

·基础研究·

建立新生大鼠吸入麻醉模型及异氟醚对其海马凋亡的影响*

燕琳 桂伶俐[△] 张传汉 张玥 邹恒婧 李大佳 石小云

(华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:建立新生大鼠吸入麻醉模型并探讨吸入麻醉药异氟醚对其海马凋亡的影响。方法:Penlon Prima SP 麻醉机、异氟醚挥发罐及自制带进出气口的麻醉小室。共 55 只 7 日龄的 SD 大鼠用于实验。将其中 35 只大鼠随机分为 7 组(n=5)。实验组(1-7 组)异氟醚挥发罐刻度分别为 0.125%、0.25%、0.5%、1%、1.5%、2%。新生大鼠置于自制密封麻醉小室内,分别通入含上述异氟醚浓度的混合气体。对照组(第 8 组)给予未混合异氟醚的 30%的氧气。将小室安放于 37℃ 恒温箱内。调节气体流量 2L/min。实验组于通入气体 5、10、15、30、90、180、360 min(T1-T7)时于小室出口处抽取 10mL 气体,采用气相色谱法测定麻醉小室内异氟醚浓度。于通入气体 360 min(T7)自新生大鼠左心室采血行血气分析;另取 SD 大鼠 20 只,随机分为对照组(C 组,n=10)、1.5%异氟醚组(I 组,n=10),按上述方法建立异氟醚吸入麻醉模型。麻醉结束后 2h 处死大鼠,采用免疫组织化学法观察 C 组和 I 组大鼠大脑海马区 Active caspase-3 的表达。结果:①麻醉小室出口异氟醚浓度(Y)与麻醉机挥发罐异氟醚浓度(X)的直线回归方程为 $Y=1.5472X-0.0575(r=0.9993)$ 。②血气分析结果显示:1-7 组与 8 组血气分析组间差异无统计学意义($P>0.05$)。③免疫组化结果显示:与 C 组相比,I 组大鼠海马 Active caspase-3 明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:通过麻醉机、异氟醚挥发罐及自制密封带进出气口的麻醉小室成功建立了新生大鼠异氟醚麻醉模型;为进一步研究异氟醚及相关吸入麻醉药对突触发生期的神经毒性提供了实验基础。

关键词 异氟醚;大鼠;吸入麻醉

中图分类号:Q95-3 R614 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)24-4601-05

Establish a Model for Evaluating the Effects of Isoflurane on the Apoptosis in Hippocampal Cells of Neonatal Rats*

YAN Lin, GUI Ling-li[△], ZHANG Chuan-han, ZHANG Yue, ZOU Heng-jing, LI Da-jia, SHI Xiao-yun

(Department of Anesthesiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology,

Wuhan Hubei 430030, China)

ABSTRACT Objective: To establish a model of applying inhalation anesthesia for neonatal rats and evaluate the reliability of this model, then to investigate the apoptosis of isoflurane on the hippocampal cells of neonatal rats. **Methods:** Connected the anaesthesia machine equipped with a calibrated vaporizer of isoflurane, to the domestic air-tight chamber with an air-scoop and an air-out to form anesthesia pipeline. 55 seven-day-old male and female Sprague Dawley rats were used for the experiment. 35 SD rats were divided into seven randomly selected groups (n=5). According to the different concentrations of the isoflurane in the air stream, the mixture gas were divided into six groups as follows: (1)Experiment groups: 0.125% (group 1), 0.25% (group 2), 0.5% (group 3), 1% (group 4), 1.5% (group 5), 2% (group 6); (2) Control groups (group 7): air stream composed only of 70% nitrogen mixed 30% oxygen. The experimental rats were exposed to isoflurane in the air-tight chamber, which was placed inside a constant temperature incubator, setting up at 37℃. Isoflurane was continuously delivered into chamber through inlet with an air stream (70% nitrogen +30% oxygen) containing desired anesthetic concentration using a calibrated vaporizer (before each test, the mixture gas was flow through the chamber several minutes). The mixture gas samples in chamber of each experiment group were taken at 5min, 10min, 15min, 30min, 90min, 180min and 360min after isoflurane intervention. Isoflurane concentrations in the chamber were measure by gas chromatograph. The samples of both the experiment groups and the control group were taken at the end of anesthesia for blood gas analysis. The other 20 seven-day-old SD rats were divided into two randomly selected groups(n=10), control group and 1.5%isoflurane group, to establish the isoflurane inhalation model as above-mentioned, and using immunohistochemistry to detect the expression of Active caspase-3. **Results:** ①Whereafter the isoflurane concentrations in them became linearly dependedent, the linear dependence equation of them is $Y=1.5472X-0.0575(r=0.9993)$. ②The values of pH, PO₂, PCO₂, BE, HCO₃⁻ and SaO₂ between experiment groups and control groups had no significant difference at the end of anesthesia time point ($P>0.05$). ③Compared with C group, the Active caspase-3 immono-stain positive cells were significantly increased in the I group in the hippocampal areas ($P<0.05$). **Conclusion:** The model for evaluating the effects of isoflurane on neonatal

* 基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(200804871046);华中科技大学同济医学院院基金

作者简介:燕琳(1984-),女,硕士研究生,E-mail:yanlin1026@126.com

△通讯作者:桂伶俐,E-mail:gui_lingli@hotmail.com

(收稿日期:2012-02-09 接受日期:2012-03-04)

rats is successfully established using an anaesthesia apparatus, a calibrated vaporizer of isoflurane, a domestic air-tight chamber with an air-scoop and an air-out, which may provide experimental basis for further studies of inhalation anesthetics such as isoflurane on the triggering of synaptic neurotoxicity.

Key words: Isoflurane; Neonatal rats; Anesthesia; Inhalation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 ,R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)24-4601-05

前言

研究表明在新生动物脑发育高峰期使用全身麻醉药可引起神经细胞的凋亡,甚至导致这些动物成年后认知功能障碍^[1-4]。新生动物脑发育高峰期如大鼠主要是出生前 1、2 天至出生后 2 周^[5] 相当于人类出生前 3 个月到出生后 2 至 3 年,即妊娠晚期至婴幼儿时期。吸入麻醉药由于具有起效快、排出快、对循环和呼吸影响较小,可控性好,副作用较小,在妇产科以及儿科麻醉中应用广泛,但其对人类脑发育是否具有神经毒性尚存争议。因此建立合适的新生动物吸入麻醉模型对于研究新生儿或婴幼儿临床麻醉用药的安全性至关重要。吸入麻醉动物实验模型研究目前仅限于大鼠、小鼠、兔的成年动物^[6],对于新生动物的吸入麻醉模型还未见报道。异氟醚是临床常用的吸入麻醉药,因此本实验以异氟醚为代表拟通过麻醉机、异氟醚挥发罐及自制麻醉小室建立新生大鼠吸入麻醉模型,评价通过调节麻醉机挥发罐刻度来调整小室内异氟醚浓度的可靠性,并检测 1.5%异氟醚麻醉 6h 后新生大鼠海马 Active caspase-3 及 Caspase-3 mRNA 的表达,为进一步探讨异氟醚以及相关吸入麻醉药对新生大鼠脑发育的影响机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂、仪器及实验动物

异氟醚(批号 876115U,美国雅培制药有限公司)、多克隆兔抗活化 caspase-3 抗体(3015-100, Biovision 公司,美国)、免疫组化 SABC 试剂盒(武汉博士德公司)、Penlon Prima SP 麻醉机(英国)、Agilent 6890N 气相色谱仪(Agilent 公司,美国)、HP-5 色谱柱(Agilent 公司,美国)、1 μL 专用气体进样器、10 mL、20 mL 玻璃注射器、锥形瓶(精密称量容积为 3.16 L)、医用塑料三通、真空硅脂(批号 7501, 济南鑫亿佳化工有限公司)、i-STAT 血气分析仪(美国)、低温恒冷冻切片机(Leica CM 1900, 德国)、生物显微镜(NIKON TE2000, 日本)、Image-proplus 6.0 图像分析软件。7 日龄新生 SD 大鼠 55 只,雌雄不拘,体重 13.5-16.8g,由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。

1.2 麻醉方法

使用 Penlon Prima SP 麻醉机,连接氧源,在麻醉机输出口接一导管与麻醉小室的进气口相连,麻醉小室的出口处连一细管与外界通风处相通,形成麻醉管路。自制密封麻醉小室置于 37 度恒温箱,麻醉小室为长方形聚乙烯材质,大小为 10 cm × 8 cm × 8 cm。打开气体开关,调整气体流量为 2 L/min。气体比例 O₂:N₂=3:7。预充气体,排空麻醉输送管道及麻醉小室内的残留气体,为样品注入做准备。将 35 只 7 日龄新生大鼠随机分为 7 组(n=5)。将 35 只 7 日龄 SD 大鼠随机分为 7 组(n=5)。- 组异氟醚挥发罐刻度分别为 0.125%、0.25%、0.5%、1%、1.5%、

2%,按上述数值调整麻醉机上异氟醚挥发罐的刻度,并将麻醉机输出口流出的气体分别通入麻醉小室,维持麻醉 6 h。组新生大鼠置于相同温度条件下,给予未混合异氟醚的 30%的氧气。麻醉后均仔细观察新生大鼠皮肤黏膜颜色变化,有无缺氧、CO₂ 潴留等表现。实验中每隔 30 min 采用针刺、尾钳等方法检测新生大鼠麻醉深度,每次检测时间不超过 15 秒。

1.3 异氟醚标准气体的制备和测定条件

标准气样的配制:选用配备锡箔纸包裹的橡胶塞的锥形瓶,采用蒸馏水充满称重法测量盖紧橡胶塞后的内部容量为 3.16 L。金属针头上接医用塑料三通后扎入橡胶塞中,将烧瓶抽成负压后注入精密称重的液态异氟醚,与大气压平衡,配成标准气样。标准气样的浓度按照理想气体状态方程计算^[7]:异氟醚浓度(%)=液态异氟醚剂量(g)×22.4×(273+室温)÷273÷184.5÷容器容积(L)×100%。参照本实验室向强^[8]等人实验条件及方法,采用 Agilent 6890N 气相色谱仪,配带火焰离子化检测器(FID),HP-5 色谱柱进行测定。测定条件:柱温 70 °C,检测室温度 250 °C,进样口气化温度 100 °C,氮气流速 1.2 mL/min,氢气流速 40 mL/min,空气流速 450 mL/min,使用 1 μL 气体专用微量进样器加样,用随机携带的 Agilent chemstation 色谱数据分析软件自动计算出峰时间和异氟醚峰面积。

参照文献将上述标准气样采用倍比稀释的方法,制成含 0.125%、0.25%、0.5%、1%、1.5%、2%异氟醚的标准气体,每一样本均采用气相色谱仪注射测定其峰面积^[7,8]。以系列倍比稀释气体的浓度为 X 轴,其对应的峰面积为 Y 轴,绘制异氟醚标准气体-峰面积标准曲线,做直线回归,求出线性回归方程,保证相关系数 r>0.995,并以此线性回归方程作为当日的峰面积与异氟醚麻醉药浓度间的换算,减少因为实验环境条件的不同导致的实验误差。

1.4 测量实验组异氟醚浓度

- 组分别在通入气体 5、10、15、30、90、180、360 min 时点(T1-7)于麻醉小室出口处抽取 10 ml 混合气体,采用气相色谱法测定异氟醚浓度。将 10 mL 气密性良好的玻璃注射器用真空硅脂封闭针栓和针筒间隙,侧端用肝素帽封闭,头端接医用塑料三通在麻醉小室出口处按照所设定的时间点各抽取混合异氟醚气体 10 ml,并做好标记。采样后,立即在前述气相色谱条件下测定注射器气相中的异氟醚浓度。

1.5 新生大鼠采血及血气分析

各组新生大鼠分别于 T7 时刻抽取左心室血 100 μL。具体操作步骤参照金玮等人^[9]的方法并作改良:固定新生大鼠,充分暴露胸部,以一次性头皮针接 5 mL 注射器,事先用 10 U/mL 的肝素钠生理盐水冲洗,排尽空气,选择剑突下 30 度角进针向上刺入皮下。针尖穿过横膈膜继续斜行刺入,边进针边回抽针管,当针头正确刺入心脏时,可见血液借心脏跳动的力量进入注射

器。大约采 100 μL 血后缓慢拔出针头,用消毒棉签按压心脏搏动处 1 min。立即将采好的血放入雅培血气分析仪中检测 pH、PO₂、PCO₂、BE、HCO₃⁻ 和 SaO₂。

1.6 免疫组化检测各组 Active caspase-3 的表达

参照上述方法建立新生大鼠吸入麻醉药异氟醚麻醉模型。麻醉结束后 2 小时,将 C 组和 I 组大鼠经 10%水合氯醛 (300 mL/g) 麻醉,快速开胸,暴露肝脏,用一次性头皮静脉针经左心室插管至升主动脉,先用 0.9%生理盐水快速灌注,待右心耳流出液变成淡红色,肝脏颜色发白时改用 4%多聚甲醛先快后慢灌注固定 20 min 后完整取脑,在上述多聚甲醛液中 4℃后固定 4-12 h 后,转入 30%蔗糖液中 4℃过夜至下沉,从视交叉处连续做冠状位冰冻切片,片厚 15 μm。按照 SABC 免疫组织化学法检测大鼠海马 Active caspase-3 的表达,专用一抗稀释液稀释一抗 (1:50),以胞浆棕黄色染色为阳性信号。

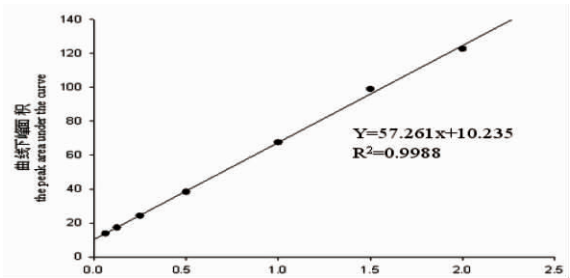


图 1 异氟醚标准浓度曲线图
Fig.1 Standard concentration curve of isoflurane

2.2 动脉血气分析

在整个实验过程中,所有新生大鼠呼吸平稳,实验组新生大鼠皮肤黏膜颜色与对照组新生大鼠相同,均呈粉红色。实验中轻微针刺、尾钳刺激新生大鼠无反应,较重时有缩爪反应。T7 时点各种不同异氟醚浓度下新生大鼠左心室血气分析,实验组与对照组 pH、PO₂、PCO₂、BE 和 HCO₃⁻、SaO₂ 组间差异无统计学

1.7 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件进行处理,计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,重复测量资料采用重复测量方差分析,组间比较采用单因素方差分析 ($P < 0.05$)。麻醉小室内异氟醚浓度 (Y) 与麻醉机异氟醚挥发罐异氟醚浓度设定值 (X) 行直线回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 麻醉小室出口处异氟醚浓度与设定值的相关关系

本实验中异氟醚峰面积 (Y) 和异氟醚标准气浓度 (X) 呈正相关,直线回归方程 $Y=57.261X+10.235$ ($r=0.9988$, $P < 0.05$) (见图 1)。麻醉小室内异氟醚浓度 (Y) 与麻醉挥发罐异氟醚浓度设定值 (X) 的直线回归方程为 $Y=1.5472X-0.0575$ ($r=0.9993$) (见图 2)。

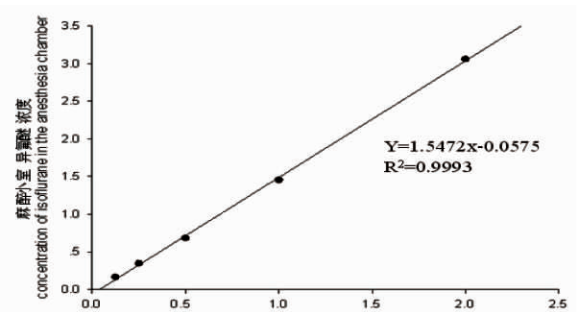


图 2 麻醉小室内达平衡后异氟醚浓度
Fig.2 Anesthesia chamber of equilibrium of isoflurane

意义 (见表 1)。实验结束后,新生大鼠均能从麻醉状态中恢复,高浓度组新生大鼠恢复较慢,但与低浓度组及对照组相比无明显差异。麻醉恢复后,实验组新生大鼠均能正常觅食。

2.3 1.5%异氟醚对新生大鼠海马 Active caspase-3 表达的影响

与正常对照组相比,1.5% isoflurane 麻醉 6h Active caspase-3 表达增多,阳性细胞着色加深。如图 3-A、B。

表 1 各组大鼠肺组织 leptin、IL-8 的表达

Table 1 Expression of leptin and IL-8 in the lungs of rats

Analysis of blood gas	Control group	Experiment group
pH	7.48± 0.05	7.49± 0.03*
PaO ₂ (mmHg)	118± 10	95± 11*
PaCO ₂ (mmHg)	32± 6	29± 4*
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	23± 4.0	22± 2.2*
BE	0.5± 3.0	1.05± 2.7*
SaO ₂ (%)	99± 1.0	97± 1.2*

注:与对照组比较,* $P > 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P > 0.05$.

3 讨论

吸入麻醉药由于其可控性好,对呼吸和循环影响较小,副作用少等优点在产科及儿科麻醉中应用广泛。但是近年来的一些研究表明在新生动物如新生大鼠脑发育高峰期,使用吸入麻醉药如异氟醚、七氟醚等可能会导致神经毒性,表现为中枢神

经系统组织病理学的改变,如神经细胞凋亡增多、抑制轴突生长发育、髓鞘反应等,及成年后的行为学变化,如学习记忆能力减退、认知功能障碍等^[10-12]。目前研究发现大鼠的突触发生期与人类胚胎期最后 3 个月至出生后 1 个月的脑发育期大致相当^[13]。这些现象引起了人们对吸入麻醉药是否可以安全应用于新生儿或婴幼儿麻醉的广泛关注。而目前关于吸入麻醉药新生

动物模型的可靠性还有待考量 因此建立合理有效的的新生动物吸入麻醉模型对于指导新生儿或婴幼儿临床麻醉用药的安全性迫在眉睫。

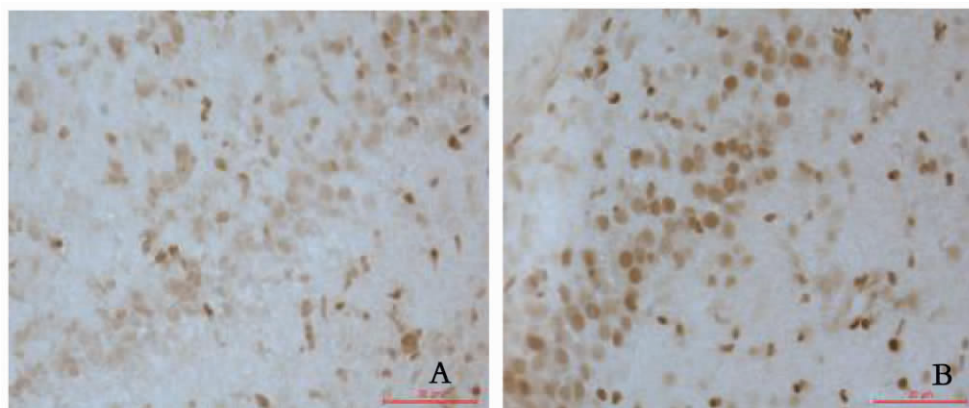


图 3 异氟醚对新生大鼠海马 Active caspase-3 表达的影响($\times 400$) A 对照组 B 1.5%异氟醚组

Fig.3 The effect of isoflurane on the expression of active caspase-3 on the hippocampal of neural rats: A control group; B 1.5% isoflurane group

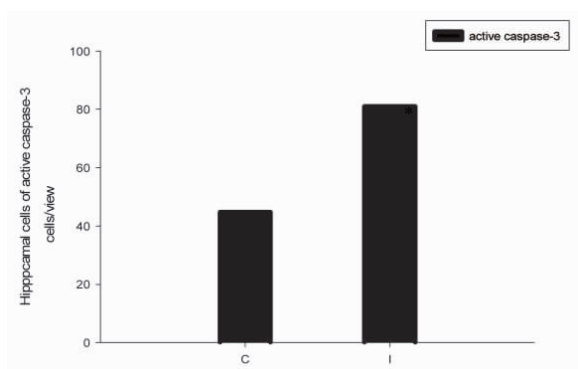


图 4 两组大鼠免疫组织化学检测结果(n=10)

Fig.4 Result of immunohistochemistry of the two groups(n=10)

$P < 0.05$ vs C group

异氟醚是临床常用的吸入麻醉药,在我国小儿麻醉用药中占据重要地位。其分子式为 $\text{CF}_3 \cdot \text{CHCl} \cdot \text{O} \cdot \text{CHF}_2$, 相对分子质量为 184.5, 37℃时其血 / 气分配系数为 1.4, 油 / 气分配系数是 94^[14]。异氟醚较少引起颅内压增高,在体内代谢产物较少,因此本实验以异氟醚为代表来研究吸入麻醉药对新生大鼠大脑的影响。由于异氟醚在一个标准大气压下的沸点是 48.5℃,在液体状态下极易挥发,因此本实验采用直接经麻醉机和异氟醚挥发罐将液态异氟醚转化成气态,经过自制的气体输送管道送入麻醉小室,通过新生大鼠的自主呼吸维持麻醉来模拟新生儿临床麻醉,方法简便,可控性好。

有报道 7-9 天大鼠的异氟醚 MAC 为 2.34%^[15],本实验选择异氟醚浓度均在亚临床或临床相关浓度范围内。研究发现出生后第 7 天是大鼠的脑发育最高峰期,在人类则大致相当胚胎期最后 3 个月至出生后 1 个月,因此本实验选择 7 日龄的新生 SD 大鼠作为实验对象^[13]。实验过程中观察新生大鼠皮肤黏膜颜色正常,呼吸平稳。血气分析结果显示,实验组与对照组动物相比,无明显的缺氧、 CO_2 蓄积等,这与 Jevtovic TV 实验结果一致^[2,16,17]。

由于整个异氟醚输送管道严格保证密封性,同时从麻醉开

始起持续通入新鲜气流,故可认为在麻醉小室出口处异氟醚浓度相当于麻醉小室内的浓度。因此本研究选择在麻醉小室出口处取样,操作简便且检测结果稳定。本研究结果表明,在通气 15 min 后麻醉小室内充满异氟醚气体。小室内异氟醚浓度(Y)与麻醉机挥发罐异氟醚浓度(X)的直线回归方程为 $Y = 1.5472X - 0.0575$ ($r = 0.9993$)。故认为通过调整异氟醚挥发罐刻度可准确得到麻醉小室内所需浓度,很好地满足实验要求。

目前普遍认为 caspase 家族与细胞凋亡关系密切,而 Active caspase-3 被认为是触发凋亡的核心酶,在细胞凋亡早期即可检测到其变化^[18,19]。因此本实验选择麻醉结束 2 小时观察 Active caspase-3 在两组大鼠海马区的表达变化。研究发现 1.5% isoflurane 麻醉 6h 新生大鼠海马 Active caspase-3 表达明显升高,提示异氟醚可能导致神经毒性,这与^[2,10,20]的报道相一致,因此本实验构建的新生大鼠麻醉模型可以很好模拟临床上新生儿及婴幼儿吸入麻醉,为今后更好的探讨异氟醚及相关吸入麻醉药在新生儿或婴幼儿使用安全性研究方面建立了可靠的动物模型。

参考文献(References)

- [1] Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain [J]. Science, 1999, 283: 70-74
- [2] Jevtovic TV, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits [J]. J Neurosci, 2003, 23: 876-882
- [3] Loepeke AW, Soriano SG. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function [J]. Anesth Analg, 2008, 106(6): 1681-1707
- [4] Lunardi N, Ori C, Erisir A, et al. General anesthesia causes long-lasting disturbances in the ultrastructural properties of developing synapses in young rats[J]. Neurotox Res, 2010, 17(2): 179-188
- [5] Mellon RD, Simone AE, Rappaport BA. Use of anesthetic agents in neonates and children[J]. Anesth Analg, 2007, 104(3): 509-520

- [6] 罗南富, 贾梦醒, 周建新, 等. 应用小动物呼吸机实施吸入麻醉的体外模式[J]. 四川大学学报(医学版), 2005, 36(5): 727-729
Luo Nan-fu, Jia Meng-xing, Zhou Jian-xin, et al. The in vitro Model of Inhalation Anesthesia Using Rodent Ventilator [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Edi), 2005, 36(5): 727-729 (In Chinese)
- [7] 叶其泉, 刘进, 刘明政, 等. 二步法配制吸入麻醉药高压标准气[J]. 中华麻醉学杂志, 1999, 19(10): 636
Ye Qi-quan, Liu Jin, Liu Ming-zheng, et al. Two-step preparation of high-pressure standard gas inhalation anesthetics [J]. Chin J Anesthesiol, 1999, 19(10): 636 (In Chinese)
- [8] 向强, 陈映红, 陈昱, 等. 细胞实验时异氟醚鼓泡给药法的可靠性[J]. 中华麻醉学杂志, 2008, 28(12): 1074-1077
Xiang Qiang, Chen Ying-hong, Chen Gang, et al. Reliability of bubbling method for isoflurane delivery during cell experiment[J]. Chin J Anesthesiol, 2008, 28(12): 1074-1077(In Chinese)
- [9] 金玮, 金化民, 盛晖, 等. 剑突下入路的大鼠心脏穿刺采血法 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(12) :1589
Jin Wei, Jin Hua-min, Sheng Hui, et al. Cardiac puncture in the mouse through the xiphoid[J]. Chin J Exp Surg, 2005, 22(12): 1589 (In Chinese)
- [10] Wang S, Peretich K, Zhao Y. Anesthesia-induced neurodegeneration in fetal rat brains[J]. Pediatr Res, 2009, 66(4): 435-440
- [11] Sanchez V, Feinstein SD, Lunardi N, et al. General Anesthesia Causes Long-term Impairment of Mitochondrial Morphogenesis and Synaptic Transmission in Developing Rat[J]. Brain. Anesthesiology, 2011, 115 (5): 992-1002
- [12] Liang G, Ward C, Peng J, et al. Isoflurane causes greater neurodegeneration than an equivalent exposure of sevoflurane in the developing brain of neonatal mice[J]. Anesthesiology, 2010, 112(6): 1325-1334
- [13] Anand KJ, Scalzo FM. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior [J]. Biol Neonat, 2000, 77(2): 69-82
- [14] 徐启明, 郭曲练, 姚尚龙, 等. 临床麻醉学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 69
Xu Qi-ming, Guo Qu-lian, Yao Shang-long, et al. Clinical Anesthesiology[M]. Beijing, People's Health Publishing House, 2000: 69
- [15] Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, et al. Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation[J]. Anesthesiology, 2001, 95(3): 734-739
- [16] Young C, Jevtovic TV, Qin YQ, et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain[J]. Br J Pharmacol, 2005, 146(2): 189-197
- [17] Johnson SA, Young C, Olney JW. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2008, 20(1): 21-28
- [18] Troy CM, Salvesen GS. Caspases on the brain [J]. J Neurosci Res, 2002, 69(2): 145-150
- [19] Yon JH, Daniel JJ, Carter LB, et al. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways[J]. Neuroscience, 2005, 135(3): 815-827
- [20] Loepke AW, Istaphanous GK, McAuliffe JJ, et al. The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory[J]. Anesth Analg, 2009, 108(1): 90-104