

七氟醚介导的神经元自噬抑制对幼年大鼠神经发生和学习记忆功能的影响

王 瑞, 李 斐, 侯俊德, 陈永学*

邯郸市中心医院 麻醉科, 河北 邯郸 056008

摘 要: 目的 探讨七氟醚对幼龄大鼠学习记忆功能的影响及机制。方法 48只幼鼠随机分为对照组、七氟醚-1 h组、七氟醚-3 h组与七氟醚-3 h+雷帕霉素(20 mg/kg, 于麻醉前连续ip 3 d)组, 每组12只。麻醉当天, 对照组幼鼠吸入氧气混合氮气3 h, 七氟醚组以含3%七氟醚的混合气体麻醉1 h或3 h。4周后, 应用Morris水迷宫检测幼鼠学习与记忆功能; 使用电子透射显微镜观察神经元自噬; 采用BrdU免疫荧光法观察幼鼠海马组织中神经元新生; Western blotting法检测幼鼠海马组织中NeuN、DCX、PI3K、mTOR、LC3-II/LC3-I和Beclin-1蛋白表达。结果 与对照组比较, 七氟醚-3 h组幼鼠逃避潜伏期显著增加($P<0.05$), 穿越平台次数显著减少($P<0.05$), 靶象限停留时间显著减少($P<0.05$); 与七氟醚-3 h组比较, 雷帕霉素显著缩短幼鼠逃避潜伏期($P<0.05$), 增加测试中穿越平台次数($P<0.05$)与靶象限停留时间($P<0.05$)。与对照组比较, 七氟醚-3 h组幼鼠齿状回中神经元新生显著减少($P<0.05$), 神经元新生相关蛋白NeuN与DCX表达显著降低($P<0.05$); 海马组织中PI3K表达显著降低($P<0.05$), 且mTOR蛋白表达显著增加($P<0.05$), 而LC3-II/LC3-I与Beclin-1表达显著下调($P<0.05$), 造成自噬小体显著减少($P<0.05$)。与七氟醚-3 h组比较, 雷帕霉素显著增加NeuN与DCX蛋白表达($P<0.05$), 显著提高PI3K蛋白表达($P<0.05$), 显著下调mTOR表达($P<0.05$), 显著上调LC3-II/LC3-I与Beclin-1表达($P<0.05$), 显著增加自噬小体的形成。结论 七氟醚通过下调PI3K, 增加mTOR表达, 抑制LC3-II/LC3-I与Beclin-1表达, 减少自噬小体形成并抑制神经元新生, 最终诱导幼鼠学习和记忆功能障碍。

关键词: 七氟醚; 自噬; 雷帕霉素; 神经元新生; 学习记忆功能障碍

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)09-1882-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.09.010

Effects of sevoflurane-mediated neuronal autophagy inhibition on neurogenesis, learning and memory function in newborn rats

WANG Rui, LI Fei, HOU Junde, CHEN Yongxue

Department of Anesthesiology, Handan Central Hospital, Handan 056008, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of sevoflurane on the learning and memory function in newborn rats. **Methods** 48 young rats were randomly divided into control group, sevoflurane-1 h group, sevoflurane-3 h group and sevoflurane-3 h+rapamycin group, with 12 rats in each group. Before anesthesia, rats in each group were intraperitoneally injected with saline or rapamycin (20 mg/kg) for three days. On the day of anesthesia, the newborn rats in control group were inhaled with oxygen and nitrogen for three hours, and the newborn rat in sevoflurane group were anesthetized with 3% sevoflurane for one or three h. Morris water maze was used to detect the learning and memory function of young mice after four weeks. Transmission electron microscope was applied for observation of autophagosome. In addition, Immunofluorescence and Western blotting were used to explore the expression of neuron regeneration and autophagy-related proteins in the hippocampus of newborn mice. **Results** Compared with control group, sevoflurane increased the escape latency of newborn rats ($P<0.05$), decreased the number of crossing platforms ($P<0.05$), and reduced the residence time in the target quadrant ($P<0.05$). However, the intervention of rapamycin significantly reduced the escape latency of young mice ($P<0.05$), increased the number of platform crossings ($P<0.05$) and the target quadrant stay time ($P<0.05$). In addition, sevoflurane caused decreased neurogenesis in the dentate gyrus of newborn rats, and inhibited the expression of neuron regeneration-related proteins NeuN and DCX. At the same time, sevoflurane mediated the decrease of PI3K expression in the hippocampus of newborn rats ($P<0.05$), and caused an increase in mTOR protein expression ($P<0.05$), while the expression of

收稿日期: 2021-01-12

基金项目: 河北省重点研发计划项目(182777195)

第一作者: 王 瑞(1982—), 女, 硕士研究生, 主治医师。Tel: 15831862656 E-mail: huwt19860620@163.com

*通信作者: 陈永学(1970—), 主任医师, 硕士。E-mail: huwt19860620@163.com

LC3-II/LC3-I and Beclin-1 was significantly down-regulated ($P < 0.05$), resulting in a decrease in autophagosome ($P < 0.05$). However, the administration of autophagy inducer rapamycin significantly increased the expression of PI3K ($P < 0.05$), down-regulated the expression of mTOR ($P < 0.05$), and up-regulated the expression of LC3-II/LC3-I and Beclin-1 ($P < 0.05$) which increased the formation of autophagosome. **Conclusion** Sevoflurane mediates down-regulation of PI3K, up-regulation of mTOR, inhibition of LC3-II/LC3-I and Beclin-1, to reduce formation of autophagosomes and inhibit neurogenesis, which ultimately induces learning and memory dysfunction in newborn rats.

Key words: sevoflurane; autophagy; rapamycin; neuronal regeneration; learning and memory dysfunction

幼儿期手术麻醉安全始终是临床重点关注的问题,已有不少临床研究证实幼儿期麻醉具有一定神经毒性风险。七氟醚具有麻醉诱导起效快,术中麻醉效能高,可控性强,术后恢复时间短,比较其他麻醉剂对呼吸道的刺激性小的优势,已成为幼儿手术常用的挥发性麻醉剂之一。然而,已有研究报道,在七氟醚手术麻醉期间及迅速消除后,幼儿脑组织中葡萄糖代谢会出现一定程度的降低^[1]。在大脑发育早期,葡萄糖代谢紊乱会导致神经毒性并造成幼儿学习记忆功能损伤^[2]。因此临床需要密切关注七氟醚麻醉对幼儿大脑的神经毒性作用,然而,七氟醚相关的神经毒性诱导幼儿学习记忆功能损伤的潜在机制尚未探究清楚。本研究拟采用七氟醚麻醉幼鼠模拟临床上婴幼儿手术中麻醉,待幼鼠生长至能够吃颗粒饲料,约4周,且状态活跃时进行水迷宫检测,探究七氟醚麻醉对幼鼠学习记忆功能的影响与其可能的机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级出生后7 d的幼龄SD大鼠,所有幼鼠与母鼠一同由河北医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(冀)2020-001,性别随机,共48只。所有大鼠饲养于SPF级动物房中,环境温度(24 ± 2)°C、湿度(60 ± 5)%,自由饮食饮水,且昼夜节律控制12 h/12 h循环。幼龄大鼠与母鼠在实验室环境中适应性喂养1周后,背部皮肤编号,随机分为对照组、七氟醚-1 h组、七氟醚-3 h组、七氟醚-3 h+雷帕霉素组,每组12只。

1.2 药物及主要试剂

七氟醚(江苏恒瑞医药股份有限公司,规格120 mL,批号H20180172);雷帕霉素(Rapamycin, Rap,美国MCE生物科技公司,批号C019-0325);RIPA裂解液(上海碧云天生物公司);5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU,美国Sigma公司);鼠源单克隆Anti-BrdU抗体、兔源单克隆重组Anti-微管相关蛋白轻链3(LC3)抗体、Dylight 594标记的山羊抗鼠IgG(H+L)、兔源单克隆重组Anti-神经核蛋

白(NeuN)抗体、兔源多克隆Anti-双肾上腺皮质激素(DCX)抗体(美国abcam公司);鼠源单克隆Anti-磷脂酰肌醇-3-磷酸激酶(Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)抗体、鼠源单克隆Anti-雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体、兔源多克隆Anti-Beclin-1抗体(美国Proteintech公司);鼠源单克隆Anti- β -actin抗体、HRP标记山羊抗鼠IgG(H+L)、HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)(上海碧云天生物公司)。

1.3 主要仪器

小动物麻醉机(深圳瑞沃德生命科技公司,型号R500);Morris水迷宫(北京众实迪创科技公司,型号ZS-Morris);荧光显微镜(美国Thermo公司,型号EVOS M7000);电子投射显微镜(日本电子株式会社,型号JEM-2100F);电泳仪电源(美国Bio-rad公司,型号Powerpac Basic);蛋白电泳槽装置(美国Bio-rad公司,型号Basic 200);化学发光成像仪(上海天能生物技术公司,型号Tanon-2500)。

2 方法

2.1 幼鼠麻醉方案

实验前订制1个长20 cm×宽10 cm×高10 cm的透明塑料材质麻醉箱,麻醉箱底部垫有加热毯,控制温度为恒温(30 ± 2)°C。自麻醉箱顶部开盖,放入实验动物。麻醉箱两侧留有小孔,参考文献中麻醉方案^[3],3%七氟醚(哺乳动物的七氟醚最低肺泡有效浓度为2.3%,本实验选择3%七氟醚麻醉幼鼠)自一侧小孔进入箱内,加载气体为60%氧气混合40%氮气,设置气体体积流量为2 L/min。另一侧小孔与麻醉气体检测仪相连,监测箱内七氟醚浓度。控制幼鼠麻醉时间为1、3 h,对照组幼鼠麻醉时仅通入加载气体,持续通入3 h。麻醉后待幼鼠自然苏醒,散去七氟醚气味,送回母鼠身边饲养。七氟醚-3 h+雷帕霉素组在麻醉前2天,ip雷帕霉素(20 mg/kg),连续3 d,最后1次注射为七氟醚麻醉前2 h,其他各组ip生理盐水。4周后开始水迷宫检测,再取大鼠脑组织开展其他实验。

2.2 Morris水迷宫

Morris水迷宫仪器为1个高40 cm,直径120 cm,底部黑色的圆形水池。水池中注入约30 cm高清水,调节设置水温24℃。整个水面由水迷宫分析系统分为4个象限,分别为靶象限,对侧象限,左侧象限和右侧象限。靶象限中央放置1根高30 cm、直径8 cm的圆形站台。整个水迷宫测试分为训练期与测试期。训练期将各组幼鼠自靶象限开始,依次放入水中,寻找逃生平台,训练时间设为90 s,当幼鼠登上平台,系统自动停止,并记录这段时间为逃避潜伏期。若幼鼠90 s内无法登上平台则引导至平台,记逃避潜伏期为90 s,每天训练4次,取平均值为结果,连续训练4 d。第5天开展水迷宫测试,撤去逃生平台,将幼鼠自对侧象限放入水中,自由探索90 s,记录幼鼠首次穿越逃生平台象限花费时间,穿越逃生平台的次数及90 s内在靶象限中停留时间。

2.3 免疫荧光实验

幼鼠处死前3 d,各组随机挑选3只ip BrdU(50 mg/kg)。水迷宫结束后,麻醉幼鼠,打开胸腔心脏灌流。取脑组织修块后放于4%多聚甲醛溶液中固定。乙醇梯度浓度脱水,以冷冻包埋液冰冻包埋脑组织,冰冻切片机将脑组织切成5 μm厚组织片,收集海马区显著的切片清洗,转移至含10%驴血清的PBST溶液中封闭2 h。再次洗涤,加入鼠源单克隆BrdU抗体(1:100)在4℃条件下孵育过夜。次日,取出脑组织切片,洗涤后加入Dylight 594标记的山羊抗鼠IgG(H+L)溶液中避光孵育1 h。滴加DAPI染液,37℃条件下孵育15 min,加入抗荧光猝灭剂,在荧光显微镜下观察并拍照,经Image Pro Plus软件分析红色荧光斑点数量作为结果。

2.4 电子透射显微镜观察自噬小体实验

各组随机挑选3只幼鼠,迅速脱颈椎处死,分离出海马组织,在海马组织DG区截取约1 mm³组织,固定于预冷的2.5%戊二醛中,4℃固定过夜。次日,预冷PBS溶液清洗组织,15 min×3次。应用预冷的1%锇酸再次固定2 h。预冷PBS溶液清洗组织,15 min×3次。预冷梯度丙酮脱水,25%、50%、75%和95%梯度丙酮浸润10 min,再以100%丙酮溶液浸润组织,15 min×3次。丙酮等体积混合包埋剂,浸透1 h,最后使用纯包埋剂浸透,35℃条件下过夜。修块后使用金刚石刀将组织切成60~80 nm超薄切片,最后应用饱和醋酸铀、枸橼酸铅染色,封片。利用电子透射显微镜观察各组小鼠海马组织

细胞自噬小体情况,经计数获得各个图片中自噬小体数量。

2.5 Western blotting实验

各组幼鼠脱颈椎处死,冰块上分离出海马组织,-80℃储存备用。称取约30 μg海马组织,加入100 μL含PMSF的RIPA裂解液,匀浆形成细胞悬液,4℃静置30 min。4℃、12 000 r/min离心20 min,取上清液加入5×上样缓冲液,100℃下加热10 min使蛋白变性。配制SDS-PAGE电泳浓缩胶与分离胶,开启凝胶电泳,电泳条件为30 V/30 min、100 V/60 min,以上样缓冲液达到凝胶底部为终点。湿法转膜法转移目标蛋白至PVDF膜上,设置条件为2 mA/60 min。取出PVDF膜置入4%脱脂牛奶中封闭,4℃孵育一抗稀释液过夜。次日,PVDF膜使用HRP标记的IgG(H+L)稀释液室温孵育2 h,滴加ECL超敏发光液,化学发光成像仪下获得目的蛋白印迹条带,经Image J 5.1图像软件读取灰度值并比较。

2.6 统计学处理

采用SPSS 22.0处理分析数据,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据之间采用单因素方差(One Way Anova)分析,并使用Tukey检验分析差异。

3 结果

3.1 七氟醚对各组幼鼠学习、记忆功能的影响

Morris水迷宫实验是一种评估啮齿类动物学习、记忆功能的研究方法,测试期间幼鼠逃避潜伏期的减少与幼鼠学习能力呈正相关。与对照组比较,自训练第2天起,七氟醚-3 h组幼鼠逃避潜伏期显著增加($P < 0.05$),且自训练第3天起,七氟醚-1 h组逃避潜伏期显著增加($P < 0.05$)。与七氟醚-3 h组比较,雷帕霉素给药显著逆转了幼鼠逃避潜伏期的增加($P < 0.05$)。Morris水迷宫测试阶段中逃避潜伏期、穿越平台次数、靶象限停留时间反映的是幼鼠的空间记忆能力。与对照组比较,七氟醚-1、3 h组幼鼠逃避潜伏期显著增加($P < 0.05$),七氟醚-3 h组穿越平台次数显著减少且在靶象限中停留时间显著降低($P < 0.05$)。与七氟醚-3 h组比较,加用雷帕霉素干预显著缩短了幼鼠逃避潜伏期($P < 0.05$),增加了穿越平台次数($P < 0.05$)与靶象限中停留时间($P < 0.05$)。结果见表1、2。

3.2 七氟醚对各组幼鼠神经元新生的影响

海马区齿状回是神经元新生的主要区域,BrdU是一种胸腺嘧啶核苷类似物,神经元新生期间代替胸腺嘧啶参与DNA复制,能够反映神经元新生情

表1 各组幼鼠Morris水迷宫训练期间逃避潜伏期($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	逃避潜伏期/s			
	第1天	第2天	第3天	第4天
对照	76.06±10.08	42.35±13.79	16.27±6.78	12.58±4.06
七氟醚-1 h	75.85±12.35	52.18±13.31	35.52±12.28*	27.99±11.64*
七氟醚-3 h	74.72±13.41	65.57±16.20*	48.80±15.31*	40.41±13.64*
七氟醚-3 h+雷帕霉素	74.86±12.19	55.51±14.64	27.94±11.85 [#]	24.32±10.68 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与七氟醚-3 h组比较: [#] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs sevoflurane-3 h group表2 各组幼鼠Morris水迷宫测试期间逃避潜伏期、穿越平台次数与靶象限停留时间($\bar{x} \pm s, n=12$)Table 2 Escape latency, number of platforms crossing and residence time in target quadrant during Morris water maze test of young rats in each group($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数	靶象限停留时间/s
对照	16.40±6.86	8.42±3.42	51.64±14.40
七氟醚-1 h	29.12±14.13*	6.08±3.03	40.37±11.36
七氟醚-3 h	50.14±18.05*	3.33±2.22*	28.78±12.92*
七氟醚-3 h+雷帕霉素	25.87±11.48 [#]	7.83±4.00 [#]	47.06±14.90 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与七氟醚-3 h组比较: [#] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs sevoflurane-3 h group

况。与对照组比较,七氟醚-1 h组幼鼠齿状回中BrdU表达降低,但无统计学差异;而七氟醚-3 h组幼鼠海马齿状回中BrdU表达显著降低($P < 0.05$)。与七氟醚-3 h组比较,雷帕霉素干预显著增加了幼

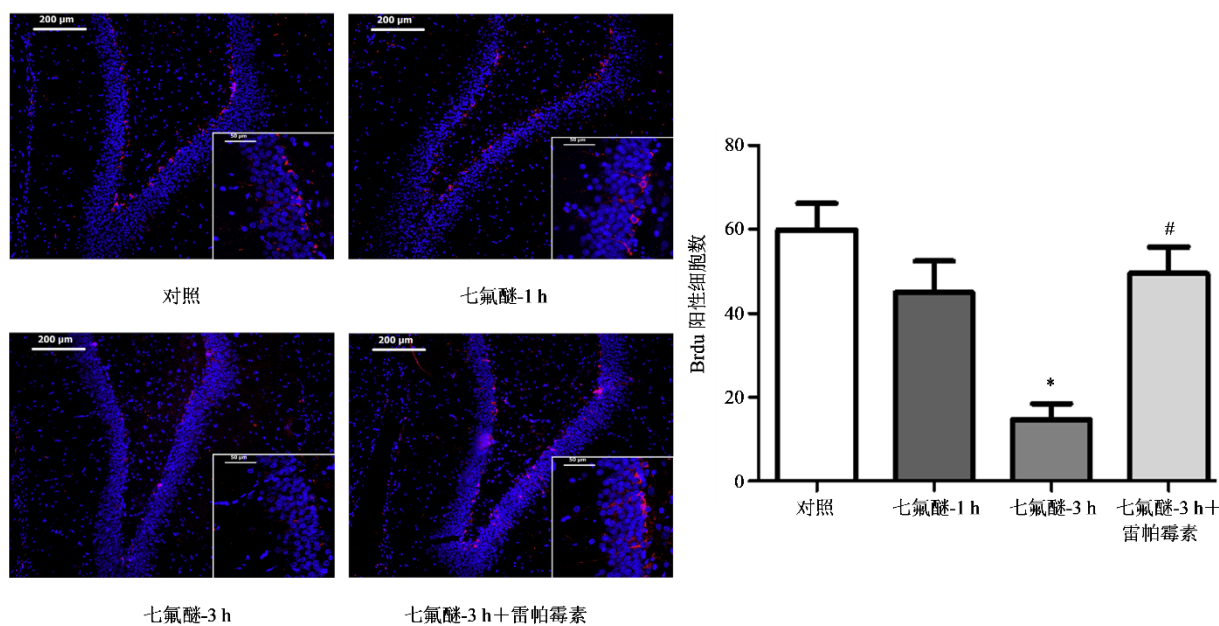
鼠海马齿状回中BrdU表达($P < 0.05$)。结果见图1。

3.3 七氟醚对各组幼鼠DCX、NeuN表达的影响

DCX是幼鼠海马齿状回区域由神经干细胞分化形成的神经前体细胞和迁移状态下未成熟神经元的标志物,NeuN是幼鼠海马组织中成熟的神经元常用标志物,两者在海马齿状回区域的表达反映的是神经元新生的情况。与对照组比较,七氟醚吸入麻醉介导幼鼠海马组织中DCX与NeuN表达显著降低($P < 0.05$);与七氟醚-3 h组比较,加用雷帕霉素显著上调了DCX与NeuN表达($P < 0.05$)。结果见图2。

3.4 七氟醚对各组幼鼠自噬小体形成的影响

自噬小体是将一小部分细胞质包围形成的双层膜结构小泡,内含各种待消化的细胞器与蛋白质,通过与溶酶体融合从而降解其内容物。本研究

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与七氟醚-3 h组比较: [#] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs sevoflurane-3 h group图1 各组幼鼠海马齿状回中BrdU表达与量化统计($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 1 BrdU expression and quantitative statistics in hippocampal dentate gyrus of young rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

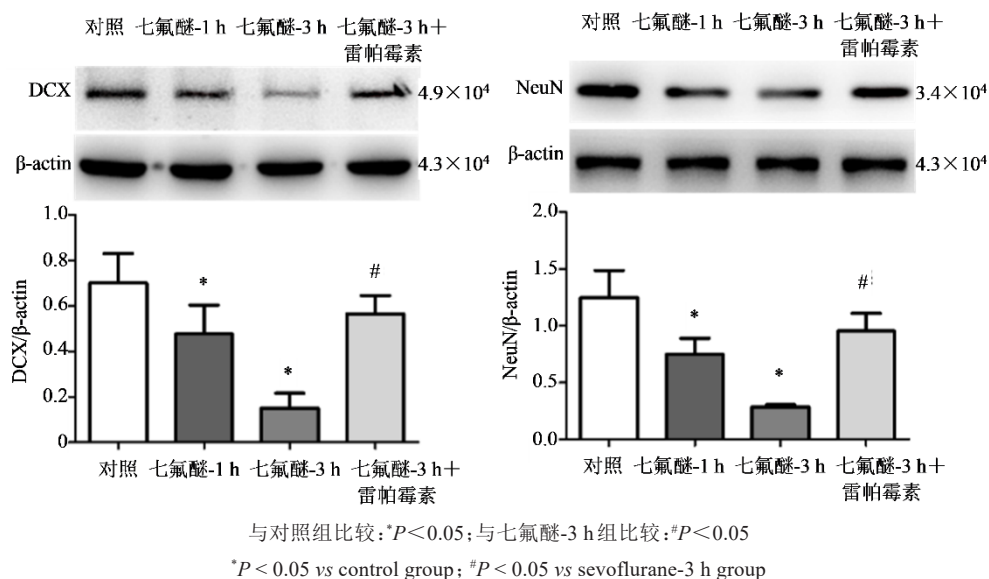


图2 各组幼鼠海马组织中DCX、NeuN表达与量化统计($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Expression and quantitative statistics of DCX and NeuN in hippocampus of young rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

中对照组幼鼠海马组织中自噬小体含量较多,与对照组比较,七氟醚-3 h组自噬小体数量显著降低($P < 0.05$),且自噬小体状态较差。与七氟醚-3 h组比较,加用雷帕霉素干预则显著上调了海马组织中自噬小体数量($P < 0.05$),且恢复了自噬小体状态。结果见图3。

3.5 七氟醚对各组幼鼠自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3-II/LC3-I 表达的影响

Beclin-1 是自噬调控相关蛋白之一,调控自噬体膜的形成,LC3-II 调控自噬过程中自噬泡膜的修

饰,与溶酶体融合,两者共同促进自噬的激活。与对照组比较,七氟醚-3 h组幼鼠海马组织中LC3-I表达升高,LC3-II表达降低,导致LC3-II/LC3-I表达显著降低($P < 0.05$),且 Beclin-1 表达也显著降低($P < 0.05$)。与七氟醚-3 h组比较,加用雷帕霉素显著升高了LC3-II/LC3-I表达比例($P < 0.05$),而 Beclin-1 表达也显著升高($P < 0.05$)。结果见图4。

3.6 七氟醚对各组幼鼠 PI3K、mTOR 表达的影响

PI3K 与 mTOR 是调控自噬激活与抑制的2个上游转导信号蛋白。与对照组比较,七氟醚吸入麻

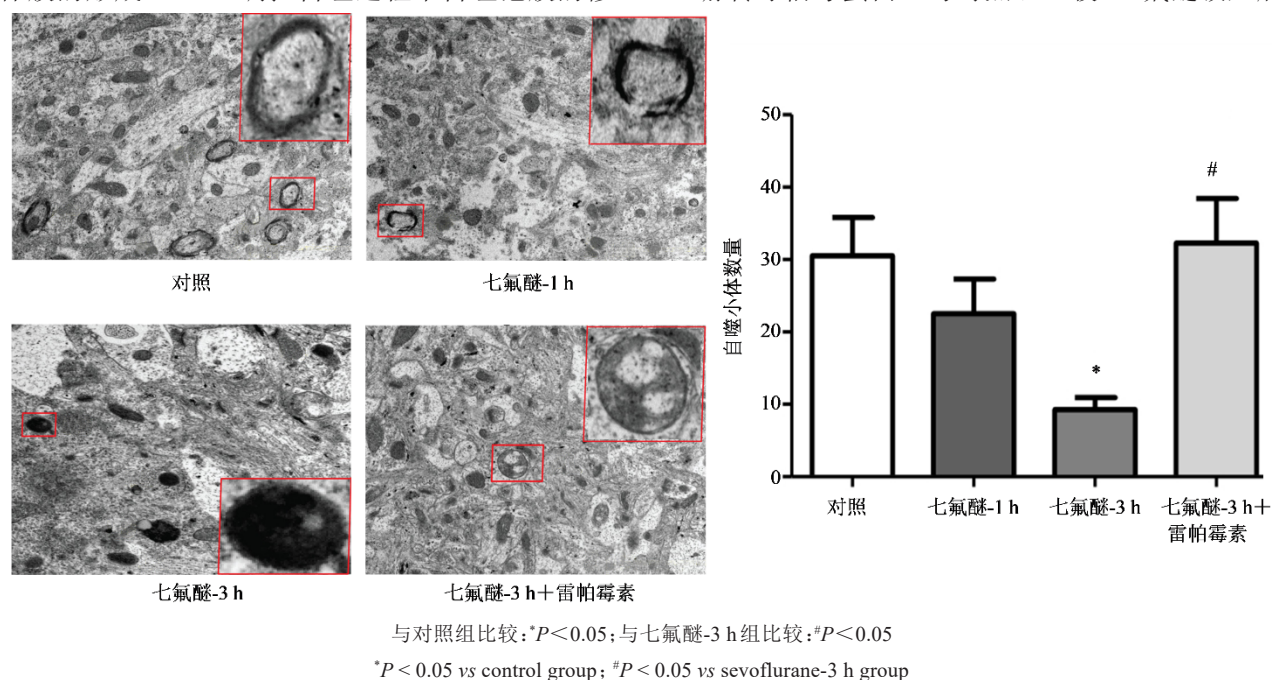
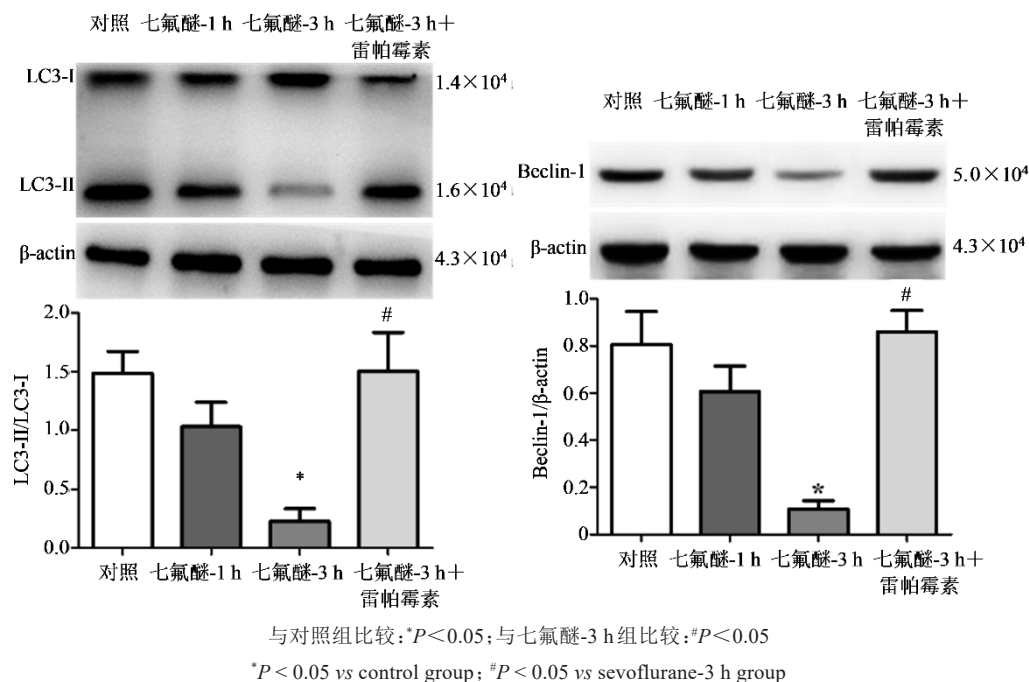


图3 各组幼鼠海马组织中自噬小体的形成与量化统计($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Formation and quantitative statistics of autophagosomes in hippocampus of young rats in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

图4 各组幼鼠海马组织中LC3-I、LC3-II与Beclin-1表达与量化统计($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Expression and quantitative statistics of LC3-I, LC3-II and Beclin-1 in hippocampus of young rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

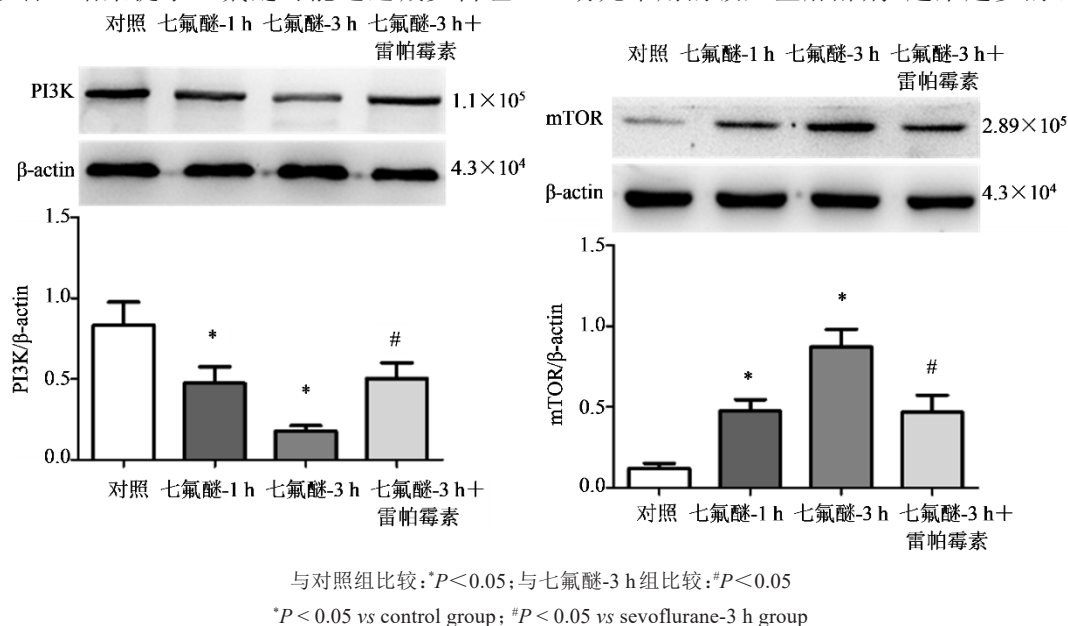
醉造成幼鼠海马组织中PI3K蛋白表达显著降低($P < 0.05$), mTOR蛋白表达显著上调($P < 0.05$)。与七氟醚-3 h组比较, 加用雷帕霉素显著升高PI3K蛋白表达($P < 0.05$), 且显著降低mTOR蛋白表达水平($P < 0.05$)。结果见图5。

4 讨论

本研究探索了七氟醚对幼年大鼠学习与记忆能力的影响。结果提示七氟醚可能通过减少自噬

小体形成, 抑制神经元新生, 最终造成幼鼠认知功能损伤。与此同时, 本研究在七氟醚麻醉幼鼠前, ip雷帕霉素, 连续给药3 d以激活自噬。结果显示雷帕霉素治疗后幼鼠脑组织中自噬小体增加, 且神经元新生增加。

已有研究证实部分经历了全麻的幼儿, 成年后仍存在学习记忆能力损伤的情况^[4]。七氟醚是临床幼儿常用的吸入型麻醉剂, 越来越多的证据表明,

图5 各组幼鼠海马组织中PI3K/mTOR表达与量化统计($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Expression and quantitative statistics of PI3K/mTOR in hippocampus of young rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

七氟醚对幼儿发育中的大脑具有神经毒性,会导致学习和记忆能力出现功能性缺陷^[5]。Morris水迷宫是一种评估啮齿类动物行为记忆、空间探索功能的研究方法^[6]。Morris水迷宫结果中通常认为逃避潜伏期统计折线图斜率与动物学习能力呈正相关,且空间探索中穿越目标物次数及靶象限中停留时间可反映动物记忆功能。Jia等^[7]早期研究采用Morris水迷宫检测证实麻醉是造成幼鼠突触学习与记忆能力降低的原因。此外,周兰云等^[8]研究中,Morris水迷宫检测发现睡眠与记忆密切相关,睡眠促进记忆碎片的分析、整合,融为长时记忆。本研究中,不同剂量七氟醚都造成幼鼠逃避潜伏期增加,提示七氟醚造成幼鼠学习能力障碍,且这种障碍与麻醉时间呈正相关。此外,七氟醚造成幼鼠穿越平台次数与靶象限中停留时间显著减少,提示七氟醚导致大鼠突触记忆能力出现损伤。因此,本研究中,七氟醚幼鼠学习和记忆能力损伤模型构建成功。然而,自噬激动剂雷帕霉素缩短了幼鼠潜伏期且增加平台穿越次数与靶象限停留时间,提示自噬参与了七氟醚致幼鼠学习与记忆功能衰退的过程。

幼鼠学习、记忆功能损伤是海马区神经元新生抑制造成的,神经元新生主要发生在海马区齿状回颗粒下层^[9]。神经发生过程中,神经干细胞首先增殖、分裂产生神经前体细胞,并逐渐向功能区迁移,最终分化为成熟神经元与其他神经元建立突触联系从而产生神经功能^[10]。已有研究报道,七氟醚吸入麻醉会造成氧化应激增加,激活炎症反应,进而诱导端粒酶活力降低、线粒体功能障碍从而造成其他细胞器功能损伤,致使细胞质内稳态失衡,加速神经干细胞衰老^[11]。当衰老细胞处于细胞周期永久停滞而无法被清除时,会导致神经发生能力受损^[12]。BrdU、DCX与NeuN等指标能有效反映幼鼠海马齿状回区域神经元新生情况。本研究中,随着七氟醚麻醉时间增加,BrdU阳性细胞数量减少,DCX与NeuN表达降低更显著,提示七氟醚抑制神经元新生与麻醉时间呈正相关。然而,雷帕霉素的治疗显著提高了BrdU阳性细胞数量、DCX与NeuN表达,提示自噬与神经元新生相关。

自噬被认为神经元新生过程中扮演着抑制氧化应激和调节突触发生的角色。Vazquez等^[13]报道,小鼠神经元分化初期,胚胎嗅球中自噬相关蛋白7(autophagy-related gene 7, Atg7)、Atg6(Beclin-1)和LC3-II均开始表达,且神经元新生标记物平行增加。将嗅球衍生的祖细胞体外培养并诱导分化,

结果显示LC3-II脂质化和自噬通量增加。Morgado等^[14]报道,海马齿状回中神经干细胞在增殖、分化和迁移过程中,Atg9a的表达与LC3-II/LC3-I的表达比例显著升高。此外,经3-甲基腺嘌呤孵育抑制细胞自噬后,带有神经突的细胞数量显著减少^[15]。与此同时,本研究中,七氟醚诱导了幼鼠齿状回神经元新生抑制,然而,自噬激动剂雷帕霉素治疗下,齿状回区域神经元新生提高。因此,七氟醚抑制了神经元增殖与自噬相关。

自噬是一类广泛存在于真核细胞中,参与细胞发育、分化、免疫和衰老的生理过程。其机制是修饰自噬小体外膜与溶酶体外膜融合,通过溶酶体途径降解自身衰老细胞器和一些错误编码的蛋白^[16]。细胞自噬发展首先从Atg介导前自噬小泡的形成开始。因此,自噬激活时,Beclin-1蛋白表达水平升高^[17]。而LC3则参与的是自噬泡膜的修饰,与溶酶体膜融合,在溶酶体内降解衰老的细胞器或错误编码蛋白。当自噬体降解后,LC3-II会在Atg4B的作用下,还原成LC3-I^[18]。因此,细胞中Beclin-1表达与LC3-II/LC3-I能够反映细胞自噬状态。本研究中,七氟醚造成海马组织中Beclin-1表达降低,且LC3-II/LC3-I下降,造成了细胞自噬抑制,且七氟醚对自噬的影响与麻醉时间呈正相关。然而雷帕霉素治疗后,幼鼠海马组织中Beclin-1表达与LC3-II/LC3-I升高,进一步证实了这一结论。

自噬小体的形成与哺乳动物mTOR和PI3K涉及的转导途径相关。文献中常用的自噬激动剂雷帕霉素是通过抑制mTOR蛋白p70S6激酶位点活性诱导自噬小体的形成^[19]。而自噬抑制剂3-MA则是通过抑制PI3K,减少PI3K与Beclin-1形成复合物进而抑制自噬诱导物磷脂酰肌醇-3-磷酸的产生,从而阻断自噬^[20]。已有研究报道高浓度七氟醚会下调胎鼠中PI3K和p-Akt蛋白水平,从而诱导神经元凋亡^[21]。而PI3K/Akt途径激活则可提高七氟醚麻醉诱导的神经元新生,增强学习和记忆能力^[22]。因此,七氟醚主要是通过抑制PI3K表达,促进mTOR蛋白表达,减少自噬小体的形成从而抑制细胞自噬。

3%七氟醚麻醉会导致幼鼠海马区神经元新生减少,造成幼鼠学习与记忆能力损伤,其机制与抑制PI3K表达,激活mTOR蛋白从而减少海马区自噬小体的形成相关。因此,临床上在幼儿手术过程中应辅以其他药物诱导麻醉,减少七氟醚剂量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Schlunzen L, Juul N, Hansen K V, et al. Regional cerebral blood flow and glucose metabolism during propofol anaesthesia in healthy subjects studied with positron emission tomography [J]. *Acta Anaesth Scand*, 2012, 2(54): 603-609.
- [2] Du Y, Cui H W, Xiao Y F, et al. The mechanism of lipopolysaccharide administration-induced cognitive function impairment caused by glucose metabolism disorder in adult rats [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(6): 1268-1277.
- [3] Zhu J, Zhang Z, Jia J, et al. Sevoflurane induces learning and memory impairment in young mice through a reduction in neuronal glucose transporter 3 [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(6): 879-895.
- [4] 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, 4(110): 796-804.
- [5] Jia M, Liu W X, Yang J J, et al. Role of histone acetylation in long-term neurobehavioral effects of neonatal exposure to sevoflurane in rats [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 91: 209-220.
- [6] Barry D N, Commings S. A novel control condition for spatial learning in the Morris water maze [J]. *J Neurosci Methods*, 2019, 318: 1-5.
- [7] Jia J K, Zhu J P, Yang Q Y, et al. The role of histone acetylation in the sevoflurane-induced inhibition of neurogenesis in the hippocampi of young mice [J]. *Neuroscience*, 2020, 432: 73-83.
- [8] 周兰云, 张叶飞. 刺五加总苷对快眼动睡眠剥夺幼鼠学习记忆的作用研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 36(6): 703-706.
Zhou L Y, Zhang Y F. Effect of total glycosides of *Acanthopanax senticosus* on learning and memory of young rats with rapid eye movement sleep deprivation [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 36(6): 703-706.
- [9] Zhao Q Y, Peng C, Wu X H, et al. Maternal sleep deprivation inhibits hippocampal neurogenesis associated with inflammatory response in young offspring rats [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 68: 57-65.
- [10] Drew L J, Fusi S, Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian Hippocampus: why the dentate gyrus? [J]. *Learn Mem*, 2013, 20(12): 710-729.
- [11] Wang X N, Dong Y L, Zhang Y Y, et al. Sevoflurane induces cognitive impairment in young mice via autophagy [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216472.
- [12] Chen L B, Yao H, Chen X B, et al. Ginsenoside Rg1 decreases oxidative stress and down-regulates akt/mtor signalling to attenuate cognitive impairment in mice and senescence of neural stem cells induced by d-galactose [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(2): 430-440.
- [13] Vazquez P, Arroba A I, Cecconi F, et al. Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells [J]. *Autophagy*, 2012, 8(2): 187-199.
- [14] Morgado A L, Xavier J M, Dionisio P A, et al. MicroRNA-34a modulates neural stem cell differentiation by regulating expression of synaptic and autophagic proteins [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 1168-1183.
- [15] Yi L T, Dong S Q, Wang S S, et al. Curcumin attenuates cognitive impairment by enhancing autophagy in chemotherapy [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 136: 104715.
- [16] Frederic D, Giovanni S. Impairment of lysosome function and autophagy in rare neurodegenerative diseases [J]. *J Mol Biol*, 2020, 8(432): 2714-2734.
- [17] Ding Y, Zhu Q L, He Y Q, et al. Induction of autophagy by Beclin-1 in granulosa cells contributes to follicular progesterone elevation in ovarian endometriosis [J]. *Transl Res*, 2021, 227: 15-29.
- [18] Xiang H G, Zhang J F, Lin C C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4): 569-581.
- [19] Liu S, Huang L, Geng Y, et al. Rapamycin inhibits spermatogenesis by changing the autophagy status through suppressing mechanistic target of rapamycin-p70S6 kinase in male rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4029-4037.
- [20] Miao X D, Cao L, Zhang Q, et al. Effect of PI3K-mediated autophagy in human osteosarcoma MG63 cells on sensitivity to the chemotherapy drug cisplatin [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8(9): 718-724.
- [21] 尹楠, 严恩石, 刘莉, 等. 高浓度七氟醚通过抑制 VEGF/PI3K/AKT 信号通路诱导神经干细胞凋亡的研究 [J]. *中华细胞与干细胞杂志*, 2018, 8(5): 284-291.
Yi N, Yan E S, Liu L, et al. High concentration sevoflurane induces apoptosis of neural stem cells by inhibiting VEGF/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Chin J Cell Stem Cell*, 2018, 8(5): 284-291.
- [22] Liu T J, Wang B, Li Q X, et al. Effects of microRNA-206 and its target gene IGF-1 on sevoflurane-induced activation of hippocampal astrocytes in aged rats through the PI3K/AKT/CREB signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4294-4306.