

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.008

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200311.1124.008.html\(2020-03-11\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200311.1124.008.html(2020-03-11))

TRPM7 离子通道激活介导布比卡因诱导神经毒性的机制研究*

李亚文¹, 宋少良¹, 陈香玲², 苏娇玲¹, 郑 钊¹, 周 龙¹, 苏 涛³, 徐世元^{4△}

(1. 南方医科大学附属深圳妇幼保健院麻醉科, 广东深圳 518028; 2. 广东省深圳市中医院中药房 518033; 3. 广州医科大学神经科学研究所, 广州 510260; 4. 南方医科大学珠江医院麻醉科, 广州 510282)

[摘要] **目的** 探讨瞬时受体电位(TRPM)7 离子通道在布比卡因(BPV)诱导的神经毒性损伤中的作用机制。**方法** 体外培养 SH-SY5Y 细胞分为 4 组, 给予 BPV 和 TRPM7 阻断剂 2-APB 预处理 30 min, 采用 Annexin V 和碘化丙啶染色和细胞计数的方法研究 BPV 的细胞毒性作用, 全细胞膜片钳技术记录 TRPM7 样电流, 研究电流峰值改变。**结果** BPV 对细胞毒性具有浓度依赖特性(细胞凋亡半数有效浓度为 7.6 mmol/L, 细胞死亡半数有效浓度为 111.4 mmol/L)。1 mmol/L BPV 可增强细胞 TRPM7 样的通道电流, 其增强电流可被 2-APB 抵消。BPV 处理组 TRPM7 样的通道电流峰值明显大于对照组($P < 0.05$)。500 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB 处理组与对照组比较, 峰值电流明显下降($P < 0.05$)。TRPM7 样峰值电流对不同浓度 BPV 和 2-APB 具有一定的时间反应性和浓度反应性, 100 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB 即可有效抑制 BPV 诱导的电流增高。2-APB 可明显抑制 BPV 诱导的细胞凋亡($P < 0.05$)。**结论** BPV 的神经毒性机制与 TRPM7 通道的激活有关。

[关键词] 瞬时受体电位; 布比卡因; 神经毒性; SH-SY5Y 细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R97 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)07-1067-05

Mechanism of TRPM7 ion channel underlying the neurotoxicity induced by bupivacaine*

LI Yawen¹, SONG Shaoliang¹, CHEN Xiangling², SU Jiaoling¹,
ZHENG Zhao¹, ZHOU Long¹, SU Tao³, XU Shiyuan^{4△}

(1. Department of Anesthesiology, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518028, China; 2. Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518033, China; 3. Institute of Neuroscience, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China; 4. Department of Anesthesiology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) ion channel underlying the neurotoxicity induced by bupivacaine (BPV). **Methods** In-vitro cultured SH-SY5Y cells were allocated to 4 groups, in which cells were pretreated with BPV and/or TRPM7 selective blocker 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB). The cytotoxic effect of BPV was studied by Annexin V and propiridine iodide staining and cell counting. TRPM7-like current was recorded by whole-cell patch clamp technique, and the peak current change was studied. **Results** BPV is concentration-dependent on cytotoxicity ($EC_{50} = 7.6$ mmol/L for apoptosis, $EC_{50} = 111.4$ mmol/L for cell death). Cells that pretreated with 1 mM BPV significantly increased TRPM7-like current, and the current could be abolished by 2-APB. The peak current of TRPM7-like current in the BPV group was higher than the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the peak current of 2-APB (500 $\mu\text{mol/L}$) treatment group decreased significantly ($P < 0.05$). TRPM7-like current showed a rapid response of current amplitude to different concentrations of BPV and 2-APB. 100

* 基金项目: 深圳市科技创新委员会基础研究(自由探索)项目(JCYJ20170307091207527)。 作者简介: 李亚文(1975—), 副主任医师, 博士, 主要从事局麻药物外周和中枢神经毒性研究。 △ 通信作者, E-mail: xsy998@smu.edu.cn。

$\mu\text{mol/L}$ 2-APB effectively inhibit the current increase induced by BPV. 2-APB significantly inhibited the apoptosis induced by BPV. **Conclusion** The neurotoxic mechanism of BPV is related to the activation of TRPM7 channel.

[Key words] transient receptor potential melastatin; bupivacaine; neurotoxicity; SH-SY5Y cell; apoptosis

局部麻醉药是一类局部应用于神经末梢或神经干周围的药物,包括利多卡因、布比卡因(Bupivacaine, BPV)等,它们能暂时、完全和可逆地阻断神经冲动的产生和传导,被广泛用于临床和术后镇痛。然而,局部麻醉药能引起神经毒性,如短暂性神经综合征(TNS)和马尾综合征^[1-2],这引起临床上对其使用的担忧。有研究显示细胞凋亡是局部麻醉药神经毒性损伤的重要机制之一,与细胞内钙超载密切相关^[3]。细胞内钙的调节具有复杂的机制,其中一类重要的阳离子通道超家族——瞬时受体电位(transient receptor potential melastatin, TRPM)通道被认为与细胞内的钙稳态具有密切的联系^[4]。TRPM通道是非选择性阳离子通道,它能允许大部分的二价阳离子通过,包括镁离子、钙离子、锌离子等,这些离子通道都能表达于可兴奋性细胞^[5]。其中神经细胞膜的TRPM7激活被认为对细胞内钙超载具有启动作用,导致神经毒性的发生^[4,6]。然而,BPV对TRPM7通道功能的影响目前仍不清楚。本研究通过体外细胞实验探究TRPM7离子通道在BPV诱导的神经毒性损伤中的作用机制,为局部麻醉药神经毒性防治提供新的思路和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人未分化神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 细胞系购自中国科学院上海生命科学院研究院细胞资源中心;布比卡因盐酸盐、抑制剂 2-APB、Annexin V-FITC 和碘化丙啶均购自美国 Sigma 公司;培养试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;其他常规生化试剂均来自国产供应商分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 SH-SY5Y 细胞培养

SH-SY5Y 细胞接种在含有 15% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM/F12 培养基。培养 3 d 后用不同浓度 BPV(0.01、0.1、1、10、100、1 000 mmol/L) 处理细胞,随后在培养皿中进行细胞毒性的培养,置于 5% 的 CO_2 培养箱 37 $^\circ\text{C}$ 培养,每 2 天换液 1 次,细胞铺满 70% 后给予不同的处理。

1.2.2 细胞凋亡检测

用不同浓度 BPV(0.1、1、10、100、1 000 mmol/L) 在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中预处理低糖培养(5.6 mmol/L Glucose) SH-SY5Y 细胞 30 min。冲洗后利用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶凋亡检测试剂盒染色 5 min 后置于共聚焦显微镜(Leica SP8)下扫描。在 20 倍物镜下随机获取 3 个视野图像,计算视野内细胞总数、Annexin V 阳性细胞和碘化丙啶阳性细胞数。将阳性细胞数除以细胞总数获得阳性细胞比例,并平均 3 个视野的数据以进一步进行统计分析。

1.2.3 TRPM7 样电流记录

将细胞置于膜片钳电生理记录系统(Axon 200B, 美国)中,利用全细胞膜片钳技术记录。玻璃电极电阻 2~5 M Ω ,电极内液:20 mmol/L NaCl、100 mmol/L Na-D-gluconate、1 mmol/L CaCl_2 、10 mmol/L HEPES、11 mmol/L EGTA(pH 7.3),细胞外液:135 mmol/L NaCl、2 mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L MgCl_2 、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L D-glucose (pH 7.4)。串联电阻小于 10 M Ω ,并补偿 90% 以上,钳制电压误差小于 5 mV。根据 TRPM7 样电流激活和失活不具有电压依赖性的特点,建立 -100~100 mV 的 ramp 刺激,研究电流的整流特性。采用两种方案分别研究 BPV 对 TRPM7 样电流的影响:(1)在培养细胞中加入药物[1 mmol/L BPV 和(或)500 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB],分为 BPV 组、2-APB 组、BPV+2-APB 组及正常细胞外液灌流的对照组,在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱预处理 30 min 后,记录电流以研究药物的稳态效应。(2)采用快速灌注的方法在室温中给予 0.1 mmol/L BPV 灌注,灌注 4 min 后,浓度增加至 1 mmol/L,再灌注 4 min 后,加入浓度梯度递增的 2-APB(50、100、500 $\mu\text{mol/L}$),以研究药物的快效应及动态变化。灌注总时间为 30 min,每隔 2 min 记录 1 次电流,总共记录 16 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多重比较应用单因素方差分析和 Bonferroni 检验;浓度反应曲线采用 OriginPro 2017 的浓度剂量反应模型进行拟合,获得半数有效剂量(EC50);以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BPV 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

BPV 对 SH-SY5Y 细胞株的细胞毒性具有浓度

依赖特性,诱导细胞发生凋亡的半数有效浓度为 7.6 mmol/L,而引起细胞死亡的半数有效浓度为 111.4 mmol/L,见图 1。

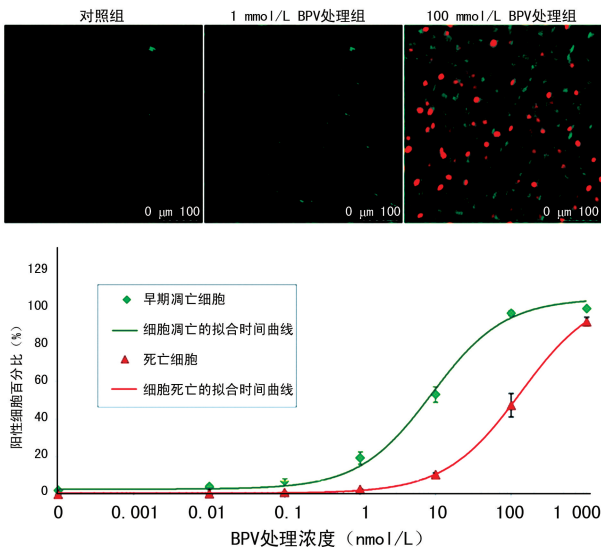
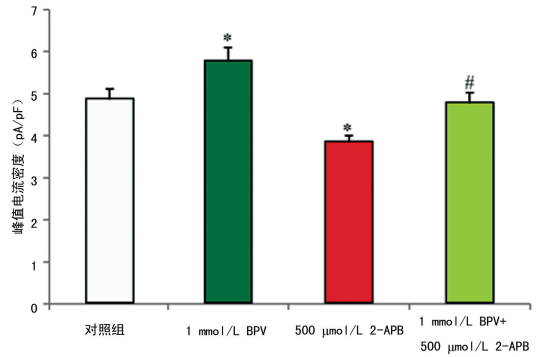


图 1 BPV 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

明显大于对照组 ($t = 2.95, P < 0.05$)。500 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB 处理组与对照组比较,峰值电流明显下降 ($t = -3.30, P < 0.05$),见图 4。快速灌注 BPV 和 2-APB 具有一定的时间反应性和浓度反应性,100 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB 即可有效抑制 BPV 诱导的电流增高,提示 BPV 诱导的电流为 TRPM7 通道所介导,见图 5。



*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与 1 mmol/L BPV 处理组比较。

图 4 不同处理组峰值电流密度比较

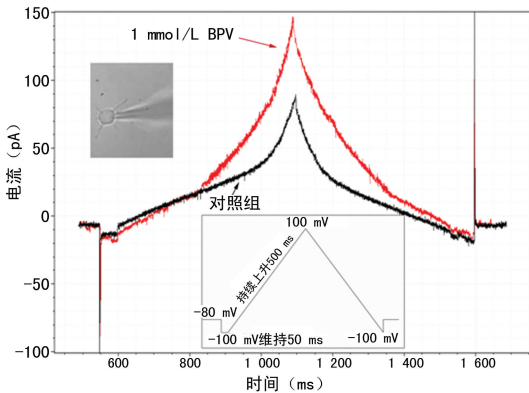


图 2 电压钳记录 SH-SY5Y 细胞 TRPM7 样电流

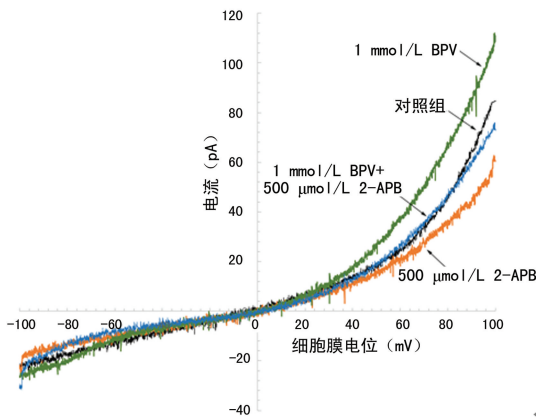
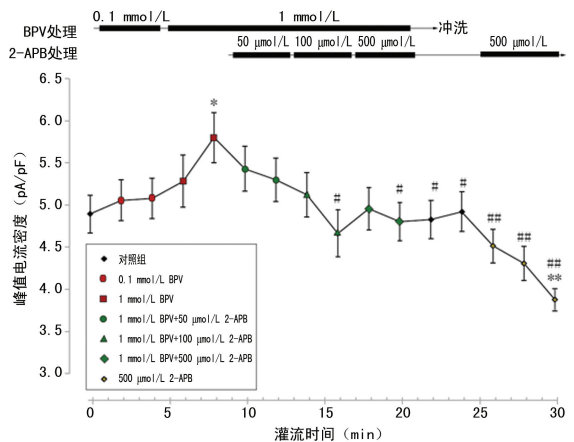


图 3 不同处理组 TRPM7 样电流的 IV 曲线

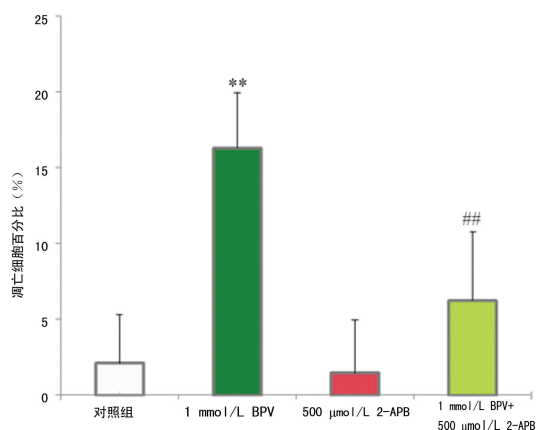


: $P < 0.05$,: $P < 0.01$,与对照组比较;#: $P < 0.01$,与 1 mmol/L BPV 处理组比较。

图 5 2-APB 对 BPV 诱导的 TRPM7 样电流影响

2.2 BPV 对细胞 TRPM7 样电流的影响

1 mmol/L BPV 预处理 30 min 可增强细胞 TRPM7 样的通道电流,见图 2。其增强电流可被 TRPM7 抑制剂 2-APB (500 $\mu\text{mol/L}$) 抵消,见图 3。1 mmol/L BPV 处理组 TRPM7 样的通道电流峰值



** : $P < 0.01$,与对照组比较;#: $P < 0.01$,与 1 mmol/L BPV 处理组比较。

图 6 BPV 和 2-APB 处理对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

2.3 抑制 TRPM7 样电流对 BPV 细胞毒性影响

细胞给予 1 mmol/L BPV 和 500 μ mol/L 2-APB 处理 30 min,用 Annexin V 标记凋亡细胞,在荧光显微镜下计算凋亡细胞比例。结果显示 2-APB 并不诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡,而 2-APB 可明显抑制 BPV 诱导的细胞凋亡,使凋亡细胞比例从(16.3 \pm 3.0)% 下降至(6.2 \pm 2.5)%($t = -4.32, P < 0.05$),见图 6。

3 讨论

局部麻醉剂广泛用于临床患者的硬膜外麻醉,神经阻滞和术后镇痛。然而,这些局部麻醉剂包括利多卡因、BPV、丁卡因、二丁卡因和普鲁卡因均具有一定的神经毒性,可引起神经损伤,甚至可能导致神经系统严重的并发症^[1]。研究提示,这些神经毒性作用是药物特异性的,并具有剂量和时间依赖性^[7-8]。BPV 是一种酰胺型局部麻醉剂,已被证实可诱导细胞凋亡和坏死^[1,7],活性氧(ROS)和乳酸脱氢酶(LDH)的释放^[9-10]。与既往研究结果相符,本研究利用 Annexin V 和碘化丙啶做标记研究 BPV 对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的细胞毒性作用,结果显示药物处理 30 min 诱导发生凋亡的半数有效剂量为 7.6 mmol/L,死亡的半数有效剂量为 111.4 mmol/L。既往报道 1 mmol/L BPV 处理 SH-SY5Y 细胞 6 h 可产生 50% 细胞死亡,细胞死亡率随处理时间增加而增加^[11];而在小鼠来源神经瘤母细胞 N2A 细胞中,0.9 mmol/L BPV 处理 9 h 即可导致 20% 的细胞出现 LDH 的释放^[12]。由此可见,BPV 的细胞毒性与浓度、处理时间、细胞特性有关。

既往研究提示 BPV 诱导的细胞凋亡可能涉及多种机制,包括 MAPK 的激活^[2],ROS 的产生^[13-14],钙稳态的破坏^[3]和 T 型钙通道的过度开放及磷酸化激酶的异常^[11]。近年发现广泛分布于哺乳动物细胞膜的阳离子通道成员 TRPM7 在细胞存活、增殖和发育中起关键作用。TRPM7 是双功能蛋白质,其包含蛋白激酶结构域和瞬时感受器电位离子通道^[5]。TRPM7 的病理生理学意义影响广泛,许多疾病都与 TRPM7 的异常功能或过度表达相关,例如癌症、中风、高血压、神经和心血管系统疾病等。在皮质、海马及周围神经系统中,TRPM7 通道表达丰富^[15],其成为神经元损伤研究的重要候选者。目前,TRPM7 过度激活已被证实在缺氧性神经元死亡起重要的作用。在皮质神经元的氧葡萄糖剥夺(OGD)模型中,TRPM7 通道的激活介导了细胞内 ROS 水平和 Ca²⁺ 内流增加,从而引起神经元 Ca²⁺ 过载导致细胞死亡^[16-17]。在脊髓损伤模型中,TRPM7 通道可通过 Mg²⁺ 依赖性机制介导脊髓神经细胞死亡^[18]。因此,TRMP7 通道是

神经损伤的重要机制,但其是否参与 BPV 的神经毒性作用仍然未知。本实验证实了在 BPV 处理的 SH-SY5Y 细胞中 TRPM7 样的电流明显增加。TRPM7 样电流表现出在膜电位 0 mV 的逆转电位;在极化膜电位下介导较小的内向电流,而在去极化膜电位下显示出明显的外向整流电流。当细胞膜电位在 -80~-40 mV 的生理范围内,TRPM7 向内运输二价阳离子(例如 Ca²⁺ 和 Mg²⁺),从而产生小的内向电流。在正膜电位下,TRPM7 向外输送细胞内阳离子(例如 K⁺),尤其在超过 +50 mV 的电位下,外向单价阳离子通量变得更加明显^[19]。本实验所记录的电流具有上述 TRPM7 通道的电流属性,称之为 TRPM7 样电流。为了进一步阐明 TRPM7 通道的属性,采用 TRPM7 通道抑制剂 2-APB,结果显示 2-APB 可抑制 BPV 诱导的 TRPM7 样电流。为了进一步证实 BPV 和 2-APB 对细胞 TRPM7 样电流的影响,应用快速药物灌注的方法,观察 TRPM7 样电流的药物反应性和时间反应性,结果显示记录的 TRPM7 样电流对 BPV 和 2-APB 均具有一定的浓度依赖性,反应时间大于 2 min,提示 BPV 促进 TRPM7 样电流的机制不是通过直接开放 TRPM7 通道,而是可能通过通道的调节作用,譬如蛋白修饰作用。因为,TRPM7 除了具有依赖膜电位的阳离子通道外,在其 C-末端具有功能性激酶。TRPM7 可以通过代谢应激和细胞内钙的变化来调节,甚至通过 Src 家族激酶,PIP2 和其自身的 α -激酶结构域来调节^[20]。因此,BPV 促进 TRPM7 样电流的机制仍有待进一步的研究。此外,本研究显示 500 μ mol/L 2-APB 仍然无法完全抑制 TRPM7 样电流,提示在 SH-SY5Y 细胞中仍有其他通道可介导 TRPM7 样的电流。在细胞凋亡实验中,发现 500 μ mol/L 2-APB 可明显降低 BPV 诱导的凋亡细胞比例,但并不能完全阻断凋亡的发生,提示 TRPM7 通道的激活只是细胞毒性的部分机制。

综上所述,本研究首次证明了 TRPM7 样电流的增加参与 BPV 的神经毒性机制,TRPM7 将有可能成为减轻局麻药神经毒性反应的药物靶标。

参考文献

- [1] HODGSON P S, NEAL J M, POLLOCK J E, et al. The neurotoxicity of drugs given intrathecally (spinal)[J]. *Anesth Analg*, 1999, 88(4): 797-809.
- [2] LIRK P, HALLER I, COLVIN H P, et al. In vitro, inhibition of mitogen-activated protein

- kinase pathways protects against bupivacaine- and ropivacaine-induced neurotoxicity [J]. *Anesth Analg*, 2008, 106(5): 1456-1364.
- [3] JOHNSON M E, SAEZ J A, DASILVA A D, et al. Effect of local anesthetic on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model[J]. *Anesthesiology*, 2002, 97(6): 1466-1476.
- [4] AARTS M, IIHARA K, WEI W L, et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death[J]. *Cell*, 2003, 115(7): 863-877.
- [5] MONTEILH-ZOLLER M K, HERMOSURA M C, NADLER MONICA J S, et al. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions[J]. *J Gen Physiol*, 2003, 121(1): 49-60.
- [6] ASRAR S, AARTS M. TRPM7, the cytoskeleton and neuronal death[J]. *Channels (Austin)*, 2013, 7(1): 6-16.
- [7] PEREZ-CASTRO R, PATEL S, GARAVITO-AQUILAR Z V, et al. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells[J]. *Anesth Analg*, 2009, 108(3): 997-1007.
- [8] TAN Z, DOHI S, CHEN J, et al. Involvement of the mitogen-activated protein kinase family in tetracaine-induced PC12 cell death[J]. *Anesthesiology*, 2002, 96(5): 1191-1201.
- [9] LU J, XU S Y, ZHANG Q G, et al. Bupivacaine induces reactive oxygen species production via activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway[J]. *Pharmacology*, 2011, 87(3/4): 121-129.
- [10] 李亚文, 徐世元, 张庆国, 等. 布比卡因致高糖培养 SH-S Y5Y 细胞内质网应激增强与活性氧簇增多及凋亡增加[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2014, 35(3): 241-245.
- [11] WEN X, XU S, LIU H, et al. Neurotoxicity induced by bupivacaine via T-type calcium channels in SH-SY5Y cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62942.
- [12] MA R, WANG X, LU C, et al. Dexamethasone attenuated bupivacaine-induced neuron injury in vitro through a threonine-serine protein kinase B-dependent mechanism [J]. *Neuroscience*, 2010, 167(2): 329-342.
- [13] PARK C H, KIM Y S, KIM Y H, et al. Calcineurin mediates AKT dephosphorylation in the ischemic rat retina[J]. *Brain Res*, 2008, 1234: 148-157.
- [14] 刘红, 李俊, 黄成, 等. 瞬时受体电位 M7 通道蛋白对大鼠肝星状细胞凋亡的影响[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(4): 486-489.
- [15] ZHAO L, WANG Y, SUN N, et al. Electroacupuncture regulates TRPM7 expression through the trkA/PI3K pathway after cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. *Life Sci*, 2007, 81(15): 1211-1222.
- [16] ZHAO Y, WANG J, JIANG H, et al. Following OGD/R, annexin 1 nuclear translocation and subsequent induction of apoptosis in neurons are assisted by myosin IIA in a TRPM7 kinase-dependent manner[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(2): 729-742.
- [17] ZHANG J, ZHAO F, ZHAO Y, et al. Hypoxia induces an increase in intracellular magnesium via transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels in rat hippocampal neurons in vitro[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(23): 20194-20207.
- [18] BIANCHETTI E, MLADINIC M, NISTRI A, et al. Mechanisms underlying cell death in ischemia-like damage to the rat spinal cord in vitro[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e707.
- [19] MACIANSKIENE R, MARTISIENE I, ZABLOCKAITE D, et al. Characterization of Mg(2)(+)-regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes[J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19: 75.
- [20] CHUBANOV V, SCHÄFER S, FERIOLO S, et al. Natural and synthetic modulators of the TRPM7 channel [J]. *Cells*, 2014, 3(4): 1089-1101.