

· 综 述 ·

评价麻醉药物对发育的中枢神经系统毒性影响的实验模型与方法研究^{*}

倪 锦¹综述,古妙宁²审校

(1. 广东省广州市儿童医院麻醉科 510120; 2. 南方医科大学附属南方医院麻醉科, 广东广州 510515)

关键词:麻醉药; 神经系统; 模型; 动物; 评价研究; 发育

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.040

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)01-0084-03

不同的麻醉药物组合用于小儿麻醉几十年却没有对药物接触和可能的毒性作用进行过系统评价。近年来,已建立在体和体外实验模型来评价多种麻醉药物不同剂量和接触时间相关的神经毒性,以及基因表达和蛋白质组学的研究、长期行为学评价等分析方法来研究麻醉药引起非人灵长类动物和啮齿动物细胞死亡的生物学途径和行为学结果。

1 在体和体外非人灵长类动物和啮齿动物模型

1.1 非人灵长类动物和啮齿动物在体模型

非人灵长类动物的生理、药理、代谢和生殖系统与人类有相似性,尤其是在妊娠期间。使得猕猴成为检测氯胺酮潜在神经退变作用的理想动物模型。在一项猕猴研究中^[1],监测了母体和幼仔所有重要生理变量,包括氧饱和度、呼出二氧化碳、体温、心率、动脉血压、血糖和红细胞压积,并维持在正常范围内。这是任何动物模型的必备条件,在灵长类动物远比啮齿动物类更容易实现。因为长时间低血压可导致大脑低灌注和缺血相关的细胞死亡,所以确保正常血压和氧饱和度尤其重要^[2]。

氯胺酮能很快通过胎盘转运,有报道胎儿血中的浓度在母体给药后 2 min 内接近母体水平^[3]。静脉给药后氯胺酮在体内迅速分布,随后血浆浓度迅速下降^[4]。近期有研究报道,需要维持猕猴麻醉氯胺酮浓度是 10~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比人类观察到的(2~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高 5~10 倍^[1]。值得注意的是,出生后 35 d 的猕猴氯胺酮血浆浓度最高,但与同年龄对照组相比却没有观察到神经细胞死亡的证据。出生后 5 d 的猕猴神经细胞死亡明显,而平均血浆浓度却大约是 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,只是人类观察到的血浆浓度的 3~5 倍。

灵长类对氯胺酮的神经毒性作用的敏感期只限于快速突触生成期,此期发生在围产期间,至少占妊娠期的 75% 并持续到出生后早期,在出生后 35 d 前某个时间点结束^[1]。然而大鼠的敏感期在出生后 1 d 开始并在大约 14 d 后结束^[5],此期是大鼠运动和其他相关系统完全发育前,多个脑区广泛突触再塑形期。此期也是快速髓鞘形成期,此期中大多数传出路径已存在于其靶区域,虽然其分布和突触靶位仍未成熟。在这些敏感阶段期间,N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)阻滞剂(如氯胺酮)引起谷氨酸能神经传递和受体表达的改变能影响神经可塑性并导致神经毒性。因此,神经元发育异常、突触可塑性异常和神经退行性变被认为是麻醉引起神经毒性的起动的促成因素^[6]。未成熟大鼠大脑对氯胺酮引起神经细胞死亡的敏感期与猕猴大脑发育的危险期一致。妊娠 122 d 的胎猴和出生后 5 d 的初生猴正处于突触生成期比处于更少的突触生成阶段的出生后 35 d 的猕猴更敏感。虽然人类和猕猴大脑发育阶段之间准确相关性和(或)麻醉引起神经损害的种属特异性的敏感程度仍

不明确,但可以肯定,人类和非人灵长类进行此方面的配比比灵长类和啮齿动物进行此方面的配比问题更少些。近期研究发现,妊娠 122 d 的猴胎就皮质发育而言等同于妊娠 199 d 的人类胎儿且两者都处于正常妊娠期的 75%~80% 范围内^[7]。同样,60 日龄和 7 日龄大鼠的神经生成和长期神经认知功能受异氟醚的影响亦有显著差异^[8]。

目前,导致凋亡和坏死的神经毒性损害的分布、特性和神经元敏感性仍不清楚,且可能取决于药物浓度、接触时间、所激活受体的亚型和细胞类型,以及神经元的发育阶段或成熟度等^[1]。在这些因素中,浓度和接触时间被认为是最重要的因素。那么浓度和接触时间如何与神经毒性相关呢?

动物研究所使用的剂量一般不能反映儿科患者的剂量。动物研究中使用的剂量和接触时间一般超出,甚至相当大地超出临床使用的剂量。而此类研究也是非常重要的,它是临床前研究的主要组成部分,一旦确定毒性剂量和作用,就可能对更低剂量和(或)更短接触时间进行评价以确定无毒性作用的相关接触水平,用以比较临床相关剂量并确立是否存在安全范围,该方法常用于药物开发。总之,不能不考虑浓度来谈接触时间,也不可能不考虑接触时间来谈浓度。

动物研究的另一个目的是确定是否存在某个麻醉时间,短于此时间,就不能检测到明显的氯胺酮引起的神经细胞死亡。有研究对出生后 5 d 的猕猴氯胺酮麻醉(静脉输注速率为 20~50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,以维持浅外科期麻醉)3 h 和 24 h 后进行评价。选取 24 h 观察相对长时间麻醉的作用,而选取 3 h 观察相对短时间麻醉的影响。麻醉时间为 3 h 组不能观察到明显的神经毒性作用。相反,24 h 组麻醉后出现皮质 II、III 层 Caspase-3 阳性细胞数、银染细胞数和 Fluoro-Jade C 阳性细胞数明显增加。这些数据与利用发育大鼠和出生后 3 d 猕猴建立的原代皮质培养系统观察到的时程研究结果一致^[6,9]。在上述时程研究中,培养物接触氯胺酮 2、4、6、12、24 h。结果表明,加入 10 M 氯胺酮 6 h 时导致细胞存活率下降约 30%,接触 12~12 h 后下降约 50%~70%。而氯胺酮接触培养物 2 h 与对照组比较无显著不同。接触 4 h 后,观察到神经细胞死亡则轻度而不明显增加,提示持续激活(代偿性)上调后的 NMDA 受体超过 6~24 h 对氯胺酮引起的猕猴额叶皮质培养发育神经元的细胞死亡极其重要^[6]。氯胺酮引起的细胞死亡在体内也呈接触时间依赖性。近期,Zou 等^[10]研究则进一步提示氯胺酮引起额叶皮质神经元大量死亡的时间是在接触氯胺酮麻醉 3.9 h 的某个时间点。

就麻醉药物的浓度与神经细胞发生凋亡关系的问题,Zhang 等^[11]报道 7 日龄 C57BL/6 小鼠吸入 1.7% 亚临床浓度

* 基金项目:广州市医药卫生科技项目(2007-YB-060);广州市中医药科研项目(2009-A-26)。

的七氟醚 2 h 即能在 12 h 后在大脑检测出神经元病理性凋亡^[12]。长时间(6 h)接触高浓度 3% 七氟醚的 6 日龄 C57BL/6 小鼠在成年后可出现学习缺陷和社会行为异常。

在体实验中,排除其他导致神经元凋亡的因素也至关重要,研究表明,吸入 0.75% 异氟醚 4 h、1.5% 异氟醚 2 h 和 2.0% 异氟醚 1 h 在血糖水平正常情况下神经元凋亡仍显著增加,因此在上述条件下,麻醉后引起的神经元凋亡与血糖下降无关^[13]。

1.2 啮齿动物和非人灵长类动物体外模型 体内和体外实验方法都已用来评估各种不同药物的多种剂量和接触时间相关的神经毒性。采用体外实验系统(原代培养^[6,9,14-15]和器官类型切片培养^[16-17])可以与体内研究^[18,1]一起评估麻醉药接触对发育期非人灵长类动物和啮齿动物模型的影响。采用猕猴和啮齿动物脑组织建立原代额叶皮质培养和器官型切片培养系统,可同时提供并行的体外实验模型在短时间内用最少数量的动物协助评价多种麻醉药、多种剂量的神经毒性。

这些体外制备物可用于快速评价麻醉药的神经毒性和支持直接研究麻醉药对大脑不同发育阶段的影响。原代和器官型培养可维持重要解剖关系和突触连接,并可直接评价细胞死亡,而且是不同麻醉药神经毒性筛选和评价的可靠模型。此外,这些制备物可直接应用靶向特异性受体基因的反义脱氧寡核苷酸,以及直接进行酶处理和药物处理。该方法可从最少数目的研究对象收集大量研究资料,且可以用简化的非人类灵长类和啮齿类动物系统来研究与麻醉药引起细胞损害相关的细胞机制。

2 药物基因组学与系统生物学方法

2.1 药物基因组学系统与生物学方法在 mRNA 和 DNA 水平(基因组学)的应用

2.1.1 基因芯片 基因芯片技术已用于确定哪一些候选死亡基因可能与麻醉药引起的凋亡相关。基因芯片可以帮助分析麻醉药引起的神经毒性与基因表达改变之间的关系。因此,不同麻醉药在不同时间点的基因表达谱得以比较。

2.1.2 组织(体内和体外) 冰冻组织在低温箱中切片以备激光俘获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)使用。简单说,组织包埋在含有光学切割温度复合物的模具中,该含有冰模的组织在干冰上平衡并冰冻于低温箱切片台上,切下来大约 7~10 μm 的切片并立即黏附在置于干冰之上的显微镜载玻片直到当日进行 LCM 处理或储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中日后处理。LCM 维持组织冷冻能保证从收集细胞上获取高质量 mRNA。对于每个实验对象收集来自相同脑区的细胞,这是属于系统生物学研究的范畴。从这些细胞分离出总 RNA 并用 RNA 扩增生成标记的 cRNA 用于基因芯片实验。简单说,分离出的 RNA 合成双股 cDNA,之后体外转录产生反义 RNA,后者又用于第 2 轮扩增产生更多的双股 cDNA。此双股 cDNA 沿青蓝 3-CTP 或青蓝 5-CTP 染料扩展而产生标记反义 cRNA。

2.1.3 寡核苷酸芯片(体内和体外) 标记 RNA,与标记参照 RNA 一起,共同杂交在包含超过 22 000 个序列的大鼠寡核苷酸芯片上。扫描芯片并用 ArrayTrack in-house 软件分析。

2.1.4 体内实验举例 新生大鼠多次氯胺酮给药产生神经元凋亡^[5]。为明确是否单次氯胺酮给药也产生凋亡,7 日龄大鼠皮下注射 40 mg/kg 氯胺酮或注射用水,注射 1、2、4 h 后获取大脑组织以鉴定丘脑部是否有与急性氯胺酮接触相关的明显基因表达改变。LCM 用来从丘脑部收集大约 500 个细胞,采

用基因芯片流程与前述一致。基因芯片分析识别出用药 1 h 后大脑中有 18 处明显的基因表达改变(>1.5 倍的变化, $P < 0.05$),用药 2 h 后有 624 处基因表达改变明显。用药 4 h 后有 52 处基因表达改变明显。这些表达改变的基因中,一些基因已明确与凋亡相关(cycs、ell、pdc8、prkcb1 和 ripk1),而大脑其他与氧化应激相关的基因在单次注射氯胺酮后上调。

2.2 药物基因组学和系统生物学方法在蛋白质水平的应用

2.2.1 蛋白质组学 为识别与 NMDA 阻滞剂和 γ -氨基丁酸(GABA)激动剂引起的凋亡相关的特异性蛋白质,可用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳或磷酸蛋白质同位素编码固相标记的方法从组织样本中分离蛋白质。亲和性分离后切除或消化也能用于分离特异性蛋白质。定量和识别能通过基质辅助激光解吸附技术和电离质谱技术完成^[1]。

2.2.2 蛋白质免疫印迹分析法(体外和体内) 反义寡核苷酸能用来确定 NMDA 受体反义寡核苷酸对麻醉药引起神经毒性的影响,并确定给予靶向 NMDA 受体 NR1 亚单位的反义寡核苷酸是否能阻断稳态蛋白水平。为明确神经细胞黏附分子上的唾液酸聚合物(sialic acid polymer on neural cell adhesion molecules, PSA-NCAM)表达下降与氯胺酮引起皮质神经元或者 NMDA 受体阻滞(由转移酶活性)是否相关,用免疫印迹分析 PSA-NCAM 与 NR1 蛋白、肌动蛋白比和反义寡核苷酸的保护效应^[7]。同时给予 NR1 反义寡核苷酸几乎能完全阻断氯胺酮引起的神经细胞死亡。研究表明氯胺酮明显上调 NMDA 受体 NR1 亚单位蛋白。同时给予反义寡核苷酸能防止氯胺酮引起的 NR1 上调和阻断氯胺酮引起的 PSA-NCAM 减少。

3 结 论

应结合发育期啮齿动物和非人灵长类动物的体内模型和体外制备物进行研究。这些结合的模型能从最少数量的实验物收集大量数据,并可用简化的非人灵长类动物或啮齿动物模型系统研究麻醉药引起与细胞死亡相关的细胞机制。

采用药物基因组学和系统生物学的方法对帮助进一步了解大脑相关的生物过程包括神经可塑性和神经毒性有巨大的潜力,这些方法也可用来监测不同治疗方案的疗效。此外,通过使用体内和体外非人灵长类和啮齿动物模型,这些方法能进一步加深对复杂生物学过程如麻醉药引起的发育期大脑神经细胞死亡、凋亡和(或)坏死的理解^[19-20]。了解这些复杂的生物学过程将阐明麻醉药引起大脑细胞死亡途径,并有助于发现改善儿科患者麻醉药毒性的不良后果的治疗方法。

参考文献:

- [1] Slikker W, Paule MG, Wright LKM, et al. Systems biology approaches for toxicology[J]. J Appl Toxicol, 2007, 27(3): 201-217.
- [2] Slikker W, Zou X, Hotchkiss CE, et al. Ketamine-induced neurodegeneration in the perinatal rhesus monkey[J]. Toxicol Sci, 2007, 98: 145-158.
- [3] Nayar R, Sahajanand H. Does anesthetic induction for cesarean section with a combination of ketamine and thiopentone confer any benefits over thiopentone or ketamine alone? A prospective randomized study[J]. Minerva Anestesiol, 2009, 75(4): 185-190.
- [4] Sigtermans M, Dahan A, Mooren R, et al. S(+)-ketamine effect on experimental pain and cardiac output: a population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling study in healthy

- volunteers[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(4): 892-903.
- [5] 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.
- [6] Wang C, Sadovova N, Hotchkiss C, et al. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors by ketamine produces loss of postnatal day 3 monkey frontal cortical neurons in culture[J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91: 192-201.
- [7] Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, et al. Extrapolating brain development from experimental species to humans[J]. *Neurotoxicology*, 2007, 5: 931-937.
- [8] Stratmann G, Sall JW, May LD, et al. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 834-848.
- [9] Wang C, Sadovova N, Fu X, et al. The role of NMDA receptors in ketamine-induced apoptosis in rat forebrain culture[J]. *Neuroscience*, 2005, 132: 967-977.
- [10] Zou X, Patterson TA, Divine RL, et al. Prolonged exposure to ketamine increases neurodegeneration in the developing monkey brain[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27(7): 727-731.
- [11] Zhang X, Xue Z, Sun A. Subclinical concentration of sevoflurane potentiates neuronal apoptosis in the developing C57BL/6 mouse brain[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 447(2/3): 109-114.
- [12] Satomoto M, Satoh Y, Terui K, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(3): 628-637.
- [13] 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.
- [14] Berns M, Zacharias R, Seeberg L, et al. Effects of sevoflurane on primary neuronal cultures of embryonic rats[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2009, 26(7): 597-602.
- [15] Xiang Q, Tan L, Zhao YL, et al. Isoflurane enhances spontaneous Ca²⁺ oscillations in developing rat hippocampal neurons in vitro[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2009, 53(6): 765-773.
- [16] Wang C, Anastasio N, Popov V, et al. Blockade of N-Methyl-D-aspartate receptors by phencyclidine causes the loss of corticostriatal neurons[J]. *Neuroscience*, 2004, 125: 473-483.
- [17] Wang C, Fridley J, Johnson KM. The role of NMDA receptor upregulation in phencyclidine-induced cortical apoptosis in organotypic culture[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69: 1373-1383.
- [18] Zou X, Sadovova N, Patterson TA, et al. The effects of L-carnitine on the combination of inhalation anesthetic-induced developmental neuronal apoptosis in the rat frontal cortex[J]. *Neuroscience*, 2008, 151: 1053-1065.
- [19] Istaphanous GK, Loepke AW. General anesthetics and the developing brain[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2009, 22(3): 368-373.
- [20] Brée B, Gourdin M, De Kock M. Anesthesia and cerebral apoptosis[J]. *Acta Anaesthesiol Belg*, 2008, 59(3): 127-137.

(收稿日期: 2010-02-10 修回日期: 2010-06-10)

· 综 述 ·

终末期肾病与恶性肿瘤相关因素探讨

彭大振 综述, 王立新 审校

(中国人民解放军第二一〇医院泌尿外科, 辽宁大连 116021)

关键词: 肾功能衰竭; 肿瘤; 透析; 炎症

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)01-0086-04

近年来,随着人们生活水平的提高,自我保健意识的增强及医疗水平的不断进步使得终末期肾病(ESRD)患者的生存期有了明显延长,ESRD患者伴发肿瘤的发生率亦呈上升趋势,使得ESRD伴发肿瘤已成为影响患者预期寿命的主要因素之一。为了对ESRD伴发肿瘤做到早诊断、早治疗,延长患者寿命,现将ESRD患者的可能致癌的潜在危险因素作一综述。

1 ESRD 恶性肿瘤的流行病学

1993年美国对72484例尿毒症患者的研究显示,其患恶性肿瘤的相对危险性比正常人平均增加7.6倍,特别是透析并发获得性囊性肾病(ACKD)与肾癌相关性较大。ESRD患者长期接受血液透析,其恶性肿瘤的发病率是正常人的20~40倍^[1]。有学者对长期透析治疗的患者进行横断面研究,发现肾细胞癌占68.4%,移行细胞癌(TCC)占43.8%^[2]。在一项研究中的大样本调查发现,肾移植受者睾丸癌和膀胱癌的发

病率增加了5倍,肾癌的发病率上升了15倍^[3]。

2 ESRD 发生恶性肿瘤的危险因素

2.1 年龄 近年一项流行病学调查显示,恶性肿瘤发病率20年间升高约50%,而人口老龄化是恶性肿瘤发病率上升的决定性因素^[4]。年龄每增加1岁,恶性肿瘤发病率上升约11.44/10万。目前透析人群的年龄亦趋向于老龄化,因而年龄成为透析患者肿瘤高发的独立因素。有报道发现在1646例ESRD患者中,肾细胞癌(RCC)占0.5%,年龄(66.8±14.6)岁^[5]。

2.2 药物 首先,免疫抑制药物如硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、环磷酰胺特别是环孢菌素不但可以引起皮肤、口唇、子宫、膀胱和肝癌,而且引发淋巴瘤和肉瘤。大多数肾小球肾炎或肾移植术者使用免疫抑制剂增加了患恶性肿瘤的可能性^[6]。肾移植术后并发恶性肿瘤的发生率比正常人明显增高,其主要原因可能