

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.17.009

孕中期丙泊酚麻醉对子代认知和海马 miRNAs 的影响^{*}

赵黎丽¹, 罗佛全², 龚海霞¹, 刘添银^{1△}, 曹蒙蒙³

1. 南昌大学第一附属医院麻醉科, 江西南昌 330006; 2. 浙江省人民医院麻醉科, 浙江杭州 310000;

3. 江西省九江市第一人民医院麻醉科, 江西九江 332000

摘要:目的 探讨孕中期丙泊酚麻醉对子代认知、海马 microRNAs(miRNAs)表达的影响。方法 将孕 14 d 的 SD 大鼠随机分为丙泊酚组(P 组)和脂肪乳剂对照组(C 组)。P 组接受丙泊酚麻醉 4 h, C 组给予 20% 脂肪乳剂。子鼠进行悬崖回避实验、Morris 水迷宫(MWM)实验、海马 miRNAs 芯片检测。结果 与 C 组比较, P 组子鼠的悬崖回避时间延长, MWM 实验中第 4 天和第 5 天的逃避潜伏期延长、平台穿越次数减少($P < 0.05$); 出生后 7 d 和出生后 30 d 的子鼠海马 miRNAs 芯片检测结果发现, P 组相比 C 组分别有 9 个和 3 个差异表达的 miRNAs($P < 0.05$)。结论 孕中期丙泊酚麻醉损伤子代认知功能, 影响海马 miRNAs 表达。

关键词:孕中期; 丙泊酚; 子代; 认知; microRNAs

中图法分类号: R614.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)17-2341-04

Effects of propofol anesthesia in the second trimester on offspring cognition and hippocampal miRNAs^{*}

ZHAO Lili¹, LUO Foquan², GONG Haixia¹, LIU Tianyin^{1△}, CAO Mengmeng³

1. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang,

Jiangxi 330006, China; 2. Department of Anesthesiology, Zhejiang Provincial People's Hospital,

Hangzhou, Zhejiang 310000, China; 3. Department of Anesthesiology,

Jiujiang First People's Hospital, Jiujiang, Jiangxi 332000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of propofol anesthesia in the second trimester of pregnancy on offspring cognition and expression of microRNAs (miRNAs) in hippocampus. **Methods** SD rats at 14 days of gestation were randomly divided into a propofol group (P group) and a fat emulsion control group (C group). Group P received propofol anesthesia for 4 hours, and group C received 20% fat emulsion. The mice were tested by cliff avoidance experiment, Morris water maze (MWM) experiment, and hippocampal miRNAs chip detection. **Results** Compared with the C group, the cliff avoidance time of the mice in the P group was prolonged, the escape latency on the 4th and 5th days in the MWM experiment was prolonged, and the number of platform crossings was decreased ($P < 0.05$). The results of microarray detection of miRNAs in the hippocampus of offspring mice at postnatal 7 d and postnatal 30 d showed that there were 9 and 3 differentially expressed miRNAs in group P compared with group C, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** Propofol anesthesia in the second trimester impairs the cognitive function of offspring and affects the expression of miRNAs in the hippocampus.

Key words: second trimester; propofol; offspring; cognition; microRNAs

有研究表明,在突触形成高峰期(妊娠期和婴儿期)几乎所有全身麻醉药物都可引起神经退行性病变^[1]。临床上大多数孕妇的非外科手术是在全身麻醉下完成的。对胎儿及孕妇而言,孕中期是进行非外科手术最合适的孕期手术时间^[2]。孕期母体丙泊酚的使用对子代出生后神经行为学(例如学习记忆)的不良影响已有相关研究证实^[3-7],但其确切的机制还在探讨中。近期有研究支持 microRNAs(miRNAs)在麻醉诱导的神经发育毒性中可能发挥作用^[8]。本

研究通过建立孕中期母体丙泊酚麻醉模型,观察子代认知功能的变化,分析子代海马组织 miRNAs 表达谱,试图寻找差异表达的 miRNAs 及进行生物信息学分析,为治疗或预防孕中期母体丙泊酚麻醉所致的子代神经毒性探索新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 本实验的开展获南昌大学第一附属医院动物伦理委员会批准,本实验所用 SD 大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。选择清

^{*} 基金项目:江西省卫生健康委科技计划项目(20185106)。

作者简介:赵黎丽,女,主治医师,主要从事麻醉医学相关研究。

[△] 通信作者, E-mail: 34700117@qq.com。

洁级健康 SD 大鼠 30 只,其中雄性 10 只、雌性 20 只,月龄 9~10 周,体质量 270~310 g。采用标准饲养条件:室内温度 22 ℃,湿度(55±5)%,照明采用自动昼夜交替循环模式,大鼠可自由摄食、饮水。雌雄鼠同笼前进行 Morris 水迷宫(MWM)实验,判断其学习记忆能力以排除遗传不良影响。剔除找不到平台的大鼠后将雌鼠和雄鼠按 2:1 同笼以完成受孕。同笼后实验员于每日清晨对雌鼠进行阴道涂片,在显微镜下阴道涂片发现精子记为母鼠第 1 天怀孕。选取孕 14 d 的母鼠,采用随机数字表法分为 2 组,丙泊酚麻醉组(P 组)和脂肪乳剂对照组(C 组),每组 10 只。

1.2 孕鼠干预 将孕鼠轻柔地固定在自制固定装置中,鼠尾暴露在外,将鼠尾浸泡在温水中数分钟,清洁表面污物,待鼠尾静脉扩张显露后用酒精消毒鼠尾,从鼠尾静脉置入 24 G 静脉留置针并固定牢靠。P 组经鼠尾静脉留置针静脉注射诱导剂量丙泊酚 20 mg/kg(阿斯利康制药有限公司,产品批号:X17147A),翻正反射消失后以 20 mg/(kg·h)持续静脉泵注丙泊酚 4 h。C 组经鼠尾静脉注射与丙泊酚等剂量的 20% 中长链脂肪乳剂(广州百特侨光医疗用品有限公司,产品批号:GM190401)。母鼠麻醉手术期间采用无创心电监护仪监测脉搏血氧饱和度、心率,脉搏血氧饱和度<95% 的孕鼠剔除本研究。处理结束后待孕鼠翻正反射恢复后放回饲养笼继续饲养,待其分娩。为排除孕中期单纯丙泊酚麻醉可能造成孕鼠内环境紊乱,每组选取 6 只孕鼠于丙泊酚或脂肪乳剂输注结束时行股动脉采血 0.5 mL 用于动脉血气分析。所有用于动脉血气分析的孕鼠不再用于后续

实验。

1.3 子鼠行为学实验 子鼠出生后进行下列实验:(1)7 d 时两组子鼠行悬崖回避实验;(2)30~34 d 时两组子鼠行 MWM 实验。

1.4 子鼠海马 miRNAs 芯片检测及生物信息学分析 取出生后 7 d 和 30 d 时的两组子鼠海马组织行 miRNAs 芯片检测,并选取数个差异表达 miRNAs 进行实时荧光定量 PCR(qPCR)验证。采用在线数据库预测差异表达 miRNAs 的靶基因,进行 KEGG 通路富集分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组悬崖回避时间比较 悬崖回避实验结果显示,C 组悬崖回避时间为(5.95±1.91)s,P 组悬崖回避时间为(8.18±1.98)s,与 C 组比较,P 组子鼠转身或后退时间延长,提示孕中期母体丙泊酚麻醉损伤子鼠早期神经发育。

2.2 两组子鼠逃避潜伏期的比较 在 MWM 定位航行训练中,P 组与 C 组比较,第 4 天和第 5 天逃避潜伏期延长(*P*<0.05),见表 1。在 MWM 空间探索实验中,各组平台穿越次数比较,P 组少于 C 组(*P*<0.05);两组子鼠靶象限停留时间和游泳速度差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 2。提示孕中期丙泊酚麻醉对 SD 大鼠子代学习记忆有损伤作用。

表 1 两组子鼠逃避潜伏期的比较($\bar{x} \pm s, s$)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
P 组	10	64.22±16.54	38.56±10.77	32.56±10.79	27.58±8.80 ^a	23.33±8.89 ^a
C 组	10	66.04±18.13	34.26±10.57	28.50±10.46	23.46±6.78	19.01±6.00

注:与 C 组比较,^a*P*<0.05。

表 2 两组子鼠空间探索实验的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平台穿越次数(次)	靶象限停留时间(s)	游泳速度(m/s)
P 组	10	2.89±0.20 ^a	21.94±5.83	0.21±0.02
C 组	10	3.52±0.22	23.68±4.86	0.23±0.02

注:与 C 组比较,^a*P*<0.05。

2.3 子鼠海马组织 miRNAs 芯片检测结果

2.3.1 差异表达的 miRNAs 在 miRNAs 芯片检测之前对抽提的 RNA 进行质量检测,Agilent2100 Nanodrop 质检结果显示 8 个标本 RNA 质量均满足实验要求,可进行后续实验。miRNAs 芯片结果显示,以差异倍数≥2 且 *P*<0.05 作为差异表达标准时,与 C 组比较,7 d 时 P 组子鼠海马组织有 9 个 miRNAs 表达水平上调,包括 miR-134-3p、miR-138-2-3p、miR-

3068-3p、miR-328b-3p、miR-3552、miR-3572、miR-5132-3p、miR-547-5p、miR-671。与 C 组比较,30 d 时 P 组有 3 个 miRNAs 表达下调,包括 miR-374-5p、miR-124-5p、miR-362-3p。

2.3.2 miRNAs 表达的验证 选取 7 d 时差异表达 miRNAs 中的 miR-134-3p 和 30 d 时差异表达 miRNAs 中的 miR-362-3p 进行 qPCR 验证,结果显示,与 C 组比较,P 组 7 d 时子鼠的 miR-134-3p 上调,P 组 30 d 时子鼠的 miR-362-3p 下调,与 miRNAs 芯片表达结果一致。见表 3。

2.3.3 差异表达 miRNAs 生物信息学分析 采用 TargetScan 和 miRDB 两个数据库对 7 d 和 30 d 时差异表达的 miRNAs 进行预测,分别预测到 1 093 个和 312 个靶基因。应用在线软件 DAVID 软件进行靶基

因的 KEGG 通路富集分析。7 d 时 KEGG 通路富集分析前 20 名见图 1,30 d 时 KEGG 通路富集分析前 20 名见图 2。

表 3 miRNAs 表达的验证($\bar{x}\pm s$)			
组别	n	miR-134-3p	miR-362-3p
P 组	10	4.37±0.52 ^a	5.31±0.79 ^a
C 组	10	2.39±0.53	8.37±0.86

注:与 C 组比较,^a*P*<0.05。

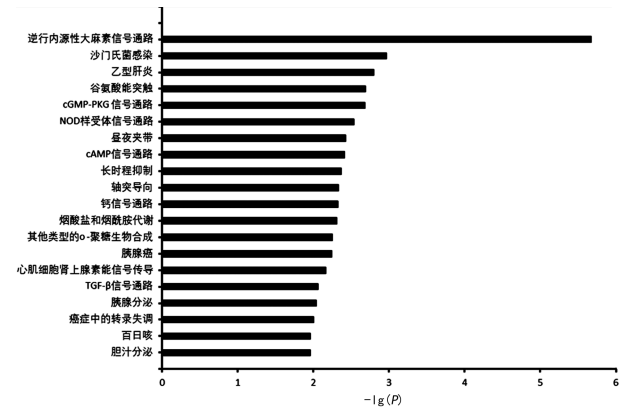


图 1 7 d 时两组差异表达 miRNAs 的靶基因 KEGG 通路富集分析

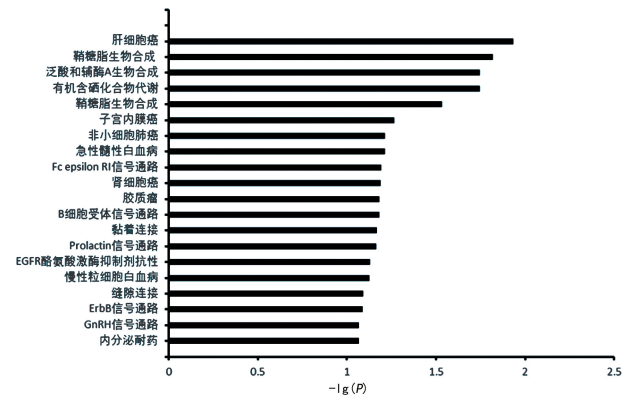


图 2 30 d 时两组差异表达 miRNAs 的靶基因 KEGG 通路富集分析

3 讨 论

在本研究中通过给孕中期大鼠尾静脉注射丙泊酚来探讨其对子代认知功能及海马组织 miRNAs 表达的影响。7 d 时子鼠悬崖回避实验结果提示孕中期母体丙泊酚麻醉损伤子鼠早期神经发育。30~34 d 时 MWM 实验结果发现孕中期母体丙泊酚麻醉会损伤子代远期空间学习记忆。孕中期母体丙泊酚麻醉可以改变子鼠海马组织 miRNAs 表达。

有研究表明,麻醉相关的 miRNAs 基因靶点参与轴突引导、DNA 转录和蛋白磷酸化相关的几个神经发育通路^[9]。因此,确定这些差异表达的 miRNAs 的靶点可能有助于阐明介导不同麻醉药对神经和生理功能作用的具体途径。本研究取孕中期母体丙泊酚麻醉后子代 7 d 和 30 d 时的海马组织进行 miRNAs 微阵列分析,寻找差异表达的 miRNAs 并进行了后续

的生物信息学分析。7 d 时差异表达 miRNAs 的靶基因 KEGG 通路富集分析发现,这些靶基因大量参与神经发育、突触塑形相关的生物学过程,例如树突形态发育、转录调控、学习、钙离子转运、蛋白磷酸化等。同时它们在谷氨酸能突触、cGMP-PKG 信号通路、cAMP 信号通路、长时程抑制、轴突导向、钙离子信号通路上都有富集,这些通道与神经发育、突触塑形都有相关性。在这些差异表达的 miRNAs 分子中,有一些已被研究证实与神经系统功能相关。miR-134 早在 2006 年就被 Nature 杂志报道为一种调节树突棘发育的脑特异性 miRNA^[10]。miR-134 可以通过下调大鼠的 Limk1/cofilin 信号参与慢性应激诱导的神经元结构可塑性和类抑郁样行为^[11]。miR-328a 可能通过上调 β-分泌酶水平参与戊四氮诱导的大鼠记忆功能障碍^[12]。miR-138-5p 在体外通过靶向甲状腺激素受体相互作用蛋白 16 表达调控神经干细胞的增殖和分化^[13]。7 d 和 30 d 子鼠差异表达 miRNAs 未产生过多交集,反映出 miRNAs 的表达具有时间特异性。30 d 时 P 组差异表达的 miRNAs 靶基因 KEGG 通路富集分析发现,预测靶基因在生物学过程、细胞成分、分子功能与 7 d 时已有了很大不同,与神经发育相关的靶基因减少。啮齿类动物大脑发育的高峰期主要集中在出生后前 2 周^[14]。7 d 时子鼠处于大脑发育的高峰期,母体丙泊酚麻醉对子代神经发育的不良影响可在分子或细胞水平被观察到是不难理解的。而 30 d 时子鼠的大脑已处于成熟期,故而差异表达的 miRNAs 预测的靶基因 KEGG 通路富集分析与神经发育相关性减少。

综上所述,本研究发现孕中期母体丙泊酚麻醉损伤子代早期神经发育和远期空间学习记忆。这可能与子鼠海马组织 miRNAs 的表达谱改变相关。这些差异表达的 miRNAs 靶基因及其相关通路的研究将为揭示孕中期母体丙泊酚麻醉导致的子代神经发育毒性机制提供新思路。

参考文献

[1] 张勤,罗佛全,赵为禄,等. 孕早期长时间异丙酚麻醉对子代大鼠认知功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2014,34(9):1051-1053.

[2] TOLCHER M C,FISHER W E,CLARK S L. Nonobstetric surgery during pregnancy[J]. Obstet Gynecol,2018,132(2):395-403.

[3] ZHONG L,LUO F Q,ZHAO W L,et al. Propofol exposure during late stages of pregnancy impairs learning and memory in rat offspring via the BDNF-TrkB signalling pathway[J]. J Cell Mol Med,2016,20(10):1920-1931.

[4] WU L,WANG S,FENG Y,et al. KIF17 mediates the learning and memory impairment in offspring induced by maternal exposure to propofol during middle pregnancy[J]. Mol Med Rep,2018,17(4):5428-5434.

(下转第 2348 页)

- Med, 2017, 376(24):2367-2375.
- [5] CHANG M, NGUYEN T T. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers[J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(5):1080-1093.
- [6] JALILIAN M, SHIRI S. The reliability of the wagner scale for evaluation the diabetic wounds: a literature review[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2021, 16(1):102369.
- [7] BUCH P J, CHAI Y, GOLUCH E D, et al. Treating polymicrobial infections in chronic diabetic wounds[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2):1-17.
- [8] LI X Y, QI X, YUAN G H, et al. Microbiological profile and clinical characteristics of diabetic foot infection in northern China: a retrospective multicentre survey in the Beijing area[J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(2):160-168.
- [9] KARMAKER M, SANYAL S K, SULTANA M, et al. Association of bacteria in diabetic and non-diabetic foot infection-an investigation in patients from Bangladesh[J]. *J Infect Public Health*, 2016, 9(3):267-277.
- [10] 周凤英, 罗田应. 糖尿病足部溃疡患者感染病原菌分布与临床治疗分析[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(24):3621-3623.
- [11] 王雪欣, 余鹏, 张明谏, 等. 糖尿病足患者下肢动脉病变和伤口细菌学分析[J]. *中华烧伤杂志*, 2018, 34(6):386-388.
- [12] HARDJO L N P, NAWANGSIH C, MOKSIDY J C, et al. Diabetic foot gangrene patient with multi-drug resistant pseudomonas putida infection in karawaci district, indonesia[J]. *J Glob Infect Dis*, 2015, 7(1):37-39.
- [13] 简丽, 赵启全, 何阳杰, 等. 2015—2017 年我院基于 Wagner 分级糖尿病足患者细菌耐药检测结果分析[J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(4):261-263.
- [14] 乐忠宏, 汤晓姣, 崔婷婷, 等. 糖尿病足感染患者病原学特点及耐药性分析[J]. *中华医院感染学志*, 2017, 27(3):590-592.
- [15] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2021, 37(4):311-398.
- [16] 张会峰, 许樟荣, 冉兴无. 糖尿病足的相关定义和标准[J]. *中华糖尿病杂志*, 2020, 12(6):363-368.
- [17] MILLER J M, BINNICKER M J, CAMPBELL S, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the infectious diseases society of America and the American society for microbiology[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(6):e1-e94.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S31[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2021.
- [19] LIPSKY B A, BERENDT A R, CORNIA P B, et al. 2012 infectious diseases society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections clinical infectious diseases[J]. *J Am Podiatr Assoc*, 2013, 103(1):2-7.
- [20] MACAULEY M, ADAMS G, MACKENNY P, et al. Microbiological evaluation of resection margins of the infected diabetic foot ulcer[J]. *Diabet Med*, 2021, 38(4):e14440.
- [21] NELSON A, WRIGHT-HUGHES A, BACKHOUSE M R, et al. CODIFI (Concordance in Diabetic Foot Ulcer Infection): a cross-sectional study of wound swab versus tissue sampling in infected diabetic foot ulcers in England[J]. *BMJ Open*, 2018, 8(1):e019437.

(收稿日期:2021-12-16 修回日期:2022-04-08)

(上接第 2343 页)

- [5] LIN J M, WANG S Q, FENG Y L, et al. Propofol exposure during early gestation impairs learning and memory in rat offspring by inhibiting the acetylation of histone[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(5):2600-2611.
- [6] XIONG M, LI J, ALHASHEM H M, et al. Propofol exposure in pregnant rats induces neurotoxicity and persistent learning deficit in the offspring[J]. *Brain Sci*, 2014, 4(2):356-375.
- [7] CREELEY C, DIKRANIAN K, DISSEN G, et al. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain[J]. *Br J Anaesth*, 2013, 110(1):29-38.
- [8] TWAROSKI D, BOSNJAK Z J, BAI X. MicroRNAs: new players in anesthetic-induced developmental neurotoxicity[J]. *Pharm Anal Acta*, 2015, 6:357.
- [9] LIN D, LIU J, HU Z, et al. Neonatal anesthesia exposure impacts brain microRNAs and their associated neurodevelopmental processes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):10656.
- [10] SCHRATT G M, TUEBING F, NIGH E A, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development[J]. *Nature*, 2006, 439(7074):283-289.
- [11] FAN C, ZHU X, SONG Q, et al. MiR-134 modulates chronic stress-induced structural plasticity and depression-like behaviors via downregulation of limk1/cofilin signaling in rats[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 131(3):364-376.
- [12] LIAO Y, HUANG Y, LIU X, et al. MicroRNA-328a regulates water maze performance in PTZ-kindled rats[J]. *Brain Res Bull*, 2016, 125(7):205-210.
- [13] WANG J, LI J, YANG J, et al. MicroRNA 138-5p regulates neural stem cell proliferation and differentiation in vitro by targeting TRIP6 expression[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5):7261-7266.
- [14] DAS-THAKUR M, FENG Y, JAGANNATHAN R, et al. Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway[J]. *Curr Biol*, 2010, 20(7):657-662.

(收稿日期:2021-11-10 修回日期:2022-05-18)