

七氟烷和异氟烷急性暴露对 SD 幼大鼠学习记忆及海马 脑源性神经营养因子表达的影响

余梓浦², 游 珊², 徐 敏², 林 函^{1,3}, 狄美琴¹, 连庆泉^{1,2}

(温州医学院 1. 附属第二医院麻醉科, 2. 环境毒理学研究所, 3. 环境医学科, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 探讨挥发性麻醉药七氟烷和异氟烷急性暴露对 SD 大鼠幼年期学习记忆及海马脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响及其机制。方法 7 日龄大鼠提前 0.5 h ip 给予荷包牡丹碱 8 mg·kg⁻¹ 或蝇蕈醇 1 mg·kg⁻¹, 然后暴露于含 3.6% 七氟烷或 2.3% 异氟烷的空氧混合气中, 连续 6 h。出生后第 21 天行 Morris 水迷宫实验记录潜伏期; 取海马, 免疫组化及 Western 印迹法检测 γ 氨基丁酸-A (GABA-A) 受体 $\alpha 1$ 亚基和 BDNF 表达, 逆转录-PCR 方法检测 mRNA 表达。结果 氟烷组的连续 5 d 总潜伏期均显著延长 ($P < 0.05$); 与七氟烷和异氟烷组比, 提前给予荷包牡丹碱或蝇蕈醇对潜伏期无显著改善作用。免疫组化、Western 印迹法和逆转录-PCR 结果显示, 与正常对照组相比, 七氟烷、异氟烷和提前给予荷包牡丹碱或蝇蕈醇组幼鼠海马 GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基蛋白与 mRNA 表达无明显差异; 七氟烷和异氟烷组 BDNF 的蛋白和 mRNA 表达量显著降低, 分别降低了 13%, 25% 和 23%, 21% ($P < 0.05$)。与七氟烷和异氟烷组相比, 提前给予荷包牡丹碱或蝇蕈醇组 BDNF 的蛋白和 mRNA 表达量无显著差异。结论 七氟烷和异氟烷急性暴露能够影响 SD 大鼠幼年期学习记忆功能, 可能与 BDNF 的表达改变有关, GABA-A 受体不参与神经发育毒性的介导。

关键词: 七氟烷; 异氟烷; 学习障碍; 受体, GABA-A; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R971.1, R962 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)02-0132-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.002

挥发性麻醉药对学习记忆能力的影响一直存在争议: Jevtovic-Todorovic 等^[1]的研究表明, 新生大鼠异氟烷急性暴露可引起长期学习记忆能力下降, 机制可能是异氟烷诱发神经细胞凋亡; 而 Li 等^[2]的研究表明, 母大鼠孕晚期急性暴露于异氟烷不会引起子代长期的学习记忆能力下降。本课题组前期实验结果显示, 七氟烷和异氟烷急性暴露具有神经发育毒性, 可致神经元的凋亡; 在等效浓度下异氟烷能引起更严重的神经元损伤^[3]。挥发性麻醉药的主要作用位点为 γ 氨基丁酸-A (γ -aminobutyric acid-A, GABA-A) 受体和 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸 (*N*-methyl *D*-aspartate, NMDA) 受体, GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基 (GABA-A α_1) 在挥发性麻醉药结合位点的形成中有重要作用^[4-6]。脑源性神经营养因子

(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是中枢神经系统发育过程中的一个重要因子, 调节神经元的生长、分化、迁移, 参与神经元可塑性的调节。故 GABA-A $\alpha 1$ 和 BDNF 为本实验的检测指标, 本研究拟继续研究 SD 新生大鼠急性暴露七氟烷和异氟烷对其长期学习记忆能力的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及主要仪器

七氟烷, 批号: 9227, 异氟烷, 批号: N022C80, 瑞士雅培公司。荷包牡丹碱 (bicuculline), 蝇蕈醇 (muscimol), 美国 Sigma 公司。兔抗大鼠 GABA-A 受体 $\alpha 1$ 抗体, 美国 Abcam 公司。兔抗大鼠 BDNF 抗体, 兔抗大鼠 α 微管蛋白抗体, 美国 Santa Cruz 公司; 山羊抗兔二抗检测试剂, 北京中杉公司。麻醉气体监测仪器, 美国 Drager 公司, 多功能麻醉气体监护仪, 美国 Vamos 公司。Western 印迹电子成像系统, 美国 GE 公司。

1.2 动物及分组处理

7 日龄雄性 SD 大鼠 210 只, 体质量 10 ~ 18 g, 由温州医学院动物中心提供, 动物许可证号: SYSK (浙) 2005-0061。实验分为 7 组, 每组 30 只: 正常

基金项目: 国家自然科学基金 (30800323); 浙江省自然科学基金 (Y206467); 温州市科技局项目 (Y20080117)

作者简介: 余梓浦 (1984 -), 男, 硕士研究生, 主要从事麻醉药的神经毒理学研究。林 函 (1974 -), 男, 副教授, 博士, 主要从事麻醉药的神经发育毒性研究。

通讯作者: 林 函, E-mail: nanlinhannansh@qq.com, Tel: (0577) 88002927; 连庆泉, Tel: (0577) 88879169, E-mail: lianqingquan@yahoo.com

对照组、七氟烷组、七氟烷 + 蝇蕈醇组、七氟烷 + 荷包牡丹碱组、异氟烷组、异氟烷 + 蝇蕈醇组、异氟烷 + 荷包牡丹碱组。

7 日龄 SD 大鼠置于塑料密闭透明容器中, 容器置于 38℃ 恒温水浴箱中^[4]。急性暴露前 0.5 h, 按照分组 ip 给予荷包牡丹碱 8 mg·kg⁻¹, 蝇蕈醇 1 mg·kg⁻¹ 或等体积的生理盐水。正常对照组大鼠置于塑料密闭透明容器中以 2 L·min⁻¹ 流量通入含 60% O₂ 的空氧混合气, 其余各组按照分组分别通入含 3.6% 七氟烷或 2.3% 异氟烷的 60% O₂ 空氧混合气, 连续暴露 6 h, 暴露结束后正常饲养直至出生后第 21 天。七氟烷和异氟烷的暴露浓度约为 7 日龄大鼠 1 个最小肺泡吸入浓度, 相当于临床麻醉维持阶段的吸入麻醉药浓度^[7-8]。麻醉气体监测仪监测暴露过程中的挥发性麻醉药浓度和 CO₂ 浓度。显露后, 除正常对照组外, 其余各组均有大鼠死亡, 第 21 天时每组存活大鼠数分别为 30, 24, 25, 25, 26, 24 和 26 只。出生后第 21 天进行 Morris 水迷宫实验, 水迷宫实验结束后, 即刻每组取 6 只大鼠处死, 取海马进行免疫组织化学检测。每组另取 6 只大鼠处死取海马, 迅速液氮保存, 然后转移到 -80℃ 冰箱保存, 以备 Western 印迹和 RT-PCR 检测。

1.3 Morris 水迷宫实验记录潜伏期

水迷宫系统由一个直径为 1.5 m 的黑色不锈钢水池、隐藏在水下 2 cm 的平台、以及水池上方的图像采集系统和信息处理系统组成。从第 1 天起, 将大鼠面向池壁分别从 4 个象限放入水池, 图像采集系统记录大鼠在水池内游泳找到隐藏在水下平台的时间(潜伏期), 每天 4 个象限各测 1 次, 4 个象限潜伏期总和作为当天的总潜伏期。每次训练时间为 120 s, 如果大鼠在 120 s 内未找到平台, 须将其引至平台, 此时潜伏期记为 120 s。每次训练后让其在平台上停留 15 s。测定时间恒定于每日 8:00 ~ 16:00, 水温维持在 (23 ± 0.5)℃。水迷宫周围摆放物品及大鼠各象限入水点保持不变。历时 7 d 并选取后 5 d 的总潜伏期的数据作为统计分析。

1.4 免疫组织化学检测 GABA-A α 1 和 BDNF 表达

水迷宫检测结束后, 每组取 6 只 SD 大鼠, ip 给予 4% 水合氯醛 0.07 ml·kg⁻¹ 麻醉, 然后开胸经左心室-主动脉插管, 用 4℃ 生理盐水快速灌注, 待右心室流出液清亮后, 再灌注 100 ~ 150 ml 4% 多聚甲醛(4℃), 大鼠四肢和尾巴僵直为灌注成功。取海马, 每只大鼠海马切片共取 6 张, 石蜡包埋切片, 片厚 4 μ m, 晾干备用。用 SP 法免疫组织化学染色, DAB 显色。苏木素复染后封片、拍照。以 IPP

软件分析的吸光度(absorbance, A) 表示海马 CA3 区 GABA-A α 1 和 BDNF 的相对表达量。

1.5 逆转录-PCR 检测 GABA-A α 1 和 BDNF 基因表达

引物序列由上海基康生物工程有限公司合成, β 肌动蛋白上游引物: 5'-ACAGCTGAGAGG-GAAATCGT-3', 下游引物: 5'-TTCTCCAGGGAG-GAAAGAGG-3', 5'-PCR 产物长度为 107 bp。5'-GABA-A 受体 α 1 上游引物: 5'-ATGGCAAAAGCG-TGGTTCC-3', 下游引物: 5'-CTTTCGGTTCTATG-GTCGCA-3', PCR 产物长度为 158 bp。BDNF 上游引物: 5'-CGTGATCGAGGAGCTGTTGG-3', 下游引物: 5'-CTGCTTCAGTTGGCCTTTTCG-3', PCR 产物长度为 342 bp。采用 Trizol 一步法抽提海马总 RNA, 取 1 μ l RNA 样品加 99 μ l DEPC 处理的水中, 混匀, 采用紫外分光光度法测定 A₂₆₀, A₂₈₀。RNA 纯度以 A₂₆₀/A₂₈₀ 表示, 计算 RNA 浓度。逆转录反应、PCR 反应后进行电泳。获得凝胶图像以后, 采用 Gel-Pro Analyzer 3.1 专业凝胶图像分析软件测定产物条带 A 值, 并保证各指标软件测量参数一致, 以目的条带积分吸光度值(IA) 与内参的 IA 值之比表示基因表达水平。

1.6 Western 印迹法检测 GABA-A α 1 和 BDNF 蛋白表达

所取组织中加入含抑制剂的预冷的蛋白抽提试剂 200 μ l, 碾磨, 4℃ 轻轻摇动混合 20 min 进行裂解。4℃ 下 12 000 \times g 离心 15 min, 取上清, Bradford 法测定样本蛋白浓度, 2 \times SDS 上样缓冲液至 4 g·L⁻¹, 煮沸 5 min 蛋白变性后上样。12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分离蛋白质, 每个泳道蛋白上样量为 20 μ g, 转膜, 封闭, 抗体封闭, 电子成像。采用 ImageQuant TL 图像分析软件分析印迹条带积分吸光度, 并保证各指标软件测量参数一致。以目的条带积分吸光度值(IA) 与内参微管蛋白 IA 之比表示目标蛋白的相对表达水平。

1.7 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。若方差齐性, 则各组间差异用单因素方差分析(ANOVA), 组间两两比较用 LSD 法。若方差不齐, 则组间两两比较用 Tamhane 法。

2 结果

2.1 七氟烷和异氟烷急性暴露对 SD 幼大鼠水迷宫总潜伏期的影响

与正常对照组相比, 七氟烷组和异氟烷组的连

续 5d 总潜伏期均显著延长 ($P < 0.05$); 与七氟烷组或异氟烷组相比, 提前 0.5 h ip 给予荷包牡丹碱 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 或蝇蕈醇 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对潜伏期无显著改变(表 1)。

2.2 七氟烷和异氟烷急性暴露对 SD 幼大鼠海马 GABA-A $\alpha 1$ 表达的影响

图 1 的免疫组化结果显示, 正常对照组 GABA-A $\alpha 1$ 亚基 DAB 染色呈棕黄色, 细胞核苏木

素染色呈蓝色(图 1A); 和正常对照组相比, 七氟烷组(图 1B)与异氟烷组(图 1C), GABA-A $\alpha 1$ 亚基 DAB 染色无改变; 提前给予蝇蕈醇(图 1D, F) GABA-A $\alpha 1$ 亚基 DAB 染色无改变; 提前给予荷包牡丹碱(图 1E, G) GABA-A $\alpha 1$ 亚基 DAB 染色无改变。RT-PCR 结果(图 2)和 Western 印迹结果(图 3)显示, 与正常对照组相比, 各给药组 GABA-A $\alpha 1$ 亚基 mRNA 和蛋白表达无显著差异(数据未显示)。

Tab. 1 Effect of acute exposure to sevoflurane (Sev) and isoflurane (Iso) on latency of juvenile SD rats

Group	n	Latency/s				
		d1	d2	d3	d4	d5
Normal control	30	214 ± 97	136 ± 67	877 ± 38	95 ± 37	88 ± 30
Sev	24	374 ± 100*	343 ± 106*	260 ± 84*	288 ± 119*	200 ± 65*
Iso	25	386 ± 78*	317 ± 101*	316 ± 91*	288 ± 119*	184 ± 42*
Sev + Mus	25	317 ± 88*	254 ± 93*	267 ± 126*	194 ± 74*	100 ± 32*
Sev + Bic	25	383 ± 54*	314 ± 106*	260 ± 64*	215 ± 90*	128 ± 64*
Iso + Mus	25	335 ± 53*	254 ± 91*	206 ± 37*	146 ± 43*	129 ± 24*
Iso + Bic	26	350 ± 111*	262 ± 94*	278 ± 68*	201 ± 54*	134 ± 76*

Seven-day-old rats were ip administered muscimol (Mus) $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ or bicuculline (Bis) $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 0.5 h before 3.6% Sev or 2.3% Iso exposure. Rats were exposed to 3.6% Sev or 2.3% Iso for 6 h. Latency was determined by Morris water maze test on the 21st postnatal day. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, compared with normal control group.

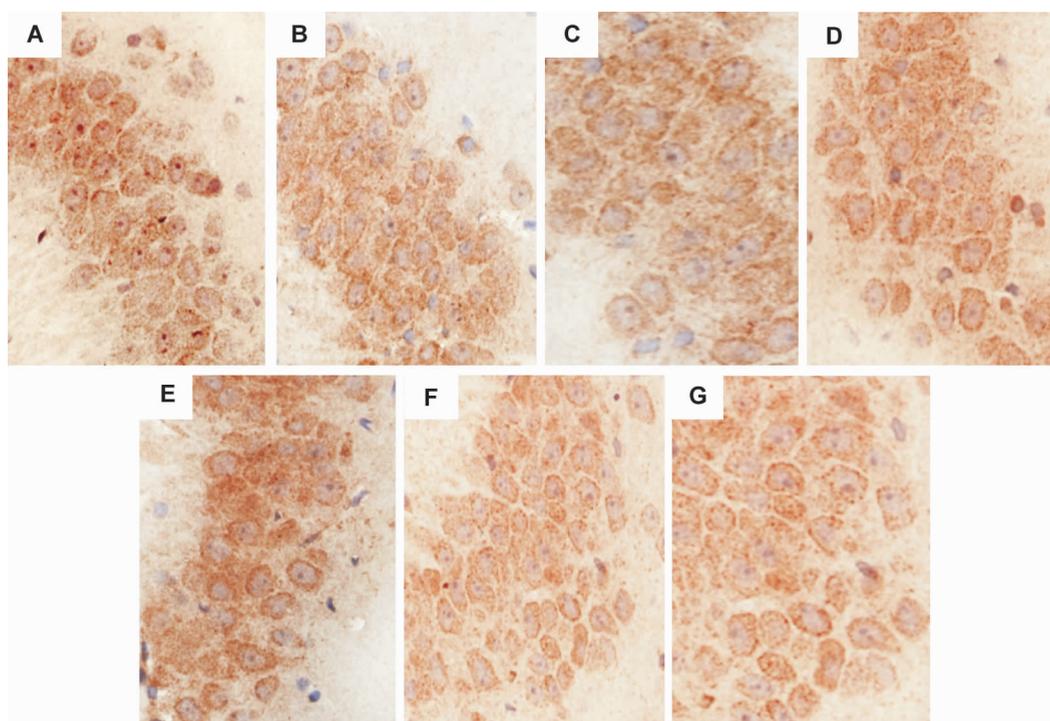


Fig. 1 Effect of acute exposure to Sev or Iso on GABA-A receptor $\alpha 1$ expression of CA3 hippocampus from post-natal rats of 21 days old (DAB staining $\times 400$). See Tab. 1 for the treatment. A: normal control group; B: Sev group; C: Iso group; D: Sev + Mus group; E: Sev + Bic group; F: Iso + Mus group; G: Iso + Bic group.

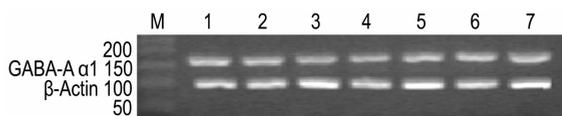


Fig. 2 Effect of acute exposure to Sev or Iso on GABA-A receptor $\alpha 1$ mRNA expression of hippocampus CA3 from postnatal rats of 21 days old by RT-PCR. See Tab. 1 for the treatment. Lane 1: Sev + Mus group; lane 2: Sev + Bic group; lane 3: Sev group; lane 4: normal control group; lane 5: Iso group; lane 6: Iso + Bic group; lane 7: Iso + Mus group. M: marker.

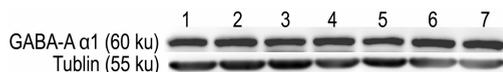


Fig. 3 Effect of acute exposure to Sev or Iso on GABA-A receptor $\alpha 1$ protein expression of CA3 on postnatal rats of 21 days old by Western blotting. See Tab. 1 for the treatment. Lane 1: normal control group; lane 2: Sev group; lane 3: Iso group; lane 4: Sev + Mus group; lane 5: Sev + Bic group; lane 6: Iso + Mus group; lane 7: Iso + Bic group.

2.3 七氟烷和异氟烷急性暴露对 SD 幼大鼠海马 BDNF 表达的影响

图 4 免疫组化结果显示,正常对照组 BDNF DAB 染色呈棕黄色,细胞核苏木素染色呈蓝色(图 4A),七氟烷组(图 4B)和异氟烷组(图 4C)与正常对照组相比,染色减轻,提前给予蝇蕈醇(图 4D,F)和七氟烷组相比,DAB 染色无改变;与异氟烷组相比,提前给予荷包牡丹碱(图 4E,G)组 DAB 染色无改变。其定量结果分析显示(图 4H),与正常对照组相比,七氟烷组和异氟烷组相对 A 值降低,差异有显著性($P < 0.05$),提前给予蝇蕈醇或荷包牡丹碱不影响 BDNF 的表达。RT-PCR 结果(图 5)和 Western 印迹结果(图 6)显示,与正常对照组相比,七氟烷组、异氟烷组 BDNF 的 mRNA 和蛋白表达量显著降低($P < 0.05$);与七氟烷组相比,七氟烷 + 荷包牡丹碱组、七氟烷 + 蝇蕈醇组 BDNF

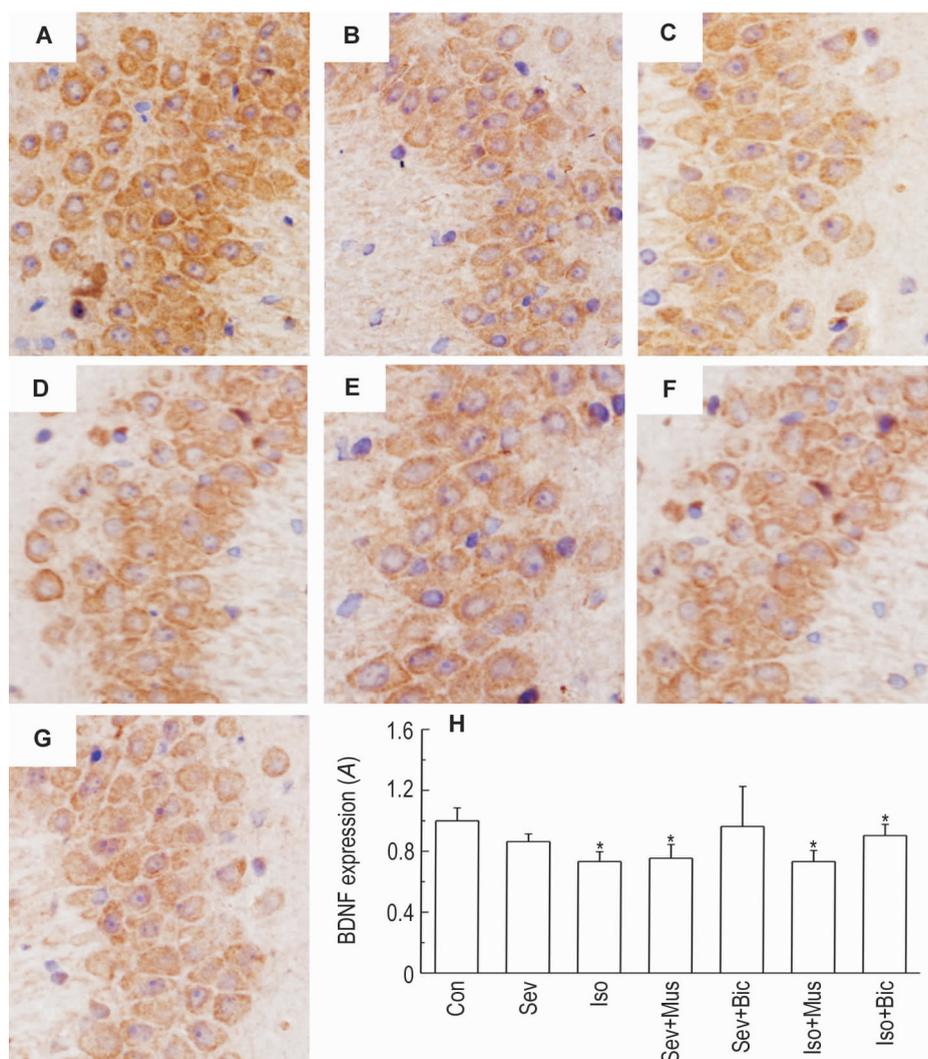


Fig. 4 Effect of acute exposure to Sev or Iso on BDNF expression of CA3 hippocampus from postnatal rats of 21 days old (DAB staining $\times 400$). See Tab. 1 for the treatment. A: normal control group; B: Sev group; C: Iso group; D: Sev + Mus group; E: Sev + Bic group; F: Iso + Mus group; G: Iso + Bic group. H was the semiquantitative results of A-G. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, compared with normal control group.

的 mRNA 和蛋白表达量无明显变化;与异氟烷组相比,异氟烷 + 蝇蕈醇组 BDNF 的 mRNA 和蛋白表达量无明显变化。

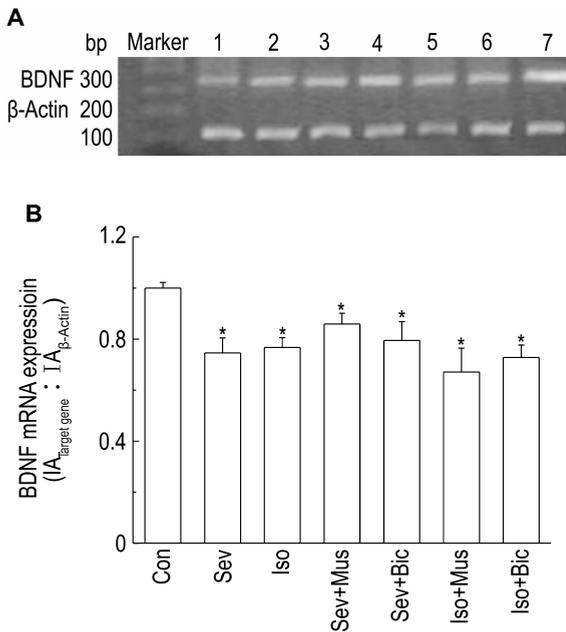


Fig. 5 Effect of acute exposure to Sev or Iso on BDNF mRNA expression of CA3 on postnatal rats of 21 days old by RT-PCR. See Tab. 1 for the treatment. Lane 1: Iso + Mus group; lane 2: Iso + Bic group; lane 3: Iso group; lane 4: normal control group; lane 5: Sev group; lane 6: Sev + Bic group; lane 7: Sev + Mus group. M: marker. B was the semiquantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. * $P < 0.05$, compared with normal control group.

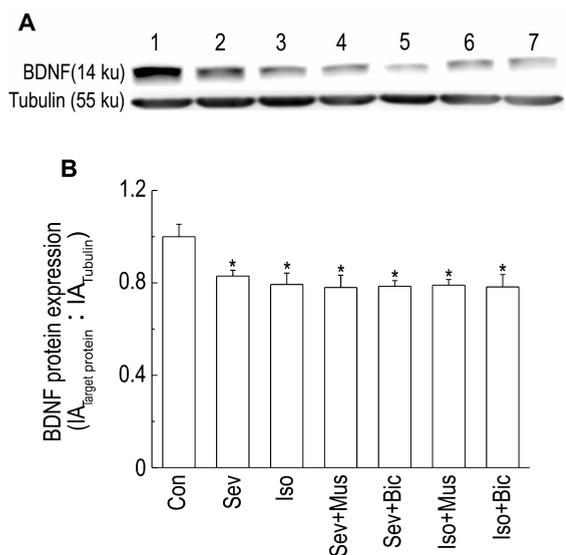


Fig. 6 Effect of acute exposure to Sev or Iso on BDNF protein expression of CA3 hippocampus from postnatal rats of 21 days old by Western blotting. See Tab. 1 for the treatment. Lane 1: Iso + Mus group; lane 2: Iso + Bic group; lane 3: Iso group; lane 4: normal control group; lane 5: Sev group; lane 6: Sev + Bic group; lane 7: Sev + Mus group. M: marker. B was the semiquantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. * $P < 0.05$, compared with normal control group.

3 讨论

本实验结果显示,七氟烷和异氟烷急性暴露后引起 SD 大鼠幼年期的学习记忆功能障碍,潜伏期显著延长。与 Li 等结果有差异,可能与吸入麻醉药暴露的浓度和动物的发育阶段差异有关,此实验中异氟烷的暴露浓度为 1.3%,暴露的发育阶段为孕 21 d。

本实验结果显示, GABA-A 受体拮抗剂荷包牡丹碱、激动剂蝇蕈醇不能显著改善七氟烷和异氟烷暴露急性暴露引起的 SD 大鼠幼年期学习记忆功能障碍,且挥发性麻醉药急性暴露不能改变 GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基的蛋白和 mRNA 水平,说明挥发性麻醉药的神经发育毒性可能不是通过 GABA-A 受体来调控的。GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基作为挥发性麻醉药的作用靶点,在挥发性麻醉药的神经发育毒性中不起介导作用,可能与新生 SD 大鼠 GABA-A 受体的表达量少有关。研究表明,新生大鼠 GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基表达量很少,而成年大鼠 GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基的表达量较多;此外,新皮质、小脑颗粒细胞、小脑星形神经元等结构中含有 GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基的表达量也是在出生后逐步增加的^[9]。

本实验发现,七氟烷和异氟烷急性暴露导致海马 CA3 区 BDNF 表达下调; GABA-A 受体的激动剂和拮抗剂并没有显著改变 BDNF 的表达。Jevtovic-Todorovic 等^[10]研究发现,异氟烷吸入能引起丘脑部位 BDNF 表达减少通过 TRK 依赖通路引起细胞凋亡;皮质部位 BDNF 表达增多通过 TRK 非依赖通路同样引起细胞凋亡。本实验还证明,七氟烷和异氟烷急性暴露引起海马部位 BDNF mRNA 和蛋白表达的改变。推测急性暴露后 SD 大鼠幼年期学习记忆障碍可能与挥发性麻醉药对 BDNF 的影响有关,但挥发性麻醉药对 BDNF 的影响不通过 GABA-A 受体介导,可能与新生大鼠 GABA-A 受体 $\alpha 1$ 亚基表达量少及 GABA-A 受体参与 BDNF 表达的调节具有时间阶段性有关。在胚胎神经元培养中 GABA 能促进 BDNF 分泌,当胚胎神经元培养 3 周后, GABA 对 BDNF 的分泌无影响^[11]。所以, GABA-A 受体可能并不是 BDNF 表达的主要调节因子。

总之,挥发性麻醉药急性暴露后引起 SD 大鼠幼年期的学习记忆障碍,可能与 BDNF 的表达改变有关, GABA-A 受体不参与神经发育毒性的介导。

参考文献:

[1] Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, *et al.* Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegenera-

- tion in the developing rat brain and persistent learning deficits[J]. *J Neurosci*, 2003, **23**(3):876-882.
- [2] Li Y, Liang G, Wang S, Meng Q, Wang Q, Wei H. Effects of fetal exposure to isoflurane on postnatal memory and learning in rats[J]. *Neuropharmacology*, 2007, **53**(8):942-950.
- [3] Yu ZP, Wang PF, Li C, Lin H, Kang DX, Di MQ, *et al.* Neurotoxicity effects of sevoflurane and isoflurane acute exposure on hippocampus of neonatal SD rats[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2011, **25**(1):72-76.
- [4] Haseneder R, Rammes G, Zieglgänsberger W, Kochs E, Hapfelmeier G. GABA (A) receptor activation and open-channel block by volatile anaesthetics; a new principle of receptor modulation? [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, **451**(1):43-50.
- [5] Koltchine VV, Finn SE, Jenkins A, Nikolaeva N, Lin A, Harrison NL. Agonist gating and isoflurane potentiation in the human gamma-aminobutyric acid type A receptor determined by the volume of a second transmembrane domain residue [J]. *Mol Pharmacol*, 1999, **56**(5):1087-1093.
- [6] Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, *et al.* Sites of alcohol and volatile anaesthetic ac-
- tion on GABA (A) and glycine receptors [J]. *Nature*, 1997, **389**(6649):385-389.
- [7] Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, *et al.* Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice[J]. *Anesthesiology*, 2009, **110**(3):628-637.
- [8] Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, Bouhemad B, Coriat P, Riou B. Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation[J]. *Anesthesiology*, 2001, **95**(3):734-739.
- [9] Mtchedlishvili Z, Sun CS, Harrison MB, Kapur J. Increased neurosteroid sensitivity of hippocampal GABA_A receptors during postnatal development[J]. *Neuroscience*, 2003, **118**(3):655-666.
- [10] Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain [J]. *Apoptosis*, 2006, **11**(9):1603-1615.
- [11] Berninger B, Marty S, Zafra F, da Penha Berzaghi M, Thoenen H, Lindholm D. GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation *in vitro* [J]. *Development*, 1995, **121**(8):2327-2335.

Effect of acute exposure to sevoflurane and isoflurane on learning, memory and brain derived neurotrophic factor expression in hippocampus of juvenile SD rats

YU Zi-pu², YOU Shan², XU Min², LIN Han^{1,3}, DI Mei-qin¹, LIAN Qing-quan^{1,2}

(1. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, 2. Institute of Environmental Toxicology, 3. Department of Environmental Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect and mechanism of acute neonatal exposure to sevoflurane and isoflurane on memory and learning of juvenile SD rats. **METHODS** Rats of postnatal day (PND) 7 were subjected to acute exposure to 3.6% sevoflurane or 2.3% isoflurane with mixture gas of air-oxygen for 6 h. Bicuculline 8 mg·kg⁻¹ or muscimol 1 mg·kg⁻¹ was ip administered 0.5 h pre-exposure. Morris water maze test was carried out for the rats that survived on PND 21 before hippocampus of rats was collected for determination of GABA-A receptor $\alpha 1$ and brain derived neurotrophic factor (BDNF) by immunohistochemistry assay, Western blotting and RT-PCR. **RESULTS** GABA-A receptor $\alpha 1$ subunit protein and mRNA expression of pup hippocampus showed no significant difference between the groups. Compared with normal control group, BDNF protein and mRNA levels significantly decreased by 13% and 25% in sevoflurane and isoflurane groups and by 23% and 21% in isoflurane group, respectively ($P < 0.05$). Compared with sevoflurane and isoflurane groups, there were no significant differences in BDNF protein and mRNA expression in bicuculline and muscimol groups. **CONCLUSION** Sevoflurane and isoflurane can significantly inhibit memory and learning in juvenile SD rats, which can be induced through BDNF rather than modulated by GABA-A receptor $\alpha 1$.

Key words: sevoflurane; isoflurane; learning disorder; receptors, GABA-A; brain derived neurotrophic factor

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(308003235); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y206467); Program of Science and Technology Bureau of Wenzhou(Y20080117)

Corresponding author: LIN Han, E-mail: nanlinhannansh@qq.com, Tel: (0577) 88002927; LIAN Qing-quan, E-mail: lianqingquan@yahoo.com, Tel: (0577) 88879169

(收稿日期: 2013-02-06 接受日期: 2013-03-13)

(本文编辑: 乔虹)