

瑞芬太尼改善异氟醚致新生大鼠神经毒性的机制

郭莹 潘波 黄绍强[△]

(复旦大学附属妇产科医院麻醉科 上海 200090)

【摘要】 目的 研究瑞芬太尼对异氟醚引起的新生大鼠海马神经毒性急性期和远期影响及其可能机制。**方法** 将出生 7 天的新生大鼠随机分成 4 组:对照组(Sham 组)、异氟醚组(Iso 组)、异氟醚 + 切开组(Iso + I 组)及异氟醚 + 切开 + 瑞芬太尼组(Ref 组),采用每天 2 h 连续 3 天的处理方式模拟临床多次麻醉暴露。在第 3 天麻醉结束后 6 h 取新鲜海马组织用 Western blot 检测 NF- κ B p65 蛋白入核的比例,q-RT-PCR 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 的相对表达量;灌注取脑后用免疫荧光计数离子钙接头蛋白抗原分子-1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1, IBA1)阳性细胞数量。大鼠在出生后的第 65 天进行被动回避实验,观察其学习与记忆能力。**结果** 与 Sham 组相比,Iso 组和 Iso + I 组 NF- κ B p65 蛋白入核的比例显著增加,IL-1 β 与 TNF- α 的 mRNA 的表达量上调,而且这种神经毒性在幼鼠成年后表现为学习与记忆障碍,然而瑞芬太尼显著改善由异氟醚多次暴露所致的神经炎症反应及学习记忆障碍。**结论** 瑞芬太尼改善异氟醚致新生大鼠神经炎症反应,可能通过 NF- κ B p65 通路发挥作用。

【关键词】 发育大脑; 瑞芬太尼; 异氟醚; 神经炎症

【中图分类号】 R614 **【文献标识码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.01.002

The mechanism of remifentanyl ameliorated isoflurane-induced neurotoxicity in neonatal rats

GUO Ying, PAN Bo, HUANG Shao-qiang[△]

(Department of Anesthesiology, Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200090, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanisms of effect of remifentanyl on isoflurane induced newborn rat hippocampal neurotoxicity and observe the effect of remifentanyl on isoflurane induced long-term effect. **Methods** Postnatal day-7 rats were randomly divided into four groups, the control group (Sham group), isoflurane group (Iso), isoflurane + incision group (Iso + I) and isoflurane + incision + remifentanyl group (Ref). We used 2 hours a day for 3 consecutive days to mimic the clinical multiple anesthesia exposure. Western blot was used to detect the proportion of NF- κ B p65 protein transferred into the nucleus; q-RT-PCR was used to detect the mRNA expression of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α ; immunofluorescence was used to count ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1) positive cells numbers. Meanwhile, on the 65th day, passive avoidance test was used to observe the learning and memory ability. **Results** Compared with the Sham group, in Iso and Iso + I group, isoflurane significantly increased the proportion of NF- κ B p65 protein transferred into the nucleus, raised the mRNA expression of TNF- α and IL-1 β , and induced learning and memory disorders after the rats matured. However, remifentanyl significantly improved repeated isoflurane exposure-induced neuroinflammation and learning and memory disorders. **Conclusions** The mechanism of

improvement of remifentanyl on isoflurane-induced neurotoxicity in newborn rats may be through the NF- κ B p65 pathway.

【Key words】 developing brain; remifentanyl; isoflurane; neuroinflammation

* This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (15ZR1404600).

临床上,由于各种疾病的影响,孕产妇和婴幼儿常常需要接受全身麻醉。常用的全麻药容易透过胎盘进入胎儿体内,由于胎儿或者婴幼儿的大脑发育不完善,麻醉药极易通过血脑屏障对发育大脑产生影响^[1]。目前,大量基础研究表明,全麻药无论是吸入麻醉药还是静脉麻醉药,均会损伤发育中的大脑,表现在多个脑区^[2-3]或同一脑区的不同类型细胞^[4],并且这种幼年时期由麻醉药所致的神经毒性会延续到成年,表现为学习记忆等行为的改变^[5-6]。2017年美国FDA发出警告,称反复或长时间暴露于麻醉药或镇痛药会损伤胎儿及3岁以下儿童的大脑发育^[7]。尽管目前还没有高质量的临床研究支持这一结论,但这一问题已引起广泛关注,改善麻醉药对发育大脑的影响也成为研究的热点。

神经炎症被认为是全麻药神经毒性机制之一。异氟醚可使细胞膜、线粒体膜及内质网上的钙通道发生改变,增加细胞内钙离子浓度。钙离子浓度的增加导致胞质内的NF- κ B活化,进入细胞核识别目的基因,促进炎症因子的进一步转录^[8-9]。适当的炎症反应对机体修复是有利的,过度的炎症反应就会对机体造成损伤。瑞芬太尼作为一种短效的阿片受体激动药,因其独特的药代动力学特性广泛应用于临床,近年来在婴幼儿中的应用也逐渐增多^[10]。有研究发现瑞芬太尼可改善由脂蛋白引起的中性粒细胞激活^[11],并且在肝损伤^[12]及肺缺血再灌注损伤^[13]等模型中发现有抑制外周炎症的作用。因此,我们用切口痛模型模拟临床手术操作,探究在创伤刺激条件下,瑞芬太尼能否改善新生大鼠多次异氟醚暴露引起的神经毒性。

材 料 和 方 法

实验动物及分组 孕16~18天的SD大鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司。12 h明暗循环,环境温度20~22℃,自由饮食,提供充足的食物和水。记录自然分娩的时间。将出生后第7天

(postnatal day 7, P7)的同一窝大鼠(12~16 g)随机分为4组:空白组(Sham组)吸入30%空氧混合气体;异氟醚组(Iso组)吸入1.8%异氟醚;异氟醚+切开组(Iso+I组)吸入1.8%异氟醚同时脚掌切开;异氟醚+切开+瑞芬太尼(中国宜昌人福药业公司,批号:6170904)组(Ref组)吸入1.8%异氟醚并皮下输注瑞芬太尼($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$),脚掌切开。所有的实验操作都遵守复旦大学实验动物伦理委员会的相关规定。每组6只用于Western blot和q-RT-PCR实验,4只用于免疫组化,10只用于被动回避实验。

麻醉与手术 除Sham组外,吸入麻醉均采用吸入1.8%异氟醚每天2 h连续3天的方法。碘酒消毒颈部皮肤后,将24号静脉套管针置于颈部皮下,并用敷贴固定。每只幼鼠所需瑞芬太尼的剂量根据 $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 计算。自麻醉开始以0.2 mL/h的速度持续泵入,直至麻醉结束。创伤模型采用Brennan切口痛模型^[14]。脚掌切开前先涂碘酒消毒,再涂丁卡因凝胶进行局麻,按切口痛模型操作。手术结束后用碘酒再次消毒,并涂抹丁卡因明胶。第1天切开左侧后脚掌,第2天切开右侧后脚掌,第3天将两侧缝合线拆除后,重新缝合。手术操作结束后,平均15 min用尖头镊子夹脚掌给予疼痛刺激。每次麻醉暴露结束后,待翻正反射恢复后再放回到母鼠身边。在每次麻醉之前测量幼鼠的体重,麻醉过程中观察皮肤黏膜颜色变化及监测呼吸频率。一部分幼鼠在第3天麻醉结束后6 h取海马组织用于Western blot和q-RT-PCR,灌注取脑用于免疫荧光。另一部分幼鼠麻醉结束后在母鼠的喂养下至第21天断奶,在第65天进行被动回避实验。

Western blot 检测 各组幼鼠在第3天麻醉结束后6 h取材。各组幼鼠直接断头在冰上迅速分离海马组织。将双侧海马组织放入清洁的EP管中,加入300 μL 4 mmol/L HEPS (40 mmol/L HEPS 5 mL + 5.48 g 葡萄糖 + 1片cocktail溶于50 mL蒸馏水中),冰浴上用匀浆器低速匀浆,至液体浑浊组织完全裂解;置于4℃离心机($1\,000\text{ g}\times 10\text{ min}$),取出上清

即为胞质蛋白,沉淀为膜蛋白;在沉淀里加入 150 μL 裂解液后超声震荡即可进行后续操作,或储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。用 BCA 法测量蛋白浓度。将计算好的样品与 $1\times$ 加样缓冲液混匀后,在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 金属浴中加热 5 min,然后放到冰上冷却。配制 12% 的分离胶及 5% 的浓缩胶,每孔加 30 μL 配制好的样品,浓缩胶的电压为 60 V,恒流,待溴酚蓝跑成一条直线将电压调至 100 V,直至到达距离玻璃板下缘 0.5 cm 处,关掉电源。在冰浴中,100 V 恒流电压 90 min 条件下转膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。将 PVDF 膜放入用含 1% 脱脂牛奶的 TBST 稀释的 NF- κB p65 抗体(美国 CST 公司,9 661 s, $1:1\ 000$)与 GAPDH 抗体(美国 Bioworld 公司, $1:1\ 000$), β -actin 抗体(美国 Abcam 公司, $1:1\ 000$)摇床室温 1 h,然后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。TBST 洗膜 4 次,每次 15 min。将 PVDF 膜放入含 1% 脱脂牛奶的 TBST 稀释的 HRP 偶联的二抗室温 1 h,洗膜后化学发光。用 Image J 1.50 软件进行分析条带。

q-RT-PCR 检测 将左侧的海马组织加入 0.5 mL Trizol 中,用电动匀浆器充分匀浆,然后再加入 0.5 mL Trizol,室温下充分裂解 5 min,使核蛋白完全解离;向 1 中 200 μL 三氯甲烷,剧烈震荡 1s,静置 3 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $10\ 000\times g$ 离心 15 min,取上清。加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,室温放置 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $10\ 000\times g$ 离心 10 min,除去上清液。加入 DEPC 配制的 75% 乙醇 1 mL,充分洗涤管壁和管盖,轻弹管底让沉淀悬浮起来; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $10\ 000\times g$ 离心 3 min,弃上清,超净台中晾干;加入 20 mL DEPC 溶解沉淀。对提取的 RNA 进行定量与定性分析,随后进行逆转录。

免疫荧光 腹腔注射水合氯醛 0.3 mL/kg 麻醉,固定四肢,暴露胸腔,将头皮针置入左心室,剪开右心耳,灌注生理盐水 50 mL 后继续灌注 4% 多聚甲醛 50 mL。取出大脑,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,再分别用 20% 及 30% 蔗糖溶液进行梯度脱水。用 OCT 包埋后置于横冷冰冻切片机内。做冠状切片 (30 μm)并收集在 24 孔板内,置于原位杂交保护液中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。清洗脑片:PBS 10 min \times 2 次,0.3% PBST 10 min \times 2 次;破胞膜:1% PBST 15 min,0.3% PBST 5 min \times 2 次;封闭:10% 羊血清封闭 1 h;一抗孵育:1% 羊血清与 IBA1 一抗(美国 Wako 公司, $1:2\ 000$)涡旋震荡混匀后室温孵育 1 h,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜;复温: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱 30 min,0.3% PBST

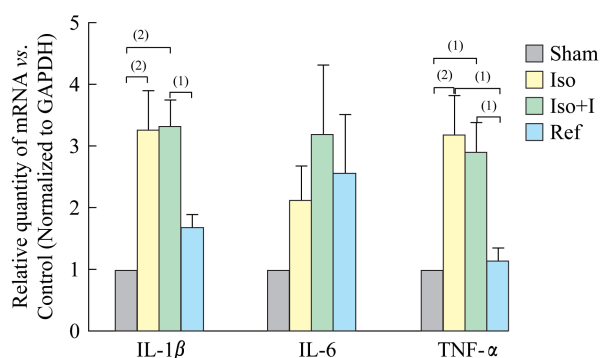
5 min \times 3 次;二抗孵育:1% 羊血清与二抗(美国 Sigma 公司, $1:1\ 000$)涡旋震荡混匀后室温避光孵育 1 h,0.3% PBST 5 min \times 3 次;贴片,封片后置于荧光显微镜下观察。

被动回避实验 被动回避实验是经典的检测学习与记忆的行为学测试,我们在大鼠出生后第 65 和 66 天进行被动回避实验。实验设备由明箱 (20.3 cm \times 15.9 cm \times 21.3 cm) 和暗箱 (20.3 cm \times 15.9 cm \times 21.3 cm) 构成,中间由自动门将明箱与暗箱分隔开。被动回避实验由两部分构成,一部分是电刺激训练阶段,另一部分是潜伏期测试阶段。训练阶段是将大鼠从明箱的一侧放入,10 s 后电动门自动打开,大鼠进入暗箱,自动门 1 min 后关闭,给予大鼠 0.5 mA 电刺激 3 s,3 min 后取出大鼠。第 2 天进行潜伏期测试,记录大鼠由明箱进入暗箱的时间。如果大鼠 3 min 后未进入暗箱,记作“无反应”。每只大鼠测试完毕后,清理排泄物并用酒精擦拭,避免气味对后续大鼠造成影响。

统计学分析 新生大鼠大脑 IBA1 计数:同一大脑的海马取 4 个连续切面。用 20 倍镜观察海马 CA1、CA3 和 DG 区 IBA1 阳性细胞,并采用相同曝光强度,同一区域采用相同位置进行观察,Image J 1.50 软件计数定量分析。Western blot 用 Image J 1.50 软件作定量分析。所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 SPSS 20.0.0 软件和 GraphPad Prism 5.01 进行统计学分析。组间比较先行正态性检验和方差齐性检验,再用 One-way ANOVA 统计方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

海马内炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 的相对表达量变化 与 Sham 组相比,Iso 组与 Iso + I 组 IL-1 β 与 TNF- α 的 mRNA 显著增加,但两组间差异无统计学意义 (IL-1 β : 3.27 ± 0.63 vs. 3.32 ± 0.32 , $P = 1.00$; TNF- α : 3.18 ± 0.64 vs. 2.90 ± 0.48 , $P = 1.00$),IL-6 在各组间表达无明显变化 (Sham vs. Iso: 1.00 ± 0.00 vs. 2.11 ± 0.56 , $P = 1.00$; Sham vs. Iso + I: 1.00 ± 0.00 vs. 3.20 ± 1.15 , $P = 0.367$)。然而,瑞芬太尼显著下调 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 水平 (IL-1 β : 1.68 ± 0.21 vs. 3.32 ± 0.42 , $P = 0.047$; TNF- α : 1.15 ± 0.20 vs. 2.90 ± 0.48 , $P = 0.043$),详见图 1。

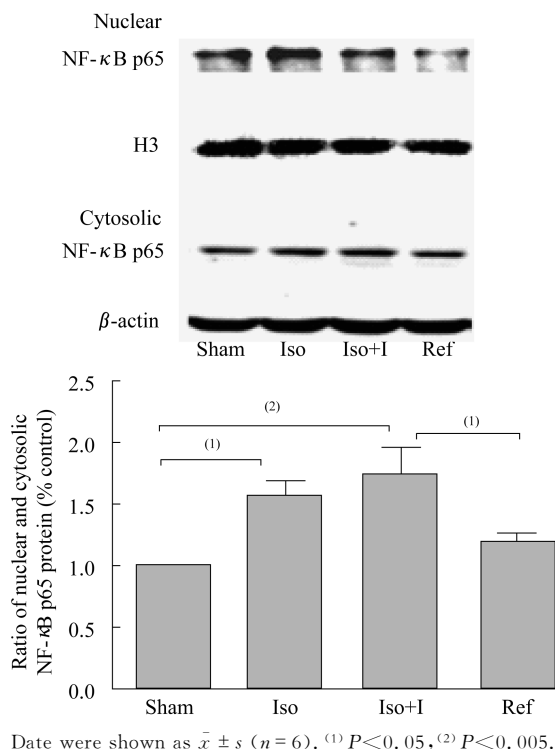


Sham: Inhaled 30% oxygen and air mixture; Iso: Inhaled 1.8% isoflurane; Iso + I: Inhaled 1.8% isoflurane with plantar incision; Ref: Inhaled 1.8% isoflurane and subcutaneously pump remifentanyl ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) with plantar incision. Data were shown as $\bar{x} \pm s$ ($n = 6$). ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.005$.

图1 海马炎症因子的mRNA相对表达量
Fig 1 mRNA relative expression of hippocampal inflammatory cytokines

海马内 NF-κB p65 蛋白入核比例变化

Western blot 结果显示(图2), Iso + I 组海马内胞核和胞质的 NF-κB p65 比值较 Sham 组明显升高 (1.00 ± 0.00 vs. 1.75 ± 0.21 , $P = 0.003$), 说明 NF-κB p65 入核较多。瑞芬太尼能下调 NF-κB p65 入核量 (1.75 ± 0.21 vs. 1.19 ± 0.07 , $P = 0.039$)。



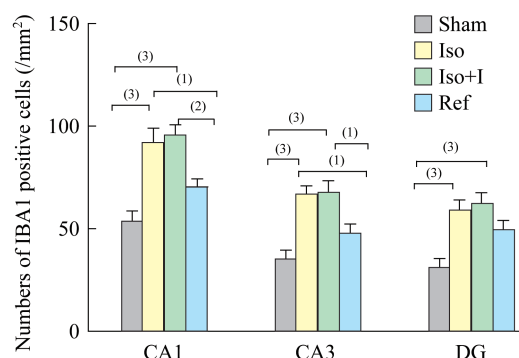
Date were shown as $\bar{x} \pm s$ ($n = 6$). ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.005$.

图2 NF-κB p65 蛋白入核比例变化

Fig 2 Ratio of nuclear and cytosolic NF-κB p65 protein

海马 CA1、CA3 和 DG 区 IBA1 阳性细胞数变化

在海马 CA1、CA3 和 DG 区, Iso + I 组较 Sham 组出现较多的 IBA1 阳性细胞 (CA1: 54.73 ± 4.79 vs. 95.64 ± 5.02 , $P < 0.005$; CA3: 36.20 ± 4.25 vs. 67.91 ± 5.51 , $P < 0.001$; DG: 32.00 ± 4.26 vs. 62.55 ± 5.04 , $P < 0.001$)。Iso + I 组与 Ref 组相比, 瑞芬太尼在 CA1 和 CA3 显著减少由异氟醚所致的 IBA1 数量的增加 (CA1: 95.64 ± 5.02 vs. 70.49 ± 3.84 , $P = 0.008$; CA3: 67.91 ± 5.51 vs. 47.99 ± 4.29 , $P = 0.019$), 而在 DG 区两组之间差异无统计学意义(图3)。



Date were shown as $\bar{x} \pm s$ ($n = 4$). ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.005$, ⁽³⁾ $P < 0.001$.

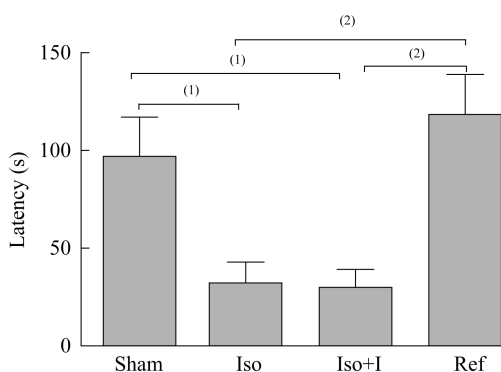
图3 海马 CA1、CA3 和 DG 区 IBA1 阳性细胞数变化

Fig 3 Change of IBA1 positive cells number in hippocampal CA1, CA3 and DG area

被动回避实验 与 Sham 组相比, Iso + I 组潜伏期(s)明显缩短 (96.50 ± 20.24 vs. 30.22 ± 8.97 , $P = 0.03$)。在创伤条件下, 与 Ref 组相比, Iso + I 组瑞芬太尼能改善异氟醚所致的潜伏期(s)缩短 (118.18 ± 20.74 vs. 30.22 ± 8.97 , $P = 0.03$)。Iso 组与 Iso + I 组之间潜伏期(s)差异无统计学意义 (31.93 ± 11.00 vs. 30.22 ± 8.97 , $P = 1.00$), 详见图4。

讨论

在体外实验中, 瑞芬太尼被发现可以通过阿片受体和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体对发育中的大脑发挥抗凋亡的作用^[15], 在我们之前的实验中也发现瑞芬太尼对新生鼠暴露 4 h 的异氟醚产生的神经毒性有抗凋亡的作用^[16]。但瑞芬太尼改善异氟醚所致神经毒性的机制仍不明确。



Latency: The time of from the bright box into the dark box.
Data were shown as $\bar{x} \pm s$ ($n = 10$). ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.005$.

图4 被动回避实验的潜伏期变化

Fig 4 Latency of passive avoidance test

出生7天的大鼠相当于人类的2~3岁,此阶段又称“脑发育关键期”。在成熟大脑中,麻醉药与镇痛药被认为是具有抗炎作用^[17],而对发育中的大脑可能产生促炎作用^[18]。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)受体在发育期被激活后产生神经兴奋作用,到成年后转变为抑制状态,由此可能导致从促炎状态转变为抑炎状态^[19]。还有研究发现神经元的凋亡释放炎症因子,这些炎症因子激活小胶质细胞,促使小胶质细胞进一步分泌炎症因子,这种恶性循环促使产生炎症瀑布反应^[20]。我们的研究中发现多次暴露异氟醚可造成新生大鼠大脑神经炎症反应,表现为海马炎症因子的mRNA及蛋白表达水平增加,小胶质细胞活化,并且这种神经损伤引起的后果会持续到成年,瑞芬太尼复合异氟醚应用后能改善异氟醚所致的神经炎症与学习记忆障碍。

与以往基础实验不同的是,我们选择了切口痛模型模拟临床的手术刺激,切口痛模型被认为是向临床转化的一个较为合理的模型^[21]。手术本身可能会引起炎症反应^[22]。Shu等^[23]发现P7大鼠暴露于70%一氧化氮与0.75%的异氟醚6h后,切口痛刺激都会导致皮层和脊髓神经元凋亡及炎症因子表达增加,并通过条件恐惧实验发现影响了成年后的认知功能。但我们的实验中单纯异氟醚组与异氟醚加手术组相比,海马炎症因子与小胶质细胞数量变化在两组中并无差异,说明神经炎症和学习记忆损害更可能是暴露异氟醚而非手术刺激引起,而瑞芬太尼改善的是异氟醚引起的神经炎症反应,与切口痛关系可能并不大或者我们选择的这个切口痛模型不足以引起明显的中枢炎症。另外,我们在切开脚

掌前用丁卡因明胶作表面麻醉,这也会减轻疼痛刺激从而可能会减轻或抑制切口痛的炎症反应。

小胶质细胞/巨噬细胞特异性蛋白抗体IBA1在巨噬细胞和小胶质细胞中表达,并在这些细胞的活化过程中表达升高。在正常情况下,小胶质细胞处于一种“静息”状态,当被某些病理或者生理条件激活后,在形态及数量上会发生明显变化。活化后的小胶质细胞会产生大量的炎症介质及细胞因子,而这些炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 被认为参与了中枢炎症反应。当一些外界因素如感染、病毒等入侵时可通过多种信号途径激活NF- κ B p65通路,活化的NF- κ B转入到核内与相关的DNA基序结合诱导靶基因的转录,进而促进炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等的释放。施庆余^[24]发现新生大鼠暴露于1.5%异氟醚2h后,海马IL-1 β 和TNF- α 的mRNA表达上调,分别在麻醉4h和6h时达峰值,并在麻醉停止12h和24h后恢复至正常水平;暴露于1.5%异氟醚4~6h时,海马IL-6的mRNA表达上调,在麻醉停止后恢复至正常水平。在我们的实验中,麻醉结束后6h,海马内炎症因子IL-1 β 与TNF- α mRNA的表达显著增加,但IL-6mRNA的表达在各组中没有变化,可能与炎症因子在脑损伤后表达出现的峰值时间有关。

本实验不足之处在于,新生鼠太小而无法进行插管,也无法记录生命体征相关指标,但我们通过观察麻醉过程中皮肤黏膜颜色变化及呼吸频率的变化,判断有无呼吸抑制现象。我们发现1.8%的异氟醚及瑞芬太尼无论是单独使用还是联合使用均不会造成明显呼吸抑制。

综上所述,在创伤刺激条件,瑞芬太尼改善异氟醚多次暴露所致新生鼠海马神经炎症可能通过NF- κ B p65通路发挥作用。

参 考 文 献

- [1] HE H, WANG Y, LE Y, *et al.* Surgery upregulates high mobility group box-1 and disrupts the blood-brain barrier causing cognitive dysfunction in aged rat [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012(18):994-1002.
- [2] ISTAPHANOUS GK, WARD CG, NAN X, *et al.* Characterization and quantification of isoflurane-induced developmental apoptotic cell death in mouse cerebral cortex[J]. *Anesth Analg*, 2013, 116(4):845-854.
- [3] BROAD KD, HASSELL J, FLEISS B, *et al.* Isoflurane exposure induces cell death, microglial activation and

- modifies the expression of genes supporting neurodevelopment and cognitive function in the male newborn piglet brain [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (11): e166784.
- [4] ZHAO YL, XIANG Q, SHI QY, *et al.* GABAergic excitotoxicity injury of the immature hippocampal pyramidal neurons' exposure to isoflurane [J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(5): 1152 - 1160.
- [5] SHEN X, DONG Y, XU Z, *et al.* Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment [J]. *Anesthesiology*, 2013, 118 (3): 502 - 515.
- [6] YI X, CAI Y, LI W. Isoflurane damages the developing brain of mice and induces subsequent learning and memory deficits through FASL-FAS signaling [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1 - 10.
- [7] ANDROPOULOS DB, GREENE MF. Anesthesia and developing brains-implications of the FDA warning [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(10): 905 - 907.
- [8] ZHANG Y, WEI G, Di Z, *et al.* miR-339-5p inhibits alcohol-induced brain inflammation through regulating NF-kappaB pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3): 450 - 456.
- [9] 张旭东,任鹏程,高昌俊,等.异氟醚麻醉诱导大鼠脑海马神经炎症并激活 Toll 样受体 2 通路 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2016, 37(1): 37 - 42.
- [10] KAMATA M, TOBIAS JD. Remifentanyl: applications in neonates [J]. *J Anesth*, 2016, 30(3): 449 - 460.
- [11] HYEJIN J, MEI L, SEONGHEON L, *et al.* Remifentanyl attenuates human neutrophils activation induced by lipopolysaccharide [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(2): 264 - 271.
- [12] ZHANG Y, DU Z, ZHOU Q, *et al.* Remifentanyl attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by downregulating the NF-kB signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1654 - 1660.
- [13] ZHAO G, SHEN X, NAN H, *et al.* Remifentanyl protects liver against ischemia/reperfusion injury through activation of anti-apoptotic pathways [J]. *J Surg Res*, 2013, 183(2): 827 - 834.
- [14] BRENNAN TJ, VANDERMEULEN EP, GEBHART GF. Characterization of a rat model of incisional pain [J]. *Pain*, 1996, 64(3): 493 - 501.
- [15] TOUREL F, DE LENDEU PK, ABILY-DONVAL L, *et al.* The antiapoptotic effect of remifentanyl on the immature mouse brain [J]. *Anesth Analg*, 2014, 118(5): 1041 - 1051.
- [16] PAN B, HUANG S, SUN S, *et al.* The neuroprotective effects of remifentanyl on isoflurane-induced apoptosis in the neonatal rat brain [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(10): 4521 - 4533.
- [17] SANDERS RD, HUSSELL T, MAZE M. Sedation & immunomodulation [J]. *Anesthesiol Clin*, 2011, 29(4): 687 - 706.
- [18] PESIC V, MILANOVIC D, TANIC N, *et al.* Potential mechanism of cell death in the developing rat brain induced by propofol anesthesia [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27(3): 279 - 287.
- [19] SANDERS RD, GODLEE A, FUJIMORI T, *et al.* Benzodiazepine augmented gamma-amino-butyric acid signaling increases mortality from pneumonia in mice [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(7): 1627 - 1636.
- [20] ZHANG L, ZHANG J, YANG L, *et al.* Isoflurane and sevoflurane increase interleukin-6 levels through the nuclear factor-kappa B pathway in neuroglioma cells [J]. *Br J Anaesth*, 2013, 110(suppl 1): i82 - i91.
- [21] BRENNAN TJ, ZAHN PK, POGATZKI-ZAHN EM. Mechanisms of incisional pain [J]. *Anesthesiol Clin North America*, 2005, 23(1): 1 - 20.
- [22] SANDERS RD, HASSELL J, DAVIDSON AJ, *et al.* Impact of anaesthetics and surgery on neurodevelopment: an update [J]. *Br J Anaesth*, 2013, 110(suppl 1): i53 - i72.
- [23] SHU Y, ZHOU Z, WAN Y, *et al.* Nociceptive stimuli enhance anesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(2): 743 - 750.
- [24] 施庆余. 异氟烷诱导的发育期大鼠大脑神经毒性及米诺环素的保护作用 [D]. 华中科技大学, 2011: 1 - 90.

(收稿日期: 2018 - 03 - 30; 编辑: 王蔚)