

· 论 著 ·

孕酮对大鼠孕中期吸入七氟醚致 1 周龄子代神经损伤的保护作用及机制

高荣^{1,2,3}, 马丽², 王川³, 常海霞⁴, 王滨³, 李云峰^{3,4}, 冉玉华³, 郭文治²

(1. 山西医科大学麻醉学院, 山西太原 030001; 2. 解放军总医院第七医学中心麻醉科, 北京 100070; 军事科学院军事医学研究院 3. 毒物药物研究所, 4. 军事认知与脑科学研究所, 北京 100850)

摘要:目的 探讨孕酮(Prog)改善孕中期大鼠吸入七氟醚致 1 周龄子代大鼠(子鼠)神经损伤作用及其机制。方法 孕中期 SD 大鼠分为正常对照组、模型组和模型+Prog 2, 4 和 8 mg·kg⁻¹组。模型组在孕 14~16 d 吸入七氟醚(浓度 2.5%, 流量 2 L·min⁻¹, 2 h·d⁻¹, 连续 3 d)制备孕中期七氟醚暴露模型, 正常对照组在同等条件下吸入压缩空气, 模型+Prog 组于造模前(孕 11~16 d) im 给予 Prog, 取子鼠海马组织, 采用流式细胞术检测细胞凋亡水平, Western 印迹法检测突触后致密蛋白 95(PSD95)、突触蛋白 1、桥尾蛋白、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和酪氨酸激酶受体(TKR)表达水平, 免疫荧光技术检测海马 CA1 区离子钙接头蛋白分子 1(Iba-1)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性细胞数量。结果 与正常对照组比较, 模型组子鼠海马细胞早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$); 海马 GDNF 和 TKR 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), PSD95、突触蛋白 1 和桥尾蛋白表达水平降低($P<0.05$); 海马 CA1 区 Iba-1 和 GFAP 阳性细胞数量均显著增多($P<0.01$, $P<0.05$)。与模型组比较, 模型+Prog 各剂量组子鼠海马细胞晚期凋亡率和总凋亡率显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), 模型+Prog 4 和 8 mg·kg⁻¹组海马细胞早期凋亡率显著降低($P<0.05$, $P<0.01$); 模型+Prog 4 和 8 mg·kg⁻¹组海马组织中 GDNF 和 TKR 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$); 模型+Prog 8 mg·kg⁻¹组海马 PSD95 表达水平升高($P<0.05$), 而突触蛋白 1 和桥尾蛋白表达水平均无明显改变; 模型+Prog 4 和 8 mg·kg⁻¹组 Iba-1 阳性和 GFAP 阳性细胞数量显著减少($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 Prog 对孕中期吸入七氟醚致子鼠神经损伤的改善作用可能与其抑制小胶质细胞和星形胶质细胞活化介导的海马细胞凋亡率上升和突触相关蛋白表达水平下降有关。

关键词: 七氟醚; 孕中期; 孕酮; 神经保护; 胶质细胞; 海马

中图分类号: R971 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002-(2022)10-0721-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.10.001

七氟醚(sevoflurane)是临床常用全身麻醉药物之一,因其诱导迅速、术中血液动力学平稳、苏醒较快的特点被广泛用于成人和小儿麻醉^[1]。然而,2016年美国FDA对3岁以下儿童和孕妇手术麻醉提出了警告:发育早期多次接触七氟醚可能导致大脑发育异常^[2],并造成远期认知功能障碍^[3]。近年越来越多研究表明,孕酮(progesterone, Prog)可改善神经损伤症状并提高认知学习能力,这一效果在多种神经损伤模型上均得到了证实^[4-7]。但Prog对孕期七氟醚吸入导致的子代神经损伤是否有保护效应未见文献报道。本研究旨在探索Prog预给

药对孕中期大鼠七氟醚吸入致幼龄子代大鼠神经损伤的保护作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

15 只 SD 孕大鼠, SPF 级, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 生产许可证号为 SCXK(京)2019-0010。饲养温度 23~26℃, 湿度 50%~70%, 12 h 光暗循环(8:00~20:00 灯光照明), 自由摄食饮水。本研究动物实验经解放军总医院第七医学中心伦理委员会批准, 批准编号: 2022-55。

1.2 药品、试剂和主要仪器

七氟醚(凯特利), 上海恒瑞医药有限公司; Prog, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 2-羟丙基-β-环糊精, 北京百灵克生物科技有限公司; FITC Annexin V/

基金项目: 国家自然科学基金(81701072)

作者简介: 高荣, 硕士研究生, 主要从事麻醉药理学研究, E-mail: 2326447730@qq.com

通讯作者: 冉玉华, E-mail: ranyuhua@126.com; 郭文治, E-mail: elite2005gg@163.com

7-AAD 凋亡试剂检测盒, 美国 Tonbobio 公司; 胰蛋白酶, 北京索莱宝科技有限公司; 兔抗大鼠突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density-95, PSD95)、突触蛋白 1、桥尾蛋白、离子钙接头蛋白分子 1 (ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba-1)、胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、 β 肌动蛋白和 GAPDH 单抗, 美国 Abcam 公司; 兔抗大鼠胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 和酪氨酸激酶受体 (tyrosine kinase receptor, TKR) 单抗, 武汉博士德公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG 抗体, 美国 CST 公司; 小动物麻醉机, 北京友诚嘉业生物科技有限公司; 麻醉监护仪, 美国 GE 公司; 台式冷冻离心机, 日本 KUBOTA 公司; FACSCalibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司; 样品冷冻研磨仪, 北京赫德科技有限公司; 冰冻切片机, 美国 Thermo 公司; 正置显微镜和数码显微成像系统, 日本 NIKON 公司。

1.3 实验分组和七氟醚吸入损伤模型制备

孕鼠随机分为正常对照组、模型组和模型+Prog (2, 4 和 8 mg·kg⁻¹) 组。模型组在孕 11~16 d 每日 8:00 am im 给予溶剂 (25% 环糊精溶液), 孕 14~16 d 给予溶剂 1 h 后吸入七氟醚 (浓度 2.5%, 流量 2 L·min⁻¹, 2 h·d⁻¹) 制备七氟醚暴露模型^[8]; 模型+Prog (2, 4 和 8 mg·kg⁻¹) 组在孕 11~16 d im 给予不同剂量 Prog, 孕 14~16 d 于同等条件下吸入七氟醚; 正常对照组在孕 11~16 d im 给予溶剂, 孕 14~16 d 于同等条件下吸入压缩空气。

所有孕鼠在七氟醚吸入过程中均进行氧饱和度和心率检测, 以观察大鼠生命体征, 处理结束后放回动物房正常饲养至子代出生。取 1 周龄子代大鼠 (子鼠) 海马组织进行后续检测。

1.4 流式细胞术检测子鼠海马细胞凋亡率

取子鼠海马组织置冰冷 PBS 缓冲液中, 以 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 消化 1 h 至组织呈絮状悬液, 悬液经 100 目滤网过滤, 所得细胞悬液经 300×g 离心 5 min, 弃上清, 加 1 mL 预冷 PBS 液, 同等条件下重复离心 2 次弃上清, 在所得细胞沉淀中加入 250 μ L 1×结合缓冲液, 调节细胞密度至 1×10⁹ L⁻¹。取 100 μ L 细胞悬液于流式管中, 按照 FITC Annexin V/7-AAD 凋亡试剂检测盒说明书, 加入 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L 7-AAD 溶液, 混匀避光孵育 30 min 后使用 FACSCalibur 流式细胞仪检测, FlowJo_V10 软件分析海马细胞凋亡率。

1.5 Western 印迹法检测子鼠海马组织突触相关蛋白表达

依照文献[18]方法, 取子鼠海马组织加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂, 加入研磨珠 4℃ 研磨 1 min, 静置离心后取上清, BCA 定量测定蛋白浓度, 而后与 2×上样缓冲液 1:1 混合, 100℃ 煮 10 min 后备用。配置分离胶和浓缩胶后上样, 上样量为 50 μ g, 80 V 恒定电压电泳 90 min, 200 mA 恒定电流转膜 100 min, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 清洗 3 次后分别加入抗 PSD95、突触蛋白 1、桥尾蛋白、GDNF 或 TKR 的一抗 (均为 1:1000), 4℃ 摇床过夜。TBST 清洗 3 次后孵育荧光二抗 (1:5000), TBST 清洗 3 次。以 GAPDH 或 β 肌动蛋白作为内参对照, 使用 Odyssey 双色红外成像系统进行显影, Image J 软件分析蛋白条带积分吸光度 (integrated absorbance, IA) 值, 以目标蛋白与内参蛋白 IA 值的比值反映目标蛋白相对表达水平。

1.6 免疫荧光检测子鼠海马胶质细胞激活水平

取子鼠全脑浸泡在 4% 多聚甲醛中, 4℃ 固定 24 h, 换 30% 蔗糖溶液脱水 24 h, 冰冻切片机制片, 厚度为 20 μ m。使用 PBS 漂洗 5 min, 封闭液室温封闭 3 h, 弃封闭液, 加入抗 Iba-1 或 GFAP 抗体, 4℃ 过夜, 回收一抗后用 PBS 漂洗, 加荧光二抗, 室温避光孵育 2 h, 弃二抗, 用 PBS 漂洗, 用 DAPI 封片后使用正置显微系统观察拍照。每张切片选取海马组织相同区域的 3 个不同视野, 用 Image J 软件进行阳性细胞计数, 以 Iba-1 阳性染色细胞数量反映小胶质细胞的激活水平, GFAP 阳性染色细胞数量反映星形胶质细胞激活水平。

1.7 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Prog 对子鼠海马细胞凋亡的影响

细胞凋亡检测结果 (图 1) 显示, 与正常对照组比较, 模型组海马细胞早期凋亡率 ($P < 0.01$)、晚期凋亡率 ($P < 0.05$) 和总凋亡率 ($P < 0.01$) 均显著升高; 与模型组比较, 模型+Prog 各剂量组子鼠海马晚期凋亡率和总凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 模型+Prog 4 和 8 mg·kg⁻¹ 组早期凋亡率也显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示 Prog 对七氟醚引起的

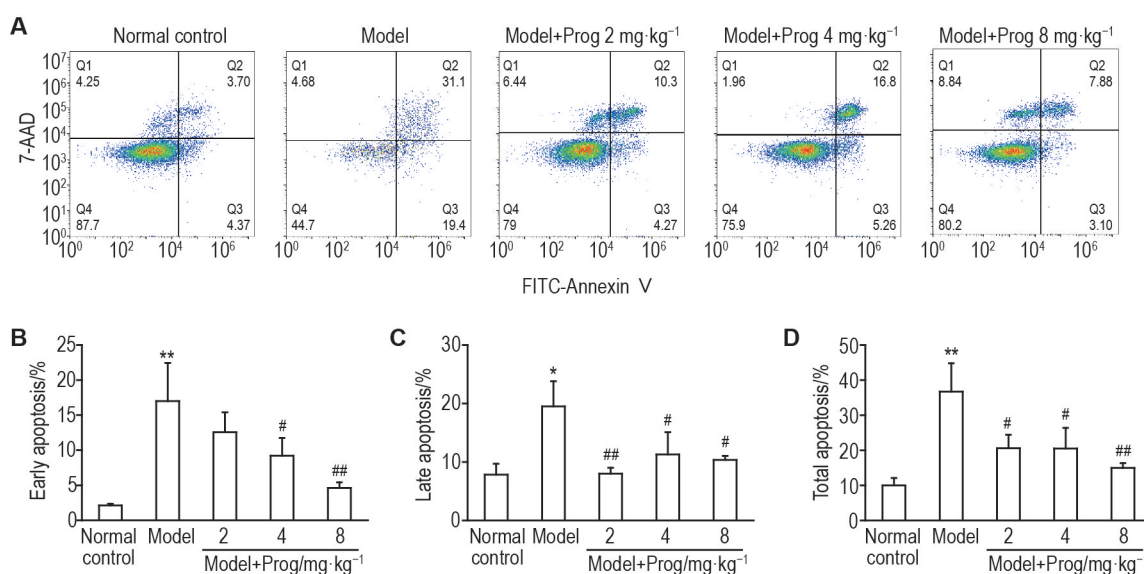


Fig.1 Effect of progesterone (Prog) on apoptosis rate of one-week-old offspring rat (offspring rat) hippocampus cells by flow cytometry. The pregnant rats were divided into five groups. The model group and model+Prog groups were im given solvent or Prog (2, 4 and 8 mg·kg⁻¹) during the 11th–16th days of pregnancy, and were inhaled given sevoflurane (concentration 2.5%, flow rate 2 L·min⁻¹, 2 h·d⁻¹) 1 h after drug treatment during the 14th–16th days of pregnancy. The normal control group was im given solvent during the 11th–16th days of pregnancy, and inhaled compressed air under the same conditions. The hippocampus of offspring rats was taken for detection. B, C and D were the semi-quantitative results of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with normal control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with model group.

子鼠海马神经细胞凋亡水平升高具有逆转效应。

2.2 Prog对子鼠海马GDNF和TKR蛋白表达水平的影响

检测结果(图2)显示,与正常对照组比较,模型组GDNF($P<0.05$)和TKR($P<0.01$)蛋白表达水平显著降低;与模型组比较,模型+Prog 4和8 mg·kg⁻¹组GDNF和TKR表达水平升高($P<0.05$)。

2.3 Prog对子鼠海马PSD95、突触蛋白1和桥尾蛋白表达水平的影响

突触相关蛋白检测结果(图3)显示,与正常对照组比较,模型组子鼠海马PSD95、突触蛋白1和桥尾蛋白表达水平降低($P<0.05$);与模型组比较,模型+Prog 8 mg·kg⁻¹组PSD95表达水平升高($P<0.05$),模型+Prog 2和4 mg·kg⁻¹组PSD95表达水

平无显著变化;模型+Prog各剂量组突触蛋白1和桥尾蛋白表达水平均无显著变化。

2.4 Prog对子鼠海马CA1区小胶质细胞激活水平的影响

海马CA1区小胶质细胞激活水平检测结果(图4)显示,与正常对照组比较,模型组CA1区Iba-1阳性细胞数量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,模型+Prog 4和8 mg·kg⁻¹组Iba-1阳性细胞数量显著减少($P<0.01$)。提示Prog可改善七氟醚诱导的子鼠海马CA1区小胶质细胞过度激活。

2.5 Prog对子鼠海马CA1区星形胶质细胞激活水平的影响

海马CA1区星形胶质细胞激活水平检测结果(图5)显示,与正常对照组比较,模型组CA1区

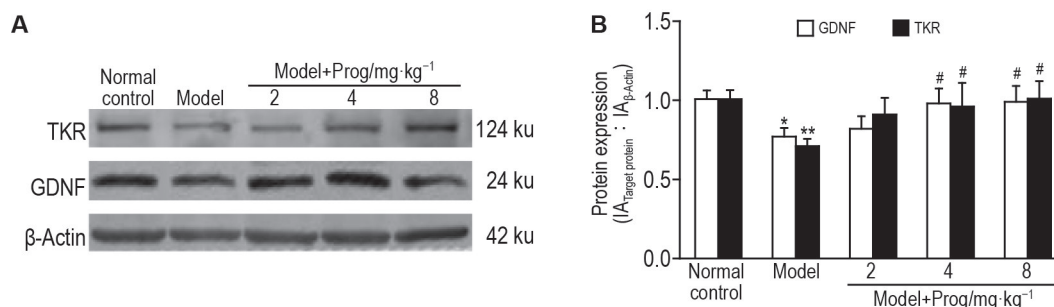


Fig.2 Effect of Prog on levels of glial cellline-derived neurotrophic factor (GDNF) and tyrosine kinase receptor (TKR) expression in hippocampus of offspring rats by Western blotting. See Fig.1 for the rat treatment. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with normal control group; # $P<0.05$, compared with model group.

GFAP 阳性细胞数量增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, 模型+Prog 4 和 $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 GFAP 阳性细胞数

量减少 ($P<0.05, P<0.01$)。提示 Prog 可改善七氟醚诱导的子鼠海马 CA1 区星形胶质细胞过度激活。

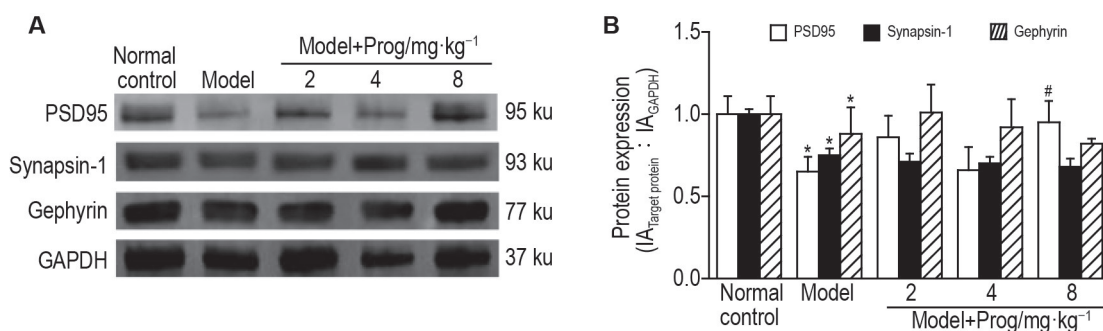


Fig.3 Effect of Prog on levels of synapse-related protein expressions in hippocampus of offspring rats by Western blotting. See Fig.1 for the rat treatment. B was the semi-quantitative result of A. PSD95: postsynaptic density-95. $\bar{x}\pm s, n=3$. * $P<0.05$, compared with normal control group; # $P<0.05$, compared with model group.

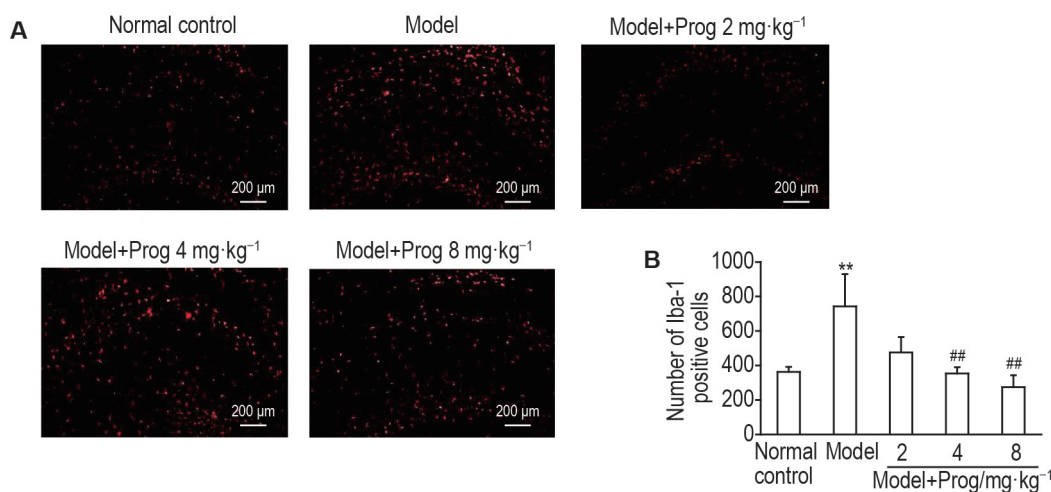


Fig.4 Effect of Prog on number of ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) positive cells in hippocampus CA1 region of offspring rats by immunofluorescence staining. See Fig.1 for the rat treatment. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s, n=3$. ** $P<0.01$, compared with normal control group; ## $P<0.01$, compared with model group.

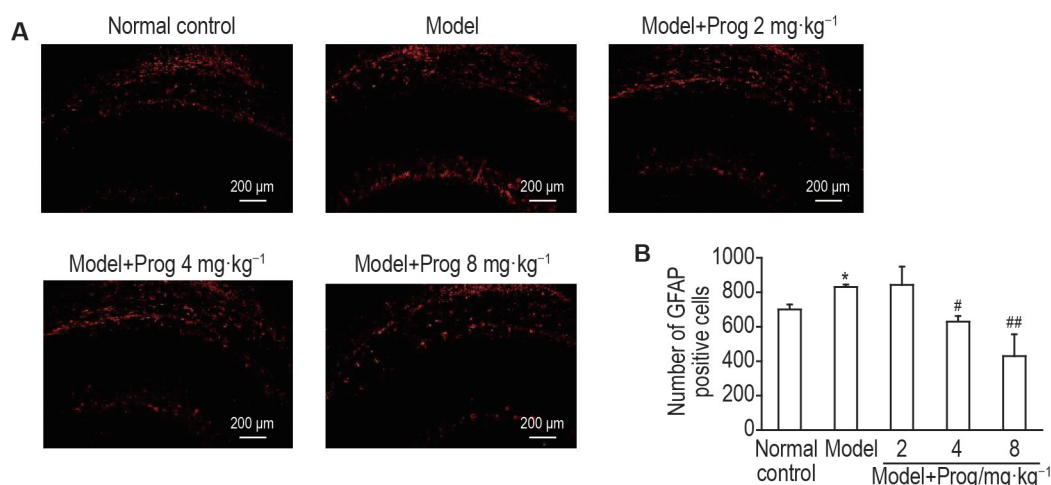


Fig.5 Effect of Prog on number of glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive cells in hippocampus CA1 region of offspring rats by immunofluorescence staining. See Fig.1 for the rat treatment. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s, n=3$. * $P<0.05$, compared with normal control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with model group.

3 讨论

孕中期是临床进行妊娠期非外科手术最常见的一个时期^[9],是人类胚胎中枢神经系统发育的第 1 个关键时期,对外界刺激极其敏感^[10]。本研究参照文献[11-13]选取孕中期 SD 大鼠进行七氟醚干预造模,参照文献[14-16]的造模浓度和方式,研究 Prog 对七氟醚吸入导致子代神经发育障碍的影响。

研究结果显示,大鼠孕中期七氟醚吸入引起子鼠海马神经细胞凋亡率上升,突触相关蛋白表达水平下降,提示子鼠可能存在神经元损伤和突触发育异常。该结果与文献[17-19]结果一致。Prog 预给药逆转了七氟醚吸入引起的上述改变,表明 Prog 对七氟醚引起子代神经损伤具有预防效应,该结果与文献[20-22]报道一致。

既往研究表明,Prog 在 4~16 mg·kg⁻¹ 剂量范围内均可改善突触可塑性,减轻神经损伤^[23-24]。本课题组前期采用 SD 大鼠孕 14~16 d 吸入七氟醚制备七氟醚损伤模型^[18],并在孕 11~16 d 给予不同剂量的 Prog (1, 2, 4, 8 和 16 mg·kg⁻¹)。结果发现,Prog 2 mg·kg⁻¹ 即可逆转七氟醚引起的子代大鼠神经细胞凋亡水平升高。因此,本研究选取 Prog 2, 4 和 8 mg·kg⁻¹ 研究 Prog 预处理对七氟醚引起的子代神经损伤的保护作用及相关机制。

本研究结果表明,Prog 预处理可显著逆转大鼠孕中期七氟醚吸入所致子代海马 Iba-1 和 GFAP 阳性细胞数量增加,表明小胶质细胞和星形胶质细胞激活可能是 Prog 神经保护作用机制之一。小胶质细胞可被七氟醚激活,并进一步促进白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 等促炎因子释放,从而造成神经元损伤^[25],据此推测,Prog 对七氟醚导致子代神经损伤效应的预防作用可能与抑制小胶质细胞介导炎症反应有关。星形胶质细胞激活可介导多种营养因子释放。TKR 是 GDNF 通路下游的一个跨膜酪氨酸激酶受体,是 GDNF 分子信号传入细胞内的枢纽。正常情况下 GDNF 可通过 TKR 激活胞内下游信号通路,进一步发挥神经营养作用,TKR 可在疾病或药物等外界环境刺激下发生突变,表现为过度激活或失活^[26]。本研究结果表明,Prog 4 和 8 mg·kg⁻¹ 能显著逆转七氟醚吸入引起的子鼠海马 GDNF 和 TKR 表达下调,表明 Prog 的作用机制与激活 GDNF/TKR 相关通路有关。Prog 对 GDNF/TKR 通路的精确调节机制有待深入研究。

激活的星形胶质细胞和小胶质细胞可通过维持或重塑突触可塑性,进而改变突触可塑性相关蛋

白表达水平^[27-28]。本研究检测了突触相关蛋白水平,以探讨 Prog 的神经保护作用是否在突触水平起效。结果发现,大鼠孕中期七氟醚吸入可引起子代海马 PSD95、突触蛋白 1 和桥尾蛋白 3 种突触相关蛋白表达水平下降,表明其具有突触损伤作用,与文献[29]报道一致;而 Prog 可改善孕中期七氟醚吸入引起的子代海马 PSD95 水平下降。PSD95 可调节兴奋性突触,是 N-甲基-D-天冬氨酸受体的支架蛋白。在星形胶质细胞促进神经元之间突触形成的过程中,PSD95 可能参与促进突触的形成^[30]。推测 Prog 激活星形胶质细胞与促进 PSD95 水平升高可能具有协同效应,可进一步促进突触形成,改善七氟醚引起的突触损伤,发挥神经保护作用。

综上所述,Prog 预处理可减轻大鼠孕中期七氟醚吸入对子代造成的神经损伤,该效应可能与抑制小胶质细胞和星形胶质细胞激活、促进 GDNF/TKR 表达、发挥神经营养作用、抑制海马神经细胞凋亡和突触相关蛋白水平下降有关。

参考文献:

- [1] Yin SW, Meng YL, Li C, *et al*. Enriched environment for offspring improves learning and memory impairments induced by sevoflurane exposure during the second trimester of pregnancy[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(6): 1293-1298.
- [2] Olutoye OA, Baker BW, Belfort MA, *et al*. Food and Drug Administration warning on anesthesia and brain development: implications for obstetric and fetal surgery[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2017, 218(1): 98-102.
- [3] Lu Y, Huang Y, Jiang J, *et al*. Neuronal apoptosis may not contribute to the long-term cognitive dysfunction induced by a brief exposure to 2% sevoflurane in developing rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 78: 322-328.
- [4] Ghazvini H, Tirgar F, Khodamoradi M, *et al*. Ovarian hormones prevent methamphetamine-induced anxiety-related behaviors and neuronal damage in ovariectomized rats[J / OL]. *Neurosci Lett*, 2021, 746: 135652 (2021-01-19) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33482310/>. DOI: 10.1016/j.neulet.2021.135652.
- [5] Atif F, Yousuf S, Espinosa-Garcia C, *et al*. Post-ischemic stroke systemic inflammation: immunomodulation by progesterone and vitamin D hormone[J/OL]. *Neuropharmacology*, 2020, 181: 108327 (2020-09-18) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

- 32950558/. DOI: 10.1016/j.neuroharm.2020.108327.
- [6] Amirkhosravi L, Khaksari M, Sheibani V, *et al.* Improved spatial memory, neurobehavioral outcomes, and neuroprotective effect after progesterone administration in ovariectomized rats with traumatic brain injury: role of RU486 progesterone receptor antagonist[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24(3): 349-359.
- [7] Xu J, Zhou Y, Yan C, *et al.* Neurosteroids: a novel promise for the treatment of stroke and post-stroke complications[J]. *J Neurochem*, 2022, 160(1): 113-127.
- [8] Lee S, Chung W, Park H, *et al.* Single and multiple sevoflurane exposures during pregnancy and offspring behavior in mice[J]. *Paediatr Anaesth*, 2017, 27(7): 742-751.
- [9] Devroe S, Bleeser T, Van de Velde M, *et al.* Anesthesia for non-obstetric surgery during pregnancy in a tertiary referral center: a 16-year retrospective, matched case-control, cohort study[J]. *Int J Obstet Anesth*, 2019, 39: 74-81.
- [10] Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, *et al.* Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 106-107: 1-16.
- [11] Wang Y, Yin SW, Zhang N, *et al.* High-concentration sevoflurane exposure in mid-gestation induces apoptosis of neural stem cells in rat offspring[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(9): 1575-1584.
- [12] Hirotsu A, Iwata Y, Tatsumi K, *et al.* Maternal exposure to volatile anesthetics induces IL-6 in fetal brains and affects neuronal development[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 863: 172682 (2019-09-15) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31545984/>. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172682.
- [13] Chai D, Yan J, Li C, *et al.* Sevoflurane inhibits neuronal migration and axon growth in the developing mouse cerebral cortex[J]. *Aging*, 2020, 12(7): 6436-6455.
- [14] Jiang M, Tang T, Liang X, *et al.* Maternal sevoflurane exposure induces temporary defects in interkinetic nuclear migration of radial glial progenitors in the fetal cerebral cortex through the Notch signaling pathway[J/OL]. *Cell Prolif*, 2021, 54(6): e13042 (2021-05-06) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33955094/>. DOI: 10.1111/cpr.13042.
- [15] Song R, Ling X, Peng M, *et al.* Maternal sevoflurane exposure causes abnormal development of fetal prefrontal cortex and induces cognitive dysfunction in offspring[J/OL]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 6158468 (2017-09-25) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29098009/>. DOI: 10.1155/2017/6158468.
- [16] Yuan X, Liu H, Li Y, *et al.* Ribbon synapses and hearing impairment in mice after in utero sevoflurane exposure[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 2685-2693.
- [17] Wang Y, Cheng Y, Liu G, *et al.* Chronic exposure of gestation rat to sevoflurane impairs offspring brain development[J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(3): 535-544.
- [18] He J, Zhu J. Collapsin response mediator protein-2 ameliorates sevoflurane-mediated neurocyte injury by targeting PI3K-mTOR-S6K pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 4982-4991.
- [19] Liao Z, Li J, Miao L, *et al.* Inhibition of RhoA activity does not rescue synaptic development abnormalities and long-term cognitive impairment after sevoflurane exposure[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(3): 468-481.
- [20] Wali B, Sayeed I, Stein DG, *et al.* Prophylactic progesterone prevents adverse behavioural and neurocognitive effects of neonatal anaesthesia exposure in rat[J]. *Br J Anaesth*, 2022, 128(2): 301-310.
- [21] Tyagi E, Agrawal R, Ying Z, *et al.* TBI and sex: crucial role of progesterone protecting the brain in an omega-3 deficient condition[J]. *Exp Neurol*, 2014, 253: 41-51.
- [22] Zhang Z, Yang R, Zhou R, *et al.* Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice[J]. *Hippocampus*, 2010, 20(3): 402-412.
- [23] Barreto-Cordero LM, Ríos-Carrillo J, Roldán-Roldán G, *et al.* Cyclic changes and actions of progesterone and allopregnanolone on cognition and hippocampal basal (stratum oriens) dendritic spines of female rats[J/OL]. *Behav Brain Res*, 2020, 379: 112355 (2019-11-12) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31730784/>. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112355.
- [24] Cao T, Tang M, Jiang P, *et al.* A potential mechanism underlying the therapeutic effects of progesterone and allopregnanolone on ketamine-induced cognitive deficits[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 612083 (2021-05-08) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33767621/>. DOI: 10.3389/fphar.2021.612083.
- [25] Dong Y, Liang F, Huang L, *et al.* The anesthetic sevoflurane induces tau trafficking from neurons to microglia[J/OL]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 560 (2021-05-12) [2022-02-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33980987/>. DOI: 10.1038/s42003-021-02047-8.
- [26] Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases[J]. *Cytokine Growth Factor*

- Rev*, 2001, 12(4): 361-373.
- [27] Allen NJ, Eroglu C. Cell biology of astrocyte-synapse interactions[J]. *Neuron*, 2017, 96(3): 697-708.
- [28] Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, et al. Microglia: dynamic mediators of synapse development and plasticity[J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(10): 605-613.
- [29] Li C, Liu S, Mei Y, et al. Differential effects of sevoflurane exposure on long-term fear memory in neonatal and adult rats[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(5): 2799-2807.
- [30] Ullian EM, Harris BT, et al. Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 25(2): 241-251.

Protective effect and mechanism of progesterone against nerve injury in one-week-old offspring rats induced by sevoflurane inhalation in second trimester rats

GAO Rong^{1,2,3}, MA Li², WANG Chuan³, CHANG Hai-xia⁴, WANG Bin³, LI Yun-feng^{3,4},
RAN Yu-hua³, GUO Wen-zhi²

(1. School of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Department of Anaesthesia, the Seventh Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100070, China; 3. Institute of Pharmacology and Toxicology, 4. Institute of Military Cognitive and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: OBJECTIVE To study the protective effect of progesterone (Prog) against nerve injury in one-week-old offspring rats (offspring rats) induced by sevoflurane inhalation in second trimester rats and the possible mechanism. **METHODS** SD rats in the second trimester were divided into the normal control group, model group, model+Prog 2, 4 and 8 mg·kg⁻¹ group. The model group was inhaled sevoflurane (at the concentration of 2.5%, a flow rate of 2 L·min⁻¹, 2 h·d⁻¹, and for three consecutive days) during 14–16 days of pregnancy to prepare sevoflurane exposure model during pregnancy. The normal control group inhaled compressed air under the same conditions. The model+Prog groups were given different doses of progesterone by intramuscular injection before modeling (11–16 days of pregnancy). The hippocampus tissue of offspring rats was collected for testing, and the apoptosis level was detected by flow cytometry. The expression levels of protein 95 (PSD95), synapsin-1, gephyrin, glial cellline-derived neurotrophic factor (GDNF) and tyrosine kinase receptor (TKR) were detected by Western blotting. The numbers of ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1)-positive cells and glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive cells in the CA1 region were detected by immunofluorescence technique. **RESULTS** Compared with the normal control group, the early-stage, late-stage and total rates of apoptosis of hippocampal cells in the model group were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the expression levels of GDNF and TKR protein were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the expression levels of PSD95 and synapsin-1 were decreased ($P<0.05$), and the expression level of gephyrin protein remained unchanged, but the numbers of Iba-1 and GFAP positive cells in the hippocampal CA1 region were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the model group, the late-stage and total rates of apoptosis of hippocampal cells in model+Prog groups were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), so was the early-stage apoptosis in model+Prog 4 and 8 mg·kg⁻¹ groups ($P<0.05$, $P<0.01$); but the expression levels of GDNF and TKR protein in the hippocampus of model+Prog 4 and 8 mg·kg⁻¹ groups were significantly increased ($P<0.05$), the expression level of PSD95 in the hippocampus of the model+Prog 8 mg·kg⁻¹ group was increased ($P<0.05$), the expression levels of synapsin-1 and gephyrin were not significantly changed in any group, but the numbers of Iba-1-positive and GFAP-positive cells

were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** The protective effect of progesterone against nerve injury of offspring rats induced by sevoflurane inhalation in the second trimester may be related to its inhibition of the increased proportion of hippocampal apoptosis and decreased expression levels of synapse-related proteins mediated by the activation of microglia and astrocytes.

Key words: sevoflurane; second trimester; progesterone; neuroprotection; glial cells; hippocampus

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81701072)

Corresponding author: RAN Yu-hua, E-mail: ranyuhua@126.com; GUO Wen-zhi, E-mail: elite2005gg@163.com

(收稿日期: 2022-03-22 接受日期: 2022-05-27)

(本文编辑: 赵楠)

欢迎投稿 欢迎订阅

《中国药理学与毒理学杂志》是为军事科学院主管,军事科学院军事医学研究院主办的学术性刊物,月刊。被北大图书馆评为药学专业中文核心期刊(中文核心期刊要目总览),同时还是中国科技核心期刊、中国学术核心期刊和中国生物医学核心期刊等。被美国《化学文摘》(CA)等十余家数据库收录。

《中国药理学与毒理学杂志》设有前沿论坛、论著、实验方法和综述栏目。读者对象主要为从事药理学、毒理学、药学、医学和生物基础科学研究的工作者。中英文稿件兼收,更欢迎英文稿件。

遵照上级部门有关规定,本刊目前暂停收稿件处理费和版面费。

本刊全年12期,每期定价30.00元。国内外公开发行,国内邮发代号:82-140,国外邮发代号:BM-1051。本刊主要通过邮局订阅,也可以联系编辑部商谈杂志订阅事宜。

地址:北京市海淀区太平路27号毒物药物研究所《中国药理学与毒理学杂志》编辑部

邮编:100850

电话:(010)66930636,(010)66931617

E-mail: cjpt518@163.com

网址: <http://cjpt.magtechjournal.com>