

线粒体自噬在幼年大鼠七氟烷麻醉后发育期神经毒性中的作用

缪佳敏 陈钢

[摘要] 目的 探索线粒体自噬在幼年大鼠七氟烷麻醉后发育期神经毒性中的作用。方法 选取7日龄SD大鼠40只,随机分为4组,每组10只。A组给予2 L/min的新鲜气体吸入5 h,B组给予2 L/min的新鲜气体+2%七氟烷麻醉5 h,C组给予腹腔注射缬氨霉素后吸入2 L/min新鲜气体5 h,D组给予腹腔注射缬氨霉素后,吸入2 L/min的新鲜气体+2%七氟烷麻醉5 h。各组大鼠模型构建成功后第7天观察行为学新的物体识别试验表现。结果 行为学新的物体识别试验表明A组和D组辨别指数均高于B组,差异有统计学意义(t 分别=21.05、11.40, P 均 <0.05);但C组辨别指数与A组比较,差异无统计学意义($t=1.63$, $P>0.05$)。结论 线粒体自噬水平上调可减轻幼年大鼠七氟烷麻醉后发育期神经毒性,这为预防婴幼儿全麻后神经毒性提供了未来可能的干预靶点。

[关键词] 七氟烷; 线粒体自噬; 发育期神经毒性; 幼鼠

Role of mitophagy in sevoflurane-induced developmental neurotoxicity in rat pups MIAO Jiamin, CHEN Gang. Department of Anesthesiology, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China.

[Abstract] **Objective** To explore the role of mitophagy in sevoflurane-induced developmental neurotoxicity in rat pups. **Methods** Totally forty 7-day-old rat pups were selected and randomly divided into four groups, with 10 rat pups in each group. Group A was given 2 L/min fresh air for 5 hours, group B was given 2 L/min fresh air with 2% sevoflurane for 5 hours, group C was given valinomycin and then 2 L/min fresh air for 5 hours, group D was given valinomycin and then 2 L/min fresh air with 2% sevoflurane for 5 hours. New object recognition test was conducted among four group on 7th day after successfully modeling. **Results** New object recognition test revealed that recognition index of group A and group D were higher than that of group B ($t=21.05, 11.40, P<0.05$). There was no significantly difference in recognition index between group A and group C ($t=1.63, P>0.05$). **Conclusion** Up-regulation of mitophagy can relieve sevoflurane-induced developmental neurotoxicity. It provides a new medical target for preventing sevoflurane-induced developmental neurotoxicity.

[Key words] sevoflurane; mitophagy; developmental neurotoxicity; rat pups

美国每年婴幼儿的全麻总量约为150万人次,占全部儿童全麻总量的25%^[1]。根据人口比例,中国估计每年的婴幼儿的全麻总量近700万人次,并且还在逐年增加。吸入麻醉药对婴幼儿发育期神经系统的毒性作用也越来越受到关注。因此,阐明

吸入麻醉药引起的发育期神经系统毒性的产生机理,并找到合适的干预手段和治疗策略是当前研究的热点之一。七氟烷由于起效快、作用时间短及对呼吸道刺激小等优点成为目前临床上婴幼儿最常用的吸入性全身麻醉药。在动物实验中,七氟烷已经被充分证明能够引起神经毒性作用,但是其中的机制并不清楚。本次研究使用7日龄大鼠建立七氟烷诱导的发育期神经毒性模型,并用线粒体自噬诱导剂上调线粒体自噬水平,探索线粒体自噬在七氟

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.002.003

基金项目:浙江省自然科学基金(LY16H090008)

作者单位:310016 浙江杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院麻醉科

烷诱导的发育期神经毒性中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本次研究时间为2017年8月至2018年12月。本研究采用由浙江大学动物实验中心提供的7日龄雄性、体重20~25 g健康大鼠40只,同窝幼鼠与母鼠一起饲养,饲养室温度保持在20℃~25℃,相对湿度50%~65%,饲养环境保持安静,提供适当的昼夜光变化周期(12 h光照,12 h黑暗)。大鼠随机分为A、B、C、D四组,每组10只,四组活动度等一般情况无明显差异。

1.2 方法

1.2.1 线粒体自噬水平干预与模型构建 在获得7日龄大鼠当天,A组大鼠予以吸入2 L/min新鲜气体5 h;B组大鼠予以吸入2 L/min的新鲜气体+2%七氟烷麻醉5 h;C组大鼠予以腹腔注射自噬诱导剂(缬氨霉素)后,吸入2 L/min新鲜气体5 h;D组大鼠予以腹腔注射缬氨霉素后,吸入2 L/min的新鲜气体+2%七氟烷麻醉5 h。模型构建成功后继续按上述环境条件饲养。

1.2.2 行为学检测(新物体识别实验) 在模型构建成功后第7天进行行为学检测。实验装置为底面为40 cm×40 cm的灰色正方形,四周有墙壁,壁高45 cm。在进行测试或训练前24 h,将动物放在测试的房间内,适应测试环境。首先,在实验装置内放置A、B两个物体,A、B物体完全一样。将A、B两个物体放在一侧壁的左右两端,大鼠背朝两物体放入场地内,并且大鼠鼻尖距离两物的长度要一致。放入后立即开启录像设备,记录大鼠与物体接触的情况,包括鼻子或嘴巴触及物体的次数和距离物体2~3 cm范围内探究的时间(前爪搭在物体上、鼻子嗅物体、舔物体等均属探究物体,摆个架势或爬到物体上不动不能算是对新物体的探究)。10 min结束后,立即将大鼠放回测试房间的鼠盒内。待大鼠休息1 h后开始正式测试,这时将场地内的B物体换成新物体C,观察大鼠对C物体的探究情况。观察2~5 min。通过观测指标计算辨别指数,辨别指数=(N-F)/(N+F),“N”表示测试期时动物对新奇物体(C)的探索时间(s),“F”表示测试期时动物对熟悉物体(B)的探索时间(s)。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0对实验数据进行统计学处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料比较采用独立样本t检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

四组大鼠辨别指数比较见表1。

表1 四组大鼠辨别指数比较

组别	n	辨别指数
A组	10	0.62 ± 0.03*
B组	10	0.38 ± 0.02
C组	10	0.59 ± 0.05
D组	10	0.51 ± 0.03*

注:*:与B组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,四组大鼠辨别指数比较,差异有统计学意义($F=8.81, P < 0.05$)。两两比较发现,A组和D组辨别指数均高于B组,差异有统计学意义(t 分别=21.05、11.40, P 均 < 0.05);但C组辨别指数与A组比较,差异无统计学意义($t=1.63, P > 0.05$)。

3 讨论

国内外研究表明,新生大鼠暴露于3%的七氟烷可引起大鼠大脑皮层神经元凋亡相关蛋白caspase的活化和神经元A β -淀粉样蛋白水平的升高,而肌醇1,4,5-三磷酸受体拮抗剂2-氨基乙基二苯基硼酸可以减弱七氟烷诱发的caspase-3活化和 β -淀粉样蛋白聚集^[2]。行为学测试也发现,新生大鼠吸入3%七氟烷出现了认知功能障碍^[3],给予糖原合成酶激酶3 β 抑制剂锂盐能够改善七氟烷引起的大鼠认知损伤^[4]。这些证据表明七氟烷引起发育期大鼠神经系统损伤,而其中的机制并不清楚。

本次研究结果显示,B组(吸入新鲜气体+七氟烷麻醉)大鼠辨别指数明显低于A组(吸入新鲜气体)大鼠,说明临床常用浓度的七氟烷(2%)可成功建立七氟烷麻醉后幼年大鼠神经毒性模型,诱发出幼年大鼠出现学习、记忆功能障碍。但是D组(线粒体自噬诱导剂+吸入新鲜气体+七氟烷麻醉)大鼠辨别指数明显升高,高于B组(吸入新鲜气体+七氟烷麻醉),说明线粒体自噬诱导剂上调线粒体自噬水平后,神经毒性减轻。由此推断七氟烷可能通过引起线粒体自噬障碍,诱导幼年大鼠发育期神经毒性,其具体机制可能是线粒体自噬的激活可使紊乱的蛋白质稳态恢复正常,并调控相关基因表达,抑制了七氟烷麻醉后相关神经损伤。

自噬能快速地体内能量提供燃料,因此对“细胞对饥饿的响应”及其他类型的压力至关重要。被感染之后,自噬能消灭掉入侵的细胞菌和病毒,还影响着胚胎的发展和细胞变异。此外,细胞还利

用自噬来消除受损的蛋白质和细胞器,因而自噬是一种高质量的控制机制,对抵抗年老所导致的不良影响至关重要^[5]。自噬可以选择性降解特定的细胞器,根据靶细胞器的不同可分为线粒体自噬、内质网自噬、过氧化酶体自噬以及核糖体自噬等^[6]。线粒体自噬是神经元清除树突和轴突中受损线粒体的主要方式^[7,8],在静息状态下,只占总体积2%的人类大脑的耗氧量却占用全身耗氧量的25%,神经元需要大量线粒体以维持正常的细胞功能,而神经元的高度分化和不可分裂特性,决定了神经元更易堆积活性氧而造成线粒体损伤,及时清除损伤线粒体对保护神经元免受活性氧损伤及维持正常功能至关重要。研究表明,线粒体自噬障碍在多种中枢神经系统疾病如帕金森病、阿尔兹海默病、肌萎缩侧索硬化症、亨廷顿舞蹈病以及衰老的生理病理过程中起着重要的作用^[9-12]。

综上所述,本研究明确了线粒体自噬能力调控中在吸入麻醉药诱发的发育期神经毒性中的作用,为预防婴幼儿全麻后神经毒性提供了未来可能的干预靶点。

参考文献

- 1 Cavuoto KM, Rodriguez LI, Tutiven J, et al. General anesthesia in the pediatric population[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2014, 25(5): 411-416.
- 2 Lu Y, Wu X, Dong Y, et al. Anesthetic sevoflurane causes neurotoxicity differently in neonatal naive and Alzheimer disease transgenic mice[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(6): 1404-1416.
- 3 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.
- 4 Tao G, Zhang J, Zhang L, et al. Sevoflurane induces tau phosphorylation and glycogen synthase kinase 3beta activation in young mice[J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(3): 510-527.
- 5 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- 6 Mizumura K, Choi AM, Ryter SW. Emerging role of selective autophagy in human diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5(1): 244.
- 7 Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 31-42.
- 8 Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons[J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(4): 407-417.
- 9 Abeliovich A. Parkinson's disease: Mitochondrial damage control[J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 744-745.
- 10 Batlevi Y, La Spada AR. Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 43(1): 46-51.
- 11 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- 12 Glass M, Dragunow M, Faull RL. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease[J]. *Neuroscience*, 2000, 97(3): 505-519.

(收稿日期 2019-10-24)

(本文编辑 蔡华波)