doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.08.008

异氟醚麻醉通过导致神经干细胞的丢失降低幼鼠的神经发生和认知发育的实验研究 *

李星辉 [1] 胡明利 [2] 张碧凤 [1] 刘 旺 [1] 杨 波 [3△]

（贵州中医药大学第二附属医院 1 麻醉科；2 肝胆科；3 疼痛科 贵州 贵阳 550000）

摘要 目的：探讨异氟醚麻醉通过导致神经干细胞的丢失降低幼鼠的神经发生和认知发育。**方法：**SPF 级雄性 Sprague Dawley(SD) 幼年大鼠(30 只)平分为两组 - 对照组与异氟醚组，对照组吸入 30 %氧气，异氟醚组吸入 1.5 最低肺泡有效浓度(minimum alveolar concentration，MAC)异氟烷，检测两组神经干细胞丢失降低与幼鼠的神经发生、认知发育情况。**结果：**两组建模后 6 h 的逃避潜伏期、Longa 评分对比差异无统计学意义(P>0.05)，异氟醚组建模后 12 h、24 h 的逃避潜伏期、Longa 评分高于对照组(P<0.05)。两组建模后 6 h、12 h、24 h 的下肢动脉血氧饱和度在组内与组间对比差异都无统计学意义(P>0.05)。异氟醚组建模后 14 d 的海马组织葡萄糖调节蛋白 8(GRP8)、糖原合成酶激酶 -3β(GSK-3β)蛋白相对表达水平都低于对照组(P<0.05)。**结论：**异氟醚麻醉可通过导致神经干细胞的丢失，抑制血清 GRP8、GSK-3β 的释放，从而影响幼鼠的神经发生和认知发育。

关键词：异氟醚；幼鼠；神经发生；认知功能；糖原合成酶激酶 -3β；葡萄糖调节蛋白 8

中图分类号：R-33；Q593.2；R614 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2021)08-1438-04

Experimental Study of Isoflurane Anesthesia by Causing the Loss of Neural Stem Cells to Reduce Neurogenesis and Cognitive Development in Young Mice*

LI Xing-hui[1], HU Ming-li[2], ZHANG Bi-feng[1], LIU Wang[1], YANG Bo[3△]

(1 Department of Anesthesiology, 2 Department of Hepatobiliary, 3 Department of Pain, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, 550000, China)

ABSTRACT Objective: To explore that isoflurane anesthesia reduce the neurogenesis and cognitive development of young rats by causing the loss of neural stem cells. **Methods:** SPF male Sprague Dawley (SD) juvenile rats (30 rats) were equally divided into two groups-control group and isoflurane group. The control group were inhaled 30 % oxygen, and the isoflurane group were inhaled 1.5 minimum alveolar effective concentration (MAC) isoflurane, and were to detect the loss of neural stem cells, neurogenesis and cognitive development in the two groups. **Results:** There were no statistically significant difference in the escape latency and Longa score compared between the two groups at 6 h after modeling (P>0.05). Thehigher escape latency and Longa score at 12 h and 24 h after modeling in the isoflurane group at 12 h and 24 h after modelingwere more than the control group(P<0.05). There were no significant difference in the arterial blood oxygen saturation of the lower extremities compared between the two groups at 6 h, 12 h, 24 h after modeling (P>0.05). The relative expression levels of glucose-regulated protein 8 (GRP8) and glycogen synthase kinase-3β(GSK-3β) in hippocampus 14 days after modeling in the isoflurane group were lower than those in the control group (P<0.05). **Conclusion:** Isoflurane anesthesia can inhibit the release of serum GRP8 and GSK-3β by causing the loss of neural stem cells, thereby affect the neurogenesis and cognitive development of young mice.

Key words: Isoflurane; Young mice; Neurogenesis; Cognitive function; Glycogen synthase kinase-3β; Glucose regulatory protein 8

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2; R614 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2021)08-1438-04

前言

术后认知功能障碍是指机体麻醉手术后出现的中枢神经系统并发症，主要表现为认知异常、记忆缺损或健忘综合征，严重情况下可导致机体出现严重记忆损害的痴呆[1,2]。该病确切的发病机制尚不明确，常是多因素协同作用的共同结果，包括老龄、合并基础疾病、酗酒、长期服用某些药物等[3,4]。现代医学研究表明该病的致病基础为脑血管病，如果机体出现脑灌注不足，促使氧自由基和脂质过氧化产物发生堆积，造成氧化应激损伤、神经元凋亡、细胞能量衰竭，最终导致认知功能障碍的发生[5,6]。当前多数手术患者在麻醉中采用吸入麻醉，虽然其应用方便，但是其术后认知功能障碍在老年吸入麻醉患者中的发生

* 基金项目：贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目（QZYY-2018-008）

作者简介：李星辉（1983-），男，本科，住院医师，研究方向：麻醉或疼痛，电话：13765158797，E-mail：li23099301@163.com

△ 通讯作者：杨波（1985-），女，本科，住院医师，研究方向：疼痛，电话：18585822299，E-mail：53459916@qq.com

（收稿日期：2020-09-30 接受日期：2020-10-24）

率比较高[7,8]。临床中发现异氟醚可以对患者的脑血流、血压、脑代谢等生命体征产生负面影响。异氟醚可以降低自身脑功能代偿作用功能,从而导致机体出现缺血性代谢和病理变化[9,10]。葡萄糖调节蛋白 8(GRP8)作为内质网的重要分子伴侣,在内质网应激反应、蛋白质折叠和转运过程中都发挥着重要的作用[11,12]。糖原合成酶激酶 -3β(GSK-3β)是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶,其表达状况被认为是调节神经元失活的重要机制之一[13,14]。本文具体探讨了异氟醚麻醉通过导致神经干细胞的丢失降低幼鼠的神经发生和认知发育,以明确异氟醚麻醉的的作用效果与机制。现总结报道如下。

1 资料与方法

1.1 实验材料

SPF 级雄性 Sprague Dawley(SD)幼年大鼠(30 只)购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物许可证编号 00010751,1 月龄,体重(50± 6)g,饲养环境:温度在 22℃~24℃,相对湿度 40 %~60 %, 食水自由,12/12 h 光照黑暗循环)。异氟醚 (美国 Baxter Healthcare 公司),Morris 水迷宫仪由本实验室保存,Drager Fabius 型麻醉机购自德国 Drager 公司,七氟醚(国药准字 09110942,江苏恒瑞医药股份有限公司)。

1.2 动物分组与处理

所有 SD 大鼠平分为两组 - 对照组与异氟醚组,每组 15 只大鼠。对照组吸入 30 %氧气,异氟醚组吸入 1.5 最低肺泡有效浓度(minimum alveolar concentration,MAC)异氟醚。吸入过程:采用自制透明玻璃麻醉吸入箱通过螺纹管连接麻醉机,控制麻醉气体输出浓度,监测麻醉气体浓度、氧气浓度以及二氧化碳浓度。

1.3 观察指标

(1) 在建模过程中将血氧饱和度探头接于大鼠左下肢记录动脉血氧饱和度。(2)在水迷宫装置自动记录大鼠从入水到寻台成功的时间,即逃避潜伏期,如 120 s 大鼠仍未找到平台,则潜伏期为 120 s。(3)Longa 评分:分为 5 个等级,4 分:不能自发行走,有意识丧失;3 分:行走时大鼠身体倾倒,重度神经功能缺损;2 分:行走时大鼠身体转圈,中度神经功能缺损;1 分:左侧前爪不能完全伸张,轻度神经功能缺损;0 分:完整正常。(4)处死大鼠,取海马组织提取总蛋白,测完蛋白含量,用进样器取样品上样,电泳、转膜、封闭,封闭液中加适当一抗(抗 GRP8 抗体、GSK-3β 抗体(稀释浓度为 1:500),清洗后加入二抗 37℃(稀释浓度为 1:5000) 1 h,采用 ECL 法检测 GRP8、GSK-3β 蛋白相对表达水平,以β-actin 作为内标。

1.4 统计方法

应用软件 SPSS20.00 分析数据,使用均数± 标准差来描述计量数据,对比为 t 检验,检验水准为α=0.05。

2 结果

2.1 逃避潜伏期对比

两组建模后 6 h 的逃避潜伏期对比差异无统计学意义(P>0.05),异氟醚组建模后 12 h、24 h 的逃避潜伏期时间长于对照组,经过对比差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 两组建模后不同时间点的逃避潜伏期对比(s, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of escape latency between two modules at different time points (s, $\bar{x}\pm s$)

Groups	n	6 h	12 h	24 h
Control group	15	20.22± 2.48	20.22± 2.29	20.29± 1.42
Isoflurane group	15	21.98± 1.47	38.67± 3.10*	44.76± 3.11*

Note: compared with the control group, *P<0.05.

2.2 下肢动脉血氧饱和度对比

两组建模后 6 h、12 h、24 h 的下肢动脉血氧饱和度在组内与组间对比差异都无统计学意义(P>0.05),见表 2。

表 2 两组建模后不同时间点的下肢动脉血氧饱和度对比(%,$\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of lower extremity arterial oxygen saturation at different time points after the two models (%, $\bar{x}\pm s$)

Groups	n	6 h	12 h	24 h
Control group	15	98.22± 1.49	98.76± 2.77	98.00± 3.14
Isoflurane group	15	99.09± 1.33	97.98± 1.34	98.02± 1.93

2.3 Longa 评分对比

两组建模后 6 h 的 Longa 评分对比差异无统计学意义(P>0.05), 异氟醚组建模后 12 h、24 h 的 Longa 评分高于对照组,经过对比差异有统计学意义(P<0.05),见表 3。

表 3 两组建模后不同时间点的 Longa 评分对比(分, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of Longa scores at different time points after the two models (score, $\bar{x}\pm s$)

Groups	n	6 h	12 h	24 h
Control group	15	0.56± 0.08	0.52± 0.09	0.53± 0.07
Isoflurane group	15	0.57± 0.09	1.87± 0.12*	1.98± 0.13*

Note: compared with the control group, *P<0.05.

2.4 海马组织 GRP8、GSK-3β 蛋白相对表达水平对比

异氟醚组建模后 14 d 的海马组织 GRP8、GSK-3β 蛋白相对表达水平都低于对照组，经过对比差异有统计学意义(P<0.05)，见表 4。

表 4 两组建模后 24 h 的海马组织 GRP8、GSK-3β 蛋白相对表达水平对比($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of GRP8, GSK-3β protein expression levels in hippocampal tissue 24 h after the two models ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	GRP8	GSK-3β
Control group	15	6.36± 0.44	5.87± 0.33
Isoflurane group	15	1.98± 0.28*	3.62± 0.45*

Note: compared with the control group, *P<0.05.

3 讨论

术后认知功能障碍是老年人群术后的常见病、多发病，可给患者家庭和社会带来沉重的负担。影响患者术后认知功能障碍影响因素众多，其中麻醉为重要的一个因素[13,14]。特别是不合理的麻醉可导致脑缺血再灌注损伤，使得海马区和基底节产生神经元不可逆损伤，压迫周围毛细血管，上述部位呈进行性脑水肿，导致缺血坏死的程度增加，从而形成术后认知功能障碍[15]。异氟醚是全身麻醉的主要用药之一，有研究发现异氟醚能导致谵妄，吸入异氟醚后可导致幼鼠在早期的学习记忆能力显著下降，且存在一定的时间与剂量依赖性[16,17]。不过有学者研究认为吸入异氟醚后对认知功能影响不大，可能与选择的实验动物种类、动物的年龄都有关[18]。本研究显示两组建模后 6 h 的逃避潜伏期对比差异无统计学意义，异氟醚组建模后 12 h、24 h 的逃避潜伏期长于对照组；两组建模后 6 h、12 h、24 h 的下肢动脉血氧饱和度在组内与组间对比差异都无统计学意义，与蔡琳[19]等学者的研究类似，该学者探究探究了异氟醚对大鼠海马区小窝蛋白家族(Cav-1、Cav-2、Cav-3)表达的影响，将 SD 大鼠随机分为对照组、异氟醚 1 组(ISO_1)、异氟醚 2 组(ISO_2)和异氟醚 3 组(ISO_3)，每组 10 只，对照组吸入 40 %氧气，ISO_1 吸入 1.2 %异氟醚，ISO_2 吸入 1.8 %异氟醚，ISO_3 吸入 2.4 %异氟醚，结果显示大鼠麻醉苏醒后 2~4 d，ISO_1、ISO_2 和 ISO_3 组逃避潜伏期长于对照组。表明异氟醚影响幼鼠的认知功能，但不会对生命体征产生严重负面影响。

术后认知功能障碍的促发因素包括手术麻醉、创伤、脑血管微栓子形成、围术期低血压、脑血流降低、低氧血症、血压波动剧烈、低氧血症、电解质酸碱平衡紊乱等，特别是手术麻醉可形成较多的毒性产物，作用于脑组织从而出现精神障碍[20,21]。本研究显示两组建模后 6 h 的 Longa 评分对比差异无统计学意义，异氟醚组建模后 12 h、24 h 的 Longa 评分高于对照组。与张贵星[22]等学者的研究类似，该学者探究了异氟醚后处理对局灶性脑缺血 - 再灌注大鼠海马神经损伤的影响，与假手术组组比较，模型组组大鼠神经行为学评分，神经细胞损伤及凋亡数目明显增加。分析其原因为异氟醚虽具有无刺激气味、诱导苏醒迅速、麻醉深度易于掌握、对呼吸道无刺激作用等特点[23]，但是研究也发现异氟醚的应用能增加幼鼠慢性脑低灌注损伤导致海马神经元的凋亡，增加海马神经元损伤，对脑功能有一定的损伤，降低幼鼠的认知功能[24,25]。

GRP8 的表达可抑制巨噬细胞凋亡的发生，调节多种抗氧化应激蛋白基因和解毒酶基因的表达，减少活性氧簇(Reactive Oxygen Species，ROS)的生成，抑制肝细胞内氧化应激损伤，从而发挥抗氧化应激的作用[26,27]。GSK-3β 的正常表达是维持细胞增殖分化的主要因子之一，也是一种高度保守的丝氨酸 / 苏氨酸激酶。当不良因素刺激下，Wnt 基因大量编码 Wnt 蛋白并释放入细胞质，从而抑制 GSK-3β 的表达[28-30]。海马是人体记忆功能的活动中枢，对于脑组织的缺氧、缺血等损伤极为敏感。本研究显示异氟醚组建模后 14 d 的海马组织 GRP8、GSK-3β 蛋白相对表达水平都低于对照组，与孙越[31]的研究类似，评价异氟醚对发育期大鼠海马神经干细胞 p-GSK-3β 表达的影响，结果显示与对照组比较，2 %异氟醚组大鼠海马齿状回 BrdU 阳性细胞数减少，p-GSK-3β 表达下调。表明吸入异氟醚麻醉可以导致中枢神经系统的紊乱，改变大脑的物质代谢和结构功能，使得机体出现低血压和低灌注压可导致中枢神经系统的损伤，可以降低脑血供并且减弱脑血管自身调节功能，导致大鼠血清 GRP8、GSK-3β 表达降低[32-34]。本研究也有一定的不足，异氟醚介导的调节途径比较多，且本研究没有设置剂量分组，可能存在研究偏倚，将在后续研究中深入分析。

综上所述，异氟醚麻醉可通过导致神经干细胞的丢失，抑制血清 GRP8、GSK-3β 的释放，从而影响幼鼠的神经发生和认知发育。

参 考 文 献(References)

[1] Chen Y, Lian F, Lu Q, et al. L-Theanine Attenuates Isoflurane-Induced Injury in Neural Stem Cells and Cognitive Impairment in Neonatal Mice[J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(6): 938-945

[2] Song Y, Li X, Gong X, et al. Green tea polyphenols improve isoflurane-induced cognitive impairment via modulating oxidative stress[J]. J Nutr Biochem, 2019, 73(6): e108213

[3] Sun N, Chu L, Yuan L, et al. Inactivation of P2YR12 contributes to isoflurane-induced neuronal injury by altering TLR-4/BDNF/TNF-alpha[J]. Folia Neuropathol, 2019, 57(2): 161-169

[4] Tang X, Zhang X, Li S, et al. NR2B receptor- and calpain-mediated KCC2 cleavage resulted in cognitive deficiency exposure to isoflurane[J]. Neurotoxicology, 2019, 76(5): 75-83

[5] Wu T, Sun XY, Yang X, et al. Histone H3K9 Trimethylation Downregulates the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Dorsal Hippocampus and Impairs Memory Formation During Anaesthesia and Surgery[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12(14): e246

[6] Yang M, Yu Y, Liu Q. Analgesic Effects of Sevoflurane and Isoflurane on Elderly Patients with Colon Cancer and Their Influences on Immunity and Postoperative Cognitive Function [J]. Iran J Public Health, 2019, 48(3): 444-450

[7] Du Y, Gong XD, Fang X, et al. Sevoflurane plays a reduced role in cognitive impairment compared with isoflurane: limited effect on fear memory retention[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1): 96-102

[8] Gong X, Xu L, Fang X, et al. Protective effects of grape seed procyanidin on isoflurane-induced cognitive impairment in mice [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 200-207

[9] Duthie A, Van Aalten L, Macdonald C, et al. Recruitment, Retainment, and Biomarkers of Response; A Pilot Trial of Lithium in Humans With Mild Cognitive Impairment [J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12 (9): e163

[10] Liu Y, Liu Z, Wei M, et al. Pharmacodynamic and urinary metabolomics studies on the mechanism of Schisandra polysaccharide in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Food Funct, 2019, 10(1): 432-447

[11] Matsunaga S, Fujishiro H, Takechi H. Efficacy and Safety of Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. J Alzheimers Dis, 2019, 69(4): 1031-1039

[12] Salehi P, Shahmirzadi ZY, Mirrezaei FS, et al. A hypothetic role of minocycline as a neuroprotective agent against methylphenidate-induced neuronal mitochondrial dysfunction and tau protein hyper-phosphorylation: Possible role of PI3/Akt/GSK3beta signaling pathway[J]. Med Hypotheses, 2019, 128(13): 6-10

[13] Zong W, Zeng X, Chen S, et al. Ginsenoside compound K attenuates cognitive deficits in vascular dementia rats by reducing the Abeta deposition[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(3): 223-230

[14] Cui H, Xu Z, Qu C. Tetramethylpyrazine ameliorates isoflurane-induced cognitive dysfunction by inhibiting neuroinflammation via miR-150 in rats[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(4): 3878-3887

[15] Liang F, Fu X, Li Y, et al. Desoxyrhapontigenin attenuates neuronal apoptosis in an isoflurane-induced neuronal injury model by modulating the TLR-4/cyclin B1/Sirt-1 pathway [J]. AMB Express, 2020, 10 (1): e175

[16] Liu H, Gong XD, Zhao X, et al. GLYX-13 pretreatment ameliorates long-term isoflurane exposure-induced cognitive impairment in mice [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1): 128-135

[17] Qiu LL, Pan W, Luo D, et al. Dysregulation of BDNF/TrkB signaling mediated by NMDAR/Ca (2+)/calpain might contribute to postoperative cognitive dysfunction in aging mice [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): e23

[18] Schaefer ML, Perez PJ, Wang M, et al. Neonatal Isoflurane Anesthesia or Disruption of Postsynaptic Density-95 Protein Interactions Change Dendritic Spine Densities and Cognitive Function in Juvenile Mice[J]. Anesthesiology, 2020, 133(4): 812-823

[19] 蔡琳, 隋大鸣, 付海钰,等. 异氟醚对大鼠海马组织小窝蛋白家族表达的影响 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2018, 25(3): 170-175

[20] Yan P, Xu D, Ji Y, et al. LiCl Pretreatment Ameliorates Adolescent Methamphetamine Exposure-Induced Long-Term Alterations in Behavior and Hippocampal Ultrastructure in Adulthood in Mice[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2019, 22(4): 303-316

[21] Yang C, Li X, Zhang L, et al. Cornel iridoid glycoside induces autophagy to protect against tau oligomer neurotoxicity induced by the activation of glycogen synthase kinase-3beta [J]. J Nat Med, 2019, 73 (4): 717-726

[22] 张贵星, 王胜, 殷姜文,等. 异氟醚后处理对局灶性脑缺血 - 再灌注大鼠海马神经损伤的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2019, 35(1): 66-71

[23] Chinn GA, Sasaki Russell JM, Yabut NA, et al. Androgenic Modulation of the Chloride Transporter NKCC1 Contributes to Age-dependent Isoflurane Neurotoxicity in Male Rats [J]. Anesthesiology, 2020, 133(4): 852-866

[24] 王晓宇,何伟,马富强,等.束缚和异氟烷麻醉对大鼠心率变异性及HPA 轴影响的比较[J].中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 28-35

[25] 邓城旗,杨静,房晓燕,等.生后不同间隔时间异氟烷处理对大鼠成年后认知功能的影响[J].解放军医学杂志, 2018, 43(6): 465-471

[26] Shi X, Barr JL, Von Weltin E, et al. Differential Roles of Accumbal GSK3beta in Cocaine versus Morphine-Induced Place Preference, U50, 488H-Induced Place Aversion, and Object Memory [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 371(2): 339-347

[27] Wang H, Sui H, Zheng Y, et al. Curcumin-primed exosomes potently ameliorate cognitive function in AD mice by inhibiting hyperphosphorylation of the Tau protein through the AKT/GSK-3beta pathway [J]. Nanoscale, 2019, 11(15): 7481-7496

[28] 吴倍,曹高亚,王新生,等.异氟烷对幼鼠学习记忆及额叶神经元GRP78、ATF4、CHOP 表达的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志, 2017, 26(7): 600-604

[29] Liu H, Gong XD, Zhao X, et al. GLYX-13 pretreatment ameliorates long-term isoflurane exposure-induced cognitive impairment in mice [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1): 128-135

[30] Mashour GA. Role of cortical feedback signalling in consciousness and anaesthetic-induced unconsciousness[J]. Br J Anaesth, 2019, 123 (4): 404-405

[31] 孙越, 孙满意, 孙丽宁, 等. 异氟醚对发育期大鼠海马神经干细胞 p-GSK-3β 和β-catenin 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017,37 (1): 66-69

[32] Puigoriol-Illamola D, Leiva R, Vázquez-Carrera M, et al. 11β-HSD1 Inhibition Rescues SAMP8 Cognitive Impairment Induced by Metabolic Stress[J]. Mol Neurobiol, 2019, 8(9): 114-118

[33] 滕清宇,蔡林林,李玮伟,等.R-α- 甲基组胺改善异氟烷导致的发育期大鼠神经元凋亡及记忆损害[J].第二军医大学学报, 2017, 38(8): 1023-1027

[34] Du Y, Gong XD, Fang X, et al. Sevoflurane plays a reduced role in cognitive impairment compared with isoflurane: limited effect on fear memory retention[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1): 96-102