



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R743.3

U D C 616.8

密 级 公开

博士学位论文

星形胶质细胞 NDRG2 在七氟烷
预处理神经保护作用中的机制研究

李 新

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 麻醉学

研 究 方 向 围术期神经保护

指 导 教 师 熊利泽 教授 (主任医师)

培 养 单 位 西京医院麻醉科

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	6
ABSTRACT	8
前 言	10
文献回顾	12
正 文	29
第一部分 七氟烷预处理对缺血/再灌注后 NDRG2 表达的影响	29
1 材料	29
2 方法	32
3 实验计划和分组	42
4 结果	43
5 讨论	53
第二部分 NDRG2 表达上调/下调对七氟烷预处理减轻细胞 OGD 损伤作用的影响	56
1 材料	56
2 方法	57
3 实验计划和分组	58
4 结果	59
5 讨论	65
第三部分 七氟烷预处理和 NDRG2 表达上调/下调对缺血/再灌注后细胞凋亡的影响	67
1 材料	67
2 方法	67
3 实验计划和分组	68
4 结果	70
5 讨论	78

小 结	82
参考文献	84
附 录	104
个人简历和研究成果	108
致 谢	110

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
2-DG	2-deoxyglucose	2-脱氧葡萄糖
5-HD	5-hydroxydecanoic acid	5-羟基癸酸
6-OHDA	6-hydroxydopamine	6-羟基多巴胺
AD	Alzheimer's disease	阿尔兹海默病
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP 激活的蛋白激酶
ANLS	astrocyte neuronal lactate shuttle	星形胶质细胞-神经元 乳酸循环
AQP	aquaporins	水通道蛋白
BBB	blood-brain barrier	血脑屏障
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BrdU	5-bromo-2'-deoxy-uridine	5'-溴脱氧尿苷
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	环化腺苷酸
Car	carbonic anhydrase	碳酸酐酶
CAT	catalase	过氧化氢酶
CBD	cortico-basal degeneration	皮质基底节变性
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	趋化因子 (C-C 模序) 配体 2
CDCA	chenodeoxycholic acid	鹅去氧胆酸
CSPGs	chondroitin sulfate proteoglycans	硫酸软骨素

CTMP	carboxy-terminal modulator protein	羧基末端调节蛋白
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10	CXC 模序趋化因子 10
DAPI	diamidino-phenyl-indole	二脒基苯基吲哚
DCD	diabetic cognitive dysfunction	糖尿病认知功能障碍
DCFH-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate	2',7'-二氯荧光素二乙酸酯
DEPC	diethyl pyrocarbonate	二乙基焦磷酸胺
DHT	dihydrotestosterone	双氢睾酮
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	杜尔伯科改良伊格尔培养基
DMSO	dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
DZX	diazoxide	二氮嗪
EAATs	excitatory amino acid transporters	兴奋性谷氨酸转运体
ECT	electroconvulsive treatment	电惊厥治疗
EPO	erythropoietin	促红细胞生成素
ERK	extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
FAK	focal adhesion kinase	局部粘着激酶
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FTLD	frontotemporal lobar degeneration	额颞叶变性
GAT	GABA transporter	GABA 转运体
GBM	glioblastoma	胶质母细胞瘤
GDNF	glial cell-derived neurotrophic factor	胶质细胞源性神经营 养因子
GFAP	glial fibrillary acidic protein	神经胶质酸性蛋白

GlyT	glycine transporter	甘氨酸转运体
GR	glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
GSH-px	glutathion peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
GSK3 β	glycogen synthase kinase-3 β	糖原合成酶激酶-3 β
HCC	hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
HIF-1	hypoxia induced factor-1	低氧诱导因子
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1	细胞间粘附分子-1
IL-1 β	interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
INB	inner neuroblastic layer	内侧神经母细胞层
JAK	Janus kinase	Janus 激酶
K _{ATP}	ATP sensitive potassium channel	ATP 敏感性钾通道
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LEF	lymphoid enhancer factor	淋巴增强因子
LKB1	liver kinase B1	肝激酶 B1
LTP	long-term potentiation	长时程增强
MAC	minimal alveolar concentration	最小肺泡浓度
MAPK	mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MCAO	middle cerebral artery occlusion	大脑中动脉阻断术
MEK	MAPK/ERK kinase	MAPK/ERK 激酶
mGluR	metabotropic glutamate receptor	代谢型谷氨酸受体
MMP	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
mPTP	mitochondrial permeability transition pore	线粒体通透性转换孔

MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	1-甲基-4-苯基-四氢吡啶
mTOR	mammalian target of rapamycin	雷帕霉素靶蛋白
MTT	3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide	3-(4, 5-二甲基噻唑-2)- -2, 5-二苯基四氮唑溴 盐
NDRG2	N-myc downstream regulated gene 2	N-myc 下游调节基因 2
NF-κB	nuclear factor-κB	核因子-κB
NO	nitric oxide	一氧化氮
OGD	oxygen-glucose deprivation	氧糖剥夺
oxLDL	oxidized low density lipoprotein	氧化型低密度脂蛋白
PCL	Purkinje cell layer	浦肯野细胞层
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	增殖细胞核抗原
PD	Parkinson's disease	帕金森氏病
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板源性生长因子
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase	磷脂酰肌醇 3 激酶
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PKM	protein kinase M	蛋白激酶 M
PMSF	phenylmethyl sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟化物
ROS	reactive oxygen species	活性氧簇
RU486	mifepristone	米非司酮
SD	Sprague-Dawley rat	SD 大鼠
SGK1	serum/glucocorticoid-induced kinase 1	血清/糖皮质激素诱导 蛋白激酶 1

SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor	选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂
STAT3	signal transducers and activators of transcription	信号转导与转录激活因子 3
STZ	streptozotocin	链脲佐菌素
TCF	T cell factor	T 细胞因子
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1	金属蛋白酶组织抑制剂-1
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
TREK1	TWIK-related K ⁺ channel-1	TWIK 相关钾通道-1
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride	2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑
TUNEL	transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling	转移酶介导的三磷酸脱氧鸟苷-生物素末端标记
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	血管细胞粘附分子-1
VEGF	vascular endothelia growth factor	血管内皮生长因子
VRAC	volume-regulated anion channels	容积调节性阴离子通道

星形胶质细胞 NDRG2 在七氟烷 预处理神经保护作用中的机制研究

博士研究生：李 新

导 师：熊利泽 教授

辅 导 教 师：王 强 副教授

第四军医大学西京医院麻醉科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金重点项目（30930091）

国家自然科学基金（81072888）

中文摘要

目的：大量在体研究和离体研究均表明，常用吸入性麻醉药七氟烷预处理可诱导脑缺血耐受，减轻脑缺血再灌注损伤，但其机制尚未完全明了。N-myc 下游调节基因 2（N-myc downstream regulated gene 2, NDRG2）是一个在中枢神经系统内主要表达于星形胶质细胞的基因，与细胞增殖、分化、应激等功能密切相关。我们前期工作发现，局灶性脑缺血再灌注损伤后缺血半暗带区 NDRG2 发生了时间和空间上的表达变化，且参与了缺血再灌注损伤后 p53 介导的细胞凋亡过程。本研究旨在从在体和离体两方面探讨 NDRG2 及其介导的细胞凋亡和星形胶质细胞功能改变在七氟烷预处理神经保护效应中的作用及机制。

方法：在体—健康雄性成年 SD 大鼠，2%七氟烷预处理 1h，预处理结束 2h 后行大脑中动脉阻断（middle cerebral artery occlusion, MCAO）诱导局灶性脑缺血，缺血 120min 后抽出线栓恢复灌注。再灌注 24 h 依据 Garcia 评分标准评估神经功能，并行 TTC（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑）染色计算脑梗死容积百分比，采用 Western Blot、real-time PCR、免疫荧光染色、TUNEL（transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling, 转移酶介导的

三磷酸脱氧鸟苷-生物素末端标记) 染色等测定缺血半暗带区 NDRG2 表达、分布和细胞凋亡情况。**离体**—取新生 SD 鼠的大脑皮层培养原代星形胶质细胞, 采用脂质体转染法向细胞内转染 NDRG2 siRNA 或 NDRG2 过表达质粒, 转染 24h 给予 2% 七氟烷预处理 1h, 预处理结束 2h 后进行氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 4h, 复氧 24h 检测细胞活力 (MTT 试验)、细胞毒性 (LDH 释放率)、凋亡情况 (TUNEL 染色、活化 Caspase-3 表达) 以及 NDRG2 表达变化。

结果: 七氟烷预处理显著降低了局灶性脑缺血再灌注引起的大鼠神经功能损伤和脑梗死容积, 减少了缺血半暗带组织 TUNEL 染色阳性细胞数目和活化 Caspase-3 表达量, 抑制了缺血后 NDRG2 上调和核转移现象 ($P < 0.05$)。原代培养星形胶质细胞 OGD 模型中得到了类似的结果。采用 NDRG siRNA 降低原代培养星形胶质细胞中 NDRG2 表达可增加细胞活力, 减轻氧糖剥夺引起的 LDH (lactate dehydrogenase, 乳酸脱氢酶) 释放, 降低 TUNEL 阳性细胞数和活化 Caspase-3 表达 ($P < 0.05$); 而转染 NDRG2 过表达质粒使原代培养星形胶质细胞中 NDRG2 上调则可部分逆转七氟烷预处理减轻氧糖剥夺损伤的作用 ($P < 0.05$)。

结论: 七氟烷预处理可通过抑制脑组织星形胶质细胞内 NDRG2 的表达和活性, 减轻细胞凋亡, 改善星形胶质细胞功能, 从而减轻脑缺血再灌注损伤。本研究为七氟烷预处理可能的临床应用提供了可靠的理论支持, 也为开发新的脑缺血损伤防治措施提供了新的靶点。

关键词: 七氟烷, 预处理, 神经保护, NDRG2

Inhibition of NDRG2-related Apoptosis is Involved in an Astrocyte-specific Neuroprotection Induced by Sevoflurane Preconditioning

Ph.D Candidate: Li Xin

Supervisor: Prof. Xiong Lize

Tutor: Associate Prof. Wang Qiang

Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: Major Program of National Natural Science Foundation (30930091)
National Natural Science Foundation (81072888)

Abstract

Background: Mechanism study of sevoflurane preconditioning-induced cerebral ischemic tolerance is mostly focused on the death and survival of neuron, while the involvement of other cell types (i.e. astrocyte) is neglected. NDRG2 is a gene that mainly expressed in astrocyte in central nervous system and plays an important role in regulating astrocyte proliferation and reactivity. Our previous work showed that NDRG2 might participate in brain ischemia. This study investigates the role of astroglial NDRG2 in the neuroprotection of sevoflurane preconditioning against cerebral ischemic/reperfusion injury both *in vivo* and *in vitro*.

Methods: At 2h after sevoflurane (2%) preconditioning for 1h, rats were subjected to MCAO for 120min. Neurobehavioral scores (n=10), infarct volumes (n=10), astrocyte reactivity (n=6), cellular apoptosis (n=6), and NDRG2 expression (n=6) were determined at 24 h after reperfusion. *In vitro*, cultural astrocytes were exposed to OGD for 4h at 2h

after 2% sevoflurane preconditioning (1h). Cellular viability (n=8), LDH release (n=8), apoptosis (n=6), and NDRG2 expression (n=6) were evaluated in the presence or absence of NDRG2-specific siRNA or NDRG2 overexpression plasmid.

Results: Sevoflurane preconditioning improved neurological function (12.75[11.38~13.50] vs. 7.0[6.5~8.5]), reduced ischemic infarct volume (25.7±5.7% vs. 48.3±8.9%), decreased apoptosis (TUNEL-positive cells reduced to 31.2 ± 5.3% and cleaved Caspase-3 reduced to 1.42 ± 0.21 fold) and inhibited NDRG2 expression (1.28±0.15 fold) and nuclear translocation (2.21±0.29 fold) at ischemic penumbra. Similar effects were observed in cultural astrocytes exposed to OGD. NDRG2 knockdown by siRNA attenuated OGD-induced injury (cell viability increased to 80.5±4.1%; LDH release reduced to 30.5±4.0%) and cellular apoptosis (cleaved Caspase-3 reduced to 1.55±0.21 fold; TUNEL-positive cells reduced to 18.2±4.3%), whereas NDRG2 overexpression reversed the protective effects of sevoflurane preconditioning.

Conclusion: Sevoflurane preconditioning inhibits NDRG2 up-regulation and nuclear translocation in astrocytes, and represses NDRG2-related cellular apoptosis to induce cerebral ischemic tolerance *via* antiapoptosis, which represents one new mechanism of sevoflurane preconditioning and provides a novel target for neuroprotection.

Key words: NDRG2, sevoflurane, preconditioning, neuroprotection

前 言

脑卒中是由于突发性脑内动脉狭窄、闭塞或破裂，引起急性脑血液循环障碍，进而导致的脑功能障碍。近年来，由于人口老龄化、饮食结构改变、社会压力增大等诸多因素，脑卒中的发病率、死亡率均呈明显上升趋势。脑卒中已成为世界范围内的第二位致死原因和首位致残原因，给家庭和社会带来了沉重的负担^[1, 2]。临床上对脑卒中的治疗措施主要从促进血管再通和营养神经两个方面着手，包括血管成形术、支架植入、溶栓以及多种神经保护药物等，但由于神经细胞对缺血损伤极为敏感，导致治疗时间窗狭窄、对药物反应性差，近年来多项系统回顾和 Meta 分析显示上述治疗手段的安全性和有效性尚存在很大争议^[3, 4]。在预防方面，尽管抗血小板聚集药物及抗凝血药显示出了一定的效果，却因为其可能导致出血而限制了其在卒中预防中的应用。2014年5月2日，美国 FDA 发布其审查结果，称由于会增加胃出血和脑出血的风险，不建议阿司匹林用于心血管病一级预防。诸多干预手段的失利使研究者将视线转移到了脑本身，认为脑具有良好的自我保护能力^[5]。因此，深入了解脑的自我保护机制，探索能够充分调动脑内源性防御机制的方法，将有助于我们更好地对抗脑缺血损伤。

预处理，是指短暂性受到非伤害性或亚致死性刺激可增强机体对后续严重损伤的抵抗力，首次报道见于缺血预处理可诱导心肌缺血耐受^[6]。这种抵抗力，即是激活了机体的内源性保护机制，提高了组织和细胞对缺血损伤的耐受能力。以往研究发现，临床常用的氟烷类吸入性麻醉药，如异氟烷、七氟烷等，在体研究和离体研究中均被发现可诱导缺血耐受，具有预处理效应^[7, 8]。其中，七氟烷预处理的神经保护作用可通过抑制神经细胞凋亡^[9]、激活线粒体 ATP 敏感型钾通道^[10]、减少兴奋性氨基酸释放^[11]等实现，但其机制仍未完全清晰，尚需进一步研究。

以往对脑缺血损伤和预处理神经保护机制的研究多集中于神经元，近年来胶质细胞得到了越来越多的重视。做为中枢神经系统含量最丰富的细胞，星形胶质细胞在调节脑缺血后神经元死亡和存活中发挥重要作用^[12]。因此，星形胶质细胞有可能是预处理措施诱导缺血耐受的潜在靶点。以往研究发现，七氟烷可在正常生理情况下增加星形胶质细胞对谷氨酸的摄取^[13]，另外又可在多种病理条件下延迟星形胶质细

细胞的活化^[14, 15]。本研究中,我们将探讨星形胶质细胞相关机制在七氟烷预处理神经保护效应中的作用。

NDRG2 在脑中主要表达于星形胶质细胞,参与星形胶质细胞活化^[16],与星形胶质细胞功能密切相关。研究表明,NDRG2 可能在多种中枢神经系统疾病的病理过程中发挥作用,包括胶质细胞瘤^[17]、阿尔兹海默氏病^[18]、抑郁^[19]、额颞叶变性^[20]等。本课题组前期工作发现短暂性局灶性脑缺血再灌注损伤时,NDRG2 发生了时间和空间上的表达变化^[21],进一步研究表明 NDRG2 参与了 p53 介导的细胞凋亡^[22]。因此我们推测,七氟烷预处理可能通过抑制星形胶质细胞 NDRG2 相关的细胞凋亡而诱导神经保护作用。

本课题中,我们将在前期研究的基础上,以 SD 大鼠和原代培养星形胶质细胞为研究对象,建立大鼠 MCAO 模型和培养细胞 OGD 模型,利用 Western blot、qPCR、免疫荧光等方法,观察七氟烷预处理对缺血再灌注损伤后 NDRG2 表达的影响,明确调控 NDRG2 表达对七氟烷预处理神经保护作用的影响,并进一步探讨 NDRG2 参与七氟烷预处理脑保护效应的具体作用机制,为开发新的脑缺血损伤防治措施提供新的靶点,也为七氟烷预处理可能的临床应用提供可靠的理论支持。

文献回顾

1 氟烷类麻醉药预处理诱导脑缺血耐受的作用及机制

吸入性麻醉药通过肺部吸入而达到麻醉效果，包括挥发性液体（异氟烷、七氟烷、地氟烷、恩氟烷、氟烷等）和气体（氧化亚氮、氙气等）。研究显示各种吸入性麻醉药均可对脑缺血再灌注损伤发挥一定程度的保护作用，其中以针对氟烷类，尤其是异氟烷、七氟烷的研究最多。

1.1 异氟烷预处理对脑缺血的神经保护作用

异氟烷的预处理效应在多种缺血模型中进行了广泛的研究。在 MCAO 造成的局灶性脑缺血模型中，异氟烷浓度 1%~2.25%，刺激时间由 30min~4h 不等，单次或连续多日预处理，均被发现可改善缺血后动物的神经功能、减少脑梗死容积^[23-28]，而当浓度降至 0.75% 时则无效^[23]。另外，异氟烷预处理对局灶性脑缺血的保护作用具有性别特异性，仅对雄性鼠有效，对雌性鼠无效甚至会加重损伤（1.0%，4h）^[29]。在全脑缺血模型中，异氟烷预处理（1.2%，1h/天，连续 5 天）可抑制双侧颈总动脉结扎引起的海马 CA1 区神经元死亡，改善神经功能^[30, 31]，也可诱导狗对心跳骤停（8min）引起的脑缺血产生耐受，减轻其复苏后的神经功能障碍（1.5%，30min）^[32]。离体实验中，异氟烷预处理可降低原代培养大脑皮层神经元^[33-35]和视黄酸诱导分化后 SH-SY5Y 细胞^[36, 37]的 OGD 损伤，也可减轻体外培养的海马^[38, 39]和小脑^[40-43] OGD 后的细胞损伤。尽管多数异氟烷预处理神经保护相关研究在成年动物中进行，有研究发现幼年动物接受异氟烷预处理可改善缺血缺氧性损伤引起的夭折^[44]和神经发育障碍，改善其成年后的神经功能^[45]，尤其是皮层和纹状体^[46]，但对海马组织损伤和海马相关的学习记忆能力无明显影响^[47]。但 Sasaoka N 等的研究却发现异氟烷预处理对新生儿缺血缺氧性损伤仅具有短期的保护作用（7 天内），而延长观察时间（49 天）却未见到有差异性的结果^[48]。因此，需要进行更深入的研究来阐明异氟烷预处理诱导脑缺血耐受的作用与性别、年龄、缺血严重程度等因素的关系，以及其保护作用的持续时间。

1.2 七氟烷预处理对脑缺血的神经保护作用

七氟烷在上世纪九十年代开始用于临床麻醉，由于其物理性质稳定、诱导快速、对呼吸循环功能影响较小等特征，迅速获得麻醉医生的青睐。七氟烷预处理的神经保护作用首先在体外研究发现，Kehl F 等采用 1、2、3 MAC (minimal alveolar concentration, 最小肺泡浓度)三个浓度的七氟烷处理海马脑片 30min, 随后进行 13min 缺氧, 复氧 30min, 采用电生理技术检测海马 CA1 区的电活动, 发现七氟烷对海马组织缺氧性损伤具有剂量依赖性的预处理效应^[10]。另一实验室用 2%、4%、6% 的七氟烷预处理海马脑片后进行 OGD, 也得到了类似的剂量依赖性结果, 同时形态学研究发现七氟烷预处理可减轻 OGD 引起的 CA1 区神经元变性、坏死等^[49]。在体研究的证据首先在大鼠心跳骤停造成的全脑缺血模型中获得: 作者给予大鼠一个 MAC 的七氟烷预处理, 持续 30min, 结果显示无论是单次预处理后 15min 缺血, 或是连续 4 天预处理间隔 24h 后缺血, 七氟烷预处理均可减轻 7min 心跳骤停引起的海马 CA1 区神经元损伤, 并可改善 CA1 区 LTP (long-term potentiation, 长时程增强), 且这种保护作用可持续至复苏后 7 天^[50]。随后七氟烷诱导缺血耐受的作用陆续在小脑组织^[42]、原代培养神经元^[51]和神经元-胶质细胞联合培养^[52]的 OGD 模型、新生鼠缺血缺氧模型^[47, 51]、局灶性脑缺血模型^[9, 53]以及脊髓缺血模型^[54, 55]等中得到了验证。与异氟烷类似, 对七氟烷预处理的浓度选择在 1%~4%之间, 多数研究选择 1MAC, 但尚无证据显示更低浓度的七氟烷是否对脑缺血损伤具有预处理效应。另外, 关于七氟烷预处理神经保护作用的持续时间, 有研究显示其可改善局灶性脑缺血 (60min) 再灌注后 3 天大鼠的神经功能、降低脑梗死容积, 但再灌注后 7 天、14 天这种显著性差异消失^[9]。然而同样是在 MCAO 造成的局灶性脑缺血损伤模型中 (120min), Ye R 等在缺血后 42 天仍然观察到了七氟烷预处理对神经功能和脑梗死容积的保护作用^[56]。新生鼠缺氧模型中七氟烷预处理的脑保护作用也持续到了缺血后 30 天^[51]。因此尽管七氟烷预处理对缺血缺氧性脑损伤的神经保护作用已经得到了大量实验证据的支持, 然而仍存在部分有争议的结果, 尚需综合分析不同实验中所采用的预处理参数 (七氟烷浓度、持续时间)、损伤参数 (缺血模型、持续时间) 和观察指标、观察时间等, 并进行更严密可靠的研究以得到明确清晰的结论。

1.3 七氟烷预处理神经保护作用的可能机制

1.3.1 降低兴奋性毒性

兴奋性毒性是指脑缺血缺氧时能量缺乏使神经元细胞膜上钠钾 ATP 酶活性下降,引起胞外钾离子浓度显著增高,细胞膜持续去极化,兴奋性氨基酸大量释放,导致突触后神经元过度兴奋并最终死亡。在大鼠皮层和海马组织以及培养神经元 OGD 模型中,七氟烷可通过影响谷氨酸转运体的功能,逆转能量缺乏引起的细胞外谷氨酸和天冬氨酸水平上升^[11, 57-59]。而在脑缺血模型中,七氟烷也可降低脑缺血后脑内谷氨酸和去甲肾上腺素浓度^[60]。Wang C 等发现七氟烷预处理对小脑切片 OGD 模型的保护作用可被谷氨酸转运体的抑制剂取消^[42],表明其预处理效应也可能是通过降低兴奋性毒性实现的。

1.3.2 减少氧化应激

在神经元-胶质细胞联合培养中,采用 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯)染色发现七氟烷预处理后细胞 ROS (reactive oxygen species, 活性氧簇)产生量增加,而七氟烷预处理对 OGD 的细胞保护效应却可被氧自由基清除剂 2-MPG 和 NAC 阻断^[52]。Yang Q 等采用七氟烷连续 5 天预处理大鼠,在末次预处理 24h 后检测脑组织和血清的抗氧化酶活性,发现脑内 SOD (superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶)、CAT (catalase, 过氧化氢酶)、GSH-px (glutathion peroxidase, 谷胱甘肽过氧化物酶)的含量均较对照组显著升高,血清内的 GSH-px 也较对照组明显升高,且与 MCAO 后造成缺血后的脑梗死容积呈负相关^[8]。上述研究结果表明七氟烷预处理诱导脑缺血耐受的机制部分是通过使细胞产生少量自由基,这些自由基激活了内源性抗氧化系统,从而有效对抗缺血再灌注后产生的大量自由基对细胞产生的损伤。

1.3.3 减轻炎症反应

脑缺血后大量炎症因子释放,在缺血急性期是机体的一种自我防御机制,但随后过于强烈的级联式炎症反应却会加重缺血再灌注损伤。研究发现,局灶性脑缺血后 TNF- α (tumor necrosis factor- α , 肿瘤坏死因子- α)、IL-1 β (interleukin-1 β , 白细胞介素-1 β)等细胞因子和 NF- κ B (nuclear factor- κ B, 核因子- κ B)、MAPK (mitogen-activated protein kinase, 丝裂原活化蛋白激酶)等炎症相关细胞内信号分子的 mRNA、蛋白表达水平均显著上调,缺血前 24h 行单次或多次七氟烷预处理,缺血后 24h 或 72h 检

测到上述细胞因子和细胞内信号分子的上调被抑制^[53, 61, 62], 表明七氟烷预处理可通过限制急性期后脑内炎症反应的程度而发挥其延迟相脑保护作用。另外, 在脊髓缺血模型中, 七氟烷预处理可抑制缺血后小胶质细胞活化和 MMP-9 (matrix metalloproteinase-9, 基质金属蛋白酶-9) 分泌, 降低趋化因子 CXCL10 (C-X-C motif chemokine 10, CXC 模序趋化因子 10)、CCL2 (C-C motif ligand 2, C-C 模序配体 2) 和促炎因子 IL-1 β 释放, 从而减少了血脑屏障的炎性损伤, 维持了血脑屏障的完整性, 减轻缺血引起的脊髓神经损伤^[55]。

1.3.4 抑制细胞凋亡

凋亡是缺血后延迟性神经细胞死亡的主要方式。很多关于七氟烷预处理神经保护作用的研究都关注了其对细胞凋亡的影响, 发现七氟烷预处理在离体和在体环境下均可抑制凋亡相关蛋白 Caspase-3 活化片段产生, 降低 TUNEL 阳性细胞的数量^[9, 63-65]。进一步研究发现七氟烷预处理可通过下调促凋亡基因 (Tnf, Tnfrsf10b, Tp53 等) 表达、上调抗凋亡基因 (Aven, Bcl2, Bcl2l2, Prok2 等) 表达, 影响二者之间的平衡从而使细胞内分子信号向抗凋亡方向发展^[28]。另外, Shi H 等发现 microRNA-15b 可抑制性调控 Bcl2 表达, 参与了脑缺血后的凋亡性细胞损伤, 而七氟烷预处理可降低 miR-15b, 逆转其对 Bcl2 的下调, 且采用 siRNA 干扰 miR-15b 表达可模拟七氟烷预处理的保护作用^[66], 表明七氟烷预处理可通过抑制 miR-15b 对 Bcl2 的调控发挥抗凋亡作用, 也为防治脑缺血再灌注损伤提供了新的干预靶点。

1.3.5 激活 ATP 敏感性钾通道 (ATP sensitive potassium channel, K_{ATP})

K_{ATP} 分为两类, 一类是分布于胞质膜上的 sarcK_{ATP}, 另一类是分布于线粒体膜上的 mitoK_{ATP}。正常情况下 K_{ATP} 活性较低, 受刺激开放时 sarcK_{ATP} 可减轻细胞膜去极化程度而减少兴奋性毒性损伤, mitoK_{ATP} 则发挥抑制线粒体钙超载、缓解线粒体基质肿胀、调节自由基生成等作用。研究者在多种缺血模型中发现七氟烷预处理的保护作用可被选择性 mitoK_{ATP} 抑制剂 5-羟基癸酸 (5-hydroxydecanoic acid 5-HD)^[10, 49, 67-69] 阻断, 而激动剂二氮嗪 (diazoxide, DZX) 则可模拟七氟烷预处理的效应^[69], 表明七氟烷预处理可通过激活 K_{ATP} 发挥保护作用。另外, Velly L 等发现七氟烷预处理的保护效应可同时被 5-HD 和 sarcK_{ATP} 阻断剂格列本脲 (glibenclamide) 所阻断^[52], 表明 sarcK_{ATP} 也参与了七氟烷预处理的神经保护作用。然而 Bantel C 等却得到了不同的结论, 他们在神经元-胶质细胞共同培养 OGD 模型中发现, 七氟烷预处理的效

应既不能被 sarcK_{ATP} 阻断剂甲苯磺丁脲 (tolbutamide) 阻断, 也不能被 mitoK_{ATP} 阻断剂 5-HD 阻断; 进一步在 HEK293 细胞中高表达重组 sarcK_{ATP}, 发现七氟烷、异氟烷均不能激活 sarcK_{ATP}, 而是对其产生抑制作用, 因此认为 K_{ATP} 的开放并不参与氟烷类麻醉药预处理的保护作用^[70], 这对之前的结论提出了挑战, 故 K_{ATP} 在七氟烷预处理神经保护中的角色尚需进一步阐明。

1.3.6 活化蛋白激酶系统

细胞内蛋白激酶负责控制蛋白质的磷酸化, 决定蛋白质的结构和活性, 影响细胞内信号传递过程, 在调控细胞内生存信号和死亡信号的平衡中发挥重要作用。研究发现七氟烷预处理可通过激活 cAMP (cyclic adenosine monophosphate, 环化腺苷酸) /PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase, 磷脂酰肌醇 3 激酶)^[51] 或抑制 CTMP (carboxy-terminal modulator protein, 羧基末端调节蛋白)^[71], 使 Akt 磷酸化增强而活化, 促进缺血后细胞的生存。其他两类重要蛋白激酶系统 MEK (MAPK/ERK kinase, MAPK/ERK 激酶) /ERK (extracellular signal-regulated kinase, 细胞外信号调节激酶) /MAPK、PKC (protein kinase C, 蛋白激酶 C) /PKM (protein kinase M, 蛋白激酶 M) 也在七氟烷预处理的神经保护中扮演重要角色。ERK 抑制剂 U0126 可逆转七氟烷预处理诱导的脊髓缺血耐受^[54], U0126 和 MAPK 抑制剂 SB203580 还可逆转七氟烷对海马脑片 OGD 模型的预处理效应^[72]。PKC/PKM 的激活与 mTOR (mammalian target of rapamycin, 雷帕霉素靶蛋白) 信号通路有关。七氟烷预处理活化 mTOR, 使 PKC/PKM 蛋白合成增加, 并维持磷酸化激活状态, 开放 K_{ATP}, 增强细胞膜超极化程度, 减少缺血引起的除极化和兴奋性毒性^[73, 74]。除此之外, FAK (focal adhesion kinase, 局部粘着激酶) 也参与了七氟烷预处理减轻缺血性神经损伤的作用^[64]。

1.3.7 其他可能机制

除上述经典促生存的机制之外, 七氟烷预处理还可通过其他细胞内调节分子影响细胞转归。TREK1 (TWIK-related K⁺ channel-1, TWIK 相关钾通道-1) 是双孔钾通道的一种, 是挥发性麻醉药的靶点之一。七氟烷预处理可增加 TREK1, 下调 TREK1 则会逆转七氟烷预处理的脑保护作用^[75], 表明除 K_{ATP} 外, TREK1 也参与了七氟烷预处理对细胞内外钾离子平衡的调节。Notch 信号通路虽不属于蛋白激酶, 但也在细胞内信号转导中发挥极为重要的作用, 与细胞分化、发育等功能密切相关。近年来发现 Notch 信号参与脑缺血再灌注损伤过程及后期组织修复过程, 本实验室的研究结

果表明该信号通路参与了包括七氟烷预处理在内的多种预处理措施的神经保护效应^[76]。另外，七氟烷预处理还可通过降低粘附分子（ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1, 细胞间粘附分子-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, 血管细胞粘附分子-1）和基质金属蛋白酶（MMP-2; MMP-9; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, 金属蛋白酶组织抑制剂-1）从而减轻缺血缺氧对血脑屏障的破坏^[77]、抑制线粒体通透性转换孔（mitochondrial permeability transition pore, mPTP）维持缺血后线粒体正常功能^[56]、缓解缺氧造成的 ATP 合成减少以改善能量代谢^[78]等机制减轻缺血再灌注造成的脑损伤。

以上对七氟烷预处理诱导脑缺血耐受的机制回顾显示，七氟烷预处理通过调节 K_{ATP} 、蛋白激酶系统及其他多种信号分子来影响细胞兴奋性、氧化还原过程、能量代谢等，还可抑制凋亡、平衡炎症与抗炎反应、维持血脑屏障通透性，最终实现对缺血再灌注损伤的神经保护作用。然而上述机制研究多集中在神经元本身，做为中枢神经系统内含量最丰富的细胞种类，星形胶质细胞在调节脑缺血后神经元死亡与存活中发挥重要作用，但其是否参与七氟烷的预处理效应尚不得而知。

2 星形胶质细胞与脑缺血损伤

迄今为止，针对脑卒中的干预措施无一不是为了减少缺血后神经元细胞的死亡。然而，要减少缺血后的脑梗死，不仅仅是减少神经元死亡就能达到的，还必须将脑内包括星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞、内皮细胞等全部细胞种类考虑在内。由于星形胶质细胞的数量远远高于神经元的数量，且星形胶质细胞对神经元的存活和功能发挥起着至关重要的作用，因此保护好和维持星形胶质细胞的正常功能可能更有利于脑卒中的最终转归。

2.1 星形胶质细胞的生理功能

星形胶质细胞除了传统观点认为的物理性支持隔离以及提供营养物质外，还参与一系列与神经元存活和功能密切相关的生理活动，包括摄取和释放神经递质^[79]、保持细胞内外水^[80]和离子平衡^[81]、维持血脑屏障稳定性^[82]、调节脑血流量^[83, 84]、分泌神经营养因子^[85]等，近年来更发现参与了神经元细胞间的突触信息传递，出现了“三突触”的新概念^[86]。

2.1.1 维持细胞内外水、盐和酸碱平衡

神经元除极时 K^+ 大量外流，导致细胞外液 K^+ 浓度迅速升高^[87]。一方面，星形胶质细胞可通过缝隙连接和膜电位的变化迅速将局部升高的 $[K^+]_o$ 扩散至远处，起到“空间缓冲”的作用^[88]；另一方面，星形胶质细胞膜表面存在大量电压门控性和时间依赖性 K^+ 通道，以及其他类型的离子通道，可通过主动转运和被动扩散摄取神经元兴奋时释放到突触间隙和细胞外液的 K^+ ，其中 Na^+/K^+ 泵、 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体（NKCC 共转运体）发挥了重要作用^[89]，他们依赖 ATP 供能来维持细胞内高 K^+ 和低 Na^+ 环境。另外，Kir4.1 和双孔 K^+ 通道等^[90] 也发挥了一定的作用。

星形胶质细胞还可通过对细胞外 H^+ 和 HCO_3^- 的调节来控制细胞外液酸碱平衡。形成血脑屏障的星形胶质细胞内存在碳酸酐酶（carbonic anhydrase, Car），可将 CO_2 水合再分解为 H^+ 和 HCO_3^- ，再利用 Na^+/H^+ 交换将 H^+ 输送至血管内，而通过 Cl^-/HCO_3^- 交换将 HCO_3^- 转运到细胞外液；转运到细胞外液的 HCO_3^- 再结合细胞外液的 H^+ 形成新的 CO_2 进入星形胶质细胞成为 Car 的底物^[91]。如此 Car- Na^+/H^+ 交换- Cl^-/HCO_3^- 交换三者的循环可将细胞外 H^+ 维持在较低的水平。另外一个重要的 H^+ 转运系统是乳酸/ H^+ 转运体。该转运体在星形胶质细胞和神经元内存在同工酶，主要功能是将乳酸转运出星形胶质细胞，而吸收进神经元并为神经元提供能量，即星形胶质细胞-神经元乳酸循环（astrocyte neuronal lactate shuttle, ANLS）^[92]。

此外，星形胶质细胞膜上存在大量水通道（aquaporins, AQP），其中最主要的是 AQP4，主要分布于星形胶质细胞靠近毛细血管和小动脉的膜上^[93]。AQP4 的存在可使星形胶质细胞膜内外发生快速而高效的水转运，可能是水进出脑实质的主要通道^[93]。

2.1.2 摄取、灭活谷氨酸、GABA、甘氨酸等神经递质

星形胶质细胞最重要的功能之一便是摄取兴奋性神经递质谷氨酸，并依赖星形胶质细胞特异性的谷氨酰胺合成酶（glutamine synthetase）将谷氨酸转化为谷氨酰胺使其灭活。灭活的谷氨酰胺被释放到细胞外液，由邻近的突触前神经元吸收并重新转化为谷氨酸^[94]。星形胶质细胞再摄取并灭活谷氨酸，限制了谷氨酸大量释放对神经元的兴奋性毒性作用，在脑缺血/再灌注损伤中发挥重要作用。星形胶质细胞对谷氨酸的摄取依赖于其膜表面的兴奋性谷氨酸转运体（excitatory amino acid transporters, EAATs），其中以 EAAT2 的作用最为重要^[95]。除 EAATs 外，星形胶质细胞还具有

GABA 转运体 (GABA transporter, GAT), 如 GAT1 和 GAT3^[96, 97], 以及甘氨酸转运体 (glycine transporter, GlyT) GlyT-1 和 GlyT-2^[98, 99]以及牛磺酸转运体^[100]等, 可对这些神经递质的含量进行调节。尚未在星形胶质细胞膜表面发现单胺能神经递质的存在, 因此其不能对去甲肾上腺素、5-羟色胺、多巴胺等进行再摄取^[89]。

2.1.3 形成和维持血脑屏障的完整性, 控制脑血流量

星形胶质细胞终足包绕脑内所有血管, 与内皮细胞紧密连接、周细胞、基膜共同构成血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB)。胚胎发育期, 星形胶质细胞鞘与血管内皮细胞的相互作用导致形成了内皮细胞间紧密连接^[101]。生后星形胶质细胞鞘仍存在, 介导血液与脑实质尤其是神经元间的物质交换, 例如将血液中的营养物质葡萄糖、氨基酸等输送至神经元, 并将神经细胞产生的代谢产物转运至血管^[102]。由于毛细血管缺乏平滑肌细胞, 脑血流量的控制主要依赖小动脉直径的改变。近年来研究发现, 星形胶质细胞可做为转换器将神经元活动变化传递至小动脉的平滑肌细胞, 改变小动脉的直径进而影响局部血流量^[103]。星形胶质细胞膜表面 mGluR (metabotropic glutamate receptor, 代谢型谷氨酸受体) 被激动引起细胞内 Ca^{2+} 水平升高, 活化磷脂酶 A2 产生花生四烯酸, 再由 COX-1 转化成前列腺素 2, 使血管平滑肌舒张^[104]。

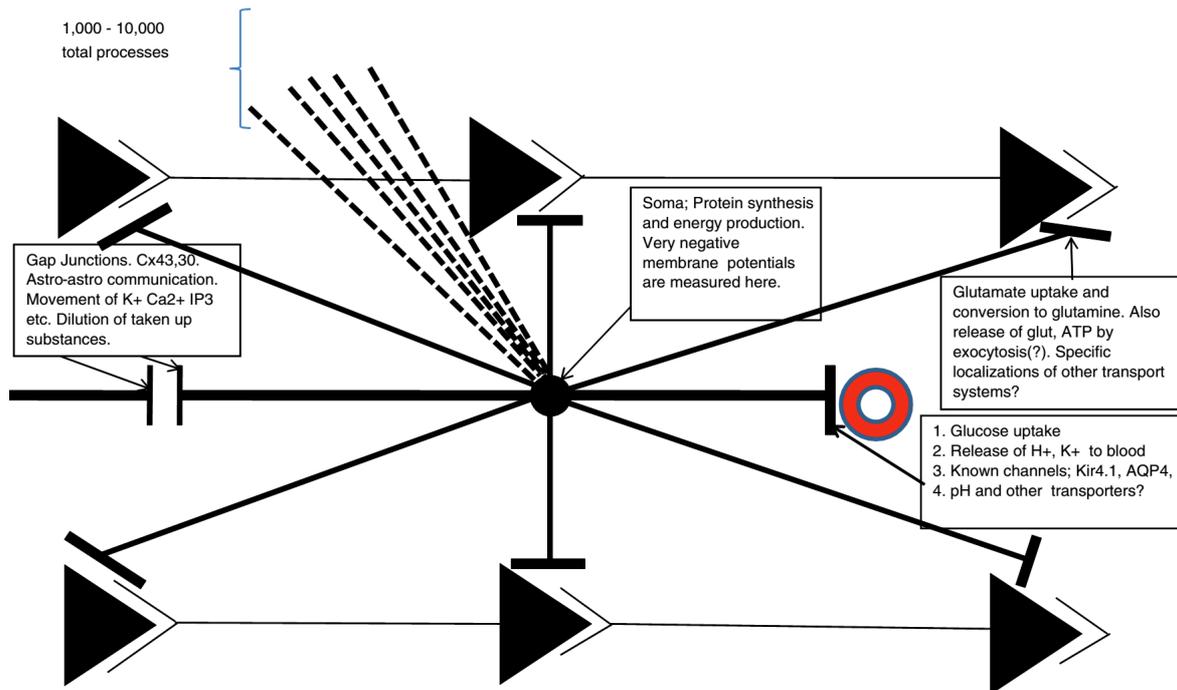


图 1. 星形胶质细胞与其他细胞的细胞间联系及主要生理功能。

Harold K. Kimelberg. *The Neuroscientist*. 2010, 16(1): 79-106.

2.2 星形胶质细胞与脑缺血

脑缺血/再灌注损伤中会导致神经元死亡的病理机制也在星形胶质细胞死亡中发挥重要作用, 如 ROS、炎症、凋亡等, 然而两者又存在差异。缺血核心区完全的脑血流阻断导致氧和葡萄糖等能量物质的缺乏, 会引起包括神经元和星形胶质细胞在内的所有细胞发生不可逆的损伤; 但在缺血半暗带区, 可由侧枝循环或周边正常组织扩散提供氧糖, 细胞还有恢复正常的机会, 而星形胶质细胞较神经元更有可能存活^[105]。星形胶质细胞—神经元共培养时, 60~90min OGD 即可引起绝大多数神经元死亡, 而星形胶质细胞则在 4~6h OGD 后仅有部分损伤^[106, 107]。动物实验也发现, 缺血核心区以外, 星形胶质细胞存活量比神经元更多^[105]。MCAO 后 1h 神经元标志物即明显下降, 但星形胶质细胞 GFAP (glial fibrillary acidic protein, 神经胶质酸性蛋白) 在再灌注 3h 仍持续高表达, 直至后期转化为胶质瘢痕^[108]。因此针对更易存活的星形胶质细胞开发神经保护措施和药物将有可能降低缺血后的脑梗死面积, 改善神经功能并促进恢复期的神经修复。

2.2.1 缺血后反应性星形胶质细胞增生 (astrogliosis) 的“双刃剑”作用

上文所述缺血半暗带区 GFAP 高表达是反应性星形胶质细胞增生的表现。急性期, 星形胶质细胞反应使细胞间缝隙连接持续开放, 促凋亡因子等物质向周围细胞扩散, 会导致梗死面积的扩大^[109]。另外, 星形胶质细胞释放促炎细胞因子会加重缺血后脑内的炎症反应, 引起损伤加重^[110]。抑制星形胶质细胞反应性增生可降低梗死面积, 改善缺血后神经功能恢复^[111]。在缺血晚期, 反应性星形胶质细胞形成胶质瘢痕, 一方面肥大的星形胶质细胞及相互交叉的细胞突起会形成物理屏障^[112], 另一方面星形胶质细胞还会产生硫酸软骨素 (chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs) 等抑制性化学物质^[109], 两者均会阻碍损伤后的修复过程。然而, 缺血后星形胶质细胞也会产生对抑制损伤和促进修复有益的反应, 包括形成胶质屏障防止损伤进一步扩散^[113], 重建 BBB^[114], 产生神经营养因子^[115]等。研究发现, 敲除 GFAP 的小鼠局灶性脑缺血后梗死面积增加^[116]; 同时敲除 GFAP 和波形蛋白 (另一星形胶质细胞反应性增生的标志物) 使星形胶质细胞谷氨酸摄取能力受损^[117], 而 MCAO 后给予星形胶

质细胞条件性培养液可降低梗死容积，恢复 BBB 功能^[118]，表明缺血后星形胶质细胞释放的物质具有神经保护作用。因此，缺血后星形胶质细胞同时发挥伤害性和保护性两方面的作用，使其有希望成为减轻脑缺血损伤、促进神经功能恢复的有意义的干预靶点。

2.2.2 星形胶质细胞调节细胞外谷氨酸水平和兴奋性毒性

上文已提到，摄取兴奋性神经递质谷氨酸是星形胶质细胞最重要的功能之一。脑缺血后，神经元受到刺激大量释放谷氨酸，引起突触后膜持续去极化，并经过一系列级联反应最终导致细胞的死亡，即兴奋性毒性损伤。星形胶质细胞依赖于 EAAT2 和 EAAT1 重吸收突触间隙和细胞外液的谷氨酸^[79]，维持正常情况下细胞外谷氨酸含量的平衡，提高 EAATs 的功能可减轻缺血后的兴奋性毒性。但 EAAT2 摄取谷氨酸是一个主动耗能的过程，依赖于 Na^+/K^+ ATP 酶。脑缺血缺氧引起 ATP 水平下降， Na^+/K^+ ATP 酶的活性降低，导致 EAATs 功能抑制，又可加重兴奋性毒性的发生^[119, 120]。

2.2.3 星形胶质细胞分泌炎症因子参与脑缺血损伤和修复过程

除小胶质细胞外，星形胶质细胞也是中枢神经系统内不容忽视的一种免疫细胞，可释放多种炎症因子。缺血数分钟后，缺血核心区和半暗带区的神经元及胶质细胞产生促炎细胞因子和 ROS，活化星形胶质细胞和小胶质细胞^[121]。活化的星形胶质细胞可释放 IL-6、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1 α 、IL-1 β 、 $\text{IFN}\gamma$ 等促炎细胞因子^[11, 121]，通过增加 NO (nitric oxide, 一氧化氮) 含量^[122]、诱导凋亡、抑制神经发生等机制阻碍缺血损伤后修复过程^[36, 123]。缺血后活化星形胶质细胞还可释放趋化因子^[124]，通过上调血管内皮细胞粘附分子、促进免疫细胞渗出而加重缺血损伤^[125]。然而另一方面，炎症反应也可发挥有益的作用。星形胶质细胞释放的 IL-6 在缺血早期具有神经保护作用^[126]。缺血预处理可通过 TLR-4 信号通路增加 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 和 COX-2 等炎症调节因子诱导脑缺血耐受^[127]。因此，炎症反应在脑缺血中的作用不能一概而论，取决于缺血的时间和炎症反应的强弱程度。

2.2.4 星形胶质细胞通过合成释放抗氧化物减轻氧化应激损伤

缺血后细胞快速产生大量自由基，包括 NO、超氧化物、亚硝酸盐等^[128]，引起氧化代谢和 ATP 产生障碍，破坏线粒体膜释放细胞色素-C 导致细胞凋亡^[129]，还可使生物膜脂质过氧化等，引起细胞坏死^[130]。星形胶质细胞通过释放 GSH 和 SOD、

抗坏血酸等抗氧化物减轻氧化应激损伤，在维持神经元存活中发挥重要作用^[131, 132]。其中 GSH 是脑内主要的抗氧化物，星形胶质细胞内 GSH 及其合成代谢酶远高于神经元。神经元与星形胶质细胞共培养时，GSH 含量高于神经元单独培养，提示星形胶质细胞可能向神经元提供 GSH^[133]。但神经元不是直接利用来自星形胶质细胞的 GSH，而是利用星形胶质细胞源性 GSH 还原胱氨酸产生并进入神经元的半胱氨酸来重新合成 GSH，发挥对抗神经元内活性氧的作用^[134]。星形胶质细胞释放的 GSH 也可通过清除细胞外 ROS 减轻神经元的损伤^[135]。多种治疗措施和药物可通过上调 GSH 水平减轻缺血损伤^[136, 137]。脑缺血时星形胶质细胞 SOD 含量增加^[138]，SOD 可将超氧化物转化为氧气和过氧化氢，减轻超氧化物引起的氧化应激损伤。SOD1 基因敲除小鼠缺血后脑梗死容积显著增加^[139]，上调 SOD1 可对局灶性脑缺血和全脑缺血产生保护作用^[140, 141]。星形胶质细胞内的抗坏血酸（即维生素 C）在脑缺血/再灌注中发挥延迟性的对抗氧化应激损伤的作用^[142]。脱氢抗坏血酸是抗坏血酸的前体物质，能够透过 BBB，进入脑内后可由星形胶质细胞吸收并转化为抗坏血酸释放到细胞外发挥抗氧化作用减轻 MCAO 引起的脑缺血/再灌注损伤^[143]。

2.2.5 星形胶质细胞通过水通道蛋白影响缺血后脑水肿

缺血后由于血脑屏障的破坏，水分子由血管渗出到脑实质内，引起脑水肿。脑水肿后血管受到压迫，进一步降低脑血流，加重细胞损伤。星形胶质细胞通过水通道蛋白在缺血后脑水肿中发挥关键性调节作用^[144]。AQP4 可快速调节细胞内外和血管内外的水含量和渗透压。AQP4 高表达于脑血管周围的星形胶质细胞终足^[145]，使星形胶质细胞在脑缺血病理过程水含量变化中发挥核心作用。AQP4 基因敲除小鼠卒中后脑水肿程度较轻^[146]，因此抑制 AQP4 功能可成为减轻脑水肿的药物开发靶点。降低 AQP4 含量还可通过抑制 VRAC（volume-regulated anion channels，容量调节性阴离子通道），减少由 VRACs 释放至细胞外液的谷氨酸而发挥神经保护作用^[147]。另外，AQP4 尚可促进星形胶质细胞迁移和胶质瘢痕形成，抑制 AQP4 可减轻胶质瘢痕形成。

2.2.6 星形胶质细胞释放神经营养因子减轻损伤和促进修复

星形胶质细胞可释放 EPO（erythropoietin，促红细胞生成素）、VEGF（vascular endothelia growth factor，血管内皮生长因子）、GDNF（glial cell-derived neurotrophic factor，胶质细胞源性神经营养因子）等神经营养因子，起到减轻缺血后神经损伤或

促进卒中后神经功能恢复的作用。EPO 可减轻 OGD^[148]、谷氨酸^[149]以及 NO^[150]诱导的细胞死亡，也对动物脑缺血模型具有保护作用^[151, 152]。星形胶质细胞是脑内 EPO 的主要来源^[153]，参与了 EPO 的神经保护作用。缺血缺氧后，HIF-1（hypoxia induced factor-1，低氧诱导因子）诱导星形胶质细胞表达 VEGF^[154]，减轻细胞损伤^[155]，促进血管生成^[156]，抑制中风晚期神经元死亡^[157]。此外，星形胶质细胞还可向细胞外液释放 ATP，ATP 转化为腺苷，可起到神经保护作用^[158]。

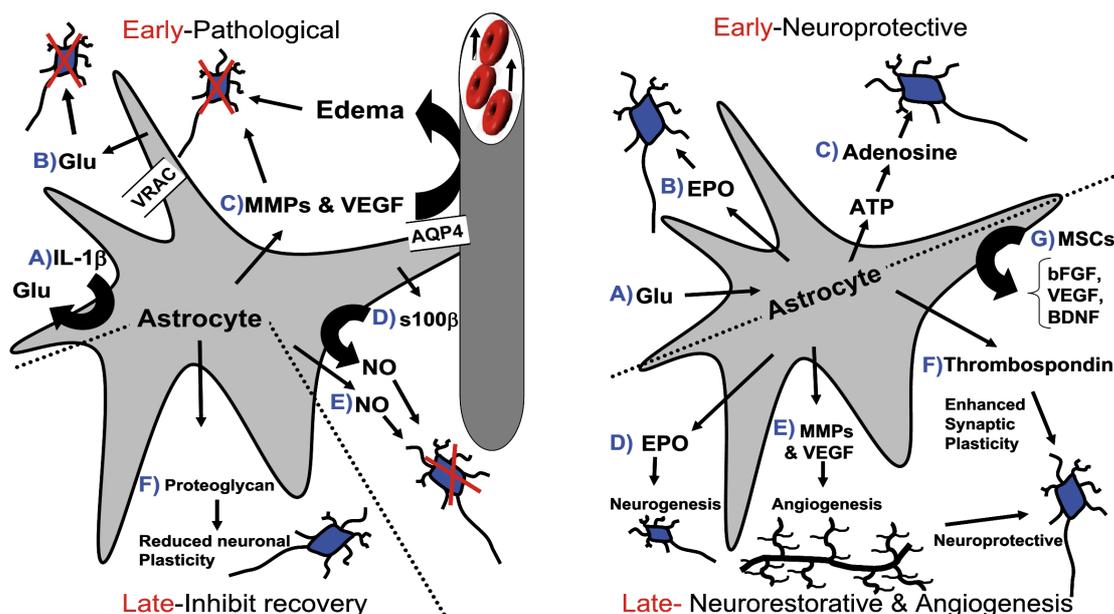


图 2. 星形胶质细胞在脑缺血后神经元损伤和存活中所发挥的作用。

Yanxin Zhao, David A. Rempe. *Neurotherapeutics*. 2010, 7: 439-451.

3 NDRG2 在脑功能及神经系统疾病中的作用

3.1 NDRG2 的结构和分布情况

人NDRG2基因定位于14号染色体q11.1-11.2，转录产物为2121bp，编码371个氨基酸的蛋白质，分子量为40.7kD，具有 α/β 水解酶的催化结构域^[159]。NDRG2具有多个磷酸化位点：Thr330、Ser332和Thr348在骨骼肌细胞中被发现，三者均可被SGK1（serum/glucocorticoid-induced kinase 1，血清/糖皮质激素诱导蛋白激酶1）磷酸化，Thr348和Ser332位点还分别可被Akt和PKC θ 磷酸化^[160, 161]。另两个磷酸化位点T330和T334在海马中被发现^[162]，但诱导其磷酸化的激酶尚未探明。

Northern-blot发现NDRG2 mRNA在脑、骨骼肌中高表达，在心脏、肝脏、肾脏

中次之。进一步大规模dot blot分析发现NDRG2 mRNA还高表达于唾液腺，肾上腺和气管中表达量中等，肺、消化道和泌尿生殖系统表达量较低，免疫和造血器官（胸腺、白细胞、淋巴结、骨髓等）中基本检测不到NDRG2 mRNA^[163]，提示NDRG2基因表达水平与细胞增殖速度呈负相关。发育过程中，NDRG2在胚胎期和生后持续表达且表达量逐渐升高^[164, 165]。在细胞内，NDRG2主要定位于细胞质中^[166]，在脑中可出现于细胞核^[167]。

3.2 NDRG2 的功能和表达调控

3.2.1 NDRG2 抑制细胞增殖，促进细胞分化和凋亡

作为 Myc 调节基因，NDRG2 在细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用。NDRG2 过表达可使细胞停留在细胞分裂的 G1^[168]或 S 期^[169]，通过抑制细胞周期蛋白 E-Cdk2^[170]和调节组蛋白乙酰化^[171]抑制细胞增殖。另外，NDRG2 是 p53 的靶基因并参与 p53 信号通路介导的细胞凋亡^[170, 172]。研究者在多种肿瘤组织和细胞系中检测到 NDRG2 表达下调，如肝细胞癌^[173]、结直肠癌^[174]、肾细胞癌^[175]、胃癌^[176]、乳腺癌^[177]等。NDRG2 含量与肿瘤分级和分期呈负相关^[178-181]，过表达 NDRG2 可抑制肿瘤细胞生长、侵袭和转移^[182-184]，因此 NDRG2 已被广泛认为是一个抑癌候选基因，可做为肿瘤发展和预后的标志物。NDRG2 通过与和肿瘤发生发展密切相关的多条细胞内信号通路相互作用发挥其抑癌功能，包括：TCF（T cell factor，T 细胞因子）/ LEF（lymphoid enhancer factor，淋巴增强因子）/ β -catenin（ β -连环蛋白信号）通路^[174, 185]，ERK/ MAPK 信号通路^[186]，LKB1（liver kinase B1，肝激酶 B1）/ AMPK（AMP-activated protein kinase，AMP 激活的蛋白激酶）信号通路^[187]，JAK（Janus kinase，Janus 激酶）/ STAT3（signal transducers and activators of transcription 3，信号转导与转录激活因子 3）/ Snail 信号通路^[177, 188]，NF- κ B（nuclear factor- κ B，核因子- κ B）信号通路^[189, 190]，PI3K/Akt/ GSK3 β （glycogen synthase kinase-3 β ，糖原合成酶激酶-3 β ）信号通路^[182, 191]和 TGF- β 1（transforming growth factor- β 1，转化生长因子- β 1）/ Smad 信号通路等^[192]。

3.2.2 NDRG2 参与多种激素的功能

NDRG2 可被多种激素诱导表达并参与这些激素的功能调节。雌激素可上调内皮细胞 NDRG2 含量，NDRG2 与 Na⁺/K⁺-ATP 酶 β 1 亚基的相互作用可促进 Na⁺/K⁺-ATP 酶的功能^[193]。在雌激素缺乏的大鼠中，在唾液腺局部给予 NDRG2 过表达腺病毒可恢复唾液腺的分泌功能^[194]，表明 NDRG2 参与雌激素对离子转运和水平衡的调节功

能。肾上腺切除术使海马、皮层和心脏 NDRG2 mRNA 表达水平下降, 给予皮质酮可使其恢复^[195]。地塞米松呈剂量依赖性地升高原代培养星形胶质细胞内的 NDRG2 表达水平, 而糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 拮抗剂米非司酮 (mifepristone, RU486) 可阻断这一效应^[190], 表明 NDRG2 受到糖皮质激素的正向调节。另外, NDRG2 还可被盐皮质激素和雄激素调节。醛固酮可增加肾皮质收集管细胞 NDRG2 的表达水平^[196], 而双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT, 睾酮的活性代谢物) 可降低相同部位的 NDRG2 表达^[197], 表明盐皮质激素和雄激素对肾皮质收集管的 NDRG2 表达发挥不同的调节作用。

3.2.3 NDRG2 调节细胞应激

NDRG2 受到多种病理性刺激的调节。高温可诱导 NDRG2 表达增加, 并通过抑制 ERK1/2 信号通路进而抑制 HCC (hepatocellular carcinoma, 肝细胞癌) 细胞侵袭^[198]。高温还可通过 Akt 诱导 NDRG2 磷酸化而促进胃癌细胞凋亡^[176]。NDRG2 过表达增加 2-脱氧葡萄糖 (2-deoxyglucose, 2-DG) 和缺氧的促凋亡效应, 表明 NDRG2 可做为 OGD 等代谢性刺激的感受器^[187]。HIF-1 在代谢性刺激诱导 NDRG2 上调中发挥重要作用^[199]。除病理性刺激外, 一些生理性刺激也可诱导 NDRG2 表达发生改变。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 可诱导巨噬细胞中 NDRG2 表达上调发挥抑制 PDGF (platelet-derived growth factor, 血小板源性生长因子)、VEGF 等生长因子释放的作用^[200]。鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) 可强烈刺激 NDRG2 在人肝癌细胞和原代培养肝细胞的表达^[201]。另外, 在骨髓肌细胞中, 持续的体育锻炼也可诱导 NDRG2 基因表达, 参与调节肌细胞收缩相关基因的表达^[202]。

3.3 NDRG2 在神经功能和神经系统疾病中的作用

在脑中, NDRG2 广泛分布于各个脑区。免疫荧光双标显示 NDRG2 与星形胶质细胞标志物 GFAP 共定位, 提示 NDRG2 主要表达于星形胶质细胞^[167, 203]。最新研究发现 NDRG2 在脑内的分布比 GFAP 广泛, 与 S100 β 基本重叠, 进一步表明 NDRG2 在星形胶质细胞的表达, 因此作者认为 NDRG2 可做为一种新的星形胶质细胞标志物^[204]。

由于 NDRG2 在中枢神经系统内主要表达于星形胶质细胞, 因此其在脑中的功能主要与其在星形胶质细胞活动中的作用有关。Takeichi T 等发现 NDRG2 基因沉默可增加原代培养星形胶质细胞中 BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine, 5'-溴脱氧尿苷) 和

PCNA (proliferating cell nuclear antigen, 增殖细胞核抗原) 阳性细胞的比例, 降低细胞突起长度和 F-肌动蛋白 (F-actin) 表达量; 而腺病毒介导的 NDRG2 过表达则产生了完全相反的作用, 表明 NDRG2 可通过抑制增殖和维持细胞正常形态来调节星形胶质细胞功能^[16]。大脑皮层刀刺伤模型中, 损伤区周围 NDRG2 表达增加, 敲除 NDRG2 基因使星形胶质细胞反应性改变减弱, 提示 NDRG2 可能在反应性星形胶质细胞增生中发挥关键作用^[205]。然而, 另一实验室则发现皮层注射 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 导致的胶质瘢痕中仅有极少量 NDRG2 表达, 因此认为 NDRG2 可做为成熟的、非反应性星形胶质细胞的特异性标志物^[204]。因此, 尚需更多的证据来说明 NDRG2 在星形胶质细胞反应性中的作用。

尽管形态学上尚未发现 NDRG2 蛋白在神经元中的表达, 却有研究发现 NDRG2 可能在神经分化、突触形成和轴突存活等方面发挥作用。NGF 诱导分化的 PC12 细胞中, NDRG2 mRNA 随时间延长逐渐升高, 但 NDRG2 蛋白未被检测到。当向 PC12 细胞中转染入 V5 连接 NDRG2 mRNA 时, 可在细胞膜表面和生长锥观察到 NDRG2 阳性染色的存在, 且 NDRG2 过表达还促进了细胞突起的萌出和延伸^[206]。Liu L 等采用原位杂交技术发现胚胎期 NDRG2 mRNA 在室管下区和海马齿状回含量丰富, 出生后表达逐渐下降。NDRG2 mRNA 不仅在增殖前体细胞与 BrdU、Ki67、Nestin 等共定位, 并且可在皮质板、小脑浦肯野细胞层 (Purkinje cell layer, PCL) 和视网膜内侧神经母细胞层 (inner neuroblastic layer, INB) 等部位正在分化中的有丝分裂后神经元中检测到, 说明 NDRG2 可能通过抑制神经前体细胞增殖和促进有丝分裂后神经元分化控制神经发生^[207]。

3.3.1 NDRG2 与胶质细胞瘤

胶质细胞瘤起源于胶质细胞, 是脑内最常见的肿瘤类型。NDRG2 表达在胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 中被显著抑制。Deng Y 等检测了脑组织和 GBM 细胞系中 NDRG2 的基因转录情况, 发现 GBM 组织样品和细胞系中 NDRG2 转录显著降低。转染人 NDRG2 cDNA 后, GBM 细胞系 U373 和 U138 增殖速度明显下降^[208]。进一步研究发现 GBM 中 NDRG2 表达减少与 NDRG2 启动子甲基化增多有关^[209]。NDRG2 还通过调节组蛋白乙酰化水平控制胶质瘤细胞的生长^[171]。两项临床观察发现 NDRG2 表达水平与胶质瘤分级呈负相关, 而与胶质瘤患者生存期呈负相关^[17, 210], 表明 NDRG2 可控制胶质瘤细胞增殖和分化, 其表达变化可做为胶质瘤预后的独立观

察指标。

3.3.2 NDRG2 与神经退行性疾病

神经退行性疾病主要包括阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 和帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD), 已成为最主要的致残性疾病之一。使用消减克隆技术, Cathy Mitchelmore等发现AD患者脑组织中NDRG2 mRNA和蛋白水平都明显升高。然而, 与在大鼠、小鼠中观察到的星形胶质细胞定位不同, 该研究在一名64岁的AD患者颞叶发现NDRG2表达于锥体神经元, 与NeuN共定位^[18]。同样在AD疾病中, Wang F等近来在APP/PS1转基因小鼠中发现NDRG2表达上调, 且与GFAP共定位。另外, APP/PS1小鼠脑内NDRG2的表达上调可被电针 (用于治疗AD小鼠的认知功能障碍) 所逆转^[211]。

用PD相关的神经毒素MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, 1-甲基-4-苯基-四氢吡啶) 处理小鼠, 星形胶质细胞内NDRG2呈现先下降后升高的趋势^[16]。在PD和皮质基底节变性 (cortico-basal degeneration, CBD) 患者的脑内, 也发现了星形胶质细胞内NDRG2的表达变化^[16], 提示NDRG2可能参与了PD的神经退行性改变。另外, Herskowitz JH等在额颞叶变性 (frontotemporal lobar degeneration, FTL D) 患者中发现NDRG2磷酸化水平改变^[20], 提示NDRG2磷酸化调节也参与了神经退行性变的病理过程。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的2型糖尿病大鼠的认知功能障碍 (diabetic cognitive dysfunction, DCD) 伴随海马中NDRG2表达下降, 采用GR拮抗剂RU486治疗DCD可同时逆转NDRG2的下调^[212], 表明NDRG2参与了糖皮质激素-GR对DCD的调节, 可作为DCD的治疗靶点。

3.3.3 NDRG2 与抑郁

前面已提到, NDRG2是糖皮质激素的靶基因^[195], 而糖皮质激素在抑郁的发病中具有极为重要的意义。抗抑郁药可能通过拮抗糖皮质激素的生物学效应缓解抑郁症状, 因此有理由认为抗抑郁治疗可对NDRG2表达产生影响。Takahashi K等连续数周给予大鼠丙咪嗪 (imipramine, 三环类抗抑郁药) 和舍曲林 (sertraline, 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂, selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 发现大鼠额皮质NDRG2 mRNA和蛋白水平均有所下降。有趣的是, 重复电惊厥治疗 (electroconvulsive treatment, ECT) 也可使该脑区的NDRG2表达下降。作者认为NDRG2可能与抗抑郁治疗引起的神经元可塑性的适应性改变有关^[213]。然而, Araya-Callis C等的研究得到

了不同的结果。他们发现慢性心理社会应激可升高海马NDRG2含量，而西酞普兰（citalopram，同样是SSRI）并不能使其回降。恰恰相反，西酞普兰本身可上调非应激大鼠的NDRG2水平^[19]。这些结果说明NDRG2在抑郁中的作用仍不明确，还需进行更深入和可靠的研究。

综上所述，NDRG2是一种在中枢神经系统主要表达于星形胶质细胞的基因。NDRG2与星形胶质细胞的反应性密切相关，参与胶质细胞瘤、AD、PD、抑郁等多种疾病的病理过程。尽管NDRG2在神经系统的功能和在神经疾病中的作用虽已进行了广泛的研究，但现有结论并不一致甚至相互矛盾，因此还需寻找更多的证据来阐明其功能和作用机制。

正文

第一部分 七氟烷预处理对缺血/再灌注后 NDRG2 表达的影响

1 材料

1.1 实验动物

SPF (specific pathogen free) 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 8~12 周龄, 体重 280~320g; 新生 SD 大鼠, 1~3 日龄, 均由第四军医大学实验动物中心提供。全部动物实验通过第四军医大学实验动物伦理委员会的批准, 并严格按照第四军医大学动物实验规范执行。

1.2 实验仪器

麻醉机	日本 Acoma 公司
麻醉气体分析仪	荷兰 Phillips 公司, MP-60 型
激光多普勒血流监测仪	瑞典 Perimed AB 公司, PeriFlux 5000 型
动物恒温手术台	西安万东仪器厂
肛温探头连接多功能监测仪	美国 Spacelab 公司
保温箱	深圳瑞沃德公司
超净台	上海苏净公司
解剖显微镜	德国 Leica 公司
200 目细胞滤网	北京索莱宝科技有限公司
CO ₂ 细胞培养箱	美国 Forma Scientific 公司
倒置相差显微镜	日本 Nikon 公司
恒温摇床	武汉科学仪器厂, HQ45 型
细胞孵育舱	美国 Billups-Rothenberg 公司

低温高速离心机	美国 Beckman 公司
凝胶电泳及转膜系统	美国 Bio-Rad 公司
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司, Bio-Rad iQ5 型
凝胶显像仪	美国 Bio-Rad 公司
酶标仪	美国 Bio-Rad 公司, Model 550 型
分光光度计	美国 Thermo 公司
荧光显微镜	日本 Olympus 公司, BX51 型
单通道移液器	德国 Eppendorf 公司
高压蒸汽灭菌锅	山东新华医疗器械公司, HINVA3260 型
pH 计	瑞士 Mettler 公司
纯水机	英国 ELGA 公司
制冰机	日本三洋电子有限公司, SIM-F123 型
微波炉	美的集团
大鼠脑槽	美国 TED-Pella 公司
数码相机	美国 Eastman Kodak 公司, Kodak DC240 型
Adobe Photoshop CS5	美国 Adobe Systems 公司
Image J	美国 NIH
SPSS 13.0	美国 SPSS 公司

1.3 实验耗材

75cm ² 细胞培养瓶	美国 Corning 公司
6cm 细胞培养皿	美国 Corning 公司
96 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
24 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
3-0 尼龙线	日本 ETHICON 公司
5-0 缝合用丝线	日本 ETHICON 公司
7-0 缝合用丝线	日本 ETHICON 公司
细胞刮刀	丹麦 NUNC 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司

1.4 实验试剂

DAPI	美国 Sigma-Aldrich 公司
DEPC	美国 Sigma-Aldrich 公司
DMSO	美国 Sigma-Aldrich 公司
MTT	美国 Sigma-Aldrich 公司
PMSF	中国碧云天公司
TTC	美国 Sigma-Aldrich 公司
多聚甲醛	美国 Sigma-Aldrich 公司
戊巴比妥钠	美国 Sigma-Aldrich 公司
安尔碘消毒液	上海利康公司
七氟烷	美国 Baxter 公司
Lipofectamine 2000	美国 Life Technologies 公司
DMEM 培养基	美国 Life Technologies 公司
0.25%胰蛋白酶	美国 Life Technologies 公司
胎牛血清	美国 Life Technologies 公司
多聚赖氨酸	美国 Sigma-Aldrich 公司
Western 及 IP 用 RIPA 裂解液	上海碧云天公司
蛋白酶抑制剂	瑞士 Roche 公司
5×蛋白上样缓冲液	上海碧云天公司
预染蛋白 Marker	立陶宛 Fermentas 公司
HRP 化学发光底物	美国 Millipore 公司
Trizol 裂解液	美国 Life Technologies 公司
山羊血清	上海碧云天公司
兔抗 NDRG2 抗体	英国 Abcam 公司
小鼠抗 GFAP 抗体	英国 Abcam 公司
兔抗 cleaved Caspase-3 抗体	英国 Abcam 公司
兔抗 Caspase-3 抗体	英国 Abcam 公司
小鼠抗 β -actin 抗体	美国 Santa Cruz 公司

Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG	美国 Life Technologies 公司
Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG	美国 Life Technologies 公司
HRP 标记山羊抗兔 IgG	美国 Pierce 公司
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG	美国 Pierce 公司
PrimeScript™ RT reagent Kit	大连 TaKaRa 公司
SYBR Premix Ex Taq™ II	大连 TaKaRa 公司
TUNEL 检测试剂盒	瑞士 Roche 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	上海碧云天公司
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天公司
核浆蛋白分离提取试剂盒	美国 Pierce 公司
LDH 检测试剂盒	南京建成生物工程公司

2 方法

2.1 原代星形胶质细胞培养

- 1) 出生 1~3 天的新生 SD 大鼠，浸泡入 75%酒精消毒；
- 2) 在细胞培养用超净台中断头，置于盛有预冷的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 杜尔伯科改良伊格尔培养基) 培养基的培养皿中；
- 3) 在解剖显微镜下剥离颅骨，分离鼠脑并置于预冷 DMEM 培养基中；
- 4) 镜下仔细剥离大脑表面的脑膜和血管组织，分离皮层置于另一个含有预冷 DMEM 培养基的培养皿中；
- 5) 吸取皿内多余的培养基丢弃，用眼科镊充分剪碎分离出的皮层组织；
- 6) 加入适量 0.25%胰蛋白酶消化液，细胞培养箱内消化 15min；
- 7) 消化结束后，用弯头吸管吸取消化组织，转移至盛有含 20%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基的无菌离心管中，轻轻漂洗终止消化；
- 8) 将终止消化的皮层组织转移入另一盛有含 20% FBS 的 DMEM 培养基的无菌离心管中，反复吹打成细胞悬液；
- 9) 室温静置 5min，待未消化的组织沉入管底，将上层的细胞悬液经过细胞滤网 (200

目) 过滤入另一无菌培养皿内;

- 10) 将细胞悬液用含 20% FBS 的 DMEM 培养基适当稀释后, 接种入预先用多聚赖氨酸包被的 75cm² 培养瓶内 (约 2~3 只新生 SD 大鼠的皮层组织可接种一瓶), 细胞培养箱中培养 (37°C, 5%CO₂, 90%相对湿度);
- 11) 每 3 天一次半量换液含 10%FBS 的 DMEM 培养基, 待 10~14 天细胞长满后, 在 37°C 恒温摇床上以 200~220rpm 的速度振摇 14~16 小时, 去除小胶质细胞和少突胶质细胞;
- 12) 纯化后的细胞按后续实验要求以适当密度接种培养皿或培养板。

2.2 七氟烷预处理

1) 在体:

- A 3~4 只 SD 大鼠放入密封箱内 (透明塑料板制成, 50 × 40 × 30 cm³, 装有进气管道和出气管道);
- B 麻醉机设置氧气流量 1L/min, 七氟烷浓度 2.0%, 由进气管道进入密封箱内, 出气管道连接麻醉气体分析仪, 测量排出气体内七氟烷浓度;
- C 待排出气七氟烷浓度达 2.0%时, 开始计时;
- D 预处理 1 小时后, 关闭七氟烷, 待七氟烷浓度降至 0、大鼠清醒时, 关闭氧气, 取出大鼠放回鼠笼, 等待进行下一步实验。

2) 离体:

- A 细胞培养皿或培养板放入细胞孵育舱内, 进气管连接麻醉机, 出气管连接麻醉气体分析仪;
- B 麻醉机连接 95%空气/5%CO₂ 气罐, 设置流量 1L/min, 七氟烷浓度 2.0%, 由进气管道进入密封箱内;
- C 充气约 5min, 待排出气中七氟烷浓度达 2.0%时, 先夹闭出气管, 再夹闭进气管;
- D 孵育舱放入 37°C 恒温箱, 计时 1 小时后取出细胞等待进行下一步实验。

2.3 大鼠局灶性脑缺血模型—MCAO

- 1) SD 大鼠 (术前禁食 12 小时, 自由饮水) 腹腔注射 40mg/kg 戊巴比妥钠麻醉, 剪开头皮暴露颅骨表面大脑中动脉投射处(Bregma 点后 1mm, 中线旁开 4mm), 牙

科胶固定激光多普勒血流监测仪探头;

- 2) 大鼠仰卧位固定于 37°C 恒温板上, 消毒并剪开颈部正中皮肤, 分离肌肉和筋膜显露右侧颈总、颈外、颈内动脉;
- 3) 近心端结扎颈总、颈外动脉, 颈总远心端靠近血管分叉处挂线备用;
- 4) 在颈总动脉距血管分叉约 4mm 处剪一小口, 将尼龙线 (3-0) 烧制而成的线栓插入颈内动脉;
- 5) 轻推栓线, 沿颈内动脉进入约 18mm, 至大脑中动脉开口处, 微感有阻力时停止;
- 6) 系牢颈总动脉远心端的丝线, 使栓线位置固定;
- 7) 缝合皮肤, 大鼠移至保温箱内, 设定温度使大鼠肛温保持 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- 8) 缺血 120min 后, 轻轻抽出栓线至颈总远心端结扎处, 剪断多余的栓线, 使大脑中动脉恢复灌注;
- 9) 手术过程中使用激光多普勒血流监测仪监测大脑中动脉局部脑血流, 插入线栓前记录基础值, 插入线栓后脑血流降至基础值 30% 以下, 拔出线栓后脑血流恢复至基础值 80% 以上视为造模成功。

2.4 原代培养星形胶质细胞 OGD 模型

- 1) 细胞培养皿或培养板内培养基换为无糖无血清 DMEM, 放入细胞孵育舱内, 进气管连接 95%N₂/5%CO₂ 混合气, 出气管连接麻醉气体分析仪;
- 2) 混合气设置流量 1L/min, 由进气管进入密封箱内;
- 3) 充气约 5min, 待排出气中氧气浓度降至 2% 以下时, 先夹闭出气管, 再夹闭进气管;
- 4) 孵育舱放入 37°C 恒温箱, 计时 4h 后取出细胞更换含 10%FBS 的正常 DMEM 培养基, 继续培养待下一步实验。

2.5 大鼠神经行为学评估

麻醉苏醒后将大鼠放回鼠笼, 自由饮食。再灌注 24 小时, 由一不了解动物分组情况的观察者行 Garcia 评分, 如下表所示:

表 1 Garcia 评分标准 (NDS 评分)

测试	得分			
	0	1	2	3
自主活动 (鼠笼内活动 3min)	无自主活动	几乎不能活动	有自主活动, 可 达到鼠笼 1~2 面	活动范围可达到 鼠笼 3~4 面
四肢运动对称性	左侧肢体无运 动	左侧肢体轻微运 动	双侧肢体运动略 不对称	双侧肢体对称运 动
前肢运动对称性 (悬尾时前肢伸展 情况)	左侧前肢无运 动、无法能伸 展	左侧前肢能轻微 运动和伸展	双侧前肢运动和 伸展不对称	双侧前肢对称运 动和伸展
攀网试验 (金属丝笼盖)	...	不能攀爬	左侧肢体攀爬较 弱	攀爬正常
躯干碰触反应	...	碰触左侧躯干无 反应	碰触左侧躯干反 应减弱	双侧对称反应
触须反应	...	左侧触须无反应	左侧触须反应减 弱	双侧对称反应

注: 该评分标准最低得分 3 分, 最高得分 18 分, 得分越高表明动物的神经功能越好, 得分越低提示动物的神经功能损伤越严重。其中前四项试验评价动物的运动功能, 后两项评价动物的感觉功能。12~18 分为轻度神经功能障碍, 8~11 分为中度神经功能障碍, 3~7 分为重度神经功能障碍。

2.6 缺血后梗死容积测定

- 1) 再灌注 24 小时并进行神经行为学评分后, 给予大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (60~80mg/kg) 麻醉, 断头取脑;
- 2) 取出的鼠脑在-20℃冰箱中速冻 10min 左右, 放入大鼠脑槽;
- 3) 自脑前极开始, 取冠状面均匀切成 2mm 厚脑片, 第 2 片起连续取 6 片迅速放入 2% TTC 溶液中, 37℃ 染色 15~30min;
- 4) 待脑片未梗死区染成均匀红色时, 取出脑片置入 4% 多聚甲醛溶液中, 4℃ 固定

24 小时;

- 5) 固定好的脑片取出在黑色衬底上按顺序排列好, 用数码相机 (Kodak DC240) 拍照;
- 6) 照片输入计算机, 由一不了解分组情况的观察者用图像处理软件 (Adobe Photoshop CS5) 计算梗死容积 (红色区域为未梗死区, 未着色的白色区域为梗死区); 为减少缺血半脑水肿对结果的影响, 分别计算左侧半脑总面积和右侧半脑未梗死区总面积, 面积乘以层厚 2mm 分别为左侧半脑容积和右侧半脑非梗死区容积; 梗死容积百分比 = (左侧半脑正常组织容积 - 右侧半脑非梗死区容积) / 左侧半脑正常组织容积 × 100%。

2.7 细胞活力测定—MTT 试验

- 1) 纯化后的星形胶质细胞以 1×10^4 /孔接种至 96 孔板, 24 小时后进行核酸转染、七氟烷预处理、氧糖剥夺等试验;
- 2) 到达待检测时间点时, 吸弃孔内培养液, 加入含 0.5mg/mL MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐] 的培养基, 继续培养 4 小时;
- 3) 终止培养, 吸弃孔内液体, 加入 100 μ L DMSO (dimethyl sulphoxide 二甲基亚砷)/孔, 置摇床上低速振荡 3~5min 后, 在酶标仪上测量 490nm 处的吸光值, 以正常对照组为 100%, 计算不同处理组的细胞活力。

2.8 细胞毒性测定—LDH 释放试验

- 1) 收集不同处理后培养星形胶质细胞的上清液样品, 按 LDH 试剂盒 (微板法, 南京建成) 所附说明书在 96 孔板中配制反应体系, 如下表所示:

表 2 LDH 释放试验反应液配制说明

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水 (μ L)	25	5	-	5
0.2mmol/L 标准液 (μ L)	-	20	-	-
待测样本 (μ L)	-	-	20	20
基质缓冲液	25	25	25	25

- 2) 在摇床上振摇 1~2min 混匀, 37°C 孵育 15min;

- 3) 每孔加入 2,4-二硝基苯肼 25 μL , 上摇床振摇混匀, 37°C 孵育 15min;
- 4) 每孔加入 0.4mol/L NaOH 溶液 250 μL , 混匀, 室温孵育 5min;
- 5) 酶标仪测定 450nm 处的吸光度, 以标准孔为 100%, 计算不同处理组细胞的 LDH 释放情况。

2.9 免疫荧光染色

在体:

- 1) 制备石蜡切片:
 - A 再灌注 24h, 腹腔注射 40mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 固定于灌注台;
 - B 剪开大鼠胸腔, 暴露心脏, 灌注针由心尖插入, 经左心室进入主动脉后用血管钳固定;
 - C 剪开右心耳, 打开输液器控制阀, 全速输入预冷生理盐水约 250mL;
 - D 生理盐水输注完毕后, 迅速更换 4% 多聚甲醛, 全速输注约 100mL, 1.5~2h 内缓慢滴注约 150mL;
 - E 固定结束后取脑, 自脑前极向后 6mm 处起, 冠状面切取 4mm 厚脑组织块, 置于 30% 酒精中脱水, 交由病理科制备 1 μm 厚石蜡切片。
- 2) 脱蜡: 石蜡切片顺序浸泡入二甲苯 I 10min、二甲苯 II 5min、无水酒精 I 5min、无水酒精 II 5min、95% 酒精 3min、90% 酒精 2min、85% 酒精 1min、75% 酒精 1min、蒸馏水 1min 脱蜡至水, PBS 漂洗 5min \times 3 次;
- 3) 抗原修复: 将切片置于 0.01M 柠檬酸盐缓冲液 (pH=6.0) 中, 微波炉加热至微微沸腾 10min, 停止加热后使其自然冷却至室温;
- 4) 封闭: 抗原修复后 PBS 漂洗切片 5min \times 3 次, 滴加羊血清室温封闭 1h;
- 5) 一抗杂交: 去除封闭血清, 直接在脑片上滴加稀释后的一抗 (兔抗 NDRG2, 1:200; 小鼠抗 GFAP, 1:500), 4°C 过夜;
- 6) 二抗杂交: 去除一抗, PBS 漂洗 5min \times 3 次, 滴加稀释后的二抗 (Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG, 1: 400; Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG, 1: 400), 室温避光孵育 2h;
- 7) 染核: 去除二抗, 直接滴加稀释后的 DAPI (diamidino-phenyl-indole, 二脒基苯基吲哚) 染液 (1: 1000), 室温避光孵育 15min;

8) 封片：去除 DAPI 染液，PBS 漂洗 5min×3 次，用 50%甘油封片，荧光显微镜下观察缺血半暗带 NDRG2 表达情况。

离体：

1) 制备细胞爬片：

A 10mm 直径圆形玻片浸泡入浓硫酸中过夜，自来水冲洗干净后，再置于无水酒精中浸泡过夜，去离子水冲洗干净后高压消毒；

B 消毒后的玻片浸泡入 0.1mg/mL 多聚赖氨酸溶液中包被 5~10min，取出后在超净台中晾干备用；

C 将准备好的玻片放入 24 孔板孔中，每孔接种 10^4 个星形胶质细胞，接种 24~48h 待细胞贴壁良好时进行不同实验处理；

D 复氧复糖 24h，吸弃 24 孔板内培养基，用预冷 PBS 漂洗 3 次，加入 4%多聚甲醛室温下固定 15min；

E 吸弃甲醛溶液，用 PBS 漂洗 3 次，再加入适量 PBS 浸泡玻片，4°C 保存。

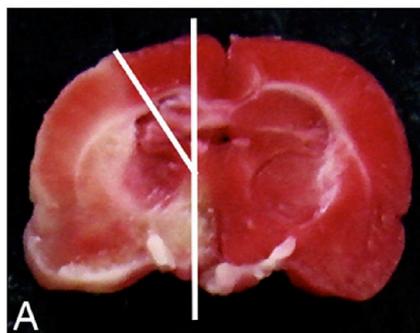
2) 通透化处理：制备好的细胞爬片放在 24 孔板内，滴加 0.3%Triton X-100 溶液处理 15min；

3) 血清封闭、一抗杂交、二抗杂交、DAPI 染核、甘油封片同鼠脑石蜡切片。

2.10 蛋白免疫印迹—Western blot

1) 蛋白提取：

A 缺血半暗带组织取材：再灌注 24h，大鼠断头、取脑，自脑前极向后 6mm 处起、冠状面切取 4mm 厚脑片，在该脑片右侧距中线 2mm 处纵切一刀，再自半圆形中心点向 10 点钟方向切一刀取楔形半暗带组织，如下图如示：



B 配制蛋白裂解液：取 RIPA 蛋白裂解液，加入蛋白酶抑制剂 (Roche)，再按

- 100: 1 的比例加入 100mM 的 PMSF (phenylmethyl sulfonylfluoride, 苯甲基磺酰氟化物) 混匀, 配制成蛋白裂解工作液;
- C** 组织匀浆: 将半暗带组织称量后放入干净的匀浆器内, 加入配制好的蛋白裂解液 (每 100mg 组织加入 700 μ L), 冰上对组织充分匀浆, 完成后将匀浆液转移至 1.5mL 离心管内;
- D** 样品制备: 匀浆液 4 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 离心 20min, 转移上清液, 取 5 μ L 进行蛋白定量检测, 其余按比例加入 5 \times 蛋白上样缓冲液煮沸 5min, 12000rpm 离心 5min, 制备成 Western blot 样品;
- E** 制备细胞蛋白样品时, 弃去待测细胞培养液, 用预冷 PBS 冲洗 3 次, 按照细胞密度和培养容器大小加入适量蛋白裂解液, 冰上裂解 10min, 用细胞刮刀将裂解产物刮下并收集至离心管内, 后续处理同组织样品。
- 2) 蛋白定量:**
- A** 采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量, 首先用 PBS 将蛋白标准品 BSA (2mg/mL) 稀释为不同浓度 (2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0 mg/mL) 标准液 (体积均为 20 μ L), 按顺序加入 96 孔板中;
- B** 用 PBS 将待测蛋白样品稀释 20 倍, 各取 20 μ L 加入 96 孔板中, 每个样品设 3 个复孔;
- C** 将试剂盒内的 A 液和 B 液按 50: 1 的比例混匀, 加入已有蛋白标准品或待测蛋白样品的孔内 (200 μ L/孔), 并在摇床上混匀;
- D** 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 酶标仪上检测 562nm 处的吸光值;
- E** 已知各蛋白标准液的浓度, 结合吸光值绘制出标准曲线;
- F** 利用标准曲线计算各蛋白样品的浓度, 并依据蛋白浓度计算上样量。
- 3) 蛋白电泳:**
- A** 配制 SDS-PAGE 凝胶: 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%;
- B** 上样: 根据蛋白定量结果, 每孔上样量 40 μ g, 并取一孔加入 5 μ L 蛋白预染 Marker;
- C** 电泳: 浓缩胶电泳电压为 100V, 时间约 15~20min, 分离胶电压 120V, 电泳时间 45~60min;
- 4) 转膜:** 电泳结束后, 将 SDS-PAGE 凝胶上已分离的蛋白利用湿转的方法转移至

PVDF 膜上，电压 100V，转膜时间 90min;

- 5) 封闭: 转膜结束后，利用预染 Marker 根据目的蛋白分子量对 PVDF 膜进行裁剪，浸泡入 TBST 配制的 5% 脱脂牛奶 (W/V) 中室温封闭 1h;
- 6) 一抗杂交: 封闭结束后，用 TBST 轻轻漂洗膜表面的脱脂牛奶，加入用 TBST 稀释的一抗 (兔抗 NDRG2, 1: 2000; 小鼠抗 β -actin, 1: 1000)，4℃ 过夜;
- 7) 二抗杂交: 第二天取出 PVDF 膜，TBST 漂洗 5min×3 次，加入 TBST 稀释的二抗 (HRP 标记山羊抗兔 IgG, 1: 5000; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, 1: 5000)，室温孵育 1h;
- 8) 显影: TBST 漂洗 5min×3 次洗去未结合的二抗，将 PVDF 膜放置在发光仪底板上，滴加适量 HRP 发光底物，选择自动曝光使其显影，并利用图像分析软件 (Image J) 对结果进行数据分析。

2.11 实时定量 PCR (Real-time PCR)

1) 总 RNA 提取:

- A 大鼠缺血半暗带组织取材同 Western blot;
- B 将半暗带组织样品置入预先用 DEPC (diethyl pyrocarbonate, 二乙基焦磷酸胺) 处理过的匀浆器，加入 1mL Trizol 裂解液，冰上充分匀浆至看不见块状组织，冰上继续裂解 10min 后，将匀浆液转移至 EP 管内;
- C 加入 0.2mL 氯仿萃取 RNA，剧烈震荡 30s，室温静置 5min，4℃、12000rpm 离心 15min，可见样品分为 3 层;
- D 转移上层水相至新的 EP 管中 (约 400 μ L)，加入等量异丙醇沉淀 RNA，剧烈震荡 30s，室温静置 5min，4℃、12000rpm 离心 10min，可见管底有少量白色沉淀;
- E 弃上清，加入 1mL 75% 酒精洗涤 RNA，涡旋震荡 30s，4℃、10000rpm 离心 5min，可见管底重新出现白色沉淀;
- F 弃上清，倒扣 EP 管，室温干燥 20~30min，待白色沉淀转为无色透明略成胶状时，加入 20 μ L RNase-Free 水，55℃ 水浴 10min 使沉淀溶解，取 2 μ L 备定量，其他 -80℃ 保存;
- G 提取细胞 RNA 时，弃去待测细胞培养液，用预冷 PBS 冲洗 3 次，按照细胞

密度和培养容器大小加入适量 Trizol，冰上裂解 10min，用细胞刮刀将裂解产物刮下并收集至离心管内，后续处理同组织样品。

- 2) RNA 定量：2 μ L RNA 样品用 RNase-Free 水稀释至 100 μ L，加入石英杯中用分光光度计分别测定 260nm 和 280nm 的吸光值，OD260/OD280 在 1.8~2.0 之间说明 RNA 样品纯度较高，再根据 OD260 计算样品浓度；
- 3) cDNA 合成：使用 Takara 公司 PrimeScriptTM RT reagent Kit 进行反转录反应合成 cDNA，根据说明书在冰上配制反应体系如下：

表 3 PrimeScriptTM RT reagent Kit 反应液配制说明

试剂名称	使用量 (μ L)	终浓度
5 \times PrimeScript Buffer	2	1 \times
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5	25 pM
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5	50 pM
Total RNA (0.5~22 μ g)	2	0.05~0.2 μ g/ μ L
RNase Free ddH ₂ O	5	
Total	10	

配制完成的反应管放入 PCR 仪内，条件设置如下：37 $^{\circ}$ C，15min \rightarrow 85 $^{\circ}$ C，15sec \rightarrow 4 $^{\circ}$ C，反应完成后，样品-20 $^{\circ}$ C 保存；

- 4) Real-time PCR：使用 Takara 公司 SYBR Premix Ex TaqTM II(Perfect Real Time) 试剂盒进行实时荧光定量 PCR，根据说明书配制反应体系如下：

表 4 SYBR Premix Ex TaqTM II(Perfect Real Time) Kit 反应液配制说明

试剂名称	使用量 (μ L)	终浓度
SYBR Premix Ex Taq TM (2 \times)	12.5	1 \times
PCR Forward Primer (10 μ M)	1	0.4 μ M
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1	0.4 μ M
cDNA (50~100ng)	2	
ddH ₂ O	8.5	
Total	25	

配制完成的 PCR 管（每个样品设 3 个复孔）置入 Real-time PCR 仪中，反应条件设置如下：

A 扩增曲线: 95℃, 30sec→95℃, 5sec→60℃, 30sec→72℃, 30sec, 40 个循环, 此阶段进行荧光信号的采集;

B 溶解曲线: 60~95℃每循环退火温度升高 0.5℃, 维持 30sec, 采集荧光信号, 共 71 个循环。

附: 所使用 PCR 引物序列

名称	序列
NDRG2 Forward	5'-AACTTTGAGCGAGGTGGTGAGA-3'
DNRG2 Reverse	5'-ATTCCACCACGGCATCTTCA-3'
β-actin Forward	5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAGG-3'
β-actin Reverse	5'-ATTGGTGGCTCTATCCTGGC-3'

2.12 统计学处理

所有实验重复至少 3 次。采用 SPSS 13.0 进行统计学分析。除神经行为学评分结果外, 其他所有数据均采用均数±标准误表示, 单因素方差分析比较组间差异, Tukey post hoc 检验进行两两比较; 神经行为学结果用均数 [四分位数间距] 表示, Kruskal-Wallis 检验比较组间差异, Bonferroni 校正和 Mann-Whitney U 检验进行两两比较。P<0.05 视为有统计学意义。

3 实验计划和分组

3.1 验证七氟烷预处理对脑缺血再灌注损伤和细胞 OGD 损伤的保护作用

30 只雄性 SD 大鼠随机分为三组, 局灶性脑缺血再灌注组 (MCAO), 氧气+局灶性脑缺血再灌注组 (Vehicle+MCAO) 和七氟烷+局灶性脑缺血再灌注组 (Sevo+MCAO)。Vehicle+MCAO 和 Sevo+MCAO 分别吸入氧气或 2%七氟烷 1h, 间隔 2h 进行 MCAO。缺血 2h 后拔出线栓, 于再灌注 24h 根据 Garcia 标准对大鼠神经功能进行评分, 评分后处死动物, 断头取脑行 TTC 染色计算脑梗死容积百分率。

原代培养星形胶质细胞接种入 96 孔板, 随机分为四组, 对照组 (Control), OGD 组, 氧气+OGD 组 (Vehicle+OGD), 七氟烷+OGD 组 (Sevo+OGD), 每组 8 孔。Vehicle+OGD 和 Sevo+OGD 组分别通入 5%CO₂ 混合气或含 2%七氟烷的 5%CO₂ 混合气 1h, 间隔 2h 换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 恢复氧糖, 于复氧复糖

24h 吸取细胞上清液检测 LDH 释放率，并利用 MTT 摄取实验检测细胞活力。

3.2 观察七氟烷预处理对脑缺血再灌注损伤和细胞 OGD 损伤后星形胶质细胞反应性以及 NDRG2 表达和分布的影响

64 只雄性 SD 大鼠随机分为四组，假手术组 (Sham)，局灶性脑缺血再灌注组 (MCAO)，氧气+局灶性脑缺血再灌注组 (Vehicle+MCAO) 和七氟烷+局灶性脑缺血再灌注组 (Sevo+MCAO)。Vehicle+MCAO 和 Sevo+MCAO 分别吸入氧气或 2% 七氟烷 1h，间隔 2h 进行 MCAO；Sham 组进行手术但不插入线栓，缺血 2h 后拔出线栓，于再灌注 24h 每组 6 只取半暗带组织进行 Real-Time PCR 检测 NDRG2 mRNA 表达水平，6 只取半暗带组织进行 Western blot 检测 GFAP 和 NDRG2 蛋白含量，4 只灌注固定并石蜡切片后进行免疫荧光染色观察缺血半暗带区星形胶质细胞形态改变以及 NDRG2 表达和细胞分布情况。

原代培养星形胶质细胞分别接种至 6cm 细胞培养皿和细胞染色用玻片，随机分为四组，对照组 (Control)，OGD 组，氧气+OGD 组 (Vehicle+OGD)，七氟烷+OGD 组 (Sevo+OGD)。Vehicle+OGD 和 Vehicle+OGD 组分别通入 5% CO₂ 混合气或含 2% 七氟烷的 5% CO₂ 混合气 1h，间隔 2h 换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖，于复氧复糖 24h 提取细胞总 RNA 和蛋白质，分别进行 Real-Time PCR 和 Western blot 检测 NDRG2 mRNA 表达水平 (n=6) 和蛋白质含量 (n=6)，细胞爬片固定后进行免疫荧光染色观察 NDRG2 表达和分布情况 (n=4)。

4 结果

4.1 七氟烷预处理减轻大鼠局灶性脑缺血损伤

建立大鼠 MCAO 模型，再灌注 24h，根据 Garcia 标准对大鼠神经功能进行评分，结果显示 MCAO 后大鼠神经功能评分显著降低，氧气吸入组与之相较无统计学差异 (7.0 [6.5~8.5])，而七氟烷预处理可改善缺血后神经功能 (12.75 [11.38~13.50]， $P < 0.05$ ，图 3)；TTC 染色计算脑梗死容积，发现 MCAO 后大鼠右侧出现明显脑梗死，氧气吸入组脑梗死容积百分率无显著变化 (48.3±8.9%)，而给予七氟烷预处理则使脑梗死容积降至 25.7±5.7% ($P < 0.05$ ，图 4)。

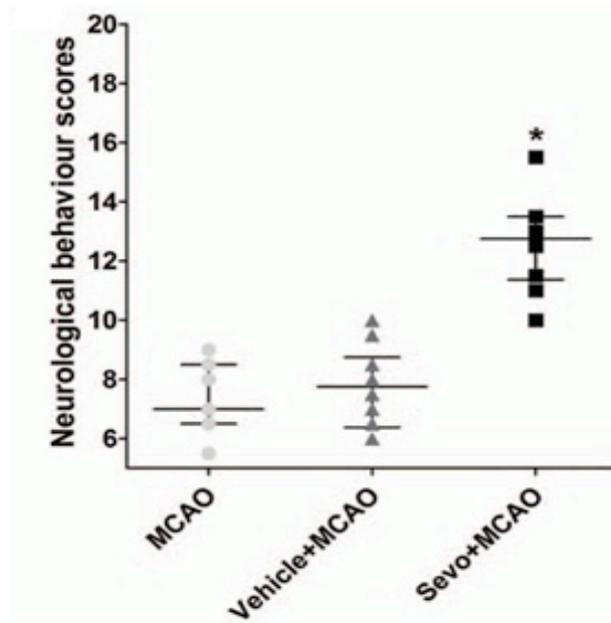


图 3. 七氟烷预处理对再灌注 24h 大鼠神经功能 Garcia 评分的影响 (n=10)。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MCAO, 大脑中动脉阻断; Sevo, 七氟烷预处理。

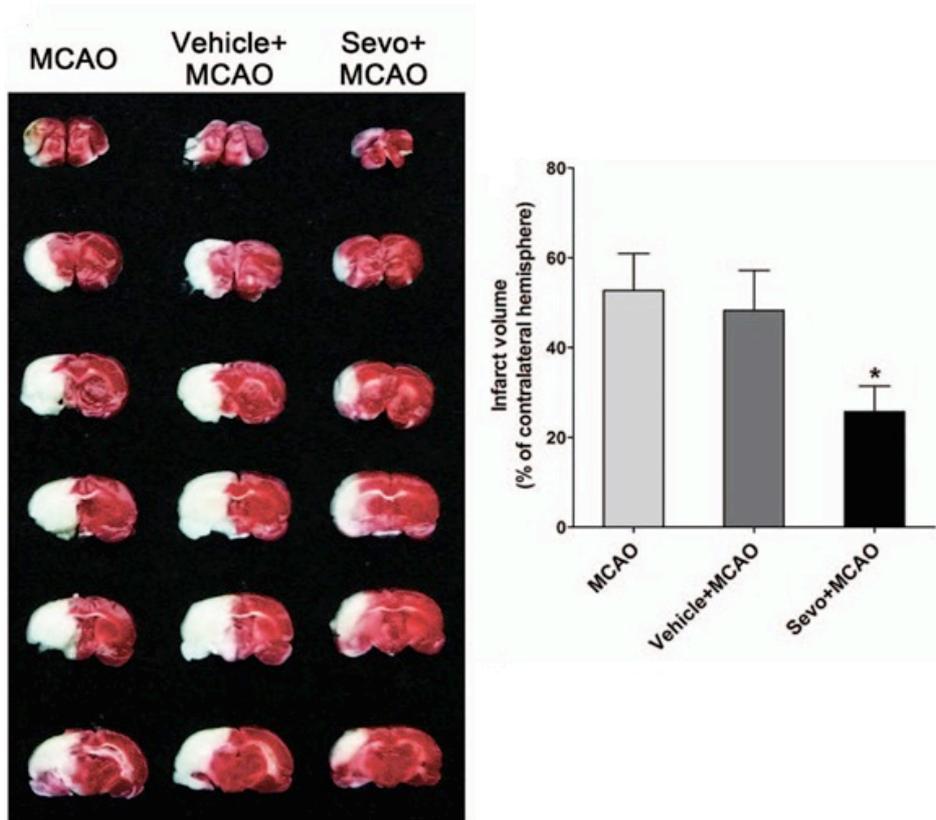


图 4. 七氟烷预处理对再灌注 24h 大鼠脑梗死容积的影响 (n=10)。左图为大鼠局灶性脑缺血后脑梗死 TTC 染色的代表性图像, 右图为计算各组脑梗死容积百分率的统计学结果。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MCAO, 大脑中动脉阻断; Sevo, 七氟烷预

处理。

4.2 七氟烷预处理减轻原代星形胶质细胞 OGD 损伤

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞，进行 OGD 模拟动物脑缺血再灌注损伤。OGD 4h，复氧 24h 后取培养上清液检测 LDH 释放量，发现 OGD 后培养上清液中 LDH 含量显著上升，通入 5%CO₂ 混合气未对 LDH 释放量的上升产生明显影响（62.5±6.2%），七氟烷预处理可抑制 OGD 引起的 LDH 释放增加（32.5±4.0%，P<0.05，图 5）；利用 MTT 试验检测细胞活力，发现 OGD 可显著降低培养细胞对 MTT 的摄取量，通入 5%CO₂ 混合气的细胞活力无明显改善（45.2±3.5%），七氟烷预处理则可改善细胞活力，增加培养细胞对 MTT 的摄取量（78.5±4.0%，P<0.05，图 6）。

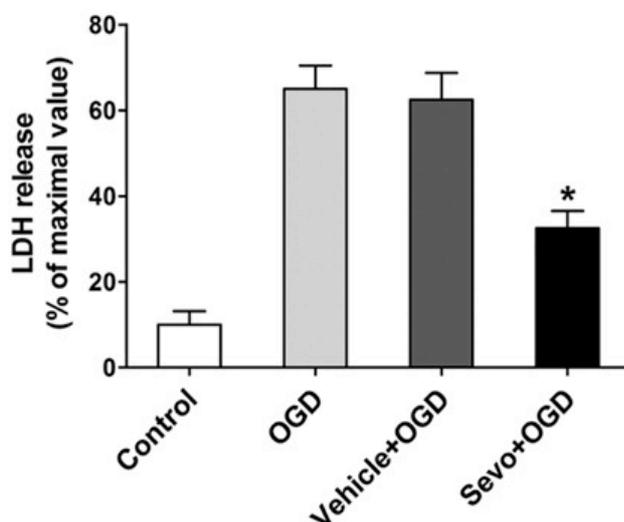


图 5. 七氟烷预处理对复氧 24h 原代星形胶质细胞 LDH 释放率的影响 (n=8)。

*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。LDH，乳酸脱氢酶；OGD，氧糖剥夺；Sevo，七氟烷预处理。

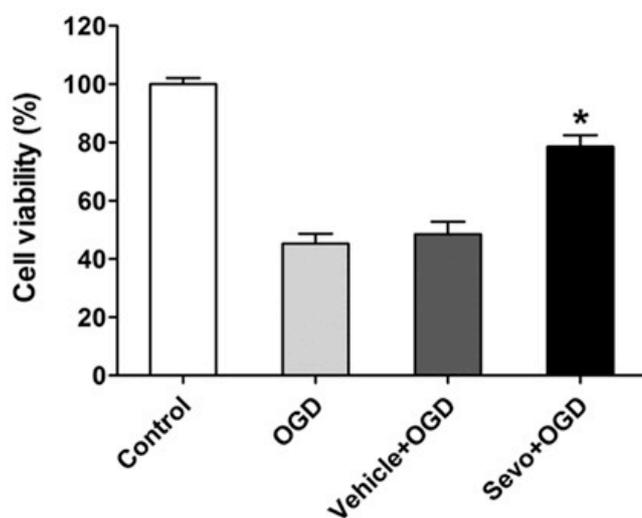


图 6. 七氟烷预处理对复氧 24h 原代星形胶质细胞 MTT 摄取的影响 (n=8)。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MTT, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐; 乳酸脱氢酶; OGD, 氧糖剥夺; Sevo, 七氟烷预处理。

4.3 七氟烷预处理减轻大鼠 MCAO 后缺血半暗带星形胶质细胞反应性改变

建立大鼠 MCAO 模型, 再灌注 24h 进行固定和石蜡切片, 利用免疫荧光染色标记 GFAP, 观察缺血半暗带星形胶质细胞形态变化。结果发现: MCAO 组大鼠缺血半暗带区 GFAP 阳性细胞数增加, 染色明显增强, 且星形胶质细胞形态出现增生样改变: 胞体肥大, 突起增多、延长; 七氟烷预处理组缺血半暗带区 GFAP 荧光强度及星形胶质细胞形态学改变较 MCAO 组减弱 (图 7)。进一步取缺血半暗带组织提取蛋白质, Western blot 检测 GFAP 蛋白表达水平, MCAO 组 GFAP 表达明显增加, 而七氟烷预处理抑制了其上调 (1.35±0.21 倍 vs 2.05±0.23 倍, P<0.05, 图 8)。

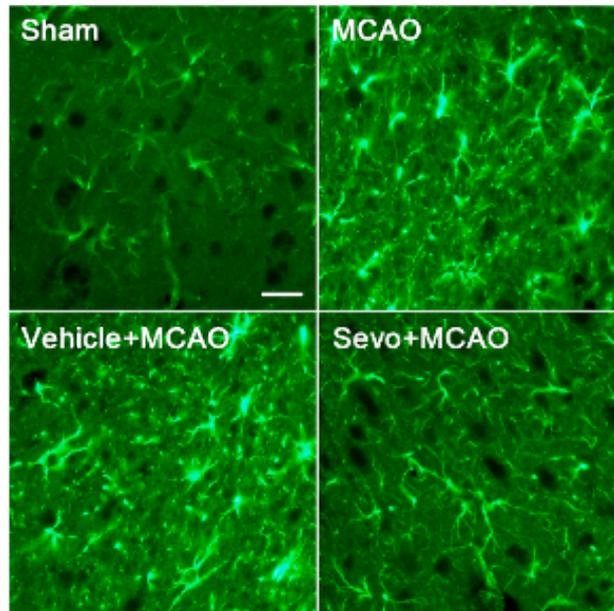


图 7. 七氟烷预处理对再灌注 24h 大鼠缺血半暗带区星形胶质细胞反应性增生的影响 (绿色荧光为 GFAP 标记)。标尺=40um。MCAO, 大脑中动脉阻断; Sevo, 七氟烷预处理。

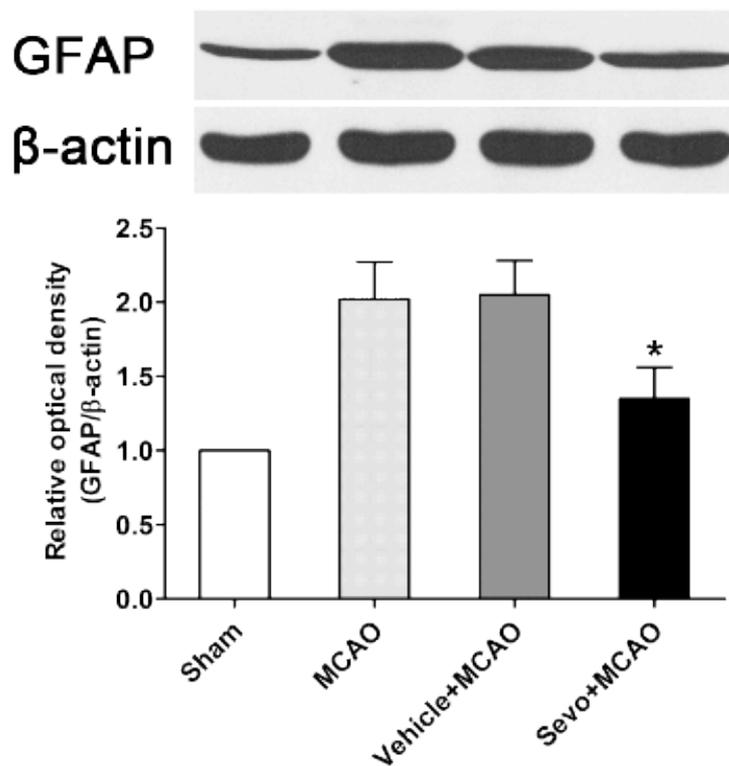


图 8. 七氟烷预处理对再灌注 24h 大鼠缺血半暗带组织 GFAP 含量的影响 (n=6)。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MCAO, 大脑中动脉阻断; Sevo, 七氟烷预处理。

4.4 七氟烷预处理抑制大鼠 MCAO 后缺血半暗带组织 NDRG2 表达上调

建立大鼠 MCAO 模型, 再灌注 24h, 取缺血半暗带组织分别提取总 RNA 和蛋白质, 检测 NDRG2 mRNA 和蛋白表达水平。Real-time PCR 和 Western blot 结果显示, MCAO 后大鼠缺血半暗带脑组织内 NDRG2 mRNA 和蛋白质表达水平显著升高, 氧气吸入组与之相较无明显变化, 七氟烷预处理则可部分逆转 MCAO 引起的 NDRG2 mRNA (2.21 ± 0.28 倍 vs 3.75 ± 0.35 倍, $P < 0.05$, 图 9) 和蛋白 (1.28 ± 0.15 倍 vs 1.95 ± 0.18 倍, $P < 0.05$, 图 10) 表达上调。

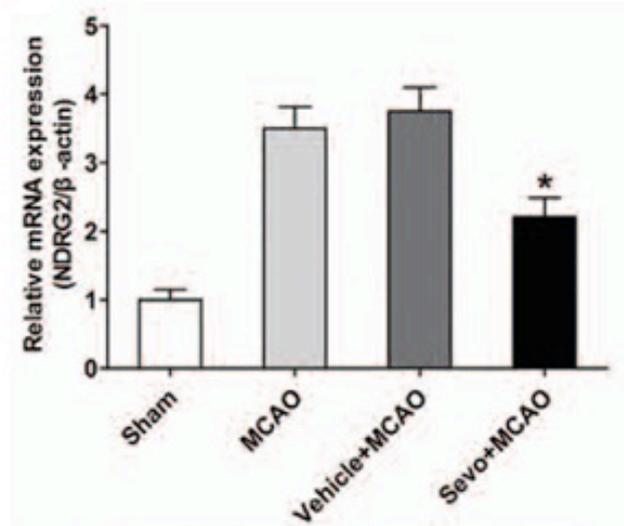


图 9. 七氟烷预处理对 MCAO 再灌注 24h 缺血半暗带组织 NDRG2 mRNA 表达的影响 (n=6)。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MCAO, 大脑中动脉阻闭; Sevo, 七氟烷预处理。

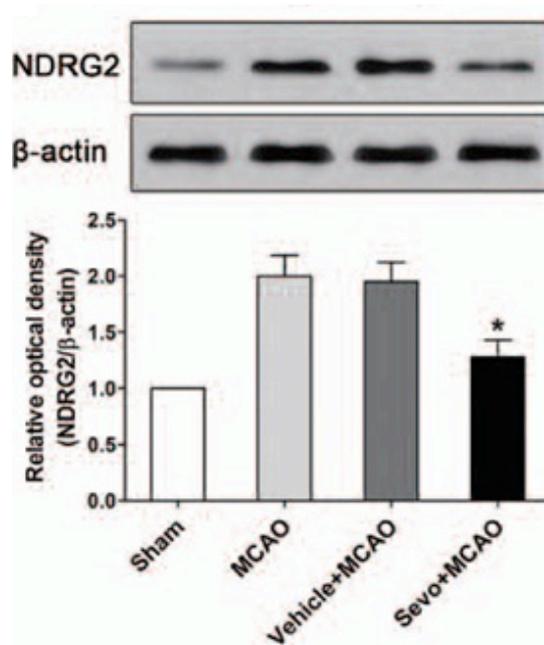


图 10. 七氟烷预处理对 MCAO 再灌注 24h 缺血半暗带组织 NDRG2 蛋白表达的影响 (n=6)。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MCAO, 大脑中动脉阻闭; Sevo, 七氟烷预处理。

4.5 七氟烷预处理抑制大鼠 MCAO 后缺血半暗带组织 NDRG2 核转位

建立大鼠 MCAO 模型，再灌注 24h 进行固定和石蜡切片，利用免疫荧光染色标记 NDRG2 和 GFAP，并用 DAPI 衬染细胞核，观察 NDRG2 在缺血半暗带组织的细胞定位情况。结果发现：NDRG2 与 GFAP 广泛共标，MCAO 后缺血半暗带区 NDRG2 染色显著增强，而七氟烷预处理则使其信号有所减弱（图 11）；另外，非缺血脑组织内 NDRG2 主要分布于星形胶质细胞的细胞浆内，细胞核内仅有较弱荧光，MCAO 后缺血半暗带区星形胶质细胞内 NDRG2 强染，且在细胞核中出现较强荧光信号，但七氟烷预处理使细胞核内的 NDRG2 荧光强度降低（图 12）。进一步对缺血半暗带组织进行核浆蛋白分离，分别进行 Western blot 检测 NDRG2 蛋白表达情况，发现 MCAO 后 NDRG2 蛋白在细胞核内含量显著增加，七氟烷预处理可部分逆转 MCAO 引起的 NDRG2 蛋白核/浆比上调（ 2.21 ± 0.29 倍 vs 4.30 ± 0.55 倍， $P < 0.05$ ，图 13），而氧气吸入则较 MCAO 组无显著性差异。

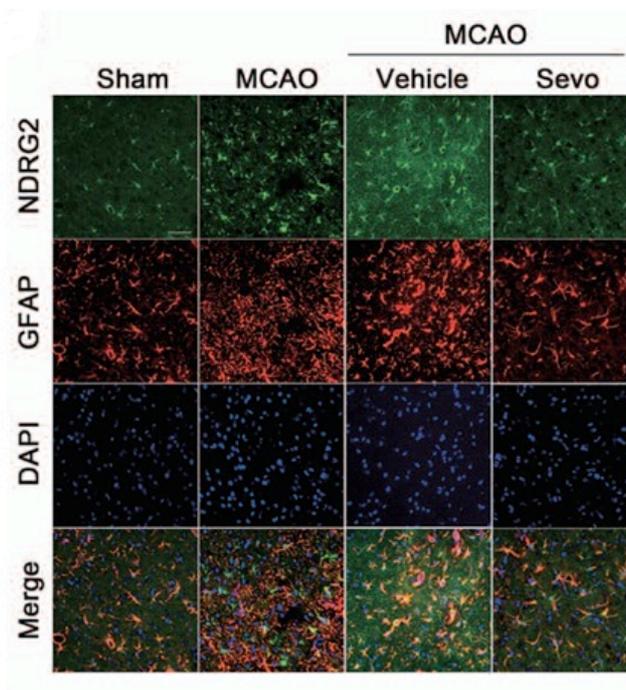


图 11. 七氟烷预处理对 MCAO 再灌注 24h 缺血半暗带组织 NDRG2 免疫荧光染色的影响。标尺 = 100 μ m。MCAO，大脑中动脉阻断；Sevo，七氟烷预处理。

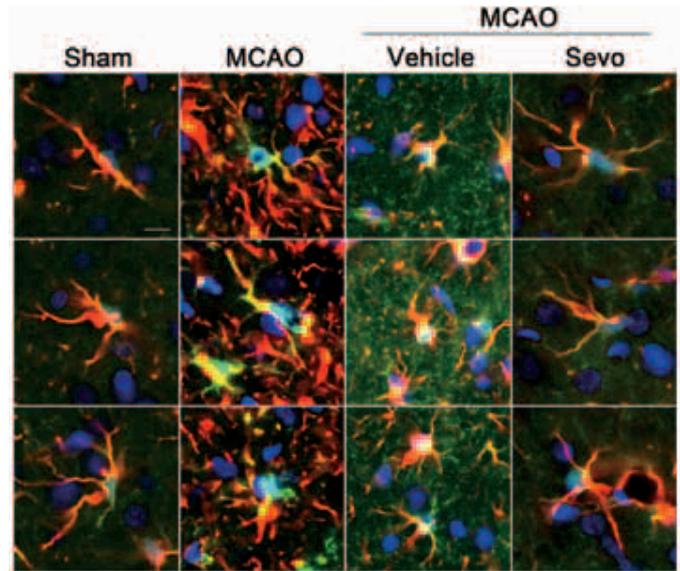


图 12. 七氟烷预处理对 MCAO 再灌注 24h 缺血半暗带组织 NDRG2 在星形胶质细胞内细胞浆和细胞核定位的影响。绿色：NDRG2；红色：GFAP；蓝色：DAPI。标尺=20 μm 。MCAO，大脑中动脉阻断；Sevo，七氟烷预处理。

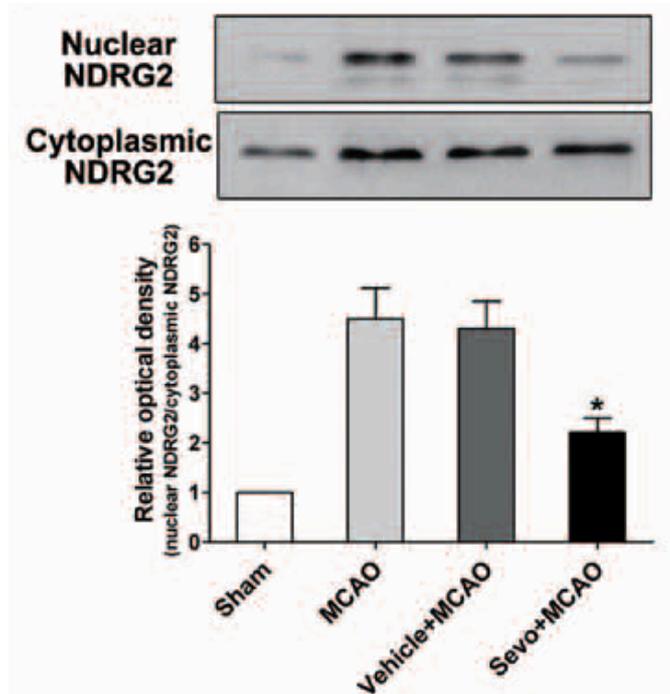


图 13. 七氟烷预处理对 MCAO 再灌注 24h 缺血半暗带组织 NDRG2 蛋白分别在细胞核和细胞浆表达水平的影响 ($n=6$)。* $P<0.05$ vs Vehicle+MCAO。MCAO，大脑中动脉阻断；Sevo，七氟烷预处理。

4.6 七氟烷预处理抑制 OGD 引起的原代培养星形胶质细胞 NDRG2 表达上调

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞, OGD 4h, 复氧 24h 分别提取总 RNA 和蛋白质, 检测 NDRG2 mRNA 和蛋白表达水平。Real-time PCR 和 Western blot 结果显示, OGD 后星形胶质细胞内 NDRG2 mRNA 和蛋白质表达水平显著升高, 通入 5%CO₂ 混合气组与之相较无明显变化, 七氟烷预处理则可部分逆转 OGD 引起的 NDRG2 mRNA (1.82±0.25 倍 vs 4.13±0.45 倍, P<0.05, 图 14) 和蛋白 (1.25±0.19 倍 vs 2.10±0.23 倍, P<0.05, 图 15) 表达上调。

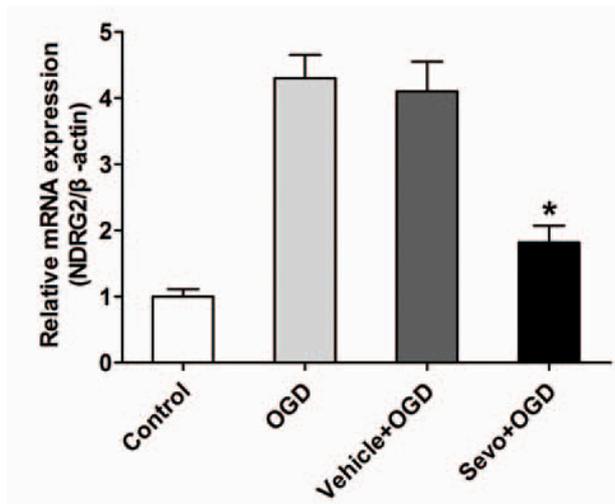


图 14. 七氟烷预处理对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 NDRG2 mRNA 表达的影响 (n=6)。*P<0.05 vs Vehicle+OGD。OGD, 氧糖剥夺; Sevo, 七氟烷预处理。

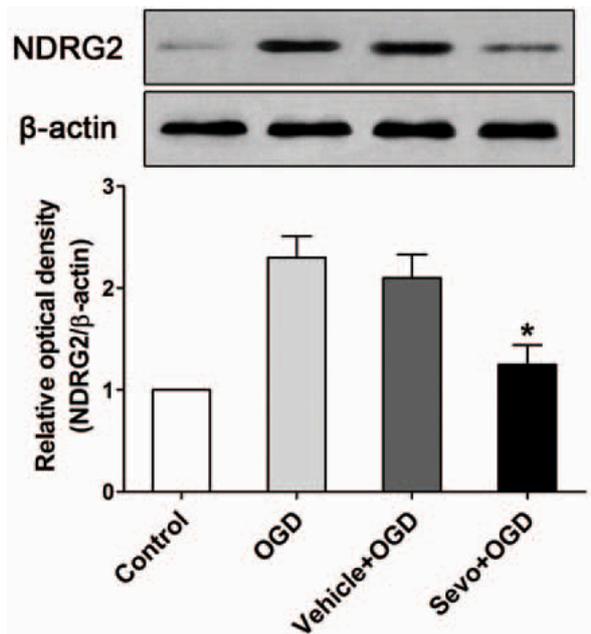


图 15. 七氟烷预处理对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 NDRG2 蛋白质表达的影响 (n=6)。*P<0.05 vs Vehicle+OGD。OGD, 氧糖剥夺; Sevo, 七氟烷预处理。

4.7 七氟烷预处理抑制 OGD 引起的原代培养星形胶质细胞 NDRG2 核转位

建立原代星形胶质细胞 OGD 模型, 复氧 24h 将细胞爬片用 4% 多聚甲醛固定后利用免疫荧光染色标记 NDRG2 和 GFAP, 并用 DAPI 衬染细胞核, 观察 NDRG2 在原代培养星形胶质细胞中的亚细胞定位情况。结果发现同动物实验类似, 与对照组相比, OGD 后 NDRG2 染色显著增强, 且细胞核内浓染, 而七氟烷预处理则使 OGD 引起的 NDRG2 增加及核内浓染有所减弱 (图 16)。进一步对培养的星形胶质细胞进行核浆蛋白分离, 分别进行 Western blot 检测 NDRG2 蛋白表达情况, 发现 OGD 后 NDRG2 蛋白在细胞核内含量显著增加, 七氟烷预处理可部分逆转 OGD 引起的 NDRG2 蛋白核/浆比上调 (1.78±0.23 倍 vs 3.75±0.49 倍, P<0.05, 图 17), 而通入 5% CO₂ 混合气组则较 OGD 组无显著性差异。

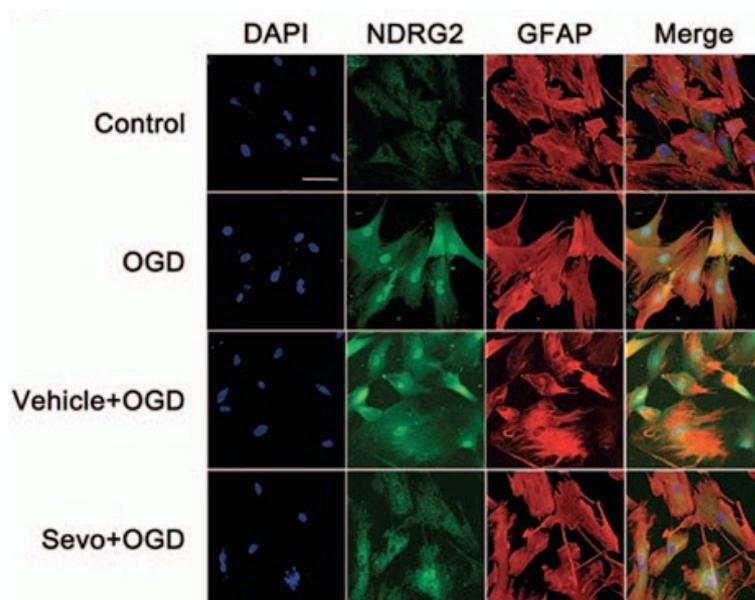


图 16. 七氟烷预处理对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 NDRG2 免疫荧光染色及细胞核/浆定位的影响。标尺=60 μm。OGD, 氧糖剥夺; Sevo, 七氟烷预处理。

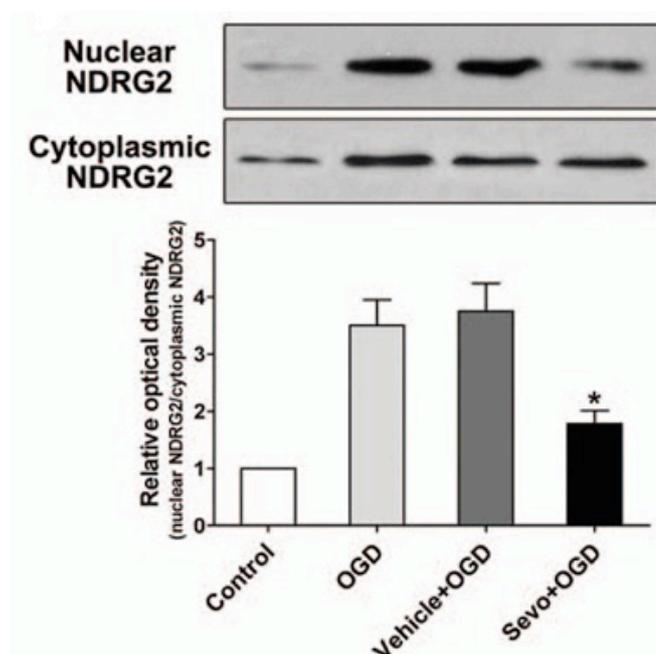


图 17. 七氟烷预处理对 OGD 复氧 24h NDRG2 蛋白分别在原代培养星形胶质细胞的细胞核和细胞浆表达水平的影响 ($n=6$)。* $P<0.05$ vs Vehicle+OGD。OGD, 氧糖剥夺; Sevo, 七氟烷预处理。

5 讨论

前期已有大量研究表明, 氟烷类麻醉药预处理对心肌缺血具有保护作用。近年来在动物实验和离体实验中发现, 氟烷类麻醉药预处理对神经缺血缺氧性损伤同样具有保护作用。七氟烷是临床常用的氟烷类麻醉药, 其诱导缺血耐受的效应也已得到了广泛验证^[8, 54, 76]。本实验室进行过一系列关于七氟烷预处理神经保护作用的研究, 采用的是连续 5 天给予七氟烷吸入, 末次吸入间隔 24h 后进行 MCAO 诱导局灶性脑缺血的延迟性预处理模式^[8, 76]。本部分研究首次采用了单次七氟烷预处理, 间隔 2h 即进行缺血的预处理模式, 发现 2.0%七氟烷预处理 1h 可明显改善 MCAO 2 h, 再灌注 24 h 后大鼠的神经功能评分, 降低脑梗死容积百分率, 表明单次七氟烷预处理对急性期内脑缺血也具有神经保护作用, 但其机制仍尚未明确。

研究发现, 七氟烷的预处理效应可能与线粒体膜上的 K_{ATP} 通道有关^[10]。同时七氟烷预处理可以改变低氧膜电位^[73], 从而促进缺血损伤后的神经功能恢复。本实验室前期研究结果表明, 七氟烷预处理可以增加 ROS 的释放并激活内源性抗氧化酶活

性^[214]，产生脑保护作用。而在脊髓缺血损伤中，七氟烷可激活 ERK/MAPK 信号通路^[54]，增加对缺血损伤的耐受性。此外，七氟烷预处理还可以通过减轻炎症反应^[62]发挥脑保护作用。然而，以上提到的作用机制均不具有特异性，并不能成为七氟烷预处理脑保护作用的特异性靶点。

由于神经元在脑功能中的核心作用，因此对脑缺血再灌注损伤研究主要关注神经元损伤及其相关机制。然而近年来对脑缺血研究的观点已经由只关注单一细胞转向重视整体的内环境稳定。做为中枢神经系统含量最丰富的细胞类型，星形胶质细胞占到脑内细胞总数的 80%~90%，是神经元数目的五倍之多，其在脑缺血损伤和保护中的作用不容忽视^[12, 215]。如文献回顾中所述，星形胶质细胞参与中枢神经系统的多项重要生理功能^[216]，包括摄取和释放神经递质、维持水和离子平衡、稳定血脑屏障的正常结构、调节脑血流量、控制能量代谢以及参与神经突触间信息传递等，而不仅仅是传统观点认为的连接和支持作用。因此，提高星形胶质细胞的存活率，改善缺血后星形胶质细胞的功能可能将更有利于脑缺血再灌注损伤的最终转归；而对星形胶质细胞在缺血缺氧性损伤中的变化和功能进行深入研究将为开发新的脑缺血防治措施提供有效的靶点。

大量研究发现七氟烷预处理可通过调节细胞内信号通路发挥神经保护作用，如 PI3K/Akt 信号通路、ERK/MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路等，但多只关注了神经元内的信号通路，七氟烷预处理能否调节星形胶质细胞内信号分子尚未可知。NDRG2 是一个在中枢神经系统内主要表达于星形胶质细胞的特殊基因，属于 NdrG 家族，在细胞增殖、分化、应激中发挥重要作用，普遍被认为是一个抑癌候选基因^[217]。已有研究表明 NDRG2 参与调节生理和病理条件下星形胶质细胞的活化状态^[16]。星形胶质细胞活化即反应性星形胶质细胞增生，是缺血后早期非常重要的病理变化，形态学表现为星形胶质细胞数量增加，胞体肥大，突起增多、延长，标志物 GFAP 表达上调，可能导致脑水肿、增加颅内压。另外，反应性星形胶质细胞释放促炎细胞因子，可加重缺血损伤^[121]。有研究发现重复多次七氟烷预处理可通过抑制星形胶质细胞反应性维持血脑屏障的完整性^[77]。本部分结果显示，单次七氟烷预处理也可减轻 MCAO 引起的缺血半暗带星形胶质细胞形态学改变。NDRG2 作为调控星形胶质细胞反应性的重要分子，可能在七氟烷预处理对星形胶质细胞反应性增生的抑制过程中发挥一定作用，进而做为一种星形胶质细胞特异性的机制参与七氟烷预处理的神经

保护。

本课题组前期研究发现，局灶性脑缺血再灌注损伤后，缺血半暗带区 GFAP 阳性细胞增加，而免疫荧光双标结果显示与 GFAP 共定位于星形胶质细胞的 NDRG2 表达上调，且发生明显的核转位，表明缺血再灌注损伤可激活星形胶质细胞，上调 NDRG2 表达并促使 NDRG2 向核内转移。本部分实验通过在 SD 大鼠和原代培养星形胶质细胞中分别建立 MCAO 和 OGD 模型，发现七氟烷预处理可逆转大鼠脑缺血半暗带区和培养星形胶质细胞 OGD 后的 NDRG2 上调，并抑制 NDRG2 从胞浆向胞核的转移，且可抑制缺血后星形胶质细胞反应性形态变化，故推测七氟烷预处理有可能通过降低 NDRG2 表达、抑制其核转位而影响缺血后反应性星形胶质细胞增生，进而减轻缺血再灌注损伤，但这一结论尚需通过改变星形胶质细胞内 NDRG2 的水平，观察其对缺血/再灌注损伤和七氟烷神经保护体作用的影响方能证实。

第二部分 NDRG2 表达上调/下调对七氟烷 预处理减轻细胞 OGD 损伤作用的影响

1 材料

1.1 实验动物

新生 SD 大鼠，1~3 日龄，由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 小干扰 RNA (siRNA)

实验中所使用的 NDRG2 siRNA 系李艳博士委托德国 QIAGEN 公司构建，后委托 Genscript 公司重新合成，序列为 5'-GCAUCCUGCAGUACUAAAATT-3' 和 5'-UUUAAGUACUGCAGGAUGCAA-3'；用做对照的乱序 RNA 序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 和 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'，亦委托 Genscript 公司重新合成。

1.3 过表达质粒

实验中所使用的 NDRG2 过表达质粒为李艳博士构建，后委托陕西东澳公司利用大肠杆菌表达扩增并提取质粒，具体信息如下：采用 PCR 反应分别扩增大鼠和人 NDRG2 的 DNA 片段，大鼠 NDRG2 引物序列为 5'-GAATTCTATGGCAGAGCTTCAGGAGGT-3' / 5'-GGATCCTCAACAGGAGACTTCCATGGT-3'，人 NDRG2 引物序列为 5'-ATGGCGGAGCTGCAGGAGGTGC-3' / 5'-TGAGGAACGAGGTCTGGGTGGG-3'。扩增后的 DNA 片段克隆入 pEGFP-C1 载体的 *EcoR/Bam*HI 位点。

1.4 实验仪器

同第一部分。

1.5 实验耗材

同第一部分。

1.6 实验试剂

同第一部分。

2 方法

2.1 原代星形胶质细胞培养

同第一部分。

2.2 七氟烷预处理

离体细胞七氟烷预处理，同第一部分。

2.3 原代培养星形胶质细胞 OGD 模型

同第一部分。

2.4 细胞 NDRG2 siRNA 和过表达质粒载体转染

- 1) 细胞培养皿或培养板内培养基换为无血清无双抗 DMEM (3.5cm 皿 2mL, 24 孔板 500uL/孔, 96 孔板 100uL/孔);
- 2) 按比例用无血清无双抗 DMEM 稀释 Lipofectamine 2000 (3.5cm 皿:100uL DMEM+5uL Lipofectamine 2000; 24 孔板: 25uL DMEM+1uL Lipofectamine 2000 /孔; 96 孔板: 5uL DMEM+0.25uL Lipofectamine 2000 /孔), 室温孵育 5min;
- 3) 按比例用无血清无双抗 DMEM 稀释 NDRG2 siRNA 和乱序对照 RNA (3.5cm 皿: 100uL DMEM+100pmol RNA; 24 孔板: 25uL DMEM+20pmol RNA /孔; 96 孔板: 5uL DMEM+5pmol RNA /孔), 以及 NDRG2 过表达质粒及载体质粒 (3.5cm 皿: 100uL DMEM+2.5ug DNA; 24 孔板: 25uL DMEM+0.5ug DNA /孔; 96 孔板: 5uL DMEM+0.1ug DNA /孔);
- 4) 稀释好的 siRNA 或质粒 DNA 加入稀释后的 Lipofectamine 2000, 轻弹管壁使其混合均匀, 室温孵育 20~30min;
- 5) 混合液缓慢滴加入培养皿或培养板内, 轻轻摇晃使其迅速混匀, 放入培养箱继续培养;
- 6) 4~6 小时后, 更换含 10%FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养以进行下一步实验。

2.5 细胞活力测定—MTT 试验

同第一部分。

2.6 细胞毒性测定—LDH 释放试验

同第一部分。

2.7 蛋白免疫印迹—Western blot

同第一部分。

2.8 统计学分析

同第一部分。

3 实验计划和分组

3.1 验证 NDRG2 siRNA 和过表达质粒载体的基因沉默/过表达效率

原代培养星形胶质细胞接种入 6cm 细胞培养皿，随机分为 5 组，正常对照组 (Control)，乱序对照 RNA 组 (si-Con)，NDRG2 siRNA 组 (si-NDRG2)，质粒空载体组 (Vector)，NDRG2 过表达质粒载体组 (NDRG2)，每组 6 皿。si-Con 和 si-NDRG2 组分别转染乱序对照 RNA 和 NDRG2 siRNA，Vector 和 NDRG2 组分别转染空载体和 NDRG2 过表达质粒。转染 24h 提蛋白进行 Western blot 检测各组 NDRG2 表达情况，验证 NDRG2 siRNA 和过表达质粒载体的基因沉默/过表达效率。

3.2 观察下调 NDRG2 表达对培养星形胶质细胞 OGD 损伤的影响

原代培养星形胶质细胞接种入 96 孔板，随机分为 3 组，OGD 组，乱序对照 RNA + OGD 组 (si-Con + OGD)，NDRG2 siRNA + OGD 组 (si-NDRG2 + OGD)，每组 8 孔。si-Con + OGD 和 si-NDRG2 + OGD 组分别转染乱序对照 RNA 和 NDRG2 siRNA。转染 24h 后换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖，于复氧复糖 24h 吸取细胞上清液检测 LDH 释放率，并利用 MTT 摄取实验检测细胞活力。

3.3 观察上调 NDRG2 表达对培养星形胶质细胞 OGD 损伤的影响

原代培养星形胶质细胞接种入 96 孔板，随机分为 3 组，正常对照组 (Control)，质粒空载体组 + OGD 组 (Vector + OGD)，NDRG2 过表达质粒载体 + OGD 组 (NDRG2

+OGD), 每组 8 孔。Vector+OGD 和 NDRG2+OGD 组分别转染空载体和 NDRG2 过表达质粒。转染 24h 后换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖, 于复氧复糖 24h 吸取细胞上清液检测 LDH 释放率, 并利用 MTT 摄取实验检测细胞活力。

3.4 观察上调 NDRG2 表达对七氟烷预处理细胞保护作用的影响

原代培养星形胶质细胞接种入 96 孔板, 随机分为 3 组, 对照组 (Control), 质粒空载体组 (Vector), NDRG2 过表达质粒载体组 (NDRG2), 每组 8 孔。Vector 和 NDRG2 组分别转染空载体和 NDRG2 过表达质粒。转染 24h 后三组同样处理: 通入含 2% 七氟烷的 5% CO₂ 混合气预处理 1h, 间隔 2h 换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖, 于复氧复糖 24h 吸取细胞上清液检测 LDH 释放率, 并利用 MTT 摄取实验检测细胞活力。

4 结果

4.1 NDRG2 siRNA 和过表达质粒载体可分别使培养星形胶质细胞中 NDRG2 基因沉默或表达增加

原代星形胶质细胞稳定传代后接种至 6cm 培养皿, 分别转染乱序对照 RNA (si-Con), NDRG2 siRNA (si-NDRG2), pEGFP-C1 质粒空载体 (Vector) 及 NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体 (NDRG2)。由于 NDRG2 基础表达量较低, 故转染 siRNA 组选择转染 24h 后行 OGD, 复氧 24h 提蛋白进行 Western blot 检测 OGD 后 NDRG2 基因沉默情况, 发现转染 NDRG2 siRNA 可显著降低培养星形胶质细胞内 NDRG2 蛋白水平 ($P < 0.05$, 图 18), 同时转染 NDRG2 siRNA 和 NDRG2 rescue 表达载体可对抗 NDRG2 siRNA 对 NDRG2 敲低的作用, 转染 si-Con 未对 NDRG2 含量造成明显影响,; 而转染 NDRG2 过表达质粒载体组则于转染 24h 后提蛋白检测其效率, 发现 NDRG2 过表达质粒可显著增加培养星形胶质细胞内 NDRG2 蛋白水平 (6.25 ± 0.68 倍 vs 1.08 ± 0.22 倍, $P < 0.05$, 图 19), 空载体转染组则与对照组无明显差异。

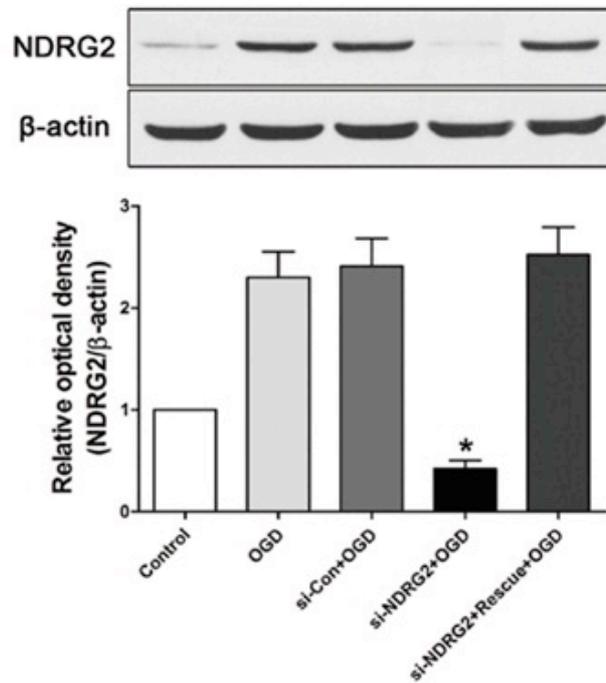


图 18. 转染 siRNA 对培养星形胶质细胞 NDRG2 表达的影响 (n=6)。*P<0.05 vs si-Con。si-Con, 乱序对照 RNA; si-NDRG2, NDRG2 小干扰 RNA。

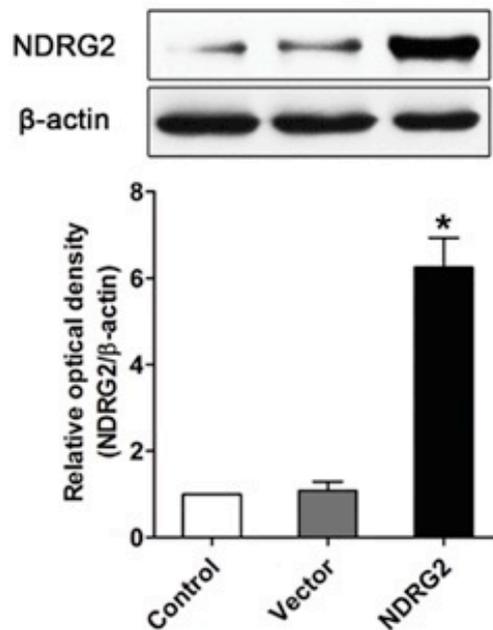


图 19. 转染质粒载体对培养星形胶质细胞 NDRG2 表达的影响 (n=6)。*P<0.05 vs Vector。NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

4.2 沉默 NDRG2 表达减轻培养星形胶质细胞 OGD 损伤

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞，稳定传代后接种至 96 孔板，分别转染乱序对照 RNA (si-Con) 和 NDRG2 siRNA (si-NDRG2)。转染 24h 后进行 OGD 模拟动物脑缺血再灌注损伤。OGD 4h，复氧 24h 后取培养上清液检测 LDH 释放量，发现 OGD 后培养上清液中 LDH 含量显著上升，转染 si-Con 未对 OGD 后 LDH 释放量的上升产生显著影响 ($59.3 \pm 6.2\%$)，si-NDRG2 组 OGD 后 LDH 释放量明显下降 ($30.4 \pm 4.0\%$, $P < 0.05$, 图 20)；利用 MTT 试验检测细胞活力，发现 OGD 可显著降低培养细胞对 MTT 的摄取量，转染 si-Con 的细胞 OGD 后活力无明显变化 ($44.5 \pm 4.3\%$)，转染 si-NDRG2 则可改善 OGD 后的细胞活力，增加培养细胞对 MTT 的摄取量 ($80.5 \pm 4.1\%$, $P < 0.05$, 图 21)。上述结果表明转染 NDRG2 siRNA 下调 NDRG2 表达可减轻 OGD 引起的培养星形胶质细胞损伤。

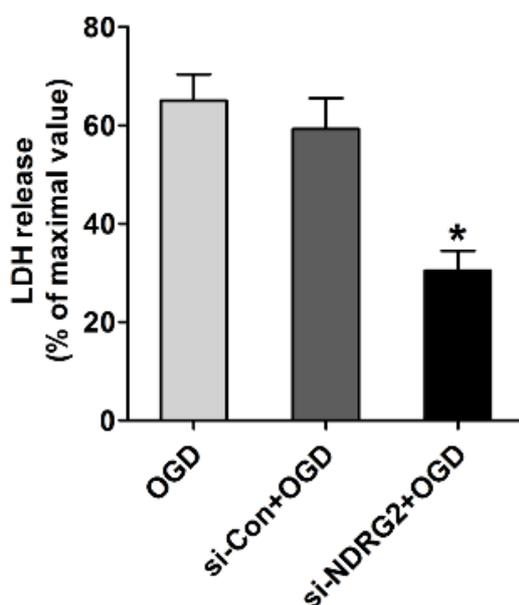


图 20. 转染 siRNA 对培养星形胶质细胞 OGD 后 LDH 释放情况的影响 (n=8)。

* $P < 0.05$ vs si-Con。OGD，氧糖剥夺；si-Con，乱序对照 RNA；si-NDRG2，NDRG2 小干扰 RNA。

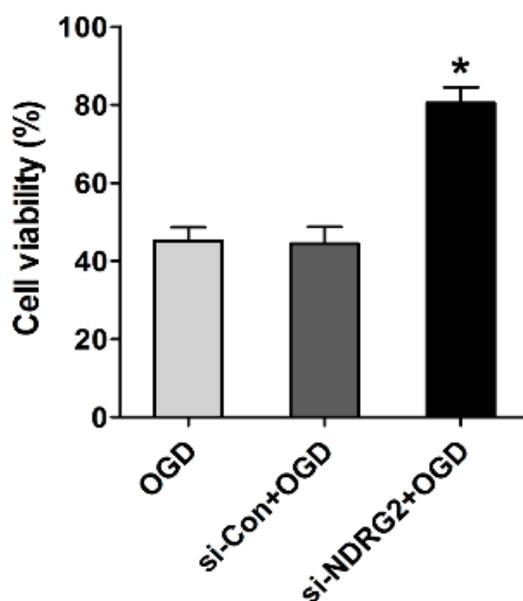


图 21. 转染 siRNA 对培养星形胶质细胞 OGD 后细胞活力的影响(n=8)。*P<0.05 vs si-Con。OGD, 氧糖剥夺; si-Con, 乱序对照 RNA; si-NDRG2, NDRG2 小干扰 RNA。

4.3 过表达 NDRG2 加重培养星形胶质细胞 OGD 损伤

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞, 稳定传代后接种至 96 孔板, 分别转染 pEGFP-C1 质粒空载体 (Vector) 及 NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体 (NDRG2)。转染 24h 后进行 OGD 模拟动物脑缺血再灌注损伤。OGD 4h, 复氧 24h 后取培养上清液检测 LDH 释放量, 发现 Vector 组 OGD 后 LDH 释放量的显著上升, NDRG2 过表达组 OGD 后 LDH 释放量较 Vector 组进一步上升 ($78.6 \pm 2.3\%$, $P < 0.05$, 图 22); 利用 MTT 试验检测细胞活力, 发现转染质粒空载体的培养星形胶质细胞 OGD 后活力明显下降, 转染 NDRG2 过表达质粒组 OGD 后对 MTT 的摄取量进一步下降 ($28.5 \pm 2.3\%$, $P < 0.05$, 图 23)。上述结果表明转染 NDRG2 过表达质粒上调 NDRG2 表达可加重 OGD 引起的培养星形胶质细胞损伤。

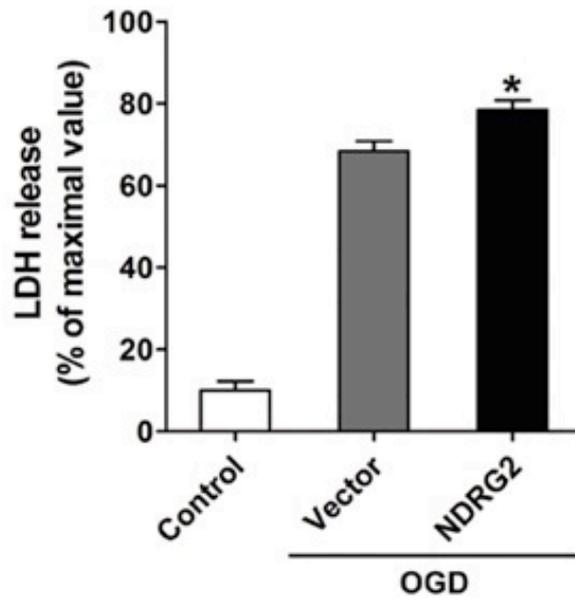


图 22. 转染 pEGFP-C1 质粒载体对培养星形胶质细胞 OGD 后 LDH 释放情况的影响 (n=8)。*P<0.05 vs Vector。OGD, 氧糖剥夺; NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

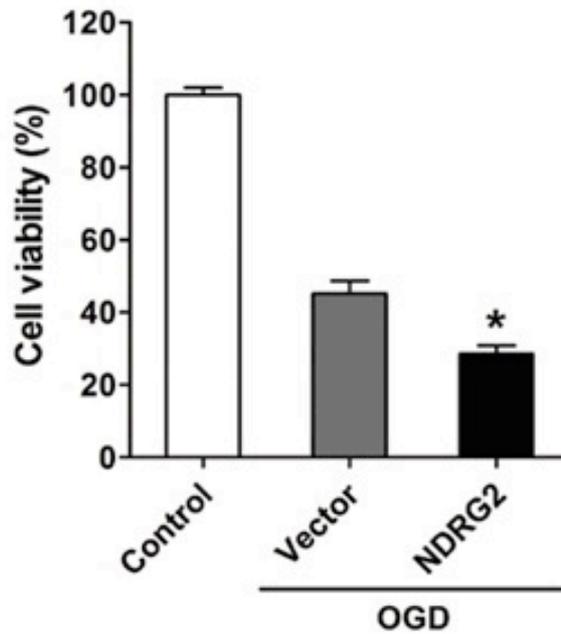


图 23. 转染 pEGFP-C1 质粒载体对培养星形胶质细胞 OGD 后细胞活力的影响 (n=8)。*P<0.05 vs Vector。OGD, 氧糖剥夺; NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

4.4 过表达 NDRG2 逆转七氟烷预处理对培养星形胶质细胞 OGD 损伤的保护作用

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞，稳定传代后接种至 96 孔板，分别转染 pEGFP-C1 质粒空载体 (Vector) 及 NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体 (NDRG2)。转染 24h 后给予 2% 七氟烷预处理 1h，2h 后进行 OGD 模拟动物脑缺血再灌注损伤。OGD 4h，复氧 24h 后取培养上清液检测 LDH 释放量，发现 Vector 组七氟烷对 LDH 释放的抑制未发生明显变化，NDRG2 过表达组七氟烷对 LDH 释放的降低作用被逆转 ($65.6 \pm 6.5\%$, $P < 0.05$, 图 24)；利用 MTT 试验检测细胞活力，发现转染质粒空载体的培养星形胶质细胞中，七氟烷预处理对 OGD 后活力的改善作用与未转染组类似，转染 NDRG2 过表达质粒组七氟烷对 OGD 后 MTT 摄取的增加作用被阻断 ($47.5 \pm 3.1\%$, $P < 0.05$, 图 25)。上述结果表明转染 NDRG2 过表达质粒上调 NDRG2 表达可逆转七氟烷预处理对培养星形胶质细胞 OGD 损伤的保护作用。

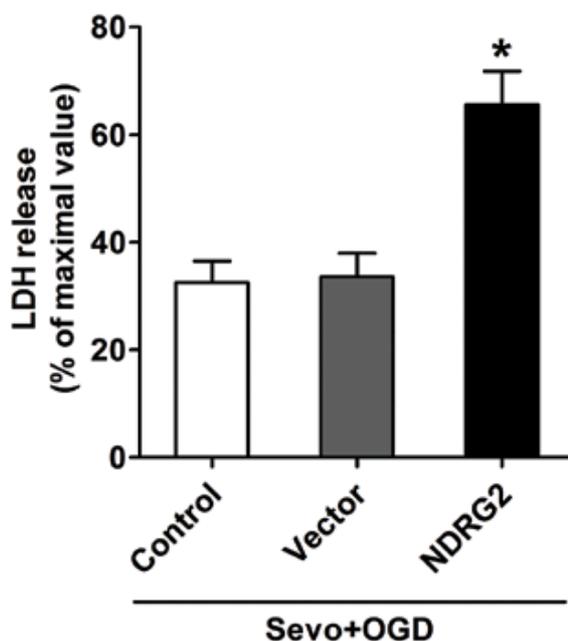


图 24. 转染 pEGFP-C1 质粒载体对培养星形胶质细胞七氟烷预处理 + OGD 后 LDH 释放情况的影响 (n=8)。* $P < 0.05$ vs Vector。OGD, 氧糖剥夺; NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Sevo, 七氟烷预处理; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

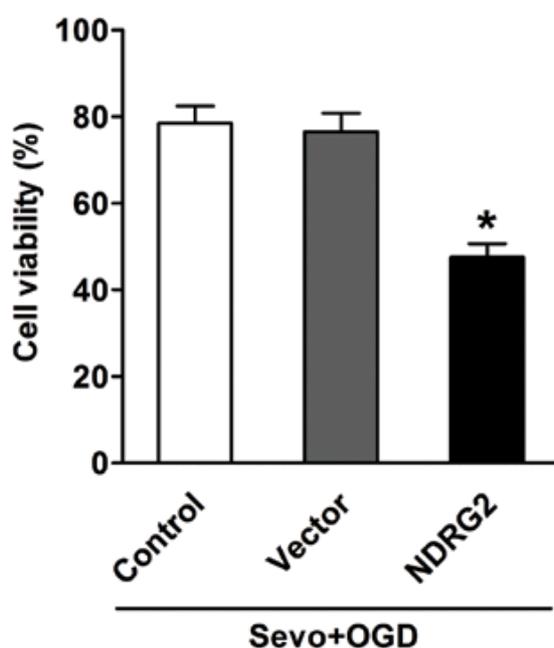


图 25. 转染 pEGFP-C1 质粒载体对培养星形胶质细胞七氟烷预处理+OGD 后细胞活力的影响 (n=8)。*P<0.05 vs Vector。OGD, 氧糖剥夺; NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Sevo, 七氟烷预处理; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

5 讨论

第一部分研究从动物实验和细胞实验两方面观察了七氟烷预处理对缺血/再灌注后星形胶质细胞 NDRG2 表达和分布变化的影响,发现七氟烷预处理可抑制缺血/再灌注引起的 NDRG2 表达上调和核转位,提示 NDRG2 抑制可能参与了七氟烷预处理的神经保护作用。本部分研究采用原代培养星形胶质细胞为研究对象,构建了 NDRG2 特异性 siRNA 和过表达质粒载体,观察 NDRG2 上调/下调对 OGD 损伤和七氟烷预处理保护作用的影响。

由于缺乏 NDRG2 转基因动物和基因敲除动物模型,且尚未开发出 NDRG2 特异性激动剂和抑制剂,因此本部分实验采用的是针对 NDRG2 mRNA 的 siRNA 来下调 NDRG2 表达,以及构建了携带 NDRG2 cDNA 的过表达质粒载体来上调 NDRG2 的含量。另外,由于 siRNA 和过表达质粒载体在动物脑中转染成功率低,基因沉默和过表达效果不佳,因而我们使用了原代培养的星形胶质细胞进行转染,并以 OGD 模型来模拟动物脑缺血/再灌注损伤模型,观察 NDRG2 表达上调/下调对培养星形胶质

细胞 OGD 损伤和七氟烷预处理细胞保护作用的影响来推测其对脑缺血/再灌注损伤和七氟烷预处理神经保护作用的影响。故本实验存在一定的局限性，我们已经在构建 NDRG2 转基因小鼠和基因敲除小鼠，将在未来采用这些遗传修饰小鼠明确 NDRG2 在脑缺血/再灌注损伤以及预处理措施神经保护中的作用。

本课题组前期研究已证实利用 siRNA 下调 NDRG2 表达可加快细胞增殖，而利用 NDRG2 过表达质粒载体上调 NDRG2 含量可使细胞增殖速度减慢^[22]，但并未观察调控其表达对 OGD 损伤的影响。第一部分实验表明 OGD 后星形胶质细胞内 NDRG2 表达上调，因此我们先观察了抑制 NDRG2 表达上调后 OGD 引起的细胞损伤的变化。与转染乱序对照 RNA (si-Con) 组相比，转染 siRNA 使星形胶质细胞内 NDRG2 基因沉默，OGD 后细胞对 MTT 的摄取增加，LDH 释放减少；我们还向星形胶质细胞内转染了携带 NDRG2 基因的过表达质粒载体，发现较普通星形胶质细胞，OGD 后 MTT 摄取量更低，LDH 释放量更多，表明细胞内过表达 NDRG2 导致 OGD 引起的细胞损伤进一步加重。这些结果说明：在星形胶质细胞 OGD 模型中，NDRG2 发挥促损伤的作用。

前一部分实验已证明，七氟烷预处理可使 OGD 后 NDRG2 表达上调被抑制。那么，如果 NDRG2 在细胞内过表达，使其不能被七氟烷预处理完全抑制，七氟烷预处理的保护作用是否会发生改变呢？因此我们在转染了 NDRG2 过表达质粒的原代培养星形胶质细胞中，观察了七氟烷预处理对 OGD 损伤保护作用的变化，发现细胞活力下降，LDH 释放增加，提示 NDRG2 表达上调后七氟烷预处理对 OGD 损伤的细胞保护作用部分丧失。

本部分研究结果发现转染 NDRG2 siRNA 下调 NDRG2 表达发挥了与七氟烷预处理类似的细胞保护作用。相反，转染 NDRG2 过表达质粒使 OGD 引起的细胞活力受损和细胞毒性进一步加重，且可逆转七氟烷预处理对培养星形胶质细胞 OGD 损伤的保护作用，表明七氟烷预处理确实可能通过抑制 NDRG2 上调和核转位发挥其保护作用。

第三部分 七氟烷预处理和 NDRG2 表达上调/下调对缺血/再灌注后细胞凋亡的影响

1 材料

1.1 实验动物

同第一部分。

1.2 小干扰 RNA (siRNA)

同第二部分。

1.3 过表达质粒

同第二部分。

1.4 实验仪器

同第一部分。

1.5 实验耗材

同第一部分。

1.6 实验试剂

同第一部分。

2 方法

2.1 原代星形胶质细胞培养

同第一部分。

2.2 七氟烷预处理

同第一部分。

2.3 大鼠局灶性脑缺血模型—MCAO

同第一部分。

2.4 原代培养星形胶质细胞 OGD 模型

同第一部分。

2.5 细胞 NDRG2 siRNA 和过表达质粒载体转染

同第二部分。

2.6 TUNEL 染色

- 1) 石蜡切片脱蜡、抗原修复，细胞爬片通透化处理方法同第一部分免疫荧光染色；
- 2) 按 TdT 酶：标记液=1：9 比例配制 TUNEL 反应液，滴加到切片或爬片上，37℃ 孵育 60min，PBS 漂洗后甘油封片，荧光显微镜下观察。

2.7 蛋白免疫印迹—Western blot

方法同第一部分，所使用抗体包括：兔抗 Caspase-3（1：500），兔抗 cleaved-Caspase-3（1：500）。

2.8 统计学分析

同第一部分。

3 实验计划和分组

3.1 观察七氟烷预处理对脑缺血再灌注和培养星形胶质细胞 OGD 后凋亡的影响

48 只雄性 SD 大鼠随机分为四组，假手术组（Sham），局灶性脑缺血再灌注组（MCAO），氧气+局灶性脑缺血再灌注组（Vehicle+MCAO）和七氟烷+局灶性脑缺血再灌注组（Sevo+MCAO）。Vehicle+MCAO 和 Sevo+MCAO 分别吸入氧气或 2%七氟烷 1h，间隔 2h 进行 MCAO；Sham 组进行手术但不插入线栓，缺血 2h 后拔出线栓，于再灌注 24h 每组 6 只取半暗带组织进行 Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 含量，另 6 只灌注固定并石蜡切片后进行 TUNEL 染色计算缺血半暗带区 TUNEL 阳性细胞百分率。

原代培养星形胶质细胞分别接种至 6cm 细胞培养皿和细胞染色用玻片，随机分

为四组，对照组（Control），OGD 组，氧气+OGD 组（Vehicle+OGD），七氟烷+OGD 组（Sevo+OGD）。Vehicle+OGD 和 Sevo+OGD 组分别通入 5%CO₂ 混合气或含 2%七氟烷的 5%CO₂ 混合气 1h，间隔 2h 换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖，于复氧复糖 24h 提取细胞蛋白进行 Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 含量（n=6），细胞爬片固定后进行 TUNEL 染色计算 TUNEL 阳性细胞百分率（n=6）。

3.2 观察下调 NDRG2 表达对培养星形胶质细胞 OGD 后凋亡的影响

原代培养星形胶质细胞接种分别接种至 6cm 细胞培养皿和细胞染色用玻片，随机分为 3 组，OGD 组，乱序对照 RNA+OGD 组（si-Con+OGD），NDRG2 siRNA+OGD 组（si-NDRG2+OGD）。si-Con+OGD 和 si-NDRG2+OGD 组分别转染乱序对照 RNA 和 NDRG2 siRNA。转染 24h 后换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖，于复氧复糖 24h 提取细胞蛋白进行 Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 含量（n=6），细胞爬片固定后进行 TUNEL 染色计算 TUNEL 阳性细胞百分率（n=4）。

3.3 观察上调 NDRG2 表达对培养星形胶质细胞 OGD 后凋亡的影响

原代培养星形胶质细胞接种分别接种至 6cm 细胞培养皿和细胞染色用玻片，随机分为 3 组，正常对照组（Control），质粒空载体组+OGD 组（Vector+OGD），NDRG2 过表达质粒载体+OGD 组（NDRG2+OGD）。Vector+OGD 和 NDRG2+OGD 组分别转染空载体和 NDRG2 过表达质粒。转染 24h 后换无血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖，于复氧复糖 24h 提取细胞蛋白进行 Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 含量（n=6），细胞爬片固定后进行 TUNEL 染色计算 TUNEL 阳性细胞百分率（n=6）。

3.4 观察上调 NDRG2 表达对培养星形胶质细胞七氟烷预处理+OGD 后凋亡的影响

原代培养星形胶质细胞接种分别接种至 6cm 细胞培养皿和细胞染色用玻片，随机分为 3 组，对照组（Control），质粒空载体组（Vector），NDRG2 过表达质粒载体组（NDRG2）。Vector 和 NDRG2 组分别转染空载体和 NDRG2 过表达质粒。转染 24h 后三组同样处理：通入含 2%七氟烷的 5%CO₂ 混合气预处理 1h，间隔 2h 换无

血清无糖培养基进行 OGD。OGD 4h 后恢复氧糖，于复氧复糖 24h 提取细胞蛋白进行 Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 含量 (n=6)，细胞爬片固定后进行 TUNEL 染色计算 TUNEL 阳性细胞百分率 (n=6)。

4 结果

4.1 七氟烷预处理减轻大鼠脑缺血再灌注后细胞凋亡

七氟烷预处理后，间隔 2h 建立大鼠 MCAO 模型，再灌注 24h，取缺血半暗带组织提取蛋白质，Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平，结果显示，MCAO 后大鼠缺血半暗带脑组织内 cleaved Caspase-3 表达明显升高，氧气吸入组与之相较无统计学差异，而七氟烷预处理可降低缺血后 cleaved Caspase-3 含量 ($P<0.05$ ，图 26)；大鼠灌注固定取石蜡切片行 TUNEL 染色，发现 MCAO 后缺血半暗带区 TUNEL 阳性细胞百分率显著增加 ($62.5\pm 8.5\%$)，氧气吸入组 TUNEL 阳性细胞数无显著变化 ($61.5\pm 9.2\%$)，而给予七氟烷预处理则使 TUNEL 阳性细胞百分率降至 $31.2\pm 5.4\%$ ($P<0.05$ ，图 27)。上述结果说明七氟烷预处理可减轻大鼠 MCAO 后缺血半暗带区的细胞凋亡。

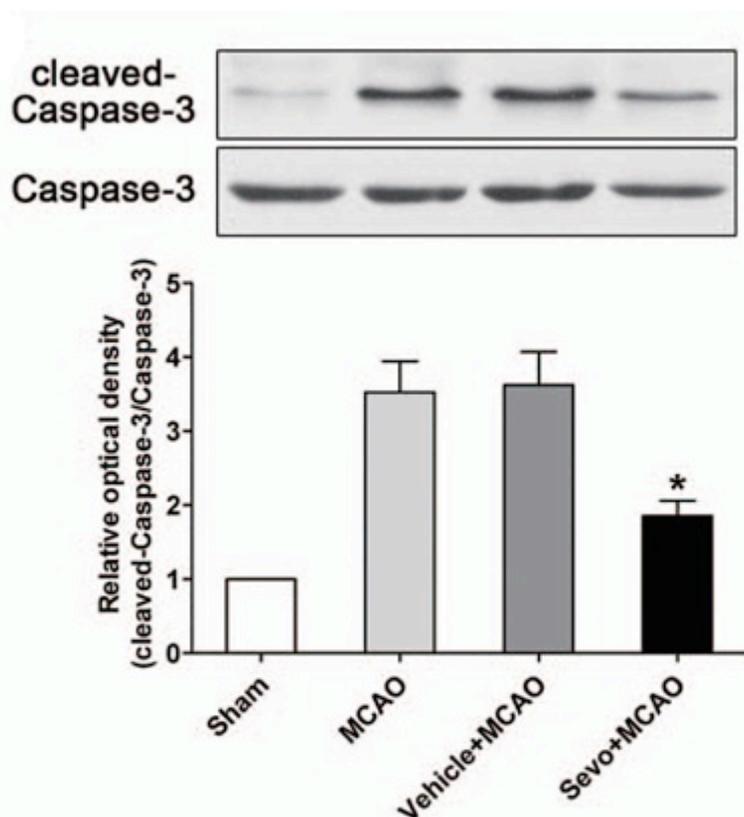


图 26. 七氟烷预处理对 MCAO 再灌注 24h 缺血半暗带组织 Caspase-3 活化的影响 (n=6)。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MCAO, 大脑中动脉阻闭; Sevo, 七氟烷预处理。

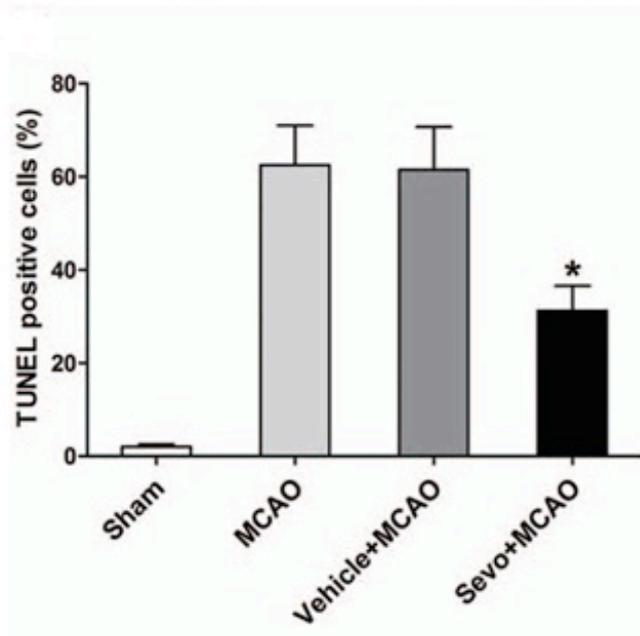
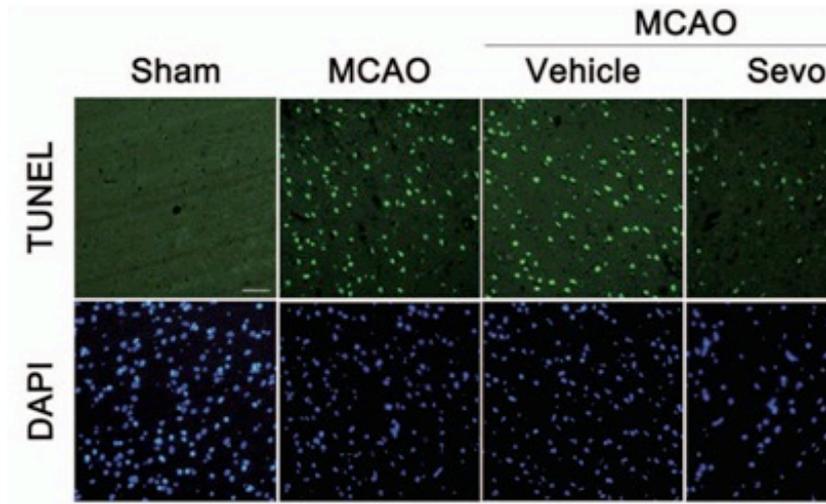


图 27. 七氟烷预处理对 MCAO 再灌注 24h 缺血半暗带组织 TUNEL 阳性细胞百分率的影响 (n=6)。标尺=100 μm。*P<0.05 vs Vehicle+MCAO。MCAO, 大脑中动脉阻闭; Sevo, 七氟烷预处理。

4.2 七氟烷预处理减轻培养星形胶质细胞 OGD 后凋亡

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞, 稳定传代后接种至 6cm 细胞培养皿

和细胞爬片专用玻片，七氟烷预处理后间隔 2h 行 OGD，OGD 4h，复氧 24h 提取培养皿内星形胶质细胞蛋白质，Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平，结果显示，OGD 后培养原代星形胶质细胞 cleaved Caspase-3 表达明显升高，通入 5%CO₂ 混合气组与之相较无统计学差异，而七氟烷预处理可降低 OGD 后 cleaved Caspase-3 含量 ($P<0.05$ ，图 28)；细胞爬片行 TUNEL 染色，发现 OGD 后培养星形胶质细胞 TUNEL 阳性细胞百分率显著增加 ($62.5\pm 8.5\%$)，混合气处理组 TUNEL 阳性细胞数无显著变化 ($61.5\pm 9.2\%$)，而给予七氟烷预处理则使 TUNEL 阳性细胞百分率降至 $31.2\pm 5.4\%$ ($P<0.05$ ，图 29)。上述结果说明七氟烷预处理可减轻原代培养星形胶质细胞 OGD 引起的细胞凋亡。

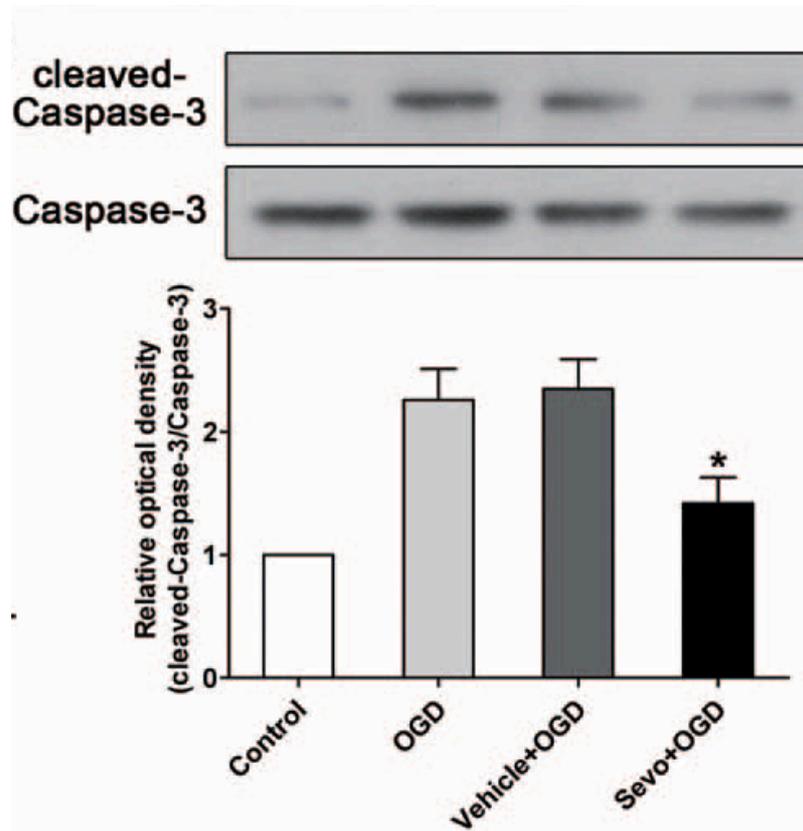


图 28. 七氟烷预处理对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 Caspase-3 活化的影响 ($n=6$)。* $P<0.05$ vs Vehicle+OGD。OGD，氧糖剥夺；Sevo，七氟烷预处理。

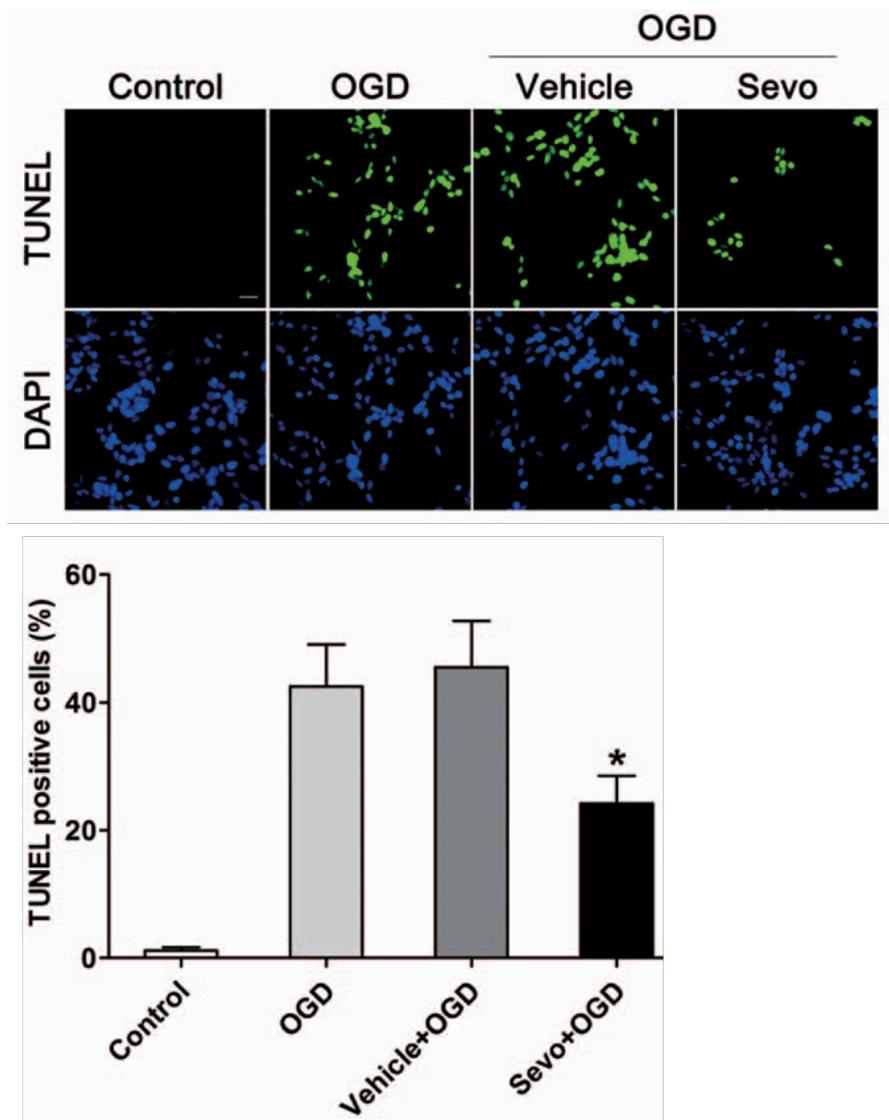


图 29. 七氟烷预处理对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 TUNEL 阳性细胞百分率的影响 ($n=6$)。标尺=40 μm 。* $P<0.05$ vs Vehicle+OGD。OGD, 氧糖剥夺; Sevo, 七氟烷预处理。

4.3 沉默 NDRG2 表达抑制培养星形胶质细胞 OGD 后凋亡

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞, 稳定传代后接种至 6cm 细胞培养皿和细胞爬片专用玻片, 分别转染乱序对照 RNA (si-Con) 和 NDRG2 siRNA (si-NDRG2)。转染 24h 后进行 OGD 模拟动物脑缺血再灌注损伤。OGD 4h, 复氧 24h 提取培养皿内蛋白质, Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平, 发现 si-NDRG2 组 OGD 后 cleaved Caspase-3 含量明显下降, 而转染 si-Con 未

对 OGD 后 Caspase-3 产生显著影响 ($P < 0.05$, 图 30); 细胞爬片行 TUNEL 染色, 发现 si-Con 组阳性细胞数与单纯 OGD 组相比较无统计学差异 ($44.5 \pm 6.5\%$), 而转染 si-NDRG2 则使 TUNEL 阳性细胞百分率降至 $18.2 \pm 4.3\%$ ($P < 0.05$, 图 31)。上述结果说明转染 NDRG2 siRNA 下调 NDRG2 表达可减轻 OGD 引起的培养星形胶质细胞凋亡。

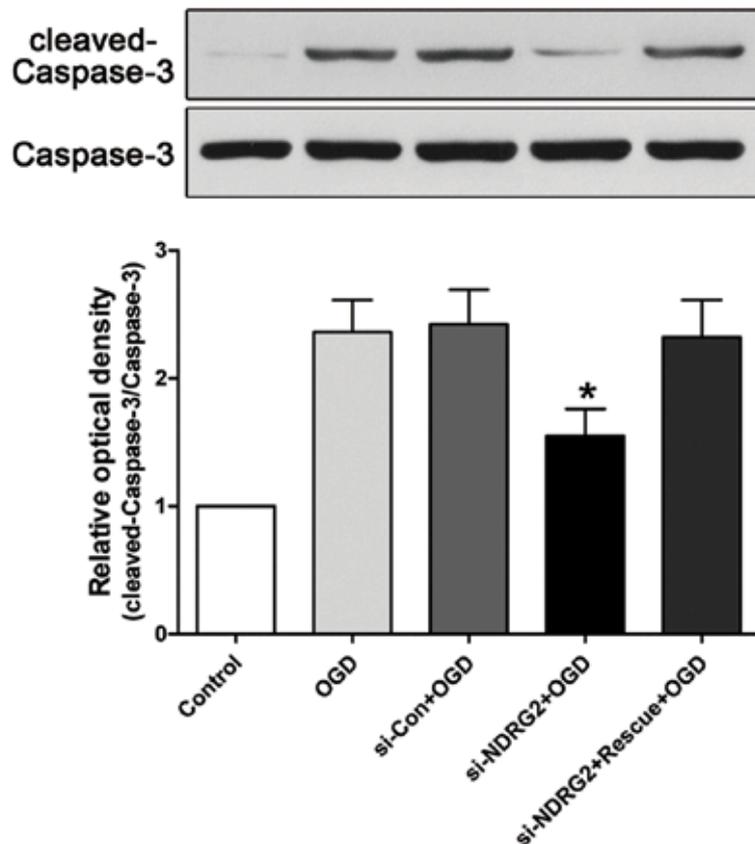


图 30. 转染 siRNA 对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 Caspase-3 活化的影响 ($n = 6$)。* $P < 0.05$ vs si-Con。OGD, 氧糖剥夺; si-Con, 乱序对照 RNA; si-NDRG2, NDRG2 小干扰 RNA。

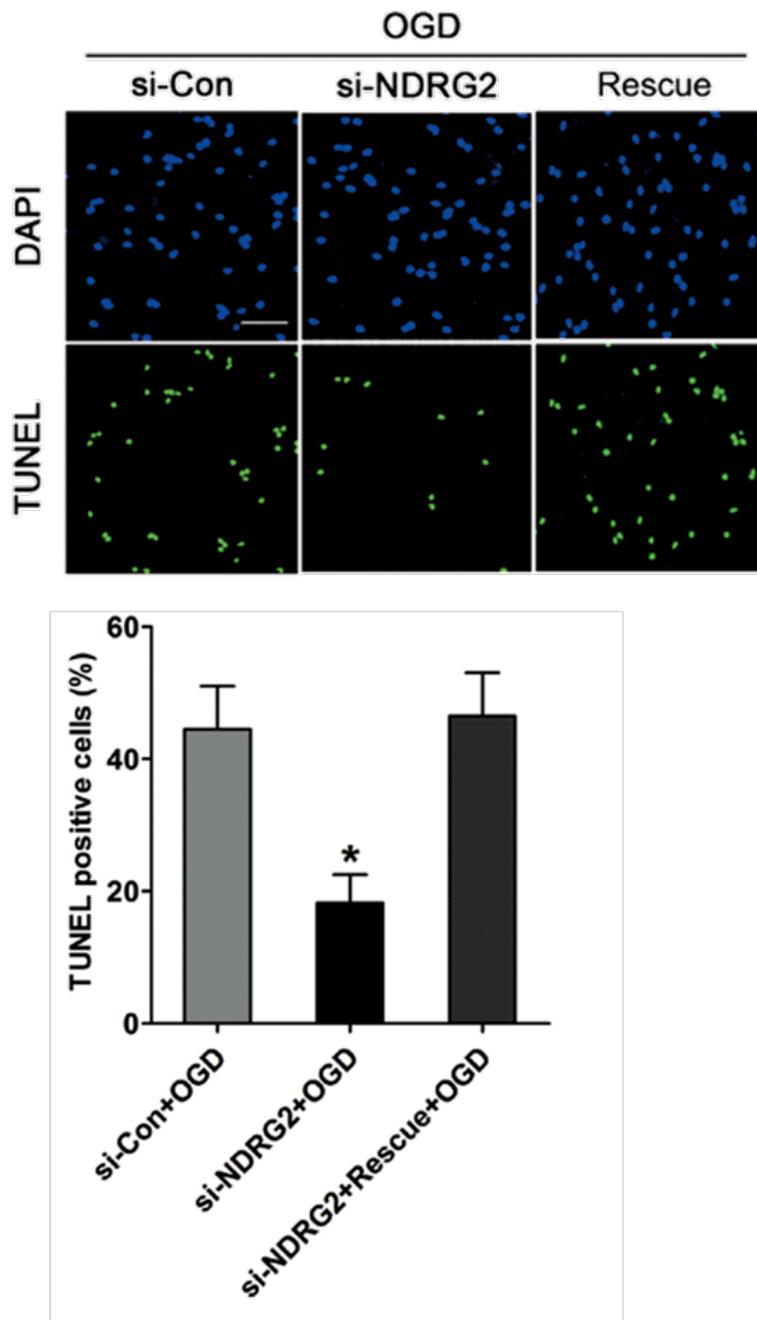


图 31. 转染 siRNA 对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 TUNEL 阳性细胞百分率的影响 (n=6)。标尺=80 μ m。*P<0.05 vs si-Con。OGD, 氧糖剥夺; si-Con, 乱序对照 RNA; si-NDRG2, NDRG2 小干扰 RNA。

4.4 过表达 NDRG2 增加培养星形胶质细胞 OGD 后凋亡

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞, 稳定传代后接种至 6cm 细胞培养皿,

分别转染 pEGFP-C1 质粒空载体 (Vector) 及 NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体 (NDRG2)。转染 24h 后进行 OGD 模拟动物脑缺血再灌注损伤。OGD 4h, 复氧 24h 提取培养皿内蛋白质, Western blot 检测 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平, 发现 Vector 组 OGD 后 cleaved Caspase-3 含量明显上升, NDRG2 过表达组 OGD 后 cleaved Caspase-3 水平较 Vector 组进一步提高 (3.82 ± 0.43 倍, $P < 0.05$, 图 32)。上述结果说明转染 NDRG2 过表达质粒上调 NDRG2 表达可加重 OGD 引起的培养星形胶质细胞凋亡。

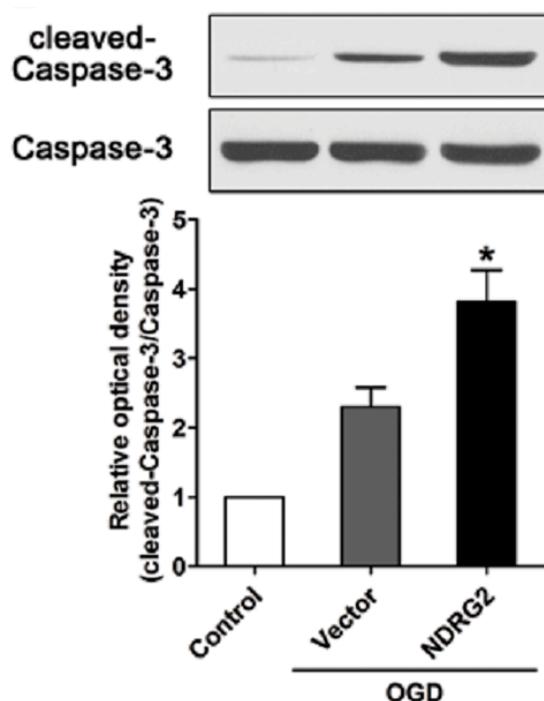


图 32. 转染 pEGFP-C1 质粒载体对 OGD 复氧 24h 原代培养星形胶质细胞 Caspase-3 活化的影响 (n=6)。* $P < 0.05$ vs Vector。OGD, 氧糖剥夺; NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

4.5 过表达 NDRG2 逆转七氟烷预处理对培养星形胶质细胞凋亡的抑制作用

取新生 SD 大鼠皮层培养原代星形胶质细胞, 稳定传代后接种至 6cm 细胞培养皿和细胞爬片专用玻片, 分别转染 pEGFP-C1 质粒空载体 (Vector) 及 NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体 (NDRG2)。转染 24h 后给予 2% 七氟烷预处理 1h, 2h 后进行 OGD 模拟动物脑缺血再灌注损伤。OGD 4h, 复氧 24h 提取培养皿内蛋白质, Western blot 检测

Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平，发现 Vector 组七氟烷对 Caspase-3 活化的抑制未发生明显变化，NDRG2 过表达组七氟烷对 cleaved Caspase-3 的降低作用被逆转 (2.35 ± 0.29 倍, $P < 0.05$, 图 33); 细胞爬片行 TUNEL 染色，发现转染质粒空载体的培养星形胶质细胞中，七氟烷预处理对 TUNEL 阳性细胞数目的减少作用与未转染组类似，转染 si-NDRG2 组七氟烷对 OGD 后 TUNEL 阳性细胞的抑制作用被阻断 ($77.5 \pm 9.5\%$, $P < 0.05$, 图 34)。上述结果表明转染 NDRG2 过表达质粒上调 NDRG2 表达可逆转七氟烷预处理对培养星形胶质细胞 OGD 凋亡的抑制作用。

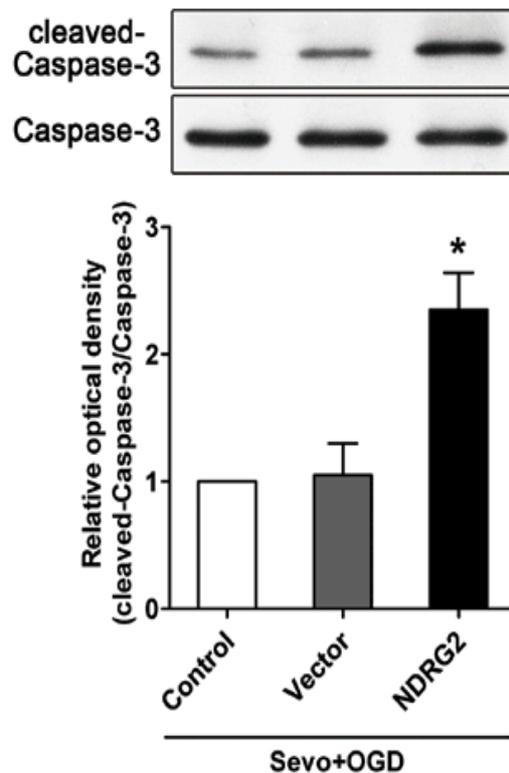


图 33. 转染 pEGFP-C1 质粒载体对培养星形胶质细胞七氟烷预处理+OGD 后 Caspase-3 活化的影响 (n=6)。* $P < 0.05$ vs Vector。OGD, 氧糖剥夺; NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Sevo, 七氟烷预处理; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

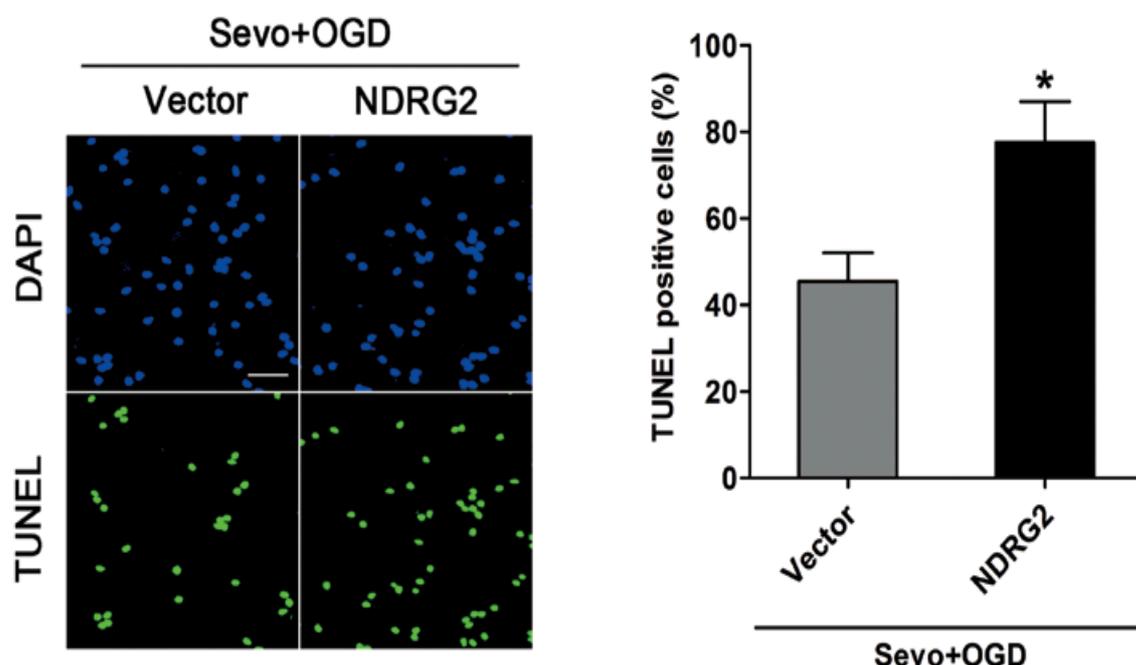


图 34. 转染 pEGFP-C1 质粒载体对培养星形胶质细胞七氟烷预处理+OGD 后 TUNEL 阳性细胞百分率的影响 (n=6)。标尺=80 μ m。*P<0.05 vs Vector。OGD, 氧糖剥夺; NDRG2, NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体; Sevo, 七氟烷预处理; Vector, pEGFP-C1 质粒空载体。

5 讨论

我们的前期研究发现缺血区半暗带 NDRG2 升高伴随凋亡水平升高, 且 NDRG2 多与 TUNEL 阳性细胞共定位^[21], 表明缺血后 NDRG2 上调可能与星形胶质细胞凋亡有关。近期研究发现, IL-6 诱导分化的 C6 细胞 (大鼠神经胶质瘤细胞, 可模拟星形胶质细胞) OGD 后也出现 NDRG2 表达上调及核转位, siRNA 下调 NDRG2 可抑制 OGD 后 Bax 表达、减少 TUNEL 阳性细胞, 而 NDRG2 过表达质粒载体上调 NDRG2 可增加 OGD 后 Bax 表达, 表明 NDRG2 可通过提高 Bax 水平促进细胞凋亡。进一步研究发现, NDRG2 的变化趋势与凋亡重要信号分子 p53 的变化趋势一致, 且沉默 p53 基因可抑制 OGD 后 NDRG2 的上调, 提示 NDRG2 可能 OGD 后 p53 凋亡信号通路的一部分^[22]。

凋亡是细胞死亡的一种重要方式。脑缺血/再灌注损伤中, 缺血核心区的细胞以

坏死为主要死亡方式,且其死亡基本不可逆;而缺血半暗带区的细胞则是以逐渐发生凋亡为主要死亡方式,如采取适当措施,这一部分细胞死亡是可以避免的。因此阻止缺血半暗带区的细胞凋亡成为减轻脑缺血/再灌注损伤的重要关注方向。多项研究证实七氟烷预处理可通过抑制缺血后细胞凋亡诱导脑缺血耐受^[9, 28, 63, 66],本课题前两部分实验已证实七氟烷预处理可通过抑制 NDRG2 上调减轻 MCAO 和 OGD 引起的缺血/再灌注损伤,那么 NDRG2 介导的星形胶质细胞凋亡是否是七氟烷预处理神经保护效应的作用靶点呢?

我们首先证实了七氟烷预处理可以降低 MCAO 后缺血半暗带区以及 OGD 后培养星形胶质细胞 cleaved Caspase-3 含量和 TUNEL 阳性细胞数量。cleaved Caspase-3 是 Caspase-3 裂解后的活化片段,是凋亡最后阶段的诱导酶;TUNEL 技术标记凋亡中断裂的 DNA,两者均是细胞凋亡状态的重要标志物。因此这些结果说明七氟烷预处理可抑制缺血/再灌注引起的星形胶质细胞凋亡。转染 NDRG2 siRNA 使 OGD 引起的星形胶质细胞 cleaved Caspase-3 含量和 TUNEL 阳性细胞百分率均减少,而转染 NDRG2 过表达质粒载体则使 OGD 引起的星形胶质细胞 Caspase-3 活化和 TUNEL 阳性细胞百分率进一步增加,且可逆转七氟烷预处理对 OGD 所致细胞凋亡的抑制作用,表明七氟烷预处理可通过抑制 NDRG2 相关的星形胶质细胞凋亡诱导脑缺血耐受。

已有多项研究探讨了 NDRG2 在细胞毒性和细胞死亡中的作用。一方面,NDRG2 促进多种细胞尤其是肿瘤细胞的凋亡,其促凋亡作用是其作为抑癌候选基因的重要支持^[218];然而,另一方面,也有研究发现 NDRG2 在某些细胞中发挥抗凋亡的作用。Shen L 等在胰岛 beta 细胞中发现,NDRG2 可做为 Akt 的磷酸化底物参与 beta 细胞的存活和功能,下调 NDRG2 使游离脂肪酸引起的 beta 细胞凋亡增加^[219]。另外,在心肌细胞的缺血/再灌注模型中,也发现 NDRG2 基因沉默会导致胰岛素的抗凋亡作用减弱^[220]。因此,NDRG2 在凋亡和细胞损伤中的作用不能一概而论,可能随细胞种类和刺激方式的变化有完全不同的表现。本部分研究结果发现下调 NDRG2 可使 OGD 引起的星形胶质细胞凋亡减少,而上调 NDRG2 则可使 OGD 引起的星形胶质细胞凋亡加重,并阻断七氟烷预处理对凋亡的抑制作用,表明 NDRG2 在 OGD 所致星形胶质细胞损伤和七氟烷预处理减轻 OGD 损伤中发挥的是促凋亡的作用,抑制 NDRG2 相关的星形胶质细胞凋亡可能是七氟烷预处理诱导脑缺血耐受的关键作用

机制之一。

本课题还存在一些局限性。首先，我们仅选择了一个时间点（再灌注 24h）来观察 NDRG2 在七氟烷预处理神经保护效应中的作用及其机制。选择这个时间点的原因是再灌注后缺血半暗带区的 NDRG2 在 24h 达到高峰，原代培养星形胶质细胞 OGD 模型中也在复氧 24h 观察到 NDRG2 的表达高峰。然而 24h 的结果代表的是七氟烷预处理对缺血/再灌注急性期损伤的保护作用，NDRG2 是否参与七氟烷预处理的延迟期（再灌注 48~72h 及以后）保护作用还不明确，尚需进一步研究。其次，七氟烷预处理通过星形胶质细胞诱导脑缺血耐受的机制远比我们在原代培养星形胶质细胞中复杂。除了影响星形胶质细胞本身存活外，NDRG2 通过调节星形胶质细胞功能进而影响星形胶质细胞—神经元相互作用，可能是七氟烷预处理调控 NDRG 发挥神经保护作用更重要的机制。细胞实验不能模拟动物脑内细胞间复杂的相互作用关系。然而，在整体动物使用 siRNA 和质粒载体调控 NDRG2 表达难以达到令人满意的结果，因此将来需采用 NDRG2 转基因动物和基因敲除动物来获得更可靠的结果以明确 NDRG2 在脑缺血/再灌注损伤和神经保护中的作用。再次，本研究只关注了凋亡机制在 NDRG2 参与脑缺血/再灌注损伤和七氟烷神经保护作用中的角色，但事实上缺血/再灌注损伤过程中的重要机制还包括能量代谢障碍、谷氨酸兴奋性毒性、氧化应激、炎症反应等，因此还需要进行深入的研究探讨 NDRG2 是否参与脑缺血/再灌注的其他损伤机制，以及七氟烷预处理能否通过调控 NDRG2 介导的这些损伤机制发挥其神经保护作用。另外，NDRG2 尚存在磷酸化和去磷酸化修饰调节，如前文已提到在胰岛 beta 细胞中，NDRG2 可做为 Akt 的磷酸化底物参与 beta 细胞的存活和功能，NDRG2 磷酸化水平增加伴随 beta 细胞凋亡减少，而在肿瘤细胞中发现凋亡抑制与 NDRG2 含量下降有关，表明 NDRG2 磷酸化状态可能影响其功能状态，因此除 NDRG2 含量上调/下调外，还应关注 NDRG2 磷酸化水平改变在脑缺血/再灌注损伤和神经保护中的作用。

综合上述三部分实验结果，本课题从在体和离体两个角度证实单次七氟烷预处理可对预处理后急性期缺血/缺氧性损伤产生保护作用，观察了七氟烷预处理对缺血/再灌注后星形胶质细胞内 NDRG2 表达和分布的影响，进一步通过调控星形胶质细胞内 NDRG2 表达水平明确了 NDRG2 在缺血/再灌注损伤和七氟烷预处理神经保护效

应中的作用，并确定了星形胶质细胞内凋亡通路可能是 NDRG2 参与脑缺血/再灌注损伤和七氟烷保护作用的关键机制之一。本研究表明神经元并不是七氟烷等预处理措施神经保护作用的唯一靶点，深入阐明脑内其他支持细胞，如星形胶质细胞，在脑缺血/再灌注损伤中的作用机制及其与神经元的相互作用将为防治脑缺血损伤提供新的思路。

小 结

本研究以 SD 大鼠和原代培养星形胶质细胞为研究对象,采用 MCAO 和 OGD 分别构建在体和离体缺血/再灌注损伤模型,观察了单次七氟烷预处理的保护作用以及七氟烷预处理对缺血/再灌注后星形胶质细胞内 NDRG2 表达的影响;构建了特异性 NDRG2 siRNA 和 NDRG2 pEGFP-C1 质粒载体转染入原代培养星形胶质细胞对 NDRG2 进行基因沉默和过表达,探讨了 NDRG2 在缺血再灌注损伤和七氟烷预处理保护效应中的作用及其机制。本课题主要实验结果和研究结论如下:

1. 2.0%七氟烷预处理 1h, 间隔 2h 对 SD 大鼠进行 MCAO 缺血 120min, 再灌注 24h 大鼠的神经功能学评分改善, 脑梗死容积降低; 同样七氟烷预处理后, 原代培养星形胶质细胞进行 OGD 4h, 复氧 24h 发现细胞对 MTT 的摄取量增加, 培养上清液中 LDH 含量下降, 表明单次七氟烷预处理可减轻预处理后急性期进行的大鼠局灶性脑缺血损伤和原代培养星形胶质细胞 OGD 损伤。
2. 局灶性脑缺血和 OGD 后 24h, 缺血半暗带区和培养星形胶质细胞内 NDRG2 mRNA 和蛋白质含量均明显上升, 形态学观察到 NDRG2 在星形胶质细胞的细胞核内表达明显增加, 而七氟烷预处理可抑制缺血/再灌注后星形胶质细胞内 NDRG2 表达上调和核转位, 提示七氟烷预处理可能通过调控 NDRG2 表达发挥其神经保护作用。
3. 利用 NDRG2 特异性 siRNA 下调 NDRG2 表达, 使培养星形胶质细胞 OGD 后细胞活力改善, LDH 释放减少, 出现与七氟烷预处理类似的细胞保护作用; 转染 NDRG2 pEGFP-C1 过表达质粒载体上调 NDRG2 表达, 使培养星形胶质细胞 OGD 后细胞损伤进一步加重, 且可逆转七氟烷预处理的细胞保护作用, 表明 NDRG2 在缺血/再灌注中可能发挥促损伤的作用, 七氟烷预处理可能通过抑制其促损伤的作用诱导脑缺血耐受。
4. 七氟烷预处理抑制 MCAO 后缺血半暗带区和 OGD 后培养星形胶质细胞的 Caspase-3 活化, 降低 TUNEL 阳性细胞数目; NDRG2 基因沉默使培养星形胶质细胞 OGD 后 cleaved Caspase-3 表达下降, TUNEL 阳性细胞百分率减少, 即模拟了七氟烷预处理的抗凋亡作用; NDRG2 过表达使培养星形胶质细胞 OGD 后凋亡进

一步加重，且可阻断七氟烷预处理对细胞凋亡的抑制作用，表明 NDRG2 通过促进星形胶质细胞凋亡参与脑缺血/再灌注损伤，七氟烷预处理可抑制 NDRG2 相关的星形胶质细胞凋亡进而发挥其神经保护作用。

参考文献

- [1] Donnan G A, Fisher M, Macleod M, et al. Stroke[J]. Lancet, 2008, 371(9624): 1612-1623.
- [2] Liu M, Wu B, Wang W Z, et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(5): 456-464.
- [3] Lansberg M G, Bluhmki E, Thijs V N. Efficacy and safety of tissue plasminogen activator 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke: a metaanalysis[J]. Stroke, 2009, 40(7): 2438-2441.
- [4] Toyoda K, Fujii K, Kamouchi M, et al. Free radical scavenger, edaravone, in stroke with internal carotid artery occlusion[J]. Journal of Neurological Sciences, 2004, 221(1-2): 11-17.
- [5] Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(11): 1363-1368.
- [6] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124-1136.
- [7] Kitano H, Kirsch J R, Hurn P D, et al. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(6): 1108-1128.
- [8] Yang Q, Dong H, Deng J, et al. Sevoflurane preconditioning induces neuroprotection through reactive oxygen species-mediated up-regulation of antioxidant enzymes in rats[J]. Anesth Analg, 2011, 112(4): 931-937.
- [9] Codaccioni J L, Velly L J, Moubarik C, et al. Sevoflurane preconditioning against focal cerebral ischemia: inhibition of apoptosis in the face of transient improvement of neurological outcome[J]. Anesthesiology, 2009, 110(6): 1271-1278.
- [10] Kehl F, Payne R S, Roewer N, et al. Sevoflurane-induced preconditioning of rat brain in vitro and the role of KATP channels[J]. Brain Res, 2004, 1021(1): 76-81.
- [11] Toner C C, Connelly K, Whelpton R, et al. Effects of sevoflurane on dopamine, glutamate and aspartate release in an in vitro model of cerebral ischaemia[J]. Br J Anaesth, 2001, 86(4): 550-554.

- [12] Zhao Y, Rempe D A. Targeting astrocytes for stroke therapy[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 439-451.
- [13] Miyazaki H, Nakamura Y, Arai T, et al. Increase of glutamate uptake in astrocytes: a possible mechanism of action of volatile anesthetics[J]. *Anesthesiology*, 1997, 86(6): 1359-1366; discussion 1358A.
- [14] Karwacki Z, Kowianski P, Dziewiatkowski J, et al. The influence of sevoflurane on the reactivity of astrocytes in the course of the experimental intracerebral haemorrhage in rat[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(3): 455-469.
- [15] Romero A, Romero-Alejo E, Vasconcelos N, et al. Glial cell activation in the spinal cord and dorsal root ganglia induced by surgery in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 702(1-3): 126-134.
- [16] Takeichi T, Takarada-Iemata M, Hashida K, et al. The effect of NdrG2 expression on astroglial activation[J]. *Neurochem Int*, 2011, 59(1): 21-27.
- [17] Li L, Wang J, Shen X, et al. Expression and prognostic value of NDRG2 in human astrocytomas[J]. *J Neurol Sci*, 2011, 308(1-2): 77-82.
- [18] Mitchelmore C, Buchmann-Moller S, Rask L, et al. NDRG2: a novel Alzheimer's disease associated protein[J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 16(1): 48-58.
- [19] Araya-Callis C, Hiemke C, Abumaria N, et al. Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2012, 224(1): 209-222.
- [20] Herskowitz J H, Seyfried N T, Duong D M, et al. Phosphoproteomic analysis reveals site-specific changes in GFAP and NDRG2 phosphorylation in frontotemporal lobar degeneration[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(12): 6368-6379.
- [21] Li Y, Shen L, Cai L, et al. Spatial-temporal expression of NDRG2 in rat brain after focal cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Brain Res*, 2011, 1382: 252-258.
- [22] Li Y, Xu N, Cai L, et al. NDRG2 is a novel p53-associated regulator of apoptosis in C6-originated astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57130.
- [23] 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[J]. *Anesth Analg*, 2003, 96(1): 233-237, table of contents.
- [24] Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(5): 1172-1180.
- [25] Liu Y, Xiong L, Chen S, et al. Isoflurane tolerance against focal cerebral ischemia is attenuated by adenosine A1 receptor antagonists[J]. *Can J Anaesth*, 2006, 53(2): 194-201.
- [26] Li L, Zuo Z. Isoflurane preconditioning improves short-term and long-term neurological outcome after focal brain ischemia in adult rats[J]. *Neuroscience*, 2009, 164(2): 497-506.
- [27] Chi O Z, Hunter C, Liu X, et al. The effects of isoflurane pretreatment on cerebral blood flow, capillary permeability, and oxygen consumption in focal cerebral ischemia in rats[J]. *Anesth Analg*, 2010, 110(5): 1412-1418.
- [28] Bedirli N, Bagriacik E U, Emmez H, et al. Sevoflurane and isoflurane preconditioning provides neuroprotection by inhibition of apoptosis-related mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2012, 24(4): 336-344.
- [29] Kitano H, Young J M, Cheng J, et al. Gender-specific response to isoflurane preconditioning in focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(7): 1377-1386.
- [30] Zhang H P, 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[J]. *Anesth Analg*, 2010, 111(2): 506-514.
- [31] Zhang H P, Sun Y Y, Chen X M, et al. The neuroprotective effects of isoflurane preconditioning in a murine transient global cerebral ischemia-reperfusion model: the role of the Notch signaling pathway[J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(1): 191-204.
- [32] Blanck T J, Haile M, Xu F, et al. Isoflurane pretreatment ameliorates postischemic neurologic dysfunction and preserves hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in a canine cardiac arrest model[J]. *Anesthesiology*, 2000, 93(5): 1285-1293.
- [33] Bickler P E, Zhan X, Fahlman C S. Isoflurane preconditions hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation: role of intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinase signaling[J]. *Anesthesiology*, 2005, 103(3): 532-539.
- [34] Li Q F, Zhu Y S, Jiang H. Isoflurane preconditioning activates HIF-1 α , iNOS and Erk1/2

- and protects against oxygen-glucose deprivation neuronal injury[J]. *Brain Res*, 2008, 1245: 26-35.
- [35] Johnsen D, Murphy S J. Isoflurane preconditioning protects neurons from male and female mice against oxygen and glucose deprivation and is modulated by estradiol only in neurons from female mice[J]. *Neuroscience*, 2011, 199: 368-374.
- [36] Zuo Z, Wang Y, Huang Y. Isoflurane preconditioning protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against in vitro simulated ischemia-reperfusion through the activation of extracellular signal-regulated kinases pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 542(1-3): 84-91.
- [37] Tong L, Wu Z, Ran M, et al. The Role of SUMO-Conjugating Enzyme Ubc9 in the Neuroprotection of Isoflurane Preconditioning Against Ischemic Neuronal Injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2014.
- [38] Bickler P E, Fahlman C S. Expression of signal transduction genes differs after hypoxic or isoflurane preconditioning of rat hippocampal slice cultures[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(2): 258-266.
- [39] Wang S, Guo S X, Dai Z G, et al. Dual isoflurane-induced preconditioning improves neuroprotection in rat brain in vitro and the role of extracellular signal--regulated protein kinase[J]. *Chin Med Sci J*, 2011, 26(1): 36-42.
- [40] Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning reduces purkinje cell death in an in vitro model of rat cerebellar ischemia[J]. *Neuroscience*, 2003, 118(1): 99-106.
- [41] Shu Y, Patel S M, Pac-Soo C, et al. Xenon pretreatment attenuates anesthetic-induced apoptosis in the developing brain in comparison with nitrous oxide and hypoxia[J]. *Anesthesiology*, 2010, 113(2): 360-368.
- [42] Wang C, Jin Lee J, Jung H H, et al. Pretreatment with volatile anesthetics, but not with the nonimmobilizer 1,2-dichlorohexafluorocyclobutane, reduced cell injury in rat cerebellar slices after an in vitro simulated ischemia[J]. *Brain Res*, 2007, 1152: 201-208.
- [43] Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning decreases glutamate receptor overactivation-induced Purkinje neuronal injury in rat cerebellar slices[J]. *Brain Res*, 2005, 1054(2): 143-151.
- [44] Zhao P, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection that is inducible nitric

- oxide synthase-dependent in neonatal rats[J]. *Anesthesiology*, 2004, 101(3): 695-703.
- [45] Zhao P, Peng L, Li L, et al. Isoflurane preconditioning improves long-term neurologic outcome after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. *Anesthesiology*, 2007, 107(6): 963-970.
- [46] Mcauliffe J J, Joseph B, Vorhees C V. Isoflurane-delayed preconditioning reduces immediate mortality and improves striatal function in adult mice after neonatal hypoxia-ischemia[J]. *Anesth Analg*, 2007, 104(5): 1066-1077, tables of contents.
- [47] Mcauliffe J J, Loepke A W, Miles L, et al. Desflurane, isoflurane, and sevoflurane provide limited neuroprotection against neonatal hypoxia-ischemia in a delayed preconditioning paradigm[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(3): 533-546.
- [48] Sasaoka N, Kawaguchi M, Kawaraguchi Y, et al. Isoflurane exerts a short-term but not a long-term preconditioning effect in neonatal rats exposed to a hypoxic-ischaemic neuronal injury[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2009, 53(1): 46-54.
- [49] Wang Z P, Zhang Z H, Zeng Y M, et al. [Protective effect of sevoflurane preconditioning on oxygen-glucose deprivation injury in rat hippocampal slices: the role of mitochondrial K(ATP) channels][J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2006, 58(3): 201-206.
- [50] Payne R S, Akca O, Roewer N, et al. Sevoflurane-induced preconditioning protects against cerebral ischemic neuronal damage in rats[J]. *Brain Res*, 2005, 1034(1-2): 147-152.
- [51] Luo Y, Ma D, Jeong E, et al. Xenon and sevoflurane protect against brain injury in a neonatal asphyxia model[J]. *Anesthesiology*, 2008, 109(5): 782-789.
- [52] Velly L J, Canas P T, Guillet B A, et al. Early anesthetic preconditioning in mixed cortical neuronal-glia cell cultures subjected to oxygen-glucose deprivation: the role of adenosine triphosphate dependent potassium channels and reactive oxygen species in sevoflurane-induced neuroprotection[J]. *Anesth Analg*, 2009, 108(3): 955-963.
- [53] Ye Z, Guo Q, Wang E, et al. [Sevoflurane preconditioning induced delayed neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats][J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2009, 34(2): 152-157.
- [54] Ding Q, Wang Q, Deng J, et al. Sevoflurane preconditioning induces rapid ischemic tolerance against spinal cord ischemia/reperfusion through activation of extracellular signal-regulated

- kinase in rabbits[J]. *Anesth Analg*, 2009, 109(4): 1263-1272.
- [55] Li X Q, Cao X Z, Wang J, et al. Sevoflurane preconditioning ameliorates neuronal deficits by inhibiting microglial MMP-9 expression after spinal cord ischemia/reperfusion in rats[J]. *Mol Brain*, 2014, 7: 69.
- [56] Ye R, Yang Q, Kong X, et al. Sevoflurane preconditioning improves mitochondrial function and long-term neurologic sequelae after transient cerebral ischemia: role of mitochondrial permeability transition[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(9): 2685-2693.
- [57] Canas P T, Velly L J, Labrande C N, et al. Sevoflurane protects rat mixed cerebrocortical neuronal-glia cell cultures against transient oxygen-glucose deprivation: involvement of glutamate uptake and reactive oxygen species[J]. *Anesthesiology*, 2006, 105(5): 990-998.
- [58] Jung H H, Lee J J, Washington J M, et al. Inability of volatile anesthetics to inhibit oxygen-glucose deprivation-induced glutamate release via glutamate transporters and anion channels in rat corticostriatal slices[J]. *Brain Res*, 2008, 1227: 234-239.
- [59] Zhang H J, Wang Z P, Hu S Q, et al. [Neuroprotection of sevoflurane against the ischemia injury in hippocampal slices of rat][J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2008, 24(4): 426-429.
- [60] Engelhard K, Werner C, Hoffman W E, et al. The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats[J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(4): 1155-1161, table of contents.
- [61] Ye Z, Guo Q, Wang E. [Delayed neuroprotective effect of sevoflurane on the expression of NF-kappaB following transient focal ischemia-reperfusion in rats][J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2010, 35(3): 262-266.
- [62] Wang H, Lu S, Yu Q, et al. Sevoflurane preconditioning confers neuroprotection via anti-inflammatory effects[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 604-615.
- [63] Lin H F, Zhu Z R, Hu Z Y. [Protective effects of sevoflurane preconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats][J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, 89(41): 2943-2945.
- [64] Sigaut S, Jannier V, Rouelle D, et al. The preconditioning effect of sevoflurane on the oxygen glucose-deprived hippocampal slice: the role of tyrosine kinases and duration of ischemia[J]. *Anesth Analg*, 2009, 108(2): 601-608.

- [65] 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[J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(3): 549-562.
- [66] Shi H, Sun B L, Zhang J, et al. miR-15b suppression of Bcl-2 contributes to cerebral ischemic injury and is reversed by sevoflurane preconditioning[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12(3): 381-391.
- [67] Ye Z, Guo Q, Wang N, et al. Delayed neuroprotection induced by sevoflurane via opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and p38 MAPK phosphorylation[J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(2): 239-249.
- [68] Ye Z, Huang Y M, Wang E, et al. Sevoflurane-induced delayed neuroprotection involves mitoK(ATP) channel opening and PKC epsilon activation[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5049-5057.
- [69] Adamczyk S, Robin E, Simerabet M, et al. Sevoflurane pre- and post-conditioning protect the brain via the mitochondrial K ATP channel[J]. *Br J Anaesth*, 2010, 104(2): 191-200.
- [70] Bantel C, Maze M, Trapp S. Neuronal preconditioning by inhalational anesthetics: evidence for the role of plasmalemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(5): 986-995.
- [71] Chen Y, Nie H, Tian L, et al. Sevoflurane preconditioning-induced neuroprotection is associated with Akt activation via carboxy-terminal modulator protein inhibition[J]. *Br J Anaesth*, 2015, 114(2): 327-335.
- [72] Wang S, Dai Z G, Dong X W, et al. Duplicate preconditioning with sevoflurane in vitro improves neuroprotection in rat brain via activating the extracellular signal-regulated protein kinase[J]. *Neurosci Bull*, 2010, 26(6): 437-444.
- [73] Wang J, Lei B, Popp S, et al. Sevoflurane immediate preconditioning alters hypoxic membrane potential changes in rat hippocampal slices and improves recovery of CA1 pyramidal cells after hypoxia and global cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2007, 145(3): 1097-1107.
- [74] Wang J, Meng F, Cottrell J E, et al. Metabotropic actions of the volatile anaesthetic sevoflurane increase protein kinase M synthesis and induce immediate preconditioning protection of rat hippocampal slices[J]. *J Physiol*, 2012, 590(Pt 16): 4093-4107.

- [75] Tong L, Cai M, Huang Y, et al. Activation of K(2)P channel-TREK1 mediates the neuroprotection induced by sevoflurane preconditioning[J]. *Br J Anaesth*, 2014, 113(1): 157-167.
- [76] 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[J]. *Anesthesiology*, 2012, 117(5): 996-1005.
- [77] Yu Q, Chu M, Wang H, et al. Sevoflurane preconditioning protects blood-brain-barrier against brain ischemia[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 978-988.
- [78] Esenther B R, Ge Z, Meng F, et al. Sevoflurane preconditioning attenuates the fall in adenosine triphosphate levels, but does not alter the changes in sodium and potassium levels during hypoxia in rat hippocampal slices[J]. *Anesthesiology*, 2013, 119(1): 119-128.
- [79] Anderson C M, Swanson R A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions[J]. *Glia*, 2000, 32(1): 1-14.
- [80] Zelenina M. Regulation of brain aquaporins[J]. *Neurochem Int*, 2010, 57(4): 468-488.
- [81] Pasantes-Morales H, Vazquez-Juarez E. Transporters and channels in cytotoxic astrocyte swelling[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(11): 2379-2387.
- [82] Abbott N J, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(1): 41-53.
- [83] Anderson C M, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation[J]. *Trends Neurosci*, 2003, 26(7): 340-344; author reply 344-345.
- [84] Gordon G R, Mulligan S J, Macvicar B A. Astrocyte control of the cerebrovasculature[J]. *Glia*, 2007, 55(12): 1214-1221.
- [85] Trendelenburg G, Dirnagl U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning[J]. *Glia*, 2005, 50(4): 307-320.
- [86] Araque A, Parpura V, Sanzgiri R P, et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner[J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(5): 208-215.
- [87] Orkand R K, Nicholls J G, Kuffler S W. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia[J]. *J Neurophysiol*, 1966, 29(4): 788-806.

- [88] Kofuji P, Newman E A. Potassium buffering in the central nervous system[J]. *Neuroscience*, 2004, 129(4): 1045-1056.
- [89] Cahoy J D, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(1): 264-278.
- [90] Skatchkov S N, Eaton M J, Shuba Y M, et al. Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Muller) glial cells[J]. *Glia*, 2006, 53(3): 266-276.
- [91] Kimelberg H K. Active accumulation and exchange transport of chloride in astroglial cells in culture[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 646(1): 179-184.
- [92] Pellerin L, Magistretti P J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons[J]. *Neuroscientist*, 2004, 10(1): 53-62.
- [93] Amiry-Moghaddam M, Ottersen O P. The molecular basis of water transport in the brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(12): 991-1001.
- [94] Hertz L, Peng L, Dienel G A. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(2): 219-249.
- [95] Rothstein J D, Dykes-Hoberg M, Pardo C A, et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate[J]. *Neuron*, 1996, 16(3): 675-686.
- [96] Minelli A, Brecha N C, Karschin C, et al. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex[J]. *J Neurosci*, 1995, 15(11): 7734-7746.
- [97] Minelli A, Debiasi S, Brecha N C, et al. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex[J]. *J Neurosci*, 1996, 16(19): 6255-6264.
- [98] Zafra F, Poyatos I, Gimenez C. Neuronal dependency of the glycine transporter GLYT1 expression in glial cells[J]. *Glia*, 1997, 20(2): 155-162.
- [99] Nishikawa Y, Sasaki A, Kuraishi Y. Blockade of glycine transporter (GlyT) 2, but not GlyT1, ameliorates dynamic and static mechanical allodynia in mice with herpetic or postherpetic

- pain[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112(3): 352-360.
- [100] Warskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, et al. Phenotype of the taurine transporter knockout mouse[J]. *Methods Enzymol*, 2007, 428: 439-458.
- [101] Abbott N J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability[J]. *J Anat*, 2002, 200(6): 629-638.
- [102] Pardridge W M. Drug delivery to the brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(7): 713-731.
- [103] Gordon G R, Choi H B, Rungta R L, et al. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles[J]. *Nature*, 2008, 456(7223): 745-749.
- [104] Koehler R C, Roman R J, Harder D R. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow[J]. *Trends Neurosci*, 2009, 32(3): 160-169.
- [105] Chen Y, Swanson R A. Astrocytes and brain injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(2): 137-149.
- [106] Goldberg M P, Choi D W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury[J]. *J Neurosci*, 1993, 13(8): 3510-3524.
- [107] Almeida A, Delgado-Esteban M, Bolanos J P, et al. Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture[J]. *J Neurochem*, 2002, 81(2): 207-217.
- [108] Li Y, Chopp M, Zhang Z G, et al. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kDa heat shock protein[J]. *J Neurol Sci*, 1995, 128(2): 134-142.
- [109] Smith G M, Strunz C. Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes[J]. *Glia*, 2005, 52(3): 209-218.
- [110] Del Zoppo G J. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 972-982.
- [111] Wang W, Redecker C, Yu Z Y, et al. Rat focal cerebral ischemia induced astrocyte proliferation and delayed neuronal death are attenuated by cyclin-dependent kinase inhibition[J]. *J Clin Neurosci*, 2008, 15(3): 278-285.

- [112] Bidmon H J, Jancsik V, Schleicher A, et al. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia[J]. *Neuroscience*, 1998, 82(2): 397-420.
- [113] Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia[J]. *Glia*, 2005, 50(4): 281-286.
- [114] Kaur C, Ling E A. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2008, 5(1): 71-81.
- [115] Swanson R A, Ying W, Kauppinen T M. Astrocyte influences on ischemic neuronal death[J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4(2): 193-205.
- [116] Nawashiro H, Brenner M, Fukui S, et al. High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(7): 1040-1044.
- [117] Li L, Lundkvist A, Andersson D, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(3): 468-481.
- [118] Kinoshita A, Yamada K, Kohmura E, et al. Effect of astrocyte-derived factors on ischemic brain edema induced by rat MCA occlusion[J]. *APMIS*, 1990, 98(9): 851-857.
- [119] Boycott H E, Dallas M, Boyle J P, et al. Hypoxia suppresses astrocyte glutamate transport independently of amyloid formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364(1): 100-104.
- [120] Dallas M, Boycott H E, Atkinson L, et al. Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(15): 3946-3955.
- [121] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Di Sciacca R, et al. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(33): 3574-3589.
- [122] Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions[J]. *Prog Neurobiol*, 1998, 56(2): 149-171.
- [123] Clark W M, Lutsep H L. Potential of anticytokine therapies in central nervous system ischaemia[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(2): 227-237.
- [124] Kim J S. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases[J]. *J Neurol Sci*, 1996, 137(2): 69-78.
- [125] Sofroniew M V. Astrocyte failure as a cause of CNS dysfunction[J]. *Mol Psychiatry*, 2000,

- 5(3): 230-232.
- [126] Ali C, Nicole O, Docagne F, et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(6): 956-966.
- [127] Pradillo J M, Fernandez-Lopez D, Garcia-Yebenes I, et al. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning[J]. *J Neurochem*, 2009, 109(1): 287-294.
- [128] Suzuki M, Tabuchi M, Ikeda M, et al. Concurrent formation of peroxynitrite with the expression of inducible nitric oxide synthase in the brain during middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats[J]. *Brain Res*, 2002, 951(1): 113-120.
- [129] Sugawara T, Chan P H. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5(5): 597-607.
- [130] Mitrovic B, Ignarro L J, Vinters H V, et al. Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes[J]. *Neuroscience*, 1995, 65(2): 531-539.
- [131] Dringen R, Gutterer J M, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(16): 4912-4916.
- [132] Lindenau J, Noack H, Possel H, et al. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS[J]. *Glia*, 2000, 29(1): 25-34.
- [133] Giordano G, Kavanagh T J, Costa L G. Mouse cerebellar astrocytes protect cerebellar granule neurons against toxicity of the polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture DE-71[J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(2): 326-329.
- [134] Wang X F, Cynader M S. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione[J]. *J Neurochem*, 2000, 74(4): 1434-1442.
- [135] Cho I H, Im J Y, Kim D, et al. Protective effects of extracellular glutathione against Zn²⁺-induced cell death in vitro and in vivo[J]. *J Neurosci Res*, 2003, 74(5): 736-743.
- [136] Hoda M N, Singh I, Singh A K, et al. Reduction of lipoxidative load by secretory phospholipase A2 inhibition protects against neurovascular injury following experimental stroke in rat[J]. *J Neuroinflammation*, 2009, 6: 21.

- [137] Rong Z T, Gong X J, Sun H B, et al. Protective effects of oleanolic acid on cerebral ischemic damage in vivo and H₂O₂-induced injury in vitro[J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(1): 78-85.
- [138] Liu X H, Kato H, Nakata N, et al. An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 1993, 625(1): 29-37.
- [139] Kondo T, Reaume A G, Huang T T, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(11): 4180-4189.
- [140] Chan P H, Kawase M, Murakami K, et al. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(20): 8292-8299.
- [141] Yang G, Chan P H, Chen J, et al. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 1994, 25(1): 165-170.
- [142] Rose R C, Bode A M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate[J]. *FASEB J*, 1993, 7(12): 1135-1142.
- [143] Huang J, Agus D B, Winfree C J, et al. Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(20): 11720-11724.
- [144] Papadopoulos M C, Verkman A S. Potential utility of aquaporin modulators for therapy of brain disorders[J]. *Prog Brain Res*, 2008, 170: 589-601.
- [145] Nielsen S, Nagelhus E A, Amiry-Moghaddam M, et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(1): 171-180.
- [146] Manley G T, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke[J]. *Nat Med*, 2000, 6(2): 159-163.
- [147] Benfenati V, Nicchia G P, Svelto M, et al. Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes[J]. *J Neurochem*, 2007, 100(1): 87-104.

- [148] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(23): 10291-10301.
- [149] Morishita E, Masuda S, Nagao M, et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death[J]. *Neuroscience*, 1997, 76(1): 105-116.
- [150] Sakanaka M, Wen T C, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(8): 4635-4640.
- [151] Bernaudin M, Marti H H, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19(6): 643-651.
- [152] Siren A L, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(7): 4044-4049.
- [153] Marti H H, Gassmann M, Wenger R H, et al. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(2): 416-418.
- [154] Rempe D A, Lelli K M, Vangeison G, et al. In cultured astrocytes, p53 and MDM2 do not alter hypoxia-inducible factor-1alpha function regardless of the presence of DNA damage[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(22): 16187-16201.
- [155] Jin K L, Mao X O, Greenberg D A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(18): 10242-10247.
- [156] Beck H, Plate K H. Angiogenesis after cerebral ischemia[J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(5): 481-496.
- [157] Zhao B Q, Wang S, Kim H Y, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke[J]. *Nat Med*, 2006, 12(4): 441-445.
- [158] Wardas J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS[J]. *Pol J Pharmacol*, 2002, 54(4): 313-326.
- [159] Zhang J, Li F, Liu X, et al. The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(51): 39159-39168.
- [160] Murray J T, Campbell D G, Morrice N, et al. Exploitation of KESTREL to identify NDRG

- family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3[J]. *Biochem J*, 2004, 384(Pt 3): 477-488.
- [161] Burchfield J G, Lennard A J, Narasimhan S, et al. Akt mediates insulin-stimulated phosphorylation of NdrG2: evidence for cross-talk with protein kinase C theta[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18623-18632.
- [162] Chen W Q, Hoeger H, Diao W F, et al. Mass spectrometrical characterization of NDRG2 protein (N-myc-downstream regulated gene 2) and description of two novel phosphorylation sites[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(11): 1969-1977.
- [163] Qu X, Zhai Y, Wei H, et al. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family[J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 229(1-2): 35-44.
- [164] Hu X L, Liu X P, Deng Y C, et al. Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 325(1): 67-76.
- [165] Park M Y, Choi S C, Lee H S, et al. A quantitative analysis of N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG 2) in human tissues and cell lysates by reverse-phase protein microarray[J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 387(1-2): 84-89.
- [166] Hu X L, Yao L B, Zhang Y Q, et al. [Distribution characteristic of NDRG2 expression in human fetal tissues.][J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2006, 58(4): 331-336.
- [167] Shen L, Zhao Z Y, Wang Y Z, et al. Immunohistochemical detection of NdrG2 in the mouse nervous system[J]. *Neuroreport*, 2008, 19(9): 927-931.
- [168] Wu G Q, Liu X P, Wang L F, et al. [Induction of apoptosis of HepG2 cells by NDRG2][J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2003, 19(4): 357-360.
- [169] Liao H, Wu Z, Huang X, et al. NMyC downstreamregulated gene 2 suppresses proliferation and induces oncosis of OSRC2 human renal cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1240-1245.
- [170] Yang J, Li Y, Wu L, et al. NDRG2 in rat liver regeneration: role in proliferation and apoptosis[J]. *Wound Repair Regen*, 2010, 18(5): 524-531.
- [171] Li L, Qin X, Shi M, et al. Regulation of histone acetylation by NDRG2 in glioma cells[J]. *J Neurooncol*, 2012, 106(3): 485-492.

- [172] Liu N, Wang L, Li X, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(16): 5335-5349.
- [173] Lee D C, Kang Y K, Kim W H, et al. Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4210-4220.
- [174] Hwang J, Kim Y, Kang H B, et al. Crystal structure of the human N-Myc downstream-regulated gene 2 protein provides insight into its role as a tumor suppressor[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(14): 12450-12460.
- [175] Liang Z L, Kang K, Yoon S, et al. NDRG2 is involved in the oncogenic properties of renal cell carcinoma and its loss is a novel independent poor prognostic factor after nephrectomy[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(8): 2763-2772.
- [176] Tao Y, Guo Y, Liu W, et al. AKT inhibitor suppresses hyperthermia-induced NdrG2 phosphorylation in gastric cancer cells[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(4): 394-404.
- [177] Kim M J, Lim J, Yang Y, et al. N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) suppresses the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells via STAT3/Snail signaling[J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(1): 33-42.
- [178] Lulis E A, Watson M A, Chicoine M R, et al. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7121-7126.
- [179] Zheng J, Li Y, Yang J, et al. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 251:251-259.
- [180] Ma J J, Kong L M, Liao C G, et al. Suppression of MMP-9 activity by NDRG2 expression inhibits clear cell renal cell carcinoma invasion[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5): 3306-3313.
- [181] Song S P, Zhang S B, Liu R, et al. NDRG2 down-regulation and CD24 up-regulation promote tumor aggravation and poor survival in patients with gallbladder carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1879-1885.
- [182] Kim Y J, Kang H B, Yim H S, et al. NDRG2 positively regulates E-cadherin expression and prolongs overall survival in colon cancer patients[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(4): 1890-1898.
- [183] Qiang S, Du Z F, Huang M. Adenovirus-mediated NDRG2 inhibits the proliferation of human renal cell carcinoma cell line OS-RC-2 in vitro[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(11):

- 873-878.
- [184] Zhang Z G, Li G, Feng D Y, et al. Overexpression of NDRG2 can inhibit neuroblastoma cell proliferation through negative regulation by CYR61[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(1): 239-244.
- [185] Kim Y J, Yoon S Y, Kim J T, et al. NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/beta-catenin signaling in human colon carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(4): 598-605.
- [186] Liu X, Niu T, Liu X, et al. Microarray profiling of HepG2 cells ectopically expressing NDRG2[J]. *Gene*, 2012, 503(1): 48-55.
- [187] Kim H S, Kim M J, Lim J, et al. NDRG2 overexpression enhances glucose deprivation-mediated apoptosis in breast cancer cells via inhibition of the LKB1-AMPK pathway[J]. *Genes Cancer*, 2014, 5(5-6): 175-185.
- [188] Park Y, Shon S K, Kim A, et al. SOCS1 induced by NDRG2 expression negatively regulates STAT3 activation in breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(2): 361-367.
- [189] Kim A, Kim M J, Yang Y, et al. Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(6): 927-936.
- [190] Takahashi K, Saitoh A, Yamada M, et al. Dexamethasone indirectly induces NdrG2 expression in rat astrocytes[J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(1): 160-166.
- [191] Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, et al. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3393.
- [192] Yang J, Zheng J, Wu L, et al. NDRG2 ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting the TGF-beta1/Smad pathway and altering the MMP2/TIMP2 ratio in rats[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27710.
- [193] Li Y, Yang J, Li S, et al. N-myc downstream-regulated gene 2, a novel estrogen-targeted gene, is involved in the regulation of Na⁺/K⁺-ATPase[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(37): 32289-32299.

- [194] Li Y, Liu C, Hou W, et al. Retrograde ductal administration of the adenovirus-mediated NDRG2 gene leads to improved sialaden hypofunction in estrogen-deficient rats[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(5): 908-918.
- [195] Nichols N R. Ndr2, a novel gene regulated by adrenal steroids and antidepressants, is highly expressed in astrocytes[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1007: 349-356.
- [196] Wielputz M O, Lee I H, Dinudom A, et al. (NDRG2) stimulates amiloride-sensitive Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and fisher rat thyroid cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(38): 28264-28273.
- [197] Boulkroun S, Le Moellic C, Blot-Chabaud M, et al. Expression of androgen receptor and androgen regulation of NDRG2 in the rat renal collecting duct[J]. *Pflugers Arch*, 2005, 451(2): 388-394.
- [198] Guo Y, Ma J, Wu L, et al. Hyperthermia-induced NDRG2 upregulation inhibits the invasion of human hepatocellular carcinoma via suppressing ERK1/2 signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61079.
- [199] Wang L, Liu N, Yao L, et al. NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 21(1-3): 239-250.
- [200] Liu S, Yang P, Kang H, et al. NDRG2 induced by oxidized LDL in macrophages antagonizes growth factor productions via selectively inhibiting ERK activation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(2): 106-113.
- [201] Langhi C, Pedraz-Cuesta E, Donate Y, et al. Regulation of N-Myc downstream regulated gene 2 by bile acids[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(1): 102-109.
- [202] Foletta V C, Brown E L, Cho Y, et al. Ndr2 is a PGC-1alpha/ERRalpha target gene that controls protein synthesis and expression of contractile-type genes in C2C12 myotubes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3112-3123.
- [203] Okuda T, Kokame K, Miyata T. Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system[J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56(2): 175-182.
- [204] Flugge G, Araya-Callis C, Garea-Rodriguez E, et al. NDRG2 as a marker protein for brain astrocytes[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(1): 31-41.
- [205] Takarada-Iemata M, Kezuka D, Takeichi T, et al. Deletion of N-myc downstream-regulated

- gene 2 attenuates reactive astrogliosis and inflammatory response in a mouse model of cortical stab injury[J]. *J Neurochem*, 2014, 130(3): 374-387.
- [206] Takahashi K, Yamada M, Ohata H, et al. Ndr2 promotes neurite outgrowth of NGF-differentiated PC12 cells[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 388(3): 157-162.
- [207] Liu L, Shi M, Wang L, et al. Ndr2 expression in neurogenic germinal zones of embryonic and postnatal mouse brain[J]. *J Mol Histol*, 2012, 43(1): 27-35.
- [208] Deng Y, Yao L, Chau L, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation[J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(3): 342-347.
- [209] Tepel M, Roerig P, Wolter M, et al. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(9): 2080-2086.
- [210] Li W, Chu D, Chu X, et al. Decreased expression of NDRG2 is related to poor overall survival in patients with glioma[J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(11): 1534-1537.
- [211] Wang F, Zhong H, Li X, et al. Electroacupuncture attenuates reference memory impairment associated with astrocytic NDRG2 suppression in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 305-313.
- [212] Zuo Z F, Wang W, Niu L, et al. RU486 (mifepristone) ameliorates cognitive dysfunction and reverses the down-regulation of astrocytic N-myc downstream-regulated gene 2 in streptozotocin-induced type-1 diabetic rats[J]. *Neuroscience*, 2011, 190: 156-165.
- [213] Takahashi K, Yamada M, Ohata H, et al. Expression of Ndr2 in the rat frontal cortex after antidepressant and electroconvulsive treatment[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2005, 8(3): 381-389.
- [214] Yang Q, Dong H, Deng J, et al. Sevoflurane preconditioning induces neuroprotection through reactive oxygen species-mediated up-regulation of antioxidant enzymes in rats[J]. *Anesth Analg*, 2011, 112(4): 931-937.
- [215] Barreto G, White R E, Ouyang Y, et al. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke[J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2011, 11(2): 164-173.
- [216] Kimelberg H K. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view[J]. *Neuroscientist*, 2010, 16(1): 79-106.

- [217] Liu N, Wang L, Li X, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(16): 5335-5349.
- [218] Yao L, Zhang J, Liu X. NDRG2: a Myc-repressed gene involved in cancer and cell stress[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(7): 625-635.
- [219] Shen L, Liu X, Hou W, et al. NDRG2 is highly expressed in pancreatic beta cells and involved in protection against lipotoxicity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(8): 1371-1381.
- [220] Sun Z, Tong G, Ma N, et al. NDRG2: a newly identified mediator of insulin cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(3): 341.

附 录

Inhibition of N-myc Downstream-regulated Gene-2 Is Involved in an Astrocyte-specific Neuroprotection Induced by Sevoflurane Preconditioning

Xin Li, M.D., Peng Luo, M.D., Ph.D., Feng Wang, M.D., Ph.D., Qianzi Yang, M.D., Ph.D., Yan Li, M.D., Ph.D., Mingming Zhao, M.D., Shiquan Wang, M.S., Qiang Wang, M.D., Ph.D., Lize Xiong, M.D., Ph.D.

ABSTRACT

Background: Mechanism of sevoflurane preconditioning-induced cerebral ischemic tolerance is unclear. This study investigates the role of N-myc downstream-regulated gene-2 (NDRG2) in the neuroprotection of sevoflurane preconditioning in ischemic model both *in vivo* and *in vitro*.

Methods: At 2 h after sevoflurane (2%) preconditioning for 1 h, rats were subjected to middle cerebral artery occlusion for 120 min. Neurobehavioral scores (n = 10), infarct volumes (n = 10), cellular apoptosis (n = 6), and NDRG2 expression (n = 6) were determined at 24 h after reperfusion. *In vitro*, cultured astrocytes were exposed to oxygen-glucose deprivation for 4 h. Cellular viability, cytotoxicity, apoptosis, and NDRG2 expression (n = 6) were evaluated in the presence or absence of NDRG2-specific small interfering RNA or NDRG2 overexpression plasmid.

Results: Sevoflurane preconditioning decreased apoptosis (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling-positive cells reduced to $31.2 \pm 5.3\%$ and cleaved Caspase-3 reduced to 1.42 ± 0.21 fold) and inhibited NDRG2 expression (1.28 ± 0.15 fold) and nuclear translocation (2.21 ± 0.29 fold) in ischemic penumbra. Similar effects were observed in cultured astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation. NDRG2 knockdown by small interfering RNA attenuated oxygen-glucose deprivation-induced injury (cell viability increased to $80.5 \pm 4.1\%$; lactate dehydrogenase release reduced to $30.5 \pm 4.0\%$) and cellular apoptosis (cleaved Caspase-3 reduced to 1.55 ± 0.21 fold; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling-positive cells reduced to $18.2 \pm 4.3\%$), whereas NDRG2 overexpression reversed the protective effects of sevoflurane preconditioning. All the data are presented as mean \pm SD.

Conclusion: Sevoflurane preconditioning inhibits NDRG2 up-regulation and nuclear translocation in astrocytes to induce cerebral ischemic tolerance *via* antiapoptosis, which represents one new mechanism of sevoflurane preconditioning and provides a novel target for neuroprotection. (ANESTHESIOLOGY 2014; 121:549-62)

SEVOFLURANE is a widely used inhalational anesthetic in clinical practice. Accumulating preclinical evidences have demonstrated that preconditioning with volatile anesthetics, such as sevoflurane, could induce ischemic tolerance both *in vitro* and *in vivo*.^{1,2} The mechanisms underlying sevoflurane preconditioning were associated with inhibition of apoptosis,³ activation of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels,⁴ reduction of excitatory amino acids,⁵ and many more. However, the mechanism is not fully understood.

As the most abundant cells in central nervous system, astrocytes have crucial roles in regulating neuronal death and survival after cerebral ischemia.⁶ Thus, astrocytes may be the potential targets for ischemic tolerance induced by precondition strategy. Previous studies showed that sevoflurane could increase the glutamate uptake of astrocytes under physiological circumstance⁷ and delay the activation of astrocytes under different pathological conditions.^{8,9} In this study, we focused on role of the indispensable

What We Already Know about This Topic

- The mechanisms of anesthetic-induced preconditioning against cerebral ischemia remain unclear but are crucial to optimizing neuroprotection strategies
- N-myc downstream-regulated gene-2 is an astrocytic protein implicated in ischemia-induced neuronal apoptosis

What This Article Tells Us That Is New

- Using *in vivo* and *in vitro* models of ischemia, sevoflurane preconditioning reduced astrocytic N-myc downstream-regulated gene-2 (NDRG2) expression and neuronal apoptosis, which was counteracted by NDRG2 overexpression
- Reduction of astrocytic NDRG2 expression by sevoflurane preconditioning is a novel astrocyte-mediated mechanism for anesthetic neuroprotection

astrocytes in the neuroprotective effect induced by sevoflurane preconditioning.

N-myc downstream-regulated gene-2 (NDRG2) is one of the special genes that mainly expresses and plays its function in astrocyte rather than neuron of the adult brain.¹⁰

The first two authors contributed equally to this work.

Submitted for publication May 19, 2013. Accepted for publication April 14, 2014. From the Department of Anesthesiology (X.L., F.W., Q.Y., Y.L., S.W., Q.W., L.X.) and Department of Neurosurgery (P.L., M.Z.), Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, China; and Department of Anesthesiology, Shaanxi Provincial Maternal and Child Health Hospital, Xi'an, China (Y.L.).

Copyright © 2014, the American Society of Anesthesiologists, Inc. Lippincott Williams & Wilkins. Anesthesiology 2014; 121:549-62

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This chapter was originally published in the book *International Review of Neurobiology*, Vol. 111 published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues who know you, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

From Xin Li, Qiang Wang, Acupuncture Therapy for Stroke Patients. In Bai-Yun Zeng, Kaicun Zhao, Fan-Rong Liang, editors: *International Review of Neurobiology*, Vol. 111, Burlington: Academic Press, 2013, pp. 159-179.

ISBN: 978-0-12-411545-3
© Copyright 2013 Elsevier Inc.
Academic Press

Review Article

Electroacupuncture Pretreatment as a Novel Avenue to Protect Brain against Ischemia and Reperfusion Injury

Xin Li,¹ Peng Luo,² Qiang Wang,¹ and Lize Xiong¹

¹ Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 127 Changle West Road, Shaanxi, Xi'an 710032, China

² Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 127 Changle West Road, Shaanxi, Xi'an 710032, China

Correspondence should be addressed to Qiang Wang, wangqiang@fmmu.edu.cn and Lize Xiong, mzkxiz@126.com

Received 23 November 2011; Accepted 8 February 2012

Academic Editor: Vitaly Napadow

Copyright © 2012 Xin Li et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Electroacupuncture (EA) pretreatment is a recent observation which has been shown to induce ischemic tolerance mimicking the ischemic pretreatment, suggesting that EA pretreatment may be a promising preventive strategy for the patients with high risk of acute ischemia/reperfusion injury. It was first described in the brain, then in the heart where EA stimulation at acupoint prior to ischemia led to neuroprotection and myocardial protection and induced rapid and delayed ischemic tolerance. Then the optimal parameters and acupoint specificity of EA pretreatment to induce protective effect were proved. Many studies have shown that protective mechanisms of EA pretreatment may involve a series of regulatory molecular pathways including activity enhancement of antioxidant, regulation of the endocannabinoid system, involvement of *beta*-adrenergic receptor, and postreceptor signaling pathway, inhibition of apoptosis. Recently, the neuroprotective and cardioprotective effect of EA pretreatment had been demonstrated in patients undergoing craniocerebral tumor resection or heart valve replacement surgery. Thus, the purpose of this paper is to collect the evidence for the neuroprotective effect of EA pretreatment, to summarize the proposed protective mechanisms of EA pretreatment, and to discuss the possibility of EA pretreatment as a new preventive strategy for patients with high risk of ischemia in clinic.

1. Introduction

Stroke is the second most common cause of death and results in a large number of people with disability worldwide. Strokes are either ischemic or hemorrhagic, but more than 80% of stroke cases are caused by cerebral ischemia [1]. Although many neuroprotective agents have been proved to reduce infarction volume and improve neurological recovery in basic research with animal models of stroke, few of them show effects in clinical trials [2, 3]. Moreover, most of the currently used pharmacotherapies are focused on treatment after ischemia, such as tissue plasminogen activator (t-PA), to remove the thrombus and reestablish blood perfusion in ischemic region. Although t-PA facilitates the revascularization when given at the early stage (up to 3 h) after ischemia, the safety and efficacy of t-PA at late stage (beyond 3.5 h) remain controversial [4]. The neuroprotective agent Edaravone, a free radical scavenger, has been approved

internationally to treat cerebral ischemia recently. However, it can neither stop the process of infarction or edema after the stroke, nor improve the neurological outcomes of survivals [5]. Although there are some effective drugs like antiplatelets and anticoagulants to prevent stroke, the possibility of causing hemorrhage has limited the application of these drugs. Therefore, it is a huge and urgent medical need to develop novel and rational strategies aimed at preventing ischemia/reperfusion (I/R) injury as well as reducing impairments caused by I/R.

The phenomenon of pretreatment induced ischemic tolerance provides a new idea for the prevention of I/R injury. The pretreatment effect is that a brief exposure to sublethal or noninjurious stimuli can increase resistance to the subsequent prolonged and lethal damage [6]. There are various kinds of pretreatment measures, such as ischemia (regional or remote), hypoxia, endotoxin, cytokines, and anesthetics.

RESEARCH

Open Access

Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemic injury through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated inhibition of high-mobility group box 1 release in rats

Qiang Wang^{*†}, Feng Wang[†], Xin Li[†], Qianzi Yang, Xuying Li, Ning Xu, Yi Huang, Qiaomei Zhang, Xingchun Gou, Shaoyang Chen and Lize Xiong^{*}

Abstract

Background: We have previously reported that electroacupuncture (EA) pretreatment induced tolerance against cerebral ischemic injury, but the mechanisms underlying this effect of EA are unknown. In this study, we assessed the effect of EA pretreatment on the expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ nAChR), using the ischemia-reperfusion model of focal cerebral ischemia in rats. Further, we investigated the role of high mobility group box 1 (HMGB1) in neuroprotection mediated by the $\alpha 7$ nAChR and EA.

Methods: Rats were treated with EA at the acupoint "Baihui (GV 20)" 24 h before focal cerebral ischemia which was induced for 120 min by middle cerebral artery occlusion. Neurobehavioral scores, infarction volumes, neuronal apoptosis, and HMGB1 levels were evaluated after reperfusion. The $\alpha 7$ nAChR agonist PHA-543613 and the antagonist α -bungarotoxin (α -BGT) were used to investigate the role of the $\alpha 7$ nAChR in mediating neuroprotective effects. The roles of the $\alpha 7$ nAChR and HMGB1 release in neuroprotection were further tested in neuronal cultures exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD).

Results: Our results showed that the expression of $\alpha 7$ nAChR was significantly decreased after reperfusion. EA pretreatment prevented the reduction in neuronal expression of $\alpha 7$ nAChR after reperfusion in the ischemic penumbra. Pretreatment with PHA-543613 afforded neuroprotective effects against ischemic damage. Moreover, EA pretreatment reduced infarct volume, improved neurological outcome, inhibited neuronal apoptosis and HMGB1 release following reperfusion, and the beneficial effects were attenuated by α -BGT. The HMGB1 levels in plasma and the penumbra brain tissue were correlated with the number of apoptotic neurons in the ischemic penumbra. Furthermore, OGD in cultured neurons triggered HMGB1 release into the culture medium, and this effect was efficiently suppressed by PHA-543,613. Pretreatment with α -BGT reversed the inhibitory effect of PHA-543,613 on HMGB1 release.

Conclusion: These data demonstrate that EA pretreatment strongly protects the brain against transient cerebral ischemic injury, and inhibits HMGB1 release through $\alpha 7$ nAChR activation in rats. These findings suggest the novel potential for stroke interventions harnessing the anti-inflammatory effects of $\alpha 7$ nAChR activation, through acupuncture or pharmacological strategies.

Keywords: $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, Cerebral ischemia, Electroacupuncture, Pretreatment, High-mobility group box 1

* Correspondence: wangqiang@fmmu.edu.cn; lize.xiong@hotmail.com

† Contributed equally

Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China



个人简历和研究成果

姓名：李新

性别：女

民族：汉

出生日期：1984/07/29

籍贯：四川

政治面貌：党员

学习经历（按时间倒排序）：

2012/9至今，第四军医大学西京医院麻醉科，博士研究生，导师：熊利泽 教授

2009/9—2012/6，第四军医大学西京医院麻醉科，硕士研究生，导师：熊利泽 教授

2004/9—2009/6，第四军医大学，临床医学五年制，本科

在读期间发表文章：

1. **Li X**, Luo P, Wang F, Yang Q, Li Y, Zhao M, Wang S, Wang Q, Xiong L. Inhibition of N-myc Downstream-regulated Gene-2 Is Involved in an Astrocyte-specific Neuroprotection Induced by Sevoflurane Preconditioning. *Anesthesiology*. 2014;121(3):549-62. (IF=6.168)
2. **Li X**, Wang Q. Acupuncture Therapy for Stroke Patients. *International Review of Neurobiology*. 2013;111:159-79. (IF=2.457)
3. **Li X**, Luo P, Wang Q, Xiong L. Electroacupuncture Pretreatment as a Novel Avenue to Protect Brain against Ischemia and Reperfusion Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:195397. (IF=2.175)
4. Wang Q*, Wang F*, **Li X***(co-1st author), Yang Q, Li X, Xu N, Huang Y, Zhang Q, Gou X, Chen S, Xiong L., et al. Electroacupuncture Pretreatment Attenuates Cerebral Ischemic Injury through Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Inhibition of High-Mobility Group Box 1 Release in Rats. *Journal of Neuroinflammation*. 2012,

- 26:9-24. (IF=4.902)
5. Yang Q, Yan W, Li X, Hou L, Dong H, Wang Q, Dong H, Wang S, Zhang X, Xiong L. Activation of canonical notch signaling pathway is involved in the ischemic tolerance induced by sevoflurane preconditioning in mice. *Anesthesiology*. 2012; 117(5):996-1005.
 6. Wang F, Gao Z, Li X, Li Y, Li X, Zhong H, Xu N, Cao F, Wang Q, Xiong L. NDRG2 is involved in anti-apoptosis induced by electroacupuncture pretreatment after focal cerebral ischemia in rats. *Neurological Research*. 2013; 35(4):406-14.
 7. Luo P, Yang Y, Liu W, Rao W, Bian H, Li X, Chen T, Liu M, Zhao Y, Dai S, Yan X, Fei Z. Downregulation of postsynaptic density-95-interacting regulator of spine morphogenesis reduces glutamate-induced excitotoxicity by differentially regulating glutamate receptors in rat cortical neurons. *FEBS J*. 2013;280(23):6114-27.
 8. Wang F, Zhong H, Li X, Peng Y, Kinden R, Liang W, Li X, Shi M, Liu L, Wang Q, Xiong L. Electroacupuncture Attenuates Reference Memory Impairment Associated with Astrocytic NDRG2 Suppression in APP/PS1 Transgenic Mice. *Molecular Neurobiology*. 2014; 50(2):305-13.
 9. Wang Q, Li X, Qiang Wang, Chen Y, Wang F, Yang Q, Chen S, Min Y, Li X, Xiong L. Activation of epsilon protein kinase C-mediated anti-apoptosis is involved in rapid tolerance induced by electroacupuncture pretreatment through cannabinoid receptor type 1. *Stroke*. 2011 Feb;42(2):389-96.

致 谢

自 2009 年本科毕业起，我已在西京医院麻醉科度过了 6 个年头。回首过去的六年，有过欢笑，有过泪水。衷心感谢陪伴着我一路走来的所有老师、同学、朋友和家人，感谢你们给予我的指导、关怀、帮助和支持。

能够成为熊利泽教授的学生，是一件非常幸运的事情，同时也是一种荣耀。作为导师，他始终贯彻“To pursue the excellence”的理念，不仅在科研道路上为我指明了方向，使我在研究的进行过程中不再迷茫，更以他严肃认真的科学态度、积极向上的人生思想、渊博全面的学术知识以及风趣幽默的教学方式为我树立了一生追赶和学习的榜样。同时，导师给了我大量的机会去参与各种学术活动，从中我的科研思路得到了扩展、逻辑思维得到了提高、各方面能力也获得了极大的锻炼。感谢他给我提供了自我展示和进步的平台，使我获得了一生取之不尽、用之不竭的精神财富。我希望未来能够成为像导师一样的医生、学者和老师。

衷心感谢我的指导老师王强副教授耐心细致的指导和孜孜不倦的教诲。在本课题进行的全过程中，从课题设计、实验实施到文章撰写和发表，他都以精益求精的标准严格把关，并反复提出修正意见和建议，帮助我在课题的进展道路上行进得更为顺畅。更要感激的是他对我“拖延症”的容忍，没有他的再三提醒和严厉督促，就不会有本课题的顺利完成。从他身上学习到的严谨、周密的思维方式和解决、发现问题的方法，将使我受益终身。

衷心感谢麻醉科董海龙主任、吕岩教授、王百忍教授在实验设计和课题开展过程中给予的建议；感谢王世全老师和顾婷老师在实验方法和实验操作上的指导；感谢李新莉秘书和余垚莹秘书对课题进行和学位申请工作各个环节中所提供的帮助。麻醉科实验室拥有先进的仪器、良好的环境和完善的规章制度，为本课题的顺利开展提供了绝佳的条件，也形成了舒适的氛围使我度过了极为愉快的六年。

除了各位老师的教诲和指导，我在研究生阶段的成长和进步也离不开同门的支持。我要以最诚挚的谢意感谢王枫博士、杨谦梓博士、李艳博士、邓娇博士、雷翀博士、钟海星博士、陈宇博士、仝黎博士、李旭颖硕士、白福海硕士以及其他麻醉科的师兄姐妹们，在我刻苦攻关、艰苦奋斗的日子里，与我分享课题设计、实验技术和论文写作方面的经验和心得体会，并对我各项工作的扶持和帮助；感谢和我

一起共同经历大学和研究生时光的各位战友们（在此不具体列举每一位的名字），与他们在一起的日子将是我记忆里“最美的十一年”。

特别感谢张遐教授提供给我到加拿大渥太华大学精神健康研究所学习和工作的机会，让我领略到了完全不一样的风土人情，极大地扩展了我的眼界。他传递给我“slow and sure”的科学态度，培养了我科学思维和表达的能力，将使我永远铭记在心。感谢张遐教授一家，实验室的 Maria Da.Silva、Richard Belange、Philip Kesner、Renee Kinde、王莹博士、贾蕊博士、段婷婷博士以及同样出自西京医院麻醉科的王枫博士、仝黎博士、钟海星博士对我在国外学习工作中给予的一系列关心和帮助，在生活方面提供的陪伴和支持，大大降低了我在异国他乡的孤独感。

最后，谨以此文献给我的父母、公婆、妹妹，感谢他们对我的宽容、关心和无微不至的照顾，祝他们身体健康！感谢我的爱人，他在背后默默的支持给予我前进的动力，我们会相互扶持，一路走下去！