

· 实验研究 ·

七氟醚对新生大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴发育的影响

邹菊 刘彦 谭思杰

【摘要】 目的 研究新生期七氟醚暴露对下丘脑-垂体-肾上腺皮质 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴发育及功能的影响。**方法** 新生雄性 SD 大鼠 54 只, 6 日龄, 随机分为三组: 对照组(C 组)、七氟醚组(S 组)和布美他尼+七氟醚组(BS 组), 每组 18 只。C 组: 吸入 100% 氧气 6 h; S 组: 吸入 2.1% 七氟醚 6 h; BS 组: 吸入 2.1% 七氟醚 6 h, 在麻醉前 30 min 和麻醉后 3 h 注射布美他尼。6 h 后, 每组随机选取 6 只处死收集血清, 采用 ELISA 法测定皮质酮浓度; 各组剩余大鼠于第 60 天行高架十字迷宫测试, 第 65 天行束缚应激 30 min, 并在应激前后取尾静脉血, 采用 ELISA 法测定血清皮质酮浓度。**结果** 麻醉后 S 组血清皮质酮浓度明显高于 C 组 ($P < 0.01$); BS 组血清皮质酮浓度明显低于 S 组 ($P < 0.01$)。S 组进入开放臂次数明显少于 C 组 ($P < 0.05$), 开放臂停留时间明显短于 C 组 ($P < 0.05$), 应激前后血清皮质酮浓度明显高于 C 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); BS 组进入开放臂次数明显多于 S 组, 开放臂停留时间明显长于 S 组 ($P < 0.05$), 应激前后血清皮质酮浓度明显低于 S 组 ($P < 0.05$)。**结论** 新生期七氟醚麻醉可导致 HPA 轴功能亢进, 其机制与 GABA_A 受体相关。

【关键词】 七氟醚; 下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴; 布美他尼; 应激

Effects of sevoflurane exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis development in neonatal rat

ZOU Ju, LIU Yan, TAN Sijie. Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China

Corresponding author: TAN Sijie, Email: sijietan@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of sevoflurane exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis development in neonatal rats. **Methods** Fifty-four SD rats (P6) were randomly divided into three groups: control group (group C), sevoflurane group (group S) and bumetanide+sevoflurane group (group BS), $n = 18$ in each group. In group C, rats were treated with pure oxygen for 6 hours and rats in group S received 2.1% sevoflurane anesthesia for 6 h. Rats in group BS also received 2.1% sevoflurane anesthesia for 6 h, but they were injected with bumetanide before 30 min and at 3 h during the anesthesia. 6 rats from each group were randomly selected and the tail blood was collected to measure the corticosterone in the serum using ELISA. Remaining rats in each group were normally housed to P60. A elevated plus maze (EPM) were employed to investigate the anxiety-like behavior, and restraint stress were used to evaluate the function of HPA axis. **Results** In P6 rats, sevoflurane significantly increased the serum corticosterone level ($P < 0.01$) while bumetanide pretreatment decreased corticosterone level ($P < 0.01$). In P60 rats, neonatal exposure to sevoflurane decreased the visits and time spent in the open arms of EPM ($P < 0.05$), increased the corticosterone level pre-stress and post-stress ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pretreatment of bumetanide normalized serum corticosterone level and the anxiety behavior in the EPM. **Conclusion** Neonatal sevoflurane exposure caused hyperactive HPA axis in rats, which is normalized by bumetanide pretreatment through blocking GABA_A receptors.

【Key words】 Sevoflurane; Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; Bumetanide; Stress

全球每年有数百万婴幼儿需要在麻醉下接受各种检查或外科手术操作^[1]。孕后期至婴幼儿时期

人类大脑处于高速发育时期, 具有较强的可塑性^[2], 麻醉药物对大脑内的未成熟神经元发育造成远期影响已经得到广泛关注。临床研究表明, 新生期七氟醚暴露可导致远期认知功能受损和情绪障碍^[3], 并在大量动物实验中得到证实^[4~6], 但其产生机理尚未完全明确。通过 GABA_A 受体抑制神经

基金项目: 国家自然科学基金 (81301144); 国家留学基金 (201608430251)

作者单位: 421001 湖南省衡阳市, 南华大学医学院寄生虫学教研室 (邹菊、刘彦), 组织学与胚胎学教研室 (谭思杰)

通信作者: 谭思杰, Email: sijietan@126.com

元的兴奋性是七氟醚的作用机制之一。但在未成熟神经元内, GABA_A 受体介导神经元的兴奋作用。GABA_A 受体可兴奋下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴并致其远期功能亢进, 损伤中枢神经系统和远期认知功能。因此, 七氟醚可能通过 GABA_A 受体兴奋 HPA 轴并对其产生远期的影响。布美他尼是 Na⁺-K⁺-Cl⁻ 共转运体 1(Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 1, NKCC1) 的特异性抑制剂, 能通过调节 Cl⁻ 的浓度抑制 GABA_A 受体的兴奋作用。本实验观察新生期七氟醚麻醉对 HPA 轴的远期影响, 并用布美他尼进行干预, 探讨其 GABA_A 受体作用机制。

材料与方法

实验动物与分组 健康雄性 SD 大鼠 54 只, 6 日龄, 体重 10~15 g。随机分为三组: 对照组(C 组)、七氟醚组(S 组)和布美他尼+七氟醚组(BS 组), 每组 18 只。

麻醉方法 C 组: 吸入 100% 氧气 6 h 后, 常规饲养; S 组: 腹腔注射 500 μl 生理盐水 30 min 后采用 6% 七氟醚诱导麻醉 3 min, 2.1% 七氟醚维持, 麻醉维持时间为 6 h^[7]; BS 组: 腹腔注射布美他尼 1.82 mg/kg(注射体积约为 100 μl), 30 min 后用 6% 七氟醚诱导麻醉 3 min, 2.1% 七氟醚维持 6 h, 在第 3 小时重复注射相同剂量布美他尼。整个麻醉过程通过水浴维持麻醉箱温度恒定为 37℃。接受麻醉的大鼠均在第 3 小时皮下注射生理盐水 500 μl, 防止脱水。

标本收集和皮质酮测定 麻醉结束后, 每组随机选取 6 只大鼠处死, 收集全血约 1 ml, 室温静置 30 min 后, 置于 4℃ 下 1 500 r/min 离心 5 min, 吸取血清, -80℃ 低温冰箱保存备用。使用皮质酮 ELISA 试剂盒(Cayman 产品号 501320)测定样本的皮质酮浓度。测定按照试剂盒的说明书进行, 具体步骤如下: 首先, 根据预实验结果用纯净水对样本进行适当稀释, 每个样本设 3 个重复孔, 将 50 μl 样本加入酶标板, 并设置标准样品孔和空白对照孔, 37℃ 孵育 2 h 后, 弃上清, 加入酶标试剂 50 μl, 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 去除残留的酶, 加入显色液, 显色 15 min 后, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值), 根据标准品绘制标准曲线, 计算样本的皮质酮浓度。

高架十字迷宫实验 每组剩余 12 只大鼠常规饲养, 第 60 天进行高架十字迷宫测试, 评价焦

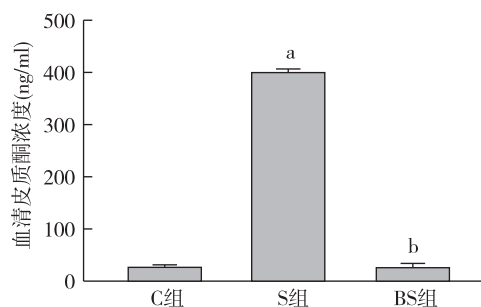
虑行为变化。高架十字迷宫由 2 个开放臂(50 cm×10 cm)、2 个闭合臂(50 cm×10 cm×40 cm)和 1 个中间区(10 cm×10 cm)组成, 迷宫距地面高度为 70 cm。大鼠在测试前先在测试室里适应 30 min, 实验时将大鼠放在中间区, 让其自由探索 5 min, 通过摄像头记录大鼠在开放臂、闭合臂和中间区的时间以及大鼠总的运动距离。在实验过程中, 如果有大鼠跌落平台, 则该动物的时间不计入本组结果。

束缚应激 上述行为实验完成后 5 d, 每组大鼠随机选取 6 只进行束缚应激实验。束缚应激按照文献[8]的方法进行, 在束缚前, 每只动物取尾静脉血 1 ml, 按前述方法收取血清, 保存备用。采用大鼠束缚袋对其束缚 30 min, 造成应激, 30 min 后再次收集尾静脉血 1 ml。收集的血清按照前述方法测定应激前后皮质酮浓度。

统计分析 采用 Sigmaplot 13.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

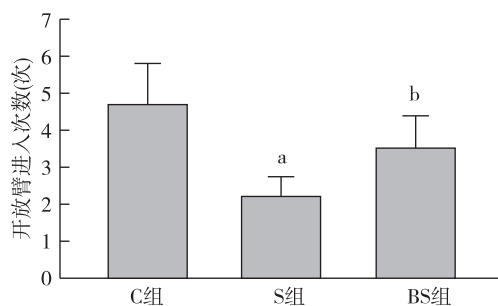
血清皮质酮浓度 麻醉后 S 组血清皮质酮浓度明显高于 C 组(P<0.01); BS 组血清皮质酮浓度明显低于 S 组(P<0.01)。BS 组与 C 组血清皮质酮浓度差异无统计学意义(图 1)。



注: 与 C 组比较, ^aP<0.01; 与 S 组比较, ^bP<0.01

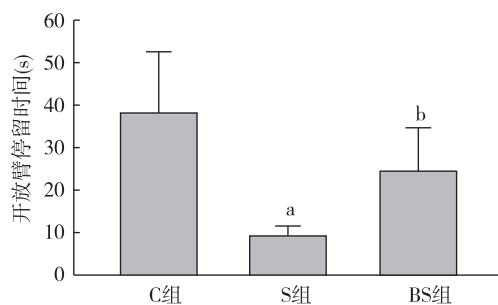
图 1 三组大鼠麻醉后血清皮质酮浓度的比较

高架十字迷宫实验 S 组进入开放臂次数明显少于 C 组, 开放臂停留时间明显短于 C 组(P<0.05); BS 组进入开放臂次数明显多于 S 组, 开放臂停留时间明显长于 S 组(P<0.05)。BS 组与 C 组进入开放臂的次数差异无统计学意义(图 2, 3)。



注:与 C 组比较, ^a $P < 0.05$;与 S 组比较, ^b $P < 0.05$

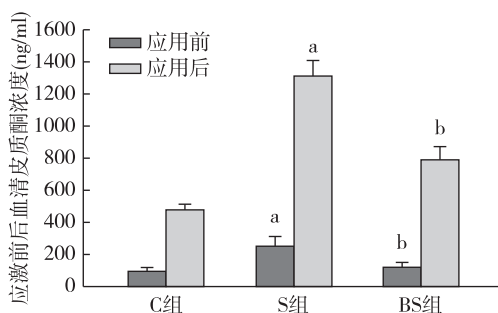
图 2 三组大鼠高架十字迷宫开放臂进入次数的比较



注:与 C 组比较, ^a $P < 0.05$;与 S 组比较, ^b $P < 0.05$

图 3 三组大鼠高架十字迷宫开放臂停留时间的比较

应激前后血清皮质醇浓度 S 组应激前后血清皮质醇浓度明显高于 C 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); BS 组大鼠应激前后血清皮质醇浓度明显低于 S 组($P < 0.05$); BS 组与 C 组应激前后血清皮质醇浓度差异无统计学意义(图 4)。



注:与 C 组比较, ^a $P < 0.05$;与 S 组比较, ^b $P < 0.05$

图 4 三组大鼠应激前后血清皮质醇浓度的比较

讨 论

七氟醚是常用的吸入麻醉药,研究表明,新生期七氟醚麻醉可以导致远期认知功能损害,但其具体机制不明。HPA 轴又称边缘系统-下丘脑-垂体-肾上腺轴(LHPA 轴),是机体内应激反应通

路,HPA 轴功能亢进可损伤中枢神经系统,进而引发焦虑症、抑郁症,导致认知功能受损^[9]。本研究通过建立新生大鼠七氟醚麻醉的动物模型,并用布美他尼干预,探讨七氟醚对 HPA 轴的发育及其功能的影响。本研究结果显示,新生大鼠麻醉后血清皮质酮浓度明显升高,而布美他尼处理可以明显降低皮质酮浓度。此外,布美他尼处理可以改善七氟醚所致的 HPA 轴功能亢进,减轻焦虑样行为。

在应激状态下,HPA 轴被激活,肾上腺分泌大量的皮质激素应对应激。肾上腺皮质激素也可以作用于海马,对 HPA 轴起到负反馈调节。长期的 HPA 功能亢进可损伤海马,进而损害认知功能。本研究结果显示,新生期七氟醚麻醉可以导致皮质激素皮质酮明显增加,产生类似应激的效果,而且对 HPA 轴可产生远期影响,并导致焦虑样行为,这与本课题组前期关于丙泊酚的研究结果一致^[10]。值得注意的是,HPA 轴的活性受 GABA_A 受体的调控^[11],因而麻醉剂激活 HPA 轴的机理可能与其对 GABA_A 受体的激动作用有关。

GABA_A 受体是一种 Cl⁻ 通道, GABA_A 受体离子通道在 GABA 的作用下开放, Cl⁻ 顺浓度梯度跨细胞膜流动,改变膜电位,影响神经细胞的兴奋性。跨膜 Cl⁻ 浓度梯度由细胞膜上的 NKCC1 和 K⁺-Cl⁻ 转运体(K⁺-Cl-Cotransporter 2, KCC2)共同维持。其中, NKCC1 促进细胞内 Cl⁻ 的积累,而 KCC2 则外排胞内的 Cl⁻,降低胞内的 Cl⁻ 浓度。在成熟神经元内, KCC2 的表达高于 NKCC1,细胞外的 Cl⁻ 浓度高于细胞内, GABA_A 受体开放时, Cl⁻ 流向胞内,膜电位增加,兴奋性降低;然而,在未成熟神经元中, NKCC1 的表达高于 KCC2,使得细胞内的 Cl⁻ 高于细胞外,七氟醚暴露时,可导致 GABA_A 受体开放,胞内的 Cl⁻ 外流,膜电位下降,神经细胞兴奋^[12]。因此,在未成熟大脑内,七氟醚能通过 GABA_A 受体兴奋新生神经元,进而激活 HPA 轴,导致远期 HPA 轴功能亢进。布美他尼是 NKCC1 的特异性抑制剂,本研究旨在通过布美他尼阻断七氟醚通过 GABA_A 受体对 HPA 轴的兴奋作用,改善七氟醚对 HPA 轴发育的影响。本研究结果显示,经布美他尼处理后,新生大鼠的皮质酮浓度明显低于单纯七氟醚麻醉的大鼠,而且 P60 的行为测试和应激实验显示,布美他尼能有效降低 HPA 轴的兴奋性从而改善新生期七氟醚麻醉导致的焦虑样行为。

综上所述, 新生期七氟醚暴露可使大鼠 HPA 远期功能亢进并导致焦虑样行为, 布美他尼可逆转新生期七氟醚暴露对 HPA 轴发育的影响, 其机制与 GABA_A 受体密切相关。

参 考 文 献

- [1] Servick K. Biomedical research. Researchers struggle to gauge risks of childhood anesthesia. *Science*, 2014, 346(6214): 1161-1162.
- [2] Jin X. The role of neurogenesis during development and in the adult brain. *Eur J Neurosci*, 2016, 44(6): 2291-2299.
- [3] Sanders RD, Hassell J, Davidson AJ, et al. Impact of anaesthetics and surgery on neurodevelopment: an update. *Br J Anaesth*, 2013, 110 Suppl 1: i53-i72.
- [4] Satomoto M, Satoh Y, Terui K, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology*, 2009, 110(3): 628-637.
- [5] 张慧, 孙晓茹, 唐会, 等. 丰富环境对新生小鼠暴露于七氟醚所致微清蛋白中间神经元表型缺失及认知功能损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(2): 156-160.
- [6] Ji MH, Wang XM, Sun XR, et al. Environmental enrichment ameliorates neonatal sevoflurane exposure-induced cognitive and synaptic plasticity impairments. *J Mol Neurosci*, 2015, 57(3): 358-365.
- [7] Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 2003, 23(3): 876-882.
- [8] Porterfield VM, Zimomra ZR, Caldwell EA, et al. Rat strain differences in restraint stress-induced brain cytokines. *Neuroscience*, 2011, 1(188): 48-54.
- [9] Wingfield K, Wolf OT. Stress, memory, and the hippocampus. *Front Neurol Neurosci*, 2014, 34: 109-120.
- [10] Tan S, Xu C, Zhu W, et al. Endocrine and neurobehavioral abnormalities induced by propofol administered to neonatal rats. *Anesthesiology*, 2014, 121(5): 1010-1017.
- [11] Crowley SK, Girdler SS. Neurosteroid, GABAergic and hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis regulation: what is the current state of knowledge in humans? *Psychopharmacology (Berl)*, 2014, 231(17): 3619-3634.
- [12] Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, et al. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, 2012, 18(5): 467-486.

(收稿日期: 2016-12-07)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》中英文摘要撰写规范

论著文章须有中、英文摘要, 内容必须包括目的 (Objective)、方法 (Methods)、结果 (Results) 和结论 (Conclusion) 四个部分, 目的主要是回答为什么进行此项研究, 说明提出问题的理由, 表明研究的范围和重要性。方法中应简要说明研究课题的基本设计, 所用的原理, 条件, 对象, 材料, 设备, 如何分组对照, 研究范围精确度, 观察的指标等。结果部分应写出本研究的主要数据, 被确定的关系, 观察结果, 得到的效果, 有何新发现。结论是结果内容的升华, 是由结果推论而出, 是结果的分析, 研究的比较, 评价, 应用, 假设, 启发, 建议及预测等。摘要应具有独立性, 即不阅读全文就能获得必要的信息, 采用第三人称撰写, 不用“本文”、“作者”等主语, 不加评论和解释, 摘要中首次出现的缩略语、代号等, 非公认公知者, 须注明全称。考虑篇幅的限制, 中文摘要可简略些, 一般 300~500 字左右, 英文摘要与中文摘要原则上相对应, 考虑到国外读者的需要, 可更详细, 一般 500 个实词左右。英文摘要尚应包括文题 (仅第一个字母大写)、所有作者姓名 (姓在前, 名在后; 姓全大写, 名字仅首字母大写)、第一作者单位名称和科室、所在城市名、邮政编码及国名。