

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.18.007
文章编号: 1005-8982 (2021) 18-0034-05

实验研究·论著

短时间吸入不同浓度七氟醚对幼鼠空间学习 记忆能力及海马神经细胞凋亡的影响

萧治恒, 吴论, 彭学强, 赵立梅, 刘鉴, 梁鸿韬
(中山市中医院, 广东 中山 528400)

摘要: 目的 观察短时间吸入不同浓度七氟醚对幼鼠空间学习记忆能力及海马神经细胞凋亡的影响。**方法** 选择80只SD幼鼠, 均为1月龄, 采取随机数字表法将幼鼠分为对照组(单纯吸氧2h)、1%七氟醚组(吸入1%七氟醚2h)、2%七氟醚组(吸入2%七氟醚2h)与3%七氟醚组(吸入3%七氟醚2h), 每组20只。吸入结束12h后, 各组取5只开展Morris水迷宫实验, 5只取海马组织行苏木精-伊红染色, 5只通过流式细胞分析仪进行细胞凋亡测定, 5只通过激光共聚焦显微镜进行神经元细胞游离钙离子浓度测定。**结果** 2%七氟醚组、3%七氟醚组平台象限停留时间较对照组缩短($P < 0.05$), 穿台次数较对照组减少($P < 0.05$)。2%七氟醚组、3%七氟醚组凋亡神经元数目较对照组增加($P < 0.05$)。2%七氟醚组、3%七氟醚组早期凋亡率、晚期凋亡率较对照组增加($P < 0.05$)。2%七氟醚组、3%七氟醚组荧光强度较对照组增加($P < 0.05$), 钙离子浓度较对照组升高($P < 0.05$)。**结论** 短时间内吸入1%七氟醚并不会对幼鼠空间学习记忆能力造成影响, 短时间吸入2%或者3%七氟醚可降低其空间学习记忆能力, 促进海马神经细胞凋亡, 提高细胞钙离子浓度可能为触发凋亡的机制。

关键词: 细胞凋亡; 七氟醚; 不同浓度; 大鼠; 神经元

中图分类号: R322.81

文献标识码: A

Influence of inhaling different concentrations of sevoflurane in a short time on spatial learning and memory ability and hippocampal neuronal apoptosis in immature rats

Zhi-heng Xiao, Lun Wu, Xue-qiang Peng, Li-mei Zhao, Jian Liu, Hong-tao Liang
(Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: Objective To observe the influence of inhaling different concentrations of sevoflurane in a short time on spatial learning and memory ability and hippocampal neuronal apoptosis in immature rats. **Methods** Eighty SD rats aged only one month were selected and divided into control group (2 h of oxygen inhalation), 1% sevoflurane group (inhaling 1% sevoflurane for 2 h), 2% sevoflurane group (inhaling 2% sevoflurane for 2 h) and 3% sevoflurane group (inhaling 3% sevoflurane for 2 h) by random number table method, with 20 rats in each group. At 12 h after inhalation, 5 rats were selected from each group for Morris water maze test. Hippocampal tissues of 5 rats were obtained for hematoxylin-eosin (HE) staining. The neuronal apoptosis in 5 rats was determined by flow cytometry, and the concentration of free calcium ions in the neurons derived from the remaining 5 rats was detected via confocal laser scanning microscopy. **Results** Compared with the control group, the time spent on traveling in the quadrant where the target platform was located was shorter, and the number of times crossing the target platform was fewer in the 2% sevoflurane group and the 3% sevoflurane group ($P < 0.05$). The number of apoptotic neurons, as well as early apoptotic rate and late apoptotic rate of hippocampal neurons was greater in the 2% sevoflurane

收稿日期: 2021-03-16

group and the 3% sevoflurane group relative to the control group ($P < 0.05$). Besides, fluorescence intensity and concentration of calcium ions in the neurons in the 2% sevoflurane group and 3% sevoflurane group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Inhaling 2% or 3% sevoflurane rather than 1% sevoflurane in a short time will dampen the spatial learning and memory ability and promote apoptosis of hippocampal neurons, which may be triggered via the increasing level of calcium ions in the neurons.

Keywords: apoptosis; sevoflurane; different concentrations; immature rat; neuron

现阶段, 麻醉药物神经毒性是国际麻醉界的主要研究热点之一, 相关研究指出, 相较于其他麻醉药物, 七氟醚效果更优越, 患者不良反应更少, 已在婴幼儿手术麻醉中得到广泛使用^[1-4]。亦有报道表明, 七氟醚可能提高婴幼儿术后认知异常发生率^[5-6]。选择何种浓度七氟醚开展婴幼儿手术麻醉依然有待进一步探讨。本文以 80 只 SD 幼鼠作为实验对象, 探讨短时间吸入不同浓度七氟醚对幼鼠空间学习记忆能力及海马神经细胞凋亡的影响, 以期为婴幼儿患者七氟醚的应用提供有效指导。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

选取无特异病原体 (specific-pathogen free, SPF) 级雄性 SD 幼鼠 80 只 [生产许可证号: SCXK (粤) 2013-0002, 使用许可证号: SYXK (粤) 2013-00011], 均为 1 个月龄, 体重 100 ~ 110 g, 平均 (105 ± 5) g, 均购自广东省医学实验动物中心。选择实验室平衡饲料喂养, 使其自由进食、饮水, 控制光照与黑暗各 12 h, 湿度 55% ~ 58%, 室温 22 ~ 25℃, 确保饲养环境安静。

1.2 试剂与仪器

七氟醚 (上海恒瑞医药有限公司), 麻醉气体监测仪 (美国 Datex-Ohmeda 公司), Morris 水迷宫实验装置 (上海海软隆科技发展公司), Fluo3-AM 荧光指示剂、Pluronic F-127 (日本同仁化学研究所), 激光共聚焦显微镜 (型号: FV10i, 日本奥林巴斯公司), 流式细胞分析仪 (型号: BD FACSAria, 美国 Becton Dickinson 公司)。

1.3 方法

1.3.1 幼鼠分组与模型复制 实验开始前, 所有幼鼠开展 4 d 水迷宫学习训练, 然后采取随机数字表法将其分为 4 组, 每组 20 只。对照组单纯吸氧 2 h, 控制氧流量 2.0 L/min; 在和对照组幼鼠相同吸氧条

件下, 1% 七氟醚组吸入 1% 七氟醚 2 h, 2% 七氟醚组吸入 2% 七氟醚 2 h, 3% 七氟醚组吸入 3% 七氟醚 2 h, 采用麻醉气体监测仪进行气体浓度监测, 并使用挥发罐合理调控七氟醚具体吸入浓度。

1.3.2 Morris 水迷宫实验 幼鼠吸入结束后 12 h, 各组取 5 只幼鼠开展 Morris 水迷宫实验, 让其在水池里自由游泳 60 s, 详细记录其平台象限停留时间及穿台次数。

1.3.3 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色 幼鼠吸入结束后 12 h, 各组取 5 只幼鼠, 采用多聚甲醛进行心脏灌注, 然后取出全脑制作石蜡切片, HE 染色后详细观察幼鼠海马组织神经元形态学改变情况; 每只幼鼠选择 10 张切片, 并对海马神经元凋亡详细数目进行计数, 计算平均值。

1.3.4 细胞凋亡 幼鼠吸入结束后 12 h, 各组取 5 只幼鼠断头处死, 采取无菌手术器械将其大脑取出, 于放置磷酸盐缓冲液冰盘上进行双侧海马分离 (3 min 内完成), 然后制备单细胞悬液。采取锥虫蓝进行细胞活力检测, 确保活细胞 > 95%。用 2.5 ml 含有血清培养基进行细胞重悬, 获得 5×10^5 个/ml 的细胞浓度。在流式管里面加入 100 μ l 细胞悬液, 再放入 5 μ l Annexin V 及 10 μ l 碘化丙啶溶液。置于室温条件下避光反应 20 min, 并于 1 h 内用流式细胞分析仪进行凋亡测定。通过 BD FACSDria Softwa 完成结果分析。

1.3.5 钙离子浓度 幼鼠吸入结束后 12 h, 各组取 5 只幼鼠, 断头取其海马组织, 制备单细胞悬液, 制备细胞图片, 确保细胞贴壁。采取 Hank 平衡盐溶液对 1 mmol/L Fluo3-AM 母液进行稀释, 获得 5 μ mol/L 工作液。加入该工作液 5 μ mol/L 及 0.05% Pluronic F-127, 有效覆盖细胞。持续孵育 45 min 后用 Hank 平衡盐溶液洗涤细胞 3 次, 有效去除工作液。然后于培养箱里避光孵育 10 min。采用 75% 酒精持续浸泡 5 min, 使用处理过的盖玻片将其轻轻盖上, 防止产生气泡。在激光共聚焦显微镜相应样

品小槽里放置上述负载完成后的细胞涂片。控制激发光 488 nm 及发射光 530 nm。于低倍镜下发现神经细胞(见图 1)，再于 ×40 高倍物镜下完成扫描拍照。通过荧光强度变化间接反映钙离子水平的变化(见图 2)。

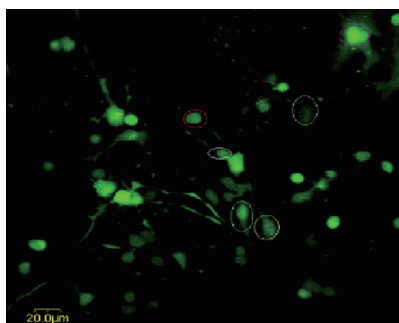


图 1 海马神经元选定图 (×10)

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 SNK-*q* 检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Morris 水迷宫实验结果比较

各组平台象限停留时间、穿台次数比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 2% 七氟醚组、3% 七氟醚组平台象限停留时间较对照组缩短 ($P < 0.05$), 穿台次数较对照组减少 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组 HE 染色结果比较

对照组、1% 七氟醚组、2% 七氟醚组及 3% 七氟

表 1 各组 Morris 水迷宫实验结果比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	平台象限停留时间/s	穿台次数
对照组	26.54 ± 2.87	1.85 ± 0.21
1% 七氟醚组	24.07 ± 2.68	1.69 ± 0.20
2% 七氟醚组	12.50 ± 1.49 ^{①②}	0.75 ± 0.08 ^{①②}
3% 七氟醚组	12.38 ± 1.46 ^{①②}	0.67 ± 0.07 ^{①②}
F 值	56.839	79.637
P 值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 1% 七氟醚组比较, $P < 0.05$ 。

醚组的凋亡神经元数目分别为 (1.92 ± 0.22) 个/视野、(2.14 ± 0.25) 个/视野、(38.57 ± 4.16) 个/视野及 (40.35 ± 4.38) 个/视野, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=56.839, P=0.000$), 2% 七氟醚组、3% 七氟醚组较对照组增加 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.3 各组海马神经元凋亡率比较

各组早期凋亡率、晚期凋亡率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 2% 七氟醚组、3% 七氟醚组较对照组增加 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 各组细胞荧光强度、钙离子浓度比较

各组荧光强度、钙离子浓度比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 2% 七氟醚组、3% 七氟醚组荧光强度较对照组增加 ($P < 0.05$), 钙离子浓度较对照组升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

3 讨论

有研究指出, 幼鼠七氟醚最低肺泡的有效浓度为 2.3% 左右, 吸入大约 2.3% ~ 3.5% 七氟醚不会对其心血管功能与体内重要器官组织血流灌注产

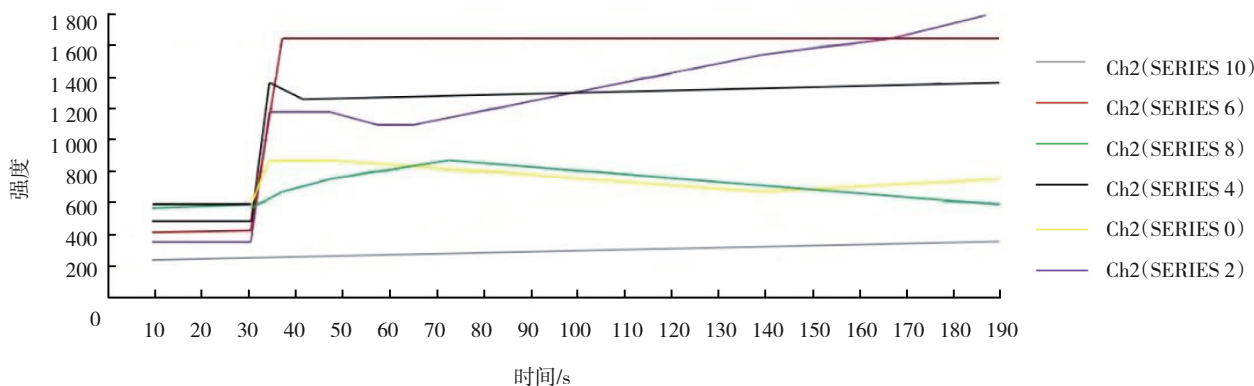
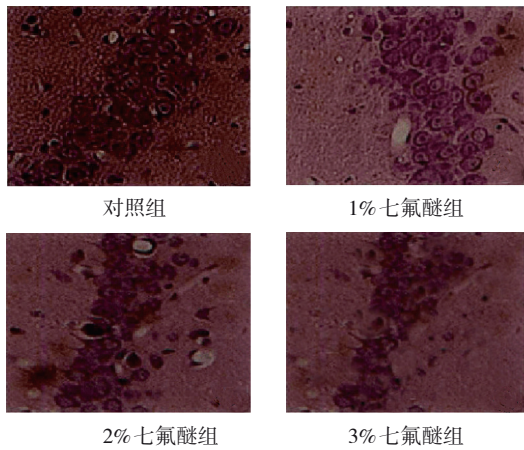


图 2 实时监测荧光强度图



对照组与1%七氟醚组细胞核呈现蓝色,并且神经元细胞核体积较大,具有规整性;2%七氟醚组、3%七氟醚组细胞皱缩,并且核体积缩小,具有形态不规整特点。

图3 各组海马组织神经元形态学改变 (HE × 400)

表3 各组海马神经元凋亡率比较 (n=5, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率
对照组	11.23 ± 1.28	8.12 ± 0.93
1%七氟醚组	12.58 ± 1.30	9.26 ± 1.05
2%七氟醚组	24.36 ± 3.78 ^{①②}	17.38 ± 1.87 ^{①②}
3%七氟醚组	26.85 ± 3.81 ^{①②}	19.36 ± 2.14 ^{①②}
F值	39.773	63.928
P值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, P < 0.05; ②与1%七氟醚组比较, P < 0.05。

表4 各组细胞荧光强度、钙离子浓度比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度	钙离子浓度/(nmol/L)
对照组	104.36 ± 18.67	79.50 ± 11.28
1%七氟醚组	108.79 ± 19.98	82.36 ± 11.94
2%七氟醚组	287.53 ± 35.12 ^{①②}	185.37 ± 26.85 ^{①②}
3%七氟醚组	296.37 ± 36.54 ^{①②}	193.58 ± 27.62 ^{①②}
F值	69.178	44.936
P值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, P < 0.05; ②与1%七氟醚组比较, P < 0.05。

生影响^[7-8]。故笔者选择吸入1%、2%与3%浓度的七氟醚开展研究。有报道认为,吸入七氟醚能够影响认知功能,同时雄性幼鼠敏感性较雌性幼鼠更高^[9-10]。故本研究全部选择雄性幼鼠作为实验对象。Morris水迷宫实验能客观评价幼鼠认知功能,

具有操作简单、数据误差较小等优点。Morris水迷宫实验还能够检测实验动物运动功能、学习记忆能力及感觉障碍等,客观反映动物认知功能^[11-12]。本研究中2%七氟醚组、3%七氟醚组平台象限停留时间、穿台次数明显少于其余两组,且2%七氟醚组与3%七氟醚组、对照组与1%七氟醚组比较无显著差异,表明短时间吸入高浓度七氟醚可降低幼鼠空间学习记忆能力。HE染色显示,对照组与1%七氟醚组幼鼠神经元细胞核体积较其他两组大,同时具有规整性,短时间吸入高浓度七氟醚组幼鼠细胞皱缩,并且形态不规整,海马神经元凋亡数明显高于低浓度七氟醚组与对照组,提示高浓度七氟醚能够导致海马神经元产生形态学改变,加快海马神经元凋亡。本研究结果显示,2%七氟醚组、3%七氟醚组海马神经元早期凋亡率及晚期凋亡率明显高于其余两组,与徐桂萍等^[13]研究结论相符。说明短时间吸入2%或者3%七氟醚可提高幼鼠海马神经细胞早期与晚期凋亡率。细胞之中钙离子水平升高属于细胞凋亡的重要条件,为进一步明确短时间吸入不同浓度七氟醚是否会对细胞之中钙稳态造成影响,继而导致其凋亡。本实验制备了幼鼠海马神经细胞涂片,并进行钙荧光试剂负载,通过激光共聚焦显微镜了解钙离子变化。若实验培养黏附细胞,则其将牢固黏附于相应培养皿表面或者载玻片表面,而新鲜海马组织获得的单细胞悬液,其神经元贴壁具有一定难度^[14]。为有效解决该问题,需要处理载玻片。一般通过聚乙烯醇、多聚赖氨酸或者蛋清等作为相应粘贴剂,实验过程中需结合细胞特性合理选择处理手段^[15]。本研究通过多聚赖氨酸进行载玻片,最终海马神经细胞贴壁。考虑各种细胞特性以及活性,确保实验染色成功具有较强技术性^[16]。本研究最终确定所用Fluo 3-AM浓度应该为5 μmol/L,且持续孵育45 min。本研究显示,2%七氟醚组、3%七氟醚组荧光强度、钙离子浓度显著高于1%七氟醚组与对照组,提示高浓度七氟醚导致海马神经细胞凋亡的同时,细胞之中钙离子增加,并由于钙失衡导致神经细胞凋亡。本研究发现,短时间吸入低浓度七氟醚麻醉不会对幼鼠学习记忆能力产生严重影响,不代表幼鼠随时间逐渐延长,不会产生神经行为改变,该观点有待后续研究进一

步论证。

综上所述,短时间吸入低浓度七氟醚并不会严重影响幼鼠学习记忆能力,但是短时间吸入高浓度七氟醚能够降低其认知能力,提高海马神经细胞凋亡率,增加细胞之中钙离子浓度,导致细胞凋亡。

参 考 文 献 :

- [1] CHEN Y, NIE H, TIAN L, et al. Sevoflurane preconditioning-induced neuroprotection is associated with Akt activation via carboxy-terminal modulator protein inhibition[J]. Br J Anaesth, 2015, 114(2): 327-335.
- [2] LIU B, GU Y C, XIAO H Y, et al. Altered metabolomic profiles may be associated with sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal rats[J]. Neurochem Res, 2015, 40(4): 788-799.
- [3] MAKARYUS R, LEE H, FENG T, et al. Brain maturation in neonatal rodents is impeded by sevoflurane anesthesia[J]. Anesthesiology, 2015, 123(3): 557-568.
- [4] 巩超, 张小霓, 李士通. 七氟醚对高位脊髓损伤幼鼠心肌钙感受体表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(7): 879-882.
- [5] 孙敏, 殷积慧, 刘怡, 等. NF- κ B在七氟醚诱发小鼠小胶质细胞释放炎症因子中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(7): 808-810.
- [6] AMROCK L G, STARNER M L, MURPHY K L, et al. Long-term effects of single or multiple neonatal sevoflurane exposures on rat hippocampal ultrastructure[J]. Anesthesiology, 2015, 122(1): 87-95.
- [7] ZHANG Y, TIAN S Y, LI Y W, et al. Sevoflurane preconditioning improving cerebral focal ischemia-reperfusion damage in a rat model via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Gene, 2015, 569(1): 60-65.
- [8] PEREZ-ZOGHBI J F, ZHU W, GRAFE M R, et al. Dexmedetomidine-mediated neuroprotection against sevoflurane-induced neurotoxicity extends to several brain regions in neonatal rats[J]. British Journal of Anaesthesia, 2017, 119(3): 506-516.
- [9] ZHOU X, LI W D, YUAN B L, et al. Lithium treatment prevents apoptosis in neonatal rat hippocampus resulting from sevoflurane exposure[J]. Neurochem Res, 2016, 41(8): 1993-2005.
- [10] 冯艳, 杨小霖, 陈小波, 等. 吸入不同浓度七氟醚患者全血游离六氟异丙醇浓度的比较:与苏醒期躁动的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(3): 274-278.
- [11] 杨晓楠, 李鹏涛, 赵梦, 等. 七氟醚对老年幼鼠认知功能及大脑额叶 GABAR 1 和 NMDAR2B 表达的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(5): 468-472.
- [12] 张琦, 李亚南, 郭鹏, 等. 尼莫地平复合 7.5% 高渗盐水对七氟醚诱导老龄幼鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(12): 1215-1219.
- [13] 徐桂萍, 瞿莉, 马雪萍. 七氟醚麻醉对幼鼠海马神经元 GAP-43 和 NCAM 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(3): 300-302.
- [14] 文雯, 曹波, 沈峰岩, 等. 乙琥胺对七氟醚诱发幼鼠躁动的抑制作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(11): 74-76.
- [15] 刘延辉, 夏淑轩, 刘雅芳, 等. Cdk5-CRMP 通路在七氟醚抑制新生幼鼠前额叶皮层树突发育中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(10): 1729-1736.
- [16] 景灵, 斯妍娜, 鲍红光, 等. 不同浓度七氟醚对老年幼鼠海马神经发生和恐惧记忆的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(7): 698-701.

(李科 编辑)

本文引用格式: 萧治恒, 吴论, 彭学强, 等. 短时间吸入不同浓度七氟醚对幼鼠空间学习记忆能力及海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(18): 34-38.

Cite this article as: XIAO Z H, WU L, PENG X Q, et al. Influence of inhaling different concentrations of sevoflurane in a short time on spatial learning and memory ability and hippocampal neuronal apoptosis in immature rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(18): 34-38.