



李振东,赵兴凯,郭以哲,等. 异氟烷通过 CaMK II/ERK/NF- κ B 通路减轻小胶质细胞炎症反应的机制[J]. 南京农业大学学报,2024,47(2):315-322.

LI Zhendong,ZHAO Xingkai,GUO Yizhe,et al. Mechanism of isoflurane alleviating microglia cell inflammatory response through the CaMK II/ERK/NF- κ B pathway[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(2):315-322.

异氟烷通过 CaMK II/ERK/NF- κ B 通路 减轻小胶质细胞炎症反应的机制

李振东,赵兴凯,郭以哲,周振雷*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要: [目的] 本文旨在探究异氟烷减轻小胶质细胞过度激活引起炎症的具体机制。[方法] 体外使用脂多糖(LPS)处理小胶质细胞诱导炎症反应,将制备的乳化异氟烷作用于细胞。通过荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹等方法检测异氟烷与通路蛋白阻断剂对促炎介质(促炎因子、促炎酶)及通路蛋白表达的影响,确定不同阻断剂对蛋白表达的影响及异氟烷作用的信号通路,同时观察不同处理对小胶质细胞核因子 κ B(NF- κ B) 转位的影响。[结果] 与对照组相比,LPS 显著增加白介素 1 β (IL-1 β)、IL-6 等促炎因子及促炎酶一氧化氮合成酶(iNOS)、环加氧酶 2(COX II)的表达,并上调目标通路蛋白的表达和 NF- κ B 由胞质向胞核的转位。异氟烷通过 CaMK II/ERK/NF- κ B 信号通路降低促炎介质表达,抑制 NF- κ B 核转位。[结论] 异氟烷通过 Ca²⁺ 信号通路,减少促炎因子的释放,减轻小胶质细胞炎症反应。

关键词: 异氟烷;小胶质细胞;神经炎症;炎性因子;核转位

中图分类号:S859.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)02-0315-08

Mechanism of isoflurane alleviating microglia cell inflammatory response through the CaMK II/ERK/NF- κ B pathway

LI Zhendong,ZHAO Xingkai,GUO Yizhe,ZHOU Zhenlei*

(College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract: [Objectives] The paper aimed to investigate the specific mechanism through which isoflurane attenuated inflammation induced by microglia hyperactivation. [Methods] The microglia cells were treated by lipopolysaccharide(LPS) inducing inflammatory response *in vitro*, and the prepared emulsified isoflurane was used to treat to the cells. The effects of isoflurane and pathway protein inhibitors on the expression of pro-inflammatory mediators (pro-inflammatory factors, pro-inflammatory enzymes) and pathway proteins were detected by fluorescence quantitative PCR and Western blot, and then the effects of different inhibitors on protein expression and the signaling pathway of isoflurane action were determined. At the same time, the effects of different treatments on the translocation of nuclear factor κ B (NF- κ B) in microglia cells were observed. [Results] Compared with the control group, LPS significantly increased the expressions of interleukin (IL)-1 β , IL-6, nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX II) and other pro-inflammatory factors, and up-regulated the expressions of target pathway protein and the translocation of NF- κ B from cytoplasm to nucleus. Isoflurane reduced the expression of pro-inflammatory media and inhibited NF- κ B nuclear translocation through CaMK II/ERK/NF- κ B signaling pathway. [Conclusions] Isoflurane reduced the release of proinflammatory factors and alleviated the inflammatory response of microglia cells through Ca²⁺ signaling pathway.

Keywords: isoflurane; microglia cell; neuroinflammation; pro-inflammatory factors; nuclear translocation

作为大脑中枢的免疫细胞,小胶质细胞功能对于维持神经系统的稳态至关重要^[1-2]。研究表明,多种疾病的发生和发展与神经炎症有关,如多发性硬化症、创伤性损伤、缺血、中风,以及神经退行性疾病(阿尔茨海默病、帕金森病等)等^[3-5]。通常情况下,小胶质细胞处于静息状态,在与炎症反应相关的损伤和有害刺激作用下激活,合成促炎细胞因子,包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、白细胞介素 6(interleukin, IL-6)和白细胞介素 1 β (IL-1 β)等,可加剧神经炎症和损伤^[5-6]。

N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)的激活在神经系统疾病发生中

收稿日期:2023-03-04

基金项目:江苏省研究生科研实践创新计划项目(SJCX22_0214)

*通信作者:周振雷,教授,主要从事兽医外科学及畜禽骨骼生物学研究,E-mail:zhouzl@njau.edu.cn。

有重要调节作用^[7-8]。过度激活 NMDAR 可导致神经元钙超载并触发一系列下游促死亡信号通路,促进细胞坏死或凋亡^[9]。此外,NMDAR 的激活触发后续 Ca^{2+} /钙调素依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 信号通路,并诱导丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号级联反应,如细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的活化^[10]。核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 作为细胞炎症反应的重要介导因子,其激活可导致神经元细胞死亡^[11-12]。因此,抑制 NF- κB 和 MAPK 信号通路可能是抑制小胶质细胞过度激活引发炎症的有效途径之一。

异氟烷是一种临床常用的吸入麻醉剂^[13],具有神经保护作用^[14]。尤其是在脑缺血-再灌注损伤时,异氟烷能有效减小脑缺血损伤后的梗死面积。异氟烷可以有效减少大脑中的促炎物质生成^[15],减轻神经炎症。本课题组先前的体内外研究表明,异氟烷下调大鼠神经元 NMDAR 的表达^[16-17],但异氟烷是否通过该通路影响炎症反应还未见深入研究。本研究以 30% 脂肪乳剂为溶剂制备乳化异氟烷 (emulsified isoflurane, EI),使异氟烷可以直接作用于细胞,旨在探究异氟烷对脂多糖 (LPS) 诱导的小胶质细胞过度激活的影响并探讨其抗炎作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

LPS (*Escherichia coli* 055:B5) 购自 Sigma-Aldrich。NMDAR 抑制剂 MK801、ERK1/2 抑制剂 U0126、CaMKII 抑制剂 KN93 和 NMDAR 激动剂 *D*-丝氨酸均购自 MCE (上海)。磷酸化的 I κ B α 和 I κ B α 抗体,钙离子试剂盒购自 Beyotime。GAPDH 抗体购自 Proteintech (武汉)。iNOS、COX II、p-CaMKII、CaMKII、p-ERK1/2、ERK1/2、p-NF- κB 、NF- κB 抗体均购自 Affinity 公司 (南京)。Hiscript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 与 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 购自诺唯赞 (南京)。IL-1 β 、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒购自 AngleGene (南京)。小鼠小胶质细胞 (BV2) 细胞购自 Gain Biological (上海)。所用仪器:CFX96 实时荧光定量 PCR 仪、凝胶 Doc 2000 仪 (Bio-Rad)、激光共聚焦扫描显微镜 (PerkinElmer)。

1.2 乳化异氟烷 (EI) 的制备

将异氟烷溶液与 30% 脂肪乳剂按 1.2:21.3 (体积比) 在 20 °C 混匀,制备 8% 乳化异氟烷溶液。步骤:以 5 min 为间隔涡旋 1 min,持续 4 h;制成的不同浓度乳化异氟烷于 4 °C 保存,使用前水浴加热至 37 °C。根据临床实践,本研究使用低浓度 (LD) 乳化异氟烷 (0.21 mmol·L⁻¹) 与高浓度 (HD) 乳化异氟烷 (0.42 mmol·L⁻¹) 对应临床使用异氟烷最低肺泡有效浓度 (minimum alveolar concentration, MAC) 值 (LD:1MAC; HD:2MAC)^[18],并选择相应体积比的脂肪乳剂 (fat emulsion, FE) 处理作为对照。

1.3 细胞培养与处理

在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下,在 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基 (DMEM) 中培养 BV2 细胞,培养基中添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素。使用高、低浓度 (0.42、0.21 mmol·L⁻¹) 的 EI 处理 BV2 细胞,确定异氟烷处理的适宜浓度与时间。后续试验分为 2 部分:1) 空白对照组:BV2 细胞连续培养 24 h,不进行任何处理;LPS 处理组:使用 LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 BV2 细胞 24 h;EI 处理组与脂肪乳处理组:分别使用 EI (0.42 mmol·L⁻¹)、脂肪乳 (0.39 mmol·L⁻¹) 与 LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共处理 BV2 细胞 6 h,更换为只含 LPS 的培养液并处理至 24 h,共 3 组。2) 空白对照组:BV2 细胞连续培养 24 h,不进行任何处理;LPS 处理组:使用 LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 BV2 细胞 24 h;EI 处理组:使用 EI (0.42 mmol·L⁻¹) 与 LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共处理 BV2 细胞 6 h,更换为只含 LPS 培养基并处理至 24 h;信号通路阻断剂处理组:分别使用阻断剂 MK801 (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、U0126 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、KN93 (10 mmol·L⁻¹) 与 LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共处理 BV2 细胞 2 h,更换为只含 LPS 的培养液并处理至 24 h,共 4 组。

1.4 细胞活力测定

CCK-8 法测定各处理对细胞活力的影响。以每孔 5 000 个细胞的密度在 96 孔板中接种 BV2 细胞。到达处理时间后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL 并在细胞培养箱中孵育约 1 h。使用微板阅读器测量细胞培养板各孔 450 nm 处的吸光值 (A_{450}),根据试剂说明书计算相应的细胞活力。

1.5 RNA 提取和实时定量 PCR 检测炎症因子基因表达

使用 TRIzol 提取 BV2 细胞总 RNA。使用 Hiscript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 对

mRNA 进行逆转录。本研究采用 CFX96 实时 PCR 系统和 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix;按照 95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 执行 40 个循环的反应条件,以 β -actin 作为内参基因,进行实时荧光定量 PCR,检测促炎相关基因表达情况。引物由生工生物工程有限公司(上海)合成。引物序列如表 1 所示。

表 1 本试验所用引物对序列信息

Table 1 Primer pairs sequences information in the study

目的基因 Target genes	上游引物 Forward primer sequences(5'→3')	下游引物 Reverse primer sequences(5'→3')	产物大小/bp Product size
<i>IL-1β</i>	TACAGGCTCCGAGATGAACAAC	GCCACAGGTATTTTTCGTT	155
<i>IL-6</i>	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGCTCTTGGTCCCTTAGCC	79
<i>IL-10</i>	CTCCCTGTGAAAATAAGAGC	ATGGCCTTGTAGACACCTT	86
<i>iNOS</i>	ACCTTGTTTCAGCTACGCCTT	CATFCCCAAATGTGCTTGTGTC	112
<i>COX-2</i>	GAAATGGCTGCAGAATTGAA	AAGGAGAATGGTGTCCCAAG	137
<i>TNF-α</i>	AGCACAGAAAGCATGATCCG	ATCACCCCGAAGTTCAAGTAGACA	164
<i>CaMKII</i>	TGCACACCACCATCCTGAACC	GATCTGCCATTTGCCGTCCTT	164
<i>ERK</i>	TGACATCATCCGGGCACCA	AGCTTGTAAGGTCCTCTCC	84
<i>β-actin</i>	CTGACCTGAAGTACCCCAT	CATCTTTTCACGGTTGGCCTT	165

注:*IL-1β*:白介素 1β 基因 Interleukin-1β gene;*IL-6*:白介素 6 基因 Interleukin-6 gene;*IL-10*:白介素 10 基因 Interleukin-10 gene;*iNOS*:一氧化氮合成酶基因 Nitric oxide synthase gene;*COX-2*:环加氧酶 2 基因 Cyclooxygenase-2 gene;*TNF-α*:肿瘤坏死因子 α 基因 Tumor necrosis factor-α gene;*CaMKII*:钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II 基因 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II gene;*ERK*:细胞外信号调节激酶基因 Extracellular signal-regulated kinase gene;*β-actin*:β-内参基因 β-actin gene.

1.6 Western blot 分析

BV2 细胞经药物处理后,用冰冷的 PBS 冲洗细胞 2 次。加入裂解液(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA),添加 1%蛋白酶抑制剂(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和 1%磷酸化蛋白酶抑制剂。根据产品说明书,制备核和细胞质提取物。使用 BCA(bicinchoninic acid)蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后将蛋白转移到硝化纤维膜上,用脱脂牛奶封闭,在一抗中 4 °C 孵育过夜,然后与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联二抗反应。通过与胞质蛋白内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)或胞核蛋白内参增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)比较来定量蛋白质。使用 Bio-Rad Gel Doc 2000 系统定量条带的灰度。

1.7 细胞因子和钙离子浓度测定

根据说明书使用 ELISA 试剂盒测定各分组中 BV2 细胞培养上清液中的 IL-1β、IL-6 和 IL-10 浓度。使用钙检测试剂盒测定各分组别中 BV2 细胞的 Ca^{2+} 浓度。

1.8 免疫细胞化学染色

将 BV2 细胞以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种爬片,待细胞长满 60%~70%,使用 LPS、LPS+HD 及 PBS 分别处理,去除培养基, PBS 清洗 3 次,于 4%多聚甲醛浸泡 30 min, 1% Triton-X 通透 20 min。用 PBS 清洗 3 次,使用 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 封片,加入 NF-κB 抗体, 4 °C 过夜。加荧光偶联二抗并孵育,室温下碘化丙啶(propidium iodide, PI)暗染 50 min。将爬片放置在激光共聚焦扫描显微镜下观察荧光信号。

1.9 数据处理与统计分析

所有数据均以平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。试验数据使用 SPSS 25.0 软件进行处理,单因素方差分析(one-way ANOVA)进行比较,差异显著采用 Bonferroni 多重比较法进行判定。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 异氟烷对 BV2 细胞活力的影响

为探究 EI 处理 BV2 细胞最合适的条件,首先在不同时间点检测高/低(HD/LD)浓度 EI 对细胞活力的影响。结果如图 1 所示:在 6 h 时, LD 与 HD EI 均未显示出明显的细胞毒性($P > 0.05$)。随处理时间延长, LD 与 HD EI 均具有显著的细胞毒性($P < 0.05$)。基于此结果并结合异氟烷临床使用方法,本试验选择 6 h 和无细胞毒性 HD 进行后续研究。

2.2 异氟烷对促炎介质 mRNA 和蛋白表达的影响

促炎因子与促炎酶反映炎症程度。异氟烷处理后 BV2 细胞促炎因子的 mRNA 和蛋白表达结果如

图 2 和 3 所示:与对照组相比,LPS 处理显著增加促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和促炎酶一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, iNOS)、环加氧酶 2(cyclooxygenase-2, COX II) mRNA 的表达及促炎酶蛋白的表达水平($P < 0.05$)。HD 组促炎介质表达水平显著低于 LPS 组($P < 0.05$),脂肪乳与 LPS 处理组间 IL-1 β 、IL-6 表达水平差异显著($P < 0.05$),其他促炎介质差异不显著($P > 0.05$)。BV2 细胞中促炎因子检测结果显示,LPS 与 HD 处理组间 IL-1 β 、IL-6、IL-10 的表达水平差异显著($P < 0.05$),LPS 与脂肪乳(FE)处理组间差异不显著($P > 0.05$)。此外,HD 处理还增加抗炎因子 IL-10 表达水平($P < 0.05$),发挥抗炎作用。

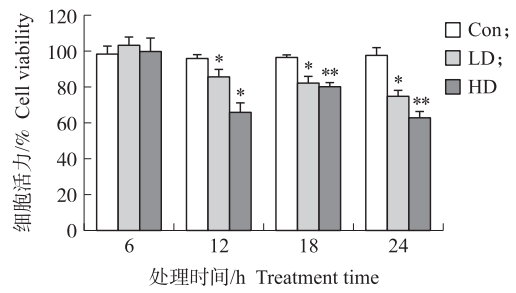


图 1 不同浓度乳化异氟烷处理时间对 BV2 细胞活力影响
Fig. 1 Effect of treatment time with different concentrations of emulsified isoflurane on BV2 cell viability

Con:对照 Control; LD:低浓度(0.21 mmol·L⁻¹)乳化异氟烷 Low-dose emulsified isoflurane; HD:高浓度(0.42 mmol·L⁻¹)乳化异氟烷 High-dose emulsified isoflurane. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 下同 The same below.

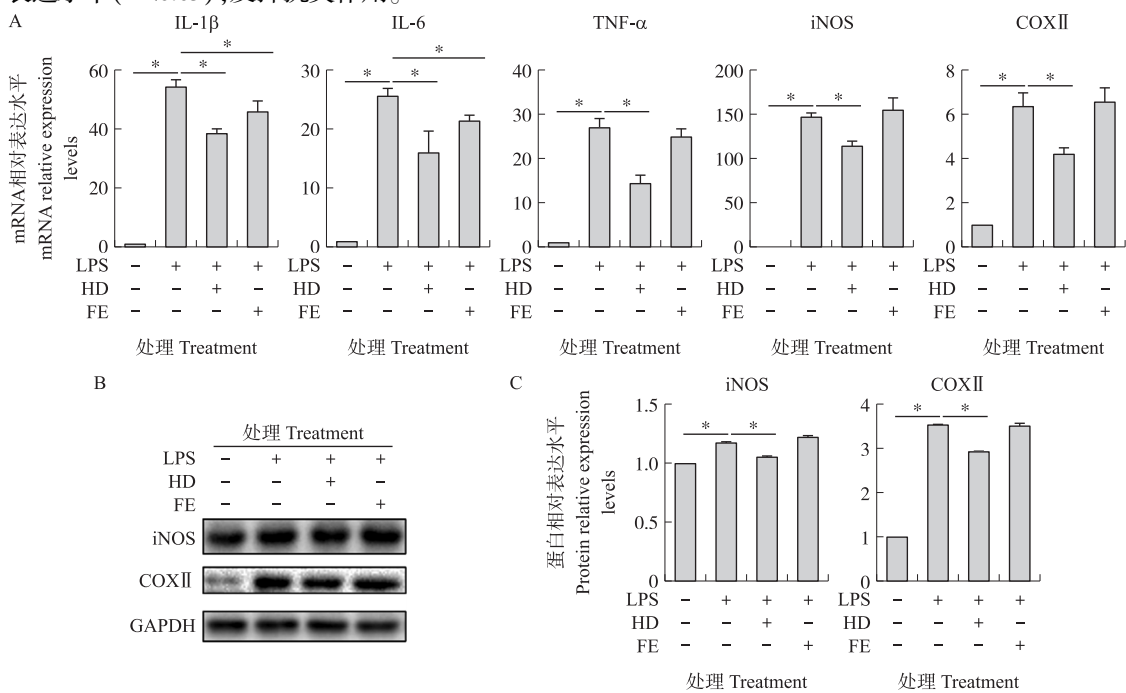


图 2 异氟烷处理 BV2 细胞中促炎因子与促炎酶 mRNA 及蛋白表达变化

Fig. 2 Changes of mRNA and protein expression of proinflammatory factor and proinflammatory enzyme in isoflurane treated BV2 cells

A. 促炎因子 mRNA 表达的 qPCR 检测 Detection of proinflammatory factor mRNA expression by qPCR; B. 促炎酶蛋白表达的 Western blot 检测 Western blot analysis of proinflammatory enzyme protein expression; C. 蛋白表达检测 Detection of protein expression. FE:脂肪乳(0.39 mol·L⁻¹)处理 Fat emulsion (0.39 mol·L⁻¹) treatment; iNOS:一氧化氮合成酶 Nitric oxide synthase; COX II:环加氧酶 2 Cyclooxygenase-2. +/-表示添加/未添加处理。+/- indicates added/not added processing. 下同 The same below.

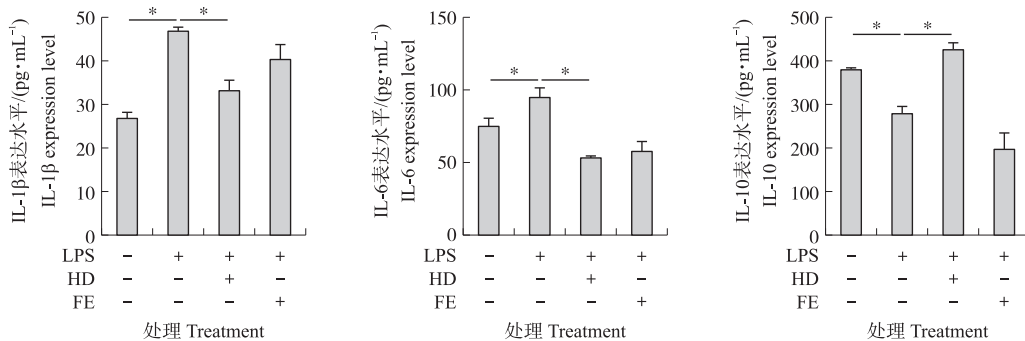


图 3 异氟烷处理 BV2 细胞中促炎因子水平变化

Fig. 3 Changes of proinflammatory factors in isoflurane treated BV2 cells

2.3 异氟烷及通路蛋白阻断剂对信号通路蛋白表达的影响

如图 4 所示:CaMKII 阻断剂 KN93 抑制CaMKII 和 ERK1/2 的磷酸化。ERK1/2 阻断剂 U0126 仅抑制 ERK1/2 的磷酸化,对 CaMKII 无显著影响。LPS 处理显著增加细胞 Ca^{2+} 水平,HD 和 NMDAR 阻断剂 MK801 处理显著降低 Ca^{2+} 水平,且 MK801 显著抑制CaMKII 和 ERK1/2 磷酸化($P<0.05$)。CaMKII 阻断剂 KN93 和 ERK1/2 阻断剂 U0126 对 LPS 诱导的 Ca^{2+} 升高无显著影响($P>0.05$)。同时,NMDAR 激动剂 *D*-丝氨酸逆转了 HD 处理降低 Ca^{2+} 、CaMKII 和 ERK1/2 的作用。

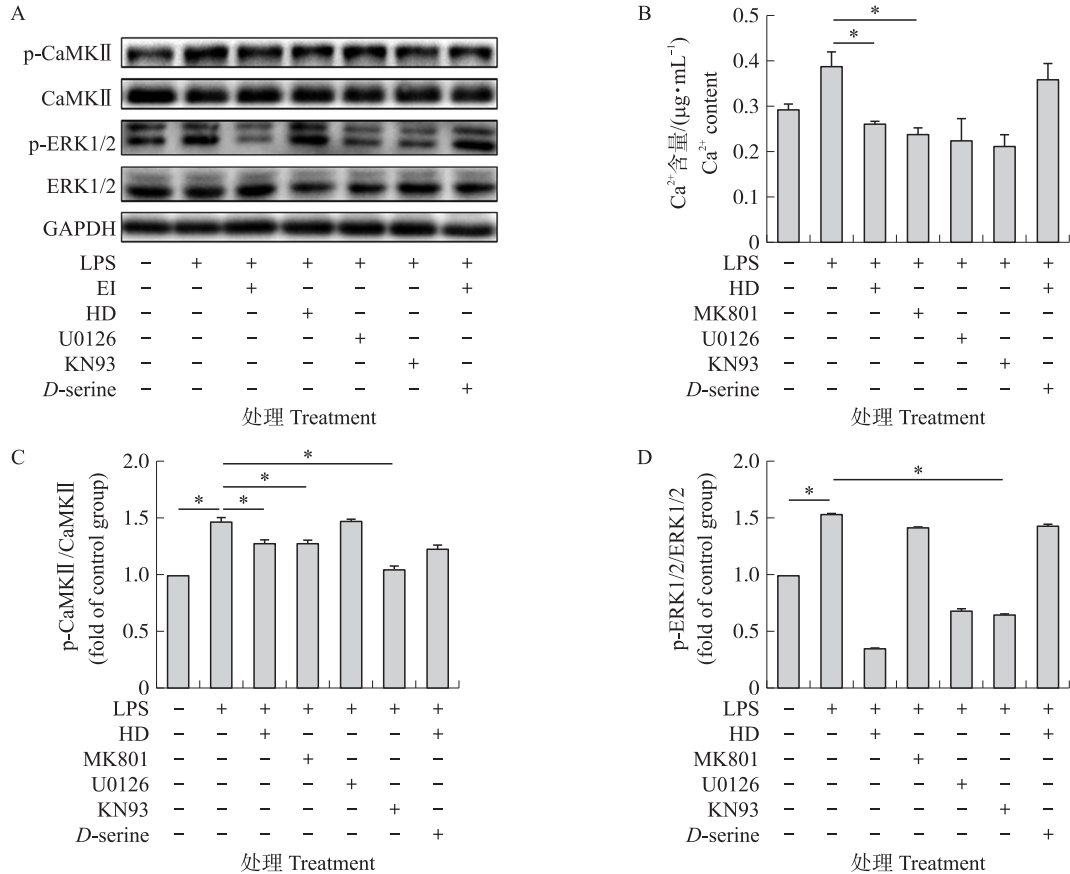


图 4 异氟烷与通路蛋白阻断剂处理后通路酶蛋白表达情况及钙离子水平比较

Fig. 4 Comparison of pathway enzyme protein expression and calcium ion level after isoflurane and pathway protein inhibitors treatment

A. CaMKII 和 ERK 蛋白表达的 Western blot 检测 Western blot analysis of CaMKII and ERK protein expression; B. 细胞内钙离子含量 Intracellular calcium content; C. CaMKII 蛋白表达的量化 Quantification of CaMKII protein expression; D. ERK 蛋白表达的量化结果 Quantified results of ERK protein expression. MK801: NMDAR 阻断剂 NMDAR inhibitor; U0126: ERK 阻断剂 ERK inhibitor; KN93: CaMKII 阻断剂 CaMKII inhibitor; *D*-serine: *D*-丝氨酸 (NMDAR 激动剂 NMDAR agonist). 下同 The same below.

从图 5 可知, LPS 处理显著提高 κB 抑制蛋白 α ($\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$) 与 NF- κB p65 的磷酸化水平 ($P<0.05$)。HD 组 $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 及 NF- κB 磷酸化水平显著低于 LPS 组 ($P<0.05$)。阻断剂 KN93、MK801 和 U0126 显著降低 NF- κB p65 和 $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 磷酸化水平 ($P<0.05$)。免疫组织化学染色显示, LPS 组 NF- κB p65 在细胞核内绿色荧光信号增强, HD 联合处理后, 细胞核内绿色荧光信号减弱。 *D*-丝氨酸处理可以逆转 HD 降低 $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 及 NF- κB 磷酸化水平及核转位的作用。以上结果表明异氟烷通过抑制酶蛋白的磷酸化表达进而阻断 NF- κB 信号通路的激活并影响 NF- κB 的核转位。

3 讨论

小胶质细胞过度激活是神经炎症与多种神经退行性疾病的病理基础^[19]。过度激活的小胶质细胞产生 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子, 介导神经炎症并引起神经元损伤, 促进炎症疾病的发生, 破坏神经组织的生理稳态^[20-21]。脑缺血后神经免疫反应的主要特征之一即为促炎介质的释放, 诱导小胶质细胞炎症反应, 这被认为是导致缺血性脑损伤的主要原因^[22]。因此, 靶向抑制小胶质细胞促炎介质的分泌可减

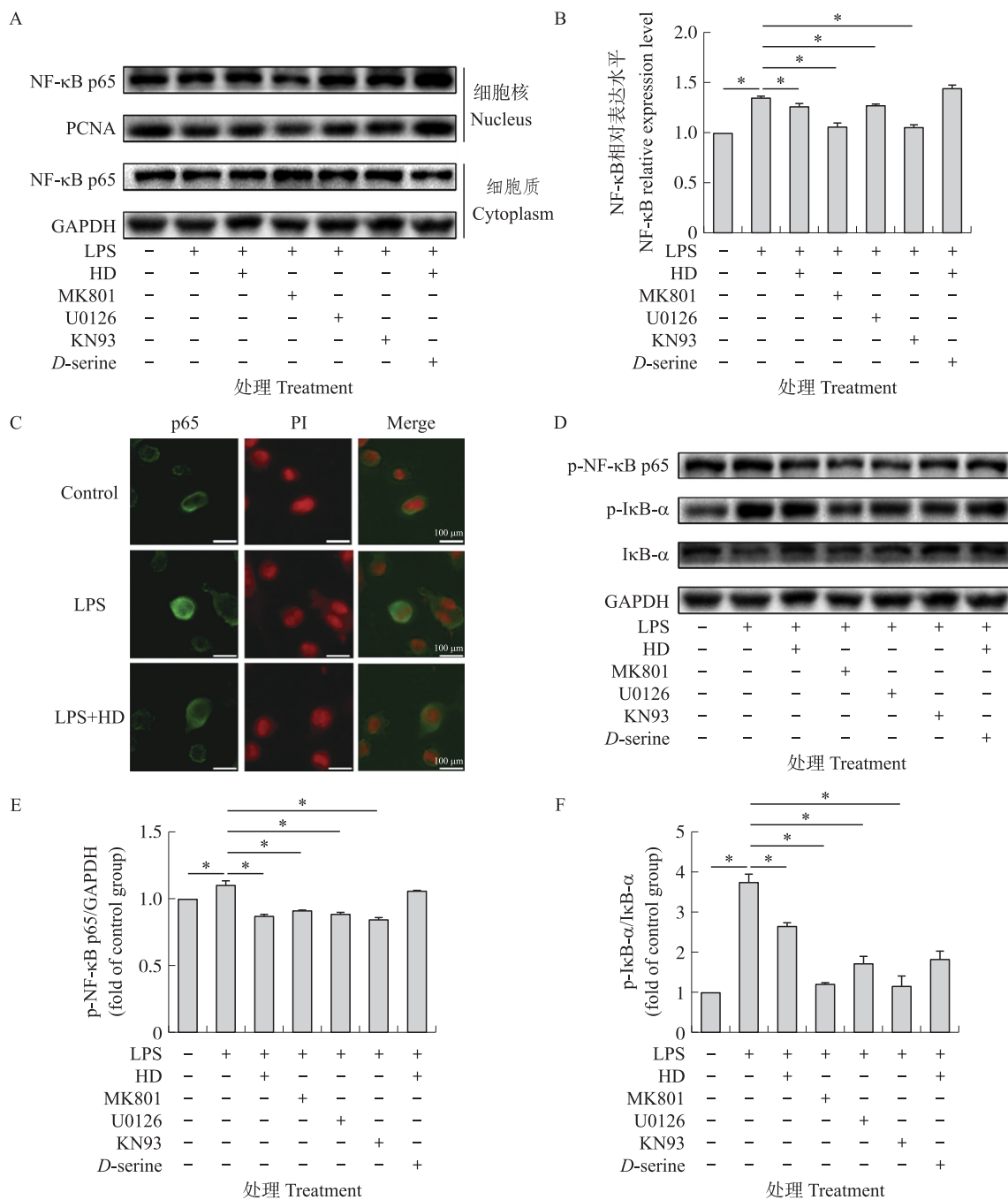


图 5 异氟烷与通路蛋白阻断剂处理后 NF-κB 和 IκB-α 的磷酸化和核转位变化
Fig. 5 Changes in phosphorylation and nuclear translocation of NF-κB and IκB-α
after treatment with isoflurane and pathway protein blockers

A, B. NF-κB p65 在细胞质与胞核表达的 Western blot 检测和量化 Determination of cytoplasmic and nuclear expression of NF-κB p65 protein by Western blot and quantified results; C. NF-κB p65 由胞质向胞核转位的代表性图像 Representative image of translocation of NF-κB p65 from cytoplasm to nucleus (绿色 Green; 核因子 κB p65 NF-κB p65; 红色 Red: 碘化丙啶 Propidium iodide); D. NF-κB p65 与 IκB-α 磷酸化蛋白表达的 Western blot 检测 Western blot detection of NF-κB p65 and IκB-α phosphorylated proteins; E, F. 磷酸化 NF-κB p65 和 IκB-α 蛋白表达的量化 Quantification of phosphorylated NF-κB p65 and IκB-α protein expression.

缓相关疾病的发展。本研究发现 LPS 处理小胶质细胞后促炎因子的表达水平明显升高,这与以往报道一致^[23-24]。另外,异氟烷抑制促炎因子的产生及促炎酶的表达,可以减轻 BV 细胞炎症反应。本研究还发现 NMDAR/CaMK II/ERK 阻断剂对于促炎因子尤其是促炎酶表达的抑制作用不明显,提示胞内促炎酶表达调控涉及其他信号通路。异氟烷上调抗炎因子 IL-10 的表达,可能有助于降低 BV 细胞炎症反应,发挥神经保护作用。

作为广泛存在于中枢神经系统的兴奋性神经递质谷氨酸门控的离子通道, NMDAR 是突触传递和可

塑性的重要介质^[25]。激活 NMDAR 可导致细胞内钙超载并引发下游通路激活^[7]。本研究结果表明,LPS 显著增强CaMKII磷酸化及胞内钙离子浓度,而异氟烷阻断CaMKII磷酸化并降低胞内钙离子浓度;对比CaMKII阻断剂与ERK阻断剂对CaMKII磷酸化及胞内钙离子浓度的影响,证实CaMKII处于ERK上游并接受钙离子调控;NMDAR阻断剂抑制目标通路所有蛋白的磷酸化并降低胞内钙离子浓度,且NMDAR激动剂与异氟烷同时作用后,异氟烷的阻断作用被逆转,说明异氟烷通过细胞表面受体NMDAR作用下游通路。

MAPK是炎症中必不可少的信号传导通路,主要参与免疫反应、凋亡、氧化应激等过程^[26-27]。本研究结果显示ERK阻断剂可抑制NF-κB p65的磷酸化及核转位,证明ERK发挥对NF-κB的调控作用。NF-κB是多种细胞信号通路的重要调控因子^[28],在小胶质细胞诱导炎症过程中启动并调节炎症过程^[12]。通常情况下小胶质细胞受到刺激后,IκB-α发生磷酸化并迅速降解,触发NF-κB从NF-κB-IκB-α复合物中分离,转运至细胞核,与促炎基因结合并促进其转录^[19]。本研究结果显示,LPS显著增强IκB-α、NF-κB的磷酸化及核因子由胞质转位至胞核。异氟烷显著抑制LPS诱导的小胶质细胞IκB-α、NF-κB p65的磷酸化和NF-κB p65的核转位增强。说明LPS刺激小胶质细胞后,过量的钙离子通过NMDAR进入胞内,激活CaMKII,进而引起ERK与NF-κB p65的磷酸化,最终导致促炎因子的产生与释放,促进炎症的发展。

异氟烷可通过缓解脑缺血-再灌注损伤,发挥神经保护作用^[29-30]。本研究采用LPS刺激小胶质细胞来模拟大脑神经炎症,发现异氟烷可以抑制促炎细胞因子和促炎酶的合成,阻断Ca²⁺通过NMDAR进入细胞,抑制CaMKII/ERK/NF-κB信号通路,以缓解LPS诱导的小胶质细胞过度激活所致的炎症反应。本研究揭示了异氟烷减轻神经炎症,发挥神经保护作用的部分机制,为异氟烷的临床应用提供了更好的试验依据。

参考文献 References:

- [1] Nguyen P L, Bui B P, Lee H, et al. A novel 1,8-naphthyridine-2-carboxamide derivative attenuates inflammatory responses and cell migration in LPS-treated BV2 cells via the suppression of ROS generation and TLR4/Myd88/NF-κB signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2527.
- [2] Casali B T, Reed-Geaghan E G. Microglial function and regulation during development, homeostasis and alzheimer's disease[J]. *Cells*, 2021, 10(4): 957.
- [3] 苏钰,陈栋梁,马慧,等. 硝唑尼特对日本脑炎病毒和脂多糖诱导炎症的体外抑制效果比较[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(10): 21-28.
Su Y, Chen D L, Ma H, et al. Comparison of the inhibition of nitazoxanide *in vitro* on inflammatory responses induced by Japanese encephalitis virus and lipopolysaccharide[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(10): 21-28 (in Chinese with English abstract).
- [4] Cai B, Seong K J, Bae S W, et al. A synthetic diosgenin primary amine derivative attenuates LPS-stimulated inflammation via inhibition of NF-κB and JNK MAPK signaling in microglial BV2 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 61: 204-214.
- [5] Do H T T, Bui B P, Sim S, et al. Anti-inflammatory and anti-migratory activities of isoquinoline-1-carboxamide derivatives in LPS-treated BV2 microglial cells via inhibition of MAPKs/NF-κB pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2319.
- [6] Gao G, Li C, Zhu J, et al. Glutaminase 1 regulates neuroinflammation after cerebral ischemia through enhancing microglial activation and pro-inflammatory exosome release[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 161.
- [7] Wu Q J, Tymianski M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection[J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1): 15.
- [8] Gonda X. Basic pharmacology of NMDA receptors[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(12): 1558-1567.
- [9] Harada H, Kelly P J, Cole D J, et al. Isoflurane reduces N-methyl-D-aspartate toxicity in vivo in the rat cerebral cortex[J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(6): 1442-1447.
- [10] Wang R, Reddy P H. Role of glutamate and nmda receptors in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4): 1041-1048.
- [11] Kang C H, Jayasooriya R G, Dilshara M G, et al. Caffeine suppresses lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells by suppressing Akt-mediated NF-κB activation and ERK phosphorylation[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(12): 4270-4276.
- [12] Ridder D A, Schwaninger M. NF-κB signaling in cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 995-1006.
- [13] 马玉捷,刘慧,周振雷. 不同浓度异氟烷对犬心血管效应的比较[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(10): 103-108.
Ma Y J, Liu H, Zhou Z L. Comparison of cardiovascular effects of different concentrations of isoflurane on dogs[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(10): 103-108 (in Chinese with English abstract).
- [14] Wang S, Yin J, Ge M, et al. Transforming growth-beta 1 contributes to isoflurane postconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 78: 280-290.
- [15] Zhang G, Ge M, Han Z, et al. Wnt/β-catenin signaling pathway contributes to isoflurane postconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury and is possibly related to the transforming growth factor β1/Smad3 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 420-430.

- [16] Zhao X, Chang G, Cheng Y, et al. GABA_A receptor/STEP61 signaling pathway may be involved in emulsified isoflurane anesthesia in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):4078.
- [17] Zhou C, Liu J. A novel intravenous general anesthetic-emulsified isoflurane; from bench to bedside[J]. *Front Med*, 2012, 6(4):381-387.
- [18] Yang Z, Lv J, Lu X, et al. Emulsified isoflurane induces release of cytochrome C in human neuroblastoma SHSY-5Y cells via JNK(c-Jun N-terminal kinases) signaling pathway[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2018, 65:19-25.
- [19] Jover-Mengual T, Hwang J Y, Byun H R, et al. The role of NF- κ B triggered inflammation in cerebral ischemia[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:633610.
- [20] Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863:1218-1227.
- [21] Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease; role of TNF[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015:610813.
- [22] Neag M A, Mitre A O, Catinean A, et al. An overview on the mechanisms of neuroprotection and neurotoxicity of isoflurane and sevoflurane in experimental studies[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 165:281-289.
- [23] Nam H Y, Nam J H, Yoon G, et al. Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):271.
- [24] Bui B P, Oh Y, Lee H, et al. Inhibition of inflammatory mediators and cell migration by 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline derivatives in LPS-stimulated BV2 microglial cells via suppression of NF- κ B and JNK pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80:106231.
- [25] Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(6):383-400.
- [26] Liu H, Chen B, Guo B, et al. Postconditioning with sevoflurane or propofol alleviates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation but exerts dissimilar effects on the NR2B subunit and cognition[J]. *Molecular Neurobiology*, 2021, 58(9):4251-4267.
- [27] Zheng Y, Fang W, Fan S, et al. Neurotropin inhibits neuroinflammation via suppressing NF- κ B and MAPKs signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 cells[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 136(4):242-248.
- [28] Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi S Z, et al. Neuroinflammation pathways; a general review[J]. *Int J Neurosci*, 2017, 127(7):624-633.
- [29] Yang H, Yin Q, Huang L, et al. The bioequivalence of emulsified isoflurane with a new formulation of emulsion; a single-center, single-dose, double-blinded, randomized, two-period crossover study[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:626307.
- [30] Kim J A, Li L, Zuo Z. Delayed treatment with isoflurane attenuates lipopolysaccharide and interferon gamma-induced activation and injury of mouse microglial cells[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(3):566-573.

责任编辑:周广礼