

氩气通过 Cav-1 抑制小鼠脑梗死后急性期血脑屏障通透性增加

刘泳欣 张云峰

【摘要】 目的 探究氩气(Argon, Ar)对小鼠脑缺血再灌注(Cerebral ischemia reperfusion, CIR)后急性期血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)通透性的影响及其机制。**方法** 27 只雄性美国癌症研究所引进(Institute of cancer research, ICR)小鼠随机分为假手术组(Sham 组)、短暂性大脑中动脉栓塞(Transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型组(tMCAO 组)和氩气吸入组(tMCAO + iAr 组),每组各 9 只;比较各组小鼠再灌注 6 h 后伊文思蓝(Evans blue)渗漏及神经功能评分;蛋白免疫印迹和免疫组化检测缺血侧脑组织闭锁连接蛋白 1(Zonula occludens 1, ZO-1)、网格蛋白(Clathrin)和小窝蛋白 1(Caveolin-1, Cav-1)的表达水平。**结果** 与 Sham 组比较, tMCAO 组小鼠缺血侧脑组织 Evans blue 渗漏增加, 神经功能缺损加重;缺血侧脑组织 Cav-1 和 Clathrin 蛋白表达水平增高, 而 ZO-1 蛋白表达水平无明显变化;CD31 标记的血管内皮细胞 Cav-1 荧光强度增加, 而 ZO-1 荧光强度无明显变化;与 tMCAO 组比较, 氩气吸入组小鼠脑组织 Evans blue 渗漏减少, 神经功能缺损改善, 缺血侧脑组织中 Cav-1 蛋白表达水平降低和缺血半暗区 CD31 阳性内皮细胞中 Cav-1 荧光强度减弱。**结论** 氩气可能通过抑制小鼠脑缺血再灌注后急性期内皮细胞 Cav-1 介导的跨细胞转运、减轻 BBB 通透性增加来发挥神经保护作用。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤 血脑屏障通透性 氩气 血管内皮细胞 跨细胞转运

【中图分类号】 R743.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)06-0547-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.06.007

随着静脉溶栓的普及和血管内治疗技术的进步,缺血再灌注损伤是许多缺血性脑卒中后血管再通的患者必须面对的 1 个难题。急性期 BBB 通透性增加参与脑梗死后缺血再灌注损伤,可继发脑水肿、出血转化等严重并发症^[1],故尽早减轻 BBB 通透性增加能有效改善患者的生存预后。尽管先前的研究已经表明,缺血性脑卒中后 BBB 损伤与炎症的诱导和紧密连接蛋白的下调有关,但血管内皮细胞跨细胞转运上调是 BBB 高通透性的起始事件^[2],是脑缺血再灌注后 BBB 破坏重要时空指标,因此内皮细胞跨细胞转运逐渐成为新的治疗靶点。

惰性气体氩气作为一种新型气体神经保护剂,有良好的脂溶性,可更快地透过 BBB 作用于病灶^[3],被认为是良好前景的神经保护剂^[4]。这可能与氩气本身是一个非极性分子,能与结合位点形成化学键,或通过范德华力与特定受体结合有关。大量临床前研究证明,氩气在多种神经损伤模型包

括脑缺血再灌注损伤模型都表现出抗凋亡、抗炎等生物学反应,发挥神经保护作用^[5],但其具体机制仍未被阐明。现有的多数研究重点关注小胶质细胞介导的神经炎症,氩气对脑缺血再灌注后 BBB 的保护作用未见报道。

前期研究发现,氩气可以减轻小鼠脑缺血再灌注后 24 h 脑组织含水量^[6],然而氩气是否能保护脑缺血再灌注急性期(4~6 h)减轻 BBB 损伤尚不清楚,其相关机制不明。本研究采用短暂性大脑中动脉栓塞模型,以模拟缺血性脑卒中后血管再通治疗的缺血再灌注损伤,通过比较氩气对 tMCAO 后脑组织伊文思蓝染色观察 BBB 通透性的影响,结合神经功能评分,并对脑组织和缺血半暗区血管内皮细胞中 Cav-1、Clathrin 和 ZO-1 表达水平进行比较,以研究氩气对脑缺血再灌注后急性期 BBB 通透性的影响及机制,为氩气治疗急性脑梗死的临床转化提供直接的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及 tMCAO 模型建立

健康成年雄性 ICR 小鼠 27 只,体重 26~30

基金项目:江苏省研究生科研创新项目(KYCX22_3372);南通市社会民生面上项目(MS22022058)

作者单位:226000 南通大学医学院[刘泳欣(南通大学附属医院卒中中心)];南通大学附属医院卒中中心[张云峰(通信作者)]

克,由南通大学实验动物中心提供;饲养环境保持安静,空气湿度 55%~75%,气温 23~25℃,12 h 交替光照,允许小鼠自由进食和饮水。正式实验前一晚禁食。所有动物实验均按照南通大学动物伦理和使用机构要求进行。

小鼠随机为假手术(Sham)组,短暂性大脑中动脉栓塞(Transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型组(tMCAO 组)和氩气吸入组(tMCAO + iAr 组)。用异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司)诱导及维持小鼠麻醉,行颈中正线切口,暴露右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉后将线栓(6023PK5Re, Doccol 公司)从颈外动脉推进颈内动脉,遇到阻力后停止进栓;将线栓与颈外动脉固定后缝合小鼠颈部切口;大脑中动脉栓塞 1 h 后拔出线栓进行血流再灌注,然后进行伤口缝合,于 37℃ 加热垫上等待苏醒。Sham 组小鼠除不插入线栓,其余处理同 tMCAO 组小鼠。tMCAO + iAr 组小鼠阻塞大脑中动脉后立即给予氩-氧混合气(79% 氩气-21% 氧气,南通天源气体有限公司),小鼠拔出线栓,继续吸入氩-氧混合气 2 h,整个过程维持小鼠体温 37℃。其他常规试剂购于 Sigma 公司。

1.2 神经功能评分

采用双盲法对小鼠脑缺血再灌注 6 h 后进行神经功能缺损评分,从动物毛发、耳朵、体位、步态、自发运动、癫痫行为等 6 个方面进行评定,最高 28 分,评分越高表示神经功能缺损越严重。

1.3 伊文思蓝(Evans blue)染色及定量

各组小鼠进行相应手术处理后按照 0.04 mL/10 g 体重经尾静脉注射 4% 伊文思蓝溶液;伊文思蓝溶液在小鼠体内循环 1 h 后小鼠经腹腔注射 2.5% 阿弗汀(0.2 mL/10 g 体重)麻醉,用 0.9% 生理盐水经心脏灌注后断头取脑,迅速将大脑切成 2 mm 冠状位薄片,按顺序置于载玻片上拍照;拍摄结束后用 1 mL 50% 三氯乙酸溶液将大脑匀浆,匀浆后 15000 r/min 离心 30 min;离心结束后取上清用无水乙醇按 1:3 的稀释,混匀后取 100 μ L 至 96 孔板中,测量其在 630 nm 处吸光度。

1.4 免疫荧光染色

各组小鼠脑组织经固定、脱水后进行冰冻切片,25 μ m 冠状位切片经磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffered saline, PBS)清洗后用免疫染色通透液 0.3% 曲拉通 X-100 (T-octylphenoxypolyethoxyethanol, Triton X-100)室温破膜 15 min,10% 牛血清蛋白室温

封闭 2 h 后加入以下一抗 4℃ 孵育过夜:抗 Cav-1(1:500, Cat # 3238, CST),抗 CD31(1:200, Cat # 28083-1-AP, Proteintech),抗 ZO-1(1:1000, Cat # 21773-1-AP, Proteintech);PBS 清洗后依次用二抗避光室温孵育 2 h,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)室温孵育 30 min;孵育结束后用封片剂封固,在避光盒中阴干。

1.5 蛋白免疫印迹(Western blot)

各组小鼠经腹腔注射 2.5% 阿弗汀麻醉后迅速断头取缺血侧脑组织;脑组织加入裂解液后充分研磨,于冰上静置 30 min 后离心收集上清进行蛋白水平测定,取等量蛋白加热变性后在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离,湿转法转移至聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后加入以下一抗 4℃ 孵育过夜 ZO-1(1:1000, Cat # 21773-1-AP, Proteintech),Cav-1(1:1000, Cat # 3238, CST),Clathrin(1:1000, ab21679, Abcam)和 β -肌动蛋白(Beta-actin, β -actin)(1:10000, Biosharp, BL005B);第 2 d 将 PVDF 膜用三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]盐缓冲液清洗 3 次后加入相对应二抗,室温孵育 2 h;增强型化学发光试剂(Enhanced chemiluminescence, ECL)系统进行显影,用 ImageJ 计算各蛋白条带灰度值,检测 ZO-1, Cav-1, Clathrin 和 β -actin 的表达水平。

1.6 统计学处理

使用 Graphpad 8.0 软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氩气减轻急性期 tMCAO 小鼠 BBB 通透性增加

与 Sham 组比较,tMCAO 组脑组织 Evans blue 外渗明显增加($P = 0.04$)。吸入氩气后小鼠脑组织 Evans blue 残留含量比 tMCAO 组小鼠少($P = 0.0173$)(图 1);与 Sham 组比较,tMCAO 组小鼠总体和局灶神经功能缺损评分显著升高($P < 0.01$)(图 1);与 tMCAO 组比较,tMCAO + iAr 组小鼠神经功能缺损评分均下降($P < 0.01$)(图 1)。即氩气吸入可减轻小鼠脑缺血再灌注超急性期 BBB 通透性增加,改善 tMCAO 小鼠神经功能缺损。

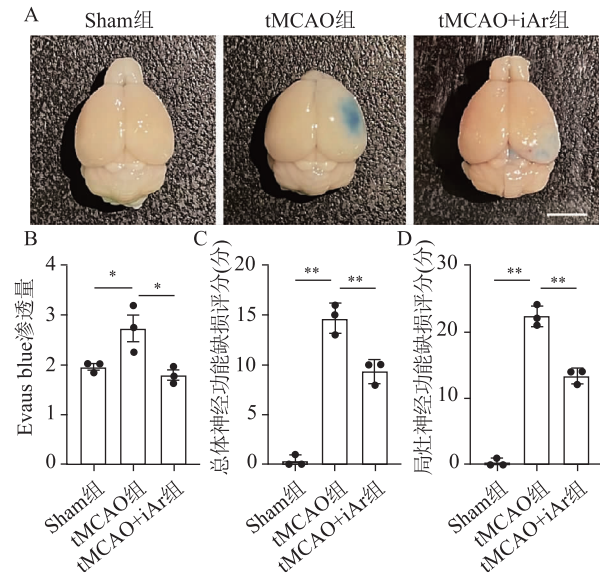


图 1 氦气对 tMCAO 小鼠 BBB 通透性及神经功能缺损评分的影响 A 为各组小鼠脑组织 Evans blue 渗漏,比例尺 = 5 mm;B 为各组小鼠脑组织 Evans blue 残留量比较, $n = 3$ /组;C 为小鼠总体神经功能缺损评分, $n = 3$ /组;D 为小鼠局灶神经功能缺损评分, $n = 3$ /组;两两比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 氦气抑制急性 Cav-1 介导的跨细胞转运

tMCAO 组缺血侧脑组织中 Cav-1 ($P =$

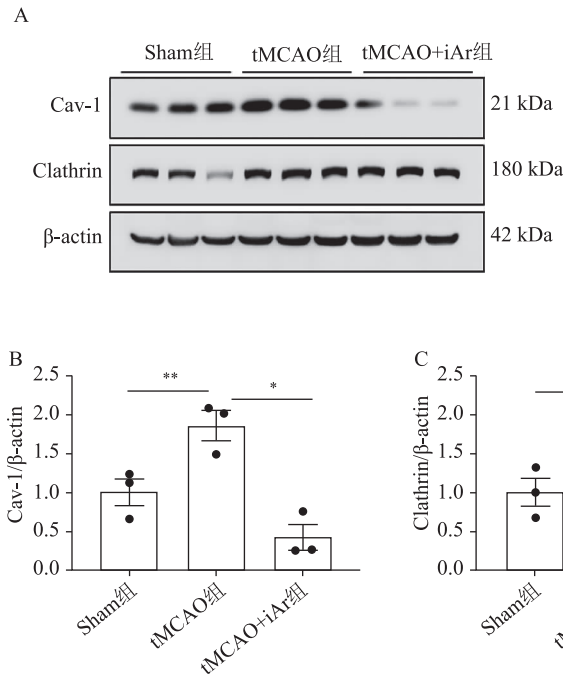


图 2 各组小鼠缺血半暗带内皮细胞中 Cav-1 表达水平 A 为各组小鼠缺血侧脑组织 Cav-1,Clathrin 和 β -actin 蛋白电泳;B, C 分别为各组小鼠缺血侧脑组织 Cav-1 和 Clathrin 蛋白水平比较, $n = 3$ /组;D 为各组小鼠缺血半暗带内皮细胞(CD31,绿色)中 Cav-1(红色)表达水平,比例尺 = 25 μ m;E 为 D 中各组 CD31 阳性细胞中 Cav-1 荧光强度比较, $n = 3$ /组;两两比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

0.0315)和 Clathrin($P = 0.0060$)蛋白表达水平均比 Sham 组升高(图 2);吸入氦气治疗后 Cav-1 表达水平低于 tMCAO 组($P = 0.0028$),但对 Clathrin 的上调无明显抑制作用($P = 0.7910$)(图 2)。

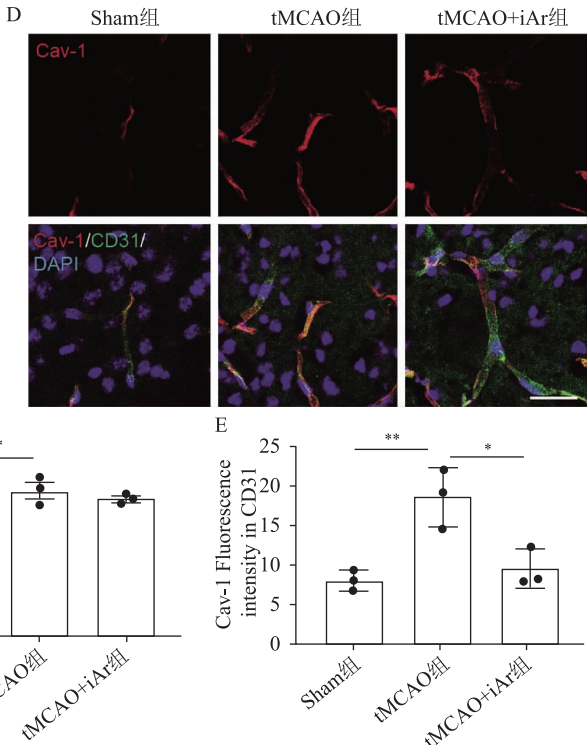
吸入氦气后 CD31 阳性细胞中 Cav-1 荧光强度比 tMCAO 组弱($P = 0.0146$)(图 2),即氦气抑制再灌注后急性期 Cav-1 介导的跨细胞转运。

2.3 氦气不影响急性期细胞旁紧密连接

与 Sham 组比较,tMCAO 组小鼠脑组织中 ZO-1 蛋白表达水平无明显变化($P = 0.7852$)(图 3);各组 CD31 阳性细胞中 ZO-1 形态连续(图 3);tMCAO 组脑缺血半暗带 CD31 阳性细胞中 ZO-1 的荧光强度与 Sham 组比较无显著差异($P = 0.8860$);吸入氦气后 ZO-1 蛋白条带灰度值未发生明显变化($P = 0.8228$),CD31 阳性细胞中 ZO-1 荧光强度未有显著差异($P = 0.6652$)。即氦气对急性期 BBB 通透性的保护作用不是通过内皮细胞旁紧密连接介导的。

3 讨论

本研究围绕氦气对 CIR 后急性期脑血管内皮



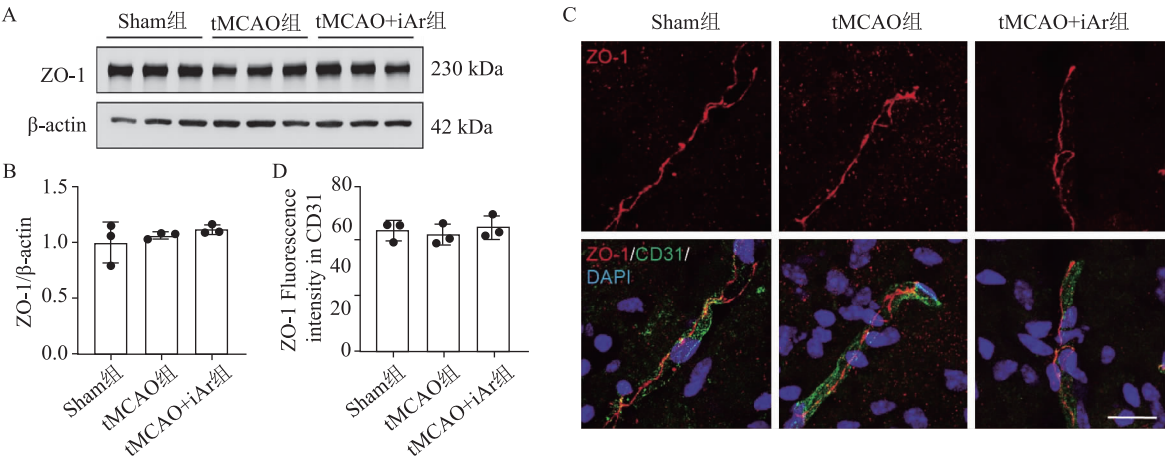


图 3 各组小鼠缺血半暗带内皮细胞中 ZO-1 表达水平 A 为各组小鼠缺血侧脑组织 ZO-1 蛋白电泳;B 为各组小鼠缺血侧脑组织 ZO-1 蛋白水平比较, $n=3$ /组;C 为各组小鼠缺血半暗带内皮细胞 (CD31, 绿色) 与 ZO-1 (红色) 双重荧光染色, 比例尺 = 25 μ m;D 为各组小鼠缺血半暗带内皮细胞 ZO-1 荧光强度比较, $n=3$ /组;两两比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

细胞通透性的作用及跨细胞转运机制展开;本研究不仅发现氦气能减少 CIR 后急性期脑组织 Evans blue 渗漏,减轻 BBB 通透性增加;进一步研究还发现,氦气明显抑制缺血半暗区跨细胞转运相关蛋白 Cav-1 在内皮细胞中的分布,但对缺血侧脑组织 Clathrin 上调无明显抑制作用,对急性期 BBB 通透性的保护作用不是通过内皮细胞旁紧密连接介导的。

BBB 功能失调是 CIR 后诱发继发性损伤的重要病理生理机制。有研究发现,CIR 后急性期 BBB 通透性增加可引起恶性脑水肿等严重并发症。惰性气体氦气具有神经保护作用^[7-9]。我们的前期研究证实氦气可以减少脑缺血再灌注 24 h 后脑含水量^[6]。本研究通过 Evans blue 残留量作为评估 BBB 通透性的指标,发现吸入氦气后 Evans blue 渗漏和神经功能缺损评分减少,提示吸入氦气可以改善 CIR 后急性期 BBB 通透性增加。

跨细胞转运增加是解释 BBB 跨细胞通透性增加的有力证据。超微结构分析表明,内皮细胞囊泡转运增加是缺血性脑卒中 BBB 损伤的起始事件。Xu 等人研究发现,在急性高血糖诱导脑卒中后出血转化模型中内皮细胞中直径<100 nm 囊泡和 100~150 nm 囊泡数量显著增加^[10],提示 Clathrin 介导和 Caveolae 介导的跨细胞转运参与脑卒中后 BBB 的高通透性^[11]。Clathrin 是胞浆中的网格蛋白,介导配体-受体特异性结合的跨细胞转运机制。Caveolae 是一种特殊的细胞膜脂筏结构,富含胆固醇和磷脂。其中,Cav1 不仅介导跨细胞转运,同时参与脂筏小窝 Caveolae 的形成。当 Cav-1 表达被抑制后疾病状态下 BBB

通透性得以维持^[12]。本研究结果表明,吸入氦气后内皮细胞 Cav-1 表达水平降低,但对 Clathrin 蛋白上调无明显抑制作用,这可能与氦气作为一种分子量较小的脂溶性气体有关。本研究推测,氦气透过细胞膜时会对磷脂双分子层产生作用,影响脂筏小窝的形成。血管内皮细胞旁途径破坏同样会增加 BBB 通透性,故本研究还对内皮细胞旁的紧密连接蛋白 ZO-1 进行检测,结果显示各组间 ZO-1 表达水平无明显差异。表明氦气对再灌注急性期 BBB 通透性的调控并非是通过细胞旁转运机制介导的。

虽然本研究已经观察到氦气能改善 CIR 急性期 BBB 通透性增加,下一步考虑采用核磁共振扫描成像在动物上观察氦气对 CIR 后 BBB 通透性时空动态变化。采用离体细胞培养了解氦气是否直接作用于血管内皮细胞,以深入探究氦气的作用机制。

本研究发现氦气抑制小鼠脑缺血再灌注后急性期 Cav-1 介导的跨细胞转运,保护 BBB,减轻脑损伤。合并其他慢性疾病如高血压病、糖尿病等动物模型对了解氦气的神经保护机制有更好的帮助^[13],也为其未来的临床转化提供了重要的实验依据。

参 考 文 献

[1] Ng FC,Churilov L,Yassi N,et al. Microvascular dysfunction in blood-brain barrier disruption and hypoperfusion within the infarct posttreatment are associated with cerebral edema[J]. Stroke,2022,53(5):1597-1605.
[2] Haley MJ,Lawrence CB. The blood-brain barrier after stroke: structural studies and the role of transcytotic vesicles[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2017,37(2):456-470.

代检验医学杂志,2019,34(2):60-63.

[23] Wang L, Li RF, Guan XL, et al. Predictive value of soluble CD59 for poor 28-day neurological prognosis and all-cause mortality in patients after cardiopulmonary resuscitation: a prospective observatory study[J]. Journal of Intensive Care,2023, 11(1):3.

[24] 曲明卫,王立敏,朱兰,等. 血清NSE、MMP-10、s100β与急性脑梗死患者神经功能缺损程度的关系研究[J]. 神经损伤与功能重建,2020,15(7):408-409.

[25] 宋宏中,饶俊平,罗凌云. 急性脑梗死患者静脉溶栓后血清

S100β蛋白与预后的关系[J]. 吉林医学,2022,43(3):589-593.

[26] Arrais AC,Melo LHMF,Norrara B,et al. S100B protein: general characteristics and pathophysiological implications in the central nervous system[J]. Int J Neurosci,2022,132(3):313-321.

[27] Flora GD,Nayak MK. A brief review of cardiovascular diseases, associated risk factors and current treatment regimes[J]. Curr Pharm Des,2019,25(38):4063-4084.

(2024-05-07 收稿)

(上接第 546 页)

[12] Chen LY,Liu F,Tian X, et al. Impact of cerebral microbleeds on cognitive functions and its risk factors in acute cerebral infarction patients[J]. Neurol Res,2023,45(6):564-571.

[13] Yang T,Deng Q, Jiang S, et al. Cognitive impairment in two subtypes of a single subcortical infarction[J]. Chin Med J (Engl),2021,134(24):2992-2998.

[14] Wei WP,Ma DL, Li L, et al. Cognitive impairment in cerebral small vessel disease induced by hypertension[J]. Neural Regen Res,2024,19(7):1454-1462.

[15] 王韵娴,林榕,颜缘娇,等. 糖尿病合并轻度认知功能障碍患者亚群分类研究[J]. 护理学杂志,2024,39(4):45-48.

[16] 付泉水,张体江. FLAIR 血管高信号-DWI 不匹配在急性卒中中血管再通治疗后预后的预测价值[J]. 临床放射学杂志,

2020,39(5):860-864.

[17] Jiang L,Peng MY,Geng W, et al. FLAIR hyperintensities-DWI mismatch in acute stroke: associations with DWI volume and functional outcome[J]. Brain Imaging Behav, 2020, 14(4): 1230-1237.

[18] Jing LN, Sui BB, Shen M, et al. Comparison of three FLAIR vascular hyperintensities methodologies in patients with acute ischemic stroke[J]. Acta radiol,2021,62(6):766-775.

[19] Tao ZH, Zhou F, Zhang HJ, et al. Value of MRI T₂ FLAIR vascular hyperintensities combined with DWI ASPECTS in predicting the prognosis of acute cerebral infarction with endovascular treatment[J]. Curr Med Imaging,2023,19(11):1273-1278.

(2024-05-15 收稿)

(上接第 550 页)

[3] 王军,程鹏飞,沈文飏. 方兴未艾的氙气生物学[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2023,39(7):905-910.

[4] De Deken JL, Rex S, Monbaliu D, et al. The efficacy of noble gases in the attenuation of ischemia reperfusion injury: a systematic review and meta-analyses[J]. Crit Care Med,2016,44(9):e886-e896.

[5] Nowrangi DS, Tang JP, Zhang JH. Argon gas: a potential neuroprotectant and promising medical therapy[J]. Med Gas Res, 2014,4(1):3.

[6] He J,Xue K, Liu J, et al. Timely and appropriate administration of inhaled argon provides better outcomes for tMCAO mice;a controlled, randomized, and Double-Blind animal study [J]. Neurocrit Care,2022,37(1):91-101.

[7] Edge CJ, Dickinson R. Argon: a noble, but not inert, treatment for brain trauma? [J]. Br J Anaesth, 2021, 126(1): 41-43.

[8] Kremer B,Coburn M, Weinandy A, et al. Argon treatment after experimental subarachnoid hemorrhage: evaluation of microglial activation and neuronal survival as a subanalysis of a randomized controlled animal trial[J]. Med Gas Res, 2020, 10

(3):103-109.

[9] Srinivasula SM,Ulbrich F,Kaufmann K, et al. Argon mediates anti-apoptotic signaling and neuroprotection via inhibition of toll-like receptor 2 and 4 [J]. Plos One, 2015, 10(12): e0143887.

[10] Xu XM, Zhu LQ, Xue K, et al. Ultrastructural studies of the neurovascular unit reveal enhanced endothelial transcytosis in hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation after stroke[J]. CNS Neurosci Ther,2021,27(1):123-133.

[11] Zhou M, Shi SX, Liu N, et al. Caveolae-mediated endothelial transcytosis across the blood-brain barrier in acute ischemic stroke[J]. J Clin Med,2021,10(17):3795.

[12] Andreone BJ, Chow BW, Tata A, et al. Blood-brain barrier permeability is regulated by lipid transport-dependent suppression of caveolae-mediated transcytosis [J]. Neuron, 2017, 94(3): 581-594. e5.

[13] Lapchak PA, Zhang JH, Noble-Haesslein LJ. RIGOR guidelines: escalating STAIR and STEPS for effective translational research[J]. Transl Stroke Res,2013,4(3):279-285.

(2024-04-09 收稿)