瞬时受体电位M2抑制剂A10对缺糖缺氧后复糖复氧细胞的保护作用

黄卓群¹, 余夏飞², 刘星宇², 马 康³, 黄敏华², 李芳芳², 杨 巍², 牛建国^{1,3}

1. 宁夏医科大学宁夏颅脑疾病重点实验室, 宁夏 银川 750004

2. 浙江大学基础医学院生物物理学系, 浙江 杭州 310058

3. 宁夏医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系, 宁夏 银川 750004

[摘 要] 目的: 探讨瞬时受体电位M2(TRPM2)抑制剂A10对缺糖缺氧后复糖复氧(OGD/R)细胞模型的保护作用。方法: 采用SH-SY5Y细胞系制备OGD/R损伤模型。将细胞随机分为空白对照组、模型对照组和A10组。细胞计数试剂盒8检测细胞存活率; 活性氧检测试剂盒检测细胞活性氧水平; 四甲基罗丹明甲酯法检测线粒体膜电位; 一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞数量; 蛋白质印迹法测定cleaved caspase 3蛋白表达。结果: 相对于3、20、30、50和100 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的A10具有较低的细胞毒性及较好的通道活性抑制作用。与模型对照组比较, A10组活性氧水平降低($P<0.05$), 线粒体膜电位降低程度改善($P<0.05$), 凋亡细胞数减少($P<0.05$), 凋亡相关蛋白cleaved caspase 3表达减少($P<0.05$)。结论: A10可以通过抑制TRPM2通道功能、减少细胞外钙离子内流、降低细胞活性氧水平、稳定线粒体膜电位水平和减少细胞凋亡缓解OGD/R后细胞的损伤。

[关键词] 瞬时受体电位M2通道; 缺糖缺氧/复糖复氧; 活性氧; 线粒体膜电位; 细胞凋亡; Cleaved caspase 3; SH-SY5Y细胞

[中图分类号] R743.31 **[文献标志码]** A

Protective effect of transient receptor potential melastatin 2 inhibitor A10 on oxygen glucose deprivation/reperfusion model

HUANG Zhuoqun¹, YU Xiafei², LIU Xingyu², MA Kang³, HUANG Minghua², LI Fangfang², YANG Wei², NIU Jianguo^{1,3} (1. Laboratory of Brain, Ningxia Medical

收稿日期: 2020-11-28 接受日期: 2021-01-28

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发(东西部合作)项目(2019BFH02003)

第一作者: 黄卓群, 主治医师, 主要从事脑缺血与神经退行性疾病研究; E-mail: huangzhuoqun1985@126.com; <https://orcid.org/0000-0002-2642-9425>

通信作者: 杨 巍, 教授, 博士生导师, 主要从事神经生物学及药理学研究; E-mail: yangwei@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0003-3065-1843>. 牛建国, 教授, 博士生导师, 主要从事颅脑疾病研究; E-mail: niujiang@nxmu.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-4324-190X>

University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Biophysics, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; 3. Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Corresponding authors: YANG Wei, E-mail: yangwei@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0003-3065-1843>; NIU Jianguo, E-mail: niujg@nxmu.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-4324-190X>

[Abstract] Objective: To investigate the effect of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) inhibitor A10 on oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) injury in SH-SY5Y cells. **Methods:** Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were subject to OGD/R injury, and then were divided into blank control group, model control group and A10 group randomly. The cell survival rate was detected by cell counting kit 8 (CCK-8); the level of cellular reactive oxygen species (ROS) was detected by reactive oxygen detection kit; the mitochondrial membrane potential was detected by tetramethylrhodamine (TMRM) method; the number of apoptotic cells was detected by TUNEL apoptosis assay kit; the protein expression level of cleaved caspase 3 was detected by Western blot. **Results:** Compared with 3, 20, 30, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ A10 has lower cytotoxicity and better inhibition effect on channel activity. Compared with the model control group, ROS level was reduced, the mitochondrial membrane potential was improved, the number of apoptosis cells was reduced, and the expression of cleaved caspase 3 was significantly reduced in the A10 group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** A10 can alleviate cell damage after OGD/R by inhibiting TRPM2 channel function, reducing extracellular calcium influx, reducing cell ROS levels, stabilizing mitochondrial membrane potential levels, and reducing apoptosis.

[Key words] Transient receptor potential melastatin 2 channel; Oxygen glucose deprivation/reperfusion; Reactive oxygen species; Mitochondrial membrane potential; Apoptosis; Cleaved caspase 3; SH-SY5Y cells

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(1): 106–112.]

[缩略语] 瞬时受体电位 M2(transient receptor potential melastatin 2, TRPM2); 缺糖缺氧后复糖复氧(oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8); 四甲基罗丹明甲酯(tetramethylrhodamine, TMRM)

脑缺血是导致人类残疾和死亡的常见病因之一。脑缺血将导致大脑供氧不足和营养缺乏,并最终引起神经元损伤和死亡^[1]。虽然再灌注治疗对保护缺血后脑组织的正常功能至关重要,但其会导致继发性脑损伤,即所谓的脑缺血再灌注损伤^[2]。缺血性脑卒中发病急性期有多种有效的治疗方法,但缺乏针对非急性期卒中患者的有效药物,特别是能显著修复受损神经元的药物^[3-4]。

在中枢神经系统中,瞬时受体电位通道广泛

表达,尤以 TRPM2 通道表达最为丰富^[5]。TRPM2 通道对中枢神经系统生理学和病理生理学具有重要作用^[6],抑制或敲除 TRPM2 具有神经保护作用,可以减少脑梗死面积,改善感觉和运动功能以及减轻炎症反应等^[7-9]。因此,抑制 TRPM2 通道功能可能成为非急性期卒中患者的有效治疗手段。

本研究利用人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞,通过建立 OGD/R 模型模拟脑缺血再灌注过程,利用自主开发的 TRPM2 特异性抑制

剂 2,3-二氢喹唑啉-4(1H)-酮衍生物 H1 的衍生物 A10 抑制通道功能,观察其对 OGD/R 损伤后细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞由浙江大学医学院段树民课题组馈赠;TRPM2 抑制剂 A10 由北京大学药学院张亮仁课题组馈赠;DMEM/F12 培养基、无葡萄糖 DMEM 培养基、青霉素-链霉素混合液(10 000 U/mL)和 0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸为美国 Gibco 公司产品;胎牛血清为德国 PAN-Seratech 公司产品;磷酸盐缓冲液为生工生物工程(上海)股份有限公司产品;BCA 法蛋白浓度测定试剂盒、活性氧检测试剂盒、CCK-8 试剂盒和一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品;caspase3 抗体为美国 CST 公司产品;TMRM、二氧化碳恒温培养箱为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; β -actin 小鼠单克隆抗体为武汉爱博泰克生物科技有限公司产品;M5 全波段多功能酶标仪为美国 Molecular Devices 公司产品;Scientz-D 超声波细胞粉碎仪为宁波新芝生物科技股份有限公司产品;倒置激光扫描共聚焦显微镜 Olympus FV1000 为日本 Olympus 公司产品。

1.2 细胞培养及分组

将细胞接种于含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 中,并于 37 °C、5% 二氧化碳的培养箱中培养。所有实验均在第 15 到 25 代细胞中进行。细胞每 3 d 传代一次。在筛选 A10 药物最佳作用浓度时,将细胞分为 0、3、10、20、30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度,其余实验均将细胞分为空白对照组、模型对照组、A10 组。每个实验至少重复 3 次。

1.3 OGD/R 模型的建立

将正常细胞的 DMEM/F12 培养基更换为无葡萄糖和无血清的 DMEM 培养基,放置在含有 95% 氮气和 5%二氧化碳混合气体的密闭培养装置中于 37 °C 下培养 6 h,然后将细胞恢复在常氧条件和正常培养基中培养 12 h。对照组在正常培养基中于 37 °C、5%二氧化碳培养箱中培养相同时间。

1.4 CCK-8 法测定细胞存活率

在筛选 A10 药物最佳作用浓度时,将细胞

以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,每组设 5 个平行复孔,过夜后长至合适密度,将 A10 加入每孔使其终浓度分别为 0、3、10、20、30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$, 孵育 12 h 后每孔加入 CCK-8 10 μL ,置于培养箱中孵育 2 h,之后采用酶标仪在 450 nm 测定每孔的吸光度值,计算细胞存活率。

在评估 A10 对细胞的保护作用时,将细胞以相同的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,过夜后弃去培养基,每孔加入 100 μL 无葡萄糖和无血清的 DMEM 培养基,建立缺糖缺氧模型,在复糖复氧阶段加入含 10 $\mu\text{mol/L}$ A10 的正常培养基复灌 12 h 后,每孔加入 CCK-8 10 μL ,置于培养箱中孵育 2 h,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(A10 组吸光度值-空白对照孔吸光度值)/(对照组吸光度值-空白对照孔吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.5 活性氧检测试剂盒检测细胞活性氧水平

以 5×10^4 /皿的密度将细胞种植于各组共聚焦成像细胞皿中,待细胞生长至合适密度后,将模型对照组和 A10 组均给予 OGD 处理,但复灌阶段 A10 组给予含 10 $\mu\text{mol/L}$ A10 的正常培养基复灌,复灌时间均为 12 h,空白对照组用正常培养基培养相同时间。各组处理结束后去除细胞培养液,每皿加入按试剂盒说明书配制好的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐工作液和无血清培养液共 1 mL,置于 37 °C 培养箱中避光孵育 30 min,结束后用无血清培养液清洗 3 次,用倒置激光共聚焦显微镜观察,随机取 3~5 个视野,采用 ImageJ 软件计算细胞的相对平均荧光强度值。

1.6 TMRM 法检测线粒体膜电位

同前各组细胞处理后,用磷酸盐缓冲液清洗 3 次,每孔加入 10 $\mu\text{mol/L}$ TMRM 染色工作液和培养液共 1 mL,置于 37 °C 培养箱中孵育 20 min,结束后用磷酸盐缓冲液清洗 3 次,用倒置激光共聚焦显微镜观察,随机取 3~5 个视野,计算细胞的 TMRM 相对平均荧光强度值。

1.7 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞数量

将细胞以 6×10^4 /孔的密度接种于 12 孔板的细胞爬片上,培养过夜后分组处理。按 TUNEL 试剂盒说明操作,用倒置激光共聚焦显微镜观察,并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)= 凋亡细胞数/视野下细胞总数 $\times 100\%$ 。以空白对照组细胞凋亡率为基准计算各组相对凋亡水平。

1.8 蛋白质印迹法测定凋亡相关蛋白表达

细胞缺糖缺氧8 h后,复灌12 h。加入4℃预冷的磷酸盐缓冲液,刮下细胞,加入适量蛋白酶抑制剂和细胞裂解液混合液,用细胞超声粉碎仪破碎细胞,低温离心机14 000×*g*离心12 min,取上清液,弃沉淀。用BCA法测定各组蛋白含量,每孔上样40 μg蛋白,15% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,先用电压80 V电泳30 min,待蓝色指示剂越过两胶分界处后将电压调至100 V再电泳40 min,然后350 mA恒流转膜90 min,常温下5%脱脂牛奶封闭2 h,4℃孵育一抗过夜(caspase 3兔多克隆抗体稀释比例为1:1000,β-actin小鼠单克隆抗体稀释比例为1:50000);TBST常温下孵育二抗2 h(羊抗兔辣根过氧化物酶 IgG 稀释比例为1:5000,TBST配制),电化学发光显影显示目的条带和内参,结果用Image Lab软件分析,将空白对照组cleaved caspase 3蛋白表达量设为100%。

1.9 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行数据分析,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,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 A10能提高OGD/R细胞的存活率

不同浓度A10作用下细胞存活率见图1。与空白对照(A10浓度为0 μmol/L)比较,当A10浓度为3 μmol/L和10 μmol/L时,细胞存活率未见明显下降(均 $P>0.05$);且当A10浓度为10 μmol/L时其对TRPM2通道的抑制率约为60%^[10],故本研究后续实验选择A10浓度为10 μmol/L。

当给予细胞OGD/R处理后,与空白对照组比

与0 μmol/L A10浓度比较,** $P<0.01$ 。

图1 不同浓度瞬时受体电位M2抑制剂A10对SH-SY5Y细胞的药物毒性

Figure 1 Toxic effect of TRPM2 inhibitor A10 at different concentrations on SH-SY5Y cells

较,模型对照组细胞存活率降低($P<0.05$),而A10组较模型对照组细胞存活率提高($P<0.05$),见表1。结果提示,10 μmol/L A10可以缓解OGD/R造成的细胞损伤。

2.2 A10可以降低OGD/R细胞的活性氧水平

与空白对照组比较,模型对照组活性氧水平升高(均 $P<0.05$);与模型对照组比较,A10组活性氧水平降低($P<0.05$),见图2和表1。结果提示,A10可以降低OGD/R细胞的活性氧水平。

2.3 A10改善OGD/R细胞的线粒体膜电位变化

与空白对照组比较,模型对照组线粒体膜电位明显降低($P<0.05$);与模型对照组比较,A10组线粒体膜电位降低改善($P<0.05$),见图3和表1。结果提示,A10可改善OGD/R细胞线粒体膜电位变化,从而对线粒体产生保护作用。

2.4 A10减少OGD/R细胞凋亡

TUNEL法荧光染色结果显示,空白对照组凋

表1 缺糖缺氧复糖复氧处理后TRPM2抑制剂A10对细胞存活率、活性氧水平、线粒体膜电位、细胞凋亡数以及cleaved caspase 3蛋白表达水平的影响

Table 1 Effects of TRPM2 inhibitor A10 on the survival rate,reactive oxygen species level,mitochondrial membrane potential, cell apoptosis number,and cleaved caspase 3 protein level of cells after OGD/R treatment

(% , $\bar{x} \pm s$)						
组别	<i>n</i>	细胞存活率	活性氧水平	线粒体膜电位	相对细胞凋亡水平	cleaved caspase 3蛋白相对表达量
空白对照组	3	101.5±5.5	100.0±4.5	100.0±5.0	100.0±20.8	100.0
模型对照组	3	60.1±6.2*	187.6±4.9*	45.0±15.0*	452.0±130.7*	125.6±12.0*
A10组	3	74.5±8.2**	125.1±11.5**	70.0±7.3**	166.2±51.9#	93.4±12.8#
<i>F</i> 值	—	64.94	104.10	30.92	15.59	14.11
<i>P</i> 值	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

“—”:无相关数据.与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$. TRPM2:瞬时受体电位M2.

A:空白对照组细胞的绿色荧光强度弱;B:模型对照组细胞的绿色荧光强度高,活性氧水平升高;C:A10组细胞的绿色荧光强度较模型对照组减弱. 标尺=20 μm .

图 2 缺糖缺氧复糖复氧处理后 A10 对细胞活性氧水平的影响

Figure 2 Effect of A10 on reactive oxygen species levels of cells after OGD/R treatment

A:空白对照组细胞红色荧光强度高;B:模型对照组细胞红色荧光强度弱,线粒体膜电位降低;C:A10组细胞红色荧光强度较模型对照组增强. 标尺=20 μm .

图 3 缺糖缺氧复糖复氧处理后 A10 对细胞线粒体膜电位变化的影响

Figure 3 Effect of A10 on the mitochondrial membrane potential of cells after OGD/R treatment

A:空白对照组,TUNEL阳性细胞数较少;B:模型对照组,TUNEL阳性细胞数较空白对照组增多;C:A10组TUNEL阳性细胞数较模型对照组减少. 标尺=20 μm .

图 4 缺糖缺氧复糖复氧处理后 A10 对细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of A10 on the apoptosis of cells after OGD/R treatment

亡细胞数少,模型对照组凋亡细胞数增多($P < 0.05$),而A10组凋亡细胞数较模型对照组减少($P < 0.05$),见图4和表1。蛋白质印迹法实验结果显示,与空白对照组比较,模型对照组cleaved

caspase 3 蛋白表达增加($P < 0.05$),而A10组cleaved caspase 3 蛋白表达较模型对照组减少($P < 0.05$),且与空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),见图5和表1。结果提示,A10可以抑制OGD/R后

caspase 3 酶的活化,从而减少细胞凋亡。

图 5 缺糖缺氧复糖复氧处理后 A10 对凋亡相关蛋白 cleaved caspase 3 表达的影响

Figure 5 Effects of A10 on the expression of cleaved caspase 3 in cells after OGD/R treatment

3 讨 论

TRPM2 是钙离子通透的非选择性阳离子通道,于 1998 年首次被克隆^[11],位于人第 21 号染色体的长臂上^[12]。TRPM2 通道广泛表达于包括脑、心脏、肾脏、胰岛、血管和平滑肌等组织和器官^[13],并参与重要的生理病理进程,如免疫应答、急性肾损伤、糖尿病等^[14-16]。位于中枢神经系统的 TRPM2 对于体温稳态调节至关重要^[17]。TRPM2 通道作为活性氧的直接感受器,介导了许多氧化应激相关疾病的发生,如神经退行性疾病和脑卒中等^[18-19]。截至目前,已有体内和体外研究结果表明中枢神经系统的 TRPM2 会进一步加重脑缺血损伤^[20-21]。

当发生脑缺血时,随即伴随能量损失、兴奋性毒性、活性氧生成等各种平行的级联反应,并引起细胞内氧化应激水平急剧上升等,从而进一步导致神经变性。此外,如线粒体功能障碍、蛋白质合成功能障碍和脂质过氧化都会导致损伤进一步加重^[22]。线粒体作为活性氧产生的主要场所之一^[23],是细胞存活的关键调节因子,其在脑缺血再灌注损伤中的作用也越来越受到大家的关注。线粒体在细胞存活中的作用主要体现在三方面:①线粒体是细胞钙信号的中枢^[24];②位于线粒体内膜上的酶复合物是维持细胞能量需求和代谢稳态的重要组成部分^[25];③细胞的存活在很大程度上依赖于线粒体的完整性和功能^[26]。当发生缺血再灌注损伤时,氧化应激导致线粒体活性受损,引起活性氧大量产生,有研究表明原代培养的神经元在经过过氧化氢处理后激活 TRPM2 通道,引起大量阳离子内流,尤其钙离子内流,导致神经元

凋亡^[7]。

A10 是一种特异性 TRPM2 通道抑制剂。该化合物在细胞外侧在不影响 TRPM8 电流的情况下表现出对 TRPM2 通道的特异性抑制作用,并可以有效抑制由过氧化氢引发的细胞内钙信号增加^[10]。本研究通过组合电生理和细胞毒性实验来筛选最适合的 A10 浓度。本文资料显示,当细胞经缺氧缺糖处理后再给予 A10 复灌处理,细胞内活性氧水平降低,线粒体膜电位改善,细胞存活率提高,凋亡细胞数减少,凋亡相关蛋白 caspase 3 活化也减少。

综上所述,TRPM2 特异性抑制剂 A10 可以缓解 OGD/R 细胞的损伤,可能主要通过抑制 TRPM2 通道功能、减少细胞外钙离子内流、降低细胞活性氧水平、稳定线粒体膜电位水平和减少细胞凋亡实现,这些结果有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] YU C Z, LI C, PEI D S, et al. Neuroprotection against transient focal cerebral ischemia and oxygen-glucose deprivation by interference with GluR6-PSD₉₅ protein interaction[J]. *Neurochem Res*, 2009,34(11):2008–2021. DOI:10.1007/s11064-009-9990-z.
- [2] BAK S W, CHOI H, PARK H H, et al. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine against oxygen-glucose deprivation-induced neural stem cell death[J]. *Mol Neurobiol*, 2016,53(10):6644–6652. DOI:10.1007/s12035-015-9563-x.
- [3] ZHAN K, YU P, LIU C, et al. Detrimental or beneficial; the role of TRPM2 in ischemia/reperfusion injury[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016,37(1):4–12. DOI:10.1038/aps.2015.141.
- [4] BEHROUZIFAR S, VAKILI A, BANDEGI A R, et al. Neuroprotective nature of adipokine resistin in the early stages of focal cerebral ischemia in a stroke mouse model[J]. *Neurochem Int*, 2018,114:99–107. DOI:10.1016/j.neuint.2018.02.001.
- [5] FONFRIA E, MURDOCK P R, CUSDIN F S, et al. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2006,26(3):159–178. .
- [6] BELROSE J C, JACKSON M F. TRPM2: a candidate therapeutic target for treating neurological diseases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018,39(5):722–732. DOI:10.1038/aps.2018.31.
- [7] KANEKO S, KAWAKAMI S, HARA Y, et al. A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide[J]. *J Pharmacol Sci*, 2006,101(1):66–76.

- DOI:10.1254/jphs.fp0060128.
- [8] JIA J, VERMA S, NAKAYAMA S, et al. Sex differences in neuroprotection provided by inhibition of TRPM2 channels following experimental stroke[J]. **J Cereb Blood Flow Metab**, 2011,31(11):2160–2168. DOI:10.1038/jcbfm.2011.77.
 - [9] HUANG S, TURLOVA E, LI F, et al. Transient receptor potential melastatin 2 channels (TRPM2) mediate neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice [J]. **Exp Neurology**, 2017,296:32–40. DOI:10.1016/j.expneurol.2017.06.023.
 - [10] ZHANG H, LIU H, LUO X, et al. Design, synthesis and biological activities of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives as TRPM2 inhibitors[J]. **Eur J Medicinal Chem**, 2018,152:235–252. DOI:10.1016/j.ejmech.2018.04.045.
 - [11] CLAPHAM D E. TRP channels as cellular sensors [J]. **Nature**, 2003,426(6966):517–524. DOI:10.1038/nature02196.
 - [12] NAGAMINE K, KUDOH J, MINOSHIMA S, et al. Molecular cloning of a novel putative Ca^{2+} channel protein (TRPC7) highly expressed in brain[J]. **Genomics**, 1998,54(1):124–131. DOI:10.1006/geno.1998.5551.
 - [13] MCHUGH D, FLEMMING R, XU S Z, et al. Critical intracellular Ca^{2+} dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation[J]. **J Biol Chem**, 2003,278(13):11002–11006. DOI:10.1074/jbc.M210810200.
 - [14] YAMAMOTO S, SHIMIZU S, KIYONAKA S, et al. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration[J]. **Nat Med**, 2008,14(7):738–747. DOI:10.1038/nm1758.
 - [15] GAO G, WANG W, TADAGAVADI R K, et al. TRPM2 mediates ischemic kidney injury and oxidant stress through RAC1[J]. **J Clin Invest**, 2014,124(11):4989–5001. DOI:10.1172/JCI76042.
 - [16] HERSON P S, LEE K, PINNOCK R D, et al. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium overload by activation of a non-selective cation channel in an insulin-secreting cell line[J]. **J Biol Chem**, 1999,274(2):833–841. DOI:10.1074/jbc.274.2.833.
 - [17] SONG K, WANG H, KAMM G B, et al. The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia[J]. **Science**, 2016,353(6306):1393–1398. DOI:10.1126/science.aaf7537.
 - [18] HERMOSURA M C, CUI A M, GO R C V, et al. Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2008,105(46):18029–18034. DOI:10.1073/pnas.0808218105.
 - [19] FONFRIA E, MARSHALL I C B, BOYFIELD I, et al. Amyloid beta-peptide(1–42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures[J]. **J Neurochem**, 2005,95(3):715–723. DOI:10.1111/j.1471-4159.2005.03396.x.
 - [20] VERMA S, QUILLINAN N, YANG Y F, et al. TRPM2 channel activation following *in vitro* ischemia contributes to male hippocampal cell death[J]. **NeuroSci Lett**, 2012,530(1):41–46. DOI:10.1016/j.neulet.2012.09.044.
 - [21] YE M, YANG W, AINSCOUGH J F, et al. TRPM2 channel deficiency prevents delayed cytosolic Zn^{2+} accumulation and CA1 pyramidal neuronal death after transient global ischemia[J/OL]. **Cell Death Dis**, 2014,5(11):e1541. DOI:10.1038/cddis.2014.494.
 - [22] RUIZ A, MATUTE C, ALBERDI E. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} release through ryanodine and IP3 receptors contributes to neuronal excitotoxicity[J]. **Cell Calcium**, 2009,46(4):273–281. DOI:10.1016/j.ceca.2009.08.005.
 - [23] SHADEL G S, HORVATH T L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis[J]. **Cell**, 2015, 163(3):560–569. DOI:10.1016/j.cell.2015.10.001.
 - [24] SZABADKAI G, DUCHEN M R. Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling[J]. **Physiology**, 2008, 23(2):84–94. DOI:10.1152/physiol.00046.2007.
 - [25] GREEN D R, GALLUZZI L, KROEMER G. Metabolic control of cell death[J]. **Science**, 2014,345(6203):1250256. DOI:10.1126/science.1250256.
 - [26] RUGARLI E I, LANGER T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons[J]. **EMBO J**, 2012,31(6):1336–1349. DOI:10.1038/emboj.2012.38.

[本文编辑 沈 敏 余 方]