

## 虾青素调控 AMPK-SIRT1 通路对七氟醚诱导 HT22 神经细胞损伤的影响

李 瑜, 胡 莹, 于映映, 贾英萍\*

郑州大学附属儿童医院, 河南省儿童医院, 麻醉科, 河南 郑州 450000

**摘要:** 目的 研究虾青素对七氟醚诱导的海马神经元 HT22 细胞活力和细胞凋亡的作用与机制。方法 体外培养 HT22 细胞分为对照组、七氟醚组、七氟醚+虾青素 (1.25、2.50、5.00  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; 七氟醚组给予 4% 七氟醚刺激细胞 6 h; 七氟醚+虾青素组七氟醚刺激细胞前给予不同浓度的虾青素处理 2 h。采用 MTT 实验检测各组 HT22 细胞存活率, DCFH-DA 荧光探针和硫代巴比妥酸法分别检测各组细胞内的活性氧 (ROS) 水平和丙二醛 (MDA) 含量, 流式细胞术和 TUNEL 检测各组细胞凋亡, Western blotting 检测各组细胞中 CyclinD1、Cleaved Caspase-3、Bax 和 Bcl-2、AMPK、p-AMPK、SIRT1 蛋白的表达。结果 与对照组比较, 七氟醚组 HT22 细胞存活率显著下降和细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.05$ ), CyclinD1、Bcl-2、p-AMPK 和 SIRT1 蛋白表达减少 ( $P < 0.05$ ), Cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达增加 ( $P < 0.05$ ), ROS 活性和 MDA 含量降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 七氟醚+虾青素 HT22 细胞 Cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达下调 ( $P < 0.05$ ), CyclinD1、Bcl-2、p-AMPK 和 SIRT1 蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ ), ROS 活性和 MDA 含量降低 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性。结论 虾青素对七氟醚诱导的 HT22 细胞凋亡和氧化应激损伤具有保护作用, 其机制可能与调控 AMPK-SIRT1 通路有关。

**关键词:** 虾青素; 七氟醚; 海马神经元; 细胞凋亡; 氧化应激; AMPK-SIRT1 通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)04-0645-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.04.002

## Astaxanthin regulates AMPK-SIRT1 pathway on the effect of sevoflurane-induced HT22 nerve cell injury

LI Yu, HU Ying, YU Ying-ying, JIA Ying-ping

Department of Anesthesiology, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Children's Hospital, Zhengzhou 450000, China

**Abstract: Objective** To study the effect and mechanism of astaxanthin on the viability and apoptosis of hippocampal neuron HT22 cells induced by sevoflurane. **Methods** HT22 cells cultured *in vitro* were divided into control group, sevoflurane group, sevoflurane + astaxanthin (1.25, 2.50, 5.00  $\mu\text{mol/L}$ ) group. The cells of sevoflurane group was given 4% sevoflurane stimulation and treated for 6 h; The cells of sevoflurane + astaxanthin group was treated with different concentrations of astaxanthin for 2 h before 4% sevoflurane stimulation. The MTT experiment was used to detect the survival rate of HT22 cells in each group, and the DCFH-DA fluorescent probe and thiobarbituric acid method were performed to determine the levels of ROS and MDA content. Flow cytometry and TUNEL were applied to detect cell apoptosis in each group, and Western blotting was used to detect expression of CyclinD1, Cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2, AMPK, p-AMPK and SIRT1 proteins. **Results** Compared with the control group, the survival rate of HT22 cells in the sevoflurane group was significantly decreased and the apoptosis rate was significantly increased. CyclinD1, Bcl-2, p-AMPK and SIRT1 protein expression were decreased, Cleaved Caspase-3, Bax protein expression were increased, and ROS activity and MDA content were decreased. Compared with the model group, the expression of Cleaved Caspase-3 and Bax protein were down-regulated in the astaxanthin group, and the expression of CyclinD1, Bcl-2, p-AMPK and SIRT1 protein were up-regulated, the activity of ROS and the content of MDA were decreased, which were dose-dependent. **Conclusion** Astaxanthin has a protective effect on sevoflurane induced HT22 cells apoptosis and oxidative stress injury, and its mechanism may be correlated to the regulation of AMPK-SIRT1 pathway.

**Key words:** astaxanthin; sevoflurane; hippocampal neuron; apoptosis; oxidative stress; AMPK-SIRT1 pathway

收稿日期: 2020-09-17

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (2018020611); 河南省医学科技攻关计划 (2018020653); 河南省医学科技攻关计划 (2018020689)

作者简介: 李 瑜, 女, 河南商丘人, 主治医师, 主要从事麻醉学临床基础研究。E-mail: 734457626@qq.com

\*通信作者: 贾英萍, 女, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事小儿麻醉研究。E-mail: 1130275756@qq.com

在临床手术过程中,七氟醚是最常用的吸入性麻醉药之一,它具有脂溶性溶解度低、对气道刺激微弱、麻醉后苏醒快等特点,但会对机体大脑海马区组织产生一定毒性,导致患者大脑神经毒性和认知功能障碍,影响患者的治疗效果<sup>[1]</sup>。七氟醚在小儿麻醉术过程中,生命体征平稳,效果稳定,是儿童外科手术常用的麻醉剂之一<sup>[2-3]</sup>。目前,七氟醚产生毒性的机制与治疗方法仍有待于探索。虾青素是自然界广泛存在的一种天然类胡萝卜素,具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抑制动脉硬化等有益作用<sup>[4]</sup>。最新报道显示,虾青素降低乳酸脱氢酶(LDH)的释放,促进细胞活力,减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的活性氧(ROS)积累和细胞凋亡,对氧化应激损伤的心脏具有保护作用<sup>[5]</sup>。虾青素可以保护大鼠脑缺血再灌注损伤<sup>[6]</sup>。然而虾青素对七氟醚诱导的神经细胞氧化应激和凋亡影响尚未见报道。基于此,本研究以七氟醚诱导小鼠海马神经元来源的 HT22 细胞损伤为模型,探讨虾青素对神经细胞氧化应激和凋亡的保护作用及其可能机制,为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验药品与试剂

吸入性七氟烷(七氟醚),上海恒瑞医药有限公司,120 mL/瓶,批号:18041632;虾青素购自 Sigma 有限公司,50 mg,批号:472-61-7,质量分数 > 99.99%;DMEM 培养基,购自北京拜尔迪生物技术有限公司;胎牛血清,产品批号 150124,购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司;胰蛋白酶,产品批号 T1350,购自北京索莱宝科技有限公司;MTT 试剂,产品批号 ab211091,购自北京百奥创新科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡试剂盒,产品批号 BB17041X,购自上海贝博生物科技有限公司;Lipofectamine2000,产品批号 11668-027,购自美国 Thermo Fisher 公司;Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、SIRT1、AMPK、p-AMPK 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗均购自美国 Santa Cruz 公司;ROS 检测试剂盒,产品批号 181011,购自上海酶联生物科技有限公司;丙二醛(MDA)检测试剂盒,产品批号 170213,购自武汉默沙克生物科技有限公司。

### 1.2 细胞

小鼠海马神经元细胞 HT22(购自上海富衡生物技术有限公司),由本实验传代室冻存保存。

### 1.3 实验仪器

ELX800 酶标仪(美国 BIOTEK 公司);

FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);GelDoc Go 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

以含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HT22 细胞,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内培养,每隔 2 d 更换 1 次培养基,待细胞生长融合度达到 80%左右时进行传代培养。

### 2.2 实验处理与分组

以含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HT22 细胞,空白未处理组标记为对照组;体积分数为 4% 的七氟醚作用 HT22 细胞 6 h 作为七氟醚组<sup>[7]</sup>,虾青素预处理 HT22 细胞 2 h 后,在通入 4%七氟醚刺激 6 h,虾青素终浓度分别为 1.25、2.50、5.00 μmol/L<sup>[8]</sup>,分别为七氟醚+虾青素组。

### 2.3 MTT 法检测细胞增殖

各组细胞培养 6、12、24 h 后,每孔分别加入 20 μL MTT 溶液,充分混匀,室温条件下培养 4 h,弃上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μL,吹打混匀,摇床内孵育 10 min,应用酶标仪检测细胞在 490 nm 处的吸光度(A)值,以对照组细胞存活率作为 100%,比较分析各组细胞存活率变化。

### 2.4 HT22 细胞中 ROS 活性和 MDA 含量检测

各组 HT22 细胞经 0.25%胰蛋白酶消化,制备细胞悬液,按照 ROS 检测试剂盒说明书检测各组荧光强度,ROS 水平以荧光强度表示。收集各组细胞及培养液上清,采用硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量。

### 2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组 HT22 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,制备细胞悬液,调整细胞密度为 6×10<sup>5</sup> 个/mL,4 °C 条件下,1 000 r/min 离心 10 min,取细胞沉淀加入 100 μL 结合缓冲液,加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI,室温避光孵育 15 min,再次加入 400 μL 结合缓冲液,应用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

### 2.6 Western blotting 检测 CyclinD1、Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、SIRT1、AMPK、p-AMPK 和 β-actin 蛋白表达

取各组 HT22 细胞,弃旧培养基,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,4 °C 条件下,12 000 r/min 转速离心 10 min(离心半径 6 cm),吸取上清液置于另一离心管内,采用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。取适量蛋白与 2×上样缓冲液充分混合,置于 100 °C 恒温水浴锅内煮沸 5 min,使蛋白变性。蛋

白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),每孔加入50 μL蛋白样品,电泳条件:80 V、30 min,120 V、90 min。4 °C条件下(90 V电压)转膜2 h,用5%脱脂奶粉封闭1 h。将膜孵育一抗稀释液(1:500),4 °C孵育24 h,孵育二抗稀释液(1:2 000),室温孵育1 h,滴加增强型化学发光试剂(ECL),暗室曝光显影,自动凝胶成像系统以β-actin为内参分析各蛋白条带灰度值。

## 2.7 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析数据,本研究数据符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD- $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表1 虾青素对七氟醚处理HT22细胞存活和CyclinD1蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 1 Effects of astaxanthin on survival activity and CyclinD1 protein expression in HT22 cells treated with sevoflurane ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	C/(μmol·L <sup>-1</sup> )	存活率/%			CyclinD1 蛋白相对表达量		
		6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
对照	—	101.01 ± 6.17	98.25 ± 6.19	100.92 ± 8.55	0.67 ± 0.06	0.75 ± 0.09	0.76 ± 0.09
七氟醚	—	98.78 ± 13.26	83.24 ± 6.37*	73.06 ± 8.86*	0.65 ± 0.06	0.35 ± 0.06*	0.26 ± 0.03*
七氟醚+虾青素	1.25	97.92 ± 10.75	85.06 ± 9.63	83.89 ± 9.41#	0.63 ± 0.07	0.45 ± 0.04#	0.32 ± 0.02#
	2.50	99.46 ± 10.97	91.09 ± 8.34#&	86.15 ± 7.85#&	0.65 ± 0.03	0.50 ± 0.06#&	0.57 ± 0.10#&
	5.00	95.62 ± 5.70	95.53 ± 7.57#&▲	91.62 ± 11.93#&▲	0.62 ± 0.07	0.64 ± 0.09#&▲	0.66 ± 0.06#&▲

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与七氟醚组比较: # $P < 0.05$ ; 与七氟醚+虾青素 1.25 μmol·L<sup>-1</sup>组比较: & $P < 0.05$ ; 与七氟醚+虾青素 2.50 μmol·L<sup>-1</sup>组比较: ▲ $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs sevoflurane group; & $P < 0.05$  vs sevoflurane + astaxanthin 1.25 μmol·L<sup>-1</sup> group; ▲ $P < 0.05$  vs sevoflurane + astaxanthin 2.50 μmol·L<sup>-1</sup> group

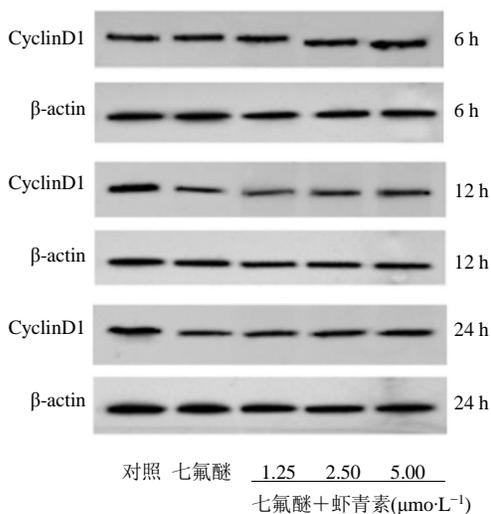


图1 Western blotting 检测 HT22 细胞中 CyclinD1 蛋白表达  
Fig. 1 Protein expression of CyclinD1 in HT22 cells detected by Western blotting

## 3 结果

### 3.1 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞存活和 CyclinD1 蛋白表达的影响

与对照组相比,七氟醚组 HT22 细胞 12、24 h 存活率和 CyclinD1 蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ );与七氟醚组相比,七氟醚+虾青素各浓度组 HT22 细胞 12、24 h 存活率和 CyclinD1 蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ ),与七氟醚+虾青素 1.25 μmol/L 组相比,七氟醚+虾青素 2.5 μmol/L 组、七氟醚+虾青素 5.00 μmol/L 组 HT22 细胞 12、24 h 存活率和 CyclinD1 蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ ),见表 1 和图 1。

### 3.2 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞氧化应激的影响

与对照组相比,七氟醚组 HT22 细胞 ROS 活性

和 MDA 含量显著升高( $P < 0.05$ );与七氟醚组相比,七氟醚+虾青素 1.25 μmol/L 组、七氟醚+虾青素 2.50 μmol/L 组、七氟醚+虾青素 5.00 μmol/L 组 HT22 细胞 ROS 活性、MDA 含量显著降低( $P < 0.05$ ),与七氟醚+虾青素 1.25 μmol/L 组相比,七氟醚+虾青素 2.50 μmol/L 组、七氟醚+虾青素 5.00 μmol/L 组 HT22 细胞 ROS 活性、MDA 含量显著降低( $P < 0.05$ ),见图 2 和表 2。

### 3.3 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞凋亡的影响

TUNEL/DAPI 荧光染色法和流式细胞术结果显示,与对照组相比,七氟醚组 HT22 细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ );与七氟醚组相比,七氟醚+虾青素各浓度组 HT22 细胞凋亡率降低( $P < 0.05$ );与七氟醚+虾青素 1.25 μmol/L 组相比,七氟醚+虾青素 2.50 μmol/L 组、七氟醚+虾青素 5.00 μmol/L 组 HT22 细胞凋亡率降低( $P < 0.05$ ),见图 3、4 和表 3。

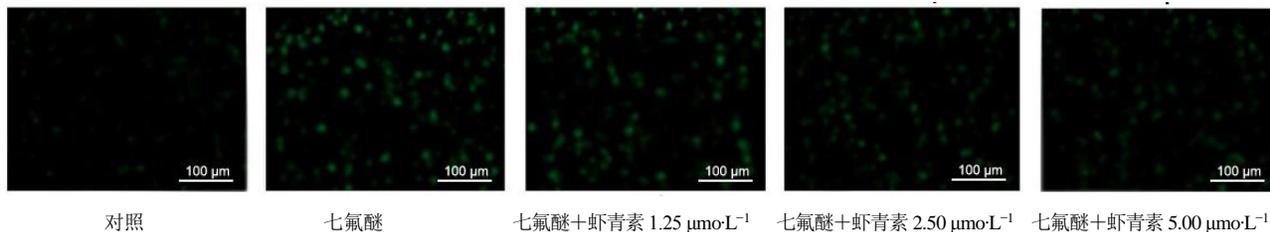


图 2 DCFH-DA 荧光探针检测 HT22 细胞 ROS 活性 (×200)

Fig. 2 ROS activity of HT22 cells detected by DCFH-DA fluorescent probe (× 200)

表 2 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞 ROS 活性、MDA 含量的影响 (  $\bar{x} \pm s, n = 9$  )

Table 2 Effects of astaxanthin on ROS activity and MDA content of HT22 cells treated with sevoflurane (  $\bar{x} \pm s, n = 9$  )

组别	C/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	ROS 荧光强度 (MFI)	MDA
对照	—	98.50 ± 5.16	4.29 ± 0.48
七氟醚	—	309.34 ± 8.74*	7.09 ± 0.41*
七氟醚+虾青素	1.25	243.41 ± 7.19#	5.63 ± 0.43#
	2.50	187.83 ± 6.74#&	3.33 ± 0.35#&
	5.00	174.84 ± 7.99#&	2.59 ± 0.31#&

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与七氟醚组比较: # $P < 0.05$ ; 与七氟醚+虾青素 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较: & $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs sevoflurane group; & $P < 0.05$  vs sevoflurane + astaxanthin 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group

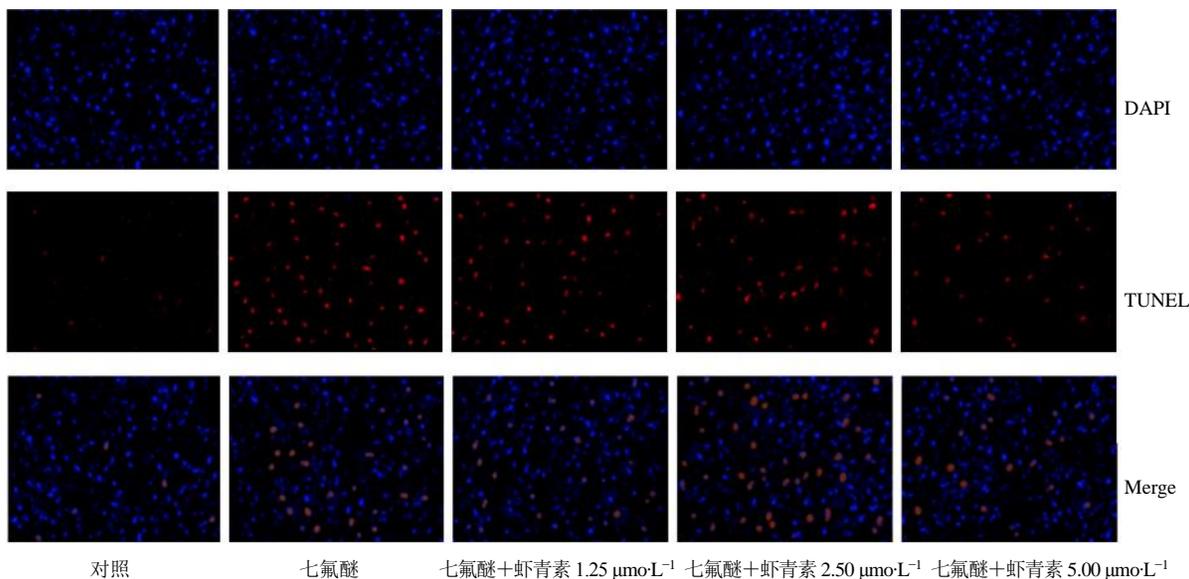


图 3 TUNEL/DAPI 荧光染色法检测 HT22 细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptosis rate of HT22 cells detected by TUNEL/DAPI fluorescent staining method

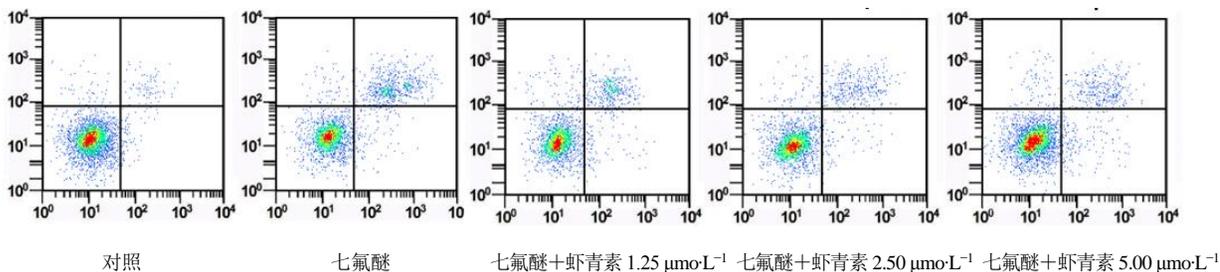


图 4 流式细胞术检测 HT22 细胞凋亡率

Fig. 4 Flow cytometry detected HT22 cell apoptosis rate

表 3 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )Table 3 Effect of astaxanthin on apoptosis of HT22 cells treated with sevoflurane ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	C/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	HT22 细胞凋亡率/%	
		TUNEL/DAPI 荧光染色法	流式细胞术
对照	—	1.00 $\pm$ 0.11	3.21 $\pm$ 0.56
七氟醚	—	6.24 $\pm$ 0.71*	16.73 $\pm$ 1.42*
七氟醚+虾青素	1.25	5.23 $\pm$ 0.31 <sup>#</sup>	12.17 $\pm$ 1.41 <sup>#</sup>
	2.50	3.09 $\pm$ 0.35 <sup>#&amp;</sup>	7.45 $\pm$ 0.99 <sup>#&amp;</sup>
	5.00	2.36 $\pm$ 0.58 <sup>#&amp;</sup>	6.55 $\pm$ 0.80 <sup>#&amp;</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与七氟醚组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与七氟醚+虾青素 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs sevoflurane group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs sevoflurane + astaxanthin 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group

### 3.4 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比, 七氟醚组 HT22 细胞 Cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与七氟醚组相比, 七氟醚+虾青素各浓度组 HT22 细胞 Cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与七氟醚+虾青素 1.25  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 七氟醚+虾青素 2.50  $\mu\text{mol/L}$  组、七氟醚+虾青素 5.00  $\mu\text{mol/L}$  组 HT22 细胞 Cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 5 和表 4。

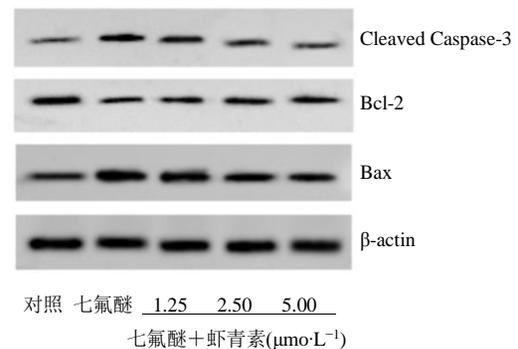


图 5 Western blotting 检测 HT22 细胞 Cleaved Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

Fig. 5 Protein expression of Cleaved Caspase-3, Bax, and Bcl-2 in HT22 cells detected by Western blotting

表 4 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞 Cleaved Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 4 Effects of astaxanthin on the protein expression of Cleaved Caspase-3, Bax and Bcl-2 in HT22 cells treated with sevoflurane ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	C/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	蛋白相对表达量		
		Cleaved Caspase-3	Bax	Bcl-2
对照	—	0.24 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.05
七氟醚	—	0.56 $\pm$ 0.08*	0.26 $\pm$ 0.06*	0.72 $\pm$ 0.07*
七氟醚+虾青素	1.25	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	0.46 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>
	2.50	0.35 $\pm$ 0.02 <sup>#&amp;</sup>	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>#&amp;</sup>	0.43 $\pm$ 0.05 <sup>#&amp;</sup>
	5.00	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>#&amp;</sup>	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>#&amp;</sup>	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>#&amp;</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与七氟醚组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与七氟醚+虾青素 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs sevoflurane group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs sevoflurane + astaxanthin 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group

### 3.5 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞 SIRT1、p-AMPK 和 AMPK 蛋白表达的影响

与对照组相比, 七氟醚组 HT22 细胞 SIRT1 和 p-AMPK 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与七氟醚组相比, 七氟醚+虾青素各浓度组 HT22 细胞 SIRT1 和 p-AMPK 蛋白表达显著降低 ( $P <$

0.05); 与七氟醚+虾青素 1.25  $\mu\text{mol/L}$  组相比, 七氟醚+虾青素 2.50  $\mu\text{mol/L}$  组、七氟醚+虾青素 5.00  $\mu\text{mol/L}$  组 HT22 细胞 SIRT1 和 p-AMPK 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), AMPK 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); AMPK 蛋白在各组间差异不显著; 见图 6 和表 5。

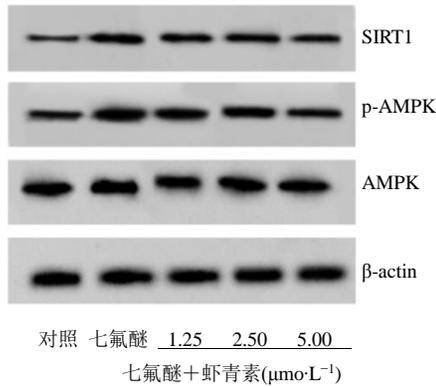


图 6 Western blotting 检测 HT22 细胞 SIRT1、p-AMPK 和 AMPK 蛋白表达

Fig. 6 Protein expression of SIRT1, p-AMPK and AMPK in HT22 cells detected by Western blotting

表 5 虾青素对七氟醚处理 HT22 细胞 SIRT1、p-AMPK 和 AMPK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 5 Effect of astaxanthin on protein expression of SIRT1, p-AMPK, and AMPK in HT22 cells treated with sevoflurane ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	C/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	蛋白相对表达量		
		SIRT1	p-AMPK	AMPK
对照	—	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.07	0.86 ± 0.05
七氟醚	—	0.57 ± 0.07*	0.74 ± 0.08*	0.85 ± 0.09
七氟醚 + 虾青素	1.25	0.43 ± 0.05#	0.54 ± 0.03#	0.85 ± 0.03
	2.50	0.35 ± 0.03#&	0.47 ± 0.04#&	0.86 ± 0.05
	5.00	0.32 ± 0.02#&	0.40 ± 0.05#&	0.81 ± 0.03

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与七氟醚组比较: # $P < 0.05$ ; 与七氟醚 + 虾青素 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较: & $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs sevoflurane group; & $P < 0.05$  vs sevoflurane + astaxanthin 1.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group

显著增多, 可见七氟醚诱导 HT22 细胞凋亡和氧化应激损伤, 与文献报道<sup>[6, 9]</sup>的神经损伤结果相吻合。

虾青素是非维生素 A 型类胡萝卜素类物质, 具有很强的抗氧化能力, 具有减轻过氧化脂质损伤的作用<sup>[11]</sup>。资料显示, 虾青素能够降低大鼠脑缺血再灌注损伤, 抑制七氟醚刺激的脑细胞凋亡, 并表现出一定的浓度依赖性<sup>[5, 7]</sup>。虾青素减弱了谷氨酸诱导的 HT22 细胞活力丧失和 LDH 释放, 降低 caspase-3/8/9 活性并裂解 PARP, 以及抑制细胞内 ROS 的积累, 增加抗氧化反应元件 (ARE) 的活性, 从而保护 HT22 细胞免受谷氨酸损伤<sup>[12]</sup>。本研究利用七氟醚复制 HT22 细胞损伤模型, 结果表明, 不同浓度虾青素能拮抗七氟醚诱导的 HT22 细胞活性降低, 细胞凋亡、ROS 活性、MDA 含量的增加。细胞凋亡过程由 Bcl-2、Bax、caspase 家族等凋亡相关基因调控, Bcl-2 是抑制细胞凋亡的备受关注的基因之一, 而 Bax、caspase 是促进细胞凋亡的基

#### 4 讨论

目前, 七氟醚对神经细胞的药理作用饱受争议。研究表明, 七氟醚可以通过抑制自噬和凋亡来保护大脑中动脉阻塞所致的脑损伤<sup>[7]</sup>, 还可抑制氧糖剥夺导致的 Akt 和雷帕霉素 (mTOR) 失活, 降低 LDH 形成并减轻自噬, 从而发挥神经细胞保护作用<sup>[8]</sup>。然而, 也有研究显示出相反的结果, BI 等<sup>[9]</sup>学者指出, 多次吸入七氟醚会使小鼠脑损伤, 造成认知功能障碍; 尤其在幼年大鼠中, 使用七氟醚麻醉会延迟其神经元发育成熟, 从而影响大鼠成年后的认知功能。七氟醚处理 7 日龄 SD 大鼠, 显著增加神经细胞的凋亡<sup>[10]</sup>。本研究利用七氟醚诱导 HT22 细胞损伤, 发现 4% 七氟醚刺激 HT22 细胞 6 h 后, 细胞存活率降低, 凋亡率增加, ROS 活性、MDA 含量

因, 其中 Bcl-2 与 Bax 两种蛋白表达比例与细胞凋亡呈负相关<sup>[13-14]</sup>。本研究 Western blotting 实验证实, 虾青素可以上调七氟醚诱导的 HT22 细胞中 Bcl-2 蛋白表达, 下调 Bax 蛋白表达, 最终阻止 Caspase-3 蛋白裂解, 进而促进细胞存活并抑制细胞凋亡。由此可见, 虾青素通过促进细胞存活、抑制细胞凋亡、减轻氧化应激来保护七氟醚诱导的 HT22 细胞损伤。

研究显示, AMPK/SIRT1 通路是细胞代谢和凋亡的重要途径之一<sup>[15]</sup>。AMPK 是细胞重要的能量代谢信号接收和调控靶点, 当机体组织细胞衰老时, AMPK 表达或活性降低<sup>[16]</sup>。SIRT1 是一类 NAD<sup>+</sup> 依赖的组蛋白脱乙酰化酶, 其定位于细胞核中, 与细胞存活、增殖、衰老和死亡等过程关系密切<sup>[17-18]</sup>。研究表明, AMPK 与 SIRT1 可以相互调节, 形成正反馈回路, 影响细胞内能量代谢<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, 七氟醚可降低 HT22 小鼠海马神经细胞 AMPK 和 SIRT1 蛋白表达, 与文献报道一致<sup>[20]</sup>。本实验用

不同浓度虾青素处理七氟醚损伤的 HT22 细胞, 随着虾青素浓度的增加, SIRT1 和 p-AMPK 蛋白表达随之增加, 提示 AMPK-SIRT1 可能是虾青素保护七氟醚致 HT22 细胞损伤的重要调控因子。

本研究结果表明虾青素可明显减轻七氟醚诱导的 HT22 细胞凋亡和氧化应激损伤, 其分子机制可能与调控 AMPK-SIRT1 通路相关, 但其具体的分子靶点和下游信号途径还有待进一步研究。本研究表明了虾青素对七氟醚致神经细胞损伤的保护作用, 为开发虾青素用于防治神经损伤提供药理学依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Yang F, Zhang Y F, Tang Z Y, *et al.* Hemin treatment protects neonatal rats from sevoflurane-induced neurotoxicity via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 242: 117151.
- [2] 石 泉, 刘素萍, 赵文涛, 等. 不同剂量地佐辛预防扁桃体联合腺样体切除术患儿七氟醚麻醉恢复期躁动的效果对比观察 [J]. *广西医学*, 2017, 9(39): 143-145.
- [3] 王 群, 张栋斌, 胡 静. 恒速输注右美托咪定用于小儿七氟醚全麻苏醒期躁动的剂量探讨 [J]. *山东医药*, 2020, 60(25): 93-95.
- [4] 尹 蕾, 尚小玉, 张泽生. 虾青素制品抗炎作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(2): 267-269.
- [5] Qu X, Zhang Z, Hu W, *et al.* Attenuation of the Na/K<sup>+</sup>-ATPase/Src/ROS amplification signaling pathway by astaxanthin ameliorates myocardial cell oxidative stress injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5125-5134.
- [6] Cakir E, Cakir U, Tayman C, *et al.* Favorable effects of astaxanthin on brain damage due to ischemia-reperfusion injury [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2020, 23(3): 214-224.
- [7] Wen X, Huang A, Hu J, *et al.* Neuroprotective effect of astaxanthin against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells: Involvement of the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway [J]. *Neuroscience*, 2015, 303: 558-568.
- [8] Shi C X, Jin J, Wang X Q, *et al.* Sevoflurane attenuates brain damage through inhibiting autophagy and apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion rats [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 123-130.
- [9] Bi C J, Cai Q P, Shan Y Y, *et al.* Sevoflurane induces neurotoxicity in the developing rat hippocampus by upregulating connexin 43 via the JNK/c-Jun/AP-1 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 1469-1476.
- [10] 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.
- [11] 徐 革, 杨 曼, 于 洋, 等. 辅酶 Q10 对多次吸入七氟醚致新生小鼠脑损伤时载脂蛋白 E 表达的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39(11): 1302-1305.
- [12] Dong L Y, Jin J, Lu G, *et al.* Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(3): 960-974.
- [13] 潘 雷, 周 莹, 刘路明, 等. 天然虾青素对大鼠 MCAO 模型的保护作用研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2014, 23(23): 9-11.
- [14] Kehr S, Haydn T, Bierbrauer A, *et al.* Targeting BCL-2 proteins in pediatric cancer: Dual inhibition of BCL-X and MCL-1 leads to rapid induction of intrinsic apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2020, 482: 19-32.
- [15] Garcia D, Shaw R J. AMPK: Mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. *Mol Cell*, 2017, 66: 789-800.
- [16] 李 岩, 李洪民, 刘 磊, 等. 硫化氢通过 CaMKK $\beta$ -AMPK 信号通路延缓大鼠主动脉内皮细胞老化 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(5): 566-575.
- [17] Braidy N, Guillemin G J, Mansour H, *et al.* Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19194.
- [18] Nakamura T, Lipton S A. Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18: 239-249.
- [19] Price N L, Gomes A P, Ling A J, *et al.* SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(5): 675-690.
- [20] Liu Z Y, Hu S P, Ji Q R, *et al.* Sevoflurane pretreatment inhibits the myocardial apoptosis caused by hypoxia reoxygenation through AMPK pathway: An experimental study [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(2): 148-151.

【责任编辑 刘东博】