

MPTP 在七氟烷诱导大鼠海马神经元损伤中的作用及其机制

强婷婷^{1,2}, 张 丽^{1,2}, 胡宪文^{1,2}

摘要 目的 探讨线粒体通透性转换孔(MPTP)在七氟烷暴露6 h后诱导SD大鼠海马神经元损伤中的作用及其机制。方法 将原代培养的SD大鼠胎鼠海马神经元细胞随机分为对照组(Con组)、环孢素A组(CsA组,0.1、0.5、1 μmol/L)、3%七氟烷暴露6 h组(Sevo组)、环孢素A预处理+3%七氟烷6 h组(Sevo+CsA组,0.1、0.5、1 μmol/L)。采用CCK-8试剂盒检测细胞活性,TUNEL染色检测神经元凋亡,JC-1试剂盒检测线粒体膜电位,Calcein AM染色检测MPTP开放程度,Western blot测定脑源性神经营养因子(BDNF)、突触后致密蛋白(PSD-95)、突触素(Synaptophysin)、突触蛋白1(Synapsin-1)、亲环素D(CypD)等蛋白的表达。结果 与Con组相比,Sevo组细胞活力降低($P < 0.05$),神经细胞凋亡率升高($P < 0.01$),突触蛋白表达降低($P < 0.05$),线粒体膜电位下降($P < 0.01$),MPTP开放程度增加($P < 0.01$),CypD蛋白表达增加($P < 0.01$);与Sevo组相比,0.1 μmol/L CsA预处理可以降低细胞凋亡率($P < 0.01$),增加突触蛋白表达($P < 0.05$),阻止线粒体膜电位下降($P < 0.05$),减少MPTP开放($P < 0.01$),降低CypD蛋白表达($P < 0.01$)。结论 七氟烷暴露可导致SD大鼠海马神经元损伤,其机制与促进CypD介导的MPTP开放有关。MPTP开放的特异性抑制剂CsA可以减少七氟烷暴露导致的海马神经元的凋亡和突触损伤,维持线粒体膜电位,抑制MPTP开放和下调CypD蛋白表达。

关键词 七氟烷;海马神经元;环孢素A;亲环素D;线粒体通透性转换孔

中图分类号 R 332;R 322.81;R 329.2;R 97

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0932-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.016

2022-02-28 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1908085QH358);安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金项目(编号:2020GQFY01);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 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室,合肥 230601

² 安徽医科大学第二附属医院麻醉与围术期医学科,合肥 230601

作者简介:强婷婷,女,硕士研究生;

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

七氟烷是儿科手术中使用最广泛的全身麻醉药之一,然而Ing et al^[1]研究表明,七氟烷长时间麻醉可造成发育期儿童长期的语言功能缺陷和认知障碍;Zhu et al^[2]研究表明,早期七氟烷暴露可导致发育期大鼠广泛的海马神经细胞凋亡,从而造成远期空间学习障碍。但是七氟烷暴露引起神经损伤和认知障碍的具体机制仍不清楚。

研究^[3]表明,吸入麻醉药暴露导致的突触发育障碍与线粒体损伤相关。线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是线粒体膜上的一个非选择性通道,亲环素D(cyclophilin D, CypD)是MPTP的阳性调节因子,而环孢素A(cyclosporin A, CsA)是MPTP的特异性抑制剂^[4]。在阿尔茨海默病动物模型中,CypD的表达增加,MPTP开放增多,而CsA能够下调CypD的表达,抑制MPTP开放,维持线粒体功能稳定进而改善老年小鼠的认知功能^[5]。然而,CypD介导的MPTP开放在七氟烷暴露导致发育期大脑神经毒性中的作用尚不清楚。该研究利用原代培养海马神经元建立七氟烷损伤模型,重点研究MPTP及其调节蛋白CypD在七氟烷暴露引起神经毒性中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 孕(18±1)d SD大鼠由安徽医科大学实验动物中心提供,生产许可证编号:SCXK(皖)2017-001。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基、L-丙氨酸-L-谷氨酰胺(Glutamax)、青-链霉素、0.25%胰蛋白酶-EDTA、B-27、Neurobasal培养基购自美国Gibco公司;5-氟-2'脱氧尿苷(FUDR)、多聚-L-赖氨酸(PLL)购自美国Sigma公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自乌拉圭Lonsera公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、免疫印迹(Western blot)一抗稀释液、CCK-8检测试剂盒、TUNEL凋亡试剂盒、MPTP检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒购自北京碧云天生物技术公司;Triton X-100购自北京索莱宝科技有限公司;β-actin抗体、突触后致密蛋白

95 (postsynaptic density protein, PSD-95) 抗体、突触蛋白 1 (Synapsin-1) 抗体购自美国 CST 公司; CypD 购自上海 Abcam 公司; 突触素 (Synaptophysin)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 购自武汉 Proteintech 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 显影液购自美国 Thermo 公司。

1.1.3 主要仪器设备 CO₂ 细胞培养箱、多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); 倒置相差荧光显微镜 (德国蔡司公司); 凝胶成像仪 (德国耶拿公司); 便携式细胞氧环境控制小室 (加拿大 Stem Cell 公司); 气体浓度监测仪 (深圳迈瑞生物公司); 七氟烷挥发罐 (德国 Dräger 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠胎鼠海马神经元培养 取孕 (18 ± 1) d SD 大鼠, 七氟烷麻醉孕鼠, 75% 乙醇消毒孕鼠腹部, 然后快速取出胚胎, 将胎鼠断头取脑, 放入装有预冷的 PBS 缓冲液的培养皿中, 置于解剖显微镜下分离海马组织。用 0.25% 胰酶 (37 °C 预热) 消化海马组织 10 min, 然后用 10% FBS 终止消化, 1 500 r/min, 离心 5 min 后弃去上清液, 再加入适量含 10% FBS 的 DMEM/F12 细胞培养液, 轻柔吹打 1 min, 重新悬浮细胞并使之变成单细胞悬液。细胞接种密度调整为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/ml, 放入 CO₂ 细胞培养箱培养。培养 24 h 后, 全量换液为 Neurobasal 细胞维持液, 并加入 50 μmol/L FUDR。每隔 3 d 更换 1 次细胞培养液, 换液 1/2。将原代培养的海马神经元细胞培养至 7 d 时, 建立七氟烷暴露模型。

1.2.2 七氟烷暴露模型的建立及实验分组 原代培养的 SD 大鼠胎鼠海马神经元随机分为: 对照组 (Con 组)、环孢素 A 组 (CsA 组, 0.1、0.5、1 μmol/L)、3% 七氟烷组 (Sevo 组)、3% 七氟烷 + 环孢素 A 处理组 (Sevo + CsA 组, 0.1、0.5、1 μmol/L)。CsA 组、Sevo + CsA 组细胞在培养至 6 d 时加入相应浓度的 CsA 预处理 24 h。7 d 时, Con 组、CsA 组放入充满 95% 空气 + 5% CO₂ 的控制小室中, 然后置于 CO₂ 细胞培养箱处理 6 h; Sevo 组、Sevo + CsA 组放入充满 3% 七氟烷的控制小室中处理 6 h。处理结束后进行后续检测。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活力 将细胞悬液调整浓度后种植于 96 孔板内, 每孔 100 μl 细胞悬液, 约 3×10^4 个细胞, 每组设 6 个复孔。造模结束后弃去 96 孔板中的培养基, 重新加入 100 μl/孔预热过的

Neurobasal 细胞维持液。每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 放入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h。酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值 (OD 值)。实验重复 4 次。

1.2.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡 弃去培养基, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 然后用 PBS 洗涤 1 次, 再加入 0.3% Triton X-100 室温通透细胞 5 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 加 50 μl TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 1 h, 孵育结束后用 PBS 洗涤 3 次, 滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片后置于荧光显微镜下观察并拍照, 实验重复 4 次, 每次每组选取 5 个视野计算细胞凋亡比例。

1.2.5 Western blot 检测 造模结束后弃去培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入细胞裂解液后用超声波细胞破碎仪破碎细胞, 接着置于 4 °C 超速离心机下 14 000 r/min 离心 15 min, 留存上清液, 按照 BCA 法测定蛋白浓度, 再加入上样缓冲液, 煮沸 10 min 使蛋白充分变性。每个样本取 10 μg, 配制 10% SDS-PAGE 分离胶, 电泳分离蛋白, 250 mA 恒流转膜, 接着用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗涤 1 次后分别加入配置好的不同的浓度的一抗稀释液于 4 °C 摇床上过夜孵育 (β-actin 1 : 10 000、BDNF 1 : 1 000、PSD-95 1 : 1 000、Synaptophysin 1 : 20 000、Synapsin-1 1 : 1 000、CypD 1 : 5 000)。一抗孵育结束后用 TBST 洗涤 3 次, 与辣根过氧化物酶偶联的相应种属的二抗 (1 : 1 000) 在室温下孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次后采用 ECL 化学发光法检测蛋白表达量。

1.2.6 线粒体膜电位检测 线粒体 JC-1 染色, 线粒体膜电位较高时形成聚合物 (JC-1 aggregates) 产生红色荧光, 线粒体膜电位较低时为 JC-1 单体 (JC-1 monomers) 产生绿色荧光。原代培养细胞在造模结束后立即吸除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 然后每孔加入 1 ml Neurobasal 细胞维持液, 再加入 1 ml JC-1 染色工作液, 轻轻混匀后放入细胞培养箱中育 20 min, 孵育结束后吸除上清液, 用预冷的 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 每孔加入 2 ml 细胞培养液后立即在荧光显微镜下观察, 1 h 内观察完毕, 实验重复 4 次。

1.2.7 MPTP 开放程度检测 造模结束后吸除培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 后加入适当体积的钙黄绿素乙酰甲酯 (Calcein AM) 染色液, 轻轻晃动使之混匀, 放入培养箱中避光孵育 40 min, 孵育结束后更换成新鲜的 37 °C 预热的 Neurobasal 细胞维持液, 然后再次避光孵育 40 min, 用 PBS 清洗 3 次, 滴加 DAPI

后于荧光显微镜下观察、拍照,实验重复4次。

1.3 统计学处理 采用 Image J 软件进行荧光强度分析, GraphPad Prism 8.0 统计软件进行数据分析, 正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多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 七氟烷对原代海马神经细胞活力的影响 检测结果显示, 与 Con 组相比, Sevo 组的细胞活力下降 ($F = 12.81, P < 0.05$); 与 Con 组相比, CsA 组用不同浓度的 CsA (0.1、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 24 h 对细胞活力的影响差异无统计学意义; 与 Sevo 组相比, Sevo + CsA (0.1、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$) 组可以降低七氟烷对细胞的损伤作用, 其中 CsA 的浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力最高 ($F = 23.15, P < 0.01$)。因此, 该研究选择 0.1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 进行后续实验。见图 1。

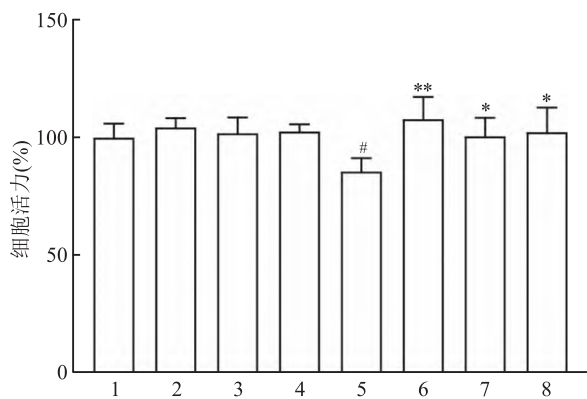


图1 不同浓度 CsA 对原代海马神经细胞活力的影响

1: Con 组; 2: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组; 3: 0.5 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组; 4: 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组; 5: Sevo 组; 6: Sevo + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组; 7: Sevo + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组; 8: Sevo + 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组; 与 Con 组比较: # $P < 0.05$; 与 Sevo 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 七氟烷对原代海马神经细胞凋亡的影响 与 Con 组相比, Sevo 组细胞 TUNEL 阳性细胞比例增高, 表明七氟烷持续暴露 6 h 可诱导细胞凋亡 ($F = 35.51, P < 0.01$); 与 Sevo 组相比, Sevo + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 预处理可以降低七氟烷持续暴露造成的高细胞凋亡率 ($F = 26.61, P < 0.01$)。见图 2。

2.3 七氟烷对 BDNF 及突触蛋白表达的影响 与 Con 组相比, Sevo 组 BDNF、Synaptophysin、Synapsin-1、PSD-95 等突触相关蛋白的表达量下降 ($F = 13.57、14.63、17.90、16.21, P < 0.05$); 与 Sevo 组相比, Sevo + CsA 组 BDNF、Synaptophysin、Synapsin-1、PSD-95

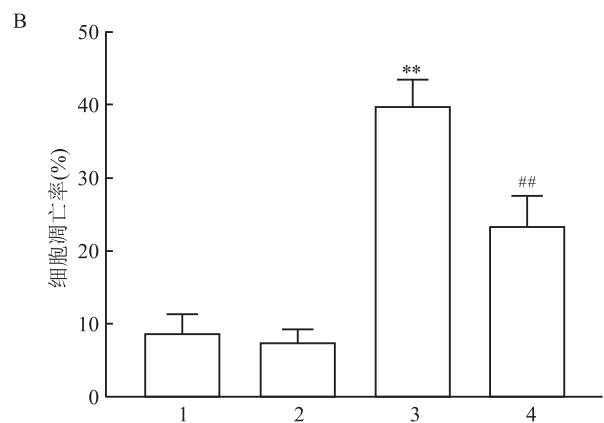
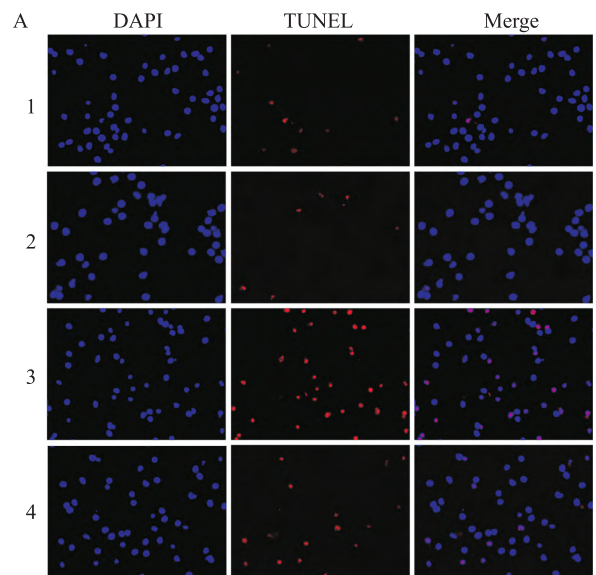


图2 TUNEL 染色检测细胞凋亡

A: TUNEL 染色 $\times 400$; B: TUNEL 阳性细胞比例; 1: Con 组; 2: CsA 组; 3: Sevo 组; 4: Sevo + CsA 组; 与 Con 组比较: * $P < 0.01$; 与 Sevo 组比较: ## $P < 0.01$

表达上调 ($F = 10.98、12.79、13.77、14.05, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 七氟烷对神经元线粒体膜电位的影响 与 Con 组相比, 原代海马神经细胞经七氟烷处理后, JC-1 聚合物荧光强度与 JC-1 单体荧光强度的比值降低, 表明线粒体膜电位下降 ($F = 29.74, P < 0.01$); 与 Sevo 组相比, CsA 可以减轻七氟烷引起的线粒体膜电位的降低 ($F = 16.84, P < 0.05$)。见图 4。

2.5 七氟烷对神经元 MPTP 开放的影响 与 Con 组相比, Sevo 组线粒体上面的荧光强度有所降低, 表明 MPTP 通道开放致使线粒体荧光发生淬灭 ($F = 27.46, P < 0.01$); 与 Sevo 组相比, Sevo + CsA 组的线粒体荧光强度增高 ($F = 15.05, P < 0.01$), 提示 MPTP 的开放程度减低。见图 5。

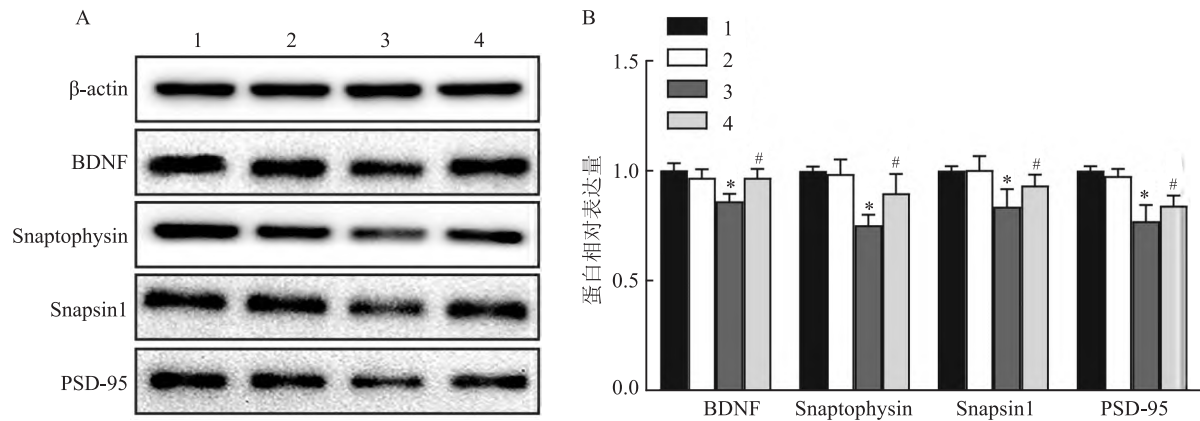


图3 BDNF及突触蛋白表达量

A: Western blot 检测 BDNF 及突触蛋白的表达; B: 蛋白相对表达量; 1: Con 组; 2: CsA 组; 3: Sevo 组; 4: Sevo + CsA 组; 与 Con 组比较: * $P < 0.05$; 与 Sevo 组比较: # $P < 0.05$

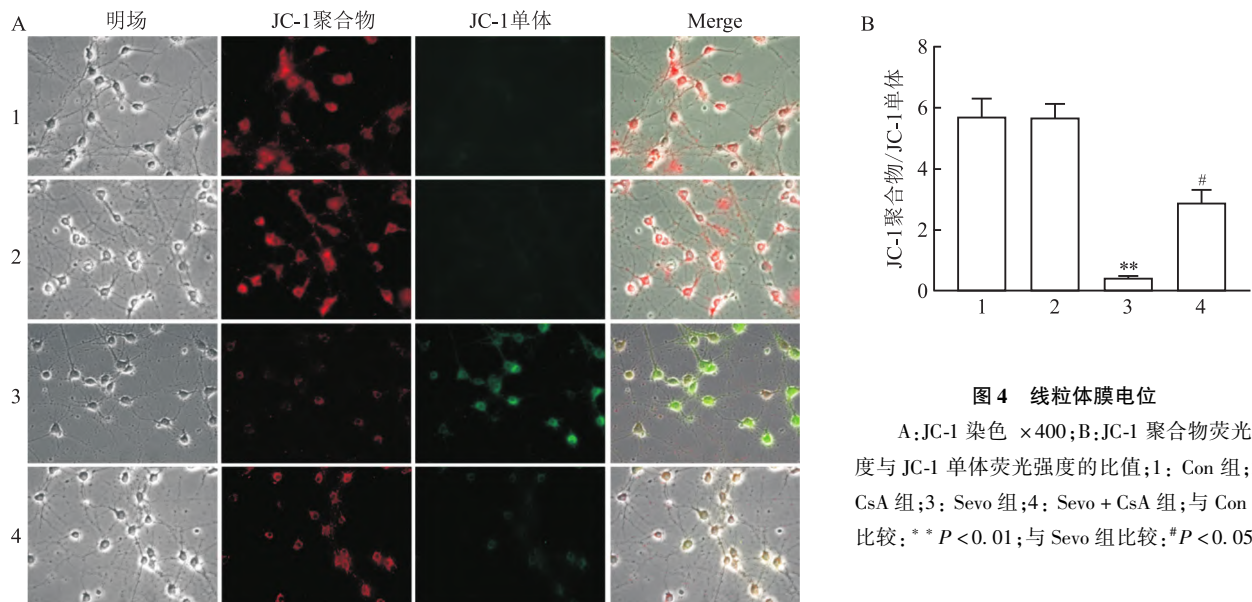


图4 线粒体膜电位

A: JC-1 染色 $\times 400$; B: JC-1 聚合物荧光强度与 JC-1 单体荧光强度的比值; 1: Con 组; 2: CsA 组; 3: Sevo 组; 4: Sevo + CsA 组; 与 Con 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Sevo 组比较: # $P < 0.05$

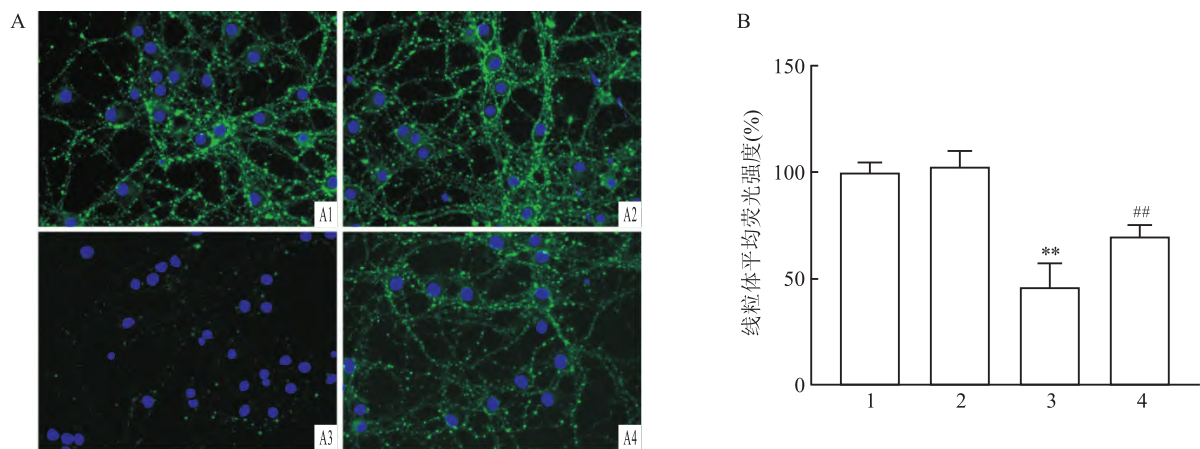


图5 MPTP 开放程度

A: 线粒体荧光染色显示 MPTP 开放程度 $\times 400$; B: 线粒体平均荧光强度; 1: Con 组; 2: CsA 组; 3: Sevo 组; 4: Sevo + CsA 组; 与 Con 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Sevo 组比较: ## $P < 0.01$

2.6 七氟烷对 CypD 蛋白表达的影响 与 Con 组相比,Sevo 组 CypD 蛋白的表达上调 ($F = 18.17, P < 0.01$); 与 Sevo 组相比,Sevo + CsA 组 CypD 蛋白的表达下降 ($F = 16.69, P < 0.01$)。见图 6。

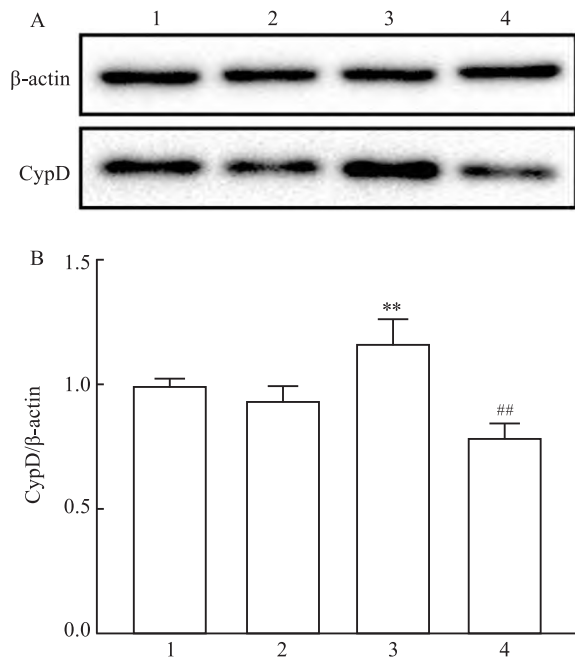


图 6 CypD 蛋白表达量

A: Western blot 检测 CypD 蛋白的表达; B: CypD 与 β -actin 的比值直方图; 1: Con 组; 2: CsA 组; 3: Sevo 组; 4: Sevo + CsA 组; 与 Con 组比较: * $P < 0.01$; 与 Sevo 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

七氟烷暴露对发育期大脑具有一定的神经毒性^[1,6]。但其具体机制目前仍不清楚。3% 是儿科手术中使用七氟烷维持麻醉深度的常用浓度^[5], 该研究将原代培养的 SD 大鼠海马神经元暴露于 3% 七氟烷 6 h, 观察其神经细胞凋亡、突触蛋白表达、线粒体功能等指标的变化, 以探讨 MPTP 及其阳性调节蛋白 CypD 在七氟烷暴露导致发育期神经细胞损伤中的分子机制。

该研究检测 3% 七氟烷暴露 6 h 后的海马神经细胞的活性, 结果显示神经细胞活力下降; 利用 TUNEL 染色法检测神经元凋亡, 结果显示七氟烷暴露 6 h 后神经细胞凋亡率增加。表明该研究已成功构建了七氟烷细胞损伤模型。

除了七氟烷暴露会引起广泛的海马神经细胞凋亡之外^[7], Ju et al^[8] 研究表明七氟烷暴露会导致啮齿动物远期认知功能障碍, 其机制与七氟烷抑制神经元突触可塑性密切相关。神经元发育至第 7 ~ 10

天是突触生长的关键阶段^[9], 因此该实验选择在神经元培养至第 7 天时检测影响突触功能的相关蛋白质的表达含量。BDNF 是影响神经元的生长、发育、分化和存活的重要神经营养因子, 成熟的 BDNF 能够结合并激活 TrkB 信号传导通路, 参与突触可塑性的调节^[10]。Synaptophysin、Synapsin-1 分布在神经元突触前膜中突触囊泡中, 影响突触前可塑性, 而 PSD-95 位于突触后致密区, 影响突触后可塑性^[11]。该研究中, 培养的神经元在七氟烷暴露 6 h 后 BDNF、Synaptophysin、Synapsin-1、PSD-95 表达下调, 提示七氟烷对海马神经元的突触前、突触后可塑性均有抑制作用。

线粒体是维持能量平衡的重要细胞器, 参与细胞凋亡、突触发育和突触可塑性的调节。Yang et al^[12] 研究表明抑制线粒体膜电位的下降可以降低细胞凋亡发生率。在突触形成关键期进行吸入麻醉药暴露可引起线粒体融合和分裂失衡, 造成氧自由基过量生成, 诱发新生突触的能量代谢障碍, 最终对树突棘以及突触的形成、稳定和正常功能造成损害^[13]。线粒体功能异常可能是七氟烷麻醉引起神经细胞凋亡和突触受损的共同靶点。该研究中七氟烷暴露使线粒体 JC-1 发生从红色荧光到绿色荧光的转变, 表明线粒体膜电位下降, 线粒体功能受损。

Bernardi et al^[14] 在心肌缺血再灌注模型中证明了 MPTP 的正常开闭在维持线粒体功能稳定中发挥至重要作用。MPTP 开放有两种状态, 生理性 (低电导) MPTP 开放可以维持线粒体功能, 而病理性 (高电导) MPTP 开放则会造成线粒体膜电位崩溃、线粒体肿胀和线粒体外膜破裂, 随之释放膜间线粒体促凋亡蛋白, 包括细胞色素 C 和凋亡诱导因子等, 这些物质进入胞质后引发细胞凋亡。MPTP 主要由电压依赖性阴离子通道 (VDAC)、腺嘌呤核苷酸转位酶 (ANT) 以及 CypD 构成。而 ANT 和 VDAC 基因敲除 (KO) 动物/细胞模型的研究^[15-16] 表明 VDAC、ANT 不参与 MPTP 开放的调节, CypD 是调节 MPTP 开放的主要调控因子。该研究显示, 与对照组相比, 七氟烷处理细胞后, 线粒体内绿色荧光发生淬灭, 表明 MPTP 开放增多, 同时 MPTP 调节因子 CypD 的表达增加。

中风、创伤性脑损伤和阿尔茨海默病等动物模型的研究表明低浓度的 CsA 具有神经保护作用^[5,7], 而高浓度的 CsA 可能造成肝肾功能受损和神经系统的不良反应^[17]。该研究检测了不同浓度的 CsA 对原代培养海马神经元的影响, 结果表明最

低浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 的保护效果相对较好。运用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 处理细胞可以适当恢复细胞活力,降低细胞凋亡率,增加突触相关蛋白的表达,维持细胞膜电位稳定,下调 CypD 蛋白表达。

综上所述,细胞凋亡增加、突触可塑性降低及线粒体功能损伤参与七氟烷引起神经毒性的过程,其机制可能与促进 MPTP 开放,上调 CypD 表达有关。CsA 能够通过抑制 MPTP 开放发挥神经保护作用,有可能为预防七氟烷暴露导致神经损伤提供一种新的保护思路。

参考文献

- [1] Ing C, Wall M M, DiMaggio C J, et al. Latent class analysis of neurodevelopmental deficit after exposure to anesthesia in early childhood[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2017,29(3):264–73.
- [2] Zhu J, Zhang Z, Jia J, et al. Sevoflurane induces learning and memory impairment in young mice through a reduction in neuronal glucose transporter 3[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020,40(6):879–95.
- [3] Amrock L G, Starner M L, Murphy K L, et al. Long-term effects of single or multiple neonatal sevoflurane exposures on rat hippocampal ultrastructure[J]. *Anesthesiology*, 2015,122(1):87–95.
- [4] Javadov S, Jang S, Parodi-Rullán R, et al. Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia-reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017,74(15):2795–813.
- [5] Wu X, Shan C, Peng B, et al. Comparison of desflurane and sevoflurane on postoperative recovery quality after tonsillectomy and adenoidectomy in children[J]. *Exp Ther Med*, 2019,17(6):4561–7.
- [6] 王加仑, 廉海光, 林凤颜, 等. 新生小鼠七氟醚暴露对其青春记忆及突触可塑性的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020,55(4):31–5.
- [7] Kang W, Lu D, Yang X, et al. Sevoflurane induces hippocampal neuronal apoptosis by altering the level of neuropeptide Y in neonatal rats[J]. *Neurochem Res*, 2020,45(9):1986–96.
- [8] Ju L, Jia M, Sun J, et al. Hypermethylation of hippocampal synaptic plasticity-related genes is involved in neonatal sevoflurane exposure-induced cognitive impairments in rats[J]. *Neurotox Res*, 2016,29(2):243–55.
- [9] Grabrucker A, Vaida B, Bockmann J, et al. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture[J]. *Cell Tissue Res*, 2009,338(3):333–41.
- [10] Bettio L, Thacker J S, Hutton C, et al. Modulation of synaptic plasticity by exercise[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2019,147:295–322.
- [11] Cui Y, Cao K, Lin H, et al. Early-life stress induces depression-like behavior and synaptic-plasticity changes in a maternal separation rat model: gender difference and metabolomics study[J]. *Front Pharmacol*, 2020,11:102.
- [12] Yang F, Pei R, Zhang Z, et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes[J]. *Toxicol In Vitro*, 2019,54:310–6.
- [13] Xu G, Lu H, Dong Y, et al. Coenzyme Q10 reduces sevoflurane-induced cognitive deficiency in young mice[J]. *Br J Anaesth*, 2017,119(3):481–91.
- [14] Bernardi P, Di L. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015,78:100–6.
- [15] Kokoszka J E, Waymire K G, Levy S E, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Nature*, 2004,427(6973):461–5.
- [16] Baines C P, Kaiser R A, Sheiko T, et al. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death[J]. *Nat Cell Biol*, 2007,9(5):550–5.
- [17] Wu Q, Wang X, Nepovimova E, et al. Mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity: oxidative stress, autophagy, and signalings[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018,118:889–907.

The role and mechanism of MPTP in sevoflurane-induced hippocampal neuron damage in rats

Qiang Tingting^{1,2}, Zhang Li^{1,2}, Hu Xianwen^{1,2}

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

Abstract Objective To investigate the role and mechanism of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in the damage of hippocampal neurons in SD rats induced by exposure for 6 hours to sevoflurane. **Methods** The hippocampal neurons of primary cultured SD rats and fetal rats were randomly divided into control group (Con group), cyclosporin A group (CsA group, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{mol/L}$), 3% sevoflurane exposure for 6 h Group (Sevo group), cyclosporin A pretreatment + 3% sevoflurane 6 h group (Sevo + CsA group, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{mol/L}$). CCK-8

HIF-1 α 调控 4-羟基他莫昔芬对乳腺癌 MCF-7 细胞敏感性的研究

陈宗跃^{1,2}, 张璟钰¹, 张敏琴¹, 樊双琴¹, 沈祥春¹, 陈妍¹, 张玥¹

摘要 目的 该研究通过建立人乳腺癌 4-羟基他莫昔芬(4-OHT)耐药细胞系(MCF-7/TR),探究低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)对乳腺癌 MCF-7 细胞 4-OHT 耐药的影响。方法 采用他莫昔芬的体内活性形式 4-OHT 建立乳腺癌耐药细胞 MCF-7/TR。MTT 实验检测 4-OHT 对乳腺癌细胞 MCF-7、MCF-7/TR 细胞活力的影响,并测定耐药指数(RI);Western blot 检测 MCF-7、MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达水平;采用 MTT 法和流式细胞术 AV/PI 双染法检测, HIF-1 α 抑制剂(LW6)或 siRNA HIF-1 α 干预作用后 4-OHT 对 MCF-

7/TR 细胞的影响以及 HIF-1 α 稳定剂(FG-4592)处理后 4-OHT 对 MCF-7 细胞的影响。结果 结果显示, MCF-7/TR 耐药细胞株成功构建,其 RI 为(5.56 $\pm$ 0.80);与 MCF-7 细胞相比, MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 高表达,且 4-OHT 作用后 MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 的表达水平上调;给予 LW6 或沉默 HIF-1 α 的表达后, HIF-1 α 的表达下调增强了 4-OHT 对 MCF-7/TR 细胞的抑制作用;给予 FG-4592 后, HIF-1 α 的表达上调可降低 4-OHT 对 MCF-7 细胞的抑制作用。结论 HIF-1 α 在乳腺癌 MCF-7 细胞 4-OHT 耐药中发挥重要作用,靶向 HIF-1 α 可能是增加乳腺癌细胞对他莫昔芬敏感性的有效途径。

关键词 乳腺癌;耐药;4-羟基他莫昔芬;低氧诱导因子 1 α
中图分类号 R 323.23

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0938-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.017

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,75% 的恶性乳腺肿瘤患者呈现雌激素受体 α (estrogen receptor- α , ER α) 阳性^[1]。他莫昔芬(tamoxifen, TAM)是原发性 ER α 阳性乳腺癌的核心治疗药物,临床数据显示约 50% 的反应性乳腺肿瘤因长期使用 TAM 而产生抗性并导致治疗失败^[2]。低氧诱导因子 1 α (hypoxia induced factor 1 α , HIF-1 α) 是细胞在低氧状态下稳定表达的核转录因子^[3],其可调控多种耐药靶

2022-03-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860648);贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(编号:黔教合 KY 字[2021]169);贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划(编号:黔教合 KY 字[2018]048);贵州省高层次创新型人才计划(编号:71000305);贵州医科大学药学国际科技合作基地(编号:黔科合平台人才[2017]5802);贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]一般 527)

作者单位:¹ 贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室,贵阳 550025

² 贵阳康养职业大学,贵阳 550081

作者简介:陈宗跃,男,硕士;

陈妍,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: s0710189@sina.com;

张玥,女,副教授,责任作者, E-mail: 254212060@qq.com

kit was used to detect cell activity, TUNEL staining was used to detect neuron apoptosis, JC-1 kit was used to detect mitochondrial membrane potential, Calcein AM was used to detect MPTP opening degree, and Western blot was used to detect proteins expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), postsynaptic compact protein (PSD-95), Synaptophysin, Synapsin-1, and Cyclophilin D (CypD). **Results** Compared with Con group, the cell viability of Sevo group was significantly reduced ($P < 0.05$), the apoptosis rate of neurons increased ($P < 0.01$), the expression of synapse proteins decreased ($P < 0.05$), the mitochondrial membrane potential decreased ($P < 0.01$), the opening degree of MPTP increased ($P < 0.01$), and the expression of CypD protein increased ($P < 0.01$). Cyclosporin A, a specific inhibitor of MPTP opening, could reduce hippocampal neuron apoptosis and synaptic damage caused by sevoflurane exposure, maintain mitochondrial membrane potential, and inhibit MPTP opening and CypD protein expression. **Conclusion** Prolonged exposure to sevoflurane can cause damage to hippocampal neurons in SD rats. The mechanism is related to the promotion of CypD-mediated MPTP opening.

Key words sevoflurane; hippocampal neurons; cyclosporin A; cyclophilin D; mitochondrial permeability transition pore