

七氟醚对发育期大脑毒性作用的研究进展

陈筱诗 杨进国

越来越多的研究表明,发育期中枢神经系统(central nervous system, CNS)暴露于七氟醚后导致广泛的神经元凋亡、神经退行性变等,在成长过程中出现学习记忆和认知障碍及远期行为异常^[1,2];部分学者也在探究可能减轻七氟醚诱导发育期神经毒性的干预措施。

发育期大脑的神经电生理特点

对于哺乳动物而言,CNS发育期是一个相对宽泛的概念。在人类,此阶段以妊娠后期到出生后数年(3~6岁左右);在啮齿类动物,该阶段从妊娠后期持续到出生后2W左右^[3]。目前认为吸入麻醉药产生麻醉作用的中枢机制可能与 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)受体和甘氨酸受体的激活、N-甲基-D-天(门)冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体等的抑制相关。脑组织对内环境的变化十分敏感,七氟醚作用于中枢后,改变脑的微循环,对大脑造成损伤。

在发育早期,神经元表达 Na^+ - K^+ - 2Cl^- 共同转运体(NKCC)而不表达 K^+ - Cl^- 同向转运体,其中 Na^+ - K^+ - Cl^- 内向共转运体(Na^+ - K^+ - Cl^- cotransporter 1, NKCC1)促进细胞内 Cl^- 堆积^[4]。啮齿类动物NKCC1表达的高峰期是出生后(postnatal day, PND)5~7d。因此,与成年期相比,发育期神经细胞内 Cl^- 浓度更高,其平衡电位比静息电位的绝对值小。 γ -氨基丁酸A型受体(GABA_A受体)和甘氨酸受体都是 Cl^- 通道受体,GABA_A受体的激活可导致大量 Cl^- 外流,神经元去极化。七氟醚激活GABA受体和甘氨酸受体, Cl^- 外流,引起发育期神经元除极,继而细胞膜上离子通道如电压依赖性 Ca^{2+} 通道开放,神经细胞胞质内 Ca^{2+} 增加,致使神经元失去正常功能甚至死亡^[5]。

七氟醚对发育期 CNS 毒性作用的表现

七氟醚诱导发育期海马神经元凋亡、改变突触可塑性和脑代谢等,影响发育期及成熟期大脑的结构和功能,导致长期的学习和记忆功能障碍及神经性行为的异常。

七氟醚诱导发育期神经元的凋亡 目前对七氟醚神经毒性的研究普遍集中在神经元凋亡。七氟醚诱导发育期神经元凋亡的机制尚未阐明,其属于生理性凋亡还是病理性凋亡仍不清楚。研究发现,PND 5~7d的大鼠、小鼠接受

七氟醚麻醉后,可检测到凋亡小体或凋亡蛋白的存在^[2,6]。

同其他全麻药物一样,七氟醚的主要作用机制是激动GABA_A受体和(或)抑制NMDA受体^[7,8]。七氟醚可使GABA_A受体过度激活对CNS产生抑制作用,致使神经元发生凋亡变性^[9]。为了更清楚地了解GABA_A受体在这一现象中的具体作用机制,Qiu等^[10]研究从Wistar大鼠胚胎取出干细胞体外培养,观察到七氟醚处理后的细胞存活率明显降低,时间依赖性的细胞毒性增加,Annexin V/PI双染色流式细胞仪检测显示细胞凋亡率升高,GABA_A受体蛋白含量、促凋亡蛋白Bax和caspase-3表达增加,抗凋亡蛋白Bcl-2表达下降;GABA受体抑制剂Bicuculline能逆转七氟醚产生的所有不利结果。表明七氟醚激活GABA_A受体导致神经干细胞凋亡使得细胞发生退化。

GABA_A受体有 α_1 、 α_2 、 β 三个亚型,约PND 7d大鼠的GABA_A受体由 α_2 转为 α_1 亚型,GABA_A受体的药理学性质也随之发生变化。设想这一改变促进神经退行性疾病的发生,Piehl等^[11]取PND 4、7、14d大鼠的海马组织做成切片,暴露于2.0%的七氟醚或者空气中5h,结果神经元对七氟醚的敏感性呈年龄依赖性的增高:PND 14d表现出即刻的细胞死亡,PND 4d和PND 7d则在72h后表现出明显的细胞死亡。同时在PND 4d和PND 7d海马组织切片中检测发现, α_1 亚单位减少或(和) α_2 亚单位增多能够提升细胞存活率,在PND 14d大鼠 α_1 亚单位增多促进细胞存活。表明年龄和GABA_A受体亚基组成与细胞存活密切相关。

NMDA受体是离子型谷氨酸受体(iGluR)的一个亚型,参与调节神经元的存活和神经元的树突、轴突结构发育及参与突触可塑性的形成等,对神经元回路的形成亦起着关键的作用。突触内NMDA受体在细胞生存方面起到了重要的作用,而突触外NMDA受体的激活则与细胞死亡有关^[11]。那么突触内NMDA受体激活是否可以缓解七氟醚导致的神经毒性呢?多个研究根据此设想设计动物实验,在体和离体实验都证明激活突触内含NR2A的NMDA受体或者抑制突触外含NR2B的NMDA受体,都能够缓解七氟醚暴露诱导的神经元凋亡。同时离体实验发现七氟醚抑制ERK1/2的磷酸化,而激活突触内NMDA受体则逆转了这一现象^[9~12]。表明ERK1/2 MAPK信号通路可能参与突触内NR2A对七氟醚神经毒性的保护作用。

脑缺氧和 CO_2 蓄积是导致脑细胞凋亡的因素之一。为了排除这一因素的影响,Edwards等^[8]采用2.1%七氟醚麻醉大鼠,通过动脉血气显示大鼠无缺氧或者通气不足的情

作者单位:442000 湖北省十堰市,湖北医药学院附属东风医院麻醉科

通信作者:杨进国,Email: yrxzy@126.com

况后,进行正式实验,发现 PND 4 d 大鼠七氟醚麻醉 6 h、第 1 天和第 14~17 天检测到活化型 caspase-3 表达明显增多。

七氟醚诱导改变突触可塑性 突触可塑性一般指突触传递可塑性,主要表现为长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD),二者被公认为是学习记忆活动在细胞水平的生物学基础。Haseneder 等^[13]运用大鼠组织(包括海马)切片记录了暴露七氟醚后场兴奋性突触后电位(fEPSPs)并与暴露前的相比较,发现七氟醚剂量依赖性地减少 fEPSPs。Ishizeki 等^[14]研究发现七氟醚浓度依赖性的抑制 LTP 的诱发,GABA 受体阻断剂 Bicuculline 可阻断这种抑制。Kato 等^[15]研究也显示在幼年期大鼠七氟醚麻醉后,成年后海马区 LTP 被显著抑制。研究显示,PND 2~4 周的大鼠接受七氟醚等麻醉后,不改变树突棘的分支状结构,但增加了树突棘的数目,促进大部分新生树突棘整合入神经环路^[16]。树突棘是突触建立联系的基本位点,其数目、形状和分布的改变直接影响神经元的兴奋性。可见在突触形成期(不仅仅是突触形成关键期),暴露七氟醚后神经环路某些特征的改变即可影响神经元长期的功能。

单次暴露一定的时间和反复暴露累积相同的时间,二者的结果有无区别? Amrock 等^[17]设计了对照,结果发现反复多次暴露比单次短时间和单次等长时间暴露后导致更多的突触丢失。但是长期观察来看,即使是短暂的单次暴露,也会造成持久的神经回路的改变,并且增加了突触对药物的敏感性,更易于丢失。这提示在临床上要注意控制七氟醚的吸入时间,以及考虑患儿之前是否有过七氟醚麻醉下手术史。

七氟醚暴露后脑代谢的改变 Yi 等^[18]的研究结果表明,七氟醚暴露后使 Sestrin-2 基因和蛋白表达呈剂量依赖性增加,通过 siRNA 使其沉默后细胞内 ROS 增加而 SOD 活性却降低,敲除 M17 细胞中的 Sestrin-2 基因后细胞凋亡数量、抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 caspase-3 显著增多,加剧了 Bax 蛋白的增加,表明 sestrin-2 对七氟醚麻醉诱导的神经元凋亡的抑制作用可能与线粒体通路的调节相关。同时,研究人员也观察到海马区神经电活动的改变,如微型抑制性突触后电流的出现^[2]。

Makaryus 等^[7]研究应用质子磁共振波谱(proton magnetic resonance spectroscopy, 1HMRS)分别采集 PND 7 d 和 PND 15 d 新生仔鼠七氟醚暴露 24 h 和 48 h 后的大脑光谱,跟踪神经元代谢产物的变化情况,发现 PND 7 d 暴露于七氟醚的小鼠 N-乙酰天冬氨酸(NAA)合成减少。1HMRS 对 NAA 的代谢检测敏感性高,并且可用于不同的物种,这种潜在的临床相关性可能在人类研究新生大脑的神经毒性方面提供有力的证据。

Xu 等^[2]研究发现,七氟醚麻醉能显著提高大鼠幼仔的皮质酮水平,成年后应激时分泌更多的皮质酮,并且雌性和雄性在神经内分泌上有差异,即雄性体内皮质酮水平更高,提示七氟醚提高皮质酮水平可能是导致长时间行为和

内分泌异常的机制之一。但是 Zhang 等^[19]研究发现 PND 4~6 d 雌性和雄性的鼠吸入七氟醚后血清皮质酮水平相近。因此,七氟醚导致的血清皮质酮水平的增高是否与性别有关需要更多后续研究。

在发育期七氟醚麻醉可导致 Ca^{2+} 通道被抑制^[20]。VGCC 是细胞外 Ca^{2+} 进入细胞内的重要途径。七氟醚导致 Ca^{2+} 内流减少,可能导致 VGCC 开放的可能性降低,进一步导致细胞膜超极化,抑制神经元的兴奋。

也有研究发现发育期七氟醚暴露导致促炎因子 IL-6 表达增多,导致神经性炎症,引起 PSD-95 蛋白(突触后标记)表达水平降低,突触生成减少,从而影响学习和记忆能力^[21]。IL-6 等促炎因子主要由胶质细胞分泌,表达上调可激活胶质细胞、抑制兴奋性递质重摄取,并提高神经元对兴奋性神经递质的反应性,产生毒性,从而影响学习记忆功能。

七氟醚暴露于发育期大脑后机体行为学的改变 分子水平的改变与宏观上行为学的改变密不可分,许多动物研究一致认为七氟醚暴露导致学习和记忆能力损害、认知功能障碍和社交障碍以及物品识别、关联恐惧的能力降低^[6,22]。对于七氟醚暴露与自闭症的关系,目前尚有争议。虽然目前接受七氟醚麻醉的儿童的健康问题成为关注的焦点,但是也必须考虑到妊娠期接受全麻的群体。动物实验^[1]中观察到妊娠期暴露于七氟醚后母体的母性行为发生了改变,具体变为不给后代哺乳,致使半数幼崽饥饿致死。Raper 等^[23]研究对 10 只幼年猕猴按照普通小儿麻醉的剂量对他们实施 4 h 麻醉,但并不实施手术,单独观察麻醉的效果和对婴儿可能存在的不良反应。结果发现,若猕猴出生 7 d、2 周、4 周后 3 次都接受麻醉,与只进行 1 次麻醉比较,猕猴认知功能更差;然后,关注 6 个月后接受麻醉和不接受麻醉的猕猴的社会行为和情绪变化发现,接受麻醉的猕猴更容易出现焦虑等情绪变化,且至少接受麻醉 5 个月后才能观察到他们存在的情绪变化。研究人员还需要进行进一步的研究,以探究他们情绪变化是永久性存在还是暂时性,如果是暂时性,则存在时长为多久、该情绪变化是否可以得到解决。

Flick 等^[24]进行的一个大型的匹配队列研究发现,2 岁之前反复暴露于麻醉和手术可能影响神经发育造成永久的不良后果,是后来学习障碍的独立危险因素。DiMaggio 等^[25]进行的队列研究结论也与之相一致。

干预措施

尽管目前为止对七氟醚导致的发育期神经毒性的具体机制仍不甚明了,但是目前已有研究展示出了对其毒性预防的方法。

布美他尼(bumetanide) Edwards 等^[8]研究发现,NKCC1 抑制剂 bumetanide 5 mmol/kg 注射降低 PND4-9 大鼠癫痫样脑电波而 PND10-17 的未发生改变,显示了 Bumetanide 对七氟醚导致的大脑皮质癫痫样活动的抑制。Xu

等^[2]和 Seubert 等^[26]研究得出一致结论。可能机制是 Bupivacaine 使发育期神经元中 GABA_A 受体介导的信号转导由兴奋性转变为抑制性^[27]。

姜黄素 (curcumin) 有许多信号通路参与凋亡。MAPK 信号通路在七氟醚导致的凋亡通路中被激活, 应用 JNK 的阻断剂 Curcumin 预处理, 可阻止七氟醚对认知功能的损害^[22]。

氢气 有研究报道, 氧化应激参与发育期麻醉导致的神经元毒性^[28]。氢气作为重要的抗氧化剂, 能穿透血脑屏障发挥对神经元的保护作用, 最近引起了广泛关注。Takaenoki 等^[1]和 Yonamine 等^[29]发现七氟醚麻醉时用氢气作为载气, 尽管发育期暴露于七氟醚, 但是生产后其母性行为并未发生改变。

促红细胞生成素 (rh-EPO) Pellegrini 等^[30]在 P7 大鼠七氟醚麻醉后即刻腹腔注射 rh-EPO, 发现海马区神经元凋亡明显减少, 并且促使大脑表达神经营养因子 NGF 和 BDNF, 随后神经功能紊乱发生的概率也有所降低。NGF 和 BDNF 都可阻止神经元凋亡^[31], 这可能是 rh-EPO 发挥神经元保护作用的关键因素。

骨髓间充质干细胞 (BMSCs) BMSCs 在神经元再生方面已经显示出巨大的潜能^[32]。在七氟醚麻醉后静脉注射 BMSCs 可有效抑制 IL-6 的表达, 减缓细胞的凋亡^[33]。

环境丰富化 实验动物福利的改善可使动物的生理与心理状态调整到最自然、最真实的状态, 而这时获得的实验数据也是最为真实与可靠的。丰富环境可以使 IL-6 等表达减少, 改善七氟醚暴露后学习和记忆能力的损害, 并改善对突触可塑性的影响^[34]。

中草药 一些中草药对七氟醚导致的发育期大脑损伤产生保护作用。Man 等^[35]研究表明芦丁抑制七氟醚对发育期大鼠大脑及其远期学习记忆的损伤作用。Yang 等^[36]研究表明醒脑静可抑制七氟醚引起的发育期大脑神经损伤。

在动物实验和少量的回顾性研究以及队列研究中, 证实以上干预措施的有效性。虽然某些药物已在临床上使用, 但是其在婴幼儿的生物安全性仍不确定, 在临床试验中需要进一步检验这些药物的安全性和有效性。同时, 这些研究结果证明对七氟醚副作用的机制进行进一步研究的必要性。

小 结

神经系统的发育具有阶段特异性, 其解剖和生理特点是麻醉药发挥作用的基础。七氟醚作为目前儿科手术患者应用最为广泛的吸入麻醉药, 研究其神经毒性具有重要的理论和现实意义。目前对这方面的研究很多, 多数研究显示七氟醚对发育期神经元的毒性作用, 但是也有研究表明七氟醚并不对发育期大脑产生毒性作用, 其中的机制尚需要进一步探讨。纵观目前的研究, 其中动物实验研究占据多数, 基础研究的理论成果尚不能直接应用于临床, 但是对于指导临床麻醉用药仍有一定的参考价值。近来美国食

品和药物管理局 (FDA) 发出警告称, 妊娠末 3 个月的孕妇或 3 岁以下儿童在手术中重复或长时间 (>3 h) 使用全麻药和镇静药, 可能会影响胎儿及儿童的大脑发育。因此在没有确切的证据之前, 为安全起见, 此类人群应尽量避免长期或者 (和) 反复接触七氟醚等麻醉药物。

参 考 文 献

- [1] Takaenoki Y, Satoh Y, Araki Y, et al. Neonatal Exposure to Sevoflurane in Mice Causes Deficits in Maternal Behavior Later in Adulthood. *Anesthesiology*, 2014, 120(2): 403-415.
- [2] Xu C, Tan S, Zhang J, et al. Anesthesia with sevoflurane in neonatal rats: Developmental neuroendocrine abnormalities and alleviating effects of the corticosteroid and Cl⁻ importer antagonists. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, 60: 173-181.
- [3] Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 1979, 3(1): 79-83.
- [4] 赵以林, 罗爱林. 吸入性全身麻醉药对发育期神经元的电生理功能影响的研究进展. *医学综述*, 2011, 17(7): 1069-1071, 1078.
- [5] 李世勇, 罗爱林. 全麻药物致发育期中枢神经系统毒性及其干预的研究进展. *医学综述*, 2013, 19(2): 193-197.
- [6] 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.
- [7] Makaryus R, Lee H, Feng T, et al. Brain aaturation in neonatal rodents is impeded by sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology*, 2015, 123(3): 557-568.
- [8] Edwards DA, Shah HP, Cao W, et al. Bupivacaine alleviates epileptogenic and neurotoxic effects of sevoflurane in neonatal rat brain. *Anesthesiology*, 2010, 112(3): 567-575.
- [9] 滕清宇, 李玮伟, 袁红斌, 等. 全麻药发育期神经毒性机制的研究进展. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(9): 929-931.
- [10] Qiu J, Shi P, Mao W, et al. Effect of apoptosis in neural stem cells treated with sevoflurane. *BMC Anesthesiol*, 2015, 15: 25.
- [11] Piehl E, Foley L, Barron M, et al. The effect of sevoflurane on neuronal degeneration and GABA_A subunit composition in a developing rat model of organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2010, 22(3): 220-229.
- [12] Wang WY, Jia LJ, Luo Y, et al. Location-and subunit-specific NMDA receptors determine the developmental sevoflurane neurotoxicity through ERK1/2 signaling. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1): 216-230.
- [13] Haseneder R, Kratzer S, von Meyer L, et al. Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*, 2009, 623(1-3): 47-51.
- [14] Ishizeki J, Nishikawa K, Kubo K, et al. Amnestic concentrations of sevoflurane inhibit synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons through gamma-aminobutyric acid-mediated mechanisms. *Anesthesiology*, 2008, 108(3): 447-456.

- [15] Kato R, Tachibana K, Nishimoto N, et al. Neonatal exposure to sevoflurane causes significant suppression of hippocampal long-term potentiation in postgrowth rats. *Anesth Analg*, 2013, 117(6): 1429-1435.
- [16] Briner A, De Roo M, Dayer A, et al. Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during synaptogenesis. *Anesthesiology*, 2010, 112(3): 546-556.
- [17] Amrock LG, Starner ML, Murphy KL, et al. Long-term effects of single or multiple neonatal sevoflurane exposures on rat hippocampal ultrastructure. *Anesthesiology*, 2015, 122(1): 87-95.
- [18] Yi W, Zhang Y, Guo Y, et al. Elevation of sestrin-2 expression attenuates sevoflurane induced neurotoxicity. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(5): 1161-1166.
- [19] Zhang MQ, Ji MH, Zhao QS, et al. Neurobehavioural abnormalities induced by repeated exposure of neonatal rats to sevoflurane can be aggravated by social isolation and enrichment deprivation initiated after exposure to the anaesthetic. *Br J Anaesth*, 2015, 115(5): 752-760.
- [20] Liu A, Li Y, Tan T, et al. Early exposure to sevoflurane inhibits Ca(2+) channels activity in hippocampal CA1 pyramidal neurons of developing rats. *Brain Res*, 2014, 1557: 1-11.
- [21] Zheng H, Dong Y, Xu Z, et al. Sevoflurane anesthesia in pregnant mice induces neurotoxicity in fetal and offspring mice. *Anesthesiology*, 2013, 118(3): 516-526.
- [22] Ji MH, Qiu LL, Yang JJ, et al. Pre-administration of curcumin prevents neonatal sevoflurane exposure-induced neurobehavioral abnormalities in mice. *Neurotoxicology*, 2015, 46: 155-164.
- [23] Raper J, Alvarado MC, Murphy KL, et al. Multiple anesthetic exposure in infant monkeys alters emotional reactivity to an acute stressor. *Anesthesiology*, 2015, 123(5): 1084-1092.
- [24] Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, et al. Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery. *Pediatrics*, 2011, 128(5): e1053-1061.
- [25] DiMaggio C, Sun LS, Li G. Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort. *Anesth Analg*, 2011, 113(5): 1143-1151.
- [26] Seubert CN, Zhu W, Pavlinec C, et al. Developmental effects of neonatal isoflurane and sevoflurane exposure in rats. *Anesthesiology*, 2013, 119(2): 358-364.
- [27] Gentry KR, Steele LM, Sedensky MM, et al. Early developmental exposure to volatile anesthetics causes behavioral defects in *Caenorhabditis elegans*. *Anesth Analg*, 2013, 116(1): 185-189.
- [28] Liu B, Gu Y, Xiao H, et al. Altered metabolomic profiles may be associated with sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal rats. *Neurochem Res*, 2015, 40(4): 788-799.
- [29] Yonamine R, Satoh Y, Kodama M, et al. Coadministration of hydrogen gas as part of the carrier gas mixture suppresses neuronal apoptosis and subsequent behavioral deficits caused by neonatal exposure to sevoflurane in mice. *Anesthesiology*, 2013, 118(1): 105-113.
- [30] Pellegrini L, Bennis Y, Velly L, et al. Erythropoietin protects newborn rat against sevoflurane-induced neurotoxicity. *Paediatr Anaesth*, 2014, 24(7): 749-759.
- [31] Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 2000, 14(23): 2919-2937.
- [32] Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol*, 2002, 1(2): 92-100.
- [33] Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*, 2003, 73(6): 778-786.
- [34] 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.
- [35] Man YG, Zhou RG, Zhao B. Efficacy of rutin in inhibiting neuronal apoptosis and cognitive disturbances in sevoflurane or propofol exposed neonatal mice. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 14397-14409.
- [36] Yang ZJ, Wang YW, Li CL, et al. Pre-treatment with a Xingnaojing preparation ameliorates sevoflurane-induced neuroapoptosis in the infant rat striatum. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3): 1615-1622.

(收稿日期:2017-01-09)