

网络出版时间:2022-04-19 14:07 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220415.1511.002.html>

◇基础医学研究◇

七氟烷后处理对原代海马神经元氧糖剥夺/复氧损伤及自噬的影响

王佳楠^{1,2}, 黄春霞^{1,2}, 胡宪文^{1,2}

摘要 目的 探讨七氟烷后处理对原代海马神经元氧糖剥夺/复氧(OGD/R)损伤、氧化应激及自噬的影响。**方法** 取(18 ± 0.5)d孕鼠子宫内胎鼠海马组织,收集海马神经元进行培养,7d后培养的海马神经元随机分为3组:正常对照组(CON组)、氧糖剥夺/复氧组(OGD/R组)、七氟烷后处理组(OGD/R+SEVO组)。CON组正常培养;OGD/R组:氧糖剥夺1.5 h,复氧复糖24 h,建立OGD/R损伤模型;OGD/R+SEVO组经氧糖剥夺后即刻予2.4%七氟烷后处理1 h,复氧复糖23 h。处理结束后,比色法检测各组乳酸脱氢酶(LDH)的活性,原位末端标记法(TUNEL)检测各组神经元凋亡变化,免疫荧光法检测各组神经元线粒体活性氧和微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)的表达,Western blot检测丝氨酸/苏氨酸激酶(PINK1)、E3泛素连接酶(Parkin)的表达。**结果** 与CON组比较,OGD/R组LDH释放增加($P < 0.01$),神经元凋亡增加,线粒体活性氧和自噬标志性蛋白LC3B表达增加($P < 0.01$),PINK1蛋白和Parkin蛋白表达上调($P < 0.001, P < 0.05$);与OGD/R组比较,OGD/R+SEVO组LDH释放减少($P < 0.05$),神经元凋亡减少,线粒体活性氧和自噬标志性蛋白LC3B表达降低($P < 0.05$),PINK1蛋白和Parkin蛋白表达下调($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论** 七氟烷后处理可以通过减少OGD/R诱导的细胞过度自噬、减轻氧化应激、减少凋亡等途径来保护原代海马神经元,且其降低自噬的机制可能与PINK1/Parkin通路有关。

关键词 七氟烷;海马神经元;氧糖剥夺/复氧;自噬;凋亡;氧化应激

中图分类号 R 322.81; R 97; R 332; R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0673-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.001

2022-03-21 收稿

基金项目:国家自然科学基金(编号:81801050);安徽省卫生健康委科研项目(编号:AHWJ2021a017);安徽医科大学科研平台基地建设提升计划项目(编号:2020xkjT060)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院麻醉与围术期医学科,合肥230601

²麻醉与围手术期医学安徽普通高校重点实验室,合肥230601

作者简介:王佳楠,女,硕士研究生;

胡宪文,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:huxianwen001@126.com

在临幊上,急性缺血性脑病的发病率、致残率、病死率很高。脑缺血可导致神经细胞损伤甚至死亡,造成不可逆的损伤^[1]。临幊治疗脑缺血的有效方法是尽快恢复血液灌注。再灌注后缺血区组织血供恢复但组织损伤加重的现象被称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)^[2]。有研究^[3]报道,在脑组织特别是海马中氧与三磷酸腺苷储存较少,海马神经元对线粒体功能障碍和线粒体活性氧增加敏感,对能量缺乏的耐受性较差,海马神经细胞极易因缺血再灌注受损。CIRI的发病机制复杂,其机制涉及线粒体功能障碍、自噬、自由基损伤、钙超载、炎症损伤、神经细胞凋亡。自噬是一种细胞自降解过程,能够降解和回收胞内组分,被证实与许多疾病的发生和发展有关,包括神经退行性疾病、癌症、自身免疫性疾病。

七氟烷是一种临幊上广泛应用的吸入性麻醉药,既往研究^[4]表明,七氟烷后处理对CIRI有神经保护作用,可以减少脑梗死面积。本课题组前期研究^[5]表明七氟烷后处理可通过增加抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,降低促凋亡蛋白Bax、细胞色素C、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(caspase-3)的表达,减少海马神经元丢失,从而抑制细胞凋亡,对大鼠有神经保护作用。但七氟烷后处理对脑自噬的影响还不清楚。故拟研究七氟烷后处理对原代海马神经元氧糖剥夺/复氧(oxygen - glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)后损伤凋亡,线粒体氧化应激及自噬的影响,探讨七氟烷后处理脑保护作用的相关分子机制,为临幊治疗CIRI提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年SPF级雄鼠和雌鼠由安徽医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(皖)2017-006。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(货号:S711-001S)购

自上海 Lonsera 公司;DMEM-12 细胞培养液(货号:11330500BT)、Neurobasal Medium (货号:21103-049)、0.25% 胰蛋白酶(货号:25200056)、GlutaMAX (货号:35050-061)、B27 (货号:17504-044)、青链霉素(货号:15140122)均购自美国 Gibco 公司;5-氟-2'-脱氧尿嘧啶核苷(货号:F0503)、多聚赖氨酸(货号:P1399)均购自美国 Sigma 公司;Parkin 抗体(货号:2132S)、微管相关蛋白 1 轻链 3B(Microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)抗体(货号:3868S)、活化的半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase-3)抗体(货号:9661S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;丝氨酸/苏氨酸激酶(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)抗体(货号:sc-517353)购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;线粒体超氧化物指示剂(MitoSOX, 货号:M36008)购自美国 invitrogen 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号: P0012)、RIPA 裂解液(货号: P0013K)均购自上海碧云天生物技术有限公司;七氟烷(货号: 83291)购自美国艾伯维公司;原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)凋亡检测试剂盒(货号: 12156792910)购自美国 Roche 公司;ECL 显影液(货号:32109)购自美国 Thermo 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒(货号:A020)购自南京建成生物工程研究所。

1.1.3 主要仪器 缺氧小室(加拿大 Stem Cell 公司);七氟烷蒸发罐(德国 Drager 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Tanon Fine Do X6 全自动化学发光图像分析系统(上海 Tannon 公司);Tecan M 1000 酶标仪(德国 Tecan 公司);37 °C 5% CO₂ 培养箱(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代海马神经元细胞提取及培养 雌雄大鼠交配,以雌性大鼠出现阴道栓日计算胎龄,提取自孕鼠子宫内胎龄(18 ± 0.5) d 胎鼠海马组织。根据文献方法^[6],用 75% 乙醇消毒器械及孕鼠腹部,“V”字形剪开腹部,取出胚胎,断头取脑,放入预冷的无菌平衡盐溶液中,显微镜下分离海马组织,0.25% 胰蛋白酶消化 10 min 左右,加入培养基(90% DMEM-F12 + 10% 胎牛血清)终止消化 5 min,3 000 r/min、离心 5 min,弃上清液后,加入培养基(88% DMEM-F12 + 1% 青链霉素 + 1% Glutamax + 10% 胎牛血清),制成细胞悬液,种植于多聚赖氨酸包被的玻片中,放入 37 °C 细胞培养箱中进行培

养。24 h 后培养基全部换成细胞维持液(96% Neurobasal Medium + 2% B27 + 1% Glutamax + 1% 青链霉素),再加入 5-氟-2'-脱氧尿嘧啶核苷(40 μmol/L)抑制胶质细胞生长。每 3 d 更换培养液的 1/3。培养至第 7 天,神经元已经基本上发育成熟。

1.2.2 建立细胞 OGD/R 损伤模型 参照文献方法^[7],将原代海马神经元细胞正常培养时的完全培养基换为无血清无糖的平衡液(139 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L KCl、0.5 mmol/L MgCl₂、1.0 mmol/L CaCl₂、5 mmol/L HEPES, pH 7.4),细胞置于缺氧小室中,通入 95% N₂ + 5% CO₂ 气体 10 min 以驱除小室内的氧气,随后将缺氧小室放入 37 °C 培养箱中培养 1.5 h 进行氧糖剥夺处理,然后用完全培养基正常培养来进行复氧复糖。

1.2.3 实验分组及处理 原代海马神经元培养已经基本发育成熟,对能量缺乏敏感。将细胞随机分为 3 组:对照组(CON 组),原代海马神经元细胞置于培养液中常规培养;氧糖剥夺/复氧组(OGD/R 组),将原代海马神经元细胞进行 1.5 h 氧糖剥夺和 24 h 复氧复糖处理;七氟烷后处理组(OGD/R + SEVO 组),原代海马神经元细胞进行氧糖剥夺处理后,缺氧小室内预充浓度 2.4% 七氟烷 6 min,然后密闭缺氧小室培养 1 h,后置于 37 °C,培养箱继续培养 23 h。

1.2.4 检测细胞 LDH 活性 完成以上分组及处理后,每组各取 40 μl 细胞培养上清液,严格按照 LDH 试剂盒说明书操作,利用酶标仪于波长 450 nm 处测定各孔吸光度值,然后根据公式计算各组培养液中 LDH 活性,以反映神经元的损伤程度。

1.2.5 MitoSOX 染色 培养细胞经处理后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤,在培养皿中加入 MitoSOX 与培养基混合物,37 °C 黑暗条件下孵育 20 min。用 PBS 洗涤 2 次,将爬片捞出,用抗淬灭剂封片后固定至载玻片,用荧光倒置显微镜获得图像,统计荧光强度,以其反映线粒体活性氧水平。

1.2.6 TUNEL 染色 用 PBS 洗涤两次爬片,在样品上加入 50 μl TUNEL 反应混合物。为了确保 TUNEL 反应混合物在细胞单层间均匀扩散,并避免蒸发损失,样品在孵化过程中应覆盖副膜。在 37 °C 黑暗条件下,在加湿气氛中孵育 60 min。用 PBS 洗涤玻片 3 次。采用共聚焦显微镜获得图像。

1.2.7 免疫荧光 处理结束后的细胞用 PBS 冲洗,使用 4% 多聚甲醛固定细胞形态 10 min,使用含

有 0.1% Triton X-100 和 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液通透并封闭细胞 120 min, 4 °C 过夜孵育一抗: 兔抗 LC3B (1:200)。细胞在室温下与相应的二抗孵育 2 h。PBS 洗涤后, 用含细胞核标记物 (DAPI) 的抗淬灭剂封片后, 指甲油将爬片固定至载玻片, 采用共聚焦显微镜获得图像。

1.2.8 Western blot 取处理结束后的原代海马神经元加入 RIPA 裂解液充分反应 30 min, 13 200 r/min 离心 30 min 后取上清液, 检测各组细胞蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 100 °C 煮 10 min。蛋白样品用 SDS-PAGE 电泳分离, 转膜, 室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 含 Tris 缓冲液 (TBST) 洗涤 2 次, 加一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 加二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后用 ECL 化学发光法检测蛋白表达, 采用 Image J 软件计算目的蛋白与内参灰度值。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七氟烷后处理对原代海马神经元 LDH 释放的影响 与 CON 组相比, OGD/R 组原代海马神经元培养液中 LDH 活性增加 ($F = 23.12, P < 0.01$); 与 OGD/R 组相比, OGD/R + SEVO 组 LDH 活性降低 ($F = 15.30, P < 0.05$)。见图 1。

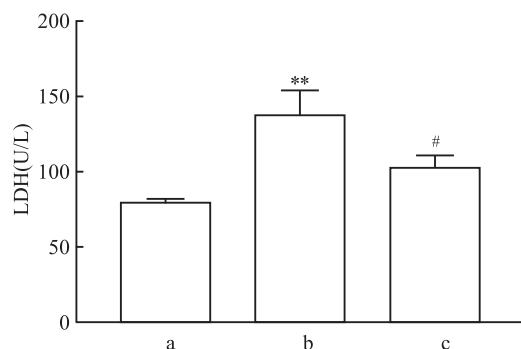


图 1 七氟烷后处理对原代海马神经元 LDH 释放的影响

a: CON 组; b: OGD/R 组; c: OGD/R + SEVO 组; 与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$

2.2 七氟烷后处理对原代海马神经元氧化应激的影响 与 CON 组相比, OGD/R 组线粒体活性氧增多 ($F = 24.41, P < 0.01$); 与 OGD/R 组相比, OGD/R + SEVO 组线粒体活性氧减少 ($F = 17.38, P < 0.05$)。见图 2。

2.3 七氟烷后处理对原代海马神经元细胞凋亡的影响 与 CON 组相比, OGD/R 组 TUNEL 阳性细胞数量和 cleaved caspase-3 表达量增多; 与 OGD/R 组相比, OGD/R + SEVO 组 TUNEL 阳性细胞数量和 cleaved caspase-3 表达量减少。见图 3。

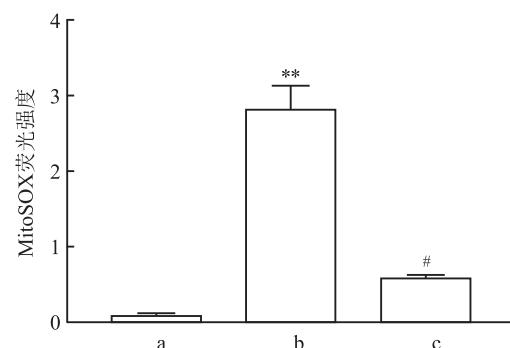


图 2 七氟烷后处理对原代海马神经元线粒体活性氧的影响

a: CON 组; b: OGD/R 组; c: OGD/R + SEVO 组; 与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$

2.4 七氟烷后处理对原代海马神经元细胞自噬的影响 采用免疫荧光染色检测原代海马神经元细胞 LC3B 的表达水平。LC3B 蛋白荧光染色结果如图 4 所示, 与 CON 组相比, OGD/R 组 LC3B 蛋白的表达增多 ($F = 6.97, P < 0.01$); 与 OGD/R 组相比, OGD/R + SEVO 组 LC3B 蛋白减少 ($F = 4.74, P < 0.05$)。用 Western blot 检测细胞 PINK1 和 Parkin 蛋白表达, 结果如图 5 所示, 与 CON 组相比, OGD/R 组 PINK1 的表达增多 ($F = 19.30, P < 0.001$), Parkin 的表达增多 ($F = 5.26, P < 0.05$); 与 OGD/R 组相比, OGD/R + SEVO 组 PINK1 的表达减少 ($F = 14.80, P < 0.01$), Parkin 的表达也降低 ($F = 5.65, P < 0.05$)。

3 讨论

脑组织尤其海马区域因供能方式单一对能量缺乏非常敏感, 极易因缺血再灌注受损。脑缺血再灌注的潜在病理改变与炎症、氧化应激、自噬密切相关, 这些改变最终可导致细胞凋亡、坏死。临幊上, 麻醉和手术中遇到的失血性休克与复苏事件非常常见, 故找到一种有效且切实可行的方法来减轻 CIRI 具有非常重要的临幊意义。

课题组前期研究^[8]表明 2.4% 七氟烷后处理可通过抑制细胞凋亡改善大鼠失血性休克和复苏损伤后的空间学习和记忆障碍。有研究^[9]表明七氟烷后处理可以减轻 HT22 细胞 OGD/R 损伤及凋亡程

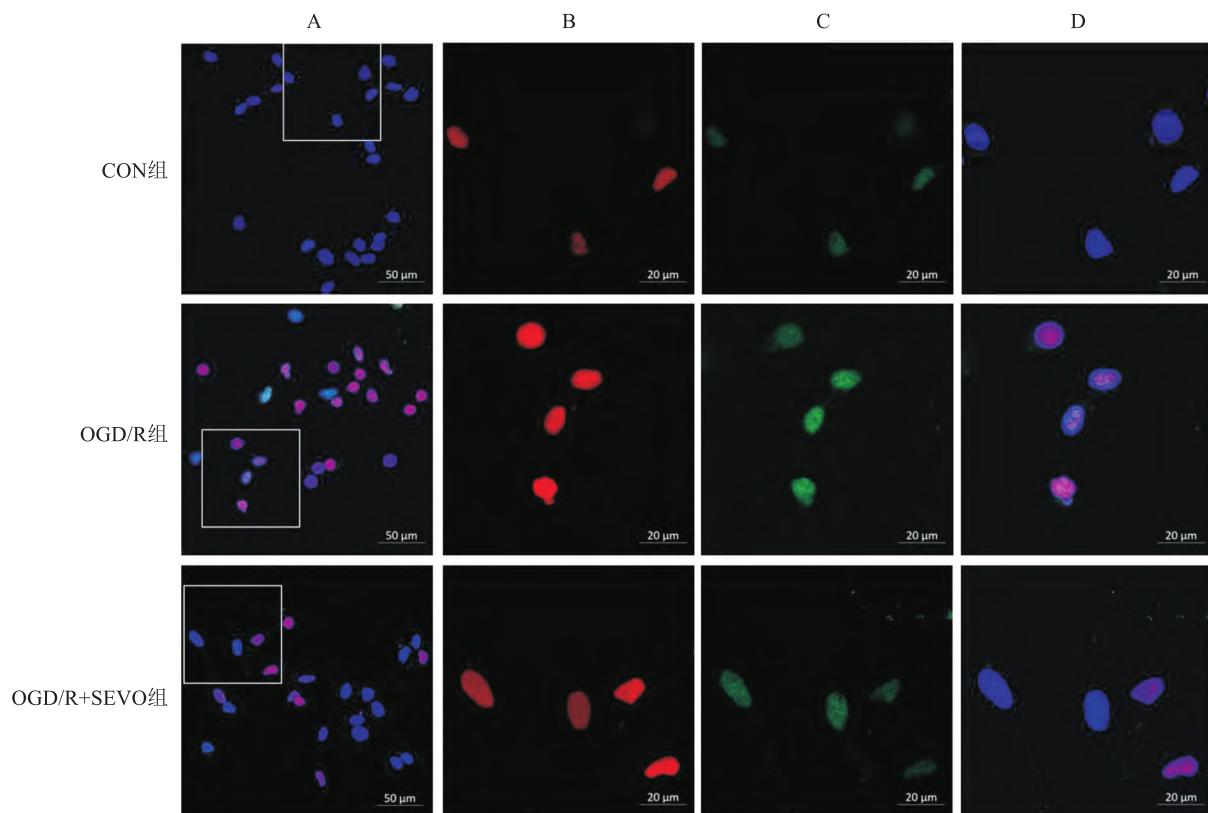


图3 TUNEL法检测七氟烷后处理对原代海马神经元凋亡的影响

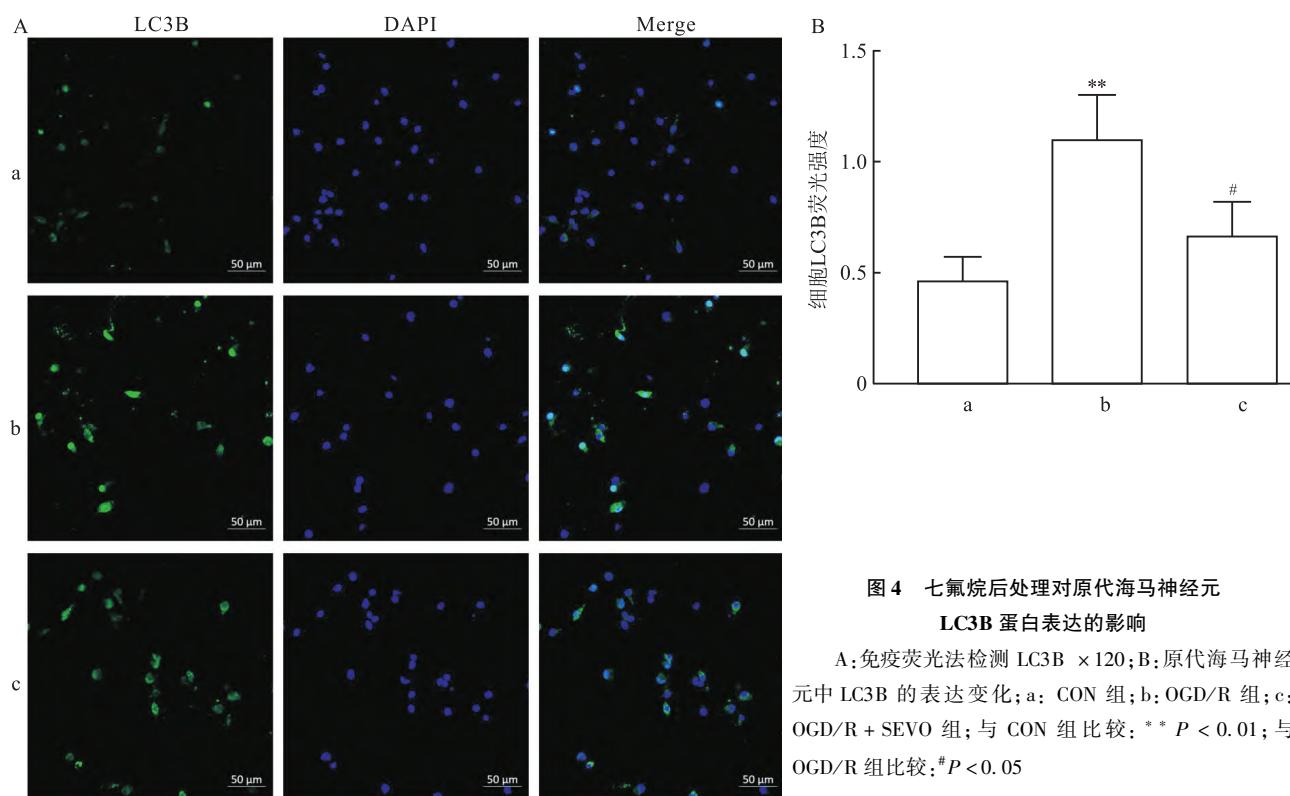
A: Merge $\times 200$; B: TUNEL $\times 600$; C: cleaved caspase-3 $\times 600$; D: Merge $\times 600$ 

图4 七氟烷后处理对原代海马神经元LC3B蛋白表达的影响

A: 免疫荧光法检测 LC3B $\times 120$; B: 原代海马神经元中 LC3B 的表达变化; a: CON 组; b: OGD/R 组; c: OGD/R + SEVO 组; 与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$

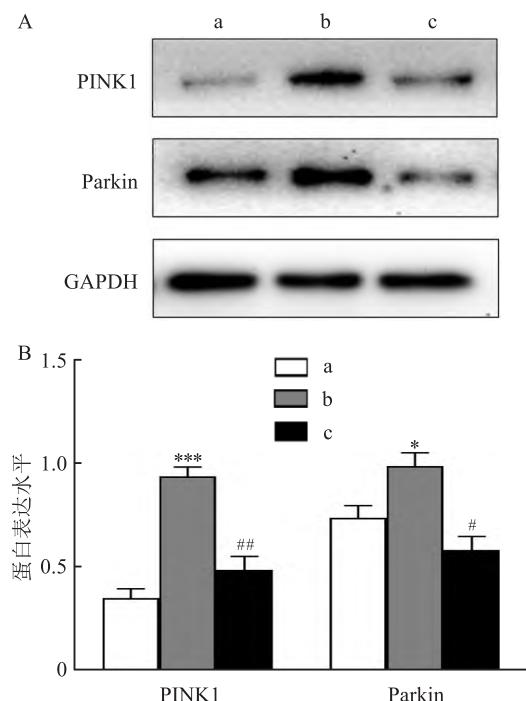


图5 七氟烷后处理对原代海马神经元 PINK1、Parkin 蛋白的影响

A: Western blot 检测 PINK1、Parkin；B: 原代海马神经元中 PINK1、Parkin 的表达变化；a: CON 组；b: OGD/R 组；c: OGD/R + SEVO 组；与 CON 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

度。故研究采用(18 ± 0.5)d 孕鼠子宫内胎鼠进行体外原代海马神经元培养,其对氧糖剥夺敏感性高^[10]。对培养 7 d 的原代海马神经元进行 OGD/R 处理,以此模拟体内脑缺血再灌注过程。本研究通过此体外模型进行七氟烷保护作用机制的验证与探索。OGD/R 处理后神经元 LDH 释放及凋亡细胞数量均增加,说明 OGD/R 模型建立成功。经过 2.4% 的七氟烷处理后 LDH 释放减少,证实采用的七氟烷后处理可减轻 OGD/R 诱导的细胞损伤。在实验中七氟烷后处理可以降低 OGD/R 诱导的神经元线粒体活性氧的生成,降低神经元氧化应激水平,改善线粒体功能。TUNEL 和 cleaved caspase-3 染色证明七氟烷后处理可以减轻 OGD/R 诱导的细胞凋亡,改善凋亡早期的 DNA 断裂。此次体外实验证实七氟烷后处理可以减少 OGD/R 后的细胞损伤和凋亡,改善线粒体损伤。

目前越来越多的研究关注自噬在缺血/再灌注中的病理生理过程。自噬作为一种机体自我防御的机制,在缺血再灌注诱导的脑损伤中起着重要作用。在体外氧糖剥夺条件下,自噬是通过自噬体包裹损坏的蛋白及细胞器,将其送入溶酶体降解,提高自噬水平从而保护细胞免受损伤。有体外研究^[11]证明,

七氟烷后处理通过减少自噬体形成,增加自噬体的清除率而有助于细胞保护。LC3B 是哺乳动物细胞中常见的自噬小体的标志蛋白。有研究^[12]表明细胞在能量底物缺乏的情况下,会产生过度自噬的激活。本研究中 OGD/R 处理后神经元 LC3B 表达增多,神经元自噬过度激活。而七氟烷后处理可以减轻 OGD/R 所致的过度自噬。在细胞发生自噬的过程中,多种途径被激活发挥作用。PINK1/Parkin 可以通过对受损线粒体的识别来启动及扩大自噬信号,是目前较公认的自噬途径,被广泛用来评估自噬水平^[13]。本研究表明,OGD/R 处理后神经元 PINK1、Parkin 蛋白表达量增多,而七氟烷处理后这两种蛋白表达量降低,证明七氟烷后处理可以减轻 OGD/R 所致的过度自噬,且这种作用可能与 PINK1/Parkin 通路有关。

综上,研究表明七氟烷后处理可以通过减少 OGD/R 诱导的细胞过度自噬、减轻氧化应激、减少凋亡等途径来保护原代海马神经元,且降低自噬的机制可能与 PINK1/Parkin 通路有关。该研究证实了七氟烷后处理对 CIRI 中神经元的保护作用,探讨了七氟烷后处理对 CIRI 中神经元自噬的影响。但该研究只初步探讨了可能的分子机制,没有应用 PINK1/Parkin 通路抑制剂进行进一步证明,需在后续的研究中进一步深入研究其具体机制,为临床治疗 CIRI 提供潜在的分子靶点。

参考文献

- Zhao G C, Yuan Y L, Chai F R, et al. Effect of melilotus officinalis extract on the apoptosis of brain tissues by altering cerebral thrombosis and inflammatory mediators in acute cerebral ischemia [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89:1346–52.
- Duan J, Cui J, Zheng H, et al. Aralia taibaiensis protects against I/R-induced brain cell injury through the Akt/SIRT1/FOXO3a pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:7609765.
- Rojas J J, Deniz B F, Miguel P M, et al. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat [J]. Exp Neurol, 2013, 241:25–33.
- Yu F, Tong L J, Cai D S. Sevoflurane inhibits neuronal apoptosis and expressions of HIF-1 and HSP70 in brain tissues of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(9): 5082–90.
- Zhang L, Huang L, Wang J, et al. Sevoflurane postconditioning improves spatial learning and memory ability involving mitochondrial permeability transition pore in hemorrhagic shock and resuscitation rats [J]. Brain Behav, 2020, 10(1): e01501.
- Yu Y, Wu X, Pu J, et al. Lycium barbarum polysaccharide pro-

- tects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death *via* the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1187–94.
- [7] Tasca C, Dal-cim T, Cimarosti H. *In vitro* oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1254:197–210.
- [8] Hu X, Wang J, Zhang L, et al. Postconditioning with sevoflurane ameliorates spatial learning and memory deficit *via* attenuating endoplasmic reticulum stress induced neuron apoptosis in a rat model of hemorrhage shock and resuscitation [J]. *Brain Res*, 2018, 1696: 49–55.
- [9] 舒见威, 黄春霞, 张丽, 等. 七氟醚后处理对氧糖剥夺/复氧复糖诱导 HT22 细胞 DNA 损伤及 SIRT1 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(2): 261–6.
- [10] Kadri S, Elayed M, Limam F, et al. Preventive and curative effects of grape seed powder on stroke using *in vitro* and *in vivo* models of cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125:109990.
- [11] Cheng A, Lu Y, Huang Q, et al. Attenuating oxygen-glucose deprivation-caused autophagosome accumulation may be involved in sevoflurane postconditioning-induced protection in human neuron-like cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 849:84–95.
- [12] Zhang X, Wei M, Fan J, et al. Ischemia-induced upregulation of autophagy precludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons [J]. *Autophagy*, 2021, 17(6): 1519–42.
- [13] Ma P, Yun J, Deng H, et al. pink1/parkinAtg1-mediated autophagy suppresses tissue degeneration in mutants by promoting mitochondrial fission in [J]. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(26): 3082–92.

Effect of sevoflurane post-conditioning on oxygen - glucose deprivation/reoxygenation injury and autophagy of primary hippocampal neurons

Wang Jianan^{1,2}, Huang Chunxia^{1,2}, Hu Xianwen^{1,2}

(¹*Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*; ²*Key Lab of Anesthesiology and Perioperative Medicine of Anhui Higher Education Institutes, Hefei 230601*)

Abstract Objective To explore the effect of sevoflurane post-conditioning on oxygen - glucose deprivation / reoxygenation (OGD/R) damage of primary hippocampal neurons , oxidative stress and autophagy. **Methods** Hippocampal neurons were cultured in uterine endometrial rats for (18 ± 0.5) days. After 7 days , the cultured hippocampal neurons were randomly divided into three groups: normal control group (CON group), oxygen - glucose deprivation / reoxygenation (OGD/R) group and sevoflurane post-conditioning group (OGD/R + SEVO group). Primary hippocampal neurons in the CON group were cultured normally ; OGD/R group was treated with oxygen-glucose deprivation for 1.5 hours and reoxygenation for 24 hours to establish oxygen and glucose deprivation / reoxygenation injury model ; OGD/R + SEVO group was treated with sevoflurane for 1 hour and then reoxygenated for 23 hours. After treatments , the activity of each group of LDH was detected by colorimetric method , TUNEL staining method detected the changes of hippocampal nerve cells in each group , immunofluorescence method detected mitochondrial ROS and the expression of autophagy proteins LC3B , and Western blot analysis detected the expression of PINK1 and Parkin. **Results** Compared with CON group , the release of lactate dehydrogenase increased ($P < 0.01$) ; neuronal apoptosis increased ; mitochondrial ROS and the expression of autophagy marker proteins LC3B increased ($P < 0.01$) , PINK1 and Parkin also increased in OGD/R group ($P < 0.001$, $P < 0.05$). Compared with OGD/R group , the release of lactate dehydrogenase was reduced ($P < 0.05$) , the apoptosis was inhibited , mitochondrial ROS and the expression of autophagy marker proteins LC3B were reduced ($P < 0.05$) , PINK1 and Parkin protein were reduced ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in OGD/R + SEVO group. **Conclusion** Sevoflurane post-conditioning can protect primary hippocampal neurons by reducing OGD/R-induced excessive autophagy , reducing oxidative stress , and reducing apoptosis , and its mechanism of reducing autophagy may be related to the PINK1/Parkin pathway.

Key words sevoflurane; hippocampal neurons; oxygen - glucose deprivation / reoxygenation; autophagy; apoptosis; oxidative stress