

# 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

舒见威<sup>1,2</sup>, 黄春霞<sup>1,2</sup>, 张丽<sup>1,2</sup>, 胡宪文<sup>1,2</sup>

**摘要** **目的** 探讨七氟醚后处理对 HT22 细胞氧糖剥夺/复氧复糖后 DNA 损伤及沉默信息调节因子 1(SIRT1) 表达的影响。**方法** 随机将对数生长期的 HT22 细胞分为 7 组: 空白对照组(CON), 氧糖剥夺/复氧复糖 4 h 组(OGD/R 4 h), 氧糖剥夺/复氧复糖 4 h + 1% 七氟醚后处理组(OGD/R 4 h + 1% SEVO), 氧糖剥夺/复氧复糖 4 h + 2% 七氟醚后处理组(OGD/R 4 h + 2% SEVO), 氧糖剥夺/复氧复糖 6 h 组(OGD/R 6 h), 氧糖剥夺/复氧复糖 6 h + 1% 七氟醚后处理组(OGD/R 6 h + 1% SEVO), 氧糖剥夺/复氧复糖 6 h + 2% 七氟醚后处理组(OGD/R 6 h + 2% SEVO); 实验后序部分只取前四组研究。MTT 法检测细胞存活率, PI/Hoechst 荧光双染检测细胞坏死及凋亡, TUNEL 染色检测神经元凋亡, 免疫荧光染色测定 Cleaved-caspase3 表达, 免疫荧光染色检测 8-OHdG 以测定 DNA 损伤程度, Western blot 测定 SIRT1、Bcl-2 及 BAX 的蛋白表达。**结果** 前半部分实验结果中, 与 CON 组比较, OGD/R 4 h 及 OGD/R 6 h 组细胞存活率均降低(均  $P < 0.01$ ), 凋亡细胞及坏死细胞占比升高; 与对应 OGD/R 4 h 组比较, 1% 和 2% 七氟醚后处理的细胞存活率升高(均  $P < 0.01$ ), 凋亡及坏死细胞数量占比降低; 与对应 OGD/R 6 h 组比较, 1% 和 2% 七氟醚后处理的细胞存活率升高(均  $P < 0.01$ ), 凋亡及坏死细胞占比降低。实验后半部分, 与 CON 组比较, OGD/R 4 h 组中 TUNEL 染色阳性细胞数增多, Cleaved-caspase3 表达增加( $P < 0.01$ ), 8-OHdG 含量增多( $P < 0.01$ ), BAX 蛋白表达上调( $P < 0.01$ ), SIRT1、Bcl-2 蛋白表达下调(均  $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 4 h 组比较, 1% 和 2% 七氟醚后处理的细胞 TUNEL 染色阳性细胞数减少, Cleaved-caspase3 表达降低(均  $P < 0.01$ ), 8-OHdG 含量降低(均  $P < 0.01$ ), BAX 蛋白表达下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 SIRT1、Bcl-2 蛋白表达上调(均  $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 七氟醚后处理改善氧糖剥夺/复氧复糖诱导的 HT22 海马

神经元 DNA 氧化损伤及凋亡, 并上调 SIRT1 蛋白表达。

**关键词** 氧糖剥夺/复氧复糖; 七氟醚; DNA 损伤; 凋亡; SIRT1; HT22 细胞

**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(2021)02-0261-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.017

失血性休克是临床常见的危重症之一, 再灌注后因恢复供氧而产生的过量自由基, 对神经细胞的损害主要涉及 DNA 损伤, 如果机体不能有效修复 DNA 损伤, 则可导致细胞突变积累甚至凋亡<sup>[1]</sup>。SIRT1 是 NAD<sup>+</sup> 依赖的赖氨酸脱乙酰化酶, 可以通过调节细胞转录过程, 进而影响 DNA 的损伤修复、细胞凋亡等生物过程。新近研究发现 SIRT1 可通过影响 PARP1 活性参与核 DNA 损伤的修复, 使 PGC1 $\alpha$  脱乙酰基参与调控线粒体稳态<sup>[2-3]</sup>。七氟醚是挥发性全身吸入性麻醉药, 其预处理或者早期后处理对缺血性脑损伤有着直接的神经保护作用, 然而七氟醚发挥神经保护作用具体机制尚未研究清楚<sup>[4]</sup>。该课题组前期研究表明, 七氟醚后处理可以抑制线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的开放, 减少凋亡相关蛋白从线粒体释放到细胞胞质, 减轻神经元凋亡, 进而改善失血性休克复苏引起大鼠的空间学习与记忆能力损伤<sup>[5-6]</sup>。该研究拟利用 HT22 细胞系, 建立氧糖剥夺/复氧复糖(oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 模型模拟体内的失血性休克复苏过程, 以探究七氟醚后处理对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞 DNA 损伤及凋亡的影响。

2020-09-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81801050); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划项目(编号: 2019xkjT026)

作者单位: <sup>1</sup> 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室(安徽医科大学), 合肥 230601

<sup>2</sup> 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: 舒见威, 男, 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

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** HT22 细胞系购于武汉普诺塞(Procell)公司。

**1.1.2 试剂** 胎牛血清(货号 S711-002S), 购自 Lonsera 公司; DMEM 培养基购自 Hyclone 公司; 七氟醚(货号: 83291), 购自艾伯维公司; RIPA 裂解液(货号: P0013B), BCA 试剂盒(货号: P0012), 购自

Beyotime 公司;  $\beta$ -actin 单克隆抗体(货号: 66009IIg), 购自 Proteintech 公司; SIRT1 单克隆抗体(货号: 9475S), 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; ECL 显影液(货号: 34095), 购自美国 Thermo 公司。

**1.1.3 仪器** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Thermo 公司), 细胞缺氧小室(加拿大 Stem Cell 公司); 气体浓度监测仪(深圳迈瑞生物公司); 七氟醚挥发罐(德国 Drager 公司); 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HT22 细胞系培养** HT22 细胞 37 °C 水浴复苏后, 培育在含 10% 南美胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱中, 待 HT22 细胞培育 2 代后, 细胞融合度到 70% 时进行 OGD/R 模型的建立。

### 1.2.2 实验分组与 HT22 细胞 OGD/R 模型的建立

取对数生长期的 HT22 细胞, 采用随机数表法分为 7 组: 空白对照组(CON)、氧糖剥夺/复氧复糖 4 h 组(OGD/R 4 h)、氧糖剥夺/复氧复糖 4 h + 1% 七氟醚后处理组(OGD/R 4 h + 1% SEVO)、氧糖剥夺/复氧复糖 4 h + 2% 七氟醚后处理组(OGD/R 4 h + 2% SEVO)、氧糖剥夺/复氧复糖 6 h 组(OGD/R 6 h)、氧糖剥夺/复氧复糖 6 h + 1% 七氟醚后处理组(OGD/R 6 h + 1% SEVO)、氧糖剥夺/复氧复糖 6 h + 2% 七氟醚后处理组(OGD/R 6 h + 2% SEVO)。对于实验后续部分, 取第一部分的前面四组进一步研究。

弃 HT22 细胞的原培养液, PBS 洗涤后, 加入无糖无血清培养液, 放入充有 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的缺氧小室中, 然后置于培养箱中培养以建立氧糖剥夺模型。HT22 细胞氧糖剥夺处理 4 h 或 6 h 后, 用含血清的高糖培养液更换原无糖无血清培养液, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 继续培养 24 h, 即为 OGD/R 4 h, OGD/R 6 h 组; 七氟醚后处理即复氧开始即刻缺氧小室内充入 1% 或 2% 浓度的七氟醚, 放入培养箱继续培养 1 h, 然后正常培养条件再培养 23 h 后, 进行后续检测。

**1.2.3 细胞活力检测** 接种于 96 孔板中的 HT22 细胞, 经过 OGD/R 处理后, 加入 10  $\mu$ l MTT(5 g/L) 溶液后, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 4 h, 然后加入 150  $\mu$ l DMSO 室温振荡 10 min, 利用 Synergy HT 型多功能酶标仪, 测定各孔在 570 nm 和 630 nm

波长处的吸光值, 其差值用以反映细胞活力。

**1.2.4 Western blot 法检测 SIRT1、Bcl-2 和 BAX 的表达** 取各实验组处理结束后的 HT22 细胞, 加入 RIPA 裂解液充分反应 20 min, 13 200 r/min 离心 30 min 后, 取上清液, 测定各组蛋白浓度, 加上样缓冲液 100 °C 变性 10 min, -20 °C 保存。10% SDS-PAGE 电泳分离, 湿转 2 h, 室温 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h, TBST 洗涤后分别滴加 SIRT1、Bcl-2 和 BAX 一抗(1:1 000), 4 °C 孵育 12 h。TBST 洗涤后, 加入相应二抗(1:10 000), 室温慢摇 60 min, TBST 洗涤后, ECL 化学发光法检测蛋白表达量, 采用 Image J 软件分析目的条带/对应内参灰度值, 以反映目的蛋白的相对表达水平。

**1.2.5 免疫荧光检测** 将无菌细胞爬片多聚赖氨酸包被 6 h, 细胞均匀的种于爬片上, 然后根据分组进行相应处理。处理细胞爬片 4% 多聚甲醛固定 15 min, 然后 0.5% Triton X-100 室温处理 5 min, 再用 10% BSA 室温孵育 120 min; 弃去封闭液后, 分别滴加 8-OHdG 抗体(1:400) 或 Cleaved-caspase 3(1:400), 湿盒中 4 °C 孵育过夜。次日待爬片恢复到室温, 用 PBS 冲洗后, 在室温下与相应的免疫荧光二抗共同孵育 2 h, 然后 PBS 冲洗, 细胞在 DAPI(1:10 000) 溶液中避光孵育 20 min, 抗荧光淬灭封片液封片。采用 LSM800 激光共聚焦显微镜获取图像。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 统计软件对数据资料进行分析, 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, 两两比较采用 Bonferroni 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 七氟醚后处理对 HT22 细胞 OGD/R 损伤后细胞活力的影响** MTT 法检测不同实验组细胞存活率结果见图 1。与 CON 组比较, OGD/R 处理后, OGD/R 4 h 组及 OGD/R 6 h 组细胞存活率均降低(均  $P < 0.01$ ), 表明 OGD/R 4 h 和 OGD/R 6 h 均可引起 HT22 细胞的损伤。与对应时间 OGD/R 组比较, 经 1% 与 2% 七氟醚后处理的细胞存活率均升高(均  $P < 0.01$ ), 且在 OGD/R 4 h 后给与 1% 与 2% 七氟醚后处理的细胞活力差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 七氟醚后处理对 HT22 细胞 OGD/R 损伤后细胞凋亡及坏死影响** Hoechst-PI 法检测神经元细胞凋亡及坏死结果见图 2。与 CON 组比较, OGD/R

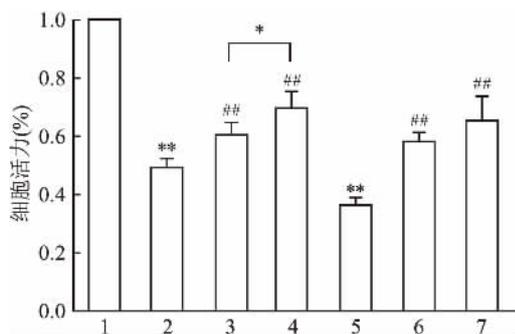


图1 七氟醚后处理对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞活力的影响

1: CON; 2: OGD/R 4 h; 3: 1% SEVO + OGD/R 4 h; 4: 2% SEVO + OGD/R 4 h; 5: OGD/R 6 h; 6: 1% SEVO + OGD/R 6 h; 7: 2% SEVO + OGD/R 6 h; 与 CON 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与对应时间 OGD/R 组比较: ##  $P < 0.01$

4 h 组及 OGD/R 6 h 组凋亡细胞及坏死细胞数量均增多,表明 OGD/R 4 h 和 OGD/R 6 h 均可诱导 HT22 细胞的凋亡坏死;与对应时间的 OGD/R 组比较,经 1% 与 2% 七氟醚后处理的 HT22 细胞凋亡及坏死细胞数量占比减少。

**2.3 七氟醚后处理对 HT22 细胞 OGD/R 损伤后细胞凋亡影响** TUNEL 结果见图 3。与 CON 组比较,OGD/R 4 h 组 TUNEL 阳性细胞数量和 Cleaved-caspase3 表达量增多,表明 OGD/R 可诱导 HT22 细胞的凋亡;与 OGD/R 组比较,经 1% 与 2% 七氟醚后处理的 TUNEL 阳性细胞数量和 Cleaved-caspase3 表达量均减少,表明 1% 与 2% 七氟醚后处理减轻了 OGD/R 诱导的细胞凋亡。

**2.4 七氟醚后处理对 HT22 细胞 OGD/R DNA 损伤影响** 通过免疫荧光检测 DNA 损伤指标 8-OHdG 的变化,结果见图 4。与 CON 组比较,OGD/R 4 h 组 8-OHdG 含量升高 ( $F = 212.4, P < 0.01$ ),表明 OGD/R 可引起 HT22 细胞的 DNA 损伤;在 OGD/R 4 h 后给与 1% 与 2% 浓度七氟醚后处理的 HT22 细胞 8-OHdG 含量均减少(均  $P < 0.01$ ),细胞 DNA 损伤程度均明显减轻,且不同浓度七氟醚之间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.5 七氟醚后处理对 HT22 细胞 OGD/R 后 SIRT1、Bcl-2 及 BAX 蛋白表达的影响** Western blot 检测结果见图 5。与 CON 组比较,OGD/R 4 h 组 SIRT1 和 Bcl-2 表达减少(均  $P < 0.01$ ),BAX 表达增加( $P < 0.01$ );与 OGD/R 4 h 组比较,经 1% 和 2% 七氟醚后处理的 HT22 细胞 SIRT1(均  $P < 0.01$ ) 和 Bcl-2 表达均增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),BAX 表达降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

失血性休克因有效循环血容量减少导致全身组织缺血缺氧,脑组织只能利用葡萄糖氧化供能而发生能量耗竭,成为最易因缺血/再灌注过程受损伤的器官<sup>[7]</sup>。临床上治疗失血性休克的首要方法是晶体液迅速恢复循环血容量,但血流恢复的同时产生的脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI),可导致神经元损伤,甚至凋亡、坏死<sup>[8]</sup>。因此,如何有效抑制神经元细胞的凋亡对于

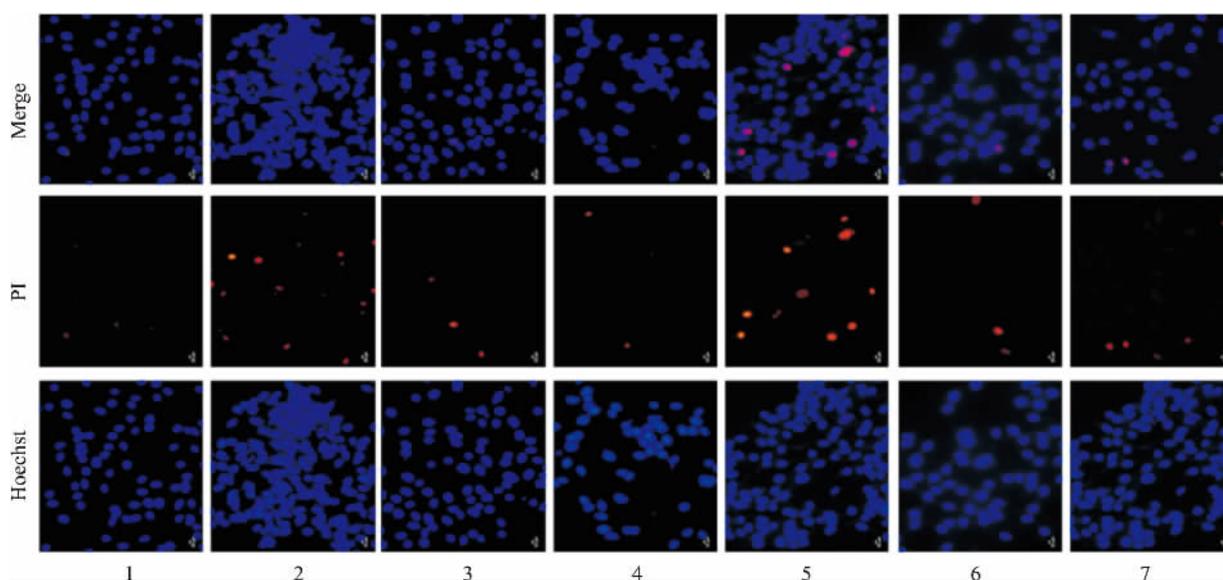


图2 Hoechst-PI 法检测七氟醚后处理对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞凋亡及坏死的影响 ×200

1: CON; 2: OGD/R 4 h; 3: 1% SEVO + OGD/R 4 h; 4: 2% SEVO + OGD/R 4 h; 5: OGD/R 6 h; 6: 1% SEVO + OGD/R 6 h; 7: 2% SEVO + OGD/R 6 h

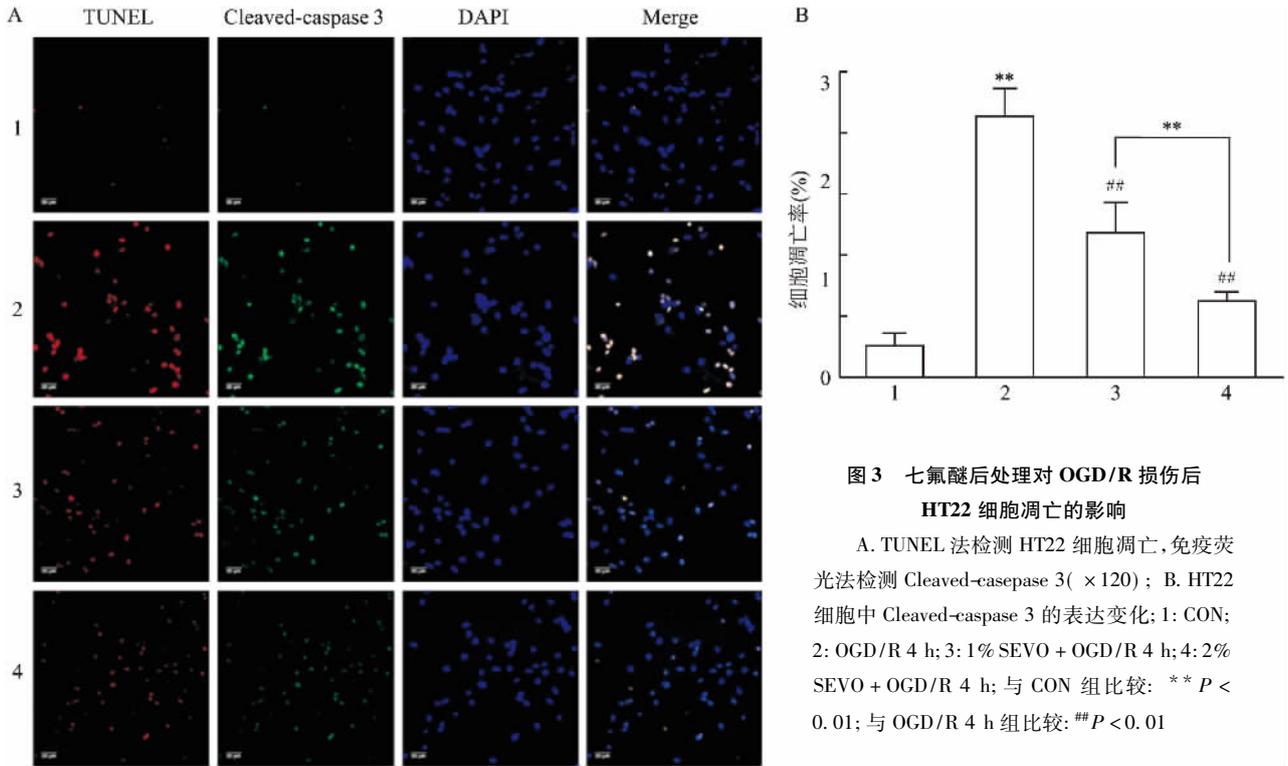


图3 七氟醚后处理对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞凋亡的影响

A. TUNEL 法检测 HT22 细胞凋亡, 免疫荧光法检测 Cleaved-caspase 3 (×120); B. HT22 细胞中 Cleaved-caspase 3 的表达变化; 1: CON; 2: OGD/R 4 h; 3: 1% SEVO + OGD/R 4 h; 4: 2% SEVO + OGD/R 4 h; 与 CON 组比较: \*\* P < 0.01; 与 OGD/R 4 h 组比较: ## P < 0.01

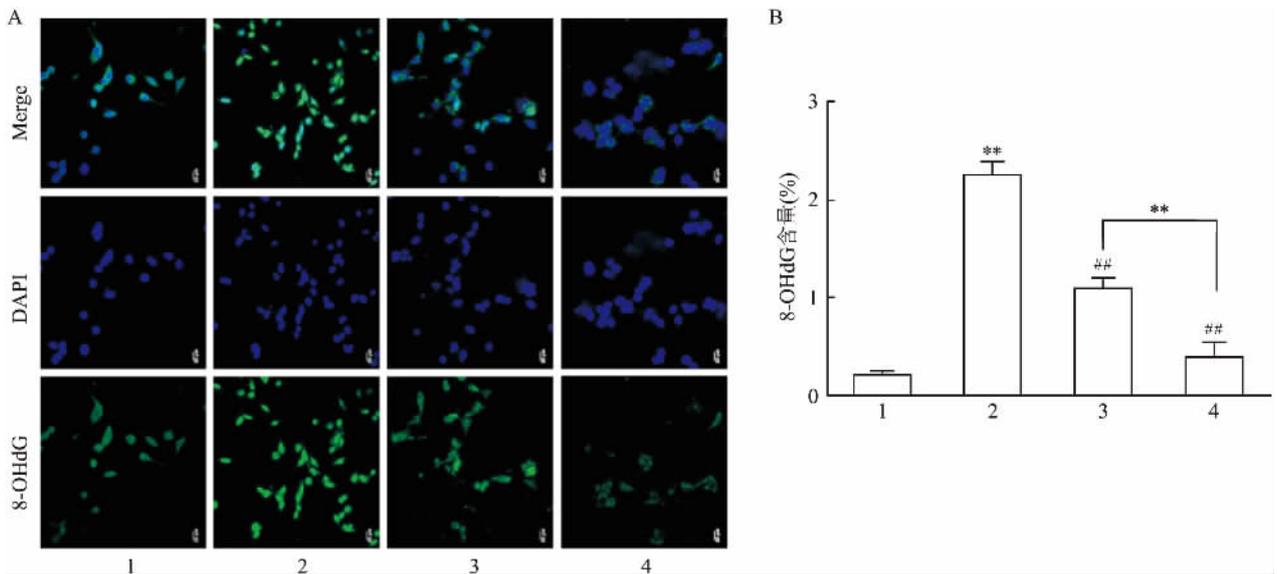


图4 七氟醚后处理对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 DNA 损伤的影响

A. 免疫荧光法检测 HT22 细胞 8-OHdG (×200); B. 定量分析 HT22 细胞中 8-OHdG 的表达变化; 1: CON; 2: OGD/R 4 h; 3: 1% SEVO + OGD/R 4 h; 4: 2% SEVO + OGD/R 4 h; 与 CON 组比较: \*\* P < 0.01; 与 OGD/R 4 h 组比较: ## P < 0.01

减轻 CIRI 具有重要临床意义。

近年来,许多研究证明七氟醚在 CIRI 中具有神经保护作用。Zhang et al<sup>[9]</sup> 利用大脑中动脉闭塞大鼠模型和 OGD/R 体外模型,发现七氟醚预处理通过抑制 miR-181a 促进 XIAP 表达,降低脑梗死面积,增加细胞活力,减少 LDH 释放,减轻神经元凋亡。在其他研究中发现七氟醚后处理可以减少 SH-

SY5Y 细胞 OGD/R 过程中的自噬体-溶酶体融合,并减少自噬体的形成,从而减弱了 OGD/R 诱导的自噬体累积<sup>[10]</sup>,减轻缺血/再灌注损伤。

本研究利用 HT22 细胞作为体外研究七氟醚后处理脑保护作用机制的实验对象,采用 OGD/R 模拟缺血/再灌注损伤模型。为了确定氧糖剥夺损伤的最佳时间,将 HT22 细胞经过 4 h 或 6 h 的氧糖剥

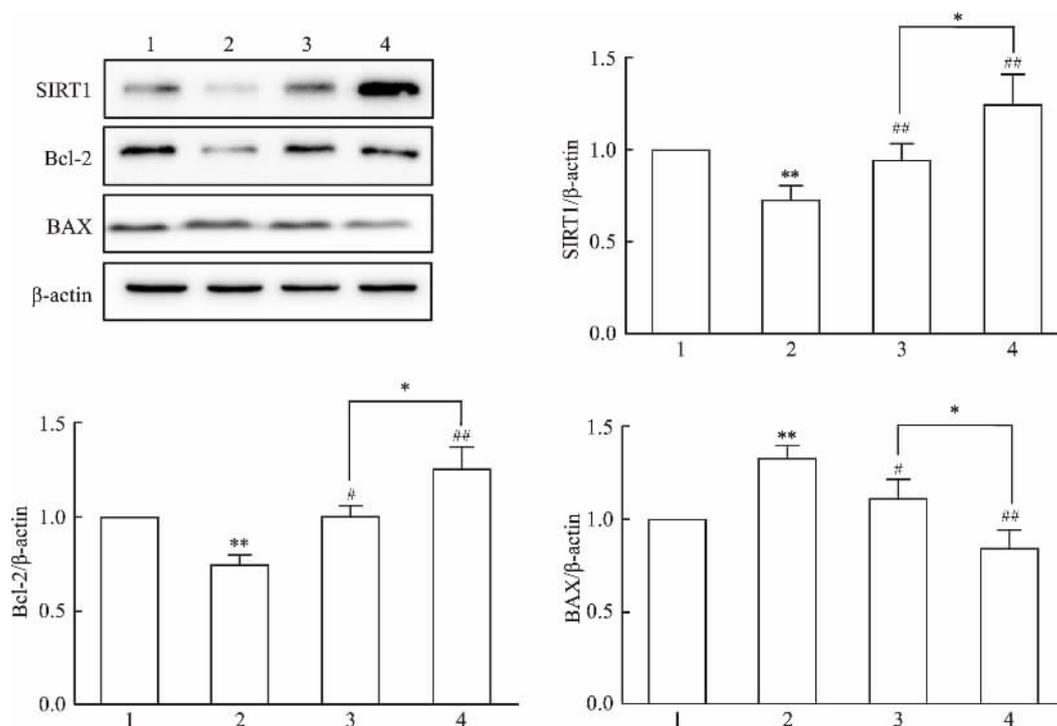


图5 七氟醚后处理对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 SIRT1、Bcl-2、BAX 表达的影响

1: CON; 2: OGD/R 4 h; 3: 1% SEVO + OGD/R 4 h; 4: 2% SEVO + OGD/R 4 h; 与 CON 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 OGD/R 4 h 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

夺处理,然后再灌注 24 h。OGD/R 处理后细胞活力降低,细胞形态发生改变(胞体回缩,突触断裂),说明 OGD/R 模型构建成功;经 1% 与 2% 七氟醚后处理的细胞活力均上升,凋亡细胞及坏死细胞数量均降低,且有一定的浓度依赖性,说明不同浓度七氟醚其保护作用存在差异。HT22 细胞经过 4 h OGD 处理后致半数细胞死亡,根据相关文献<sup>[11]</sup>及 MTT 和 PI/ Hoechst 结果,实验后续部分使用 4 h OGD。

8-OHdG 是活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 攻击 DNA 分子中的鸟嘌呤碱基第 8 位碳原子而产生的一种氧化性加合物,实验中常用作检测 DNA 氧化损伤的标志物。本研究中,OGD/R 4 h 组中 8-OHdG 含量升高,其原因可能是 OGD/R 引起细胞 DNA 发生氧化损伤,而经过 1% 与 2% 浓度七氟醚处理后,减少了细胞中的 8-OHdG 含量,减轻了 DNA 的氧化损伤,且与浓度有相关性。

为了进一步探讨七氟醚后处理减轻 HT22 细胞 OGD/R DNA 损伤及凋亡可能的分子机制,本研究在用 Western blot 法检测凋亡相关蛋白表达的同时检测了 HT22 细胞中 SIRT1 的蛋白表达水平。Sir-tuins 基因缺失小鼠表现出基因组的稳定性减低,表明 Sirtuins 蛋白家族成员在维持基因组稳定和 DNA

损伤修复方面起重要作用<sup>[12]</sup>。SIRT1 可通过修饰多种底物(包括非组蛋白和组蛋白)发挥效应,同时也可以修饰 DNA 修复蛋白 Ku70、PARP1 和 wRN,通过多个靶标调节 DNA 损伤反应<sup>[13-14]</sup>。在本研究中发现,与 CON 组比较,OGD/R 处理后,SIRT1 和 Bcl-2 表达降低,促凋亡蛋白 BAX 表达升高,而经过 1% 和 2% 浓度七氟醚后处理后,SIRT1 蛋白表达相比 OGD/R 组均升高,说明 OGD/R 可导致 SIRT1 的表达降低,凋亡级联反应增加,而七氟醚后处理可能通过上调 SIRT1 的蛋白表达,发挥 DNA 损伤修复作用,抑制促凋亡效应的发生,阻止细胞向凋亡方向发展,减轻 OGD/R 导致的细胞损伤,且这种保护效应有一定的浓度依赖性。

综上所述,七氟醚后处理可能通过上调 SIRT1 蛋白的表达,减轻 HT22 细胞 OGD/R 的 DNA 氧化损伤及凋亡。此外,本研究只观察了 SIRT1 的变化,探讨了初步的分子机制,具体的作用机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Gray K, Bennett M. Role of DNA damage in atherosclerosis—by-stander or participant [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(7): 693-700.

- [2] Garva R, Thepmalee C, Yasamut U, et al. Sirtuin family members selectively regulate autophagy in osteosarcoma and mesothelioma cells in response to cellular stress [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 949.
- [3] Tammaro M, Liao S, Mc Cane J, et al. The N-terminus of RPA large subunit and its spatial position are important for the 5'→3' resection of DNA double-strand breaks [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(18): 8790–800.
- [4] Zhang L M, Zhao X C, Sun W B, et al. Sevoflurane post-conditioning protects primary rat cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/resuscitation *via* down-regulation in mitochondrial apoptosis axis of Bid, Bim, Puma-Bax and Bak mediated by Erk1/2 [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 357(1/2): 80–7.
- [5] Hu X, Zhang M, Duan X, et al. Sevoflurane postconditioning improves the spatial learning and memory impairments induced by hemorrhagic shock and resuscitation through suppressing IRE1 $\alpha$ -caspase-12-mediated endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 685: 160–6.
- [6] 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.
- [7] Rushing G D, Britt L D. Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review [J]. *Ann Surg*, 2008, 247(6): 929–37.
- [8] Wang J, Wang A, He H, et al. Trametenolic acid B protects against cerebral ischemia and reperfusion injury through modulation of microRNA-10a and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108692.
- [9] Zhang Y, Shan Z, Zhao Y, et al. Sevoflurane prevents miR-181a-induced cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 308: 332–8.
- [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] Xie Z, Cao B Q, Wang T, et al. LanCLI attenuates ischemia-induced oxidative stress by Sirt3-mediated preservation of mitochondrial function [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 142: 216–23.
- [12] Wang C, Chen L, Hou X, et al. Interactions between E2F1 and Sirt1 regulate apoptotic response to DNA damage [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(9): 1025–31.
- [13] Zhang J F, Zhang Y L, Wu Y C. The Role of Sirt1 in ischemic stroke: pathogenesis and therapeutic strategies [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 833.
- [14] Takemura A, Iijima K, Ota H, et al. Sirtuin 1 retards hyperphosphatemia-induced calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(9): 2054–62.

## Effects of sevoflurane postconditioning on DNA damage and SIRT1 expression of HT22 under oxygen and glucose deprivation/reoxygenation

Shu Jianwei<sup>1,2</sup>, Huang Chunxia<sup>1,2</sup>, Zhang Li<sup>1,2</sup>, et al

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

**Abstract Objective** To investigate the effect of sevoflurane postconditioning on DNA damage and the expression of silent information regulation (SIRT1) of HT22 cell line following oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury. **Methods** Firstly, HT22 cells in logarithmic phase were randomly divided into normal control group (CON), oxygen and glucose deprivation/reoxygenation 4 h group (OGD/R 4 h), oxygen and glucose deprivation/reoxygenation 4 h + 1% sevoflurane postconditioning group (OGD/R 4 h + 1% SEVO), oxygen and glucose deprivation/reoxygenation 4 h + 2% sevoflurane postconditioning group (OGD/R 4 h + 2% SEVO), oxygen and glucose deprivation/reoxygenation 6 h group (OGD/R 6 h), oxygen and glucose deprivation/reoxygenation 6 h + 1% sevoflurane postconditioning group (OGD/R 6 h + 1% SEVO), oxygen and glucose deprivation/reoxygenation 6 h + 2% sevoflurane postconditioning group (OGD/R 6 h + 2% SEVO). Secondly, the former four groups in the first part of this study were further investigated the mechanism of sevoflurane postconditioning in oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury. MTT assay was used to detect cell survival rate, PI/Hoechst fluorescence staining and TUNEL assay were used to detect apoptotic and necrosis rate, immunofluorescence staining was used to detect the expression of 8-OHdG and Cleaved-caspase 3, Western blot analysis was used to detect the expression of SIRT1 and apoptotic protein expression. **Results** In the first part of the experiment, compared with CON group, the cell survival rates in both OGD/R 4 h and OGD/R 6 h groups reduced ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), and the number of apoptosis and necrotic cells also increased. Compared with the related OGD/R 4 h group, the cell survival rate in the

网络出版时间: 2020-12-25 13:52 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201224.1107.018.html>

## 芍药苷-6'-O-苯磺酸酯对高胰岛素诱导足细胞功能损伤的影响

黄琼芳, 赵天娇, 苏扬妮, 黄琼, 魏伟

**摘要** 目的 探讨芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(CP-25)对高胰岛素诱导足细胞损伤的保护作用及机制。方法 体外培养小鼠足细胞,分为空白对照组、高胰岛素组、高胰岛素+CP-25(0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ )组、高胰岛素+二甲双胍组,分别处理足细胞。CCK-8法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞增殖的影响; GOD-POD法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞葡萄糖消耗的影响; Transwell法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞迁移的影响; Annexin V-FITC/PI双染法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞凋亡的影响; Western blot法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞Nephrin蛋白表达的影响。结果 CCK-8结果显示: CP-25能够增加高胰岛素诱导的足细胞的增殖能力; GOD-POD结果显示: CP-25能够改善高胰岛素诱导的足细胞对葡萄糖的摄取能力; Transwell实验结果显示: CP-25能够减少高胰岛素诱导的足细胞的迁移; Annexin V-FITC/PI双染结果显示: CP-25能够抑制高胰岛素诱导

足细胞的凋亡; Western blot结果显示: CP-25能够上调高胰岛素诱导的足细胞Nephrin蛋白表达。结论 CP-25能够改善高胰岛素诱导的足细胞的损伤,其机制可能与提高足细胞Nephrin蛋白的表达有关。

**关键词** 足细胞; CP-25; 胰岛素; Nephrin

**中图分类号** R 587

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0267-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.018

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的常见并发症,其发病机制十分复杂<sup>[1]</sup>。高胰岛素血症(hyperinsulinism, HINS)是DN的主要临床表现,能够促进DN的发生和发展,加重肾损伤<sup>[2]</sup>。足细胞是肾小球高度分化的固有细胞,是维持肾小球滤过屏障功能正常的主要细胞。DN长时期的高胰岛素环境能够诱导足细胞损伤和凋亡,促进肾小球滤过屏障的破坏和组织学变化,包括肾小球系膜扩张、肾小球间质纤维化和肾小球硬化等<sup>[3]</sup>。

白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)主要成分为芍药苷(paeoniflorin, Pae)。据报道, TGP能够延缓DN的恶化<sup>[4]</sup>。芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(phenylsulfonypaeoniflorin, CP-25)是TGP的结构修饰产物,其抗炎免疫调节能力和生物利用度更优于Pae<sup>[5]</sup>。但CP-25对DN的研究尚无报道。该研究

2020-08-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81974508, 81673492)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 黄琼芳, 女, 硕士研究生;

黄琼, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: qionghuang@126.com;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

1% SEVO and 2% SEVO groups both increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), and the number of apoptotic cells and necrotic cells also decreased. Moreover, compared with the related OGD/R 6 h group, the cell survival rate in the 1% SEVO and 2% SEVO groups increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), and the number of apoptotic cells and necrotic cells decreased. The second part of the experiment, compared with CON group, there were more TUNEL positive labeled cells, and increased expressions of Cleaved-caspase3 ( $P < 0.01$ ) and 8-OHdG ( $P < 0.01$ ), as well as BAX ( $P < 0.01$ ) in the OGD/R 4 h group, however, SIRT1 and Bcl-2 expression reduced ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the OGD/R 4 h group, there were less TUNEL positive labeled cells, and decreased expressions of Cleaved-caspase3 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ) and 8-OHdG ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), as well as BAX ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in the 1% SEVO and 2% SEVO groups, SIRT1 and Bcl-2 expression increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Sevoflurane postconditioning can alleviate DNA oxidative damage and apoptosis of HT22 hippocampal neurons induced by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, and up-regulate SIRT1 protein expression.

**Key words** oxygen and glucose deprivation/reoxygenation; sevoflurane; DNA damage; apoptosis; SIRT1; HT22