

## 七氟醚对初级感觉神经元突触前抑制的作用\*

陈梦洁<sup>1</sup>, 马克涛<sup>1,2</sup>, 司军强<sup>1,2,3,4</sup>, 樊超<sup>1</sup>, 李丽<sup>1,2,Δ</sup>

(1. 石河子大学医学院生理教研室, 新疆石河子 832002; 2. 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 新疆石河子 832002; 3. 武汉大学基础医学院, 武汉 430071; 4. 华中科技大学基础医学院, 武汉 430071)

**摘要:**目的 观察七氟醚在大鼠急性分离的背根神经节(DRG)神经元上对 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)激活膜电流(IGABA)的影响,探讨七氟醚在脊髓水平的作用。方法 采用全细胞膜片钳技术记录七氟醚对IGABA的调制作用。结果 (1)GABA(1~1 000  $\mu\text{mol/L}$ )可以使86.8%(92/106)的DRG神经元产生浓度依赖性的内向电流。(2)七氟醚(30~3 000  $\mu\text{mol/L}$ )非浓度依赖性地增强GABA(100  $\mu\text{mol/L}$ )激活的电流,在300  $\mu\text{mol/L}$ 时增强作用最明显( $P<0.05, n=6$ )。(3)七氟醚(100、300、1 000  $\mu\text{mol/L}$ )对GABA激活电流的增强作用与GABA呈浓度依赖性,七氟醚对较小浓度的GABA(10  $\mu\text{mol/L}$ )激活电流的增强率最大( $P<0.05, n=6$ )。结论 七氟醚通过增强GABA激活的电流,增强初级感觉突触前抑制。

**关键词:**  $\gamma$ -氨基丁酸;七氟醚;背根神经节;全细胞膜片钳;初级感觉

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2155-03

## Effects of sevoflurane on presynaptic inhibition of primary sensory neurons\*

Chen Mengjie<sup>1</sup>, Ma Ketao<sup>1,2</sup>, Si Junqiang<sup>1,2,3,4</sup>, Fan Chao<sup>1</sup>, Li Li<sup>1,2,Δ</sup>

(1. Shihezi University Medical College, Shihezi, Xinjiang 832002, China; 2. Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University Medical College, Shihezi, Xinjiang 832002, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430070, China; 4. College of Basic Medical Sciences, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effects of sevoflurane on GABA-activated membrane currents(IGABA) in acutely isolated rat dorsal root ganglion(DRG) neurons and to discuss the effect of sevoflurane at the spinal cord level. **Methods** The whole-cell patch-clamp technique was adopted to record the modulating action of sevoflurane on IGABA in dorsal root ganglion neurons. **Results** (1) GABA (1-1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) could make 86.8% (92/106) of the DRG neurons to produce the concentration-dependent inward currents. (2) Sevoflurane (30-3 000  $\mu\text{mol/L}$ ) enhanced the GABA-activated current by non-concentration-dependence, the enhancement effect at 300  $\mu\text{mol/L}$  was most significant ( $P<0.05, n=6$ ). (3) The enhancement effect of sevoflurane(100, 300, 1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) on the GABA-activated currents and GABA displayed the concentration-dependence. Sevoflurane had the maximal enhancement rate on the smaller concentration of GABA (10  $\mu\text{mol/L}$ ) activated current ( $P<0.05, n=6$ ). **Conclusion** Sevoflurane can enhance the presynaptic inhibition of primary sensory neurons by enhancing the GABA-activated currents in DRG neurons.

**Key words:** gamma-aminovutyric acid; sevoflurane; dorsal root ganglion; whole-cell patch-clamp; primary sensory

七氟醚是一种较新的卤族吸入麻醉剂,与其他麻醉药物相比,其优点是诱导迅速、刺激性小、溶解度低及较好的血流动力学稳定性,并且吸收和清除迅速,并发症少,这些特性使其成为一种理想的吸入性麻醉药物广泛应用于临床。但是,吸入性麻醉药物对中枢神经系统的作用机制尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。以往的研究证明吸入性麻醉药物如氟烷、异氟烷、七氟烷在脊髓水平有明显的抗伤害感受作用<sup>[2]</sup>。近年来,越来越多的证据支持麻醉药物通过加强抑制性突触功能而发挥作用<sup>[3]</sup>。 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)存在于中枢神经系统中,作为最重要的抑制性神经递质之一,在伤害性信息处理或痛觉调制中发挥重要作用,目前已经证实GABA受体主要参与痛觉的传递<sup>[4]</sup>。背根神经节(DRG)细胞是躯体感觉信息的初级传入神经元,在疼痛的发生和维持中起着重要的作用<sup>[5]</sup>。本实验拟用膜片钳技术在DRG细胞上检测七氟醚对GABA激活电流的影响,探讨七氟醚在初级感觉突触前(脊髓)发挥作用的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 选用4周龄SD大鼠(150~200 g),雌雄不限,由新疆医科大学实验动物中心提供,动物质量符合一级标准。胶原酶、胰蛋白酶、胰蛋白酶抑制剂、GABA、HEPES为Sigma公司产品。其余试剂均为国产分析纯试剂。Axon 700B放大器(美国Axon公司)、P-97拉制仪(美国Sutter公司)、生物电信号记录计算机(Axoscope 10.2软件,美国Axon公司)。

**1.2 方法** 将大鼠击昏、断头后迅速切开背部皮肤,沿脊柱两侧剪断与之相连的肋骨及软组织,取出颈、胸、腰段脊柱。由脊柱正中纵向剖成两半,置于细胞外液中,外液成分(mmol/L): NaCl 150、KCl 5、CaCl<sub>2</sub> 2.5、MgCl<sub>2</sub> 1、HEPES 10、D-glucose 10、NaOH调节pH为7.3~7.4,溶液渗透压为330 mOsm。由剖开的椎管内侧弃去脊髓,逐个取出神经节及相连的神经根,在显微镜下用精细角膜剪和游丝镊子剪除相连的神经根和周围的结缔组织被膜,将修剪干净的DRG剪碎成2~3块,转

移到加有胰蛋白酶 0.25 mg/mL、胶原酶 0.5 mg/mL 的 EP 管中,置于 37 °C 的恒温恒湿箱内 15 min。取出放入少量的胰蛋白酶抑制剂终止其继续消化。将上述机械分离和酶处理的 DRG 神经元进行离心(1 000 r/min 离心 6 min),弃去上清液,采用膜片钳实验将 DRG 细胞外液移入沉淀中,吹打使其分散后移入培养皿内,加入细胞外液,在室温静置至少 30 min,待细胞贴壁后进行试验。

使用 Axon 700B 放大器进行全细胞膜片钳实验记录,记录电极尖端直径约为 1  $\mu\text{m}$ ,电极阻抗约为 3~5 M $\Omega$ ,由 P-97 控制仪二步控制,电极充灌内液成分 (mmol/L): KCl 140、CaCl<sub>2</sub> 1、MgCl<sub>2</sub> 2、HEPES 10、EGTA 11, KOH 调节 pH 为 7.3~7.4。实验在倒置显微镜下,选用分离的单个细胞呈圆形或椭圆形,贴壁良好、轮廓及形态清晰、胞膜完整有光晕、折光性强且胞质均匀的中小细胞,细胞直径 15~45  $\mu\text{m}$ 。通过微操纵器将玻璃微电极移至细胞表面后给予负压吸引,电极与细胞膜形成高阻(>1 G $\Omega$ )封接后将膜吸破,然后调节电容和串联电阻保持电压为 -60 mV,膜电流应用低通滤波(10 Hz)。

药物均用无糖外液配制,七氟醚在实验前 30 min 之内配置,给药系统为密闭的,通过微操纵器移动快速换液装置的排药管进行,排药管每管的直径为 0.5 mm,管口距所记录的细胞 100  $\mu\text{m}$ ,实验在室温 20~30 °C 进行。细胞外灌流 GABA 给药顺序由低浓度到高浓度依次进行,给药时间为 5~6 s,给药间歇为 4 min,给药间歇用细胞外液冲洗。给七氟醚混合液时,同上先灌流相同浓度的 GABA 引出电流作为前对照,待 IGABA 稳定后,洗脱 4 min 后持续预灌流七氟醚 10 s,然后灌流 5 s GABA 和七氟醚的混合液,洗脱至 IGABA 恢复到前对照水平后,灌流另一浓度的七氟醚。记录不同浓度七氟醚对 IGABA 的增强作用,并计算七氟醚对 I<sub>GABA</sub> 的增强率 = (I<sub>混合</sub> - I<sub>GABA</sub>) ÷ I<sub>GABA</sub> × 100%。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,给药前后采用两均数的 *t* 检验来分析数据。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DRG 细胞 GABA 激活电流** 实验共检测了 106 个细胞,其中大多数(86.8%, 92/106)对 GABA 敏感。GABA(1~1000  $\mu\text{mol/L}$ )激活的内向电流具有明显去敏感性,且具有浓度依赖性( $P < 0.05, n = 6$ ),见图 1。本实验室已经验证此反应可被 GABA<sub>A</sub> 受体特异性激动剂蝇蕈醇(100  $\mu\text{mol/L}$ )模拟,被 GABA<sub>A</sub> 受体选择性拮抗剂荷包牡丹碱(100  $\mu\text{mol/L}$ )阻断(图 2)<sup>[6]</sup>。提示 GABA 激活的内向电流由 GABA<sub>A</sub> 受体所介导。

**2.2 七氟醚对 GABA 激活电流的增强作用** 预灌流七氟醚(30~3 000  $\mu\text{mol/L}$ )10 s 后对 GABA(10~100  $\mu\text{mol/L}$ )激活电流产生明显的调制作用,在 92 个对 GABA 反应敏感的神经元中:七氟醚对其中 81 个神经元(88.04%, 81/92)膜上 GABA 激活电流产生增强效应;对 2 个神经元(2.17%, 2/92)无明显作用;对 11 个神经元(11.96%, 11/92)呈现抑制作用。其中还发现在 61.96%(57/92)的 DRG 神经元膜上,当七氟醚的浓度为 300~3 000  $\mu\text{mol/L}$  时可引起一个外向电流(见图 3)。

**2.2.1 七氟醚非浓度依赖性的增强 GABA(100  $\mu\text{mol/L}$ )激活电流** 预灌流七氟醚(30~3 000  $\mu\text{mol/L}$ )对 GABA(100

$\mu\text{mol/L}$ )激活电流的增强作用与七氟醚呈非浓度依赖性,七氟醚的浓度为 100~3 000  $\mu\text{mol/L}$  时对 GABA 激活电流的增强作用具有统计学意义( $P < 0.05, n = 6$ ),当七氟醚的浓度分别为 100、300、1 000、3 000  $\mu\text{mol/L}$  时对 GABA(100  $\mu\text{mol/L}$ )激活电流的增强率分别为 34.17% ± 4.85%、44.25% ± 9.48%、41.42% ± 7.26%、18.98% ± 0.67%,可以看出当七氟醚浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$  时对 GABA(100  $\mu\text{mol/L}$ )激活电流增强作用最明显( $P < 0.05, n = 6$ ),见图 3。

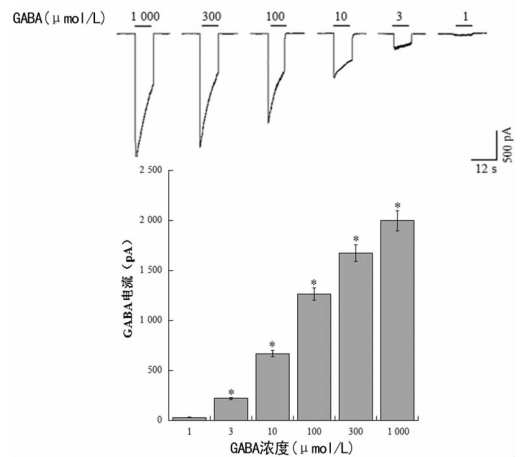


图 1 GABA 激活的浓度依赖性的内向电流

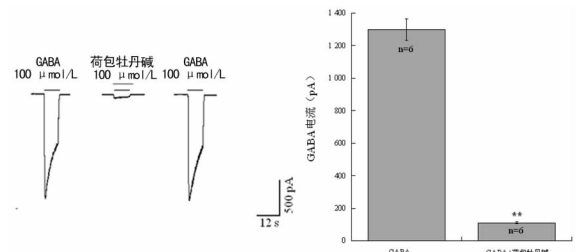
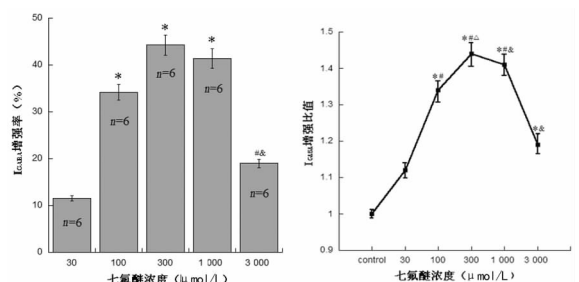


图 2 荷包牡丹碱对 GABA 激活内向电流的影响

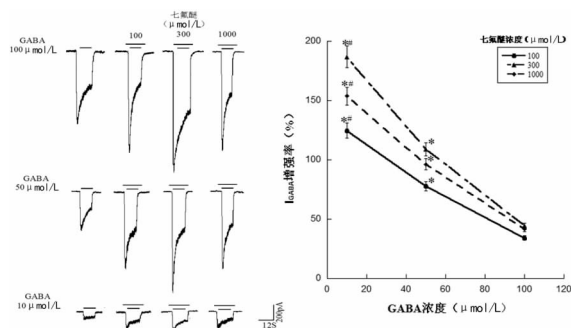


A: 不同浓度七氟醚对 100  $\mu\text{mol/L}$  GABA 激活电流的增强率。与 30  $\mu\text{mol/L}$  组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 300  $\mu\text{mol/L}$  组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 1 000  $\mu\text{mol/L}$  组比较, &  $P < 0.05$ ; 与 300  $\mu\text{mol/L}$  组比较, &  $P < 0.05$ 。B: 不同浓度七氟醚对 100  $\mu\text{mol/L}$  GABA 激活电流的增强比值。与 control 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 30  $\mu\text{mol/L}$  组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 100  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 七氟醚对 100  $\mu\text{mol/L}$  GABA 激活电流的增强作用

**2.2.2 七氟醚对 GABA 激活电流的增强作用与 GABA 呈浓度依赖性** 预灌流 100、300、1000  $\mu\text{mol/L}$  七氟醚对 GABA 激活电流的增强作用与 GABA 呈浓度依赖性(图 4),七氟醚对较小浓度的 GABA(10  $\mu\text{mol/L}$ )激活电流的增强率最大,即增强作用最明显( $P < 0.05, n = 6$ ),当七氟醚的浓度为 100、300、1 000  $\mu\text{mol/L}$  时对 GABA(10  $\mu\text{mol/L}$ )激活电流的增强率分别

达 124.63% ± 22.87%、186.88% ± 30.69%、153.65% ± 28.94%。可以看出当七氟醚的浓度为 300 μmol/L 时对 GABA(10~100 μmol/L)激活电流的增强作用最明显( $P < 0.05, n = 6$ ),见图 4。



\*:  $P < 0.05$ , 与 100 μmol/L 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 50 μmol/L 组比较。

图 4 不同浓度的七氟醚对不同浓度的 GABA 激活电流的增强作用

### 3 讨论

实验结果显示,不同浓度的七氟醚(100~3 000 μmol/L)均能增强大鼠背根神经节细胞 GABA 激活的电流,当七氟醚浓度为 300 μmol/L 时增强作用最明显,达 44.25% ± 9.48%。七氟醚对 GABA 激活电流的增强作用与 GABA 呈浓度依赖性,对较小浓度的 GABA(10 μmol/L)激活电流的增强作用最明显,其中 300 μmol/L 的七氟醚对 10 μmol/L GABA 激活电流的增强率为 186.88% ± 30.69%。

GABA 是中枢神经系统中最重要抑制性神经递质之一,它在脊髓背角通过突触前抑制作用,减少初级传入神经末梢兴奋性神经递质的释放,即“突触前抑制”<sup>[7]</sup>。当 GABA 的浓度越低时,GABA 能系统在初级感觉传入终末产生的突触前抑制作用越弱,而本实验中七氟醚对较低浓度 GABA 激活电流的增强作用较明显,可能的原因是七氟醚可以通过增强 GABA 对 GABA 受体的亲和力,来发挥抗伤害的作用。罗爱林等<sup>[8]</sup>证明当七氟醚的浓度超过 3 000 μmol/L 时,GABA 激活电流的峰值会下降,这可能与部分阻塞氯通道有关,因此,本次试验采用七氟醚的浓度为 30~3 000 μmol/L。GABAA 受体复合物是一个多亚基配体门控的离子通道,一些药物可以作用于 GABAA 受体复合物而产生类似 GABA 反应发挥作用,例如巴比妥类、苯二氮卓类、类固醇类和异丙酚类等药物。有研究证明,七氟醚在海马神经元可引起一种内向电流,而且该电流可被荷包牡丹碱阻断,这表明该电流和 GABAA 受体有关<sup>[9]</sup>。还有一些全身麻醉药物可通过增加该受体复合物中氯通道的平均开放时间或开放频率而增强 GABA 作用<sup>[10]</sup>。并且 Jones 等<sup>[10]</sup>还证明 3 种吸入性麻醉药物(氟烷、恩氟烷、异氟烷)在培养的海马神经元上可加强 GABA 激活的氯电流。Wu 等<sup>[11]</sup>推断 GABAA 受体上似乎存在一个对于许多吸入麻醉药的结合位点,而临床浓度的七氟醚所通过的结合位点和苯巴比妥或地西洋是不同的。另外徐宏伟等<sup>[12]</sup>采用放射配体结合分析法,进行抑制实验及饱和实验,也进一步证实七氟醚可提高 GABA 与 GABAA 受体的亲和力,但不影响 GABA 的结合位点。

在临床麻醉中根据患者的年龄和麻醉方法的不同,七氟醚的最低肺泡有效浓度(minimal alveolar concentration, MAC)为 1.48%~2.03%,相应的血药浓度是 340~470 μmol/L,本实验中接近这个浓度的七氟醚浓度是 300 μmol/L,临床上

MAC 的七氟醚(680~940 μmol/L)可以作为惟一使用的麻醉药诱导后气管内插管,这和本次实验中应用的 1 000 μmol/L 的七氟醚很接近,但由于在手术室中七氟醚很少单独使用,通常七氟醚是混合着氧气一起使用,这会使七氟醚实际进入血液的浓度降低,所以在临床中七氟醚经常使用的浓度和本次试验中对 GABA 激活电流的增强作用最明显的七氟醚浓度是十分接近的。

本实验采用膜片钳技术在 DRG 细胞上检测到七氟醚对 GABA 激活的电流有增强作用,当 GABA 浓度越低时 GABA 能系统在初级感觉传入终末产生的突触前抑制作用越弱,而七氟醚对较低浓度的 GABA 激活电流的增强作用最明显,这可以部分解释七氟醚在初级感觉突触前(脊髓)发挥麻醉作用的可能机制。

### 参考文献:

- [1] Frank NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia[J]. Nature, 1994, 367(6464): 607-614.
- [2] 王英伟,汪丛莹,邓小明,等. 七氟醚在脊髓对伤害性屈反射的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 1999, 19(3): 158-160.
- [3] 樊超,马克涛,司军强,等. 咪达唑仑对大鼠 DRG 神经元 GABAA 受体激活电流的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 9(32): 1104-1107.
- [4] Naik AK, Pathirathna S, Jevtovic-Todorovic V. GABAA receptor modulation in dorsal root ganglia in vivo affects chronic pain after nerve injury[J]. Neuroscience, 2008, 154(4): 1539-1553.
- [5] Tam Tam S, Bastian I, Zhou XF, et al. Micro RNA-143 expression in dorsal root ganglion neurons[J]. Cell Tissue Res, 2011, 346(2): 163-173.
- [6] 王洋,司军强,李丽,等. 神经病理性痛大鼠突触前抑制作用的改变及其第二信使系统变化的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(14): 9-14.
- [7] Rudomin P, Schmidt RF. Presynaptic Inhibition in the vertebrate Spinal Cord[J]. Exp Brain Res, 1999, 129(1): 1-37.
- [8] 罗爱林,杉山和英. 七氟烷增强单个培养鼠背根神经节细胞 γ-氨基丁酸调控的氯电流[J]. 同济医科大学学报, 2000, 29(5): 458-460.
- [9] Wu J, Harata N, Akaike N. Sevoflurane-induced ionic current in acutely dissociated CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus[J]. Brain Res, 1994, 645(1/2): 303-308.
- [10] Jones MV, Brooks PA, Harrison NL. Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics[J]. J Physiol, 1992(449): 279-293.
- [11] Wu J, Harata N, Akaike N. Potentiation by sevoflurane of the γ-aminobutyric acid-induced chloride currents in acutely dissociated CA1 pyramidal neurons from rat hippocampus[J]. Br J Pharmacol, 1996, 119(5): 1013-1021.
- [12] 徐宏伟,王泉云,刘斌,等. 七氟醚与 GABAA 受体关系的实验研究[J]. 中华麻醉学杂志, 2000, 20(10): 621-623.