

线粒体保护剂 SS-31 对发育期大鼠异氟醚麻醉后海马线粒体形态和认知功能的影响

付 群¹, 石金云¹, 张 慧², 邱丽丽², 吴 晶^{2*}

¹南京中医药大学附属中西医结合医院麻醉科, 江苏 南京 210028; ²东南大学附属中大医院麻醉科, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的: 观察线粒体靶向抗氧化剂 SS-31 对异氟醚麻醉发育期大鼠海马线粒体形态和认知功能的影响。方法: 新生鼠出生后(postnatal day, PND)第7天, 随机均分为3组($n=24$): 氧气+生理盐水组(CN组)、异氟醚+生理盐水组(IN组)和异氟醚+SS-31组(IS组)。根据分组, 于氧气或异氟醚吸入前30 min腹腔注射等容生理盐水或SS-31(5 mg/kg), 吸入氧气或异氟醚6 h。分别于气体吸入6 h后即刻(PND7)检测海马组织活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性; PND21检测海马组织线粒体形态; PND40、PND60进行旷场实验和水迷宫实验检测大鼠行为学表现。结果: 与IN组比较, IS组ROS和MDA水平降低, SOD活性升高; 异常线粒体数量减少; PND60测试阶段穿越平台次数和目标象限时间明显增多。结论: 线粒体靶向抗氧化剂SS-31可以抑制异氟醚麻醉所致发育期大鼠海马氧化应激反应的增强, 具有改善线粒体形态和认知功能的作用。

[关键词] 线粒体; 异氟醚; 抗氧化剂; 认知; 发育期大鼠

[中图分类号] R614.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)09-1204-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180906

Effects of mitochondrial antioxidant SS-31 on hippocampal mitochondrial morphology and cognition after isoflurane-anesthesia in developing rats

Fu Qun¹, Shi Jinyun¹, Zhang Hui², Qiu Lili², Wu Jing^{2*}

¹Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028; ²Department of Anesthesiology, ZhongDa Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of mitochondrion-targeted antioxidant SS-31 on hippocampal mitochondrial morphology and cognition after isoflurane-anesthesia in developing rats. **Methods:** Seventy-two postnatal day(PND)7 rats were equally divided into 3 groups($n=24$): oxygen + normal saline(the CN group), isoflurane + normal saline(the IN group), and isoflurane + SS-31(the IS group). SS-31(5 mg/kg) or normal saline was intraperitoneally administered with a volume of 0.4 mL/kg 30 min before gas inhalation. Malondialdehyde(MDA) content, reactive oxygen species(ROS) levels, and superoxide dismutase(SOD) activities were determined on PND7. Mitochondrial morphology was determined on PND21, and behavioral studies were performed on PND40 or PND60. **Results:** Compared with the IN group, the levels of ROS and MDA, and number of abnormal mitochondria were decreased, while the activity of SOD, times of crossing-platform and time spending in target quadrant were increased in the IS group. **Conclusion:** Mitochondrial antioxidant SS-31 attenuates isoflurane-induced oxidative stress, and impairments of mitochondrial morphology and cognition in developing rats.

[Key words] mitochondria; isoflurane; antioxidant; cognition; developing rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(09): 1204-1207]

[基金项目] 国家自然科学基金(81600950)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jingwu@smail.nju.edu.cn

全身麻醉药对发育期大脑可能具有潜在的神经毒性, 并引起长时程的认知功能损伤, 其机制尚不完全清楚^[1-4]。线粒体形态损伤在全身麻醉药所

致神经毒性及认知损伤的发生发展中发挥重要作用,线粒体损伤发生在易损的脑区(如海马组织),主要表现为ATP合成减少、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)产生增加、脂质过氧化增强、线粒体肿胀及结构完整性破坏等^[5-7]。然而,目前尚缺乏快速有效靶向作用于线粒体的药物,以改善全身麻醉过程中的氧化应激及线粒体形态损伤。

SS-31是一种新型线粒体靶向抗氧化剂,可自由穿过血脑屏障和细胞膜,不依赖于线粒体膜电位的改变作用于线粒体内膜,抑制ROS产生和脂质过氧化^[8-10]。我们前期研究表明,SS-31在异氟醚麻醉老年大鼠中,具有明显的线粒体保护作用^[11-12]。本研究拟观察异氟醚麻醉对发育期大鼠海马线粒体形态的影响,及SS-31对线粒体形态和认知功能的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

新生 Sprague-Dawley 鼠出生后(postnatal day, PND)第7天,随机均分为3组($n=24$):氧气+生理盐水组(CN组)、异氟醚+生理盐水组(IN组)和异氟醚+SS-31组(IS组)。CN组于氧气吸入前30 min经腹腔注射0.4 mL/kg生理盐水,IN组和IS组于异氟醚吸入前30 min经腹腔注射等容生理盐水或SS-31(5 mg/kg^[5-6])。

1.2 方法

1.2.1 麻醉方法

将IN组和IS组新生鼠放入麻醉箱中,吸入1.8%异氟醚和30%氧气的混合气体10 min进行麻醉诱导,继而吸入1.8%异氟醚和30%氧气的混合气体350 min进行维持,CN组则吸入30%氧气6 h,气体吸入过程中保持自主呼吸。气体吸入6 h后即刻(PND7)每组取6只新生鼠,提取海马组织用于生化检测;PND21每组取6只大鼠用于电镜观察;每组余12只大鼠分别于PND40和PND60进行行为学检测。

1.2.2 ROS和氧化应激反应水平检测

参照组织活性氧检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物科技有限公司)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)分别进行ROS含量、MDA水平和SOD活性检测。

1.2.3 电镜分析

取大鼠脑组织包块置于2.5%戊二醛固定,4℃

冰箱过夜;磷酸缓冲液漂洗;1%锇酸0.1 mol/L磷酸缓冲液固定2 h, PBS清洗3次。常规丙酮梯度脱水(50%、50%、70%、70%、90%、100%)10~30 min,并浸入Epon-812环氧树脂包埋,70 nm超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色, Tecnai G2透射电镜观察海马CA1区神经元线粒体超微结构。利用Image-Pro Plus 6.1软件分析电镜图片。每组6只大鼠,每只大鼠取4个神经元内的线粒体进行分析。

1.2.4 旷场实验

PND40行旷场实验。立方形敞箱(100 cm×100 cm×40 cm),底面均分为3×3方格。将大鼠从中央格放入观察箱内探索5 min,由图像自动监视系统追踪其探索路程、中央格停留时间、穿越格数、后肢直立次数、理毛次数及粪便粒数。

1.2.5 水迷宫实验

PND60行水迷宫实验。水迷宫实验分为训练阶段和测试阶段。训练阶段:将大鼠随机从4个象限(N、S、E、W)中1个象限面壁放入水池中,记录60 s内大鼠爬上平台的时间即为逃避潜伏期。若60 s内未找到平台则将其引导至平台,并停留15 s,记录逃避潜伏期为60 s,然后进行下一次训练。测试阶段:第6天撤去隐藏的平台,将大鼠从目标象限对侧象限放入水池中,记录60 s内大鼠目标象限停留时间及穿越平台次数。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0软件进行统计分析。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SNK法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

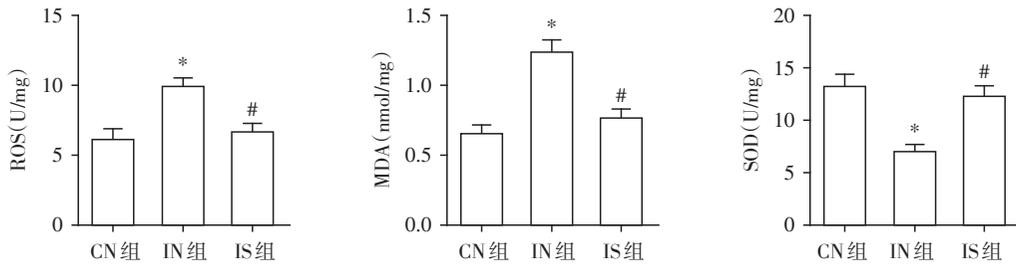
2 结果

2.1 ROS和氧化应激反应水平

与CN组相比,IN组PND7时ROS水平和MDA含量增加,SOD活性降低($P < 0.05$);与IN组相比,IS组ROS水平和MDA含量降低,SOD活性升高($P < 0.05$,图1);与CN组相比,IS组ROS水平、MDA含量及SOD活性差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 线粒体超微结构

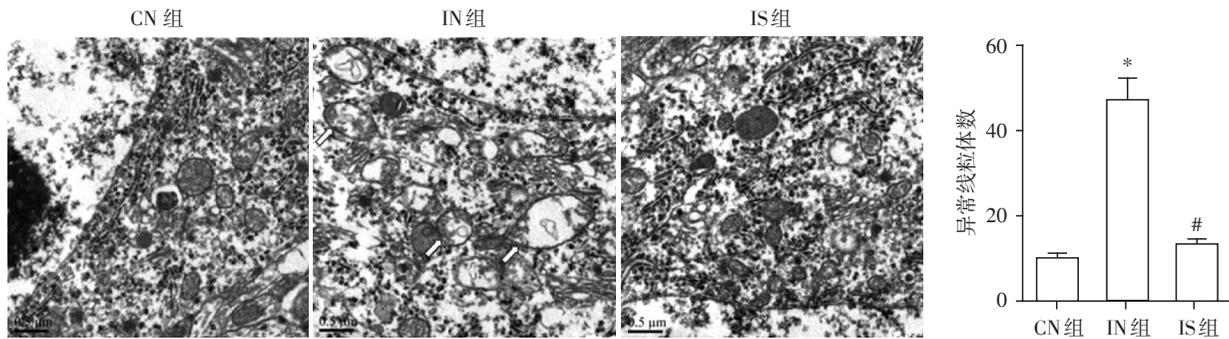
与CN组相比,IN组异常线粒体数目增加($P < 0.05$),线粒体呈肿胀性改变(箭头所表示),超微结构紊乱;与IN组相比,IS组异常线粒体数目减少($P < 0.05$),线粒体形态恢复至正常水平(图2);与CN组相比,IS组异常线粒体数目及线粒体形态差异无统计学意义($P > 0.05$)。



与CN组相比,* $P < 0.05$;与IN组相比,# $P < 0.05$ 。

图1 3组大鼠ROS、MDA、SOD比较

Figure 1 Comparison of ROS,MDA and SOD among 3 groups



箭头示线粒体肿胀性改变。与CN组相比,* $P < 0.05$;与IN组相比,# $P < 0.05$ 。

图2 3组大鼠海马CA1区线粒体数目比较

Figure 2 Comparison of mitochondria in the hippocampal CA1 of rat among 3 groups

2.3 行为学实验结果

PND40时旷场实验中,3组大鼠总运动距离及中心区域活动时间无明显差别($P > 0.05$)。与CN组相比,PND60时,IN组大鼠水迷宫实验穿越平台次数和目标象限时间明显减少;与IN组相比,IS组穿越平台次数和目标象限时间明显增加($P < 0.05$,表1);与CN组相比,IS组穿越平台次数和目标象限时间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 3组大鼠行为学实验比较

Table 1 Comparison of behavioral experiments among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | PND40 | | PND60 | |
|-----------|------------|-------------|------------|-------------|
| | 总运动距离(cm) | 中心区域活动时间(s) | 穿越平台次数 | 目标象限时间(s) |
| CN组(n=12) | 5 014 ± 65 | 32.2 ± 4.9 | 5.7 ± 0.3 | 28.7 ± 4.7 |
| IN组(n=12) | 5 394 ± 87 | 35.4 ± 6.6 | 2.3 ± 0.2* | 16.7 ± 2.8* |
| IS组(n=12) | 5 127 ± 71 | 32.1 ± 4.7 | 5.4 ± 0.3# | 25.2 ± 4.1# |

与CN组比较,* $P < 0.05$;与IN组比较,# $P < 0.05$ 。

3 讨论

越来越多的前期临床或回顾性研究表明,发育关键时期全身麻醉可以引起大脑广泛的神经毒性

和长时程学习记忆损伤^[1-3,13-15]。本研究亦观察到异氟醚麻醉引起发育期大鼠认知功能损伤。线粒体是全身麻醉药损伤的早期细胞器之一,研究报道,出生第7天的新生鼠给予异氟醚麻醉可以引起线粒体形态损伤及分布异常^[5-7],表现为出生第8天时线粒体分裂增多和体积变小的急性作用,或出生第21天时线粒体肿胀和体积变大的长期作用。前期研究结果也表明新生鼠出生第7天时给予异氟醚麻醉6 h,第21天时线粒体明显肿胀、体积增大和密度降低,说明异氟醚麻醉引起了线粒体超微结构的长期损伤^[5]。线粒体肿胀容易引起线粒体膜内介质的“泄漏”,如细胞色素C或其他促凋亡介质从线粒体内进入细胞质,进而激活线粒体依赖的内源性凋亡通路,引起神经毒性和认知功能损伤^[11]。

线粒体ROS和氧化应激是引起线粒体形态损伤的重要病因,线粒体ROS易积累于线粒体内膜,引起线粒体通透性转换孔开放和肿胀性增加。寻找靶向定位并作用于线粒体内膜、清除线粒体内ROS以及保护线粒体功能和形态的药物越来越受到广泛关注^[5-6,16]。SS-31是新型靶向抗氧化剂,可积聚并作用于线粒体内膜^[8-10],前期研究表明SS-31可以减少异氟醚麻醉老年小鼠中ROS的产生,稳定

线粒体膜电位和抑制线粒体通透性转换孔的开放, 保护线粒体功能^[11-12]。本研究观察到在异氟醚麻醉发育期大鼠中, SS-31不仅可以抑制ROS产生, 抑制氧化应激反应, 而且可以改善肿胀的线粒体形态损伤和分布异常, 说明线粒体靶向抗氧化剂SS-31可以改善线粒体功能, 抑制线粒体形态损伤的发生。

综上所述, 异氟醚全身麻醉可引起发育期大鼠氧化应激反应增强及线粒体形态损伤, 线粒体靶向抗氧化剂SS-31具有明显的线粒体保护和认知保护作用。

[参考文献]

- [1] Walters JL, Paule MG. Review of preclinical studies on pediatric general anesthesia-induced developmental neurotoxicity[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2017, 60(3): 2-23
- [2] Lin EP, Soriano SG, Loepke AW. Anesthetic neurotoxicity[J]. *Anesthesiol Clin*, 2014, 32(1): 133-155
- [3] Rappaport BA, Suresh S, Hertz S, et al. Anesthetic neurotoxicity-clinical implications of animal models[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(9): 796-797
- [4] Ing CH, Dimaggio CJ, Malacova E, et al. Comparative analysis of outcome measures used in examining neurodevelopmental effects of early childhood anesthesia exposure[J]. *Anesthesiology*, 2014, 120(6): 1319-1332
- [5] Boscolo A, Starr JA, Sanchez V, et al. The abolishment of anesthesia-induced cognitive impairment by timely protection of mitochondria in the developing rat brain: the importance of free oxygen radicals and mitochondrial integrity[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(3): 1031-1041
- [6] Boscolo A, Ori C, Bennett J, et al. Mitochondrial protectant pramipexole prevents sex-specific long-term cognitive impairment from early anaesthesia exposure in rats[J]. *Br J Anaesth*, 2013, 110(7): 47-52
- [7] Boscolo A, Milanovic D, Starr JA, et al. Early exposure to general anesthesia disturbs mitochondrial fission and fusion in the developing rat brain[J]. *Anesthesiology*, 2013, 118(5): 1086-1097
- [8] Yin X, Manczak M, Reddy PH. Mitochondria-targeted molecules MitoQ and SS31 reduce mutant huntingtin-induced mitochondrial toxicity and synaptic damage in Huntington's disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(9): 1739-1753
- [9] Hao S, Ji J, Zhao H, et al. Mitochondrion-targeted peptide SS-31 inhibited oxidized low-density lipoproteins-induced foam cell formation through both ROS scavenging and inhibition of cholesterol influx in RAW264.7 cells[J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21287-21297
- [10] Szeto HH. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(3): 601-619
- [11] Wu J, Li H, Sun X, et al. A mitochondrion-targeted antioxidant ameliorates isoflurane-induced cognitive deficits in aging mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138256
- [12] Wu J, Zhang M, Li H, et al. BDNF pathway is involved in the protective effects of SS-31 on isoflurane-induced cognitive deficits in aging mice[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 305(5): 115-121
- [13] Pinyavat T, Warner DO, Flick RP, et al. Summary of the update session on clinical neurotoxicity studies[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2016, 28(4): 356-360
- [14] Ing CH, Dimaggio CJ, Whitehouse AJ, et al. Neurodevelopmental outcomes after initial childhood anesthetic exposure between ages 3 and 10 years[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2014, 26(4): 377-386
- [15] Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, et al. Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery[J]. *Pediatrics*, 2011, 128(5): e1053-e1061
- [16] Xu F, Armstrong R, Urrego D, et al. The mitochondrial division inhibitor Mdivi-1 rescues mammalian neurons from anesthetic-induced cytotoxicity[J]. *Mol Brain*, 2016, 9(3): 35

[收稿日期] 2017-07-02

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。