

· 实验研究 ·

七氟醚暴露致新生大鼠未成熟脑损伤的研究

刘光建 魏琼 李清 罗向红

【摘要】 目的 探讨七氟醚早期暴露对新生大鼠脑发育的影响。方法 选取新生 6 日龄 SD 大鼠 80 只,随机分为四组,每组 20 只,分别为空白对照组(C 组),1%七氟醚暴露 2 h 组(Sev1 组),2%七氟醚暴露 2 h 组(Sev2 组),4%七氟醚暴露 2 h 组(Sev3 组);七氟醚暴露组分别置于 1%、2%、4%七氟醚中每天暴露 2 h,连续 3 d;出生后第 9 天采用 0.5%戊巴比妥钠麻醉后处死新生大鼠取出脑组织;采用电子天平称检测各组大鼠在出生后 6、9、15、28 d 体重和脑重的变化;采用荧光定量 PCR 法(RT-PCR)检测 Cx30、IL-6 及 BDNF 基因 mRNA 表达量;采用免疫荧光法检测 GFP 蛋白含量;出生后 28 d Morris 水迷宫评价新生大鼠学习记忆能力。结果 与 C 组比较,Sev1、Sev2 和 Sev3 组新生大鼠体质量和脑质量均有所减轻,且随着日期延长这种减轻更为明显,Cx30 mRNA 和 BDNF mRNA 表达量明显降低,IL-6mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$),GFP 细胞数量明显减少($P < 0.05$);与 Sev1 组比较,Sev2 和 Sev3 组新生大鼠体质量和脑质量均明显减轻,GFP 数量明显减少($P < 0.05$);与 C 组比较,Sev1、Sev2 和 Sev3 组逃避潜伏期和游动距离均明显延长($P < 0.05$),目标象限停留时间明显缩短($P < 0.05$),穿越虚拟平台次数明显减少($P < 0.05$)。结论 新生大鼠接受七氟醚暴露可致未成熟脑损伤及远期学习记忆能力下降,且这种脑损伤程度与七氟醚浓度呈正相关;其机制可能与其脑内 Cx30、BDNF 基因表达水平改变有关。

【关键词】 七氟醚;未成熟脑;星型胶质细胞;新生大鼠;Morris 水迷宫

Effect and mechanism research of sevoflurane exposure on immature brain injury in neonatal rats

LIU Guangjian, WEI Qiong, LI Qing, LUO Xianghong. Department of Anesthesiology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Anesthesia Research Institute, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

Corresponding author: LUO Xianghong, Email: 95luoxianghong@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of sevoflurane exposure on immature brain injury in neonatal rats. **Methods** Eighty 6-day-SD neonatal rats were randomly divided into four groups, twenty rats in each group: blank control group (group C), 1% sevoflurane 2 h-exposure group (group sev1), and 2% sevoflurane 2 h-exposure group (group sev2), 4% sevoflurane 2 h-exposure group (group Sev3). Sevoflurane exposure group were placed in 1%, 2%, 4% sevoflurane exposure 2h daily for 3 days respectively. The neonatal rats were sacrificed after anesthesia with 0.5% pentobarbital sodium and brain tissues were removed until the 9th day after birth. The body weights and brain weights were measured on the 6th, 9th, 15th, and 28th day after birth. The expression of Cx30, IL-6 and BDNF mRNA were identified by fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). The expressions of GFP protein were detected by immunofluorescence. The ability of memorize and study in these rats were assessed using Morris water maze post-natal day 28. **Results** Compared with group C, the body weight and brain mass of the neonatal rats in groups Sev1, Sev2 and Sev3 were decreased, and the reduction was more pronounced with the extension of the date; the expression of Cx30 mRNA and BDNF mRNA was down-regulated, and the expression of IL-6 mRNA was up-regulated significantly ($P < 0.05$); the number of GFP⁺ cells was decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with group Sev1, body weight and brain mass of newborn rats in groups Sev2 and Sev3 also decreased, and the number of GFP⁺ cells was decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with group C, the time of escape latency of groups Sev1, Sev2 and Sev3 after trains was significantly longer ($P < 0.05$); the time in target quadrant were significantly shorter ($P < 0.05$); the number of times through virtual platform were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Exposure of sevoflurane could result in

DOI:10.12089/jca.2019.05.021

基金项目:十堰市太和医院院级项目(2017JXXM075)

作者单位:442000 湖北省十堰市太和医院麻醉科 湖北医药学院附属太和医院 湖北医药学院麻醉学研究所实验室

通信作者:罗向红,Email:95luoxianghong@163.com

immature brain development disorders and long-term learning and memory deficits, and the extent of brain damage is positively correlated to the concentration of sevoflurane; the mechanism may be related to the changes of intracerebral Cx30 and BDNF expression.

【Key words】 Sevoflurane; Immature brain; Astrocytes; Neonatal rat; Morris water maze

我国每年大约有 600 万儿童(其中新生儿约 150 万)接受手术,其中的绝大部分在全麻下进行^[1]。新生儿阶段是神经系统发育的敏感和高峰时期,此时若接受药物刺激可对脑的发育产生影响^[2]。七氟醚作为一种吸入麻醉剂,因其起效迅速、诱导时间短、苏醒快等诸多优点,被广泛应用于小儿外科临床麻醉^[3]。近年来研究发现,未成熟大脑早期接受七氟醚暴露后可导致海马区神经元和神经胶质细胞的凋亡。本研究拟通过不同七氟醚浓度暴露模型探讨七氟醚暴露对新生大鼠未成熟脑损伤的影响。

材料与方法

实验动物与分组 6 日龄 SPF 级 SD 大鼠 80 只,由湖北医药学院实验动物中心提供。将动物按照随机数字表法分为四组,即空白对照(C)组,1%七氟醚组(Sev1 组),2%七氟醚组(Sev2 组),4%七氟醚组(Sev3 组),每组 20 只。

七氟醚吸入模型 七氟醚麻醉在麻醉箱中进行,保持箱内温度在 25 ℃左右,湿度在 50%~60%;调节麻醉机氧气流量表和七氟醚蒸发罐,待七氟醚达到预定浓度后,将新生大鼠放置于麻醉箱中,并持续监测新生大鼠 SpO₂、HR 以及箱内 CO₂ 浓度。新生大鼠七氟醚暴露每天 2 h,连续暴露 3 d;C 组新生大鼠同样放置在麻醉箱中,持续输入不含七氟醚的相同流量的氧气(1 L/min)2 h,连续 3 d。七氟醚麻醉模型建立后各新生大鼠与母鼠同窝饲养。七氟醚暴露完毕后,即生后第 9 天将各组分别取出 10 只新生大鼠采用 0.5%戊巴比妥钠麻醉后处死,用于脑组织中 Cx30、IL-6、BDNF mRNA 和 GFP 蛋白含量的检测;其余剩下的各组新生大鼠饲养至生后 28 d 用于体重、脑重检测和 Morris 水迷宫实验。

体重和脑重测量 分别将新生大鼠按照相应天数(6、9、15、28 d)用电子天平称其体重和脑重的变化。

Cx30、IL-6、BDNF mRNA 表达检测 将脑组织采用组织匀浆机进行研磨,按 Trizol 法抽提取总 RNA,并测定 RNA 浓度和纯度,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增(表 1)。PCR 反应体系 10 μl:cDNA 1 μl,上下游引物各 0.25 μl,SYBR 溶液 4.5 μl,超纯水 4

μl。反应条件:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,39 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。测定目的基因、校对基因和 β-actin 的 PCR 产物的 Ct 值,Cx30、IL-6、BDNF 基因的相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

表 1 引物名称及序列

基因	位置	引物序列
Cx30	上游	5'-CATCCTGGTCACCTGTCTT-3'
	下游	5'-TGAGACTCAGCAGGTACGTC-3'
IL-6	上游	5'-TCAGGCTCAGAGCAGAGA-3'
	下游	5'-AGGCATTTACAAGGGGGTTC-3'
BDNF	上游	5'-TCCCTGGCTGACACTTTTGA-3'
	下游	5'-TTCCTCCAGCAGAAAGAGCA-3'
β-actin	上游	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'
	下游	5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'

GFP 蛋白含量检测 将动物采用 0.5%戊巴比妥钠麻醉后,4%多聚甲醛经左心室灌注固定后,迅速取出脑组织于 4%多聚甲醛固定 10~14 h,然后依次置入梯度蔗糖溶液(20%、30%)脱水,采用冰冻切片机制成 15 μm 冰冻切片。将冰冻切片水化,封闭,加一抗[鼠单抗 GFP(1:500)]4℃孵育过夜。次日,室温复温 2 h,加稀释的二抗 488 标记山羊抗鼠(1:200),37 ℃孵育 1 h,DAPI 室温孵育 15 min,封片,荧光显微镜下观察并拍照。

Morris 水迷宫实验 将各组出生 28 天大鼠行 Morris 水迷宫实验。选择大鼠通用型 Morris 水迷宫,包括圆形恒温水池,直径 110 cm,高 60 cm,水深 25 cm,水温控制在(22±2) ℃,在水池中加入牛奶,使水池中呈白色不透明状。并在圆形池壁上标记四个等距离点 N、E、S、W 作为实验的起始点,将水池分为四个象限,选第三象限在中央放置平台(平台与池壁圆心距离相等);平台黑色,直径 12 cm,高 23 cm,没于水下 2 cm,使平台不可见。水池周围贴有丰富的参照线索(如三角形、四方形、圆、菱形等几何图形置于各个象限)且保持不变,供大鼠用来定位平台。Morris 水迷宫实验内容包含定位航行实验和空间探索实验。

定位航行实验 将各组 SD 大鼠分别按顺时针

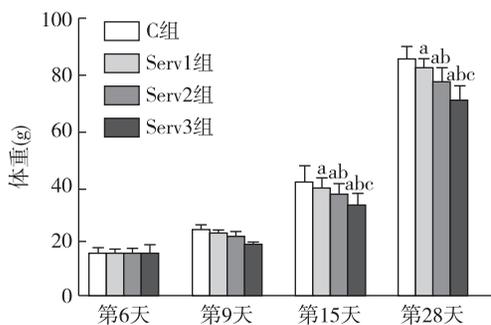
方向依次由第一、二、三、四象限入水点顺序放入圆形水池中。记录其在 2 min 内寻找平台所用的时间(逃避潜伏期)和其寻找平台所游动的距离。如果大鼠在 2 min 内找到平台,记录 2 min 内实际逃避潜伏期和游动距离;如果在 2 min 内未找到平台,由实验者将其引上平台并停留 20s,逃避潜伏期则记录为 2 min。每次将完成实验后的 SD 大鼠擦干,必要时将大鼠放在 150 W 的白炽灯下烤 5 min,放回笼内,防止其感冒影响实验数据。每只大鼠每天训练 4 次,两次训练之间间隔 15~20 min,所有实验大鼠连续训练 5 d。

空间探索实验 定位航行试验结束 24 h 后,撤除水池中的平台。继续将大鼠由不同象限放入水中,记录大鼠在 120 s 内的游泳路径,并记录大鼠在目标象限(第三象限)的停留时间和穿越目标象限的次数,观察受试大鼠的空间定位能力,及在空间探索过程中的变化规律(在电脑屏幕上用圆形环标记出站台原所在位置,便于记录穿越原平台所在位置的次数)。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。样本量计算根据公式 $df_e = k(n-1) \geq 12$, 正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;免疫荧光图片的光密度采用 IPP 6.0 软件分析;组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验;定位航行实验和空间探索实验数据使用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

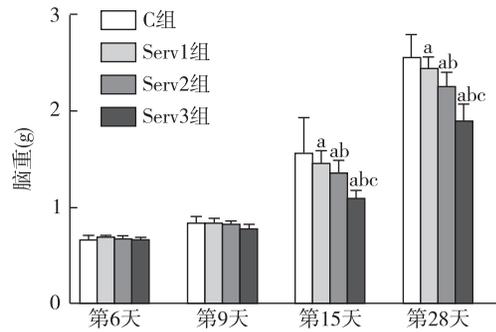
结 果

术后第 6 天、第 9 天时四组大鼠体重、脑重差异无统计学意义。术后第 15 天和第 28 天时 Sev1、Sev2 和 Sev3 组大鼠体重、脑重依次明显降低($P < 0.05$)(图 1—2)。



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Sev1 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sev2 组比较,^c $P < 0.05$

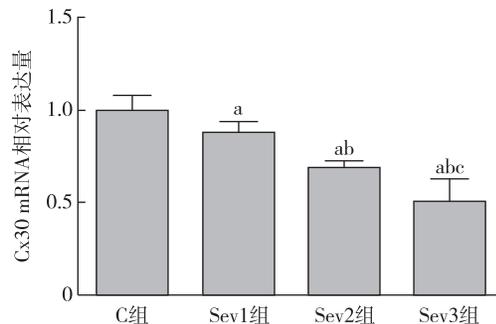
图 1 七氟醚暴露后四组大鼠出生后不同时间点体重的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Sev1 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sev2 组比较,^c $P < 0.05$

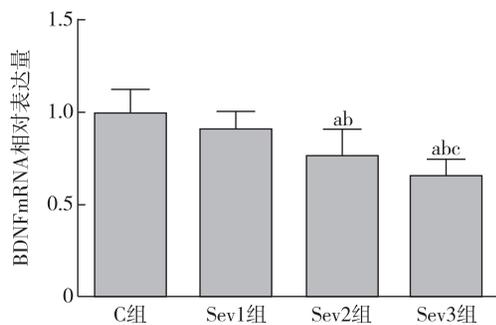
图 2 七氟醚暴露后四组大鼠出生后不同时间脑重的比较

与 C 组比较,Sev1、Sev2 及 Sev3 组 Cx30、BDNF mRNA 表达量明显降低($P < 0.05$),与 Sev2 组比较,Sev3 组 Cx30、BDNF mRNA 表达量明显降低($P < 0.05$);与 C 组比较,Sev1、Sev2 及 Sev3 组 IL-6 mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$);与 Sev1、Sev2 组比较,Sev3 组 IL-6 mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$)(图 3—5)。



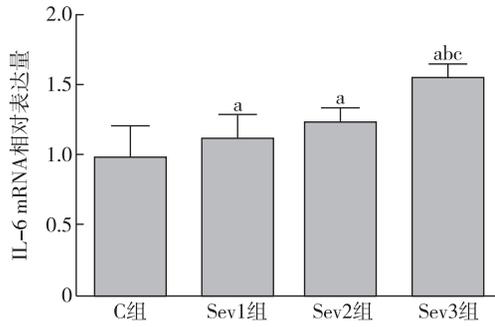
注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Sev1 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sev2 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 四组新生大鼠脑内 Cx30 mRNA 表达量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Sev1 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sev2 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 四组新生大鼠脑内 BDNF mRNA 表达量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Sev1 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sev2 组比较,^c $P < 0.05$

图 5 四组新生大鼠脑内 IL-6 mRNA 表达量的比较

与 C 组比较, Sev2、Sev3 组找到平台次数和在目标象限停留时间明显减少 ($P < 0.05$); 与 Sev1、Sev2 组比较, Sev3 组找到平台次数和在目标象限停留时间均明显减少 ($P < 0.05$) (表 2)。

与 C 组比较, Sev1、Sev2 及 Sev3 组 GFP⁺表达明显降低 ($P < 0.05$); 与 Sev1 组比较, Sev2 和 Sev3 组脑内 GFP⁺细胞数也明显降低 ($P < 0.05$) (图 6—7)。

表 2 四组大鼠七氟醚暴露后空间搜索能力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

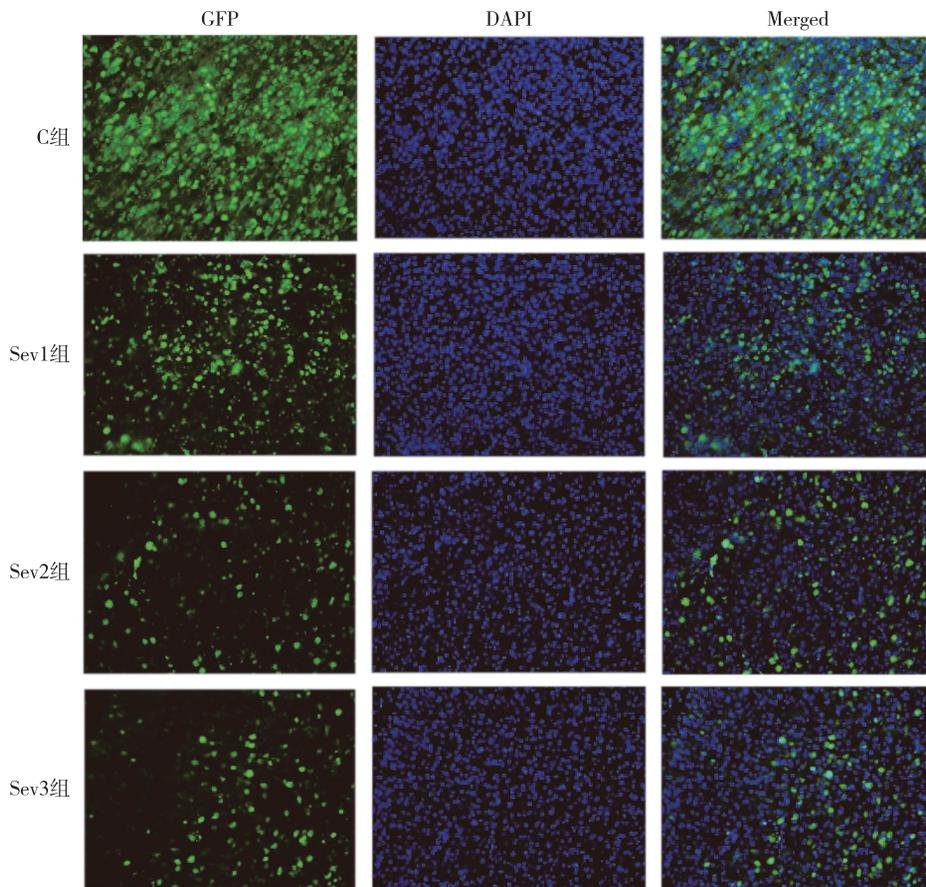
组别	只数	目标象限停留时间 (s)	找到平台次数 (次)
C 组	10	58.1 ± 4.8	13.6 ± 2.1
Sev1 组	10	49.4 ± 5.0	10.9 ± 1.8 ^a
Sev2 组	10	35.2 ± 3.6 ^{ab}	6.4 ± 1.2 ^{ab}
Sev3 组	10	28.6 ± 4.1 ^{abc}	3.8 ± 1.0 ^{abc}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 Sev1 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sev2 组比较,^c $P < 0.05$

与 C 组比较,从训练第 2 天开始, Sev1、Sev2、Sev3 组逃避潜伏期和游动距离均明显延长 ($P < 0.05$); 与 Sev1 组比较, Sev3 组大鼠逃避潜伏期和游动距离明显延长 ($P < 0.05$) (图 8—9)。

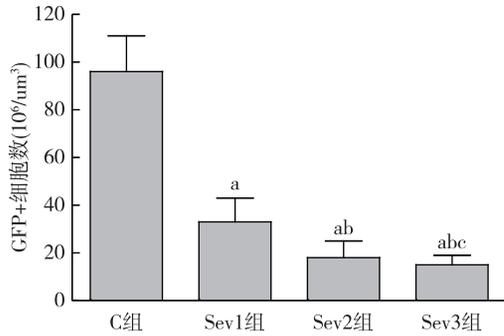
讨 论

脑发育过程中有一段突触大量生长的时期即大脑生长突增期,此时期大脑内的神经元增值、分



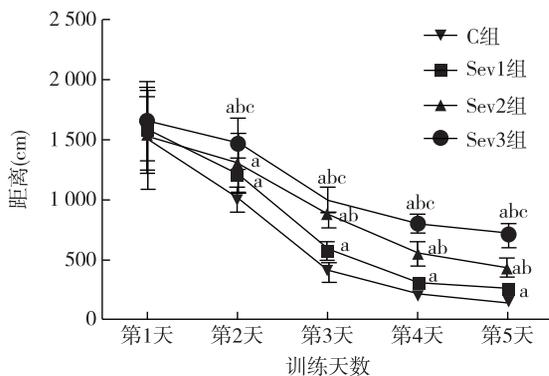
注:GFP(绿色荧光)显示星型胶质细胞,DAPI(蓝色荧光)显示细胞核

图 6 四组新生大鼠脑内 GFP 蛋白荧光含量的比较 ($n = 5, \times 200$ 倍, $50 \mu\text{m}$)



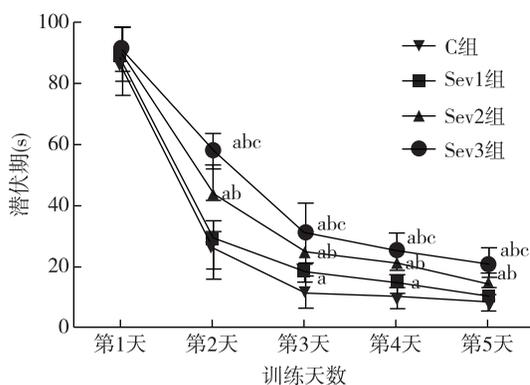
注:与 C 组比较,^a*P*<0.05;与 Sev1 组比较,^b*P*<0.05;与 Sev2 组比较,^c*P*<0.05

图 7 四组新生大鼠脑内 GFP⁺相对细胞数的比较



注:与 C 组比较,^a*P*<0.05;与 Sev1 组比较,^b*P*<0.05;与 Sev2 组比较,^c*P*<0.05

图 8 四组新生大鼠高氧暴露后定位航行能力中游泳距离的比较



注:与 C 组比较,^a*P*<0.05;与 Sev1 组比较,^b*P*<0.05;与 Sev2 组比较,^c*P*<0.05

图 9 四组新生大鼠高氧暴露后定位航行能力的逃避潜伏期的比较

的中枢神经系统(CNS)发育成熟分化的过程中,也是 CNS 的易感期,此时神经发育对内外环境的变化异常敏感^[4-5]。人类大脑快速发育阶段从怀孕第 3 个月晚期到产后第 3 年。出生后第 6 天是大鼠脑发育的高峰点,相当于人类胎儿期 31~35 周^[6]。因此,本课题为了研究七氟醚暴露对未成熟脑发育影响,选择 6 d 龄大鼠建立实验动物模型。本研究结果提示,七氟醚早期暴露后新生大鼠脑质量和体质量均明显减轻,而且七氟醚暴露浓度越高,脑重和体重减轻越明显;且随着新生大鼠的不断生长发育,这种对体质量和脑质量的影响愈发明显。脑重的减轻也从一个侧面反映出七氟醚对脑发育的影响。

星形胶质细胞(Astrocytes)是 CNS 中一种重要的神经胶质细胞,能够释放多种化学物质参与 CNS 发育过程,如转化生长因子 β(transforming growth factor-β, TGF-β)、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)及一些类固醇物质等^[7]。IL-6 是一种白细胞介素因子,可促进神经细胞(特别是免疫细胞)的增值、分化^[8]。七氟醚暴露后脑内炎症因子增多,小胶质细胞介导的免疫反应增强,间接促进 IL-6 因子大量表达。BDNF 是在脑内合成的一种蛋白质,其主要通过与神经突触受体结合介导神经元、星形胶质细胞的存活、分化、生长发育^[9]。本研究结果显示七氟醚暴露后新生大鼠脑内 IL-6 表达减少,BDNF 表达含量增加,提示脑内免疫细胞特别是星形胶质细胞大量激活,免疫反应异常增强,从而损害正常脑组织的发育。

缝隙连接蛋白(connexons, Cx)是星形胶质细胞膜上的一种重要的蛋白质,控制着多种物质的释放,如神经递质、G 蛋白以及 Ca²⁺,调节星形胶质细胞的功能^[10-11]。本研究结果显示,七氟醚暴露的浓度与 Cx30 基因之间存在负相关性,即随着七氟醚浓度增加,Cx30 基因编码受到明显抑制,导致星形胶质细胞数量显著减少。可能机制是七氟醚暴露致 Cx30 表达降低,细胞连接通道数量减少间接导致 Ca²⁺内流障碍,从而使星形胶质细胞分化增殖受到影响。

Morris 水迷宫是英国心理学家 Morris 于 1981 年设计并应用于脑学习记忆机制研究的一种实验方法,其是一种强迫实验动物(大鼠、小鼠)游泳,学习寻找隐藏在水中平台,主要用于检测实验动物对空间位置觉和方向觉(空间定位)的学习记忆能

化、迁移以及神经突触的发生、修饰、髓鞘的形成等都非常活跃,多种物质广泛并集中参与到极其复杂

力^[12-13]。较为经典的 Morris 水迷宫,主要的实验内容包括定位航行试验、空间探索试验。本实验研究中,通过对 P28 大鼠在前 5 d 进行游泳定位航行训练,使大鼠学会了找到固定位置隐蔽的平台以提高大鼠的空间学习能力;第 6 天撤去了隐藏在水池中的平台,检测大鼠在原平台位置所在第三象限的停留时间以检测大鼠的空间记忆能力。结果发现,七氟醚暴露后大鼠出现远期空间学习记忆障碍;随着七氟醚浓度的不断增加,大鼠在定位航行逃避时间、游行距离明显延长,空间搜索实验目标象限停留时间和穿越平台次数也显著减少;这提示着在相同条件下随着七氟醚浓度越高,大鼠远期空间学习记忆能力的损害也越严重。这表明了七氟醚导致新生大鼠学习记忆能力损害可能与脑中的星型胶质细胞减少导致髓鞘形成障碍有关,具体机制需要我们今后进一步研究证实。

综上所述,七氟醚会对新生大鼠的未成熟脑造成明显损伤,星型胶质细胞数量减少;七氟醚早期暴露也会对成年大鼠远期学习记忆能力造成损害;且在时间相同的条件下,七氟醚浓度与其脑损伤发生呈现正相关性。

参 考 文 献

- [1] 孙杰,王忠云,丁正年.七氟醚麻醉诱导在患儿全身麻醉中的应用.临床麻醉学杂志,2008,24(6):468-470.
- [2] Wilder RT, Flick RP, Sprung J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. *Anesthesiology*, 2009, 110(4):796-804.
- [3] Liang LQ, Jiao YQ, Guo SL. Effects of sevoflurane inhalation anesthesia on cognitive and immune function in elderly patients after abdominal operation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(24):8932-8938.
- [4] Kostović I, Sedmak G, Judaš M. Neural histology and neurogenesis of the human fetal and infant brain. *Neuroimage*, 2018, 10(18):32187-32196.
- [5] Krämer TJ, Sakas W, Jussen D, et al. Thrombin contributes to the injury development and neurological deficit after acute subdural hemorrhage in rats only in collaboration with additional blood-derived factors. *BMC Neurosci*, 2018, 19(1):81-87.
- [6] Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, et al. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*, 2007, 28(5):931-937.
- [7] Katiyar KS, Winter CC, Gordiún-Vélez WJ, et al. Three-dimensional tissue engineered aligned astrocyte networks to recapitulate developmental mechanisms and facilitate nervous system regeneration. *J Vis Exp*, 2018, 131:3791-3798.
- [8] Fominykh V, Vorobyeva A, Onufriev MV, et al. Interleukin-6, s-nitrosothiols, and neurodegeneration in different central nervous system demyelinating disorders: is there a relationship. *J Clin Neurol*, 2018, 14(3):327-332.
- [9] Fletcher JL, Murray SS, Xiao J. Brain-derived neurotrophic factor in central nervous system myelination: a new mechanism to promote myelin plasticity and repair. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12):1912-1916.
- [10] Hamzei-Sichani F, Kamasawa N, Janssen WG, et al. Gap junctions on hippocampal mossy fiber axons demonstrated by thin-section electron microscopy and freeze fracture replica immunogold labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(30):12548-12553.
- [11] Gosejacob D, Dublin P, Bedner P, et al. Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling. *Glia*, 2011, 59(3):511-519.
- [12] Millin PM, Rickert GM. Effect of a strawberry and spinach dietary supplement on spatial Learning in early and late middle-aged female rats. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 8(1):126-131.
- [13] Ahmadi M, Rajaei Z, Hadjzadeh MA, et al. Crocin improves spatial learning and memory deficits in the Morris water maze via attenuating cortical oxidative damage in diabetic rats. *Neurosci Lett*, 2017, 642:1-6.

(收稿日期:2018-07-19)