

## · 实验研究 ·

# 异氟醚通过上调 NMDA 受体导致发育期大鼠海马神经元凋亡

赵以林 张雪 李世勇 方茜 严婧 唐晓乐 罗爱林

**【摘要】 目的** 探讨异氟醚麻醉对新生大鼠海马神经元 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚基及凋亡的影响。**方法** 新生 1 d 的 SD 大鼠 36 只,雌雄不拘,取海马组织进行原代培养。采用随机数字表法将培养海马神经元 5 d 的培养皿随机分为三组:对照组(C 组)、异氟醚组(I 组)和 AP5+异氟醚组(A 组),每组 12 只。I 组和 A 组培养的海马神经元放置在密闭箱中,吸入 1.5% 异氟醚和纯氧,吸入时间 6 h, C 组不做任何处理。于异氟醚麻醉结束后 2、4、6、24 h(C 组于相应时点),提取海马神经元总 mRNA 和总蛋白,采用 RT-PCR 法测定 NR2A mRNA、NR2B mRNA 和 caspase-3 mRNA 的表达量,采用 Western blot 法测定 caspase-3 蛋白含量。**结果** 与 C 组比较,异氟醚麻醉结束后 2、4 和 6 h I 组海马神经元 NR2A mRNA 和 NR2B mRNA 的表达量明显上调( $P < 0.05$ )。与 C 组和 A 组比较,I 组异氟醚麻醉结束后 2、4 和 6 h 海马神经元 caspase-3 mRNA 的表达量、异氟醚麻醉后 4 和 6 h 海马 caspase-3 蛋白含量明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** 吸入 1.5% 异氟醚可能通过上调新生大鼠海马神经元 NMDA 受体导致发育神经元凋亡,阻断 NMDA 受体可以预防异氟醚导致的发育期海马神经元凋亡。

**【关键词】** 异氟醚;NMDA 受体;凋亡;新生;海马

## Isoflurane induces apoptosis of developing hippocampal neurons by up-regulating NMDA receptor

ZHAO Yilin, ZHANG Xue, LI Shiyong, FANG Xi, YAN Jing, TANG Xiaole, LUO Ailin. Department of Anesthesiology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: ZHANG Xue, Email: xuezhang@hust.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of isoflurane anesthesia on NMDA receptor subunits and cleaved caspase-3 in hippocampal of neonatal rats. **Methods** Thirty-six primary culture neurons were randomly divided into 3 groups ( $n = 12$  each): control groups (group C), isoflurane group (group I) and AP5+isoflurane (group A). 1.5% isoflurane with 100% O<sub>2</sub> was inhaled for 6 h in group I and group A. Group C received no treatment. The total mRNA and protein were extracted 2, 4, 6 and 24 h after isoflurane anesthesia. RT-PCR was employed to detect NR2A mRNA, NR2B mRNA and caspase-3 mRNA expression, and Western blot was used to detect cleaved caspase-3 level. **Results** Compared with group C, the expressions of NR2A mRNA, NR2B mRNA were increased at 2, 4, 6 h after isoflurane anesthesia ( $P < 0.05$ ). Compared with group C and group A, the level of caspase-3 mRNA 2, 4, 6 h after isoflurane anesthesia and cleaved caspase-3 4 h and 6 h after isoflurane anesthesia were up-regulated in group I ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Inhaled isoflurane may induce the apoptosis of developmental neurons by up-regulating the NMDA receptor of hippocampal neurons in neonatal rats, and blocking the NMDA receptor can prevent the apoptosis of hippocampal neurons induced by isoflurane.

**【Key words】** Isoflurane; NMDA receptor; Apoptosis; Newborn; Hippocampus

麻醉药可导致发育期中枢神经系统功能障碍,但具体机制尚未完全明确<sup>[1-5]</sup>。在神经元发育过程中,NMDA 受体亚单位随着神经元发育及活动依

赖性转变<sup>[6-9]</sup>。在发育期神经元 NMDA 受体亚单位主要由 NR1/NR2B 亚基构成。在海马所在的前脑区,NMDA 受体 NR2A/NR2B 比例会随个体发育而升高,而长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD)诱导的难易程度也随之发生变化,提示 NR2A/NR2B 比例可能影响脑的发育和突触可塑性的形成<sup>[8-10]</sup>。本研究拟探讨异氟醚对发育期海马神经元 NMDA 受体亚基表达影响,从而影响发育

DOI:10.12089/jca.2018.09.013

基金项目:国家自然科学基金(81500982)

作者单位:430030 武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉科

通信作者:张雪,Email:xuezhang@hust.edu.cn

期神经元凋亡及可塑性。

## 材料与方法

**主要试剂与仪器** Neurobasal 培养液、DMEM 培养液、胎牛血清、马血清、B27、胰蛋白酶, 活化 caspase-3 兔抗大鼠单克隆抗体,  $\beta$ -actin 小鼠抗大鼠单克隆抗体, AP5 辣根过氧化物标记抗兔 IgG、抗小鼠 IgG, Trizol 试剂, 逆转录试剂盒, 实时定量 PCR 试剂盒, Bio Photometer plus 核酸蛋白测定仪, ABI 实时荧光定量 PCR 仪, 凝胶制备试剂盒、PIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、凝胶成像系统, ECL 发光试剂盒。

**动物与分组** 新生 1 d 的 SD 大鼠 36 只, 雌雄不拘, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。原代培养<sup>[1-2]</sup> 5 d 后采用 beta-tubulin 染色法鉴定神经元纯度达 90% 以上进行试验。采用随机数字表法, 将培养皿随机分为 3 组( $n = 12$ ): 对照组(C 组)、异氟醚组(I 组)和 AP5+异氟醚组(A 组)。I 组和 A 组海马神经元放置在自制的密闭箱内, 进气端连接麻醉机, 通入异氟醚和纯氧, 吸入浓度 1.5%, 吸入时间 6 h, C 组不做任何处理。氧流量 2 L/min, 35 °C。

**NR2A、NR2B 和 caspase-3 mRNA 表达检测** 采用 Trizol 试剂盒提取异氟醚麻醉结束后 2、4、6 和 24 h 海马神经元总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 按 RT-PCR 试剂盒说明书取 500 ng 总 RNA 逆转录合成 cDNA, 然后以 SYBR Green I 作为荧光标记物, 在 ABI 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。NR2A 上游引物 5'-CAGTGTCCTCAAGCAAAC-3', 下游引物 5'-GTTTGTAAGGGTCCGAGGGA-3', PCR 产物片段为 179 bp; NR2B 上游引物 5'-AATACAGTCCCGTGC-CAGAA-3', 下游引物 5'-CACCGATCATGC-CATTCCAG-3', PCR 产物片段长度为 205 bp; caspase-3 上游引物 5'-GCAGCAGCCTCAAATTGTTGACTA-3', 下游引物 5'-TGCTCCGGCTCAAACCATC-3', PCR 产物片段长度为 144 bp; GAPDH 上游引物 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 下游引物 5'-TTTGAGGGTG-CAGCGAACTT-3', PCR 产物片段长度为 253 bp。扩增参数: 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火及延伸 30 s, 共反应 40 个循环。以各时点目的基因相对于 C 组的表达量即  $2^{-CT}[-CT = -(CT - CT_{\text{基础值}})]$ ;  $CT = CT_{\text{目的基因}} - CT_{\beta\text{-actin}}$  反映其表达水平。

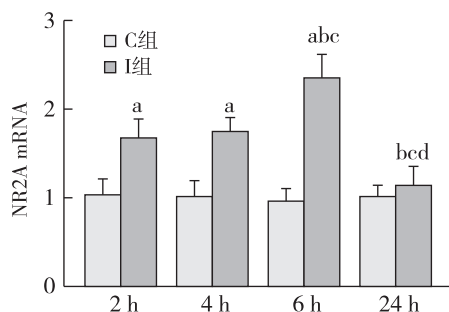
**caspase-3 蛋白含量检测** 取海马神经元, 冰浴下加入 100  $\mu$ l 预冷的细胞裂解液(PIPA:PMSF=9:1)匀浆, 室温静置 30 min 后以 4 °C 下 12 000 r/min 离心 25 min 取上清, -80 °C 保存。按每孔 8% 分离胶+6% 浓缩胶加入蛋白样本 20  $\mu$ g, 60~120 V 电泳, 然后转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 分别加入单克隆兔抗大鼠 caspase-3 和小鼠抗大鼠  $\beta$ -actin 单抗, 4 °C 摇床过夜, TBS-T 洗涤 3 次, 每次 10 min, 然后分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG-HRP, 室温摇床 1 h, TBS-T 洗涤 3 次, 每次 10 min, 采用 ECL 显色试剂盒显色, X 线胶片暗室曝光。采用 Quantity One 4.62 软件计算光密度值(OD 值), 取处理组 OD 值与对照组 OD 值的比值, 反映 caspase-3 蛋白的浓度。

**统计分析** 采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内比较采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

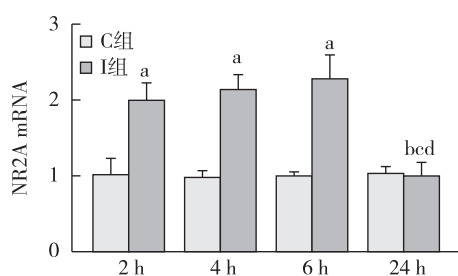
**海马神经元 NMDA 受体亚单位 mRNA 表达量** 与 C 组比较, 麻醉结束后 2、4、6 h I 组海马神经元 NR2A mRNA 和 NR2B mRNA 表达量均明显升高( $P < 0.05$ ); 与麻醉结束后 2 h 比较, 麻醉结束后 6 h I 组海马神经元 NR2A mRNA 表达量明显升高, 麻醉结束后 24 h 表达量明显降低, 而 NR2B mRNA 表达量明显降低( $P < 0.05$ ); 与麻醉结束后 4 h 比较, 麻醉结束后 6 h I 组海马神经元 NR2A mRNA 表达量明显升高( $P < 0.05$ ); 与麻醉结束后 6 h 比较, 麻醉结束后 24 h 海马神经元 NR2A mRNA 和 NR2B mRNA 表达量明显降低( $P < 0.05$ ); C 组上述指标各时点差异无统计学意义(图 1-2)。

**海马神经元 caspase-3 mRNA 和蛋白含量** 与 C 组比较, I 组麻醉结束后 2、4、6 h 海马神经元 caspase-3 mRNA 表达量和 caspase-3 蛋白含量均明显升高( $P < 0.05$ ); 与麻醉结束后 2 h 比较, I 组麻醉结束后 4、6 和 24 h 海马神经元 caspase-3 mRNA 表达量和麻醉结束后 4 和 6 h caspase-3 蛋白含量明显升高( $P < 0.05$ ); 与麻醉结束后 4 h 比较, I 组麻醉结束后 6、24 h 海马 caspase-3 mRNA 表达量, 麻醉结束后 24 h caspase-3 蛋白含量明显降低( $P < 0.05$ ); 与麻醉结束后 6 h 比较, 麻醉结束后



注:与 C 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 2 h 比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 4 h 比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 6 h 比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

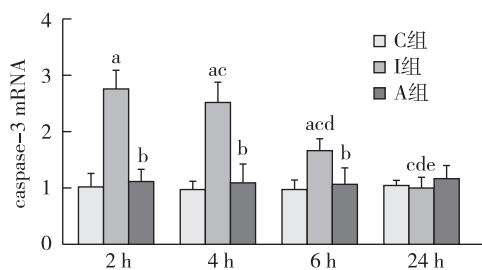
图 1 两组大鼠 NR2A mRNA 表达量的比较



注:与 C 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 2 h 比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 4 h 比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 6 h 比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

图 2 两组大鼠 NR2B mRNA 表达量的比较

24 h I 组海马 caspase-3 mRNA 表达量和 caspase-3 蛋白含量明显降低( $P < 0.05$ );C 组上述指标各时点差异无统计学意义。与 I 组比较,A 组麻醉结束后 2、4、6 h caspase-3 mRNA 表达量和麻醉结束后 4、6 h caspase-3 蛋白含量降低( $P < 0.05$ )。A 组上述指标各时点差异无统计学意义(图 3-4)。

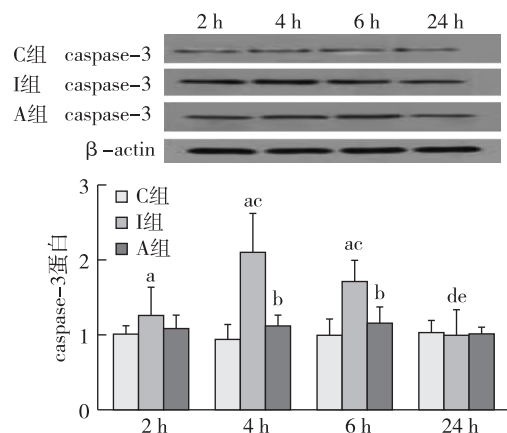


注:与 C 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 I 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 2 h 比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 4 h 比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 6 h 比较,<sup>e</sup> $P < 0.05$

图 3 三组大鼠 caspase-3 mRNA 表达量的比较

## 讨 论

发育期神经元是轴突生长、突触形成及神经环路形成的重要阶段。而发育期大鼠神经元发育高



注:与 C 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 I 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 2 h 比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 4 h 比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 6 h 比较,<sup>e</sup> $P < 0.05$

图 4 三组大鼠 caspase-3 蛋白含量的比较

峰期为出生后 1~7 d,出生后 5 d 是神经元发育的高峰期<sup>[1]</sup>,此阶段易受各种麻醉药的影响<sup>[1, 3, 5]</sup>。其主要原因是 GABA 这一中枢神经系统的重要抑制性神经递质,在出生早期是作为一种主要的兴奋性神经递质而发挥作用。吸入麻醉药通过协同 GABA 亦或直接激活胞膜表达的 GABA<sub>A</sub> 受体,使细胞内 Cl<sup>-</sup> 外流,细胞膜去极化,细胞内钙离子内流最终导致细胞凋亡<sup>[-1-2, 4-5, 11]</sup>。因此本研究采用出生后 5 d 的大鼠作为研究对象探讨吸入麻醉的毒性机制。

在发育期 NMDA 受体亚基的表达可受到外来刺激如吸入麻醉药而发生改变。NMDA 受体在调节神经元的树突、轴突发育及参与突触可塑性形成中起着关键作用<sup>[6-10, 12-13]</sup>。研究表明 NMDA 受体亚基受到活动依赖性可塑性调节<sup>[6, 8]</sup>。在发育期神经元 NMDA 受体亚单位主要 NR2B 亚基构成。在海马所在的前脑区,NMDA 受体 NR2A 亚基表达会随个体发育及外在刺激而升高。研究发现激活神经元 NR2B 受体,增加细胞膜 AMPA 受体的内容,介导 LTD,升高 LTP/LTD 反转阈值,减少细胞外钙离子内流<sup>[7, 9-10]</sup>。而激活 NR2A 受体,增加细胞膜 AMPA 受体的插入,介导 LTP,降低 LTP/LTD 反转阈值,持续增加细胞外钙离子内流,最终导致细胞毒性损伤<sup>[8-9]</sup>。因此,本研究探讨吸入麻醉药异氟醚对发育期海马神经元 NMDA 受体表达的影响。

本研究结果显示,1.5%异氟醚麻醉处理发育期海马神经元,NR2A mRNA、NR2B mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达上调,caspase-3 蛋白含量上调,

提示 1.5% 异氟醚麻醉可导致海马神经元可塑性改变。阻断 NMDA 受体可抑制 1.5% 异氟醚麻醉导致 caspase-3 mRNA 及 caspase-3 表达。异氟醚可通过神经元 GABA<sub>A</sub> 受体,引起神经元膜的去极化,NMDA 受体亚基表达增加,引起神经元内钙离子钙超载,导致发育期神经元凋亡。

综上所述,吸入麻醉异氟醚可能通过上调发育期神经元 NMDA 受体亚基表达从而导致细胞凋亡。

### 参 考 文 献

- [1] Zhao YL, Xiang Q, Shi QY, et al. GABAergic excitotoxicity injury of the immature hippocampal pyramidal neurons' exposure to isoflurane. *Anesth Analg*, 2011, 113(5): 1152-1160.
- [2] Zhao Y, Jin X, Wang J, et al. Isoflurane enhances the expression of cytochrome C by facilitation of NMDA receptor in developing rat hippocampal neurons in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011, 31(6): 779-783.
- [3] Akerman CJ, Cline HT. Depolarizing GABAergic conductances regulate the balance of excitation to inhibition in the developing retinotectal circuit in vivo. *J Neurosci*, 2006, 26(19): 5117-5130.
- [4] Broad KD, Hassell J, Fleiss B, et al. Isoflurane exposure induces cell death, microglial activation and modifies the expression of genes supporting neurodevelopment and cognitive function in the male newborn piglet brain. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166784.
- [5] Chai D, Jiang H, Li Q. Isoflurane neurotoxicity involves activation of hypoxia inducible factor-1alpha via intracellular calcium in neonatal rodents. *Brain Res*, 2016, 1653: 39-50.
- [6] Gambrell AC, Barria A. NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(14): 5855-5860.
- [7] Lopez de Armentia M, Sah P. Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala. *J Neurosci*, 2003, 23(17): 6876-6883.
- [8] Lu W, Man H, Ju W, et al. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 2001, 29(1): 243-254.
- [9] Matta JA, Ashby MC, Sanz-Clemente A, et al. mGluR5 and NMDA receptors drive the experience- and activity-dependent NMDA receptor NR2B to NR2A subunit switch. *Neuron*, 2011, 70(2): 339-351.
- [10] Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 2008, 55(7): 1081-1094.
- [11] Sen T, Sen N. Isoflurane-induced inactivation of CREB through histone deacetylase 4 is responsible for cognitive impairment in developing brain. *Neurobiol Dis*, 2016, 96: 12-21.
- [12] Sanz-Clemente A, Matta JA, Isaac JT, et al. Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron*, 2010, 67(6): 984-996.
- [13] Toyoda H, Ohno K, Yamada J, et al. Induction of NMDA and GABA<sub>A</sub> receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons. *J Neurophysiol*, 2003, 89(3): 1353-1362.

(收稿日期:2018-03-30)

## · 读者 · 作者 · 编者 ·

### 《临床麻醉学杂志》关于一稿两投问题的声明

为维护学术刊物的严肃性和科学性,也为了维护作者的名誉和向广大读者负责,本刊编辑部重申坚决反对一稿两投并采取以下措施:(1)作者和单位对来稿的真实性和科学性均应自行负责。刊出前需第一作者在校样首页亲笔签名,临床研究和实验研究来稿的通信作者也需亲笔签名。(2)来稿需附单位推荐信,应注明稿件无一稿两投,署名无争议,并加盖公章。(3)凡接到编辑部收稿回执后 3 个月内未接到退稿通知,系稿件仍在审阅中,作者欲投他刊,或将在他刊上发表,请先与编辑部联系撤稿,切勿一稿两投。(4)编辑部认为来稿有一稿两投嫌疑时,在认真收集有关资料和仔细核对后通知作者,并由作者就此问题作出解释。(5)一稿两用一经证实,将择期在杂志上刊出其作者单位和姓名以及撤销该文的通告;向作者所在单位和同类杂志通报;2 年内拒绝发表该作者为第一作者所撰写的任何来稿。