

七氟醚对新生大鼠神经干细胞的增殖作用

黄剑峰¹, 冼海燕¹, 侯小琼^{2*}

(1. 广西医科大学第二附属医院手术麻醉科, 南宁 530000; 2. 广西医科大学基础医学院免疫学教研室, 南宁 530021)

【摘要】 目的 研究七氟醚对新生大鼠神经干细胞增殖影响。方法 取出生7 d的SD大鼠48只, 体重15~20 g, 随机分3组: 对照组(Con组)、1%七氟醚组(S1组)、3%七氟醚组(S2组)。S1组和S2组分别吸入1%、3%七氟醚4 h。各组新生鼠麻醉开始前腹腔注射5-溴脱氧尿苷100 mg/kg, 于麻醉结束后6 h处死大鼠并分离脑室区和脑室下区组织。采用免疫组化法进行Nestin与BrdU染色, 计算检测脑室区和脑室下区神经干细胞增殖率; Western blot法检测Nestin、Cyclin D1、BMP2、Smad4蛋白的表达。结果 与对照组比较, S1组和S2组大鼠脑室区和脑室下区组织Nestin蛋白表达降低、神经干细胞增殖率降低, Cyclin D1表达下降, BMP2、Smad4表达上调($P < 0.05$)。结论 七氟醚可抑制新生大鼠神经干细胞的增殖, 其机制可能与Cyclin D1、BMP2、Smad4蛋白表达变化有关。

【关键词】 七氟醚; 新生大鼠; 神经干细胞; 增殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0024-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.07.005

Effect of sevoflurane on proliferation of neural stem cells in neonatal rats

HUANG Jianfeng¹, XIAN Haiyan¹, HOU Xiaoqiong^{2*}

(1. Department of Surgery Anesthesia, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China. 2. Department of Immunology, School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of sevoflurane on the proliferation of neural stem cells (NSCs) in the ventricular/subventricular zone of neonatal rats. **Methods** Forty-eight 7-day-old Sprague-Dawley rats, weighing 15–20 g, were divided into three groups ($n = 16$ each) using a random number table: control group (Con), 1% sevoflurane group (S1), and 3% sevoflurane group (S2). Rats in the control group inhaled air for 4 h. Rats in S1 and S2 groups inhaled 1% and 3% sevoflurane, respectively, for 4 h. Cell proliferation was detected by Nestin and 5-bromodeoxyuridine staining. Protein expression of Nestin, Cyclin D1, BMP2, and Smad4 in ventricular/subventricular tissues was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the proliferation rate of NSCs was decreased significantly. Expression levels of Nestin and Cyclin D1 were downregulated, but expression levels of BMP2 and Smad4 were significantly upregulated after sevoflurane treatment ($P < 0.05$). **Conclusions** Sevoflurane inhibits proliferation of NSCs in the ventricular/subventricular zone of neonatal rats and the mechanism may be related to regulation of Cyclin D1, BMP2, and Smad4 expression.

【Key words】 sevoflurane; neonatal rats; neural stem cells; proliferation

【基金项目】 广西医科大学青年科学基金(编号: GXMUYSF201209); 广西自然科学基金项目(编号: 2014GXNSFBA118158); 国家自然科学基金项目(编号: 81360312)。

【作者简介】 黄剑峰(1970—), 男, 主治医师, 硕士, 专业: 麻醉。E-mail: 1064894947@qq.com

【通信作者】 侯小琼(1973—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 神经药理与肿瘤免疫。E-mail: houxiaoqiong2017@sina.com

七氟醚因起效迅速,可控性好,气道刺激性小等优点,是目前儿科麻醉中应用最为广泛的吸入麻醉药。最近的研究表明常用的吸入全麻药暴露对中枢神经系统均有不同程度的毒害作用,婴幼儿大脑从孕中期开始至出生后的几年处于发育关键时期,容易受到外界不良因素的影响。研究表明长时间暴露于七氟醚会诱导发育期动物大脑神经细胞凋亡,影响神经系统发育,导致远期的学习认知功能障碍^[1-4]。神经干细胞都具备分化成为神经元等神经系统各种不同细胞的潜能。内源性神经干细胞主要分布于脑室/脑室下区(ventricular/subventricular zone, VZ/SVZ)和海马齿状回的颗粒下层等部位,并且神经发生从发育期一直持续到成年^[5]。目前大量研究主要集中在七氟醚对神经元的损伤作用和机制,但对神经元的前体神经干细胞的影响研究较少,本研究拟从神经干细胞增殖角度探讨七氟醚中枢神经系统毒性的发生及防治机制,为全麻药物神经毒性的防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验选用初生 7 d 雄性 SD 大鼠 48 只,清洁级,体重 15 ~ 20 g,购自广西医科大学实验动物中心[SCXK(桂)2016-0054]。动物实验经由实验动物管理委员会批准(2016-0113),在实验动物中心屏障动物实验设施进行[SYXK(桂)2016-0037],实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀照顾。

1.2 主要试剂与仪器

七氟醚(美国 Baxter Healthcare 公司),BSA 封闭液、显影定影试剂盒、TBST 缓冲液、枸橼酸盐缓冲液(北京索莱宝生物技术有限公司),Nestin、Cyclin D1、Smad4、BMP2 单克隆抗体(美国 Abcam 公司), β -actin、FITC 绿色荧光二抗及 DyLight 594 红色荧光二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),兔多抗 BrdU(美国 Accurate Chemical)。切片机(德国 Leica CM1900),荧光显微显微镜(日本 Olympus BX61),病理图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备及分组

将动物随机分为 3 组,每组 16 只,即对照组(Con 组)、1% 七氟醚组(S1 组)、3% 七氟醚组(S2 组)。在麻醉气体挥发罐中加入适量液态七氟醚,

将氧气罐的输出端连接至小动物麻醉机的入口处,麻醉机出口接至麻醉诱导箱中,温度控制在(37 ± 2)℃。将动物放入麻醉诱导箱中,开通气阀,使氧气罐中的氧气携带挥发罐中的七氟醚进入麻醉诱导箱中,从而使动物麻醉。调整七氟醚的浓度,2 L/min 流量,麻醉持续 4 h。麻醉终止后 6 h,处死大鼠,于冰上迅速离出大脑,切取额叶内含脑室区(VZ)和脑室下区(SVZ)的脑组织。

1.3.2 Nestin/BrdU 双标检测神经干细胞增殖

采用免疫荧光染色法,鼠脑冷冻好后,将其在切片机内固定好,切片厚度 20 μ m,将贴好的脑片放于片盒内保存在 -20℃ 内。脑片在 TBS 溶液中进行水化,放置于室温下 15 min,吸干脑片周围的水分,加入鼠单抗 Nestin(1:200)和兔抗鼠 BrdU(1:200)混合,4℃ 过夜;弃掉一抗,PBS 洗 5 min。FITC 标记的荧光二抗(1:200)和 DyLight 594 红色的荧光二抗(1:400)加到载玻片的组织上,室温孵育 2 h,PBS 清洗,用滤纸吸干组织周围水分,滴加一滴稀甘油,盖片。将制备好的玻片放置在荧光显微镜 400 倍下观察,每组随机选取 5 个视野,双标 Nestin/BrdU 阳性细胞数与 Nestin 阳性细胞数目比值为神经干细胞增殖率(%)。

1.3.3 Western blot 检测蛋白表达

蛋白裂解液处理各组样品,使用超声破碎仪低温裂解 3 次,每次 30 s,离心(4℃,12 000 r/min,10 min),取上清测定蛋白浓度,配平各组蛋白浓度,蛋白变性,经 SDS-PAGE 分离电泳后转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,Nestin(1:500)、Cyclin D1(1:1000)、Smad4(1:1000)、BMP2(1:500)4℃ 冰箱过夜,弃掉一抗,TBST 洗膜 5 min,3 次;将膜转入杂交袋,室温孵育二抗(1:10 000)2 h,弃掉二抗,TBST 洗膜 5 min,3 次;ECL 系统显影,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定条带的灰度值,以目标蛋白与 β -actin 灰度值之比表示目标蛋白的表达水平,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

实验结果用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 七氟醚麻醉对 Nestin 蛋白表达的影响

Nestin 蛋白表达,S1 组(0.54 ± 0.04)和 S2 组(0.43 ± 0.06)均低于对照组(0.61 ± 0.06),其中 S2

组中 Nestin 蛋白表达与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

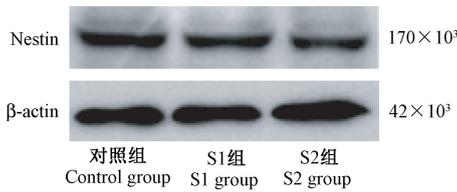


图 1 七氟醚麻醉对新生鼠脑组织 Nestin 蛋白表达影响 ($n = 6$)

Figure 1 Effects of sevoflurane anesthesia on protein expression of Nestin in the brain of neonatal rats

2.2 七氟醚麻醉降低的新生鼠神经干细胞增殖

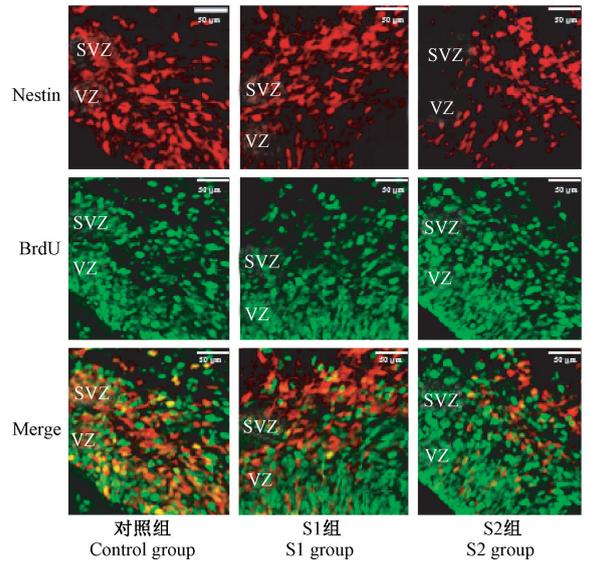
对照组中 Nestin/BrdU 双阳性细胞数目所占 Nestin 阳性细胞百分比为 $(41.3 \pm 6.7)\%$, S1 组和 S2 组双阳性细胞百分比分别为 $(25.6 \pm 7.2)\%$ 和 $(17.4 \pm 5.9)\%$ 。与对照组比较, S1 组和 S2 组神经干细胞增殖率降低, 差异均有显著性 ($P < 0.05$), 结果见图 2。

2.3 七氟醚麻醉影响新生鼠脑组织中 Cyclin D1、Smad4 和 BMP2 蛋白表达

与对照组比较, S1 组和 S2 组细胞内 Cyclin D1 的表达下调 ($P < 0.05$)。与对照组比较, S1 组和 S2 组 Smad4 和 BMP2 表达增高, 差异均有显著性 ($P < 0.05$), 结果见图 3 和表 1。

3 讨论

七氟醚作为临床广泛使用的吸入麻醉药, 对未成熟神经系统的损伤已引起广泛关注。已研究表明七氟醚麻醉出生 7 d 小鼠 6 h, 引起海马和前额皮质等多个脑区神经元调亡^[6]。神经元是由神经干细胞分化而来, 七氟醚麻醉对神经干细胞是否有不良作用, 目前尚不清楚。胚胎时期许多部位都存在神经干细胞, 终生存于 VZ/SVZ 区、海马齿状回、大



注: 标尺 = 50 μm 。

图 2 七氟醚对新生鼠神经干细胞增殖影响 ($n = 6$)

Note. Bars = 50 μm .

Figure 2 Effects of sevoflurane on the proliferation of neonatal rat neural stem cells

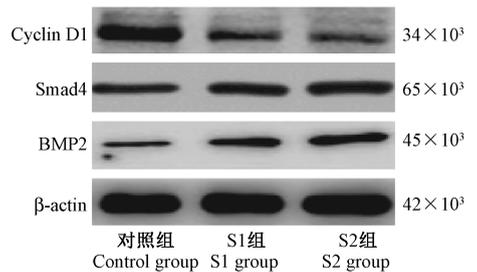


图 3 七氟醚对新生鼠脑组织中 Cyclin D1、Smad4 和 BMP2 蛋白表达影响 ($n = 6$)

Figure 3 Effects of sevoflurane on protein expression of Cyclin D1, Smad4, and BMP2 in brain tissue of neonatal rats

脑皮层等部位。其高度自我更新能力, 维持自身数目的稳定和干细胞特性。Nestin 作为神经干细胞

表 1 七氟醚麻醉对新生鼠脑组织中 Cyclin D1、Smad4 和 BMP2 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of sevoflurane on protein expression of Cyclin D1, Smad4, and BMP2 in brain tissue of neonatal rats

组别 Groups	Cyclin D1	Smad4	BMP2
对照组 Control group	0.72 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.11 ± 0.03
1% 七氟醚组 1% sevoflurane group	$0.33 \pm 0.04^{**}$	$0.42 \pm 0.02^*$	$0.19 \pm 0.03^*$
3% 七氟醚组 3% sevoflurane group	$0.18 \pm 0.04^{**}$	$0.49 \pm 0.04^{**}$	$0.39 \pm 0.04^{**}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

的标记物,有调节神经细胞增殖,分化成熟作用,随着神经干细胞完成迁移和分化,Nestin 表达逐渐减少甚至消失。通过 Western blot 检测不同组别 Nestin 表达情况发现,七氟醚处理后,Nestin 表达出现下降趋势,说明内源性神经干细胞数量是减少的。

大脑发育处于未成熟阶段,容易受外界不良因素影响神经干自我更新、增殖和分化能力。如果干细胞在本该保留增殖能力的阶段脱离了细胞周期,就会没有足够的神经干细胞产生新的神经元维持神经发育的后期阶段,导致神经发生的异常^[7]。BrdU 常用于标记活细胞中新合成的 DNA,随着 DNA 复制进入子细胞中,判断细胞的增殖能力。BrdU 与 Nestin 双标检测神经干细胞增殖率发现,S1 组和 S2 组 VZ 区和 SVZ 区神经干细胞增殖率低于对照组,这与以往的研究类似^[8]。以上结果说明,七氟醚对新生鼠神经干自我更新的能力具有干预作用。研究中发现,对照组的 Nestin 阳性细胞主要集中在 VZ 区和紧邻该区的 SVZ 区,S1 组 Nestin 阳性细胞减少主要是在 VZ 区,在 SVZ 区并无明显减少,且 Nestin 阳性细胞还有向 SVZ 区远端扩展趋势;S2 组 Nestin 阳性细胞减少也主要是在 VZ 区,以及邻近 VZ 区的 SVZ 区,SVZ 区远端仍保持较高的 Nestin 阳性细胞。目前仍不清楚为何出现此现象,尚需进一步研究。

Cyclin D1 是细胞周期调控蛋白,Cyclin D1 基因敲除,抑制了在体海马齿状回(dentate gyrus, DG)区和 SVZ 区神经干细胞的增殖,同时诱导神经干细胞走向凋亡^[9-10]。Cyclin D1 基因过表达可促进神经干细胞的增殖^[11]。本研究结果表明,与对照组比较,S1 组、S2 组脑组织中 Cyclin D1 蛋白表达下调,提示七氟醚诱发增殖抑制的机制与下调脑组织 Cyclin D1 有关。

BMP2 属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的成员,其信号通路参与神经干细胞增殖和分化的作用^[12]。BMP2 及其受体发挥作用主要通过 Smad 介导的转导途径实现^[13-14]。在信号转导过程中,细胞外的 BMP2 与细胞膜表面的 BMPR I、BMPR II 结合形成复合物,BMPR II 磷酸化后,再激活 BMPR I 而形成活化的复合物,然后引起 Smad 磷酸化而激活,活化的 Smad 发生构象改变,从受体上游离,与细胞质中的 Smad1/4 结合,共同转位入细胞核中,转录 Cyclin D1,进而调节细胞的增殖与凋亡^[12,15]。本实验结果中七氟醚处理后,BMP2 和 Smad4 表达增强,而

Cyclin D1 表达降低,神经干细胞增殖率降低。已有报道全麻药物可抑制发育期大脑神经干细胞与神经元的增殖,神经细胞增殖减少可影响认知功能^[16],与本研究结果相似,推测此七氟醚可能影响了神经细胞的增殖。

综上所述,七氟醚麻醉新生大鼠导致 VZ/SVZ 区 Nestin 表达下降,干细胞增殖活性降低,该变化和脑内 Cyclin D1 信号下调、BMP2 和 Smad4 水平上调有关。

参考文献:

- [1] 李民,钱敏,郭向阳,等.全身麻醉剂对发育期大脑神经元凋亡的影响及其机制[J].中国临床药理学杂志,2012,28(4):315-317.
- [2] Xie H, She GM, Wang C, et al. The gender difference in effect of sevoflurane exposure on cognitive function and hippocampus neuronal apoptosis in rats [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(4): 647-657.
- [3] Wang WY, Wang H, Luo Y, et al. The effects of metabotropic glutamate receptor 7 allosteric agonist N,N'-dibenzhydrylethane-1, 2-diamine dihydrochloride on developmental sevoflurane neurotoxicity: role of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. Neuroscience, 2012, 205: 167-177.
- [4] Shen X, Liu Y, Xu S, et al. Early life exposure to sevoflurane impairs adulthood spatial memory in the rat [J]. Neurotoxicology, 2013, 12(39): 45-56.
- [5] Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 698-708.
- [6] 方开云,朱焱,尚杰,等.不同全麻对非心脏手术患者术后认知功能影响的比较[J].中华麻醉学杂志,2011,31(5):556-559.
- [7] Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli [J]. J Comp Neurol, 2003, 467(4): 455-463.
- [8] 林函,刘劲,李纯,等.七氟醚和异氟醚对大鼠大脑皮质神经干细胞增殖的影响[J].中华麻醉学杂志,2013,33(11):1306-1309.
- [9] Ma J, Yu Z, Qu W, et al. Proliferation and differentiation of neural stem cells are selectively regulated by knockout of cyclin D1 [J]. J Mol Neurosci, 2010, 42(1): 35-43.
- [10] Ma J, Cui B, Ding X, et al. Over-expression of cyclin D1 promotes NSCs proliferation and induces the differentiation into astrocytes via Jak-STAT3 pathways [J]. Neurochem Res, 2015, 40(8): 1681-1690.

- [3] 陈来, 李俊, 殷玉婷, 等. 妊娠小鼠子宫内注射影响因素的研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(3): 77 - 79, 86.
- [4] 李勇, 张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术 [M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000.
- [5] 姬艳丽, 余素贞, 豆正东. 昆明种小鼠正常行为发育指标探讨 [J]. 安徽医科大学学报, 2002, 37(6): 429 - 432.
- [6] 左谦益, 宁磊. 昆明小鼠生长发育指标及繁殖性能测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2001, 11(4): 199 - 202.
- [7] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells [J]. Nature, 1953, 172(4379): 603 - 606.
- [8] Ada GL, Nossal G. The clonal-selection theory [J]. Sci Am, 1987, 257(2): 62 - 69.
- [9] Chen JC, Ou LS, Yu HY, et al. Allogeneic lymphocytes exerted graft-versus-host rather than tolerogenic effects on preimmune fetuses [J]. J Surg Res, 2013, 183(1): 405 - 411.
- [10] MacArthur KL, Wu CH, Wu GY. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and replication [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(23): 2909 - 2913.
- [11] Chen JC, Kuo ML, Ou LS, et al. Characterization of tolerance induction through prenatal marrow transplantation: the requirement for a threshold level of chimerism to establish rather than maintain postnatal skin tolerance [J]. Cell Transplant, 2010, 19(12): 1609 - 1622.
- [12] 刘英, 庄广伦, 游泽山, 等. 经胎鼠腹腔途径进行人脐血造血干细胞宫内移植的实验 [J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(1): 22 - 24, 28.
- [13] Smolic M, Wu CH, Madadi S, et al. Pharmacogenetic selection of transplanted human hepatocytes in immunocompetent rats [J]. J Dig Dis, 2012, 13(11): 579 - 587.
- [14] Lin H, Mao Q, Wang YM, et al. Proliferation of L02 human hepatocytes in tolerized genetically immunocompetent rats [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(15): 2329 - 2337.

[收稿日期]2017 - 12 - 08

(上接第 27 页)

- [11] 马俊芳, 崔博, 沈东超, 等. CyclinD1 基因过表达慢病毒载体的构建和对神经干细胞增殖的影响 [J]. 神经损伤与功能重建, 2015, 10(2): 98 - 101.
- [12] Yao M, Wang Y, Zhang P, et al. BMP2-SMAD signaling represses the proliferation of embryonic neural stem cells through YAP [J]. J Neurosci, 2014, 34(36): 12039 - 12048.
- [13] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling [J]. Nature, 2003, 425(6958): 577 - 584.
- [14] Sangadala S, Metpally RP, Reddy BV. Molecular interaction between Smurf1 WW2 domain and PPXY motifs of Smad1, Smad5, and Smad6-modeling and analysis [J]. J Biomol Struct Dyn, 2007, 25(1): 11 - 23.
- [15] Bourgeois B, Gilquin B, Tellier-Lebègue C, et al. Inhibition of TGF- β signaling at the nuclear envelope: characterization of interactions between MAN1, Smad2 and Smad3, and PPM1A [J]. Sci Signal, 2013, 6(280): ra49.
- [16] Zhu C, Gao J, Karlsson N, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(5): 1017 - 1030.

[收稿日期]2018 - 04 - 13