

敲低 TMEM16B 减轻大鼠脑缺血再灌注损伤后 脑水肿并保护血脑屏障

张婧彬^{1,2}, 刘倩¹, 潘紫燕¹, 姚天锡¹, 殷姜文^{1,2}

(¹石河子大学第一附属医院麻醉科, 石河子 832003;

²中亚高发疾病防治中心重点实验室, 石河子 832003)

摘要 目的 探究跨膜蛋白 16B(TMEM16B)在大鼠脑缺血再灌注损伤后对脑水肿和血脑屏障的作用。方法 使用腺相关病毒(AAV)上调或下调 TMEM16B 的表达,制备大鼠的大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,随机分为 Sham 组、MCAO 组、空载组、过表达组、敲低组。造模后通过改良神经功能缺损评分(mNSS)、粘连胶实验、圆筒实验评估大鼠感觉运动功能;电镜观察缺血侧脑组织的超微结构;通过脑组织干湿重比反映各组脑含水量;免疫荧光和 Western blot 检测 TMEM16B 与水通道蛋白 4(AQP4)、紧密连接蛋白 5(Claudin5)和闭锁连接蛋白-1(ZO-1)的表达水平。结果 与空载组比较,过表达组的大鼠感觉运动功能减弱;线粒体肿胀,嵴消失,紧密连接消失;脑含水量增多;TMEM16B 和 AQP4 表达量增多, Claudin5 和 ZO-1 表达量降低(均 $P < 0.05$)。而敲低组的大鼠与空载组比较在运动功能方面有所恢复;线粒体嵴明显,基底膜部分模糊;脑含水量降低;TMEM16B 和 AQP4 表达量减少, Claudin5 和 ZO-1 表达量增多(均 $P < 0.05$)。结论 TMEM16B 增多会加重脑缺血再灌注损伤后大鼠的脑水肿并加重血脑屏障损伤,而减少 TMEM16B 表达则会减轻脑水肿并保护血脑屏障。

关键词 跨膜蛋白 16B;脑缺血再灌注损伤;大脑中动脉栓塞模型;脑水肿;血脑屏障;神经保护

中图分类号 R743.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)04-0644-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.04.008

卒中具有高病死率、高致残率的特点,对于全民健康和社会经济有着重大影响^[1],卒中主要分为2种类型:缺血性卒中和出血性卒中,尤以前者更常见^[2]。对缺血性卒中的治疗除了常规的溶栓治疗之外,神经保护也逐渐成为一种新的治疗方法^[3]。而跨膜蛋白 16B (transmembrane protein 16B, TMEM16B)是一种钙激活氯通道,主要在肺泡上皮细胞、神经元^[4]、血管内皮细胞^[5]中表达,能够调控神经信号传导、影响血压和调节胃肠道蠕动^[6]。TMEM16B 主要表达于细胞膜上,不同的细胞之间 TMEM16B 的表达含量差异很大。在炎症状态下,这种差异尤为明显^[7]。脑缺血再灌注损伤过程中,本身的缺血病灶中存在着大量的炎症因子,与此同时再灌注又会加重局部或全身的炎症反应,增加组织损伤。研究^[5]表明,在血管内皮细胞中, TMEM16B 对于 Ca^{2+} 的增多起负向调节作用,即 TMEM16B 受到细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响。而脑缺血

时, Ca^{2+} 超载严重,并且脑卒中患者的预后情况与其脑水肿程度以及血脑屏障的受损程度密切相关。目前关于 TMEM16B 在该过程中发挥何种作用尚无报道。因此,该研究通过建立大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型,探究 TMEM16B 对脑缺血再灌注损伤后脑水肿和血脑屏障的作用,以期为后续研究提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择体质量 230~250 g 的雄性 SD 大鼠 90 只,购于北京斯贝福生物技术有限公司(动物合格证号:SYXK2023-0003),饲养在恒温、安静、清洁的 SPF 级环境中,温度 $(22 \pm 2)^\circ C$,湿度 $(60 \pm 5)\%$,12 h 的光暗循环,可自由进食进水。研究中所有动物实验均已获得石河子大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批号:A2023-233-01)。

1.1.2 主要试剂和材料 大鼠大脑中动脉线栓、异氟烷(货号:907-03118-90、R510-22)购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司;TMEM16B 过表达、敲低和空载腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)购自上海吉凯医学科技股份有限公司;电镜固定液

2025-11-02 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82160235)

作者简介:张婧彬,女,硕士研究生;

殷姜文,男,副主任医师,硕士生导师,通信作者,E-mail:

yjw6654328@163.com

(货号:G1102)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;TMEM16B抗体(货号:20647-1-AP)、山羊抗兔二抗(货号:RGAR001)购自武汉三鹰生物科技有限公司;AQP4抗体(货号:ab259318)、ZO-1抗体(货号:ab221547)、山羊抗兔二抗(货号:ab150077)购自英国Abcam公司;ZO-1抗体(货号:61-7300)、Claudin5抗体(货号:PA5-99415)购自美国Thermo Fisher公司; β -actin抗体(货号:TA-09)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 小动物麻醉机(型号:R500)购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司;立体定位仪(型号:ZS-FD)购自北京众实迪创科技有限公司;微量注射泵(型号:QSI)购自美国Stoelting公司;低温高速离心机(型号:1-14k)购自德国Sigma公司;电泳槽(型号:DYCZ-21)购自北京六一生物科技有限公司;激光共聚焦显微镜(型号:STELLARIS-5)购自德国Leica公司;透射电子显微镜(型号:JEM1200EX)购自荷兰FEI公司;化学发光成像仪(型号:Tanon-2500)购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 随机将90只大鼠分为5组:①Sham组,大鼠麻醉后仅分离血管不进行线栓的插入;②造模组(MCAO组),建立MCAO模型,缺血2 h后血流再灌注;③空载组(MCAO+AAV-NC组),通过脑立体定位注射技术将空载病毒注射到目标区域,14 d后正常进行造模;④过表达组(MCAO+AAV-TMEM16B组),通过脑立体定位注射技术将过表达病毒注射到目标区域,14 d后正常进行造模;⑤敲低组(MCAO+AAV-TMEM16B-RNAi组),同样通过脑立体定位注射敲低病毒,14 d后再进行造模。

1.2.2 模型制备 大鼠造模前禁食12 h,使用2.4%的异氟烷进行吸入麻醉。使大鼠仰卧位固定,沿颈正中线偏右0.5 cm切开,逐层分离各层筋膜和肌肉,暴露右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。用动脉夹夹闭颈总动脉近心端,并结扎颈外动脉,将线栓通过颈外动脉残端插入颈内动脉,入颅后闭塞大脑中动脉,此时略感阻力感,即可停止插入,固定线栓后松开动脉夹。整个操作过程避免牵拉迷走神经,并在栓塞2 h后,轻柔拔出线栓,实现再灌注。

1.2.3 脑立体定位注射 使用脑立体定位仪进行微量AAV注射。大鼠吸入异氟烷麻醉后,将其固定

于脑立体定位仪上,剪开头皮,暴露颅骨,用颅骨钻在大鼠的颅骨表面钻孔。钻孔完成后,根据文献^[8]和大鼠的脑解剖图谱选取大脑中动脉缺血周边区进行病毒注射,入颅位点为前凶点旁开5 mm,向后凶方向3 mm,深3.5 mm(坐标为 ± 5 、-3、-3.5)。病毒注射速度为0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$,注射总量为2 μL ,并在注射完成后将微量注射器停留10 min,然后缓慢移除,缝合大鼠头皮,在其麻醉苏醒后放入笼中饲养。

1.2.4 改良神经结构功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS) 再灌注后24 h,即造模1 d后,对大鼠的神经功能缺损情况进行评分,该评分包括感觉、运动、平衡和反射4个部分。所有部分分数的总和为神经功能缺陷的评分,并且分数越高,神经功能损伤越严重。

1.2.5 圆筒实验 在造模后第3天,将大鼠放置于透明的玻璃树脂圆筒中(直径:20 cm;高:40 cm),观察3 min内,大鼠后肢站立时前肢接触圆筒壁的情况。分别记录左右前肢分别接触的次數和两肢共同接触的次數。左前肢接触时间百分比(%)=[(左前肢接触次数+0.5 \times 双侧前肢共同接触次数)/左前肢接触次数+右前肢接触次数+双侧前肢共同接触次数] $\times 100\%$ 。

1.2.6 粘连胶去除实验 造模后第3天,分别在大鼠的左前爪和右前爪上粘一块胶带(3 mm \times 5 mm),记录大鼠感觉到胶带时的接触时间和去除胶带所需时间,用于检测大鼠的感觉功能。其中以右前爪测试的数据作为基线。

1.2.7 脑含水量实验 造模后第3天,对大鼠实施安乐死后取出脑组织,用预冷的PBS将残留血液冲洗干净并用吸水纸吸去多余液体,称量此时的脑组织质量为湿重。然后将脑组织在100 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥48 h,再次称量质量为干重。脑组织含水量计算方法为:(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

1.2.8 透射电子显微镜成像 大鼠麻醉后迅速断头取脑,将大鼠右侧缺血区域的皮质组织放入电镜固定液中。皮质组织厚度 < 1 mm,在室温下避光固定1 h,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定过夜。整个过程中使用的操作器械和液体均要提前预冷,并在冰上操作,以减少细胞自溶。将固定好的组织用1.5%的亚铁氰化钾和2%的四氧化锇处理,然后使用环氧树脂包埋。切片之后,通过透射电子显微镜观察神经元、细胞器和胞膜的超微结构变化。

1.2.9 免疫荧光染色 造模后第3天,将大鼠经心

脏灌注,然后取大脑组织进行石蜡切片。使用5% BSA在室温条件下封闭2 h,封闭结束后,将切片分别与TMEM16B抗体(1:200)、AQP4抗体(1:200)、Claudin5抗体(1:100)、ZO-1抗体(1:100)在4℃冰箱孵育过夜。第2天漂洗后,将切片与山羊抗兔的二抗(1:500)在37℃水浴箱中孵育2 h,然后用DAPI染液标记细胞核3 min,之后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.10 Western blot 造模后第3天,将大鼠断头取脑,进行组织匀浆,提取蛋白,BCA法测蛋白浓度。然后进行上样、电泳、转膜、封闭等操作,分别与TMEM16B抗体(1:1 000)、AQP4抗体(1:1 000)、Claudin5抗体(1:1 000)、ZO-1抗体(1:1 000)、 β -actin抗体(1:1 000)在4℃下孵育过夜。第2天清洗过后,使用山羊抗兔的二抗(1:5 000)在室温下孵育2 h,然后滴加化学发光试剂进行曝光处理,最后使用ImageJ软件测定各条带灰度值。

1.3 统计学处理 使用Graphpad prism 8.0软件进行统计分析。首先对数据进行正态性检验,测量数据以平均值 \pm 标准误($\bar{x}\pm SEM$)表示。符合正态分布的数据通过单因素方差分析(ANOVA)进行显著性检验,而非正态分布数据则通过Brown-Forsythe法进行分析。使用Dunnett *t*3检验或Games-Howell检验进行多重比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMEM16B对大鼠造模后感觉运动功能的影响

2.1.1 TMEM16B过表达对造模后大鼠神经功能评分的影响 与Sham组比较,MCAO组中大鼠的mNSS增高($P<0.001$);而MCAO组和空载组比较,两组mNSS差异无统计学意义;与空载组比较,过表达组中大鼠的mNSS增高($P<0.001$),而在敲低组中,两组mNSS差异无统计学意义;与过表达组比较,敲低组中大鼠的mNSS分数下降($P<0.01$)。见图1A。

2.1.2 TMEM16B过表达对造模后大鼠感觉功能损伤的影响 与Sham组比较,MCAO组大鼠去除胶带时间增多($P<0.05$);而MCAO组和空载组之间差异无统计学意义;与空载组比较,过表达组大鼠去除胶带时间增多($P<0.05$),在敲低组与空载组之间去除时间差异无统计学意义;与过表达组比较,敲低组的去除胶带时间减少($P<0.01$)。见图1B。

2.1.3 TMEM16B过表达对造模后大鼠运动功能损伤的影响 与Sham组比较,MCAO后大鼠的左爪接触百分比下降($P<0.05$);而MCAO组与空载组之间差异无统计学意义;与空载组相比较,过表达组大鼠的左爪接触百分比下降($P<0.05$),而在敲低组中上升($P<0.01$);与过表达组比较,敲低组大鼠的左爪接触百分比上升($P<0.001$)。见图1C。

2.2 TMEM16B过表达会对大鼠造模后脑含水量的影响 与Sham组比较,MCAO组的脑含水量增多($P<0.01$);空载组和MCAO组之间脑含水量差异无统计学意义;与空载组比较,过表达组中脑含水量增多,而敲低组脑含水量降低(均 $P<0.05$);与过表达组比较,敲低组脑含水量减少($P<0.001$)。见图1D。

2.3 TMEM16B对大鼠脑损伤处组织超微结构的影响 在Sham组中,血管内皮的基底膜完整、无断裂,线粒体双层膜结构明显,可见线粒体嵴,并且有紧密连接;在MCAO组和空载组中,线粒体肿胀,仅见双层膜结构,线粒体嵴模糊或消失,基底膜模糊不清;在过表达组中,线粒体明显肿胀、结构消失,线粒体嵴消失,紧密连接也不复存在;在敲低组中,线粒体嵴和双层膜结构清晰,基底膜有部分模糊。见图2。

2.4 AAVs注射后大鼠脑组织中TMEM16B表达变化 与Sham组比较,MCAO组TMEM16B表达明显增多($P<0.01$);空载组与MCAO组之间TMEM16B的表达差异无统计学意义;与空载组比较,过表达组中TMEM16B表达量增多($P<0.01$),而敲低组中TMEM16B表达量下降($P<0.01$);与过表达组比较,敲低组TMEM16B表达水平减少($P<0.001$)。见图3、4和表1。

2.5 TMEM16B过表达对大鼠损伤处脑组织中AQP4表达的影响 与Sham组比较,MCAO组AQP4的荧光表达水平上升($P<0.001$);而MCAO组与空载组比较,荧光表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);与空载组比较,过表达组中AQP4的荧光表达水平增加($P<0.05$),敲低组中荧光表达水平降低($P<0.05$);与过表达组比较,敲低组中荧光表达量下降($P<0.001$)。见图3、表1。

Western blot检测结果显示,MCAO组和空载组之间AQP4蛋白水平差异无统计学意义;与空载组比较,过表达组中AQP4蛋白表达量增加($P<0.01$),敲低组与空载组中AQP4蛋白表达差异无统计学意

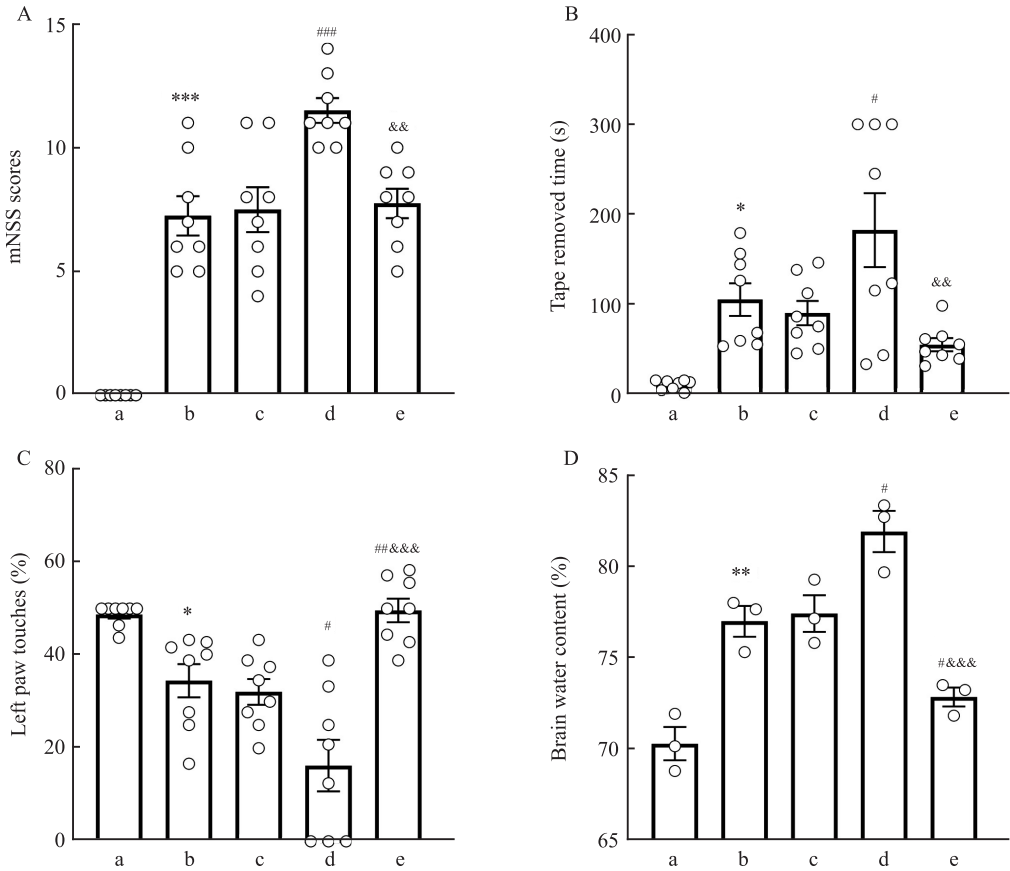


图1 行为学实验和脑含水量实验结果

Fig. 1 Results of behavioral tests and brain water content tests

A: mNSS neurological function score results; B: Adhesive removal test results; C: Cylinder test results; D: Results of brain water content; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO+AAV-NC group; d: MCAO+AAV-TMEM16B group; e: MCAO+AAV-TMEM16B-RNAi group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs MCAO+AAV-NC group; & $P < 0.01$, && $P < 0.001$ vs MCAO+AAV-TMEM16B group.

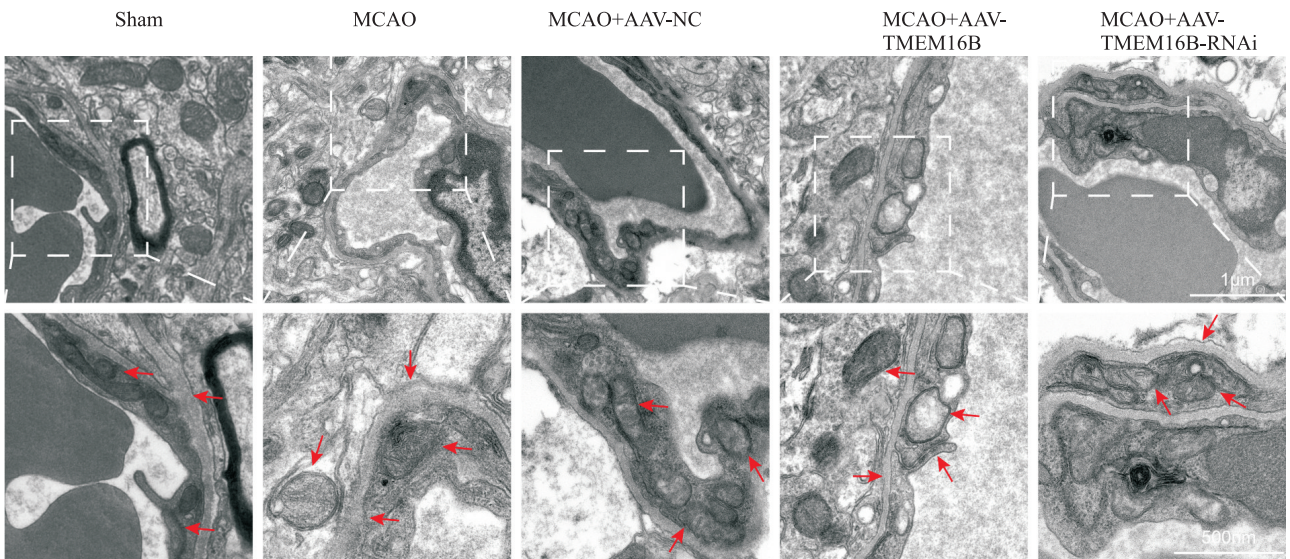


图2 脑组织电镜下观察超微结构

Fig. 2 Observation of ultrastructure of brain tissue under electron microscopy

Scale bar (up): 1 μm; scale bar (down): 500 nm; red arrows point to mitochondria, basement membrane, and tight junction.

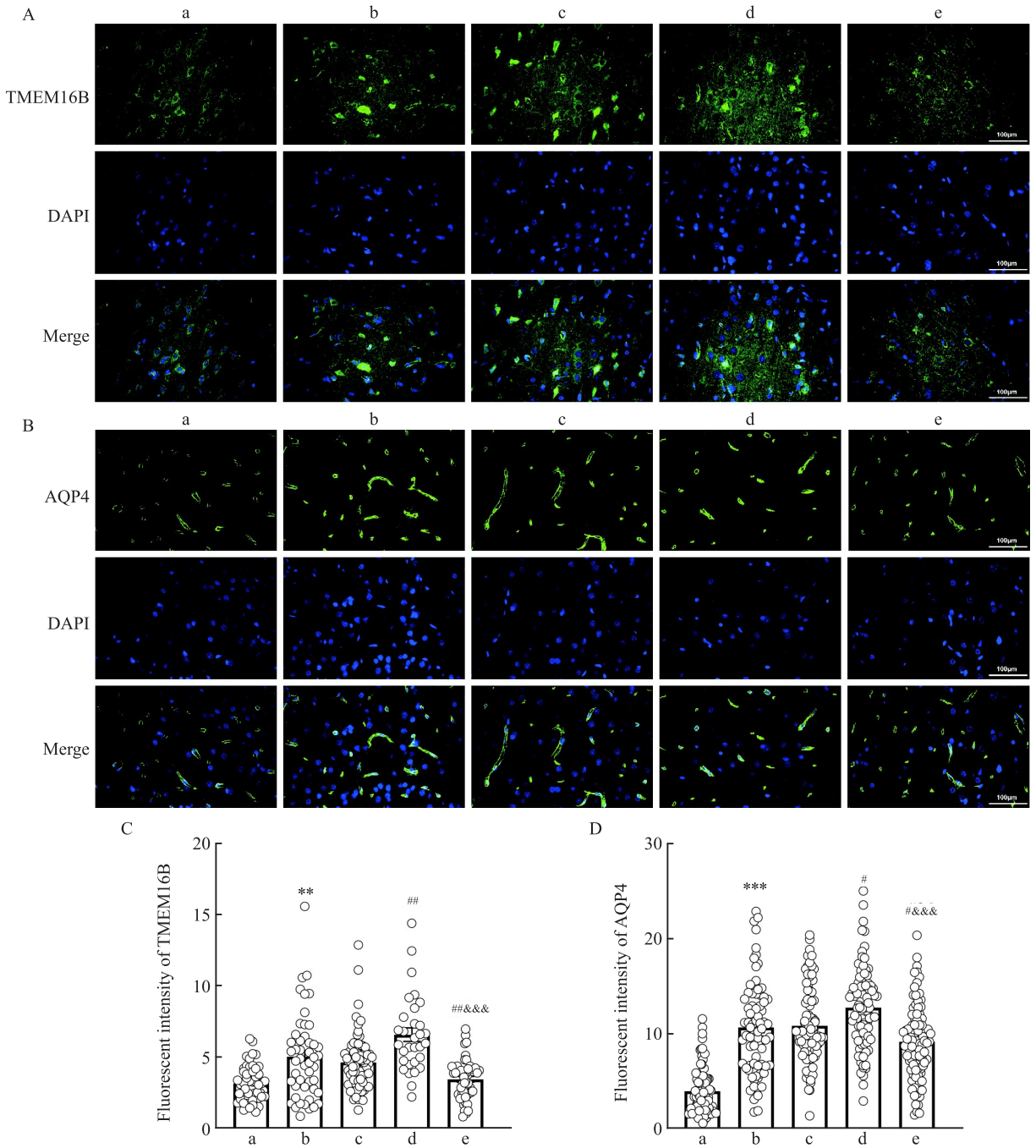


图3 TMEM16B和AQP4免疫荧光染色结果

Fig. 3 Immunofluorescence staining results of TMEM16B and AQP4

A: Immunofluorescence staining of TMEM16B ×400; B: Immunofluorescence staining of AQP4 ×400; C: Quantitative analysis of TMEM16B expression; D: Quantitative analysis of AQP4 expression; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO+AAV-NC group; d: MCAO+AAV-TMEM16B group; e: MCAO+AAV-TMEM16B-RNAi group; ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs Sham group; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs MCAO+AAV-NC group; &&&*P*<0.001 vs MCAO+AAV-TMEM16B group.

义;与过表达组比较,敲低组中AQP4蛋白水平下降(*P*<0.001)。见图4。

2.6 TMEM16B过表达对大鼠血脑屏障损伤的影响

2.6.1 TMEM16B过表达对大鼠损伤处脑组织中Claudin5表达的影响

造模后与Sham组相比,Claudin5

的表达量减少(*P*<0.001),而与空载组之间差异无统计学意义。在Western blot实验中,过表达组的Claudin5含量相较于空载组含量减少(*P*<0.01),而敲低组和空载组之间Claudin5蛋白含量差异无统计学意义;同时相较于过表达组,敲低组Claudin5蛋白量增加(*P*<0.001)。而在免疫荧光实验中,相比

表1 TMEM16B与AQP4的免疫荧光强度结果(AU, $\bar{x} \pm SEM, n=3$)

Tab. 1 Immunofluorescence intensity results of TMEM16B and AQP4 (AU, $\bar{x} \pm SEM, n=3$)

| Group | TMEM16B | AQP4 |
|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Sham | 3.19 ± 0.17 | 4.00 ± 0.25 |
| MCAO | 5.08 ± 0.43** | 10.67 ± 0.55*** |
| MCAO+AAV-NC | 4.68 ± 0.24 | 10.84 ± 0.42 |
| MCAO+AAV-TMEM16B | 6.62 ± 0.48## | 12.73 ± 0.44# |
| MCAO+AAV-TMEM16B-RNAi | 3.50 ± 0.20###&&& | 9.17 ± 0.40#&&& |
| F value | 15.49 | 64.94 |
| P value | <0.001 | <0.001 |

P<0.01, *P<0.001 vs Sham group; #P<0.05, ##P<0.01 vs MCAO+AAV-NC group; &&&P<0.001 vs MCAO+AAV-TMEM16B group.

于Sham组, MCAO组 Claudin5 荧光水平减少 ($P<0.001$); MCAO组和空载组之间 Claudin5 荧光水平差异无统计学意义; 过表达组与空载组相比, Claudin5 荧光表达水平降低 ($P<0.01$), 敲低组和空载组比较, Claudin5 荧光表达水平升高 ($P<0.001$); 而与过表达组相比, 敲低组的 Claudin5 表达水平增多 ($P<0.001$)。见图4、5和表2。

2.6.2 TMEM16B过表达对大鼠脑损伤处组织中ZO-1表达的影响 Western blot实验结果显示: 与Sham组相比, 造模组 ZO-1 表达量减少 ($P<0.001$); 造模组和空载组 ZO-1 表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$); 相较于空载组, 过表达组 ZO-1 蛋白表达

量降低 ($P<0.05$), 敲低组则表达量上升 ($P<0.001$); 而与过表达组相比, 敲低组 ZO-1 蛋白水平升高 ($P<0.001$)。在免疫荧光实验中, 与Sham组相比, MCAO组的 ZO-1 荧光表达水平下降 ($P<0.05$); MCAO组与空载组 ZO-1 荧光表达水平差异无统计学意义; 与空载组相比, 过表达组 ZO-1 荧光表达水平减少 ($P<0.01$), 敲低组和空载组之间 ZO-1 荧光水平差异则无统计学意义; 而过表达组和敲低组之间, ZO-1 在敲低组中荧光水平增多 ($P<0.001$)。见图4、5和表2。

3 讨论

脑水肿和血脑屏障受损是脑缺血后的常见损伤, 其损伤的严重程度影响着患者的治疗和预后。本研究建立了大鼠MCAO模型, 通过AAV干预目标区域TMEM16B的表达, 进而探究其在大鼠脑缺血再灌注损伤后的作用。本研究结果显示, TMEM16B过表达会加重大鼠MCAO后的神经功能损伤, 加重脑水肿和血脑屏障的损伤; 而敲低TMEM16B的表达, 大鼠的神经功能损伤有所缓解, 脑水肿减轻, 血脑屏障受损减轻。有研究^[9]表明TMEM16B能够调节小脑运动, TMEM16B缺陷的小鼠其运动能力出现了提高, 这与本研究中敲低TMEM16B表达能够改善MCAO大鼠的运动功能结果相一致。除此之外, 本研究结果显示TMEM16B的过表达或敲低对

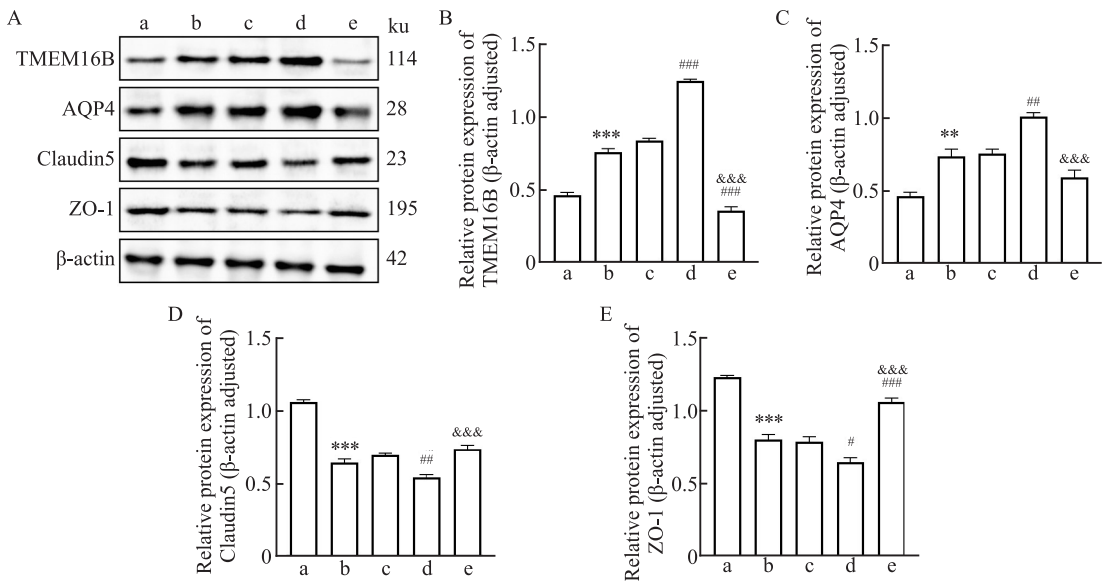


图4 Western blot 实验检测 TMEM16B、AQP4、Claudin5、ZO-1 的表达变化

Fig. 4 Western blot analysis of protein expression of TMEM16B, AQP4, Claudin5, and ZO-1

A: Western blot results; B-E: Comparison of relative expression of TMEM16B, AQP4, Claudin5, ZO-1; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO+AAV-NC group; d: MCAO+AAV-TMEM16B group; e: MCAO+AAV-TMEM16B-RNAi group; **P<0.01, ***P<0.001 vs Sham group; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs MCAO+AAV-NC group; &&&P<0.001 vs MCAO+AAV-TMEM16B group.

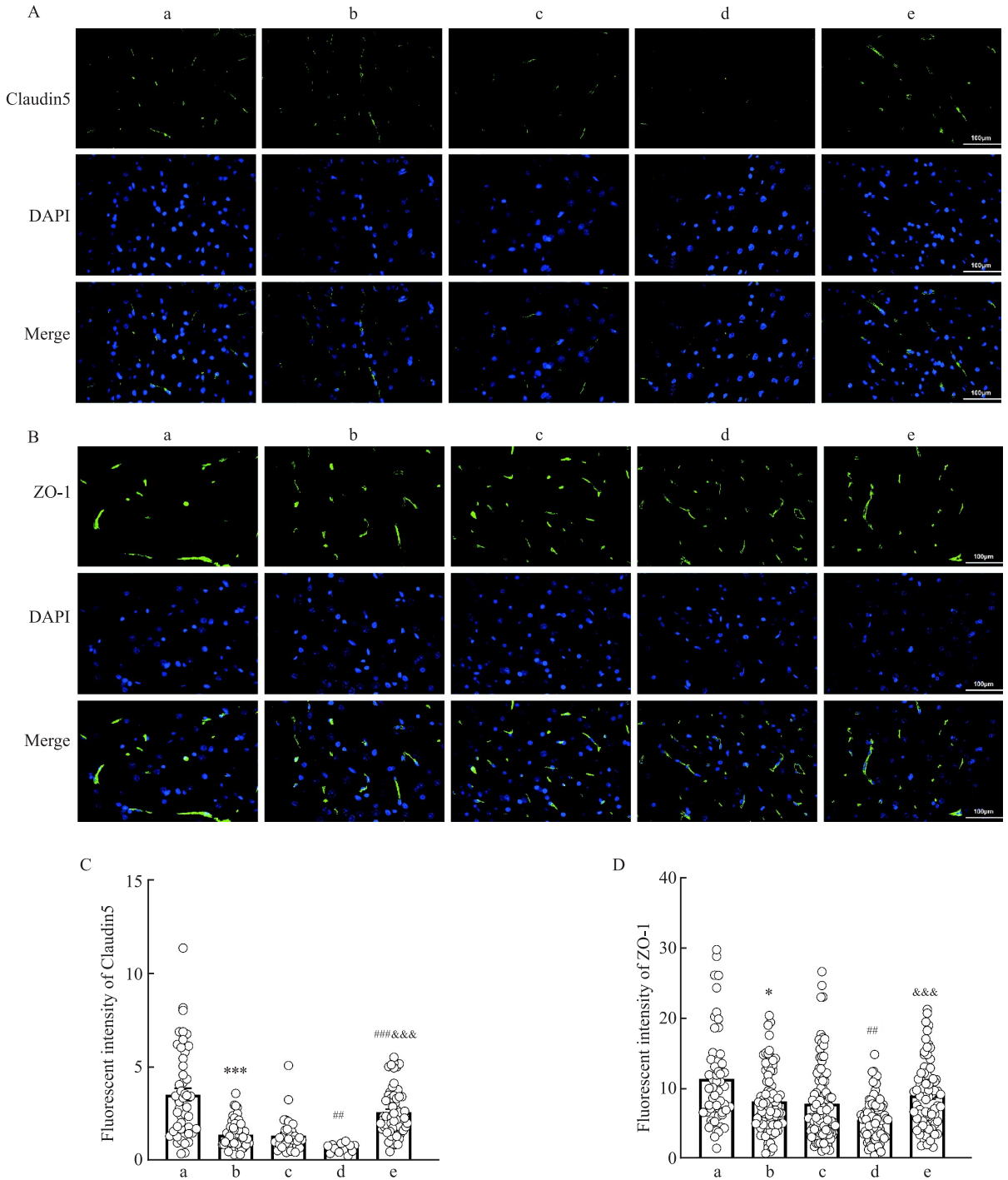


图5 Claudin5和ZO-1免疫荧光染色结果

Fig. 5 Immunofluorescence staining results of Claudin5 and ZO-1

A: Immunofluorescence staining of Claudin5 ×400; B: Immunofluorescence staining of ZO-1 ×400; C: Quantitative analysis of Claudin5 expression; D: Quantitative analysis of ZO-1 expression; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO+AAV-NC group; d: MCAO+AAV-TMEM16B group; e: MCAO+AAV-TMEM16B-RNAi group; **P*<0.05, ****P*<0.001 vs Sham group; ##*P*<0.01, ###*P*<0.001 vs MCAO+AAV-NC group; &&&*P*<0.001 vs MCAO+AAV-TMEM16B group.

MCAO大鼠的运动和感觉功能有着不同的影响,这说明了TMEM16B能够调节大脑中不同神经元中的神经信号传导,进而影响大脑的不同功能^[10]。而其中具体的作用机制,需要进一步深入研究。

目前有关TMEM16B治疗脑卒中的报道和文献较少,其相关报道主要集中于探究TMEM16B在嗅觉^[11]、视觉^[12]、疼痛^[6]、焦虑^[13]等方面的作用。但TMEM16B除了能够影响信号传导之外,其本身还

表2 Claudin5和ZO-1的免疫荧光强度结果 (AU, $\bar{x}\pm SEM, n=3$)Tab. 2 Immunofluorescence intensity results of Claudin5 and ZO-1 (AU, $\bar{x}\pm SEM, n=3$)

| Group | Claudin5 | ZO-1 |
|-----------------------|-----------------|--------------|
| Sham | 3.54±0.34 | 11.43±0.89 |
| MCAO | 1.40±0.09*** | 8.20±0.49* |
| MCAO+AAV-NC | 1.37±0.15 | 7.87±0.53 |
| MCAO+AAV-TMEM16B | 0.69±0.06## | 5.55±0.32## |
| MCAO+AAV-TMEM16B-RNAi | 2.61±0.16###&&& | 9.04±0.54&&& |
| F value | 28.68 | 12.61 |
| P value | <0.001 | <0.001 |

* $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs Sham group; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs MCAO+AAV-NC group; &&& $P<0.001$ vs MCAO+AAV-TMEM16B group.

能够作为离子通道调节离子转运。有研究表明:在脑缺血初期,神经元中的 Ca^{2+} 增加使得 Cl^- 通道打开,神经元发生去极化以及 Cl^- 的大量摄取导致神经元肿胀并且细胞外液减少^[14];进展至中期时,在低ATP和胞内 Ca^{2+} 的刺激下,非选择性的阳离子通道开放,导致血脑屏障对 Na^+ 、 K^+ 的通透性增加,再加上 Cl^- 的持续渗入^[15],使得缺血发生后数小时中,血脑屏障的通透性发生改变。而TMEM16B作为一种钙激活氯通道,能够在该过程中发挥作用。这与本研究中的TMEM16B表达过多会加重大鼠脑缺血再灌注损伤后脑水肿,增加血脑屏障通透性的结果相一致。

综上所述,该研究表明,敲低TMEM16B的表达能够减轻大鼠脑缺血再灌注损伤后脑水肿并减轻血脑屏障损伤。这一发现为围术期脑卒中患者进行神经保护提供了新的目标靶点和理论依据。但该研究并未通过膜片钳及电生理实验对TMEM16B通道的开放情况进行验证,未检测脑缺血损伤后 Ca^{2+} 浓度变化, TMEM16B对脑水肿和血脑屏障的作用机制尚不清楚。缺血受损处神经元的电信号变化、TMEM16B的作用机制以及TMEM16B对其他细胞如血管内皮细胞、神经胶质细胞在脑缺血状态时的影响还需要进一步探究。

参考文献

[1] Owolabi M O, Thrift A G, Mahal A, et al. Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action [J]. Lancet Public Health, 2022, 7 (1) : e74-e85. doi: 10.1016/S2468-2667(21)00230-9.

[2] Sporns P B, Fullerton H J, Lee S, et al. Current treatment for childhood arterial ischaemic stroke [J]. Lancet Child Adolesc Health, 2021, 5 (11) : 825-36. doi: 10.1016/S2352-4642(21)

00167-X.

[3] Ajoalabady A, Wang S, Kroemer G, et al. Targeting autophagy in ischemic stroke: from molecular mechanisms to clinical therapeutics [J]. Pharmacol Ther, 2021, 225: 107848. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107848.

[4] Dibattista M, Pifferi S, Hernandez-Clavijo A, et al. The physiological roles of anoctamin2/TMEM16B and anoctamin1/TMEM16A in chemical senses [J]. Cell Calcium, 2024, 120: 102889. doi:10.1016/j.ceca.2024.102889.

[5] Al-Hosni R, Agostinelli E, Ilkan Z, et al. Pharmacological profiling of small molecule modulators of the TMEM16A channel and their implications for the control of artery and capillary function [J]. Br J Pharmacol, 2025, 182 (8) : 1719-40. doi: 10.1111/bph.17383.

[6] Arreola J, López-Romero A E, Pérez-Cornejo P, et al. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and cholesterol regulators of the calcium-activated chloride channels TMEM16A and TMEM16B [J]. Adv Exp Med Biol, 2023, 1422: 279-304. doi: 10.1007/978-3-031-21547-6_10.

[7] Petrova M, Lissanova M, Tisonova J, et al. Ca^{2+} -dependent Cl^- channels in vascular tone regulation during aging [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(10) : 5093. doi:10.3390/ijms25105093.

[8] Huang H, Li H, Zhang Y, et al. Simultaneous monitoring of tyrosinase and ATP in thick brain tissues using a single two-photon fluorescent probe [J]. Adv Sci, 2025, 12 (19) : e2413220. doi: 10.1002/adv.202413220.

[9] Auer F, Franco Taveras E, Klein U, et al. Anoctamin 2-chloride channels reduce simple spike activity and mediate inhibition at elevated calcium concentration in cerebellar Purkinje cells [J]. PLoS One, 2021, 16 (3) : e0247801. doi: 10.1371/journal.pone.0247801.

[10] Lee D, Lim H, Lee J, et al. Intracellular loop in the brain isoforms of anoctamin 2 channels regulates calcium-dependent activation [J]. Exp Neurobiol, 2023, 32 (3) : 133-46. doi: 10.5607/en22045.

[11] Reisert J, Pifferi S, Guarneri G, et al. The Ca^{2+} -activated Cl^- channel TMEM16B shapes the response time course of olfactory sensory neurons [J]. J Physiol, 2024, 602(19) : 4889-905. doi: 10.1113/JP286959.

[12] Guarascio D M, Gonzalez-Velandia K Y, Hernandez-Clavijo A, et al. Functional expression of TMEM16A in taste bud cells [J]. J Physiol, 2021, 599(15) : 3697-714. doi:10.1113/JP281645.

[13] Yarotsky V, Lark A R S, Nass S R, et al. Chloride channels with $ClC-1$ -like properties differentially regulate the excitability of dopamine receptor D1- and D2-expressing striatal medium spiny neurons [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 322(3) : C395-409. doi:10.1152/ajpcell.00397.2021.

[14] Hladky S B, Barrand M A. Alterations in brain fluid physiology during the early stages of development of ischaemic oedema [J]. Fluids Barriers CNS, 2024, 21 (1) : 51. doi:10.1186/s12987-024-00534-8.

[15] Stokum J A, Shim B, Negoita S, et al. Cation flux through SUR1-

TRPM4 and NCX1 in astrocyte endfeet induces water influx through AQP4 and brain swelling after ischemic stroke [J]. *Sci*

Signal, 2023, 16 (788) : eadd6364. doi: 10.1126/scisignal.add6364.

Knockdown *TMEM16B* reduces brain edema and protects the blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

Zhang Jingbin^{1,2}, Liu Qian¹, Pan Ziyang¹, Yao Tianxi¹, Yin Jiangwen^{1,2}

(¹ Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832003;

² Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases, Shihezi 832003)

Abstract *Objective* To explore the effects of transmembrane protein 16B (TMEM16B) on brain edema and blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Methods* TMEM16B overexpression and knockdown was performed by adeno-associated virus (AAV), and then adult male Sprague-Dawley rats were subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO). Rats were randomly divided into Sham group, MCAO group, AAV no-load group, TMEM16B overexpression group and TMEM16B knockdown group. Modified neurological severity scores, adhesive removal test and cylinder test were used to evaluate neurologic function. The ultrastructure of ischemic brain tissue was observed by transmission electron microscope. Brain water content was reflected by dry wet weight ratio of brain tissue. The expressions of TMEM16B, aquaporin4 (AQP4), Claudin5 and zonula occludens-1 (ZO-1) were investigated by immunofluorescence and Western blot. *Results* Compared with the AAV no-load group, the sensory and motor functions of rats in TMEM16B overexpression group were significantly impaired. Mitochondria were swollen; mitochondrial cristae and tight junctions disappeared. The brain water content was higher in overexpression group. The expression of TMEM16B and AQP4 increased while the expression of Claudin5 and ZO-1 decreased (all $P < 0.05$). Compared with the AAV no-load group, the rats in TMEM16B knockdown group showed some recovery in motor function. The mitochondrial cristae and structure were clear, and the basement membrane was partially blurred. The brain water content was lower in knockdown group. The protein levels of TMEM16B and AQP4 were lower while the levels of Claudin5 and ZO-1 were higher in TMEM16B knockdown group than in AAV no-load group (all $P < 0.05$). *Conclusion* An increase in TMEM16B expression aggravates brain edema and blood-brain barrier damage in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury, while a decrease in TMEM16B expression alleviates brain edema and protects the blood-brain barrier.

Key words transmembrane protein 16B; cerebral ischemia-reperfusion injury; middle cerebral artery occlusion model; brain edema; blood-brain barrier; neuroprotection

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82160235)

Corresponding author Yin Jiangwen, E-mail: yjw6654328@163.com