

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.13.007

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190529.1533.011.html(2019-5-30)

七氟醚对大鼠海马组织 NR2B、Caspase-3 的影响*

朱彦东¹, 刘 钰²

(1. 南方医科大学深圳医院麻醉科, 广东深圳 518101; 2. 浙江省东阳市红十字会医院 322100)

[摘要] **目的** 探讨七氟醚对大鼠海马组织 N-甲基-D-天冬氨酸-2B 受体(NR2B)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 的影响。**方法** 选取 7 d 龄 SD 大鼠 60 只分为对照组和麻醉组, 每组再分为 3 个时间点, 即麻醉前、麻醉后 24 h 及麻醉后 7 周, 每组 10 只。麻醉组给予 2.5% 七氟醚麻醉 4 h, 对照组仅给予空氧混合气。采用 Western blot 检测各组大鼠海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达, Morris 水迷宫检测麻醉后 7 周大鼠的空间学习记忆能力。**结果** 麻醉后 24 h, 麻醉组大鼠海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达明显高于对照组及麻醉前 ($P < 0.05$); 麻醉前及麻醉后 7 周, 麻醉组和对照组大鼠海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。麻醉组大鼠第 1、3 天游泳潜伏期分别为 (70.23 ± 8.10)s 和 (41.03 ± 7.39)s, 总路程分别为 (18.20 ± 2.02)cm 和 (11.03 ± 1.98)cm, 明显高于对照组 ($P < 0.05$); 麻醉组和对照组大鼠游泳速度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 七氟醚麻醉可即刻造成幼鼠海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达升高, 同时其成年后的学习记忆能力有一定损伤, 但成年后海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达无明显异常。

[关键词] 七氟醚; 大鼠, Sprague-Dawley; 海马; NR2B; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3**[中图分类号]** R641**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)13-2189-03

Effect of sevoflurane on NR2B and Caspase-3 in rat hippocampal tissue*

ZHU Yandong¹, LIU Yu²

(1. Department of Anesthesiology, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518101, China; 2. Dongyang Red Cross Hospital, Dongyang, Zhejiang 322100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of sevoflurane on NR2B and Caspase-3 in rat hippocampal tissue. **Methods** Sixty SD rats of 7 d old were selected and divided into the control group and the anesthesia group, then each group was re-divided into 3 subgroups according to 3 timepoints, before anesthesia, 24 h and 7 weeks after anesthesia, with 10 cases in each group. The anesthesia group was given 2.5% sevoflurane for 4 h, and the control group was given air oxygen mixture only. The expression of NR2B and Caspase-3 protein in hippocampal tissue of each group was detected by Western blot, and the rat spatial learning and memory ability in 7 weeks after anesthesia were detected by Morris water maze. **Results** The expression levels of NR2B protein and Caspase-3 protein in the hippocampus tissue at 24 h after anesthesia in the anesthesia group were significantly higher than those in the control group and before anesthesia ($P < 0.05$). The expression levels of NR2B protein and Caspase-3 protein before anesthesia and at 7 weeks after anesthesia had no statistically significant difference between the anesthesia group and the control group ($P > 0.05$). The swimming latency periods at 1, 3 d in the anesthesia group were (70.23 ± 8.10)s and (41.03 ± 7.39)s, and the total journeys were (18.20 ± 2.02)cm and (11.03 ± 1.98)cm respectively, which were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in swimming speed between the anaesthesia group and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Sevoflurane anesthesia can instantly cause the increase of NR2B and Caspase-3 protein in the hippocampal tissue of young rats, meanwhile the learning and memory ability after adult has a certain damage, however, there is no obvious abnormality in hippocampus tissue NR2B and Caspase-3 protein expression after adult.

[Key words] sevoflurane; rats, sprague-dawley; hippocampal; NR2B; caspase-3

随着麻醉药物在临床的广泛使用,人们开始关注全身麻醉药对脑发育的影响。近年来有研究显示,异氟烷等全身麻醉药会导致神经细胞的凋亡,具有一定的神经毒性^[1-2]。目前,发育期动物中枢神经系统成为研究热点,但是对于麻醉药导致神经细胞退化和凋亡的具体机制仍未十分明确。N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA受体)是离子型谷氨酸受体的1个亚型,在神经系统发育过程中发挥重要的作用。研究显示,N-甲基-D-天冬氨酸-2B受体(NR2B)不仅介导突触的强化及神经元的存活,还可介导细胞凋亡^[3]。半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,其中Caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,在细胞凋亡中起着不可替代的作用^[4]。本研究探讨七氟醚对大鼠海马组织NR2B、Caspase-3的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选取SD大鼠(上海斯莱克实验动物有限公司)60只,7d龄,雌雄各半,饲养环境为12h明暗循环,温度20~22℃,湿度55%~60%,大鼠断奶前配乳母鼠喂养,自由取食。将大鼠分为对照组和麻醉组,每组再分为3个时间点,即麻醉前、麻醉后24h及麻醉后7周,每组10只。

1.2 方法

1.2.1 麻醉方法 大鼠放入麻醉箱,对照组开启30%空氧混合气;麻醉组开启七氟醚(浓度2.5%)和30%空氧混合气,麻醉时间4h。

1.2.2 Western blot 分别于麻醉前、麻醉后24h及麻醉后7周取大鼠海马组织,收集蛋白样品使用细胞裂解液,BCA蛋白定量法检测各组蛋白浓度。NR2B用10%分离胶,冷却到室温,把蛋白样品直接上样到十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳加样孔内,每孔上样量30μg,打开电泳仪,上层胶时使用80V电压恒压电泳,而在溴酚蓝进入下层胶时使用120V电压恒压电泳。恒流0.22mA湿转120min,转膜完毕后漂洗,5%脱脂奶粉室温封闭1h。参考一抗说明书,按照适当比例用Western一抗稀释液稀释一抗,4℃过夜。洗涤,按照适当比例用

Western二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育1h。漂洗后进行化学发光,根据一抗的不同,选择合适的曝光时间显影并保存图像。

1.2.3 Morris水迷宫测试 Morris水迷宫检测麻醉后7周大鼠的空间学习记忆能力。大鼠Water Maze水迷宫为上海欣软信息科技有限公司生产,由圆形水池、图像自动采集和处理系统组成。Morris水迷宫测试包括定位航行实验(place navigation)和空间搜索实验(spatial probe test),实验训练阶段连续进行3d,每天训练4次。观察和记录大鼠寻找并爬上平台的路线图及所需时间,记录为潜伏期。

1.3 统计学处理 采用SPSS19.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组海马组织NR2B蛋白表达情况 麻醉前及麻醉后7周,麻醉组和对照组大鼠海马组织NR2B蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$);麻醉后24h,麻醉组大鼠海马组织NR2B蛋白表达明显高于对照组及麻醉前($P < 0.05$),见图1。

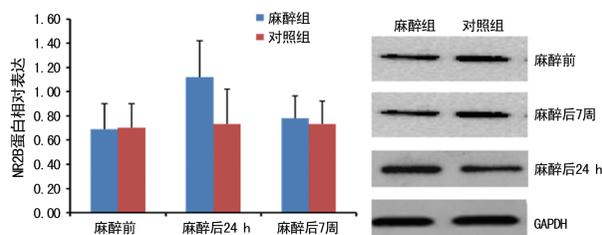


图1 两组海马组织NR2B蛋白表达变化

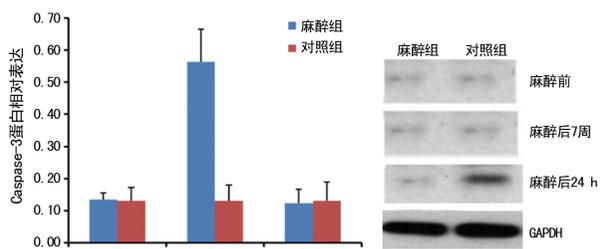


图2 两组大鼠海马组织Caspase-3蛋白表达

表1 各组Morris水迷宫测试情况($\bar{x} \pm s$)

组别	游泳潜伏期(s)			总路程(cm)			速度(cm/s)		
	第1天	第3天	第6天	第1天	第3天	第6天	第1天	第3天	第6天
麻醉组	70.23±8.10	41.03±7.39	11.03±2.04	18.20±2.02	11.03±1.98	4.02±1.80	0.16±0.09	0.17±0.06	0.16±0.06
对照组	56.33±7.82	22.10±8.03	10.03±3.11	13.17±2.05	6.10±1.43	3.89±1.54	0.18±0.07	0.19±0.05	0.18±0.07
t	3.904	5.485	0.850	5.527	6.383	0.174	-0.555	-0.810	-0.686
P	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.2 两组海马组织 Caspase-3 蛋白表达情况 麻醉前及麻醉后 7 周,麻醉组和对照组大鼠海马组织 Caspase-3 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);麻醉后 24 h,麻醉组大鼠海马组织 Caspase-3 蛋白表达明显高于对照组及麻醉前($P<0.05$),见图 2。

2.3 两组大鼠 Morris 水迷宫测试情况 将麻醉后 7 周大鼠进行 Morris 水迷宫测试,麻醉组大鼠第 1、3 天游泳潜伏期、总路程明显高于对照组($P<0.05$)。麻醉组和对照组游泳速度比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

3 讨 论

目前针对全身麻醉药物对中枢神经系统影响的报道较多。研究显示,麻醉药会导致神经细胞的凋亡,对发育期动物中枢神经系统具有不可逆转的损害^[5]。闵娜等^[6]将发育高峰期的大鼠暴露在异氟醚中超过 5 h,发现大鼠的神经细胞发生广泛的退化和死亡。七氟醚为临床上常用的吸入麻醉药,广泛应用于儿童手术,随着越来越多地应用在临床,其对神经、心脏系统的不良反应也受到研究者的关注。之前已有许多关于七氟醚对神经结构和神经认知功能影响的报道。谢思宁等^[7]研究报道,七氟醚对幼鼠发育期中枢神经系统具有损害作用。CIECHANOWICZ 等^[8]将怀孕大鼠长期暴露超剂量的异氟醚中,发现幼鼠中枢神经系统神经发生延迟,但其具体作用机制目前尚未明确。

NMDA 受体在中枢神经系统,尤其在大脑皮层和海马广泛分布。海马体(Hippocampus)是位于脑颞叶内的一个部位,主要负责长时记忆的存储转换和定向等功能^[9]。NMDA 受体具有不同的亚型,与学习、记忆等多种神经功能密切相关。研究显示,NMDA 受体参与诱导细胞的存活和凋亡,在神经元细胞的坏死、凋亡和抗凋亡过程中发挥重要作用^[10]。NR2B 亚基主要表达于发育早期阶段,对 NMDA 受体的功能起着重要作用。因此本研究选择 NR2B 为发育期的监测指标。Caspase 家族与细胞凋亡密切相关,引发的级联反应是细胞凋亡过程的中心环节^[11-12]。Caspase-3 在死亡受体介导的细胞凋亡途径中起关键作用^[13]。本研究结果显示,麻醉后 24 h,麻醉组大鼠海马组织 NR2B 蛋白和 Caspase-3 蛋白表达明显高于对照组及麻醉前($P<0.05$);麻醉前及麻醉后 7 周,麻醉组和对照组大鼠海马组织 NR2B 蛋白和 Caspase-3 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。七氟醚麻醉对幼鼠海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达影响较大,说明七氟醚麻醉对小鼠认知功能影响的机制与海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达有关,但具体的影响机制目前尚不明确,其长期效应有待进一步研究。

步研究。

Morris 水迷宫测试可很好地反映大鼠海马的功能,是研究空间学习记忆的标准实验,广泛应用于神经生物学领域研究^[14]。Morris 水迷宫测试通过在水中设置隐藏平台,记录实验动物寻找平台所用时间和所走路径,判断动物的记忆功能,研究与空间学习记忆相关的脑区功能评价。本研究中,麻醉组大鼠第 1、3 天游泳潜伏期、总路程明显高于对照组($P<0.05$),游泳速度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。因此笔者认为,大鼠接受 2.5%七氟醚麻醉 4 h 会造成海马功能长期损害,影响记忆功能,这与王权等^[15]研究结果一致。2.5%七氟醚对大鼠的运动能力无明显损害。七氟醚可能通过作用于 NMDA 受体,引起行为异常和学习、记忆功能障碍的发生,具体的机制仍需要进一步研究。

综上所述,七氟醚麻醉可即刻造成幼鼠海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达升高,成年海马功能长期损害,影响记忆功能。但成年后海马组织 NR2B、Caspase-3 蛋白表达无明显异常,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 滕清宇,李玮伟,袁红斌,等.全麻药发育期神经毒性机制的研究进展[J].临床麻醉学杂志,2016,32(9):929-931.
- [2] 李建立,侯艳宁.全身麻醉药对发育期大脑影响的研究进展[J].临床麻醉学杂志,2016,32(6):610-613.
- [3] 张广芬,杨建军.NMDA 受体相关抗抑郁药物的研究进展[J].中国药理学通报,2018,34(1):1-4.
- [4] 黄科昌,楚云超,郑观荣,等.caspase-3 在多塞平诱导大鼠神经细胞凋亡中的作用[J].中华麻醉学杂志,2016,36(1):46-48.
- [5] 孙越,孙越,孙满意,等.异氟醚对发育期大鼠海马神经干细胞 p-GSK-3 β 和 β -catenin 表达的影响[J].中华麻醉学杂志,2017,37(1):66-69.
- [6] 闵娜,胡强夫,李晓培,等.异氟醚对新生大鼠海马神经干细胞增殖及分化的影响[J].中国组织工程研究,2016,20(1):118-122.
- [7] 谢思宁,叶虹,李俊发,等.七氟醚对幼鼠海马组织神经元凋亡和 γ -氨基丁酸 A 受体 $\alpha 1/\alpha 2$ 亚型组成及远期空间探索能力的影响[J].国际麻醉学与复苏杂志,2016,37(2):126-131.
- [8] CIECHANOWICZ S,ZHAO H,CHEN Q,et al. Differential effects of sevoflurane on the metastatic potential and chemosensitivity of non-small-cell lung adenocarcinoma and renal cell carcinoma in vitro[J].Br J Anaesth,2018,120(2):368-375.
- [9] 田海涛,田苹,张宝娟,等.艾芬地尔预处理对七氟醚导致的幼年大鼠学习记忆和认知能力损伤的保护作用及机制[J].临床麻醉学杂志,2017,33(7):705-707. (下转第 2196 页)

- refractory ovarian cancer[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(6): 103.
- [8] KATHAWALA R J, KUDELKA A, RIGAS B. The chemoprevention of ovarian cancer: the need and the options[J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2018, 4(3): 250-260.
- [9] DU B W, SHIM J S. Targeting Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer[J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 965.
- [10] SANTAMARIA P G, MORENO-BUENO G, PORTILLO F, et al. EMT: present and future in clinical oncology[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(7): 718-738.
- [11] LIAO T T, YANG M H. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(7): 792-804.
- [12] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [13] KIM D H, XING T S, YANG Z B, et al. Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview[J]. *J Clin Med*, 2017, 7(1): 120-125.
- [14] PRADELLA D, NARO C, SETTE C, et al. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 8.
- [15] PAL M, BHATTACHARYA S, KALYAN G, et al. Cadherin profiling for therapeutic interventions in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and tumorigenesis[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368(2): 137-146.
- [16] LIU C Y, LIN H H, TANG M J, et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 15966-15983.
- [17] HE Y, XIE H, YU P, et al. FOXC2 promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Chem Phar*, 2018, 82(6): 1049-1059.
- [18] ZHANG Y, HUANG P, LIU X, et al. Polyphyllin I inhibits growth and invasion of cisplatin-resistant gastric cancer cells by partially inhibiting CIP2A/PP2A/Akt signaling axis[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 137(3): 305-312.
- [19] MIYAZAKI H, TAKAHASHI R U, PRIETO-VILA M, et al. CD44 exerts a functional role during EMT induction in cisplatin-resistant head and neck cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(11): 10029-10041.
- [20] SKOVIEROVÁ H, OKAJCEKOVÁ T, STRNÁDEL J, et al. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1187-1200.
- [21] DRAK ALSIBAI K, MESEURE D. Tumor microenvironment and noncoding RNAs as co-drivers of epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis[J]. *Dev Dyn*, 2018, 247(3): 405-431.

(收稿日期: 2019-01-20 修回日期: 2019-04-08)

(上接第 2191 页)

- [10] 李珊, 胡喆, 周燕, 等. 趋化因子 MCP-1 对大鼠海马区 NMDA 受体介导的兴奋性突触后电流的影响[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(7): 950-955.
- [11] DOLKA I, KROL M, SAPIERZYNSKI R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study[J]. *Res Vet Sci*, 2016, 105(2): 124-133.
- [12] FLANAGAN L, MEYER M, FAY J, et al. Low levels of Caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: Caspase-3 inhibition as a therapeutic approach[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(2): e2087.
- [13] SÁNCHEZ-MIGALLÓN M C, VALIENTE-SORIANO F J, NADAL-NICOLÁS F M, et al. Apoptotic retinal ganglion cell death after optic nerve transection or crush in mice: delayed RGC loss with BDNF or a caspase 3 inhibitor[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(1): 81-93.
- [14] 任娟娟, 朱昭琼, 王义, 等. 新生期重复吸入七氟醚的大鼠幼年学习记忆功能与海马体积变化[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(5): 470-474.
- [15] 王权, 张超, 王义, 等. 新生期间断重复吸入七氟醚对大鼠学习记忆及 Tau 蛋白和 p-Tau 蛋白的影响[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(3): 257-261.

(收稿日期: 2019-01-12 修回日期: 2019-03-30)