

丙泊酚对斑马鱼胚胎运动神经元发育的影响

曹建斌 朱敏淑 曹东航 王明仓 李军

【摘要】 目的 观察丙泊酚对斑马鱼胚胎运动神经元发育的影响。方法 根据培养液成分将特异性标记运动神经元的转基因斑马鱼胚胎随机分为 5 组,每组 30 个胚胎。A 组为 20 μ g/ml 丙泊酚处理组,B 组为 10 μ g/ml 丙泊酚处理组,C 组为 5 μ g/ml 丙泊酚处理组,D 组为加入 DMSO 溶剂的对照组,E 组为空白对照组。丙泊酚处理时间为胚胎受精后 8~52h(8~52 hpf),在 52 hpf 时用激光共聚焦显微镜观察斑马鱼胚胎运动神经元发育情况。结果 与 E 组比较,D 组斑马鱼胚胎无明显运动神经元发育改变,A、B 两组胚胎发育停滞在原肠胚时期;C 组胚胎整体形态发育正常,但运动神经元发育受到抑制($P<0.01$)。结论 丙泊酚暴露可抑制斑马鱼运动神经元的发育。

【关键词】 丙泊酚 斑马鱼 运动神经元

Effects of propofol on zebrafish embryonic motor neuron development CAO Jianbin, ZHU Minshu, CAO Donghang, et al. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of propofol on zebrafish embryonic motor neuron development. Methods The motor neuron reporter transgenic zebrafish embryos were randomized divided into five groups with 30 each. Group A: propofol 20 μ g/ml, Group B: propofol 10 μ g/ml, Group C: propofol 5 μ g/ml, Group D: DMSO control and Group E: blank control. Embryos were treated with propofol during 8~52 hpf (hours post-fertilization). Then confocal microscopy was used to observe the motor neuron development *in vivo*. Results Compared to group E, group D showed no significant motor neuron development defect, Group A and B showed significant embryogenesis defect as embryos stagnated in gastrulation stage. Group C showed obvious defects in motor neuron development yet with normal embryonic morphology. Conclusion Exposure to 5 μ g/ml propofol might inhibit the motor neuron development in zebrafish embryo.

【Key words】 Propofol Zebrafish Motor neuron

丙泊酚是一种广泛使用的麻醉药,它具有起效快、代谢迅速,使用后患者苏醒平稳、不良反应少等优点,常用于婴幼儿手术的麻醉。和其他常用的临床麻醉药一样,丙泊酚的早期多次接触会增加患儿术后多动症、语言障碍、注意力缺陷和行为异常等风险^[1-2];这些不良反应症状中,很多可能涉及到运动神经元功能的障碍。尽

管丙泊酚对运动神经元发育的影响尚未见报道,其潜在的风险并不能忽视。所以,有必要设计和开展严密的科学实验评估丙泊酚对运动神经元发育的影响,以便于指导临床医生对患儿合理使用麻醉药。斑马鱼是一种常见的模式脊椎动物,它具有体外受精、胚胎透明、易于遗传操作等特点,因此常被用来观察胚胎发育,包括运动神经元发育^[3]。斑马鱼的基因与人类的基因相似度很高,序列同源性高达 87%^[4],所以斑马鱼也常用于临床药物研发与评估^[5]。本研究利用标记运动神经元的 Tg(hlxb9:mGFP)转基因斑马鱼品系,在活体上观察丙泊酚对斑马鱼胚胎运动神经元发育的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 转基因斑马鱼为 Tg(hlxb9:mGFP)品系,由中国科学院神经科学研究所提供。按照 Kimmel 胚胎分

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.10.2018-2452

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2019RC088、2019KY776);浙江省公益技术应用研究(2017C37107);台州市科技计划项目(1702KY07)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院麻醉与围术期医学科(曹建斌、李军,曹建斌现在温州医科大学附属台州医院麻醉科工作);温州医科大学附属台州医院乳腺甲状腺外科(朱敏淑),麻醉科(曹东航、王明仓)

通信作者:李军,E-mail:lijun0068@163.com

类方法^[6]进行实验。将 Tg(hlx9:mGFP)品系斑马鱼饲养在循环水养殖系统中,饲养间保持在 14h:10h 的亮暗循环中。在实验前 1d 21:00 将发育成熟的转基因斑马鱼按雌雄 1:1 放入交配缸中(每缸共 2 条),并用挡板隔开。实验当日 11:00 拔去挡板,10min 后收集胚胎,并将胚胎放入 28.5℃恒温培养箱中培养。实验药物为丙泊酚(中国费森尤斯卡比公司),二甲基亚砜(DMSO)、MS-222(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 仪器 智能光照培养箱(多段编程 GXZ 型,中国宁波江南仪器厂),斑马鱼养殖系统(中国爱生公司),Nikon SMZ 1000 显微镜(日本尼康公司),FV-1000 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 分组与药物处理 当胚胎受精后 8h(hpf),在显微镜下确定胚胎处于相同发育阶段,选择健康的受精卵转入六孔板饲养,每孔放入 30 个胚胎并加入 4ml 鱼房系统水。胚胎分为 5 组,并进行相应的药物处理:A 组用 20μg/ml 丙泊酚处理组,B 组用 10μg/ml 丙泊酚处理组,C 组用 5μg/ml 丙泊酚处理组,D 组用 DMSO 溶剂处理作为对照,E 组不作任何处理(空白对照组)。各组药物处理时间从 8hpf 持续至 52hpf,结束后用系统水洗脱药物 3 次,然后从各组中随机取 12 个胚胎进行观察分析各组胚胎整体发育状况,取胚胎整体发育正常组的胚胎进行荧光共聚焦成像。

1.4 活体成像观察 将各组斑马鱼胚胎先予 0.03% MS-222 麻醉 3min,然后用 1.5%低熔点胶对各组斑马鱼胚胎进行侧躺固定包埋,以便拍照。待包埋胚胎的胶凝固冷却后,在胚胎上方滴上 1 滴系统水浸没胚胎,然后用激光共聚焦显微镜进行拍照,观察斑马鱼躯干泄殖孔前方 8 个体节区域运动神经元轴突生长情况,统计各组每条斑马鱼该节段未长出突起的运动神经元比例。按照斑马鱼运动神经元突起的缺失程度进行分类^[3],缺失比例>80%为重度缺失,缺失比例<20%为正常,其余为中度缺失。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism v6.0 统计软件。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用非配对双尾 *t* 检验;计数资料采用频率(百分率)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙泊酚对斑马鱼整体发育的影响 结果表明,A 组、B 组斑马鱼胚胎形态停滞在原肠胚时期,说明该浓度的丙泊酚有明显的胚胎毒性。发育正常的胚胎比例 C 组为(78.9±7.0)%,D 组为(84.4±5.1)%,E 组为(87.9±

7.0)%,C 组与 D 组、E 组发育正常的胚胎比例比较均无统计学差异(均 $P>0.05$),说明 5μg/ml 丙泊酚处理不会对斑马鱼的整体发育状况造成明显的影响,因此,本研究可用这一药物浓度处理的斑马鱼来评估丙泊酚对运动神经元发育的特异影响。

2.2 丙泊酚对运动神经元发育的影响 不同胚胎的运动神经元突起生长情况不尽相同,有的胚胎大多数运动神经元都长出突起,有的胚胎很少有运动神经元长出突起。运动神经元突起发育情况见图 1,与正常的运动神经元相比,部分神经元发育呈重度和中度缺失。对各组胚胎的运动神经元发育状况进行分析归纳,结果表明,5μg/ml 丙泊酚处理导致斑马鱼胚胎运动神经元发育畸形(重度缺失和中度缺失)的比例明显增加($P<0.01$,表 1),说明丙泊酚能够影响运动神经元发育。

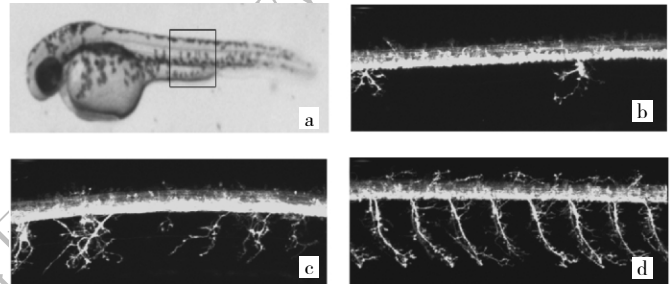


图 1 激光共聚焦显微镜运动神经元缺失程度图(a:方框所示为本实验工具所拍摄运动神经元节段;b:运动神经元发育重度缺失,×20;c:运动神经元发育中度缺失,×20;d:正常的运动神经元,×20)

表 1 各组斑马鱼胚胎运动神经元缺失程度比较[个(%)]

组别	<i>n</i>	严重缺失	中度缺失	正常
C 组	12	5(41.7)	3(25.0)	4(33.3)
D 组	12	1(8.3)	1(8.3)	10(83.4)
E 组	12	1(8.3)	0(0.0)	11(91.7)

3 讨论

临床回顾性研究发现,婴幼儿早期接受全身麻醉和镇静,可导致神经系统功能障碍,包括学习能力下降、认知功能减低等。丙泊酚是目前最常用的全身静脉麻醉药,具有起效快、苏醒迅速及苏醒平稳等优点,广泛应用于婴幼儿全麻诱导和维持^[7]。由于哺乳动物胚胎在子宫内发育,丙泊酚对活体胚胎期神经系统发育受到限制。斑马鱼因其胚胎体外受精及发育,通体透明、易于观察等特点,突破上述限制,已广泛应用于神经发育研究,成为研究胚胎期药物神经毒性的首选模式动物。

近来众多研究明确证实,丙泊酚可改变树突棘形态

和突触结构来影响神经系统的发育,从而导致运动、学习等功能障碍^[8-9],而对运动神经元生长发育的影响尚未见报道。研究发现,丙泊酚的神经毒性在啮齿类动物出生后 7~14d 最为敏感。而在神经干细胞的分化、迁移及增殖期间,丙泊酚是否能通过影响轴突的生长来影响神经元的发育尚未见报道,探讨这一问题具有重要意义。本研究表明,丙泊酚处理影响斑马鱼胚胎运动神经元发育,表现为运动神经元未分化细胞增多,轴突不能投射到相应的肌肉。在本研究中,斑马鱼胚胎暴露于 5 μ g/ml 的丙泊酚中,胚胎整体发育与 DMSO 组及空白对照组相比无统计学差异;5 μ g/ml 丙泊酚处理导致斑马鱼胚胎运动神经元发育畸形的比例明显增加($P<0.01$)。因此,5 μ g/ml 丙泊酚暴露对斑马鱼胚胎的整体发育影响与对照组相比无统计学差异,由于正常状况下也有少部分胚胎出现重度缺失和轻度缺失的情况,因此笔者推测丙泊酚的作用可能是延迟运动神经元突起的生长。

综上所述,斑马鱼胚胎早期暴露于丙泊酚会引起运动神经元发育的缺陷。这表明丙泊酚作为常用的婴幼儿临床手术麻醉药是存在影响婴幼儿神经系统发育风险的。但运动神经元的发育是一个复杂且精密的过程,丙泊酚影响运动神经元发育的机制还有待深入的探索。

4 参考文献

- [1] Sprung J, Flick RP, Katusic SK, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder after early exposure to procedures requiring general anesthesia[J]. Mayo Clinic proceedings, 2012, 87:120-129. DOI: 10.1016/j.mayocp.2011.11.008.
- [2] Ing C, DiMaggio C, Whitehouse A, et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia[J]. Pediatrics, 2012, 130:476-485, DOI:10.1542/peds.2011-3822.
- [3] Gong J, Wang X, Zhu C. Insm1a Regulates Motor Neuron Development in Zebrafish[J]. Frontiers in molecular neuroscience, 2017, 10:274. DOI:10.3389/fnmol.2017.00274.
- [4] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496:498-503. DOI:10.1038/nature12111.
- [5] Sprague J, Doerry E, Douglas S, et al. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research[J]. Nucleic acids research, 2001, 29:87-90.
- [6] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel S, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 1995, 203:253-310. DOI:10.1002/aja.1002030302.
- [7] Marsh B, White M, Morton N, et al. Pharmacokinetic model driven infusion of propofol in children[J]. Br J Anaesth, 1991, 67:41-48.
- [8] Creeley C, Dikranian K, Dissen G, et al. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain[J]. Br J Anaesth, 2013, 110(Suppl 1): 29-38. DOI:10.1093/bja/aet173.
- [9] Yu D, Jiang Y, Gao J, et al. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats[J]. Neuroscience letters, 2013, 534:41-46. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.033.
- (收稿日期:2018-09-28)
(本文编辑:严玮雯)
- (上接第 1009 页)
DOI:10.1155/2018/4217259.
- [14] Li T, Wang J, Liu P, et al. Insulin-like growth factor 2 axis supports the serum-independent growth of malignant rhabdoid tumor and is activated by microenvironment stress[J]. Oncotarget, 2017, 8(29):47269-47283. DOI:10.18632/oncotarget.17617.
- [15] Van Arsdale R, Arend RC, Cossio MJ, et al. Insulin-like growth factor 2: a poor prognostic biomarker linked to racial disparity in women with uterine carcinosarcoma[J]. Cancer Medicine, 2018, 7(3):616-625. DOI:10.1002/cam4.1335.
- [16] Liu YC, Park YR, Kim SL, et al. MicroRNA-30a Inhibits Colorectal Cancer Metastasis Through Down-Regulation of Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor[J]. Digestive Diseases & Sciences, 2017, 62(11):1-10. DOI:10.1007/s10620-017-4763-z.
- [17] 吴卓群, 马宏生, 吉亚楠. IGF-2 促进上皮性卵巢癌侵袭转移作用机制的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2017, 49(11):1297-1300. DOI: 10.16096/J.cnki.nmgxyzz.2017.49.11.007.
- [18] 张德芳. IGF-2 及 IGFBP-2 与结肠癌进展的相关性分析[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(8):74-76.
- [19] 马彦, 朱翠萍, 胡建军, 等. MiR-483-5p 通过上调 IGF-2 基因转录促进肝癌细胞生长、迁移与侵袭[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(4): 577-584. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2018.04.001.
- (收稿日期:2019-03-15)
(本文编辑:陈丹)