

网络出版时间: 2020-4-7 16:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.006.html>

新生小鼠七氟醚暴露对其青春期记忆及突触可塑性的影响

王加仑, 廉海光, 林凤颜, 李 建

摘要 目的 探讨小鼠在新生期七氟醚接触暴露对其青春期记忆和突触可塑性的影响。方法 30 只新生小鼠(6~7 d 龄)随机分为对照组和七氟醚暴露组,每组 15 只。对照组新生小鼠不进行七氟醚暴露,七氟醚暴露组新生小鼠采用 3.5% 七氟醚麻醉 30 min,然后用 3% 七氟醚麻醉 30 min,最后用 2.5% 七氟醚麻醉 30 min。在 2 月龄时,通过 Morris 水迷宫测试、关联性恐惧与条件恐惧测试和三箱交互行为学测试法分别评估各组小鼠的空间记忆、恐惧记忆和社交记忆;免疫组化检测各组小鼠的海马区半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 和脑源性神经营养因子(BDNF)水平,采用全细胞膜片钳评价各组小鼠的 GABA 能神经元微小兴奋性突触后电流(mEPSC)的频率和幅度。结果 行为学实验结果显示,与对照组比较,七氟醚暴露组小鼠在 2 月龄时出现空间记忆、恐惧记忆及社交记忆障碍($P < 0.001$)。免疫组化结果显示,与对照组比较,七氟醚暴露组小鼠在 2 月龄时海马区 BDNF 阳性细胞数明显降低($P < 0.001$),Caspase-3 阳性细胞数明显增高($P < 0.001$)。全细胞膜片钳结果显示,与对照组比较,七氟醚暴露组小鼠在 2 月龄时 GABA 能神经元 mEPSC 频率和振幅均明显降低(均 $P < 0.01$)。结论 新生小鼠七氟醚暴露可导致其青春期神经退行性变、记忆障碍和突触可塑性降低。

关键词 七氟醚;学习记忆;突触可塑性

中图分类号 R 114

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0513-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.006

在动物模型中研究^[1-2]表明,新生期一些麻醉剂的暴露可导致长期认知功能和记忆障碍。而在新生儿期-幼儿期临床麻醉的研究的结果中存在争议,有研究^[3]认为麻醉剂对认知无影响,而大部分研究^[4-6]表明麻醉剂可导致多种神经认知障碍,尤其是在有麻醉史的患儿,其发育和行为呈现出一定的缺陷。这种结果的不同可能来源于麻醉剂型、麻醉深度、麻醉时间、麻醉史和个体的差异。另外,部

分麻醉造成的认知功能损伤能在麻醉术后恢复^[7],因此,探索麻醉剂对神经发育的长期效应更有助于新生儿期麻醉应用的管理。七氟醚为新生儿科常用的吸入性麻醉剂。现采用 6~7 d 龄新生小鼠,给予三阶段七氟醚暴露,在 2 月龄时通过行为学实验及全细胞膜片钳检测小鼠学习记忆能力及突触的可塑性,从而阐明新生期小鼠七氟醚暴露对发育期学习记忆能力及突触可塑性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 C57/BL6 新生鼠(6~7 d 龄)购自海南省药物研究所 [SCXK(琼)2015-0007],饲养于海南省药品检验所的相对湿度 45%~55%、每天光照 12 h 条件下的 SPF 动物房 [SYXK(琼)2016-0009],动物实验通过海南省药品检验所实验动物伦理委员会批准(No. HNYJS201811043)。

1.1.2 主要试剂 抗脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)抗体(#sc-4012)购自美国 Santa Cruz 公司;抗半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)抗体(#ab58962)购自美国 Abcam 公司。
1.1.3 主要仪器 Morris 水迷宫视频分析系统(型号: SA201)和条件与关联条件恐惧分析系统(型号: SA897)购自江苏赛昂斯生物科技有限公司;社交交互三箱实验分析系统(型号: SX152)购自上海欣软信息科技有限公司;单细胞膜片钳记录分析系统(型号: MutiClamp 700B)购自美国 Molecular Devices 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠七氟醚暴露与分组 30 只新生鼠随机分为对照组和七氟醚暴露组,每组 15 只。对照组不进行麻醉暴露;七氟醚暴露组:新生鼠放入保温盒中,控制温度在 36℃,本研究模拟临床麻醉状态,采用三阶段递减浓度的七氟醚进行麻醉,首先,用 3.5% 七氟醚麻醉 30 min,然后用 3% 七氟醚麻醉 30 min,最后用 2.5% 七氟醚麻醉 30 min,共 1.5 h。麻醉期间用气体分析仪监测保温盒内二氧化碳和七氟醚浓度。麻醉结束后回笼,2 月龄时进行后续的行

2020-01-06 接收

基金项目: 海南省医学科技攻关计划项目(编号: 201704248)

作者单位: 海口市妇幼保健院麻醉科,海口 570206

作者简介: 王加仑,男,主治医师;

李 建,男,副主任医师,责任作者, E-mail: lvminbbvv@163.com

为学等实验。

1.2.2 Morris 水迷宫测试 水迷宫中加入二氧化钛使水混浊,水温控制在 20 ℃。将小鼠从不同位置放入水池,记录小鼠找到平台的潜伏期,将平台撤去,记录小鼠穿越平台的次数以及在平台象限停留时间。

1.2.3 三箱交互行为学测试 三箱装置中每个侧室均有一个圆形塑料笼,实验包括四个阶段,每次持续 10 min。在第一阶段,小鼠被限制在中间室;第二阶段,允许小鼠自由探索;第三阶段,在两侧的笼中分别放入陌生小鼠 1 及黑色立方体,允许小鼠探索 10 min;第四阶段,将黑色立方体替换成陌生小鼠 2。记录小鼠社交互动时间。

1.2.4 关联性恐惧与条件恐惧测试 在恐惧实验中,小鼠被放入条件反射室中,用 3 Hz 频率声音刺激 20 s 和电刺激 1 s,记录小鼠听到声音时静止次数。关联性恐惧为将小鼠放入反射室中小鼠静止次数。

1.2.5 BDNF 及 Caspase-3 免疫组化 鼠脑组织经 4% PFA 固定、30% 蔗糖脱水、石蜡包埋后 5 μm 切片,先用枸橼酸钠高温修复后,过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,之后以 1:200 稀释比例孵育 I 抗体 (BDNF 及 Caspase-3),4 ℃ 过夜。次日,PBS 洗涤后用 HRP 标记的二抗孵育 1 h,之后用 DAB 显色液显影后显微镜拍照。利用 Image J 软件对 BDNF 及 Caspase-3 的阳性细胞进行计数。

1.2.6 全细胞膜片钳记录微小兴奋性突触后电流 小鼠断头取脑,预冷人工脑脊液灌注后振动机片钳作 300 μm 海马区域冠状切面脑片,室温恢复 30 min 后放入记录箱,用人工脑脊液持续灌流,在显微镜下寻找海马区 GABA 能神经元。GABA 能神经元一般呈卵圆形,长轴约 10 μm。并且通过两种方法挑选出 GABA 能神经元,首先,GABA 能神经元相对于其它神经元有较小的膜电容及膜时间常数,其次,GABA 能神经元的微小兴奋性突触后电流 (miniature excitatory postsynaptic current, mEPSC) 有更快的运动幅。将 GABA 能神经元挑出,将细胞钳制在 -70 mV,并用 300~400 pA 电流刺激 50 ms,记录 mEPSC 峰值电流与频率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对于两组定量资料的比较,采用成组 *t* 检验;多组定量资料的比较,数据在满足正态分布和方差齐的条件下,采用方差分析事后检验。当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠在新生期七氟醚暴露可损伤青春期空间定位的记忆能力 通过 Morris 水迷宫实验研究小鼠在新生期七氟醚暴露对青春期 (2 月龄) 空间定位的记忆能力的影响。对照组第 1~5 天小鼠寻找平台的延迟时间 (逃避潜伏期) 分别为 (78.79 ± 9.25)、(31.25 ± 3.56)、(18.67 ± 5.12)、(13.24 ± 4.56) 和 (18.12 ± 4.78) s,七氟醚暴露组第 1~5 天小鼠逃避潜伏期分别为 (82.36 ± 2.56)、(67.84 ± 7.52)、(58.79 ± 5.44)、(48.24 ± 1.49) 和 (43.24 ± 3.14) s;与对照组比较,七氟醚暴露组第 2~5 天小鼠寻逃避潜伏期显著增加 ($F = 93.325, P < 0.01$),见图 1A。与对照组 (197.74 ± 10.25) mm/s 比较,七氟醚暴露组小鼠的游泳速度 (209.36 ± 11.23) mm/s,差异无统计学意义 ($t = 0.432, P = 0.785$),见图 1B。与对照组 (40.62 ± 2.23)% 比较,七氟醚暴露组小鼠在平台象限的时间百分比 (23.45 ± 5.12)% 显著缩短 ($t = 8.689, P < 0.001$),见图 1C。与对照组 (13.25 ± 0.61) 比较,七氟醚暴露组小鼠穿越平台次数 (6.16 ± 0.84) 显著减少 ($t = 11.372, P < 0.001$),见图 1D。

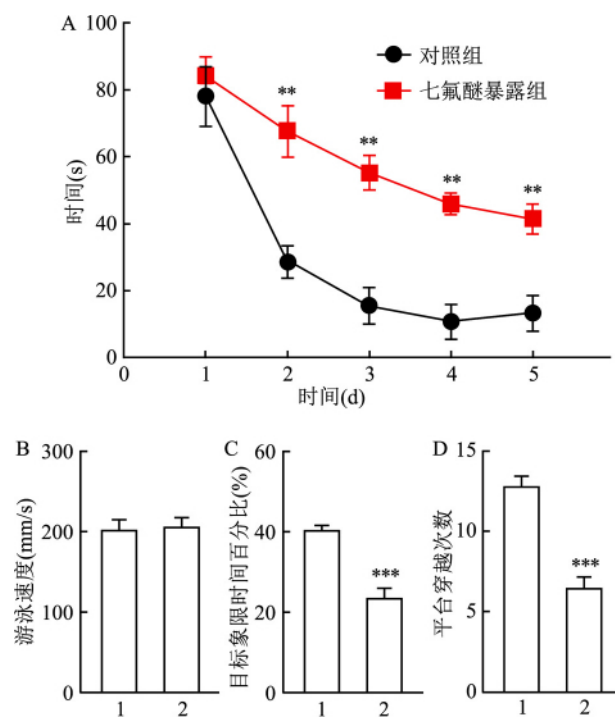


图1 小鼠在新生期七氟醚暴露可降低青春期空间定位的记忆能力

A: 两组小鼠的逃避潜伏期; B: 两组小鼠的平均游泳速度; C: 两组小鼠在平台象限的时间百分比; D: 两组小鼠的穿越平台次数; 1. 对照组; 2. 七氟醚暴露组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 小鼠在新生期七氟醚暴露可损伤青春期恐惧记忆 多次实验中,与对照组比较,七氟醚暴露组小鼠条件性恐惧记忆曲线斜率显著增加($P < 0.05$),表现出更强的学习能力,见图 2A。但在单次实验中,与对照组(48.36 ± 5.23)% 比较,七氟醚暴露组小鼠静止次数百分比(32.14 ± 3.76)% 显著降低($t = 11.325, P < 0.001$),表明小鼠的关联性恐惧记忆减少,见图 2B;与对照组(83.24 ± 6.36)% 比较,七氟醚暴露组小鼠静止次数百分比(57.35 ± 5.43)% 显著降低($t = 11.325, P < 0.001$),表明条件性恐惧记忆降低,见图 2C。

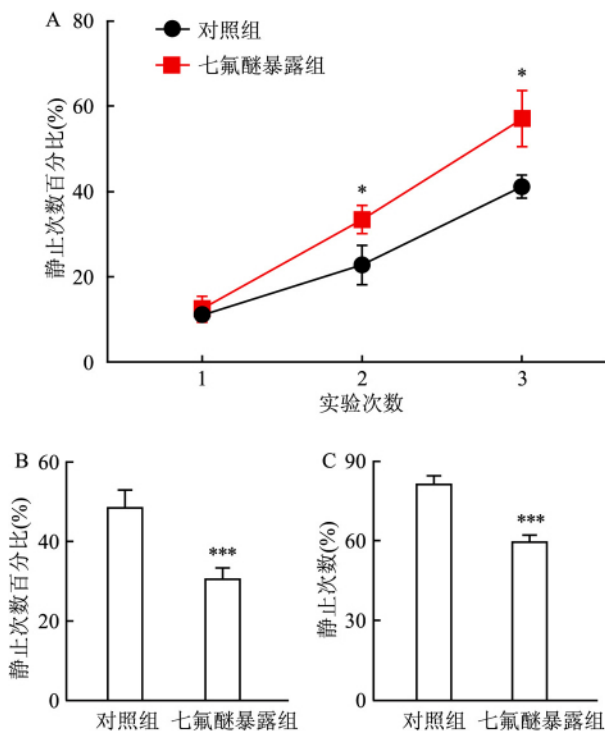


图2 小鼠在新生期七氟醚暴露可降低青春期关联性恐惧记忆与条件性恐惧记忆

A: 两组小鼠多次实验的条件性恐惧记忆斜率曲线; B: 两组小鼠单次实验的关联性恐惧记忆; C: 两组小鼠单次实验的条件性恐惧记忆; 与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.3 小鼠在新生期七氟醚暴露可损伤青春期社交记忆 采用三箱实验来检测小鼠在新生期七氟醚暴露对青春期(2月龄)的社交记忆的影响。在陌生小鼠1-空笼实验中,与空笼(50.23 ± 4.36)s 比较,七氟醚暴露组小鼠与陌生小鼠1 社交互动时间(148.74 ± 11.25)s 明显增加(图 3A、3B, $t = 9.654, P < 0.001$);同样,与空笼(54.76 ± 7.28)s 比较,对照组小鼠与陌生小鼠1 社交互动时间(151.28 ± 10.04)s 明显增加(图 3A、3B, $t = 10.344, P <$

0.001),表明两组在陌生小鼠1-空笼实验中小鼠均无社交障碍。在陌生小鼠1-陌生小鼠2 实验中,七氟醚暴露组小鼠对陌生小鼠1(37.23 ± 4.36)s 与陌生小鼠2(40.35 ± 2.16)s 的社交互动时间无差异(图 3A、图 3C, $t = 0.664, P = 0.753$);而对照组小鼠与陌生小鼠2 的社交互动时间(88.16 ± 7.34)s 高于陌生小鼠1(35.38 ± 4.28)s (图 3A、3C, $t = 12.932, P < 0.001$),表明七氟醚可明显损害小鼠的社交记忆。

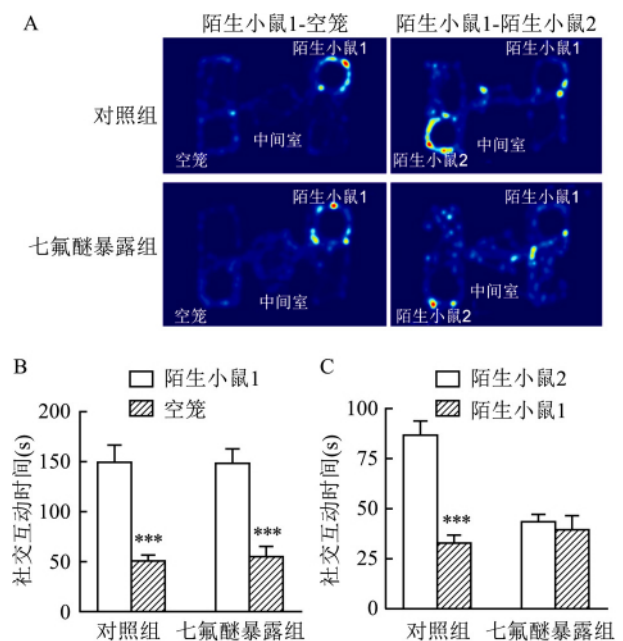


图3 小鼠在新生期七氟醚暴露可降低青春期社交记忆

A: 三箱实验结果的示意图; B: 陌生小鼠1-空笼实验中两组小鼠的社交互动时间的统计结果,与陌生小鼠1 比较: *** $P < 0.001$; C: 陌生小鼠1-陌生小鼠2 实验中两组小鼠的社交互动时间的统计结果;与陌生小鼠2 比较: *** $P < 0.001$

2.4 小鼠在新生期七氟醚暴露可降低青春期海马区域 BDNF 阳性细胞数目且增加凋亡细胞数目 BDNF 免疫组化染色结果(图 4A、4B) 显示,与对照组(100.00 ± 9.32)% 比较,七氟醚暴露组海马组织中 BDNF 阳性细胞数百分比(44.28 ± 5.14)% 显著降低($t = 10.43, P < 0.001$)。Caspase-3 免疫组化染色结果(图 4C、4D) 显示,与对照组(3.24 ± 1.02) 比较,七氟醚暴露组海马组织单位 mm^2 中 Caspase-3 阳性细胞数(35.42 ± 4.71) 显著增加($t = 16.533, P < 0.001$)。

2.5 小鼠在新生期七氟醚暴露可降低青春期海马 GABA 能神经元 mEPSC 的频率与幅度 通过全细胞记录 GABA 能神经元 mEPSC(图 5A),如图 5B 所

示,与对照组(4.34 ± 0.26) Hz 比较,七氟醚暴露组 mEPSC 频率(2.78 ± 0.31) Hz 明显降低($t = 6.332$, $P < 0.01$);如图 5C 所示,与对照组(13.26 ± 1.25) pA 比较,七氟醚暴露组 mEPSC 的峰值电流(9.14 ± 0.89) pA 明显降低($t = 5.645$, $P < 0.01$)。

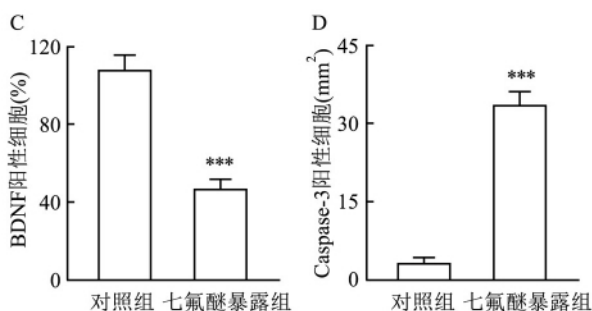
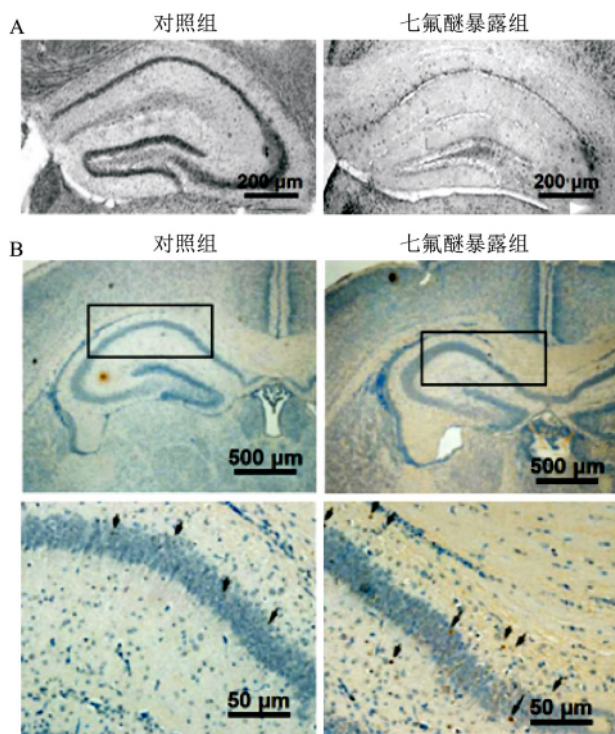


图4 小鼠在新生期七氟醚暴露可降低青春期海马区 BDNF 阳性细胞数和增加 Caspase-3 阳性细胞数

A: 两组小鼠海马区 BDNF 免疫组化标记代表图; B: 两组 BDNF 阳性细胞的统计结果; C: 两组小鼠海马区 Caspase-3 免疫组化标记代表图; D: 两组海马区 Caspase-3 阳性细胞的统计结果。与对照组比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

目前,虽然关于麻醉剂对神经发育的研究结果存在争议^[6-8],但麻醉剂暴露与神经发育过程之间必然存在密切关系。在本研究中,小鼠在新生期七氟醚暴露可明显损害其青春期的空间定位的记忆能力、恐惧记忆及社交记忆。本研究中,虽然七氟醚暴露的小鼠在条件性恐惧记忆过程中的学习能力增

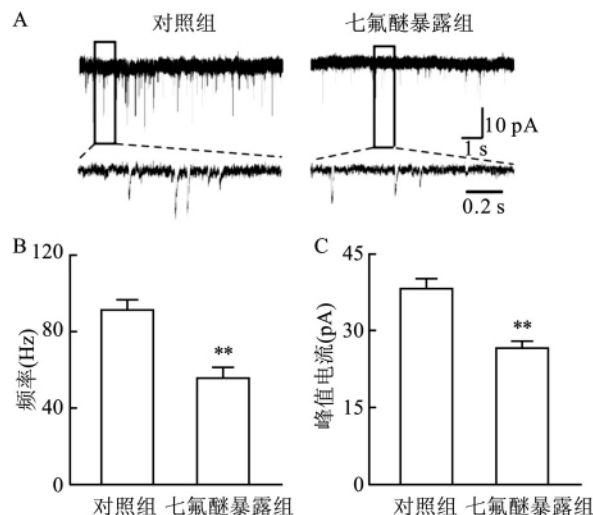


图5 小鼠在新生期七氟醚暴露可降低青春期 GABA 能神经元 mEPSC 频率与峰值电流

A: 全细胞膜片钳记录两组小鼠 GABA 能神经元的 mEPSC; B: 两组小鼠 mEPSC 频率的统计结果; C: 两组小鼠 mEPSC 峰值电流的统计结果; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

强,但这并不能表明新生鼠的七氟醚暴露与神经损害之间无关联。而既往研究^[9]显示七氟醚暴露造成条件性恐惧记忆过程中的学习能力减弱,这研究结果与本研究具有差异,造成结果差异的原因可能是既往研究^[9]采用 3% 七氟醚麻醉新生鼠 6 h,而本研究利用七氟醚浓度递减模型模拟大部分临床麻醉状态,麻醉深度相对较浅。

本研究进一步对新生鼠七氟醚暴露对突触可塑性的影响进行了探索。BDNF 是脑内重要的神经营养因子,在调控突触可塑性过程中有重要作用,且与学习和记忆具有密切联系^[10]。有研究^[11]表明,在神经系统退行性病及发育障碍的小鼠模型中 BDNF 明显下降。麻醉药物可引起的术后认知障碍,而激活 BDNF 的翻译能逆转这种认知障碍^[12]。本研究结果显示,七氟醚可明显抑制海马神经元 BDNF 表达。Caspase-3 在神经系统发育障碍中起重要作用,且有研究^[13]表明神经系统发育障碍的小鼠神经元及胶质细胞中 Caspase-3 表达升高。另外,已有研究^[14]表明,新生鼠七氟醚暴露可抑制海马及杏仁核神经元再生,且可诱导海马及皮层的神经元凋亡。本研究结果显示,七氟醚可明显促进海马神经元 Caspase-3 表达。因此,本研究证实了七氟醚对新生鼠的海马神经元的损害作用。神经元功能障碍一般表现为 mEPSC 的频率与幅度的降低^[15]。而本研究结果表明新生鼠七氟醚暴露可明显降低 GABA 能神经元 mEPSP 的频率及幅度。

参考文献

- [1] Huang J, Jing S, Chen X, et al. Propofol administration during early postnatal life suppresses hippocampal neurogenesis [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 1031–44.
- [2] Kang E, Jiang D, Ryu Y K, et al. Early postnatal exposure to isoflurane causes cognitive deficits and disrupts development of newborn hippocampal neurons via activation of the mTOR pathway [J]. *PLoS Biol*, 2017, 15(7): e2001246.
- [3] Glatz P, Sandin R H, Pedersen N L, et al. Association of anesthesia and surgery during childhood with long-term academic performance [J]. *JAMA Pediatr*, 2017, 171(1): e163470.
- [4] Lee J H, Zhang J, Wei L, et al. Neurodevelopmental implications of the general anesthesia in neonate and infants [J]. *Exp Neurol*, 2015, 272: 50–60.
- [5] Wilder R T, Flick R P, Sprung J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 796–804.
- [6] 陈学均, 万永灵, 温开兰. 新生儿心脏手术的围手术期麻醉暴露与1岁神经发育状况的关系 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2015, 40(11): 1234–8.
- [7] Biddle C, Ford V. The neurotoxicity of general anesthetic drugs: emphasis on the extremes of age [J]. *Annu Rev Nurs Res*, 2017, 35(1): 201–19.
- [8] Satomoto M, Satoh Y, Terui K, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fearconditioning in mice [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(3): 628–37.
- [9] O'Leary O F, Oghonnaya E S, Felice D, et al. The vagus nerve modulates BDNF expression and neurogenesis in the hippocampus [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2018, 28(2): 307–16.
- [10] Jones K R, Fariñas I, Backus C, et al. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. [J]. *Cell*, 1994, 76(6): 989–99.
- [11] Chen H, Wu X, Gu X, et al. Tacrine(10)-huprydone prevents post-operative cognitive dysfunction via the activation of BDNF pathway and the inhibition of AChE in aged mice [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 396.
- [12] Zheng X, Wang X, Wang T, et al. Gestational exposure to particulate matter 2.5 (PM_{2.5}) leads to spatial memory dysfunction and neurodevelopmental impairment in hippocampus of mice offspring [J]. *Front Neurosci*, 2019, 12: 1000.
- [13] Alkire M T, Nathan S V, McCreynolds J R. Memory enhancing effect of low-dose sevoflurane does not occur in basolateral amygdala-lesioned rats [J]. *Anesthesiology*, 2005, 103(6): 1167–73.
- [14] Lin Y C, Yeckel M F, Koleske A J. Abl2/Arg controls dendritic spine and dendrite arbor stability via distinct cytoskeletal control pathways [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(5): 1846–57.

Effect of neonatal sevoflurane exposure on memory and synaptic plasticity at puberty in mice

Wang Jialun, Lian Haiguang, Lin Fengyan, et al

(Dept of Anesthesiology, Haikou Women's & Children's Hospital, Haikou 570206)

Abstract Objective To examine the effect of sevoflurane exposure at the neonatal period on memory and synaptic plasticity at puberty in mice. **Methods** 30 neonatal mice (6~7 days old) were randomly divided into control group and sevoflurane exposure group, 15 mice in each group. The neonatal mice in the control group were not exposed to sevoflurane. The neonatal mice in the sevoflurane exposure group were anesthetized with 3.5% sevoflurane for 30 min, then with 3% sevoflurane for 30 min, and finally with 2.5% sevoflurane for 30 min. At 2-month-old, spatial memory, fear memory and social interaction memory were evaluated by morris water maze test, contextual fear and cue fear test and triple chambered social behavioral assay, respectively. The levels of Caspase-3 and BDNF in hippocampus were detected by immunohistochemical staining. The frequency and amplitude of mEPSC in GABA-ergic neurons were evaluated by whole cell patch clamp. **Results** Behavioral experiments show that compared with control group, mice in sevoflurane exposure group showed impairment in spatial memory, fear memory and social interaction memory at 2-month-old (all $P < 0.001$). Immunohistochemistry showed that compared with the control group, the number of BDNF positive cells significantly reduced ($P < 0.001$) while the number of Caspase-3 positive cells significantly increased ($P < 0.001$) in hippocampus of mice in sevoflurane exposure group at 2-month-old. Whole cell patch clamp showed that compared with the control group, the frequency and amplitude of mEPSC significantly reduced (all $P < 0.01$) in GABA-ergic neurons of mice in sevoflurane exposure group at 2-month-old. **Conclusion** Sevoflurane exposure at the neonatal period in mice can lead to neurodegeneration, memory impairment and synaptic plasticity decrease at puberty.

Key words sevoflurane; learning and memory; synaptic plasticity