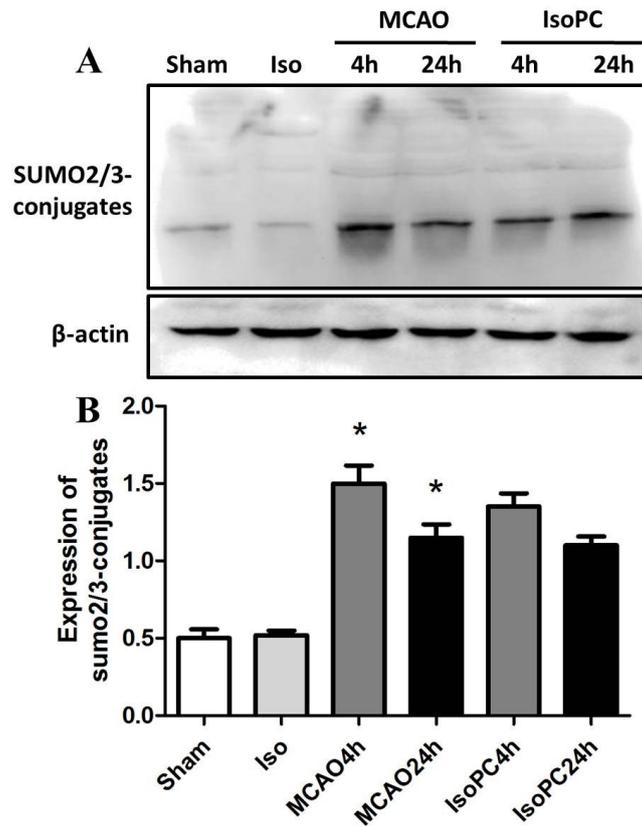


图 22 缺血再灌注损伤后 4 h 和 24 h 观察 SUMO-2/3 蛋白变化

(A) 再灌注损伤后不同时间点检测 SUMO-2/3 蛋白时相表达变化；(B) SUMO-2/3 蛋白与内参蛋白的相对比值。（* $P < 0.05$ vs. Sham 组；# $P < 0.05$ vs. MCAO 4h 组）

3.2.2. 异氟烷预处理和缺血损伤对 Ubc9 蛋白的影响

如下图所示，MCAO 缺血损伤可以下调 Ubc9 的表达 ($P < 0.05$)，在 MCAO 损伤前给予异氟烷连续吸入 5 天可以上调 Ubc9 的表达，逆转局灶性脑缺血再灌注模型的损伤作用（图 23）。

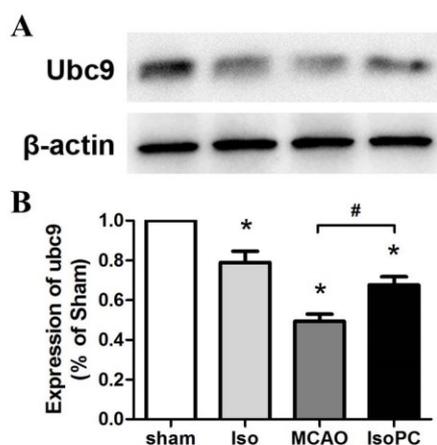


图 23 缺血再灌注损伤后 24h 观察 Ubc9 蛋白变化

(A) Western blot 检测 Ubc9 蛋白缺血后 24h 表达变化; (B) Ubc9 蛋白与内参蛋白的相对比值。(* $P < 0.05$ vs. Sham 组; # $P < 0.05$ vs. MCAO 组)

3.2.3 免疫荧光方法检测 SUMO 系统在大鼠脑组织的分布情况

取大鼠海马 CA1 区脑组织切片进行免疫荧光染色,绿色荧光为 SUMO 系统蛋白,红色荧光为 Ubc9 和 Ubiquitin 蛋白。

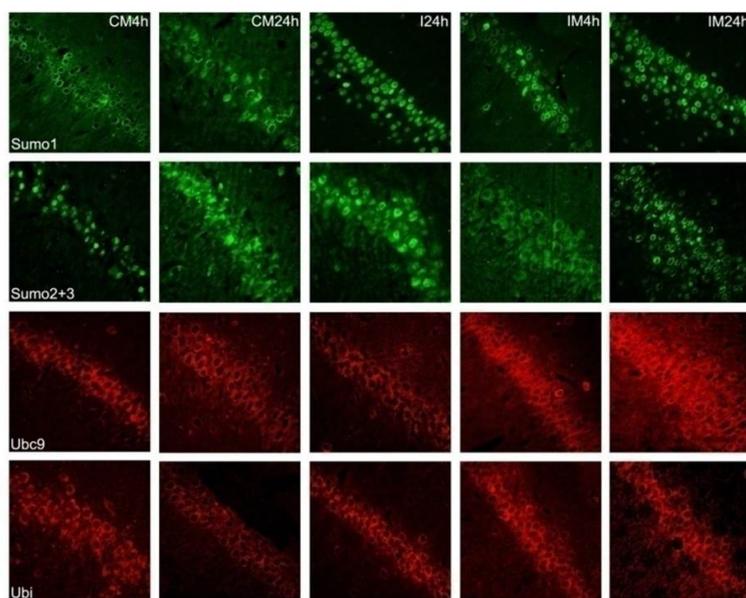


图 24 SUMO 系统蛋白在缺血损伤及异氟烷处理后的免疫荧光表达情况

CM4h 为 MCAO 术后 4 h 取材; CM 24h 为 MCAO 术后 24h 取材; I 24h 为单纯给予异氟烷吸入后 24 h 取材; IM 4h 为给予异氟烷预处理,再灌注损伤后 4h 取材; IM 24h 为给予异氟烷预处理,再灌注损伤后 24 h 取材。(绿色荧光为 SUMO 系统蛋白,红色荧光为 Ubc9 和 Ubiquitin)

4 讨论

实验四结果显示 SUMO 系统蛋白在缺血再灌注损伤和异氟烷预处理中扮演重要角色。无论是离体实验还是在体实验，在缺血缺氧损伤后 SUMO 系统蛋白表达水平开始变化，且 SUMO-1 和 SUMO-2/3 变化趋势截然相反。在缺血缺氧损伤后，结合型 SUMO-1 蛋白的表达明显降低，并且在 4 h 时达到最低，在再灌注时 24 h 逐渐恢复至正常水平，游离型 SUMO-1 的表达呈增加趋势；然而结合型 SUMO-2/3 的表达在缺血再灌注损伤后明显增加，并且同样在再灌注 4 h 后达到最高，之后逐渐恢复正常。给予异氟烷预处理可以逆转缺血缺氧引起的神经元损伤作用，通过上调结合型 SUMO-1 水平，抑制 SUMO-2/3 蛋白表达，增加蛋白质稳定性，从而发挥神经保护作用，诱导缺血耐受。

我们同时检测了 SUMO-1 的 E2 连接酶 Ubc9 的蛋白表达变化，通过免疫荧光和 Western blot 结果显示，该蛋白表达变化趋势和 SUMO-1 类似，即缺血再灌注损伤后 Ubc9 表达下降，离体免疫荧光结果显示异氟烷吸入可以使 Ubc9 蛋白发生核转位现象，使 Ubc9 在细胞核内大量聚集，因此异氟烷预处理可以逆转由缺血损伤引起的 Ubc9 蛋白表达的下调。

蛋白 SUMO 化过程可以维持蛋白质稳定性以及活化，研究证实绝大多数 SUMO 化蛋白的主要功能是调控转录因子，介导细胞信号转导通路的功能。例如 SUMO 特定蛋白酶介导 SUMO 化蛋白的去 SUMO 化过程可以激活腺甘受体、c-Jun 和细胞周期蛋白从而对肿瘤形成发挥重要作用^[190]。此外，c-Jun 和 c-Fos 的 SUMO 化可以下调转录因子 AP-1 复合体^[191]。然而不同的是，热休克蛋白 (heat-shock factor) HSF-1 α SUMO 化可以增加蛋白质稳定性和转录因子活性^[192]。同样的，缺血损伤可以使核转录因子 (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 激活，从而介导细胞介症反应、细胞存活以及凋亡^[193]。在生理状态下，NF- κ B 的活性受到抑制蛋白 I κ B 的抑制，在应激状态下 NF- κ B 活性增强 I κ B 发生磷酸化，使蛋白质泛素化增强从而导致蛋白酶体降解；小泛素蛋白相关修饰物与泛素位于相同的修饰位点，I κ B SUMO 化可以抑制蛋白质泛素化过程减少蛋白质降解，维持蛋白质稳定性。然而，Hunag 等人报道 NF- κ B 的 SUMO 化

过程对于 NF- κ B 的调节具有双向性，在不同条件下可以使 NF- κ B 激活也可以使 NF- κ B 的活性受到抑制^[194]。

以上文献均证实蛋白质 SUMO 化过程是胞内蛋白质维持活性和稳定性的重要因素，缺氧损伤所引起的结合型 SUMO 蛋白增加和自胞浆向胞核的转位，可能具有某种程度上的细胞保护作用。那么是否 SUMO 化蛋白的增加是诱导缺血耐受的重要机制呢？在后续实验中，通过调控 SUMO E2 连接酶在神经细胞中的表达，进一步证实 UPS/SUMO 系统在异氟烷预处理诱导神经保护效应中的机制研究。

实验五 调控 Ubc9 对异氟烷预处理的神经保护作用影响研究

本实验旨在通过转染过表达 Ubc9 的慢病毒或者小干扰 RNA，通过比较缺血缺氧损伤后神经元活力或活性以及脑梗死体积的改变，明确 Ubc9 在参与脑缺血损伤形成及保护效应中的相互关系及功能影响。

1 材料

1.1 细胞与实验动物

神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 和 293T 细胞，购于美国 Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)。

280-320g 的 SD 大鼠，购于第四军医大学实验动物中心，严格按照第四军医大学实验动物中心实验操作指南进行。

1.2 主要试剂

试剂	公司
小干扰 RNA	德国 Qiagen 公司
乱序 RNA	德国 Qiagen 公司
脂质体 2000	美国 Gibco 公司
过表达病毒	上海吉玛公司
RNA 提取试剂盒	上海 Invitrogen 公司
逆转录试剂盒	Fermentas
qPCR 试剂	Bio-Rad
引物设计	上海 Invitrogen 公司

其余同实验二。

1.3 主要仪器

仪器	公司
微量注射器	深圳 RWD 公司
微量注射泵	深圳 RWD 公司
立体定位仪	深圳 RWD 公司

2 方法

2.1 实验计划与分组

2.1.1 离体实验验证慢病毒转染效率和 siRNA 干扰效率

- A. 正常对照组 (Ctr group): 正常细胞不给予任何病毒或 siRNA 进行孵育;
- B. 慢病毒过表达组 (Lentivirus group): 将构建成功的含 Ubc9 过表达的慢病毒载体对 SH-SY5Y 细胞进行感染, 建立稳定过表达 Ubc9 的细胞系;
- C. 小干扰 RNA 组 (siRNA group): 将构建成功的敲除 Ubc9 表达的小干扰 RNA 加入 SH-SY5Y 细胞培养基中, 48 h 后取材进行蛋白检测;

2.1.2 离体实验验证 Ubc9 蛋白在异氟烷预处理对氧糖剥夺损伤的神经保护效应中的作用。

- A. 假手术组 (Sham group): 诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞接受 98% 氧气吸入, 不进行氧糖剥夺损伤, 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测;
- B. 单纯吸烷组 (Iso group): 诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞给予 2% 异氟烷与氧气混合吸入预处理 2 h, 不进行氧糖剥夺损伤, 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测;
- C. 氧糖剥夺损伤组 (OGD group) 将诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞接受 98% 氧气吸入 1h, 之后进行氧糖剥夺损伤 4 h 处理, 复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测;
- D. 异氟烷预处理组 (IsoPC group): 诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞接受 2% 异氟烷与 98% 氧气混合吸入预处理 2 h, 之后进行氧糖剥夺 4 h, 复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测;
- E. 小干扰 RNA+氧糖剥夺损伤组 (siRNA+OGD group): 在诱导分化后 SH-SY5Y 细胞培养基中加 siRNA, 24 h 后接受 98% 氧气吸入 2 h, 24 h 后进行氧糖剥夺 4 h, 复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测;

- F. 小干扰 RNA+异氟烷预处理组 (siRNA+IsoPC group): 在诱导分化后 SH-SY5Y 细胞培养基中加 siRNA, 24 h 后接受 2%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理 2h, 24 h 后进行氧糖剥夺 4 h, 复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测;
- G. 过表达慢病毒+氧糖剥夺损伤组 (Lenti+OGD group): 建立稳定过表达 Ubc9 的 SH-SY5Y 细胞系, 诱导分化成类神经元细胞后接受 98%氧气吸入 2 h, 24 h 后进行氧糖剥夺 4 h, 复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测;
- H. 过表达慢病毒+异氟烷预处理组 (Lenti+IsoPC group): 建立稳定过表达 Ubc9 的 SH-SY5Y 细胞系, 诱导分化成类神经元细胞后接受 2%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理 2 h, 24 h 后进行氧糖剥夺 4 h, 复氧 24 h 后进行细胞活性和凋亡检测。

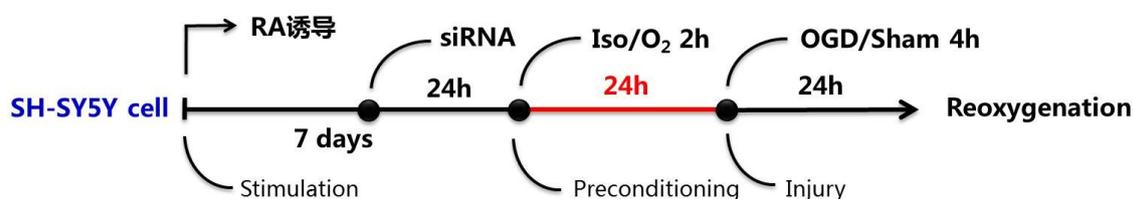


图 25 实验五离体实验方案

2.1.3 在体实验验证侧脑室微注射 siRNA 对脑组织敲除 Ubc9 水平的干扰效率

- A. 假手术组 (Sham group): 将 siRNA 溶剂微量注射于侧脑室, 48 h 后取材观察脑组织 Ubc9 水平含量变化;
- B. 乱序对照组 (siRNA-c group): 将乱序 siRNA (Allstar negative) 微量注射于侧脑室, 48 h 后取材观察脑组织 Ubc9 水平含量变化;
- C. 小 RNA 干扰组 (siRNA group): 将 siRNA-Ubc9 微量注射于侧脑室, 48 h 后取材观察脑组织 Ubc9 水平含量变化。

2.1.4 在体实验验证 Ubc9 蛋白在异氟烷预处理对局灶性脑缺血损伤的脑保护效应中的作用。

- A. 假手术组 (Sham group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 不进行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型, 24 h 后进行 TTC 染色和神经功能学评分;
- B. 单纯吸烷组 (Iso group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 每天 1 h, 但不进行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型, 24 h 后进行 TTC 染

- 色和神经功能学评分;
- C. 缺血损伤组 (MCAO group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 再灌注 4 h 后进行 TTC 染色和神经功能学评分;
- D. 异氟烷预处理组 (IsoPC group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 之后行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型 120 min, 恢复再灌注, 再灌注 4 h 后进行 TTC 染色和神经功能学评分;
- E. 小干扰 RNA+缺血损伤组 (siRNA+MCAO group): 大鼠接受 98%氧气连续吸入 5 天, 每天 1 h, 在行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型前 24 h 侧脑室微注射 siRNA-Ubc9, 再灌注 4h 后进行 TTC 染色和神经功能学评分;
- F. 小干扰 RNA+异氟烷预处理组 (siRNA+IsoPC group): 大鼠接受 1.5%异氟烷与 98%氧气混合吸入预处理连续 5 天, 每天 1 h, 在行 MCAO 大脑中动脉阻塞缺血模型前 24 h 侧脑室微注射 siRNA-Ubc9, 再灌注 4 h 后进行 TTC 染色和神经功能学评分;

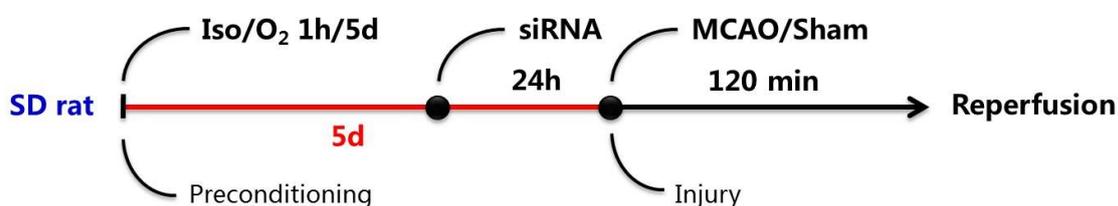


图 26 实验五在体实验方案

2.2 慢病毒载体的构建和鉴定

2.2.1 载体的构建和鉴定

根据 mRNA 序列设计引物, 上游引物 5'-CACACGCGTTTATGAGGGCGCAAAC TTCTTG-3' (Mlu I 酶切位点); 下游引物 5'-CTAGGGATCCATGTCGGGGATCGCCCT CAGC-3' (BamH I 酶切位点)。构建至过表达载体 pWPT-GFP, 转化至感受态细胞, 用青霉素进行筛选培养。得到筛选后的阳性克隆进行测序, 选取符合的扩增片段进行测序验证。

2.2.2 过表达慢病毒包装

将 293T 细胞按照 6×10^6 的密度接种于培养皿中。处于对数生长期时，将构建好的过表达慢病毒载体和包装病毒在冰上混合后加入转染试剂脂质体 2000 (Lipofectamine 2000)，在冰上孵育 20 min 完全混合。将混合液加入细胞培养基，在培养箱于 37°C 继续培养 6-8 h。弃去原有培养基，用 PBS 轻柔洗涤，更换新培养液。在转染过表达病毒后 48-72 h 后，在显微镜下观察到转染成功的细胞呈绿色荧光，说明病毒转染成功。收集细胞上清液，离心后过滤得到慢病毒浓缩液，置于 -80°C 保存。

2.2.3 建立稳定表达 Ubc9 的 SH-SY5Y 细胞系

将细胞接种于培养皿中，待细胞密度达到约 70%-80% 后，将 Ubc9 过表达的慢病毒加入 DMEM 培养基中，感染复数(MOI)= 1×10^6 v.g./cell。

2.3 siRNA 的构建

实验所需要的 siRNA 由德国 Qiagen 公司设计合成。

2.3.1 离体实验中 siRNA 的构建

实验分为 5 组：空白对照组(negative control)、siRNA-1 组、siRNA-2 组、siRNA-3 组、siRNA-4 组，siRNA 序列见于表 7。将 siRNA 溶解后与脂质体 2000 进行混合，按照说明书用量加入培养基中。在细胞培养箱中 37°C 培养 48h 后取材检测蛋白含量。结果显示 siRNA-3 干扰效率最强，因此在后续实验中选择 siRNA-3 进行干预。

表 7 siRNA 序列

siRNA	Product name	Target sequence
siRNA-1	Hs_Ube21_1	5'-AAGGGATTGGTTTGGCAAGAA-3'
siRNA-2	Hs_Ube21_6	5'-CAAGAAGTTTGCGCCCTCATA-3'
siRNA-3	Hs_Ube21_8	5'-ACCACCATTATTTACCCGAA-3'
siRNA-4	Hs_Ube21_9	5'-AAGGGTCCGAGCACAAGCCAA-3'

2.3.2 在体实验中 siRNA 的构建

实验分为 3 组：空白对照组、siRNA-1 组、siRNA-2 组。将 siRNA 或溶剂微注射入大鼠侧脑室，转染 48 h 后，取材检测脑组织中 Ubc9 表达。认为 siRNA-1 干扰效率最好，因此在后续实验中采用 siRNA-1。

siRNA-1: Rn_Ube2i_2

Target sequence: 5'-GCGGCCAGCTATTACGATCAA-3'
Sense strand: 5'-GGCCAGCUAUUACGAUCAATT-3'
Antisense strand: 5-UUGAUCGUAUAGCUGGCCGC-3'

siRNA-2: Rn_Ube2i_4

Target sequence: 5'-TTAGAGTAAATAAACTGTTTA-3'
Sense strand: 5'-AGAGUAAAUAACUGUUUATT-3'
Antisense strand: 5-UAAACAGUUUAUUUACUCUAA-3'

2.4 异氟烷预处理

离体实验部分同实验一，在体实验部分同实验二。

2.5 氧糖剥夺损伤模型（OGD）

同实验一。

2.6 大鼠大脑中动脉阻塞模型

同实验二。

2.7 侧脑室注射

在缺血再灌注前 1 天进行侧脑室注射。手术前 12 小时禁食，可自由饮水。给予大鼠腹腔注射 10%水合氯醛（300 mg/kg）麻醉动物，将大鼠在立体定位仪上固定，在头顶部行正中矢状切口，分离组织暴露前囟 Bregma 点。侧脑室定位以 Bregma 点为坐标，向后（AP）：-0.9 mm，向右（ML）：1.3 mm，向下（DV）：-4.2 mm。颅骨钻打孔后，用微量注射器缓慢持续泵入 siRNA-Ubc9 或乱序 siRNA 7.5 μ l，整个泵注过程持续 10 min，泵注完成后停留 5 min，缓慢拔出注射器，将针眼用骨蜡封住，缝合切口。

2.8 脑血流监测

同实验二。

2.9 Western blot

离体实验同实验三；在体实验同实验四。

2.10 MTT 比色法

同实验一。

2.11 流式细胞仪检测

同实验一。

2.12 动物神经行为学评分

同实验二。

2.13 脑梗死容积

同实验二。

2.14 统计学分析

该部分实验数据均采用 SPSS13.0 进行统计学分析，其中计量资料均以平均数±标准误（Mean±SEM）表示，神经功能学评分（NBS）以中位数（Median）四分位间距表示。各组间数据采用单因素方差分析（ONE-WAY ANOVA）方法进行组间比较，组间两两比较采用 Bonferroni Test 分析。当 $P < 0.05$ 时认为有统计学差异。

3 结果

3.1 验证过表达慢病毒和 siRNA 对 SH-SY5Y 细胞的转染效率

3.1.1 Ubc9 基因克隆的 PCR 结果

如图 27 所示为 Ubc9 基因的 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果，与 Marker 参照与预期一致，说明慢病毒载体构建成功。

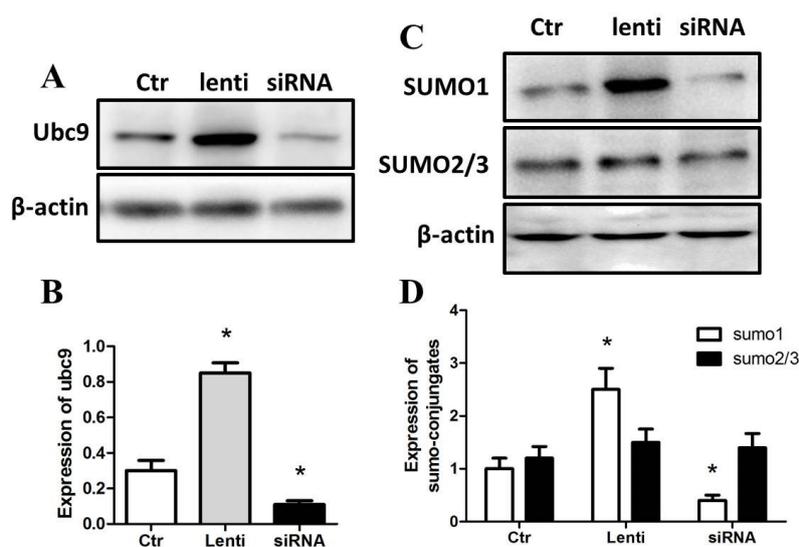


图 29 siRNA 和过表达病毒对 Ubc9 和 SUMO 蛋白的表达影响

(A) Western blot 检测转染 siRNA 和慢病毒后 Ubc9 的表达; (B) Ubc9 蛋白的灰度分析; (C) 在转染慢病毒和 siRNA 后 SUMO 系统的蛋白表达; (D) SUMO 系统蛋白的灰度分析。Ctrl 为正常细胞 Control 组, Lenti 为过表达慢病毒 lentivirus 组, siRNA 为敲除组。(* $P < 0.05$ vs. Ctrl 组)

3.2 上调或下调 Ubc9 的表达可以改变异氟烷预处理的神经保护作用

采用 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达观察细胞的凋亡水平, 以及 MTT 方法检测细胞活性。结果显示异氟烷预处理可以减小氧糖剥夺损伤引起的细胞凋亡的增加, 以及提高细胞活性 ($P < 0.05$)。在培养基中加入 siRNA, 使 Ubc9 蛋白表达下调, 可以加重氧糖剥夺模型对细胞的损伤作用, 使细胞对缺氧损伤的敏感性增加 ($P < 0.05$ vs. OGD 组); 此外 siRNA-Ubc9 可以逆转异氟烷预处理对 OGD 损伤的神经保护作用 ($P < 0.05$ vs. IsoPC 组)。但是当细胞转染慢病毒, 使 SH-SY5Y 细胞稳定过表达 Ubc9, Lenti+OGD 组细胞活性明显高于 OGD 组, 并且从 caspase-3 水平表达情况来看, Lenti+OGD 细胞凋亡程度明显减少 ($P < 0.05$ vs. OGD 组)。这一部分结果说明, 上调类神经元细胞 Ubc9 的表达可以发挥一定的神经保护作用, 逆转细胞 OGD 模型的损伤作用; 下调 Ubc9 的表达可以加重细胞氧糖剥夺的损伤, 使细胞对缺氧损伤敏感性增加, 并且逆转异氟烷预处理对 OGD 损伤的保护作用。

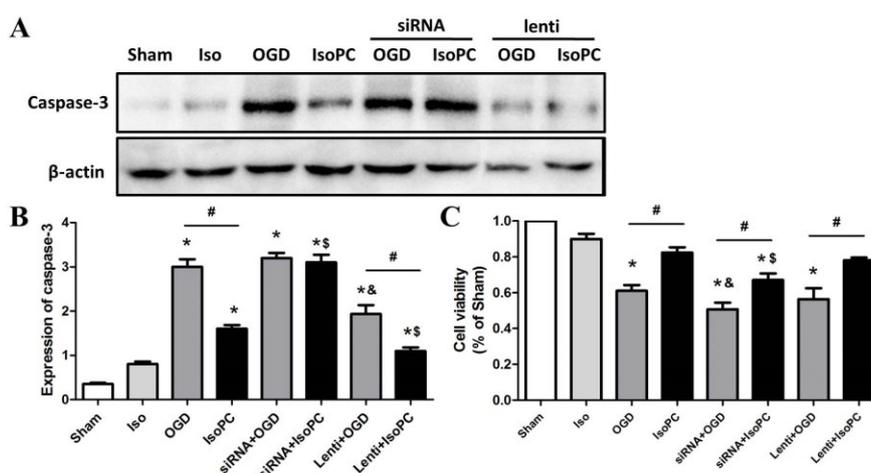


图 30 上调或下调 Ubc9 表达对异氟烷预处理神经保护作用的影响

(A) Western blot 检测 OGD 损伤后 24h caspase-3 蛋白的表达情况；(B) caspase-3 蛋白表达的灰度分析值；(C) MTT 法检测氧糖剥夺损伤后 24 h SH-SY5Y 的细胞活性。
 (* $P < 0.05$ vs. Sham 组；# $P < 0.05$ vs. 相对应 OGD 组；& $P < 0.05$ vs. 单纯 OGD 组； $^{\$}P < 0.05$ vs. IsoPC 组)

3.3 大鼠侧脑室注射 siRNA 后对脑组织 Ubc9 含量的影响

在大鼠单侧侧脑室注射 7.5 μ l siRNA，利用 Western blot 方法观察 Ubc9 蛋白表达情况（图 31）。在 siRNA 注射 48 h 后，大鼠脑组织内 Ubc9 蛋白含量减少约 40%，与 Sham 组相比有统计学意义 ($P < 0.05$)，其乱序对照组（siRNA-control）对大鼠脑内 Ubc9 的表达没有明显影响 ($P > 0.05$)。

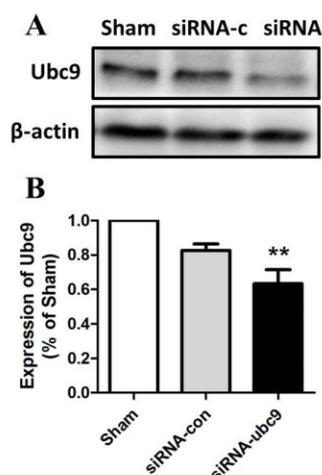


图 31 侧脑室注射 siRNA 对脑组织 Ubc9 表达的影响

(A) siRNA 注射后 48 小时检测 Ubc9 蛋白水平含量；(B) Ubc9 蛋白表达的灰度分析。
 ($P < 0.05$ vs. Sham 组)

3.4 生理学参数变化

在实验过程中不同时间点检测各组动物的生理学参数,包括 pH 值、PaO₂、PaCO₂。各组动物在不同时间点检测无明显统计学差异 ($P>0.05$)。

表 8 生理学参数

	pH 值	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)
麻醉结束			
Sham	7.39±0.02	210±9	34±5
MCAO	7.40±0.04	209±9	35±5
IsoPC	7.39±0.02	210±11	36±4
siRNA+MCAO	7.40±0.03	211±10	36±6
siRNA+IsoPC	7.40±0.04	210±11	36±6
MCAO 开始			
Sham	7.38±0.02	104±9	36±6
MCAO	7.40±0.03	104±9	35±4
IsoPC	7.38±0.04	105±10	35±5
siRNA+MCAO	7.39±0.04	106±11	34±5
siRNA+IsoPC	7.41±0.03	104±11	34±6
再灌注开始			
Sham	7.39±0.03	104±10	34±3
MCAO	7.41±0.04	104±8	36±6
IsoPC	7.40±0.04	105±8	35±4
siRNA+MCAO	7.38±0.02	105±11	35±5
siRNA+IsoPC	7.40±0.03	104±10	35±5

3.5 下调脑组织 Ubc9 的表达可以逆转异氟烷预处理的脑保护作用

缺血再灌注后 24 h 进行 TTC 染色和神经功能学评分,可以异氟烷预处理组动物比 MCAO 损伤组动物脑梗死面积明显减小,并且神经功能学评分明显高于 MCAO

缺血损伤组 ($P<0.05$)。但是注射 siRNA 下调脑组织 Ubc9 的表达, 使 OGD 损伤后脑梗死容积增加, 神经功能学评分降低 ($P<0.05$ vs. OGD 组), 进一步加重 MCAO 对脑组织的损伤作用; 此外, 注射 siRNA 后, 七氟烷预处理的神保护作用消失, 表现为 siRNA+IsoPC 组神经功能学评分降低, 脑梗死容积增加 ($P<0.05$ vs. IsoPC 组)。说明下调脑组织 Ubc9 的表达可以增加大鼠对脑缺血再灌注损伤的敏感性, 并且逆转异氟烷预处理的神保护作用。

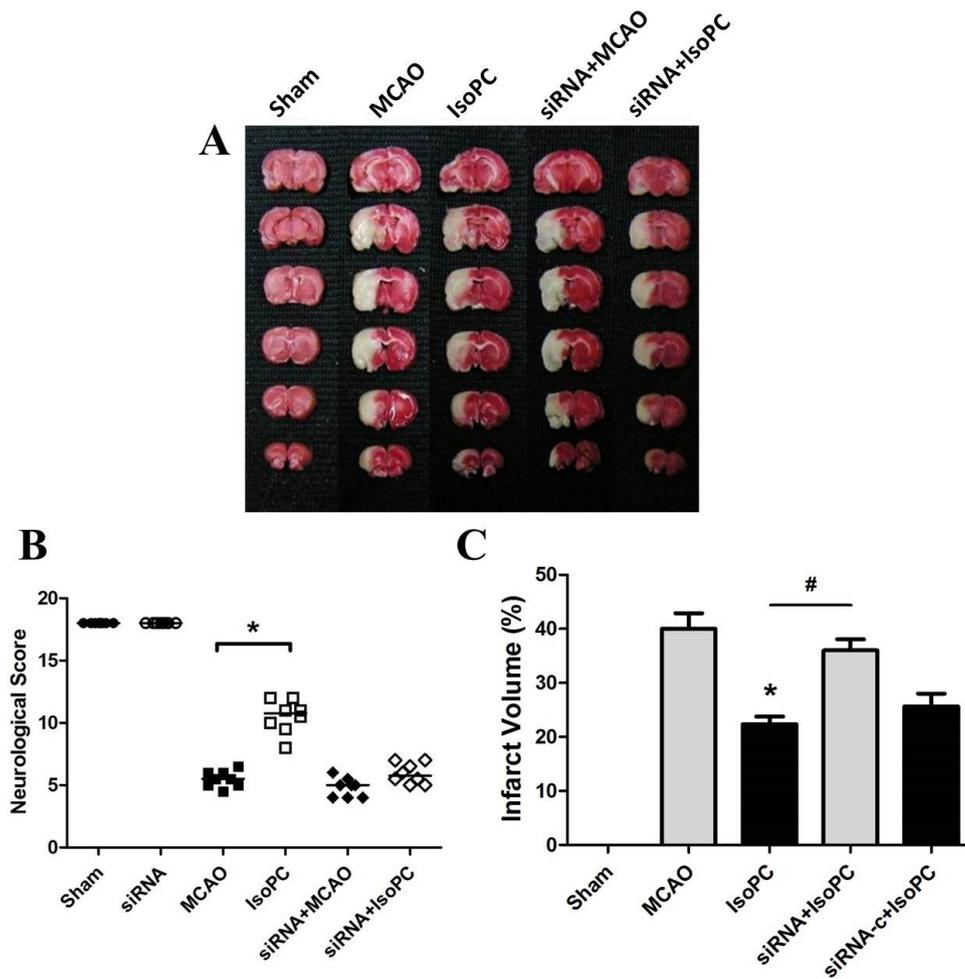


图 32 下调脑组织 Ubc9 的表达对异氟烷脑保护作用的影响

(A) 缺血再灌注损伤后 24 h 大鼠脑组织 TTC 染色; (B) 大鼠脑梗死容积百分比; (C) 再灌注后 24 h 大鼠神经功能学评分。 (* $P<0.05$ vs. MCAO 组, # $P<0.05$ vs. IsoPC 组)

4 讨论

实验五通过调控 SUMO 系统 E2 连接酶 Ubc9 在神经元或脑组织中的表达, 观察异氟烷预处理的神经保护作用。在离体实验中采用转染过表达慢病毒载体建立稳定过表达 Ubc9 的 SH-SY5Y 细胞系, 以及小干扰 RNA 基因技术下调 Ubc9 在类神经元细胞中的表达, 细胞活性及细胞存活率结果显示: 上调 Ubc9 表达可模拟神经保护效应; 下调 Ubc9 可增加细胞死亡率增加神经元对缺氧损伤的敏感性, 并且可逆转异氟烷预处理的神经保护作用。在体实验中通过给予大鼠侧脑室注射小干扰 RNA 下调脑组织中 Ubc9 水平含量, 脑梗死容积和神经功能学评分结果均显示: 下调 Ubc9 使大鼠局灶性脑缺血损伤后脑梗死容积增大, 损伤程度加重。

Ubc9 是 SUMO 途径中 E2 连接酶, 对于 SUMO 蛋白的调控具有重要作用。实验五结果显示, 通过慢病毒和 siRNA 调控 Ubc9 的表达, 同样可以影响神经元 SUMO-1 的水平含量, 而 SUMO-2/3 的表达没有明显变化, 说明 Ubc9 可以调节 SUMO-1 的蛋白合成。在对冬眠松鼠的研究中发现^[13], 在冬眠苏醒期, 与基础值相比动物体内 Ubc9 水平含量增加 2-3 倍, 而结合型 SUMO 蛋白水平增加高达近 30 倍, 说明大量增加的结合型 SUMO 蛋白诱导缺血耐受抵抗冬眠期脑血流量的下降。

以往有研究者成功构建过表达 Ubc9 的转基因小鼠, 发现其全脑 SUMO 蛋白含量明显增加, 并且与野生型小鼠相比, Ubc9 转基因小鼠对于 pMCAO 缺血损伤耐受程度更强, 脑梗梗容积减少, 脑组织损伤程度改善^[195]。高浓度 E2 连接酶对于多泛素化蛋白和 NEDD (Neural precursor cell-expressed Developmentally Downregulated-8) 产生抑制作用^[196-198]。最近有研究发现 Ubc9 也可以调控游离 E1 异质二聚体酶 (SAE1/SAE2) 阻止其构象改变, 从而抑制 SUMO 腺甘酰化作用以及 SUMO 硫代酯构象形成。Ubc9 对 SUMO 途径调控作用最早被发现并不是普通野生型 Ubc9 蛋白, 而是负显性 Ubc9 突变体 (dominant negative Ubc9 mutant, Ubc9-DN), 它并不具备 E2 连接酶的活性^[199-203]。由于 Ubc9-DN 与 SUMO E1 酶结合抑制 SUMO 化过程, 因此当脑组织内 Ubc9-DN 过表达, 则全脑的结合型 SUMO 蛋白明显减少。

总的来说, SUMO 化途径广泛影响机体的生理病理过程, 参与多种细胞信号转导通路, 基因表达, 染色体结构的重塑, 蛋白质间相互调控, 蛋白质功能的改变, 蛋白质在胞内的定位以及维持基因组的完整性^[204]。因此, SUMO 系统对于维持细胞内环境和机体稳态具有重要作用。

小 结

本研究采用 SH-SY5Y 细胞氧糖剥夺 (OGD) 模型和 SD 大鼠局灶性脑缺血 (MCAO) 模型, 首先离体观察异氟烷预处理对于类神经元细胞氧糖剥夺及复氧损伤后活性和细胞活力的影响, 并在体评估异氟烷预处理对于大鼠脑梗死容积和神经功能学评分的影响。在此基础上研究了异氟烷预处理和缺血缺氧损伤对 UPS/SUMO 系统各类蛋白表达水平的改变, 并进一步通过转染过表达慢病毒和小干扰 RNA 验证调控 SUMO 连接酶 Ubc9 改变 SUMO 化水平在异氟烷预处理神经保护效应中的影响。该实验的主要结论如下:

1. 单次异氟烷预处理对氧糖剥夺损伤的类神经元细胞具有神经保护作用。
2. 多次异氟烷预处理对局灶性脑缺血损伤的大鼠具有脑保护效应。
3. UPS/SUMO 途径的蛋白调控参与缺血缺氧损伤和异氟烷预处理神经保护作用的形成过程。
4. 上调 SUMO 连接酶 Ubc9 表达, 增强 SUMO 化进程, 可模拟神经保护效应, 下调其含量可逆转异氟烷的神经保护作用。

参考文献

- [1] Yin X, Su B, Zhang H, et al. TREK1 activation mediates spinal cord ischemic tolerance induced by isoflurane preconditioning in rats. *Neurosci Lett*, 2012, 515(2):115-120.
- [2] Zhang HP, Yuan L B, Zhao R N, et al. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection by attenuating ubiquitin-conjugated protein aggregation in a mouse model of transient global cerebral ischemia. *Anesth Analg*, 2010, 111(2):506-514.
- [3] Chen Y, Nie H, Tian L, et al. Sevoflurane preconditioning-induced neuroprotection is associated with Akt activation via carboxy-terminal modulator protein inhibition. *Br J Anaesth*, 2015, 114(2):327-335.
- [4] Yang Q, Yan W, Li X, et al. Activation of canonical notch signaling pathway is involved in the ischemic tolerance induced by sevoflurane preconditioning in mice. *Anesthesiology*, 2012, 117(5):996-1005.
- [5] Lo E H. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol*, 2008, 153 Suppl 1:S396-S405.
- [6] Vogel G. Nobel Prizes. Gold medal from cellular trash. *Science*, 2004, 306(5695):400-401.
- [7] Jung E S, Hong H, Kim C, et al. Acute ER stress regulates amyloid precursor protein processing through ubiquitin-dependent degradation. *Sci Rep*, 2015, 5:8805.
- [8] Jiang S, Park D W, Gao Y, et al. Participation of proteasome-ubiquitin protein degradation in autophagy and the activation of AMP-activated protein kinase. *Cell Signal*, 2015, 27(6):1186-1197.
- [9] Tai H C, Schuman E M. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(11):826-838.
- [10] Thompson S J, Loftus L T, Ashley M D, et al. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(1):90-95.
- [11] Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12):947-956.
- [12] Martin S, Wilkinson K A, Nishimune A, et al. Emerging extranuclear roles of protein

- SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 2007,8(12):948-959.
- [13] Lee Y J, Miyake S, Wakita H, et al. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(5):950-962.
- [14] Lee Y J, Mou Y, Klimanis D, et al. Global SUMOylation is a molecular mechanism underlying hypothermia-induced ischemic tolerance. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8:416.
- [15] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2015, 131(4):e29-e322.
- [16] Lopez A D, Mathers C D, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*, 2006, 367(9524): 1747-1757.
- [17] Ferrari D C, Nestic O, Perez-Polo J R. Perspectives on neonatal hypoxia/ischemia-induced edema formation. *Neurochem Res*, 2010, 35(12):1957-1965.
- [18] Chan P H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(1):2-14.
- [19] Chen H, Song Y S, Chan P H. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(7):1262-1272.
- [20] Wang Q, Tompkins K D, Simonyi A, et al. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. *Brain Res*, 2006, 1090(1):182-189.
- [21] Lakhan S E, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*, 2009, 7:97.
- [22] Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 2007, 99(1):4-9.
- [23] Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 1999, 79(4):1431-1568.
- [24] Iwabuchi S, Watanabe T, Kawahara K. Spatio-temporal spread of neuronal death after focal photolysis of caged glutamate in neuron/astrocyte co-cultures. *Neurochem Int*, 2013, 62(7):1020-1027.
- [25] Rami A, Kogel D. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? *Autophagy*, 2008, 4(4):422-426.

- [26] Taoufik E, Probert L. Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des*, 2008,14(33):3565-3573.
- [27] Broughton B R, Reutens D C, Sobey C G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 2009, 40(5):e331-e339.
- [28] Liu C, Gao Y, Barrett J, et al. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J Neurochem*, 2010, 115(1):68-78.
- [29] Wen Y D, Sheng R, Zhang L S, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*, 2008, 4(6):762-769.
- [30] Adhami F, Liao G, Morozov Y M, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol*, 2006, 169(2):566-583.
- [31] Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(3):329-339.
- [32] Ginet V, Puyal J, Clarke P G, et al. Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *Am J Pathol*, 2009, 175(5):1962-1974.
- [33] Du L, Hickey R W, Bayir H, et al. Starving neurons show sex difference in autophagy. *J Biol Chem*, 2009, 284(4):2383-2396.
- [34] Li J, Mccullough L D. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(3):480-492.
- [35] Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol*, 2008, 172(2):454-469.
- [36] Kubota C, Torii S, Hou N, et al. Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. *J Biol Chem*, 2010, 285(1):667-674.
- [37] Li Q, Li H, Roughton K, et al. Lithium reduces apoptosis and autophagy after neonatal hypoxia-ischemia. *Cell Death Dis*, 2010, 1:e56.
- [38] Shang J, Deguchi K, Yamashita T, et al. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res*, 2010, 88(10):2197-2206.
- [39] Steiger-Barraissoul S, Rami A. Serum deprivation induced autophagy and predominantly an

- AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons. *Apoptosis*, 2009, 14(11):1274-1288.
- [40] Eum K H, Lee M. Targeting the autophagy pathway using ectopic expression of Beclin 1 in combination with rapamycin in drug-resistant v-Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Mol Cells*, 2011, 31(3):231-238.
- [41] Carloni S, Girelli S, Scopa C, et al. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy*, 2010, 6(3):366-377.
- [42] Zhou X, Zhou J, Li X, et al. GSK-3beta inhibitors suppressed neuroinflammation in rat cortex by activating autophagy in ischemic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(2):271-275.
- [43] Yuen E Y, Liu W, Yan Z. The phosphorylation state of GluR1 subunits determines the susceptibility of AMPA receptors to calpain cleavage. *J Biol Chem*, 2007, 282(22):16434-16440.
- [44] Gomes J R, Costa J T, Melo C V, et al. Excitotoxicity downregulates TrkB.FL signaling and upregulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons. *J Neurosci*, 2012, 32(13):4610-4622.
- [45] Heales S J, Bolanos J P, Stewart V C, et al. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1410(2):215-228.
- [46] Jia J, Verma S, Nakayama S, et al. Sex differences in neuroprotection provided by inhibition of TRPM2 channels following experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(11):2160-2168.
- [47] Sun H S, Jackson M F, Martin L J, et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. *Nat Neurosci*, 2009, 12(10):1300-1307.
- [48] Gu L, Liu X, Yang Y, et al. ASICs aggravate acidosis-induced injuries during ischemic reperfusion. *Neurosci Lett*, 2010, 479(1):63-68.
- [49] Kohno K, Higuchi T, Ohta S, et al. Neuroprotective nitric oxide synthase inhibitor reduces intracellular calcium accumulation following transient global ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett*, 1997, 224(1):17-20.
- [50] Nakka V P, Gusain A, Raghurir R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res*, 2010, 17(2):189-202.

- [51] Roberts G G, Di Loreto M J, Marshall M, et al. Hippocampal cellular stress responses after global brain ischemia and reperfusion. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(12):2265-2275.
- [52] Osada N, Kosuge Y, Ishige K, et al. Characterization of neuronal and astroglial responses to ER stress in the hippocampal CA1 area in mice following transient forebrain ischemia. *Neurochem Int*, 2010, 57(1):1-7.
- [53] Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4):403-415.
- [54] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 2011, 17(7):796-808.
- [55] Macrez R, Ali C, Toutirais O, et al. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol*, 2011, 10(5):471-480.
- [56] Konstantinov I E, Arab S, Kharbanda R K, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics*, 2004, 19(1):143-150.
- [57] Pradillo J M, Fernandez-Lopez D, Garcia-Yebenes I, et al. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J Neurochem*, 2009, 109(1):287-294.
- [58] Pradillo J M, Romera C, Hurtado O, et al. TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(2):193-203.
- [59] Bantel C, Maze M, Trapp S. Neuronal preconditioning by inhalational anesthetics: evidence for the role of plasmalemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology*, 2009, 110(5):986-995.
- [60] Wilhelm S, Ma D, Maze M, et al. Effects of xenon on in vitro and in vivo models of neuronal injury. *Anesthesiology*, 2002, 96(6):1485-1491.
- [61] David H N, Leveille F, Chazalviel L, et al. Reduction of ischemic brain damage by nitrous oxide and xenon. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(10):1168-1173.
- [62] Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, et al. Xenon attenuates excitatory synaptic transmission in the rodent prefrontal cortex and spinal cord dorsal horn. *Anesthesiology*, 2009, 111(6):1297-1307.
- [63] Bantel C, Maze M, Trapp S. Noble gas xenon is a novel adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener. *Anesthesiology*, 2010, 112(3):623-630.

- [64] Fahlenkamp A V, Coburn M, Haase H, et al. Xenon enhances LPS-induced IL-1 β expression in microglia via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J Mol Neurosci*, 2011, 45(1):48-59.
- [65] Charriaut-Marlangue C, Bonnin P, Gharib A, et al. Inhaled nitric oxide reduces brain damage by collateral recruitment in a neonatal stroke model. *Stroke*, 2012, 43(11):3078-3084.
- [66] Terpolilli N A, Kim S W, Thal S C, et al. Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles. *Circ Res*, 2012, 110(5):727-738.
- [67] Li Y S, Shemmer B, Stone E, et al. Neuroprotection by inhaled nitric oxide in a murine stroke model is concentration and duration dependent. *Brain Res*, 2013, 1507:134-145.
- [68] Keynes R G, Garthwaite J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Curr Mol Med*, 2004, 4(2):179-191.
- [69] Gruss M, Bushell T J, Bright D P, et al. Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(2):443-452.
- [70] Mennerick S, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic S M, et al. Effect of nitrous oxide on excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J Neurosci*, 1998, 18(23):9716-9726.
- [71] Abraini J H, David H N, Lemaire M. Potentially neuroprotective and therapeutic properties of nitrous oxide and xenon. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1053:289-300.
- [72] Weng Y, Sun S. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest in adults: mechanism of neuroprotection, phases of hypothermia, and methods of cooling. *Crit Care Clin*, 2012, 28(2):231-243.
- [73] Newberg L A, Michenfelder J D. Cerebral protection by isoflurane during hypoxemia or ischemia. *Anesthesiology*, 1983, 59(1):29-35.
- [74] Newberg L A, Milde J H, Michenfelder J D. The cerebral metabolic effects of isoflurane at and above concentrations that suppress cortical electrical activity. *Anesthesiology*, 1983, 59(1):23-28.
- [75] Wise-Faberowski L, Osorio-Lujan S. Acute and sustained isoflurane neuroprotection: the effect of culture age and duration of oxygen and glucose deprivation. *Brain Inj*, 2013, 27(4):444-453.

- [76] Lee J J, Li L, Jung H H, et al. Postconditioning with isoflurane reduced ischemia-induced brain injury in rats. *Anesthesiology*, 2008, 108(6):1055-1062.
- [77] Xiong L, Zheng Y, Wu M, et al. Preconditioning with isoflurane produces dose-dependent neuroprotection via activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels after focal cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg*, 2003, 96(1):233-237.
- [78] Sang H, Cao L, Qiu P, et al. Isoflurane produces delayed preconditioning against spinal cord ischemic injury via release of free radicals in rabbits. *Anesthesiology*, 2006, 105(5):953-960.
- [79] Statler K D, Janesko K L, Melick J A, et al. Hyperglycolysis is exacerbated after traumatic brain injury with fentanyl vs. isoflurane anesthesia in rats. *Brain Res*, 2003, 994(1):37-43.
- [80] Hertle D, Beynon C, Zweckberger K, et al. Influence of isoflurane on neuronal death and outcome in a rat model of traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl*, 2012, 114:383-386.
- [81] Carla V, Moroni F. General anaesthetics inhibit the responses induced by glutamate receptor agonists in the mouse cortex. *Neurosci Lett*, 1992, 146(1):21-24.
- [82] Bickler P E, Warner D S, Stratmann G, et al. gamma-Aminobutyric acid-A receptors contribute to isoflurane neuroprotection in organotypic hippocampal cultures. *Anesth Analg*, 2003, 97(2):564-571.
- [83] Kimbro J R, Kelly P J, Drummond J C, et al. Isoflurane and pentobarbital reduce AMPA toxicity in vivo in the rat cerebral cortex. *Anesthesiology*, 2000, 92(3):806-812.
- [84] Miyazaki H, Nakamura Y, Arai T, et al. Increase of glutamate uptake in astrocytes: a possible mechanism of action of volatile anesthetics. *Anesthesiology*, 1997, 86(6):1359-1366, 8A.
- [85] Kawaguchi M, Drummond J C, Cole D J, et al. Effect of isoflurane on neuronal apoptosis in rats subjected to focal cerebral ischemia. *Anesth Analg*, 2004, 98(3):798-805.
- [86] Li J T, Wang H, Li W, et al. Anesthetic isoflurane posttreatment attenuates experimental lung injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013:108928.
- [87] Li L, Peng L, Zuo Z. Isoflurane preconditioning increases B-cell lymphoma-2 expression and reduces cytochrome c release from the mitochondria in the ischemic penumbra of rat brain. *Eur J Pharmacol*, 2008, 586(1-3):106-113.
- [88] Gray J J, Bickler P E, Fahlman C S, et al. Isoflurane neuroprotection in hypoxic hippocampal slice cultures involves increases in intracellular Ca^{2+} and mitogen-activated protein kinases.

- Anesthesiology, 2005, 102(3):606-615.
- [89] Kitano H, Young J M, Cheng J, et al. Gender-specific response to isoflurane preconditioning in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(7):1377-1386.
- [90] Bickler P E, Fahlman C S. The inhaled anesthetic, isoflurane, enhances Ca^{2+} -dependent survival signaling in cortical neurons and modulates MAP kinases, apoptosis proteins and transcription factors during hypoxia. *Anesth Analg*, 2006, 103(2):419-429.
- [91] Zhao P, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection that is inducible nitric oxide synthase-dependent in neonatal rats. *Anesthesiology*, 2004, 101(3):695-703.
- [92] Tanaka K, Weihrauch D, Ludwig L M, et al. Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology*, 2003, 98(4):935-943.
- [93] Bleilevens C, Roehl A B, Goetzenich A, et al. Effect of anesthesia and cerebral blood flow on neuronal injury in a rat middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. *Exp Brain Res*, 2013, 224(2):155-164.
- [94] Altay O, Suzuki H, Hasegawa Y, et al. Isoflurane on brain inflammation. *Neurobiol Dis*, 2014, 62:365-371.
- [95] Luh C, Gierrth K, Timaru-Kast R, et al. Influence of a brief episode of anesthesia during the induction of experimental brain trauma on secondary brain damage and inflammation. *PLoS One*, 2011,6(5):e19948.
- [96] Shen X, Dong Y, Xu Z, et al. Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. *Anesthesiology*, 2013, 118(3):502-515.
- [97] Wu X, Lu Y, Dong Y, et al. The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory TNF-alpha, IL-6, and IL-1beta. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(7):1364-1378.
- [98] Goldberg A L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 2003, 426(6968):895-899.
- [99] Vogel G, Malakoff D. Nobel Peace Prize. Kenya's Maathai wins for reforestation work. *Science*, 2004, 306(5695):391.
- [100] Belogurov A J, Kuzina E, Kudriaeva A, et al. Ubiquitin-independent proteosomal degradation of myelin basic protein contributes to development of neurodegenerative autoimmunity.

- FASEB J, 2015.
- [101] Ulrich H D. The fast-growing business of SUMO chains. *Mol Cell*, 2008, 32(3):301-305.
- [102] Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(9):679-690.
- [103] Nedelsky N B, Todd P K, Taylor J P. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782(12):691-699.
- [104] Wilson V G, Heaton P R. Ubiquitin proteolytic system: focus on SUMO. *Expert Rev Proteomics*, 2008, 5(1):121-135.
- [105] Zhang Y Q, Sarge K D. Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates Abeta aggregate levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(4):673-678.
- [106] Cheng J, Kang X, Zhang S, et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell*, 2007, 131(3):584-595.
- [107] Nakka V P, Lang B T, Lenschow D J, et al. Increased cerebral protein ISGylation after focal ischemia is neuroprotective. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(12):2375-2384.
- [108] Pamenter M E, Perkins G A, Mcginness A K, et al. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51469.
- [109] Harder Z, Zunino R, McBride H. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol*, 2004, 14(4):340-345.
- [110] Zunino R, Schauss A, Rippstein P, et al. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 7):1178-1188.
- [111] Zungu M, Schisler J, Willis M S. All the little pieces. -Regulation of mitochondrial fusion and fission by ubiquitin and small ubiquitin-like modifier and their potential relevance in the heart. -. *Circ J*, 2011, 75(11):2513-2521.
- [112] Hoppe J B, Rattray M, Tu H, et al. SUMO-1 conjugation blocks beta-amyloid-induced astrocyte reactivity. *Neurosci Lett*, 2013, 546:51-56.
- [113] Becker J, Barysch S V, Karaca S, et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(4):525-531.
- [114] Giorgino F, de Robertis O, Laviola L, et al. The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts

- with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(3):1125-1130.
- [115] Liu L B, Omata W, Kojima I, et al. The SUMO conjugating enzyme Ubc9 is a regulator of GLUT4 turnover and targeting to the insulin-responsive storage compartment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 2007, 56(8):1977-1985.
- [116] Chao X D, Fei F, Fei Z. The role of excitatory amino acid transporters in cerebral ischemia. *Neurochem Res*, 2010, 35(8):1224-1230.
- [117] Gibb S L, Boston-Howes W, Lavina Z S, et al. A caspase-3-cleaved fragment of the glial glutamate transporter EAAT2 is sumoylated and targeted to promyelocytic leukemia nuclear bodies in mutant SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 2007, 282(44):32480-32490.
- [118] Plant L D, Zuniga L, Araki D, et al. SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal*, 2012, 5(251):a84.
- [119] Stapels M, Piper C, Yang T, et al. Polycomb group proteins as epigenetic mediators of neuroprotection in ischemic tolerance. *Sci Signal*, 2010, 3(111):a15.
- [120] Benson M D, Li Q J, Kieckhafer K, et al. SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(6):1805-1810.
- [121] Dai X Q, Kolic J, Marchi P, et al. SUMOylation regulates Kv2.1 and modulates pancreatic beta-cell excitability. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 6):775-779.
- [122] Plant L D, Dowdell E J, Dementieva I S, et al. SUMO modification of cell surface Kv2.1 potassium channels regulates the activity of rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol*, 2011, 137(5):441-454.
- [123] Zhu Q J, Xu Y, Du CP, et al. SUMOylation of the kainate receptor subunit GluK2 contributes to the activation of the MLK3-JNK3 pathway following kainate stimulation. *FEBS Lett*, 2012, 586(9):1259-1264.
- [124] Konopacki F A, Jaafari N, Rocca D L, et al. Agonist-induced PKC phosphorylation regulates GluK2 SUMOylation and kainate receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(49):19772-19777.
- [125] Caraci F, Battaglia G, Sortino M A, et al. Metabotropic glutamate receptors in

- neurodegeneration/neuroprotection: still a hot topic? *Neurochem Int*, 2012, 61(4):559-565.
- [126] Dutting E, Schroder-Kress N, Sticht H, et al. SUMO E3 ligases are expressed in the retina and regulate SUMOylation of the metabotropic glutamate receptor 8b. *Biochem J*, 2011, 435(2):365-371.
- [127] Gowran A, Murphy C E, Campbell V A. Delta(9)-tetrahydrocannabinol regulates the p53 post-translational modifiers Murine double minute 2 and the Small Ubiquitin MOdifier protein in the rat brain. *FEBS Lett*, 2009, 583(21):3412-3418.
- [128] Yonekura I, Takai K, Asai A, et al. p53 potentiates hippocampal neuronal death caused by global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(10):1332-1340.
- [129] Nunez-O'Mara A, Berra E. Deciphering the emerging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biol Chem*, 2013, 394(4):459-469.
- [130] van Hagen M, Overmeer R M, Abolvardi S S, et al. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(6):1922-1931.
- [131] Cai Q, Verma S C, Kumar P, et al. Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS One*, 2010, 5(3):e9720.
- [132] Hilgarth R S, Hong Y, Park-Sarge O K, et al. Insights into the regulation of heat shock transcription factor 1 SUMO-1 modification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303(1):196-200.
- [133] Hong Y, Rogers R, Matunis M J, et al. Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, 2001, 276(43):40263-40267.
- [134] Hietakangas V, Ankar J, Blomster H A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(1):45-50.
- [135] Yin C, Xi L, Wang X, et al. Silencing heat shock factor 1 by small interfering RNA abrogates heat shock-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39(4):681-689.
- [136] Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, et al. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med*, 1999, 5(5):554-559.
- [137] Culver C, Sundqvist A, Mudie S, et al. Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol Cell*

- Biol, 2010, 30(20):4901-4921.
- [138] Nurmi A, Lindsberg P J, Koistinaho M, et al. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. *Stroke*, 2004, 35(4):987-991.
- [139] Eun J L, Sung H H, Jaesun C, et al. Regulation of glycogen synthase kinase 3beta functions by modification of the small ubiquitin-like modifier. *Open Biochem J*, 2008, 2:67-76.
- [140] Picard N, Caron V, Bilodeau S, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(14):2709-2721.
- [141] Shin J A, Yang S J, Jeong S I, et al. Activation of estrogen receptor beta reduces blood-brain barrier breakdown following ischemic injury. *Neuroscience*, 2013, 235:165-173.
- [142] Davies C, Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(1):85-89.
- [143] Feligioni M, Brambilla E, Camassa A, et al. Crosstalk between JNK and SUMO signaling pathways: deSUMOylation is protective against H₂O₂-induced cell injury. *PLoS One*, 2011, 6(12):e28185.
- [144] Kim H J, Yun J, Lee J, et al. SUMO1 attenuates stress-induced ROS generation by inhibiting NADPH oxidase 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(3):555-562.
- [145] Leitao B B, Jones M C, Brosens J J. The SUMO E3-ligase PIAS1 couples reactive oxygen species-dependent JNK activation to oxidative cell death. *FASEB J*, 2011, 25(10):3416-3425.
- [146] de la Vega L, Grishina I, Moreno R, et al. A redox-regulated SUMO/acetylation switch of HIPK2 controls the survival threshold to oxidative stress. *Mol Cell*, 2012, 46(4):472-483.
- [147] Foran E, Bogush A, Goffredo M, et al. Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia*, 2011, 59(11):1719-1731.
- [148] Plant L D, Zuniga L, Araki D, et al. SUMOylation silences heterodimeric TASK potassium channels containing K2P1 subunits in cerebellar granule neurons. *Sci Signal*, 2012, 5(251):a84.
- [149] Plant L D, Dowdell E J, Dementieva I S, et al. SUMO modification of cell surface Kv2.1 potassium channels regulates the activity of rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol*, 2011, 137(5):441-454.

- [150] Tong L, Cai M, Huang Y, et al. Activation of K(2)P channel-TREK1 mediates the neuroprotection induced by sevoflurane preconditioning. *Br J Anaesth*, 2014, 113(1):157-167.
- [151] Martin S, Nishimune A, Mellor J R, et al. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature*, 2007, 447(7142):321-325.
- [152] Feligioni M, Nishimune A, Henley J M. Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(7):1348-1356.
- [153] Jaafari N, Konopacki F A, Owen T F, et al. SUMOylation is required for glycine-induced increases in AMPA receptor surface expression (ChemLTP) in hippocampal neurons. *PLoS One*, 2013, 8(1):e52345.
- [154] Baxter M G, Murphy K L, Crosby G, et al. Different behavioral effects of neurotoxic dorsal hippocampal lesions placed under either isoflurane or propofol anesthesia. *Hippocampus*, 2008, 18(3):245-250.
- [155] Olson J M, Yan Y, Bai X, et al. Up-regulation of MicroRNA-21 Mediates Isoflurane-induced Protection of Cardiomyocytes. *Anesthesiology*, 2015, 122(4):795-805.
- [156] Ham A, Kim M, Kim J Y, et al. Critical role of interleukin-11 in isoflurane-mediated protection against ischemic acute kidney injury in mice. *Anesthesiology*, 2013, 119(6):1389-1401.
- [157] Sosunov S A, Ameer X, Niatetskaya Z V, et al. Isoflurane anesthesia initiated at the onset of reperfusion attenuates oxidative and hypoxic-ischemic brain injury. *PLoS One*, 2015, 10(3):e120456.
- [158] Wei H, Liang G, Yang H. Isoflurane preconditioning inhibited isoflurane-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett*, 2007, 425(1):59-62.
- [159] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [160] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*, 1995, 26(4):627-634, 635.
- [161] Han D, Sun M, He P P, et al. Ischemic Postconditioning Alleviates Brain Edema After Focal Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats Through Down-Regulation of Aquaporin-4. *J Mol Neurosci*, 2015.
- [162] Shenoda B. The Role of Na/Ca Exchanger Subtypes in Neuronal Ischemic Injury. *Transl*

- Stroke Res, 2015.
- [163] Nguyen F N, Kar J K, Zakaria A, et al. Isolated central nervous system histoplasmosis presenting with ischemic pontine stroke and meningitis in an immune-competent patient. *JAMA Neurol*, 2013, 70(5):638-641.
- [164] Wang F, Liang W, Lei C, et al. Combination of HBO and Memantine in Focal Cerebral Ischemia: Is There a Synergistic Effect? *Mol Neurobiol*, 2014.
- [165] Wei H, Yao X, Yang L, et al. Glycogen synthase kinase-3beta is involved in electroacupuncture pretreatment via the cannabinoid CB1 receptor in ischemic stroke. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1):326-336.
- [166] Li X, Luo P, Wang F, et al. Inhibition of N-myc downstream-regulated gene-2 is involved in an astrocyte-specific neuroprotection induced by sevoflurane preconditioning. *Anesthesiology*, 2014, 121(3):549-562.
- [167] Liu Y, Xiong L, Chen S, et al. Isoflurane tolerance against focal cerebral ischemia is attenuated by adenosine A1 receptor antagonists. *Can J Anaesth*, 2006, 53(2):194-201.
- [168] Kitano H, Kirsch J R, Hurn P D, et al. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(6):1108-1128.
- [169] Vannucci S J, Mummery R, Hawkes R B, et al. Hypoxia-ischemia induces a rapid elevation of ubiquitin conjugate levels and ubiquitin immunoreactivity in the immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(4):376-385.
- [170] Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, et al. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation*, 2008, 117(24):3070-3078.
- [171] Liu C, Chen S, Kamme F, et al. Ischemic preconditioning prevents protein aggregation after transient cerebral ischemia. *Neuroscience*, 2005, 134(1):69-80.
- [172] Lim K L. Ubiquitin-proteasome system dysfunction in Parkinson's disease: current evidence and controversies. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4(6):769-781.
- [173] Oddo S. The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(2):363-373.
- [174] Yamauchi T, Sakurai M, Abe K, et al. Ubiquitin-mediated stress response in the spinal cord after transient ischemia. *Stroke*, 2008, 39(6):1883-1889.

- [175] Yamashiro K, Liu R, Maeda M, et al. Induction and selective accumulation of mutant ubiquitin in CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*, 2007, 147(1):71-79.
- [176] Ahn H C, Yoo K Y, Hwang I K, et al. Ischemia-related changes in naive and mutant forms of ubiquitin and neuroprotective effects of ubiquitin in the hippocampus following experimental transient ischemic damage. *Exp Neurol*, 2009, 220(1):120-132.
- [177] Hsieh L S, Su W M, Han G S, et al. Phosphorylation Regulates the Ubiquitin-independent Degradation of Yeast Pah1 Phosphatidate Phosphatase by the 20S Proteasome. *J Biol Chem*, 2015.
- [178] Mukherjee S, Poddar R, Deb I, et al. Dephosphorylation of specific sites in the kinase-specificity sequence domain leads to ubiquitin-mediated degradation of the tyrosine phosphatase STEP. *Biochem J*, 2011, 440(1):115-125.
- [179] Garcia-Tardon N, Gonzalez-Gonzalez I M, Martinez-Villarreal J, et al. Protein kinase C (PKC)-promoted endocytosis of glutamate transporter GLT-1 requires ubiquitin ligase Nedd4-2-dependent ubiquitination but not phosphorylation. *J Biol Chem*, 2012, 287(23):19177-19187.
- [180] Arora S, Yang J M, Hait W N. Identification of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of the stability of eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Cancer Res*, 2005, 65(9):3806-3810.
- [181] Rizzardi L F, Coleman K E, Varma D, et al. CDK1-dependent inhibition of the E3 ubiquitin ligase CRL4CDT2 ensures robust transition from S Phase to Mitosis. *J Biol Chem*, 2015, 290(1):556-567.
- [182] Caldeira M V, Salazar I L, Curcio M, et al. Role of the ubiquitin-proteasome system in brain ischemia: friend or foe? *Prog Neurobiol*, 2014, 112:50-69.
- [183] Cheng C H, Lo Y H, Liang S S, et al. SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 2006, 20(15):2067-2081.
- [184] Bossis G, Chmielarska K, Gartner U, et al. A fluorescence resonance energy transfer-based assay to study SUMO modification in solution. *Methods Enzymol*, 2005, 398:20-32.
- [185] Bae S H, Jeong J W, Park J A, et al. Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(1):394-400.

- [186] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18:621-663.
- [187] Huang T T, Wuerzberger-Davis S M, Wu Z H, et al. Sequential modification of NEMO/IKK γ by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- κ B activation by genotoxic stress. *Cell*, 2003, 115(5):565-576.
- [188] Lee Y J, Mou Y, Maric D, et al. Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage. *PLoS One*, 2011, 6(10):e25852.
- [189] Siepmann T J, Bohnsack R N, Tokgoz Z, et al. Protein interactions within the N-end rule ubiquitin ligation pathway. *J Biol Chem*, 2003, 278(11):9448-9457.
- [190] Wee K E, Lai Z, Auger K R, et al. Steady-state kinetic analysis of human ubiquitin-activating enzyme (E1) using a fluorescently labeled ubiquitin substrate. *J Protein Chem*, 2000, 19(6):489-498.
- [191] Walden H, Podgorski M S, Schulman B A. Insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the activating enzyme for NEDD8. *Nature*, 2003, 422(6929):330-334.
- [192] Kurtzman A L, Schechter N. Ubc9 interacts with a nuclear localization signal and mediates nuclear localization of the paired-like homeobox protein Vsx-1 independent of SUMO-1 modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(10):5602-5607.
- [193] Tomoiu A, Gravel A, Tanguay R M, et al. Functional interaction between human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein and ubiquitin-conjugating enzyme 9 in the absence of sumoylation. *J Virol*, 2006, 80(20):10218-10228.
- [194] Jaber T, Bohl C R, Lewis G L, et al. Human Ubc9 contributes to production of fully infectious human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol*, 2009, 83(20):10448-10459.
- [195] Zhu S, Sachdeva M, Wu F, et al. Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner. *Oncogene*, 2010, 29(12):1763-1772.
- [196] Xu J, Watkins T, Reddy A, et al. A novel mechanism whereby BRCA1/1a/1b fine tunes the dynamic complex interplay between SUMO-dependent/independent activities of Ubc9 on E2-induced ER α activation/repression and degradation in breast cancer cells. *Int J Oncol*, 2009, 34(4):939-949.
- [197] Hay R T. SUMO: a history of modification. *Mol Cell*, 2005, 18(1):1-12.

- Sun J, **Tong L**, Luan Q, Deng J, Li Y, Li ZJ, Dong HL, Xiong LZ. Protective effect of delayed remote limb ischemic preconditioning role of mitochondrial KATP channels in a rat model of focal cerebral ischemic reperfusion injury. *J Cereb Blood F Met.* 2012 May; 32(5):851-9. (IF=5.339)
- Guo C, **Tong L**, Xi MM, Yang HF, Dong HL, Wen AD. Neuroprotective effect of calyculin A on cerebral ischemia and reperfusion injury in rats. *J Ethnopharmacology.* 2012 Dec; 144(3):768-74. (IF=2.755)
- Zhang LN, Li ZJ, **Tong L**, Guo C, Niu JY, Hou WG, Dong HL. Orexin-a facilitates emergence from propofol anesthesia in the rat. *Anesth Analg.* 2012 Oct; 115(4):789-96. (IF=3.3)
- Chen Y, Nie H, Tian L, **Tong L**, Deng J, Zhang Y, Dong H, Xiong L. Sevoflurane preconditioning-induced neuroprotection is associated with Akt activation via carboxy-terminal modulator protein inhibition. *Br J Anaesth.* 2014 Sep 2. [Epub ahead of print] (IF=4.237)
- Zhang HP, Yuan LB, Zhao RN, **Tong L**, Ma R, Dong HL, Xiong L. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection by attenuating ubiquitin-conjugated protein aggregation in a mouse model of transient global cerebral ischemia. *Anesth Analg.* 2010 Aug; 111(2):506-14. (IF=3.3)
- Chen Y, Nie H, Tian L, **Tong L**, Yang L, Lao N, Dong H, Sang H, Xiong L. Nicotine-Induced Neuroprotection Against Ischemic Injury Involves Activation of Endocannabinoid System in Rats. *Neurochem Res.* 2013 Feb; 38(2): 364-70. (IF=2.125)
- Wang ZH, Ni XL, Li JN, Xiao ZY, Wang C, Zhang LN, **Tong L**, Dong HL. Changes in plasma orexin-A levels in sevoflurane-remifentanyl anesthesia in young and elderly patients undergoing elective lumbar surgery. *Anesth Analg.* 2014 Apr; 118(4):818-22. (IF=3.3)
- 郭超, **仝黎**, 杨兴斌, 董海龙. 毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护。中华神经外科疾病研究杂志。2011, 10 (1): 34-37.

申请国内发明专利情况

- 董海龙, 熊利泽, 仝黎, 张昊鹏。Orexin-A 载药脂质体的制备方法及用于治疗发作性睡眠的药剂。201110107172.5
- 董海龙, 熊利泽, 仝黎, 张学策。用于小动物神经行为学评估的多功能实验装置。201110051936.3
- 曲萍, 于军, 赵海康, 张学策, 南海燕, 颜林枫, 仝黎, 赵玉峰, 刘芳娥, 田菲, 刘楠楠, 梁向艳, 黄小军, 铁茹。用于 MTT 比色实验的细胞混匀装置。201110099004.6
- 颜林枫, 南海燕, 王玮, 张学策, 魏经国, 曲萍, 陈宝莹, 崔光彬, 赵海康, 张轩, 仝黎, 赵鸽。一种细胞原代培养、组织裂解用自动剪切装置。201110107477.6

学术获奖情况

- 2012 年中华医学会第 20 次全国麻醉学术年会中青年优秀论文大赛二等奖
- 2012 年全国第三次麻醉药理学术会议青年优秀论文大赛一等奖
- 2012 年全军研究生医学创新论坛一等奖
- 2012 年中华医学会第 20 次全国麻醉学术年会大会发言

致 谢

白驹过隙，青春飞逝。在这样的时刻，我终于要为我的学生生涯划下一个句号。我相信这篇论文并不是我科研道路的结束，它将会为我打开人生新道路的大门。从硕士到博士整整六年的时间，我是何其有幸一直在西京医院麻醉科跟随这么多学识渊博的老师学习，和这么多优秀的同学同事一起工作。

在硕士博士学习期间，感谢导师熊利泽教授对我人生道路的指引和科学思维的培养，您广阔的视野和大家的气度深深感染着我，您是我一生永远追逐和学习的榜样，成为像您一样的医生和学者也是我当初选择麻醉专业的初衷。感谢导师给予我许多学习和锻炼的机会，鼓励我开阔视野不断进步，能成为您的学生接受您的指导是我的荣幸，也是我人生的一笔宝贵财富。

在研究生学习期间，衷心感谢董海龙教授带领我走进科学研究这个神奇并且充满魅力的世界。六年的时间，我不知不觉从一个对于科研懵懂未知的学生，逐渐享受到在探索科研过程中的乐趣以及解决科研问题的成就感，感谢您给予我们足够的空间，满足我们对于科学的好奇心和支持我们去证实科学疑问的动力。

感谢王百忍教授，在百忙之中不厌其烦的为我们一遍遍修改论文和幻灯，感谢您一直以来的鞭策和鼓励。感谢我的带教老师赵冀，是您带我走进麻醉专业大门，感谢您在我还是个年少无知的本科生时鼓励我成为一名优秀的麻醉科医生，即使去了远方我也会永远记得你温暖的笑容。

感谢张遐教授，感谢您提供给我如此难得的出国留学的机会，培养我们严谨的科研态度和创新的科学思维，教导我们用不同的角度思考问题，也让我有机会接触到不同的文化，感受不同的人生。谢谢 Richard Belange, Philip Kesner, 王莹博士, Renee Kinden, 王枫博士, 李新博博士, 贾蕊博士, 钟海星博士, 因为你们的陪伴让我即使身处异国他乡也像在家一般的温暖。

还要感谢这些年来如同兄弟姐妹般在实验室里一起并肩奋斗的朋友们，杨路加博士、陈宇博士、南海燕博士、颜林枫博士、张昊鹏博士、张丽娜博士、欧阳鹏荣硕士、冉明梓硕士、杨岑硕士、李新莉老师、余垚莹秘书，因为你们的存在让我觉

得实验室就像一个大家庭，探讨科研专心实验，让这六年的时间充满了欢声笑语。

感谢最最亲爱的爸爸妈妈，谢谢你们这么多年对我的包容和理解，支持我坚持自己的选择和追寻梦想的勇气，无论身在哪里，你们永远是我可以停靠的温暖的港湾。也谢谢我的朋友们一直陪伴在我的身边不离不弃。

谢谢所有给予我关心和帮助的人们，因为你们的温暖才会有今天的我。