

. 实验研究 .

褪黑激素对体外培养神经元七氟醚损害的保护作用

石磊 周银芳 方圆

【摘要】目的 探讨褪黑激素(MLT)对体外培养神经元七氟醚(SEV)损伤的保护作用及其机制。**方法** 取SD大鼠乳鼠全脑皮层组织,分离皮质神经元进行体外培养;MLT预处理24 h后,4% SEV作用神经元;采用CCK-8法检测神经元存活率,流式细胞术检测神经元凋亡率,qPCR检测神经元miR-130a-3p和ROCK2 mRNA水平;免疫印迹法检测凋亡相关蛋白表达;应用在线预测软件TargetScan分析预测miR-130a-3p与ROCK2靶向关系并验证。**结果** SEV明显降低神经元存活率以及miR-130a-3p和ROCK2 mRNA水平($P<0.05$),明显增加神经元凋亡率及凋亡相关蛋白cle-caspase3和cle-caspase9表达水平($P<0.05$);MLT明显抑制SEV的作用($P<0.05$)。软件TargetScan分析显示,miR-130a-3p与ROCK2的3'非编码区第846~852碱基处存在结合位点,PCR和免疫印迹法检测显示,miR-130a-3p与ROCK2存在靶向关系。ROCK2过表达明显逆转MLT预处理的效果($P<0.05$)。**结论** MLT预处理明显改善SEV对体外培养的大鼠乳鼠皮质神经元的损害,机制可能是上调miR-130a,进而靶向抑制ROCK2表达。

【关键词】 皮质神经元;褪黑激素;miR-130a;ROCK2;七氟醚;大鼠乳鼠

【文章编号】 1009-153X(2021)05-0354-06 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 36; R 614

Protective effect of melatonin on sevoflurane injury to cultured neonatal rat cortical neurons

SHI Lei¹, ZHOU Yin-fang², FANG Yuan¹. 1. Department of Anesthesiology, Ankang Central Hospital, Ankang 725000, China; 2. Department of Laboratory, Ankang People's Hospital, Ankang 725000, China

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of melatonin (MLT) on the sevoflurane (SEV) injury to cultured neonatal rat cortical neurons. **Methods** The neonatal rat cortical neurons were isolated from the whole cerebral cortex tissues of SD neonatal rats and cultured *in vitro*. After pretreatment with MLT for 24 h, the cortical neurons were treated with 4% SEV. The survival and apoptosis rates of neurons were detected using CCK-8 method and flow cytometry, respectively. The levels of miR-130a-3p and ROCK2 mRNA were detected by qPCR. The expression levels of apoptosis-related proteins were detected by Western blot. The targeted relationship between miR-130a-3p and ROCK2 was predicted using TargetScan software and verified. **Results** SEV significantly decreased the neuron survival rate and the levels of miR-130a-3p and ROCK2 mRNA ($P<0.05$), and significantly increased the neuron apoptosis rate and expression levels of apoptosis-related proteins including cle-caspase3 and cle-caspase9 ($P<0.05$). MLT significantly inhibited the effect of SEV on the cultured neurons ($P<0.05$). Software TargetScan analysis showed that miR-130a-3p and ROCK2 had a binding site at base 846~852 of the 3'non-coding region. PCR and Western blotting results showed that miR-130a-3p and ROCK2 had a targeting relationship. ROCK2 overexpression significantly reversed the effect of MLT pretreatment on the injured neurons induced by SEV ($P<0.05$). **Conclusions** MLT pretreatment significantly improve the SEV injury to the cultured neonatal rat cortical neurons, which may be possibly through up-regulation miR-130a, and then targeted inhibition of ROCK2 expression.

【Key words】 Neonatal rat cortical neuron; Melatonin; miR-130a; Sevoflurane

七氟醚(sevoflurane, SEV)是临床剖宫产术和儿科麻醉的常用吸入麻醉药,具有快速诱导、苏醒快的优点,且对血流动力学影响较小^[1]。研究显示,SEV影响神经元的发育,导致树突、树突棘发育障碍^[2,3]。预防SEV吸入引起的神经毒性为目前研究热点。褪

黑激素(melatonin, MLT)主要由松果体合成,具有多种生物学效应,如调控昼夜节律、改善睡眠质量、抑制肿瘤生长、抗氧化及抗凋亡等^[4]。Sun等^[5]研究发现,儿童心脏手术SEV吸入麻醉后,血清MLT水平的降低与神经损伤密切相关。本研究观察MLT预处理对SEV作用后新生大鼠皮质神经元存活与凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 新生大鼠皮质神经元的分离与鉴定^[6] 取20只SD大鼠乳鼠(出生24 h内,北京实验动物研究中心

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.05.012

基金项目:陕西省科技厅社会发展科技攻关项目(2016SF-246)

作者单位:725000 陕西,安康市中心医院麻醉科(石磊、方圆);

725000 陕西,安康市人民医院检验科(周银芳)

通讯作者:方圆, E-mail:fangyuan110@163.com

提供),断头处死,取出全脑并分离皮层组织,剪成小块,加入胰蛋白酶(1.25 g/L)消化 15 min,室温 1 000 转/min 离心 5 min,经 200 目筛网过滤。然后,接种至多聚赖氨酸预包被的培养瓶中培养 3 d,加入阿糖胞苷抑制非神经元细胞,培养至第 6 天时,采用微管关联蛋白 2 免疫荧光染色,鉴定、分离新生大鼠皮质神经元细胞,纯度约为 98%。见图 1。

1.2 细胞分组与处理

1.2.1 SEV 最佳作用时间 以 4% 的 SEV(厦门慧嘉生物科技有限公司)作用神经元 0、2、4、6、8、10 h,检测细胞存活率、凋亡率,以确定最佳作用时间。

1.2.2 MLT 预处理对 SEV 作用后神经元存活与凋亡的影响 10、50、100 μmol/L 的 MLT(美国 Sigma-Aldrich 公司)预处理 24 h,再用 4% SEV 作用 10 h,根据 MLT 浓度分为正常组(正常培养神经元)、对照组(4% SEV 作用 10 h,无 MLT 预处理),以及低、中、高剂量 MLT 组(10、50、100 μmol/L MLT 预处理 24 h 后,4% SEV 作用 10 h)。检测神经元存活率、凋亡率,以及 miR-130a-3p 和细胞凋亡相关蛋白表达水平。

1.2.3 miR-130a-3p 与 ROCK2 的靶向关系 构建过表达 miR-130a-3p、ROCK2 的细胞株,参照脂质体 3 000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书,将对照模拟物(normal control mimic,NC mimic)和 miR-130a-3p 模拟物(miR-130a-3 mimic)分别转染神经元,另加入慢病毒(lentivirus, LV)、ROCK2 慢病毒(LV-ROCK2)感染神经元,NC mimic、miR-130a-3p mimic 及 LV 由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。将神经元分为 NC mimic 组、miR-130a-3p mimic 组、LV-ROCK2 组和 miR-130a-3p+ROCK2 组。

1.2.4 ROCK2 过表达对 MLT 预处理后 SEV 作用神经元存活和凋亡的影响 将神经元分为 SEV 组(4% SEV 作用 10 h)、高剂量 MLT 组(100 μmol/L MLT 预处理 24 h 后,4% SEV 作用 10 h)、LV-ROCK2 组(ROCK2 慢病毒感染神经元后,4% SEV 作用 10 h)和 MLT+ROCK2 组(ROCK2 慢病毒感染神经元后,100 μmol/L MLT 预处理 24 h 后,4% SEV 作用 10 h)。

1.3 CCK-8 法检测神经元存活率 将神经元以 1×10³/孔接种至 96 孔板,添加含有 10% 细胞计数试剂(上海江莱生物科技有限公司)的培养基,继续培养 4 h。450 nm 处检测光密度值,计算细胞存活率[(OD_{处理}-OD_{0h})/OD_{0h}×100%]。

1.4 流式细胞仪检测神经元凋亡率 收集处理后细胞,调整密度为 3×10⁶ 个/ml,加入预冷乙醇 4 ℃ 下固定 1 h,重悬后经 400 目筛网过滤,加入 100 μl 结合缓

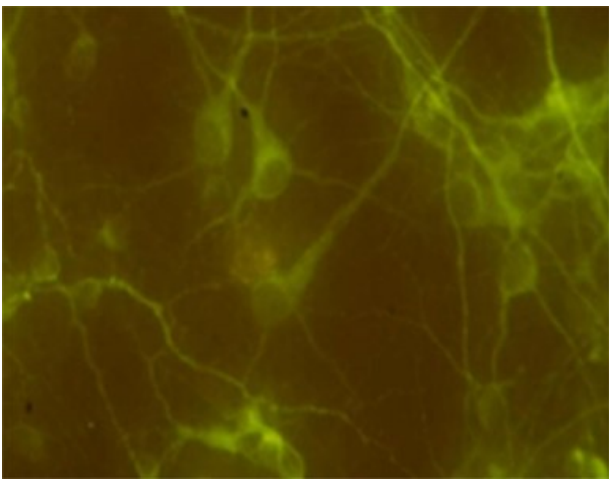


图 1 体外培养神经元免疫荧光染色(×400)

冲液、2 μl FITC 标记的 Annexin-V 及 1 μl PI 染液(武汉博士德生物工程有限公司),室温下避光孵育 30 min,流式细胞仪检测。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测细胞 miR-130a-3p 和 ROCK2 mRNA 的表达^[7,8] 收集处理后神经元,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,根据逆转录试剂盒操作规范合成 cDNA 模板链,反应体系(10 μl)包括:2 μl 逆转录 buffer、0.2 μl 上游引物、0.2 μl 下游引物、0.1 μl dNTP、0.5 μl 逆转录酶、5 μl 无 RNA 酶水和 2 μl 提取的 RNA。将 cDNA 模板混入荧光染料,应用荧光定量 PCR 仪分析,反应体系(50 μl)包括:10 μl 荧光染料、0.5 μl 上游引物、0.5 μl 下游引物、0.5 μl dNTP、1 μl Taq 酶、32.5 μl 无 RNA 酶水和 5 μl cDNA。miR-130a-3p 以 U6 为内参,ROCK2 以 GADPH 为内参。ROCK2 上游引物 5'-ATTGAGCAGCTGGAATCTAA-3',下游引物 5'-GTCTCTTCTCCAGTTTCGTAC-3'。所有引物由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 miR-130a-3p 和 ROCK2 mRNA 的相对表达量。

1.6 免疫印迹法检测细胞相关蛋白的表达 收集处理后神经元,采用放射免疫沉淀法提取总蛋白;SDS-PAGE 电泳,110 V 恒压电泳 1.5 h;采用湿转法将蛋白转移至硝酸纤维素膜;5 % 脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入一抗[GADPH(1:1 000);cle-caspase3(1:1 500);cle-caspase9(1:1 500);ROCK2(1:1 000);美国 Cell Signaling 公司]4 ℃ 下孵育过夜;然后加入二抗(1:10 000;美国 Cell Signaling 公司)37 ℃ 孵育 1 h。化学发光液进行蛋白显影、拍照。

1.7 双荧光素酶报告实验验证靶向关系 应用在线预测软件 TargetScan 分析 miR-130a-3p 和 ROCK2 的可能结合位点信息,合成含该位点的 DNA 片段

(WT)以及含该位点突变体的 DNA 片段(MUT),并将上述片段克隆至双荧光素酶启动子载体上,分别用上述质粒、NC mimic 及 miR-130a-3p mimic 转染神经元,培养 48 h 后加入 100~200 μl 裂解液,取 10 μl 细胞裂解液均匀混入 50 μl LAR II 试剂,置于检测仪读数萤火虫荧光素酶反应强度(R);再均匀加入

50 μl Stop & Glo reagent 试剂,置于检测仪读数海肾荧光素酶反应强度(F),计算荧光素酶活性(R/F)。试剂盒购自上海群己生物科技有限公司。

1.8 统计学方法 采用SPSS 21.0软件分析;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和SNK-*q*法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

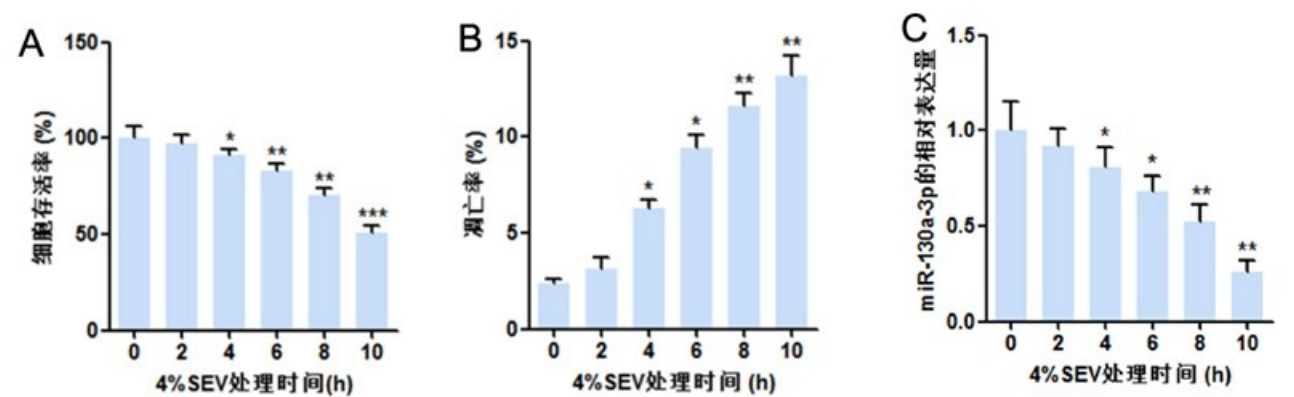


图2 SEV对外培养神经元存活和凋亡的影响
与0 h组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;SEV. 七氟醚

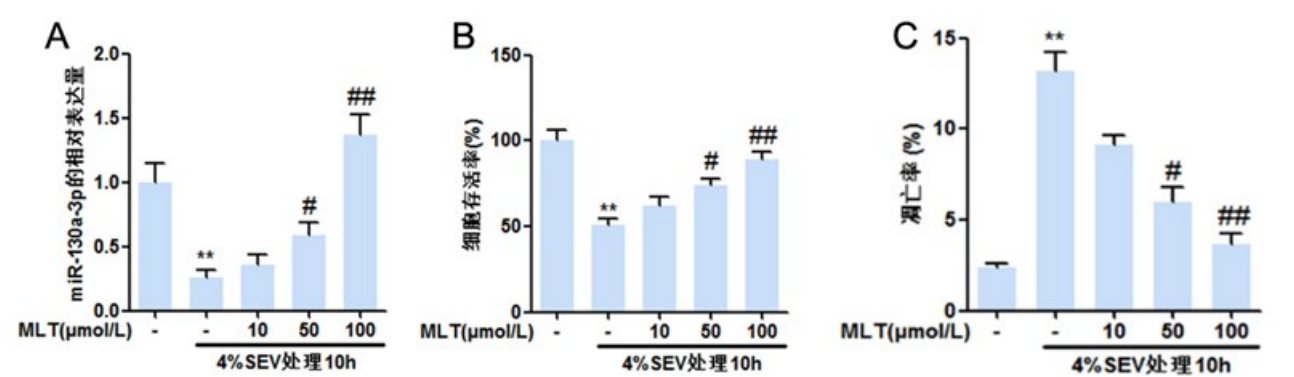


图3 MLT预处理对SEV作用后体外培养神经元存活和凋亡的影响
与正常组比较,** $P<0.01$;与4% SEV 处理组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;MLT. 褪黑激素;SEV. 七氟醚

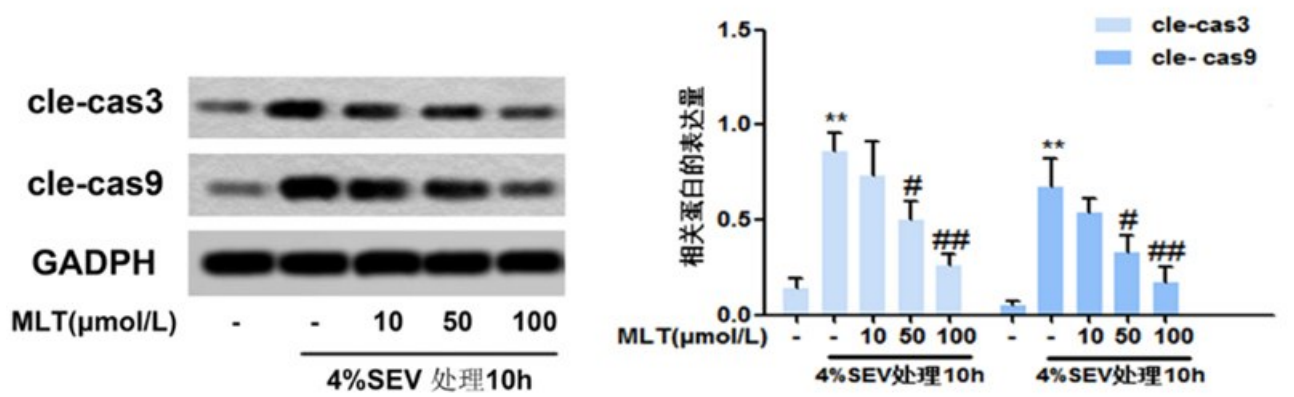


图4 MLT预处理对SEV作用后体外培养神经元凋亡相关蛋白表达的影响
与正常组比较,** $P<0.01$;与4% SEV 处理组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;MLT. 褪黑激素;SEV. 七氟醚

2 结 果

2.1 SEV 对神经元存活和凋亡的影响 与 0 h 比较, SEV 作用后 2、4、6、8、10 h 神经元存活率和 miR-130a-3p 表达水平均明显降低, 凋亡率却明显升高 ($P<0.05$), 其中 10 h 时作用最显著 ($P<0.05$)。见图 2。SEV 作用 10 h 进行后续实验。

2.2 MLT 预处理对 SEV 作用后神经元存活和凋亡的影响 与正常组比较, SEV 组 miR-130a-3p 表达水平、神经元存活率均明显降低 ($P<0.05$), 神经元凋亡率及 cle-caspase3 和 cle-caspase9 蛋白表达水平均明显增高 ($P<0.05$)。与 SEV 组比较, 中、高剂量 MLT 组

miR-130a-3p 表达水平和神经元存活率均明显增加 ($P<0.05$), 神经元凋亡率及 cle-caspase3 和 cle-caspase9 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$), 而且高剂量 MLT 明显优于中剂量 MLT。见图 3、4。高剂量 MLT 进行后续实验。

2.3 miR-130a-3p 与 ROCK2 存在靶向关系 软件 TargetScan 分析显示, miR-130a-3p 与 ROCK2 的 3' 非编码区第 846~852 碱基处存在结合位点。PCR 检测显示, 与 0 h 比较, SEV 作用后 2、4、6、8、10 h 神经元 ROCK2 mRNA 表达明显升高, 10 h 升高最显著 ($P<0.05$); 与对照组相比, 过表达 miR-130a-3p 后 miR-130a-3p 表达升高 ($P<0.05$), 过表达 ROCK2 后

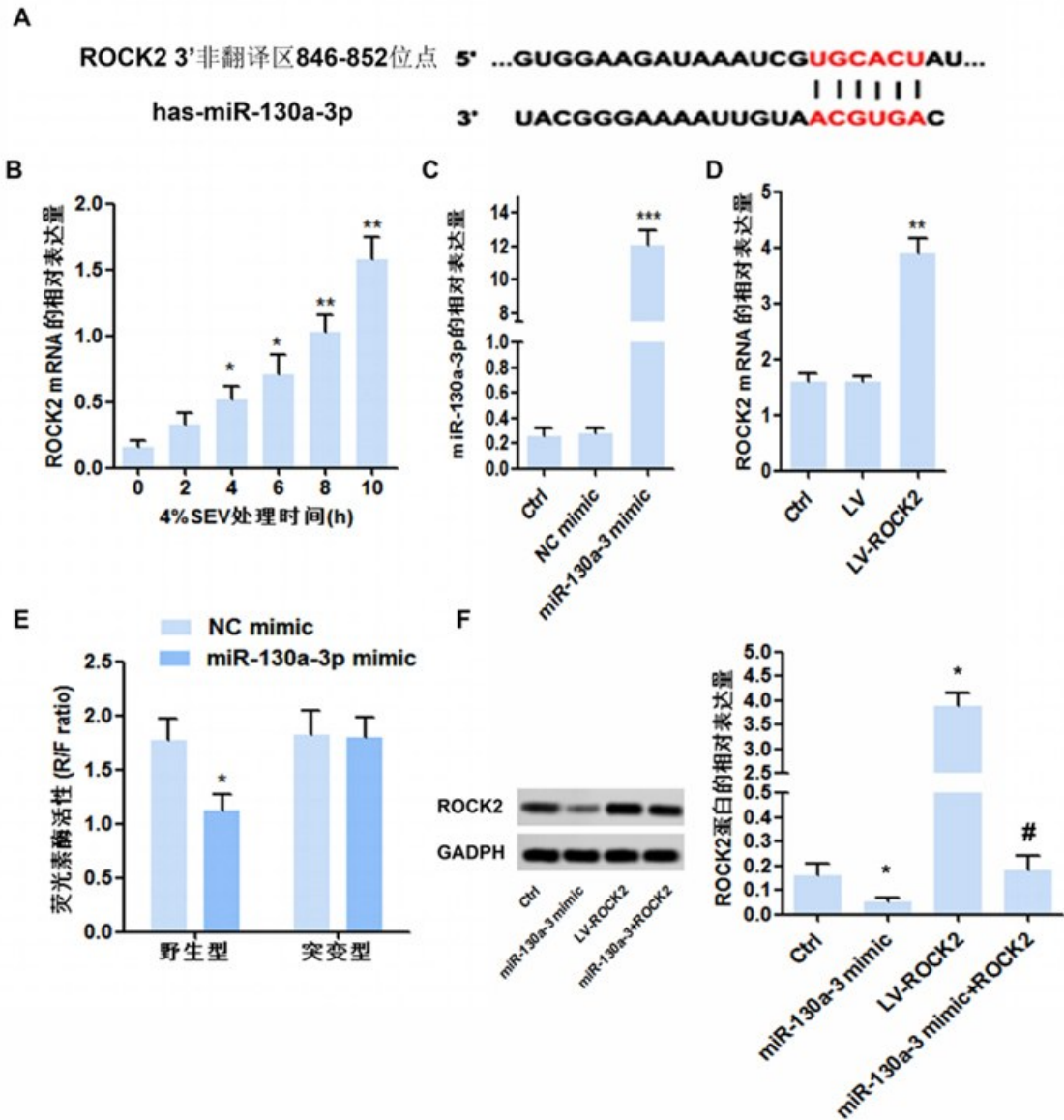


图5 miR-130a-3p与ROCK2靶向关系

与 0 h 组、SEV 组、NC mimic 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 LV-ROCK2 组比较, # $P<0.05$; Ctrl. SEV 组; NC mimic. 模拟物对
照组; miR-130a-3p mimic. miR-130a-3p 模拟物; LV-ROCK2. 含 ROCK2 慢病毒; MLT. 褪黑激素; SEV. 七氟醚

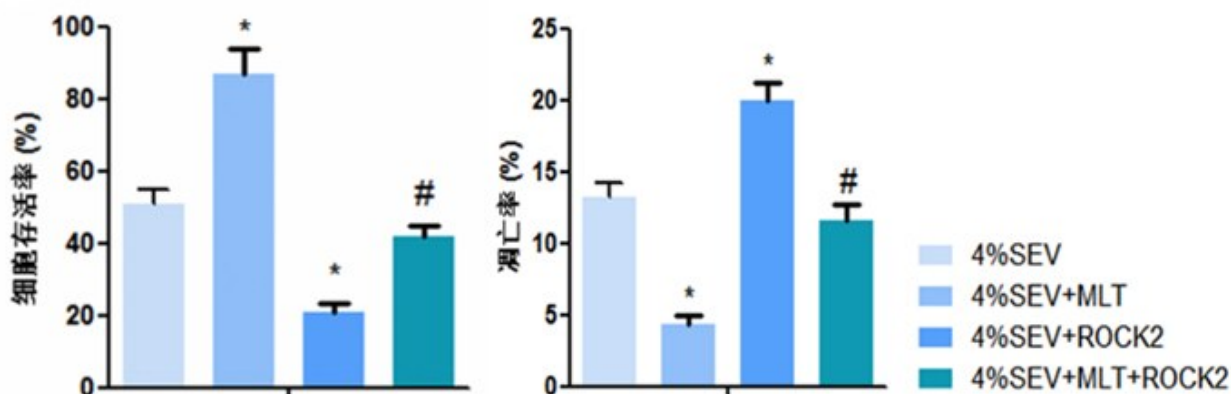


图6 ROCK2过表达对MLT预处理后SEV作用神经元存活和凋亡的影响
与SEV组比较,* $P<0.05$;与MLT组、ROCK2组比较,# $P<0.05$;MLT, 褪黑激素;SEV, 七氟醚

ROCK2 mRNA 表达升高($P<0.05$)。双荧光素酶报告实验结果显示,与 NC mimic 组比较,含有 WT 及 miR-130a-3p mimic 神经元荧光素酶活性明显降低($P<0.05$),而含有 MUT 及 miR-130a-3p mimic 神经元荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$)。免疫印迹法检测显示,与对照组比较,miR-130a-3p mimic 组 ROCK2 蛋白表达明显降低($P<0.05$),LV-ROCK2 组 ROCK2 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与 LV-ROCK2 组比较,miR-130a-3p+ROCK2 组 ROCK2 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图 5。

2.4 ROCK2 过表达对 MLT 预处理后 SEV 作用神经元存活和凋亡的影响 与 SEV 组比较,高剂量 MLT 组神经元存活率明显升高、凋亡率明显降低($P<0.05$),LV-ROCK2 组神经元存活率明显降低、凋亡率明显增高($P<0.05$)。与 LV-ROCK2 组相比,MLT+ROCK2 组神经元存活率明显增加、凋亡率明显降低($P<0.05$)。与高剂量 MLT 组比较,MLT+ROCK2 组神经元存活率明显降低、凋亡率明显增加($P<0.05$)。见图 6。

3 讨论

动物实验表明,SEV 对于未成熟脑的神经毒性表现为神经元凋亡^[9]。既往研究显示,miR-130a-3p 可调控肿瘤细胞增殖、迁移与侵袭,具有抗肿瘤作用^[10]。Jiang 等^[11]研究表明,miR-130a-3p 还可改善高糖诱导的足细胞功能障碍。本文结果显示 miR-130a-3p 参与调控 SEV 诱导的体外培养神经元凋亡过程。

MLT 是脊椎动物体内重要的激素,具有调整时差、改善睡眠、神经保护、抗肿瘤等作用。李林成等^[12]研究发现,MLT 可调控 miRNA-9 表达,抑制脓毒症

炎症反应。Gu 等^[13]研究显示,MLT 可抑制 miRNA-155 的表达,从而抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭。本文结果显示 MLT 可通过上调 miR-130a-3p 水平,下调 cle-cas3 和 cle-cas9 蛋白表达,抑制神经元凋亡,从而保护 SEV 诱导的神经元损伤。

另外,本文通过在线预测软件 TargetScan 分析,发现 miR-130a-3p 与 ROCK2 存在靶向关系。ROCK 是 Rho/ROCK 信号通路的关键分子,在轴突生长分化、树突棘形成和维持以及记忆过程中有重要作用^[14]。本研究显示,SEV 作用后新生大鼠皮质神经元 ROCK2 mRNA 表达水平明显升高;且过表达 ROCK2 可抑制神经元存活,促进其凋亡,提示 ROCK2 表达上调与 SEV 诱导的神经毒性密切相关。这与文献报道相似^[15]。同时,本文结果发现 MLT 预处理 MLT,明显增加神经元 miR-130a-3p 表达水平,抑制 ROCK2 的表达。这提示 MLT 可能提高调控 miR-130a-3p/ROCK2 减轻 SEV 诱导的神经毒性。

综上所述,MLT 可明显改善 SEV 对新生大鼠皮质神经元的毒性作用,机制可能是通过上调 miR-130a 靶向抑制 ROCK2 的表达。

【参考文献】

- [1] Kotwani MB, Malde AD. Comparison of maintenance, emergence and recovery characteristics of sevoflurane and desflurane in pediatric ambulatory surgery [J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2017, 33(4): 503-508.
- [2] Lu X, Lv S, Mi Y, et al. Neuroprotective effect of miR-665 against sevoflurane anesthesia-induced cognitive dysfunction in rats through PI3K/Akt signaling pathway by targeting insulin-like growth factor 2 [J]. Am J Transl Res, 2017, 9

(3):1344-1356.

[3] Wang Y, Zuo M. Nicotinamide improves sevoflurane-induced cognitive impairment through suppression of inflammation and anti-apoptosis in rat [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 20079-20085.

[4] Tordjman S, Chokron S, Delorme R, *et al.* Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(3): 434-443.

[5] Sun Y, Liu J, Yuan X, *et al.* Effects of dexmedetomidine on emergence delirium in pediatric cardiac surgery [J]. *Minerva Pediatr*, 2017, 69(3):165-173.

[6] 张忠胜,刘双凤,黄四春. 胸腺素β4对大鼠皮质神经细胞氧糖剥夺-复氧损伤的保护作用研究[J]. *中国脑血管病杂志*, 2019, 16(6):296-302.

[7] Pan RY, Liu P, Zhou HT, *et al.* Circular RNAs promote TRPM3 expression by inhibiting hsa-miR-130a-3p in coronary artery disease patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(36): 60280-60290.

[8] Bobo-Jiménez V, Delgado-Esteban M, Angibaud J, *et al.* APC/CCdh1-Rock2 pathway controls dendritic integrity and memory [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(17): 4513-4518.

[9] Wang Z, Cui R, Wang K. Effects of sevoflurane pretreatment

on the apoptosis of rat H9c2 cardiomyocytes and the expression of GRP78 [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3):2818-2823.

[10] Hu B, Zhang H, Wang Z, *et al.* LncRNA CCAT1/miR-130a-3p axis increases cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell line by targeting SOX4 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(12): 974-983.

[11] Jiang Y, Wang W, Liu Z, *et al.* Overexpression of miR130a-3p/301a3p attenuates high glucose-induced MPC5 podocyte dysfunction through suppression of TNFα signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1):1021-1028.

[12] 李林成,刘铭传,曹梦远,等. 褪黑素调控微小RNA-9抑制脓毒症炎症反应的机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(5):823-826.

[13] Gu J, Lu Z, Ji C, *et al.* Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells [J]. *Biomed pharmacother*, 2017, 93: 969-975.

[14] 滕培兰,贾敏,李斌,等. 海马 RhoA-ROCK2 通路在老年小鼠术后认知功能障碍中的作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2018, 34(6):574-578.

[15] 周勤,邹磊,谢敏,等. 异丙酚诱发新生大鼠海马神经元凋亡及与 RhoA/ROCK2 信号通路的关系[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(8):47-49.

(2020-04-22 收稿, 2020-06-30 修回)

(上接第 353 页)

综上所述,术前 MRI 显示的瘤周水肿程度与高级别胶质瘤病人生存预后密切相关,重度水肿病人预后较差;但还需要大规模和前瞻性研究进行进一步分析,特别是需要确定这些独立生存预测因子的关键分子机制。

【参考文献】

[1] Schoenegger K, Oberndorfer S, Wuschitz B, *et al.* Peritumoral edema on MRI at initial diagnosis: an independent prognostic factor for glioblastoma [J]. *Eur J Neurol*, 2009, 16(7): 874-878.

[2] Hartmann M, Jansen O, Egelhof T, *et al.* Effect of brain edema on the recurrence pattern of malignant gliomas [J]. *Der Radiologe*, 1998, 38(11): 948-953.

[3] Seidel C, Dorner N, Osswald M, *et al.* Does age matter: a MRI study on peritumoral edema in newly diagnosed primary glioblastoma [J]? *BMC Cancer*, 2011, 11: 127.

[4] Yamahara T, Numa Y, Oishi T, *et al.* Morphological and flow cytometric analysis of cell infiltration in glioblastoma: a comparison of autopsy brain and neuroimaging [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2010, 27(2): 81-87.

[5] Burger PC, Dubois PJ, Schold Jr SC, *et al.* Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme [J]. *J Neurosurg*, 1983, 58(2): 159-169.

[6] Chen J, Li Y, Yu TS, *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy [J]. *Nature*, 2012, 488(7412): 522-526.

[7] Mangiola A, de Bonis P, Maira G, *et al.* Invasive tumor cells and prognosis in a selected population of patients with glioblastoma multiforme [J]. *Cancer*, 2008, 113(4): 841-846.

[8] Liu SY, Mei WZ, Lin ZX. Pre-operative peritumoral edema and survival rate in glioblastoma multiforme [J]. *Onkologie*, 2013, 36(11): 679-684.

(2020-09-23 收稿, 2021-03-17 修回)