

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.14.005

## TRPM7 在七氟烷预处理抑制大鼠氧糖剥夺海马神经元凋亡和炎症反应中的作用\*

巩红岩<sup>1</sup>, 郑芳<sup>2</sup>, 左志超<sup>1</sup>, 刘景景<sup>3</sup>, 王庆志<sup>3</sup>, 赵国安<sup>3△</sup>

(1. 新乡医学院第一附属医院:1. 麻醉科;2. 超声科;3. 心脏研究中心, 河南新乡 453000)

**[摘要]** **目的** 探讨瞬时受体电位通道 M7 (TRPM7) 在七氟烷 (Sev) 预处理抑制大鼠氧糖剥夺 (OGD) 海马神经元凋亡和炎症反应中的作用。**方法** 选择出生 1 d 的 SD 大鼠 50 只, 提取海马神经元, 将其分为 5 组, 包括对照组、Sev 预处理组 (Sev 组)、OGD 组、Sev 预处理 + OGD 组 (Sev + OGD 组) 和 Sev 预处理 + 缓激肽 + OGD 组 (联合组)。缺糖缺氧 1.5 h 后复糖复氧, 再正常培养 24 h 后制备 OGD 模型。对照组海马神经元仅做正常培养; Sev 组海马神经元行 2% Sev 预处理 1 h; OGD 组海马神经元仅制备 OGD 模型; Sev + OGD 组神经元行 2% Sev 预处理 1 h, 24 h 后制备 OGD 模型; 联合组神经元 Sev 预处理同时在培养基中加入缓激肽 (终浓度 200  $\mu\text{mol/L}$ ), 其余处理同 Sev + OGD 组。正常培养 24 h 后, 检测海马神经元 TRPM7 mRNA 和蛋白表达水平、存活率和凋亡率、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的 mRNA 及上清蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, OGD 组海马神经元 TRPM7 mRNA 及蛋白表达水平、凋亡率、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而存活率明显降低 ( $P < 0.05$ )。与 OGD 组比较, Sev 组海马神经元 TRPM7 mRNA 及蛋白表达水平、凋亡率、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而存活率明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 Sev 组比较, 联合组海马神经元 TRPM7 mRNA 及蛋白表达水平、凋亡率、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而存活率显著降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** Sev 预处理可通过缓解神经元 TRPM7 过度表达, 减轻 OGD 后海马神经元凋亡和炎症反应。

**[关键词]** 瞬时受体电位通道 M7; 麻醉药, 吸入; 七氟烷; 缺血预处理; 炎症反应**[中图分类号]** R33-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)14-1857-05

### Role of TRPM7 in sevoflurane preconditioning for inhibiting hippocampal neurons apoptosis and inflammatory responses induced by oxygen-glucose deprivation in rat\*

GONG Hongyan<sup>1</sup>, ZHENG Fang<sup>2</sup>, ZUO Zhichao<sup>1</sup>, LIU Jingjing<sup>3</sup>, WANG Qingzhi<sup>3</sup>, ZHAO Guoan<sup>3△</sup>

(1. Department of Anesthesiology; 2. Department of Ultrasound; 3. Heart Research Center, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henna 453000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) in sevoflurane preconditioning for inhibiting hippocampal neurons apoptosis and inflammation response induced by oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** Fifty SD rats of postnatal 1 d were selected for extracting hippocampal neurons and randomly divided into 5 groups, including the control group (C), sevoflurane preconditioning group (Sev), OGD group, Sev preconditioning + OGD group (Sev + OGD) and Sev preconditioning + bradykinin + OGD group (combined group). After 1.5 h oxygen-glucose deprivation, reintroduction was performed, and then the normal culture was performed again for preparing the OGD model. Hippocampal neurons in the control group were normally cultured only; which in the Sev group conducted 2% Sev preconditioning for 1 h; which in the OGD group only prepared the OGD model; which in the Sev + OGD conducted 2% Sev preconditioning for 1 h, and prepared the OGD model after 24 h; which in the combined group was simultaneously added with bradykinin (final concentration 200  $\mu\text{mol/L}$ ) in Sev preconditioning, other treatment was same to that in the Sev + OGD group. After 24 h normal culture, the mRNA and protein levels of TRPM7, apoptosis rate, survival rate, mRNA and supernatant protein levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of the hippocampal neurons were detected. **Results** Compared with the control group, hippocampal neurons mRNA and protein levels of TRPM7, apoptosis rate, mRNA and supernatant protein levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the OGD group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), whereas the survival rate was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the OGD group, hippocampal neurons mRNA and protein levels of TRPM7, apoptosis rate, mRNA and supernatant protein levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the Sev group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), whereas the

\* 基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (20120426)。 作者简介: 巩红岩 (1980-), 副主任医师, 硕士, 主要从事临床麻醉与器官保护的 研究。 △ 通信作者, E-mail: 13462371221@163.com。

survival rate was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the Sev group, hippocampal neurons mRNA and protein levels of TRPM7, apoptosis rate, the mRNA and supernatant protein levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the combined group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), whereas the survival rate was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sev preconditioning can attenuate hippocampal neurons apoptosis and inflammatory response after OGD via alleviating the overexpression of TRPM7.

**[Key words]** transient receptor potential melastatin 7; anesthetics, inhalation; sevoflurane; ischemic preconditioning; inflammation

近年来大量研究表明,吸入麻醉药预处理具有明显的脑保护作用,尤其是七氟烷(sevoflurane, Sev)<sup>[1-3]</sup>。脑缺血动物模型中,Sev 预处理可明显减少缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)造成的细胞凋亡和神经炎症反应<sup>[1-3]</sup>。然而,Sev 预处理作用的具体机制尚不明确。钙稳态失衡在脑缺血后神经元凋亡和兴奋性细胞毒性中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。而近期研究表明,脑 IRI 后瞬时受体电位通道 M7 (transient receptor potential melastatin 7, TRPM7)可过度表达并通过诱发 Ca<sup>2+</sup> 过度内流加重神经元损伤或凋亡<sup>[5-7]</sup>。因此,TRPM7 已成为治疗脑缺血性损伤的重要靶点<sup>[7-8]</sup>。但 Sev 预处理是否通过缓解 TRPM7 过度表达发挥脑保护作用尚不清楚。本实验通过建立原代大鼠海马神经元氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)模型,探讨 TRPM7 在 Sev 预处理后抑制大鼠 OGD 海马神经元凋亡和炎症反应中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** (1)动物:选择出生 1 d 内的新生 SD 大鼠 50 只,体质量 50 g,由新乡医学院实验动物中心提供。(2)主要仪器与试剂:Sev(批号:10013131)购自江苏恒瑞医药有限公司;高糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基、无糖 DMEM 培养基、B27、马血清购自美国 Gibco 公司;缓激肽(批号:90834)、四甲基偶氮唑盐(MTT,批号:M2128)购自美国 Sigma 公司;原位缺口末端标记(TUNEL)试剂盒(批号:AKP1684817)购自瑞士 Roche 公司;白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(批号分别为 EK0398、EK0527)购自武汉博士德生物有限公司;反转录试剂盒(批号:DRR047A)购自日本 TakaRa 公司;抗 TRPM7 抗体(批号:ab109438)购自美国 Abcam 公司;抗  $\beta$ -actin 抗体(批号:BM0627)购自武汉博士德生物有限公司;荧光显微镜(型号:DM2500)购自美国 Leica 公司;酶标仪、凝胶成像系统购自美国 Bio Rad 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠海马神经元培养** 参照文献[9-11]方法,提取大鼠海马神经元。75%乙醇消毒后断头处死大鼠,于冰上仔细分离海马组织,将海马组织剪成约 1 mm<sup>3</sup> 的小块后加入 0.125%胰蛋白酶 37℃ 消化 5 min,再加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基洗终

止胰酶消化。离心 6 min(1 000 r/min)后,弃去上清液,重悬细胞并进行细胞计数,以  $6.5 \times 10^5$  个/孔或  $1 \times 10^5$  个/孔的细胞密度分别接种到多聚赖氨酸包被的 6 孔板或 96 孔板中,6 孔板培养板中提前置入盖玻片。细胞培养基为含 2%B27、5%马血清、0.5 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基。细胞在 37℃、5%CO<sub>2</sub>-95%空气的湿润培养箱中培养,观察并记录每天细胞生长状态,每 2~3 天行半量换液,并于培养 3 d 时向培养基中加入终浓度为 10 mmol/L 阿糖胞苷以抑制非神经元的生长。

**1.2.2 OGD 模型的建立** 参照文献[9,12]方法,建立海马神经元 OGD 模型。神经元培养 10 d 后,将细胞培养基换为无糖 DMEM 培养基。再将培养板置于培养箱中,以 5~10 L/min 的流速向缺氧培养箱内吹入含 95%N<sub>2</sub> 和 5%CO<sub>2</sub> 的混合气体,1.5 h 后将培养板取出并换回原来高糖 DMEM 培养基,于原培养箱培养 24 h。

**1.2.3 Sev 预处理** 参照文献[2,10]方法,Sev 预处理 24 h 后建立 OGD 模型。将培养的神经元放入培养箱中,麻醉机与培养箱连接后,Sev 挥发罐刻度开到 2%,用含 5%CO<sub>2</sub> 的空气(流速 2 L/min)将 Sev 送入培养箱,1 h 后关闭挥发罐,继续通入空气洗脱 Sev,30 min 后放回原培养箱培养,培养 24 h。

**1.2.4 实验分组** 将神经元细胞随机分为 5 组,包括对照组、Sev 预处理组(Sev 组)、OGD 组、Sev 预处理+OGD 组(Sev+OGD 组)和 Sev 预处理+缓激肽+OGD(联合组)。对照组海马神经元仅做正常培养;Sev 组海马神经元行 2%Sev 预处理;OGD 组海马神经元仅制备 OGD 模型;Sev+OGD 组神经元行 2%Sev 预处理后制备 OGD 模型;联合组神经元 Sev 预处理同时在培养基中加入缓激肽(TRPM7 特异性激动剂,终浓度 200  $\mu$ mol/L)<sup>[13]</sup>,其余处理同 Sev+OGD 组。

**1.2.5 MTT 法检测** 将 96 孔板中培养的神经元,各组随机取 10 孔,于正常培养 24 h 后使用 MTT 比色法检测神经元存活率。每孔中加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT,于 37℃、含 5%CO<sub>2</sub>-95%空气的湿润培养箱中反应 4 h。倒出反应液体后,每孔中加入 100  $\mu$ L 的二甲基亚砜(DMSO),反应 10 min 至蓝紫色结晶完全溶解,用酶标仪在 570 nm 波长测得吸光度( $OD_{570 nm}$ )值,计算神经元相对存活率<sup>[14]</sup>:

存活率 = (实验组  $OD_{570}$  / 对照组  $OD_{570}$ )  $\times$  100% (1)

**1.2.6 TUNEL 凋亡染色法** 参照文献[12]方法, 将 6 孔板中各组培养的神经元, 随机取 5 孔, 采用末端脱氧核糖苷酸转移酶介导的 TUNEL 法检测神经元凋亡。室温下 4% 多聚甲醛固定神经元 30 min 后, 加新鲜配制的破膜液 (含 0.2% TritonX-100) 处理 3 min。按厂家操作说明配制 TUNEL 反应液 (TdT 酶 : FITC 荧光标记溶液为 1 : 9), 每孔加入反应混合液 40~50  $\mu$ L, 并于 37  $^{\circ}$ C 的暗箱内孵育 1 h。使用含二脒苯基基吡啶 (DAPI) 水溶性封片剂封片。荧光显微镜下每个样本随机选 5 个视野 ( $\times$ 400), DAPI 染色细胞核发蓝色荧光, TUNEL 染色凋亡细胞发绿色荧光, 计算神经元凋亡率:

凋亡率 = (阳性凋亡细胞 / 细胞总数)  $\times$  100% (2)

**1.2.7 Western blot 检测** 正常培养 24 h 后, 将 6 孔板中培养的神经元, 各组随机取 6 孔, 使用 Western blot 法检测神经元 TRPM7 的表达水平。各组细胞培养板中加入裂解液, 细胞刮刮下细胞, 裂解产物用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。加入 5  $\times$  十二烷基硫酸钠 (SDS) 上样缓冲液, 沸水中煮 8~10 min 后自然冷却, 然后行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 并将蛋白转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。PVDF 膜在含 2% 胎牛血清封闭液中室温封闭 1 h 后, 浸于稀释的一抗 (抗 TRPM7 抗体, 1 : 1 000; 抗  $\beta$ -actin 抗体, 1 : 500) 中 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天, TBST 液洗涤 5 min  $\times$  3 次后, 浸于稀释的相应生物二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h, TBST 液洗涤 5 min  $\times$  3 次后行增强化学发光法 (ECL) 显色, 在凝胶成像系统中成像, 并用 Image Lab 3.0 软件进行灰度分析。

**1.2.8 实时定量 PCR (RT-PCR) 检测** 参照文献 [15] 方法, 将 6 孔板中培养的神经元, 各组随机取 6 孔, 采用 RT-PCR 法进行测定 TRPM7 的 mRNA 表达水平, PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。弃去培养液后, 各孔中加入 Trizol 反复吹打, 以保证细胞充分裂解。之后, 提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 取产物 5  $\mu$ L 参照 Takara 公司试剂盒说明书进行 RT-PCR 操作。TRPM7 上游引物: 5'-GCA AAT GAC TCC ACT CTC-3'; 下游引物: 5'-GAT TCT CTC TCA CTC CCA G-3', 扩增片段长度 422 bp<sup>[16]</sup>。IL-1 $\beta$  上游引物: 5'-GTG GGG ATG ATG ACG ACC-3'; 下游引物: 5'-TAC GAC CAG AGG CAT ACA GG-3', 扩增片段长度 241 bp<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  上游引物: 5'-AAC TGG CAG AGG AGG CG-3'; 下游引物: 5'-CAG AAG AGC GTG GTG GC-3', 扩增片段长度为 115 bp<sup>[15]</sup>。 $\beta$ -actin 上游引物: 5'-GAC GAT ATC GCT GCG CTG-3'; 下游引物: 5'-GTA CGA CCA GAG GCA TAC AGG-3', 扩增片段长度 348 bp<sup>[17]</sup>。采用 SYBR Green 荧光定量试剂盒进行 PCR 反应, 反应体系为 10  $\mu$ L。反应扩增条件为: 95

$^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 8 s, 65  $^{\circ}$ C 退火, 65  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。参照文献 [18] 的方法, 获得 TRPM7、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与  $\beta$ -actin mRNA 的 CT 值, 以实验组目的基因相对于对照组的表达量即  $2^{-\Delta\Delta C_T} = -(\Delta C_{T\text{实验组}} - \Delta C_{T\text{对照组}})$ ;  $\Delta C_T = C_{T\text{目的基因}} - C_{T\beta\text{-actin}}$  反映其表达水平。

**1.2.9 ELISA 法测定神经元 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  释放水平** 正常培养 24 h 后, 将 96 孔板中培养的神经元, 各组随机取 6 孔, 收集神经元培养上清液, 采用 ELISA 法测定 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  释放水平。根据厂家说明书, 在新的 96 孔板中分别加入各组神经元培养上清或不同浓度标准品。先后加入生物素化抗体工作液、酶结合工作液及显色剂。加入终止液之后轻轻震荡, 即可测量  $OD_{450\text{ nm}}$ 。根据标准品的 OD 分别绘制标准曲线后, 计算各个样本上清液中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的蛋白水平。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

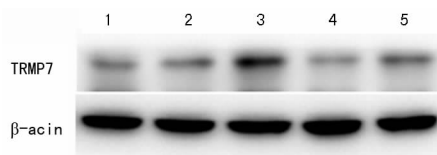
## 2 结 果

**2.1 各组大鼠海马神经元 TRPM7 mRNA 和蛋白表达水平比较** 与对照组比较, OGD 组海马神经元 TRPM7 mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 OGD 组比较, Sev 组海马神经元 TRPM7 mRNA 及蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。与 Sev 组比较, 联合组海马神经元 TRPM7 mRNA 及蛋白表达水平较高 ( $P < 0.05$ ), 见表 1、图 1。

表 1 各组海马神经元 TRPM7 mRNA 和蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	TRPM7 mRNA	TRPM7 蛋白 ( $\mu$ g/mL)
对照组	100.0 $\pm$ 20.7	100.0 $\pm$ 16.5
Sev 组	96.0 $\pm$ 23.4	106.1 $\pm$ 22.7
OGD 组	216.1 $\pm$ 52.6 <sup>a</sup>	162.6 $\pm$ 34.0 <sup>a</sup>
Sev+OGD 组	129.3 $\pm$ 29.0 <sup>b</sup>	111.1 $\pm$ 18.5 <sup>b</sup>
联合组	194.9 $\pm$ 33.5 <sup>c</sup>	150.5 $\pm$ 27.8 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 OGD 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 Sev+OGD 组比较



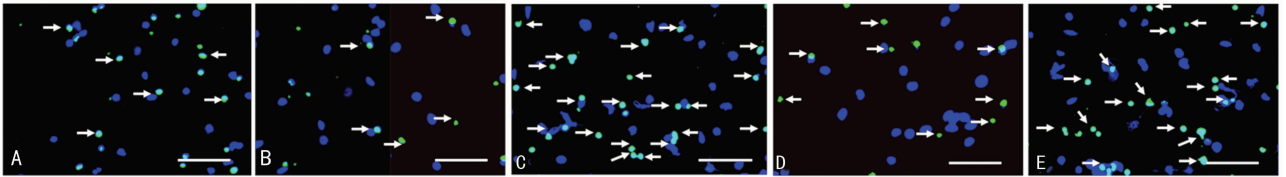
1: 对照组; 2: Sev 组; 3: OGD 组; 4: Sev+OGD 组; 5: 联合组。

图 1 各组大鼠海马神经元 TRPM7 蛋白表达水平

**2.2 各组大鼠海马神经元存活及凋亡率比较** 与对照组比较, OGD 组海马神经元存活率明显降低, 而凋亡率明显增高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 OGD 组比较, Sev 组海马神经元存活率较高, 而凋亡率明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 Sev 组比较, 联合组海马神经元存活率明显降低, 而凋亡率明显增

加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2、图 2。

**2.3 各组大鼠海马神经元 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平的比较** 与对照组比较,OGD 组海马神经元 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平均增高( $P < 0.05$ )。与 OGD 组比较,Sev 组海马神经元 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.05$ )。与 Sev 组比较,联合组海马神经元 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平均较高( $P < 0.05$ ),见表 3。



A: 对照组; B: Sev 组; C: OGD 组; D: Sev+OGD 组; E: 联合组。

图 2 各组大鼠海马神经元 TUNEL 阳性凋亡细胞显示(白色箭头所指,  $\times 400$ )

表 3 各组大鼠海马神经元 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 及上清蛋白表达水平的比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	mRNA		上清蛋白表达( $\mu\text{g/mL}$ )	
	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
对照组	100.0 $\pm$ 22.9	100.0 $\pm$ 24.4	70.2 $\pm$ 16.9	82.4 $\pm$ 15.4
Sev 组	109.6 $\pm$ 28.1	96.7 $\pm$ 22.5	72.5 $\pm$ 19.5	88.2 $\pm$ 23.1
OGD 组	214.5 $\pm$ 55.6 <sup>a</sup>	179.2 $\pm$ 33.6 <sup>a</sup>	172.3 $\pm$ 33.8 <sup>a</sup>	162.4 $\pm$ 35.4 <sup>a</sup>
Sev+OGD 组	142.3 $\pm$ 25.8 <sup>b</sup>	113.5 $\pm$ 21.8 <sup>b</sup>	100.8 $\pm$ 25.6 <sup>b</sup>	97.2 $\pm$ 16.7 <sup>b</sup>
联合组	179.5 $\pm$ 20.9 <sup>c</sup>	155.8 $\pm$ 25.8 <sup>c</sup>	142.8 $\pm$ 38.4 <sup>c</sup>	149.3 $\pm$ 24.4 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 OGD 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 Sev+OGD 组比较

### 3 讨论

本实验研究结果表明,Sev 预处理可缓解 OGD 后海马神经元 TRPM7 过度表达,并减轻凋亡和炎症因子释放。而 TRPM7 特异性激动剂缓激肽可逆转 Sev 预处理的抗炎及抗凋亡作用,说明 Sev 预处理的保护作用可能与抑制 OGD 后海马神经元 TRPM7 的过度表达相关。

Sev 预是临床上常用的吸入麻醉药,具有起效快、苏醒快等优点,且其脑保护也得到了广泛关注<sup>[1-2,19-20]</sup>。大鼠中 Sev 的最低肺泡有效浓度(MAC)为 2%<sup>[21]</sup>,1 MAC Sev 预处理 1 h 已在体外脑和心肌 IRI 模型中应用<sup>[20-21]</sup>。而海马组织对于缺血缺氧最为敏感。因此,本研究于 OGD 模型建立前 24 h,使用 2% Sev 处理海马神经元 1 h,作为 Sev 预处理的实验方法。

TRPM7 是一种广泛表达于中枢神经系统的离子通道蛋白,在海马神经元有十分重要的功能调节作用<sup>[7]</sup>。在缺血缺氧状态下,氧自由基可通过激活或上调海马神经元 TRPM7 介导过度的神经元 Ca<sup>2+</sup> 内流,进而导致细胞毒性和细胞凋亡<sup>[7,22]</sup>。本研究结果表明,OGD 模型后海马神经元 TRPM7 mRNA 和蛋白表达水平明显升高,且细胞凋亡明显增多,细胞存活率明显降低。而 Sev 预处理不仅可缓解 OGD 后的神经元凋亡,亦可下调 TRPM7 mRNA 和蛋白表达水

表 2 各组大鼠海马神经元存活及凋亡率比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	神经元相对存活率( $n=10$ )	神经元凋亡率( $n=6$ )
对照组	100.0 $\pm$ 14.5	11.6 $\pm$ 1.9
Sev 组	98.2 $\pm$ 14.4	12.0 $\pm$ 2.7
OGD 组	42.7 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	62.5 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>
Sev+OGD 组	87.4 $\pm$ 11.1 <sup>b</sup>	25.4 $\pm$ 6.2 <sup>b</sup>
联合组	52.9 $\pm$ 6.5 <sup>c</sup>	55.2 $\pm$ 9.4 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 OGD 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 Sev+OGD 组比较

平。说明 OGD 后 Sev 预处理的神经元保护作用,可能与其下调 TRPM7 的效果相关。而进一步实验证实,TRPM7 的特异性激动剂缓激肽可逆转 Sev 预处理的抗凋亡和神经元保护作用,说明 Sev 预处理可通过减少 OGD 后海马神经元 TRPM7 的过度表达,发挥抗凋亡和神经元保护作用。

抗炎作用亦是 Sev 预处理脑保护作用的重要机制<sup>[2]</sup>。本研究结果表明,OGD 可诱发海马神经元 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等促炎因子 mRNA 和上清蛋白表达水平明显升高,而 Sev 预处理可缓解 OGD 诱发的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  释放。而 TRPM7 的特异性激动剂缓激肽可逆转 Sev 的这种抗炎作用,说明 Sev 预处理可通过减少 OGD 后海马神经元 TRPM7 的过度表达发挥其抗炎作用。

综上所述,Sev 预处理可通过缓解神经元 TRPM7 过度表达,减轻 OGD 后海马神经元凋亡和炎症反应。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] WANG H, LU S, YU Q, et al. Sevoflurane precondition-

- ing confers neuroprotection via anti-inflammatory effects [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3(2):604-615.
- [3] 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.
- [4] SZYDLOWSKA K, TYMIANSKI M C. Ischemia and excitotoxicity [J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(2):122-129.
- [5] JIANG H, TIAN S L, ZENG Y, et al. TrkA pathway(s) is involved in regulation of TRPM7 expression in hippocampal neurons subjected to ischemic-reperfusion and oxygen-glucose deprivation [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 76(1/2):124-130.
- [6] CLAPHAM D E. TRP channels as cellular sensors [J]. *Nature*, 2003, 426(6966):517-524.
- [7] AARTS M M, TYMIANSKI M. TRPM7 and ischemic CNS injury [J]. *Neuroscientist*, 2005, 11(2):116-123.
- [8] BAE CY, SUN H S. TRPM7 in cerebral ischemia and potential target for drug development in stroke [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(6):725-733.
- [9] GE Q F, HU X, MA Z Q, et al. Baicalin attenuates oxygen-glucose deprivation-induced injury via inhibiting NMDA receptor-mediated 5-lipoxygenase activation in rat cortical neurons [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(2):148-157.
- [10] 邵建林, 万晓红, 王雁, 等. HO-1 在七氟烷预处理抑制大鼠氧糖剥夺海马神经元凋亡中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(4):484-487.
- [11] 邵建林, 万晓红, 曾卫军, 等. 血红素加氧酶-1 对氧糖剥夺海马神经元 CDK5-ATM-P53 信号转导通路的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(6):732-735.
- [12] LIU D, ZHANG H, GU W J, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on high Glucose-Induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e79399.
- [13] DOU Y L, LI Y, CHEN J K, et al. Inhibition of cancer cell proliferation by midazolam by targeting transient receptor potential melastatin 7 [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(3):1010-1016.
- [14] MAGIERA M M, MORA S, MOJSA B, et al. Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(2):281-292.
- [15] 施庆余, 罗爱林, 李世勇. 异氟烷对发育期大鼠海马 IL-1 $\beta$  mRNA, IL-6 mRNA 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(3):324-326.
- [16] TOUYZ R M, HE Y, MONTEZANO A C, et al. Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290(1):73-78.
- [17] HIROSE K, OKAJIMA K, TAOKA Y, et al. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation [J]. *Ann Surg*, 2000, 232(2):272-280.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [19] KITANO H, KIRSCH J R, HURN P D, et al. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain [J]. *J Cerebral Blood Flow Metabol*, 2007, 27(6):1108-1128.
- [20] WANG J K, YU L N, ZHANG F J, et al. Postconditioning with sevoflurane protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury via PI3K/Akt pathway [J]. *Brain Res*, 2010, 1357(1):142-151.
- [21] OBAL D, DETTWILER S, FAVOCCIA C, et al. The influence of mitochondrial K-ATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo [J]. *Anesth Analg*, 2005, 101(5):1252-1260.
- [22] SUN H S, JACKSON M F, MARTIN L J, et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia [J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(10):1300-1307.

(收稿日期:2017-08-22 修回日期:2018-01-25)

(上接第 1856 页)

- 局的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2016, 28(2):209-212.
- [9] 邹琦, 黄秋凌, 崇立明, 等. 滋肾育胎丸对 SD 大鼠胚胎-胎仔发育的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(3):330-336.
- [10] 周征, 王欣, 舒荣梅. 滋肾育胎丸治疗先兆流产 56 例疗效观察 [J]. *中医药导报*, 2012, 18(1):41-43.
- [11] 刘云肖, 马惠荣, 陈景伟, 等. 滋肾育胎丸对电磁辐射大鼠卵巢组织氧化损伤和 Nrf2 蛋白表达的影响 [J]. *中国药房*, 2016, 27(4):470-473.
- [12] 王汝冰, 周珊珊, 周文, 等. 抗凋亡因子 Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> 蛋白小分子抑制剂研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 2011, 21(2):155-164.
- [13] ALBAMONTE M I, ALBAMONTE M S, STELLA I, et al. The infant and pubertal human ovary: Balbiani's body-associated VASA expression, immunohistochemical detection of apoptosis-related BCL2 and BAX proteins, and DNA fragmentation [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(3):678-706.
- [14] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2):103-107.
- [15] 蔺会兰, 孙晓慧, 刘俊霞, 等. Bcl-2 与卵巢颗粒细胞凋亡相关性研究 [J]. *河北医药*, 2015, 37(9):1316-1319.
- [16] 李婷婷, 连方, 孙振高. 卵巢颗粒细胞凋亡的分子机制及中医相关研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(12):1524-1527.

(收稿日期:2017-08-21 修回日期:2018-01-24)