

本文引用: 李佳, 王建伟, 王萌, 等. γ -氨基丁酸 A 型受体在七氟醚致新生大鼠远期认知功能障碍中的作用[J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(6): 522-526. DOI: 10.7683/xyxyxb.2020.06.004.

【基础研究】

γ -氨基丁酸 A 型受体在七氟醚致新生大鼠远期认知功能障碍中的作用

李 佳¹, 王建伟¹, 王 萌¹, 任柏林¹, 李长生¹, 卢锡华¹, 缪长虹²

(1. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南省肿瘤医院麻醉科, 河南 郑州 450008; 2. 复旦大学附属中山医院麻醉科, 上海 200032)

摘要: **目的** 探讨 γ -氨基丁酸 A 型受体(GABA_AR)在七氟醚致新生大鼠远期认知功能障碍中的作用。**方法** 将 36 只 6 日龄雄性 Sprague Dawley 大鼠随机分为对照组、七氟醚组和荷包牡丹碱组, 每组 12 只。对照组大鼠吸入体积分数 30% O₂ 6 h, 七氟醚组和荷包牡丹碱组大鼠吸入体积分数 2.1% 七氟醚和 30% O₂ 6 h, 荷包牡丹碱组大鼠在七氟醚吸入前 30 min 腹腔注射荷包牡丹碱 0.5 mg · kg⁻¹。3 组大鼠干预后 8 周进行水迷宫实验, 水迷宫实验后 1 周处死大鼠取脑组织, 采用高尔基染色法观察大鼠海马锥体神经元树突棘密度, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测大鼠海马组织中脑源性神经营养因子(BDNF) mRNA 表达, Western blot 法检测大鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达。**结果** 水迷宫实验显示, 第 1~3 天 3 组大鼠逃避潜伏期比较差异无统计学意义($P>0.05$); 第 4~5 天, 七氟醚组大鼠逃避潜伏期长于对照组, 荷包牡丹碱组大鼠逃避潜伏期短于七氟醚组($P<0.05$); 七氟醚组大鼠目标象限停留时间短于对照组, 荷包牡丹碱组大鼠目标象限停留时间长于七氟醚组($P<0.05$)。七氟醚组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 和蛋白的相对表达量低于对照组($P<0.05$), 荷包牡丹碱组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 和蛋白的相对表达量高于七氟醚组($P<0.05$)。对照组、七氟醚组和荷包牡丹碱组大鼠海马锥体神经元树突棘密度分别为 35.10 ± 4.57 、 26.90 ± 6.26 、 32.40 ± 4.92 ; 七氟醚组大鼠海马锥体神经元树突棘密度小于对照组($P<0.05$), 荷包牡丹碱组大鼠海马锥体神经元树突棘密度大于七氟醚组($P<0.05$)。**结论** 七氟醚可导致新生大鼠远期认知功能障碍, GABA_AR 竞争性拮抗剂荷包牡丹碱可明显改善大鼠远期认知功能障碍, 其机制可能与上调海马组织内 BDNF 表达及增强海马突触可塑性有关。

关键词: 七氟醚; γ -氨基丁酸 A 型受体; 新生大鼠; 认知功能障碍; 学习记忆功能; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R971 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)06-0522-05

Role of gamma-aminobutyric acid type A receptor in the long-term cognitive dysfunction of neonatal rats induced by sevoflurane

LI Jia¹, WANG Jianwei¹, WANG Meng¹, REN Bolin¹, LI Changsheng¹, LU Xihua¹, MIAO Changhong²

(1. Department of Anesthesiology, the Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, Henan Province, China; 2. Department of Anesthesiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of gamma-aminobutyric acid type A receptor(GABA_AR) in the long-term cognitive dysfunction of neonatal rats induced by sevoflurane. **Methods** Thirty-six six days old male Sprague Dawley rats were randomly divided into control group, sevoflurane group and bicuculline group, with twelve rats in each group. The rats in the control group inhaled 30% O₂ for 6 hours, and the rats in the sevoflurane group and bicuculline group inhaled 2.1% sevoflurane and 30% O₂ for 6 hours. The rats in the bicuculline group were treated with bicuculline 0.5 mg · kg⁻¹ by intraperitoneal injection at 30 minutes before sevoflurane inhalation. The rats in the three groups were tested by water maze after 8 weeks. One week after the water maze test, the rats were sacrificed to take brain tissues. The dendrite spine density of hippocampal pyramidal neuron was observed by Golgi staining, the expression of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) mRNA in hippocampus was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, and the expression of BDNF protein in hippocampus was detected by Western blot. **Results** Water maze test showed that there was no significant difference in escape latency of rats among the three groups on the 1st to 3rd day ($P>0.05$). On the 4th and 5th day, the escape latency of rats in the sevoflurane group was longer than that in the control group, and the escape latency of rats in the bicuculline group was shorter than that in the sevoflurane group ($P<0.05$). The target quadrant retention time of rats in the sevoflurane group was shorter than that in

DOI: 10.7683/xyxyxb.2020.06.004

收稿日期: 2019-09-23

作者简介: 李 佳(1982-), 女, 河南安阳人, 硕士, 主治医师, 研究方向: 全身麻醉药对小儿神经毒性作用机制。

the control group, and the target quadrant retention time of rats in the bicuculline group was longer than that in the sevoflurane group ($P < 0.05$). The relative expression of BDNF mRNA and protein in hippocampus of rats in the sevoflurane group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The relative expression of BDNF mRNA and protein in hippocampus of rats in the bicuculline group was higher than that in the sevoflurane group ($P < 0.05$). The dendrite spine density of hippocampal pyramidal neuron of rats in the control group, sevoflurane group and bicuculline group was 35.10 ± 4.57 , 26.90 ± 6.26 and 32.40 ± 4.92 , respectively. The dendrite spine density of hippocampal pyramidal neuron of rats in the sevoflurane group was less than that in the control group ($P < 0.05$). The dendrite spine density of hippocampal pyramidal neuron of rats in the bicuculline group was higher than that in the sevoflurane group ($P < 0.05$). **Conclusion** Sevoflurane can lead to long-term cognitive dysfunction of neonatal rats, the GABA_AR competitive antagonist bicuculline can significantly improve the long-term cognitive dysfunction of rats, the mechanism may be related to the up-regulation of BDNF expression and the enhancement of synaptic plasticity in hippocampus.

Key words: sevoflurane; gamma-aminobutyric acid type A receptor; neonatal rats; cognitive dysfunction; learning and function; brain-derived neurotrophic factor

儿童因手术或疾病诊断常需接受全身麻醉,研究表明,全身麻醉会导致儿童远期认知功能障碍,但其机制尚不清楚^[14]。七氟醚是儿童最常用的全身麻醉药,其主要通过激动 γ-氨基丁酸 A 型受体 (gamma-aminobutyric acid type A receptor, GABA_AR) 发挥作用^[5]。研究表明,未成熟的神经元内氯离子浓度较高, GABA_AR 的激动会引起神经元兴奋,促进神经元的增殖、迁移、成熟和分化等^[6]。本研究通过观察 GABA_AR 竞争性拮抗剂荷包牡丹碱^[7]对七氟醚麻醉新生大鼠远期认知功能及海马组织内脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 表达和突触可塑性的影响,探讨 GABA_AR 在七氟醚致发育期大脑神经毒性中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 日龄健康雄性 Sprague Dawley 大鼠 36 只,体质量 10 ~ 14 g,购自郑州大学实验动物中心,按照实验动物中心所制定的环境条件标准,对实验动物进行饲养,动物饲养房温度 25 ~ 28 ℃,室内相对湿度 40% ~ 55%,自然光线光照 12 h、黑暗 12 h 交替,保持室内安静和空气流通,整个实验期间动物可以自由饮用自来水、自由摄食标准鼠类颗粒饲料,每周更换垫料 2 次。

1.2 主要试剂与仪器 七氟醚购自上海恒瑞医药有限公司 (国药准字 H20070172), GABA_AR 竞争性拮抗剂荷包牡丹碱购自美国 Sigma-Aldrich 公司,高尔基染色试剂盒购自美国 FD Neuro Technologies 公司, RNeasy Plus Kit 试剂盒购自德国 Qiagen 公司, iScript cDNA 合成试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司,

DRR081S 荧光定量试剂盒和荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, BDNF (ab108319)、Tublin (ab18207) 一抗和羊抗兔二抗 (ab205718) 购自美国 Abcam 公司;水迷宫图像自动监视系统、ANY-maze 动物行为分析软件购自上海欣软信息科技有限公司, Leica CM1860 冰冻切片机购自德国 Leica 公司, Vamos 麻醉气体监测仪购自中国德尔格医疗设备上海有限公司, Eclipse E400 显微镜购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及处理 将 36 只新生大鼠采用随机数字表法分为对照组、七氟醚组和荷包牡丹碱组,每组 12 只。七氟醚组、荷包牡丹碱组大鼠置于透明半封闭呼吸环路麻醉箱中,吸入体积分数 2.1% 七氟醚、30% O₂ 6 h,麻醉箱中气体浓度由麻醉气体监护仪连续监测,待大鼠翻正反射恢复后放回鼠笼中正常饲养。对照组大鼠吸入体积分数 30% O₂ 6 h。荷包牡丹碱组大鼠在七氟醚麻醉前 30 min 腹腔注射荷包牡丹碱 0.5 mg · kg⁻¹;七氟醚组和荷包牡丹碱组大鼠于麻醉开始后 3 h 皮下注射生理盐水 10 mL · kg⁻¹,防止脱水。

1.3.2 水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力 各组大鼠 8 周后进行 Morris 水迷宫实验,检测其学习记忆能力。水迷宫实验分为训练阶段和测试阶段,第 1 ~ 5 天进行定位航行实验,第 6 天进行空间探索实验。水迷宫实验设备由一直径为 120 cm、高 60 cm 的圆形不锈钢水池组成,水池被划分为相等的 4 个象限,各种远程视觉参考物定位在房间内的固定位

置,作为大鼠寻找平台的空间线索。将直径 12 cm 的平台置于一个象限,没于水面以下 2 cm,该象限为目标象限。开始定位航行实验之前,动物被安置在固定平台上 10 s 熟悉环境;在定位航行实验中,每日上午 9:00 至 11:00 训练大鼠 4 次,从 4 个象限取入水点,将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠的逃逸潜伏期,即大鼠在 60 s 内寻找到平台的时间(找到平台后并在上面停留 5 s 以上者视为找到平台);若大鼠在 60 s 内未能找到平台,将其引导至平台并停留 15 s,之后进行下一次训练;连续 5 d 训练以后,取每日 4 次(每个象限 1 次,共 4 次)测定结果的均值,记录各组大鼠的逃逸潜伏期;第 6 天撤除平台,取目标象限的对侧象限中点作为入水点,将大鼠面对池壁放入水中,进行空间探索实验,记录大鼠 60 s 内在目标象限停留的时间;使用 ANY-maze 动物行为分析软件分析实验结果。

1.3.3 高尔基染色检测海马椎体神经元树突棘密度 水迷宫实验后 1 周,大鼠腹腔注射戊巴比妥钠($60\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行麻醉,快速断头取脑组织,双蒸水清洗脑组织,将脑组织浸泡在提前配好的混合液(高尔基染色试剂盒中 A、B 液等量混合,提前 24 h 配置)中,24 h 后更换 A、B 混合液;室温避光浸泡 3 周后将脑组织转移至 C 溶液,4℃ 避光浸泡 1 周,24 h 后换液,滤纸吸干脑组织表面液体后行包埋剂包埋,使用冰冻切片机行冠状切片(厚 $120\text{ }\mu\text{m}$),并将脑组织切片转移至防脱载玻片,避光晾干;双蒸水清洗脑片 2 次,每次 2 min;将脑片于 D、E 液和双蒸水混合液(1:1:2)中浸泡 10 min,然后双蒸水清洗脑片 2 次,每次 4 min;体积分数 50%、75%、95%、100% 乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下(100 倍)盲法观察海马 CA1 区并照相,每张切片选取 5 个神经元,选取 $40\text{ }\mu\text{m}$ 远端树突,应用 Image J 软件分析其树突棘密度,结果以每 $30\text{ }\mu\text{m}$ 树突上树突棘数目表示。选取的神经元需符合以下条件:(1)染色清晰充分;(2)胞体成锥形;(3)单轴突,有较大的顶树突和数量较多的基树突,树突棘明显。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测大鼠海马组织中 BDNF mRNA 水平 取液氮冷存的大鼠海马组织 100 mg 迅速移至液氮预冷的研钵中,将组织破碎后采用 RNeasy Plus Kit 提取总 RNA, iScript cDNA 合成试剂盒反转录为 cDNA。以磷酸甘油醛脱氢酶

(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因作为内参基因,大鼠 BDNF 基因引物由美国 Invitrogen 公司合成。BDNF 上游引物序列为 5'-CACACAGCGCTCCTTA-3',下游引物序列为 5'-AGTGGTGGTCTGAGGTTGG-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物序列为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。取反转录获得的 cDNA,采用 DRR081S 嵌合荧光实时 PCR 试剂盒进行荧光定量 PCR,在 PCR 反应过程中设定无 cDNA 样品的空白管作为阴性对照。PCR 循环参数:95℃ 预变性 120 s;95℃ 变性 20 s,57℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 60 s,共 40 个循环。总反应体系 $25\text{ }\mu\text{L}$:SYBR Green $12.5\text{ }\mu\text{L}$,cDNA 模版液 $2\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游引物 $1\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下游引物 $1\text{ }\mu\text{L}$,去离子双蒸水 $8.5\text{ }\mu\text{L}$ 。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法获取 BDNF mRNA 相对表达量。

1.3.5 Western blot 法检测大鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达 将海马组织按 $10\text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 加入预冷的组织裂解液,超声破碎匀浆,采用二喹啉甲酸法进行蛋白定量;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏氟乙烯膜,体积分数 3% 胎牛血清封闭 2 h,加 BDNF 和 Tublin 一抗,4℃ 孵育过夜,次日摇床漂洗 3 次,每次 5 min;加入二抗,室温下孵育 1 h 后进行漂洗及显影,EPSON 扫描仪扫描条带,采用图像分析系统进行分析。以目的蛋白与内参 Tublin 灰度值的比值表示 BDNF 蛋白的相对表达量。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析和重复测量方差分析,两两比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

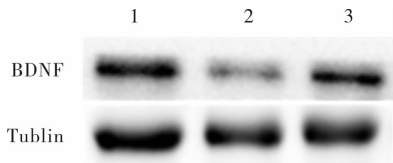
2.1 3 组大鼠逃避潜伏期和目標象限停留时间比较 结果见表 1。水迷宫实验显示,第 1~3 天 3 组大鼠逃避潜伏期比较差异无统计学意义($P > 0.05$);第 4~5 天七氟醚组大鼠逃避潜伏期长于对照组,荷包牡丹碱组大鼠逃避潜伏期短于七氟醚组,差异有统计学意义($P < 0.05$);七氟醚组大鼠目标象限停留时间短于对照组,荷包牡丹碱组大鼠目标象限停留时间长于七氟醚组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 3 组大鼠逃避潜伏期和目標象限停留时间比较

Tab.1 Comparison of escape latency and target quadrant retention time of rats among the three groups							
($\bar{x} \pm s$)							
组别	<i>n</i>	潜伏期/s					目标象限停留时间/s
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
对照组	12	43.72 ± 5.41	33.86 ± 5.89	26.21 ± 5.21	20.22 ± 5.95	18.58 ± 5.21	32.51 ± 4.88
七氟醚组	12	43.54 ± 8.30	40.14 ± 5.67	31.85 ± 7.07	30.29 ± 9.25 ^a	29.64 ± 7.52 ^a	19.39 ± 3.01 ^a
荷包牡丹碱组	12	46.69 ± 8.15	37.87 ± 6.07	28.49 ± 6.90	22.63 ± 4.23 ^b	18.28 ± 3.85 ^b	27.43 ± 5.12 ^b
<i>F</i>		0.689	3.507	2.326	7.165	15.316	26.660
<i>P</i>		0.509	0.052	0.114	0.003	0.000	0.000

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与七氟醚组比较^b*P* < 0.05。

2.2 3 组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 及蛋白表达比较 结果见图 1 和表 2。七氟醚组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 和蛋白的相对表达量低于对照组,差异有统计学意义(*q* = 4.840、11.656, *P* < 0.05);荷包牡丹碱组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 和蛋白的相对表达量高于七氟醚组,差异有统计学意义(*q* = 4.506、8.081, *P* < 0.05)。



1:对照组;2:七氟醚组;3:荷包牡丹碱组。

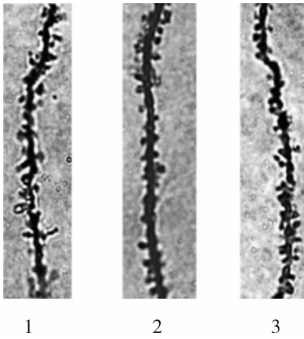
图 1 3 组大鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达 (Western blot)
Fig.1 Expression of BDNF protein in hippocampus of rats in the three groups (Western blot)

表 2 3 组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 及蛋白相对表达量比较

Tab.2 Comparison of the relative expression of BDNF mRNA and protein in hippocampus tissues of rats among the three groups			
($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	BDNF mRNA	BDNF 蛋白
对照组	6	1.00 ± 0.24	0.84 ± 0.07
七氟醚组	6	0.65 ± 0.14 ^a	0.39 ± 0.05 ^a
荷包牡丹碱组	6	0.98 ± 0.14 ^b	0.70 ± 0.14 ^b
<i>F</i>		7.310	35.661
<i>P</i>		0.006	0.000

注:与对照组比较^a*P* < 0.05;与七氟醚组比较^b*P* < 0.05。

2.3 3 组大鼠海马锥体神经元树突棘密度比较 结果见图 2。对照组、七氟醚组和荷包牡丹碱组大鼠海马锥体神经元树突棘密度分别为 35.10 ± 4.57、26.90 ± 6.26、32.40 ± 4.92;七氟醚组大鼠海马锥体神经元树突棘密度小于对照组,差异有统计学意义(*q* = 8.107, *P* < 0.05);荷包牡丹碱组大鼠海马锥体神经元树突棘密度大于七氟醚组,差异有统计学意义(*q* = 5.416, *P* < 0.05)。



1:对照组;2:七氟醚组;3:荷包牡丹碱组。

图 2 3 组大鼠海马锥体神经元树突棘
Fig.2 Spine density of hippocampal pyramid neuron of rats in the three groups

3 讨论

七氟醚是新型吸入型麻醉药,具有麻醉诱导快、血/气分配系数低、血流动力学稳定、呼吸道刺激小、患者苏醒快等优点,是目前比较理想的全身麻醉药物,被广泛应用于小儿手术^[8]。研究显示,2~3 岁前接受全身麻醉手术的婴幼儿更易出现记忆和语言行为障碍,且麻醉暴露次数、暴露时长和暴露剂量与认知功能障碍发生的风险直接相关^[1-2]。动物实验也证实,麻醉药物可引发幼年动物神经毒性作用,导致神经元凋亡和突触可塑性损伤,并影响其远期认知功能,但具体机制尚不明确^[3-4]。4~6 日龄新生大鼠相当于人类 1~3 岁幼儿,1~3 岁是人类大脑发育的窗口期,是神经元链接形成网络化的关键时期^[9]。研究显示,与出生后 14~16 d 大鼠相比,在大鼠出生后 3~5 d GABA_AR 激动剂更易诱发神经内分泌反应和焦虑抑郁样行为^[10]。因此,本研究选择 6 日龄大鼠为研究对象,探讨七氟醚对新生大鼠远期神经行为学的影响及其可能机制。

七氟烷主要是通过活化 GABA_AR 来发挥作用,而 γ-氨基丁酸是脑组织内最重要的抑制性神经递质之一。GABA_AR 广泛分布于大脑皮层、海马和丘脑等脑区。在未成熟神经元中, GABA_AR 激动会产生去

极化作用,促进神经元的增殖、迁移、成熟和分化等^[6,11]。随着神经元的发育成熟,GABA_AR 激动由兴奋性向抑制性转换。在啮齿类动物中,该转换在出生后 2 周内完成^[11]。研究显示,在新生儿期,麻醉和各种应激因素均可引起 GABA_AR 过度激动,使兴奋-抑制神经环路紊乱,进而导致神经发育障碍性疾病的发生^[12-13]。本研究结果显示,水迷宫实验第 4~5 天,七氟醚组大鼠逃避潜伏期长于对照组,荷包牡丹碱组大鼠逃避潜伏期短于七氟醚组;七氟醚组大鼠目标象限停留时间短于对照组,荷包牡丹碱组大鼠目标象限停留时间长于七氟醚组;说明七氟醚全身麻醉可导致新生大鼠远期认知功能受损,GABA_AR 抑制剂荷包牡丹碱可明显改善七氟醚所致的大鼠远期认知功能受损,提示七氟醚引起的认知功能损伤可能与 GABA_AR 兴奋性有关。

树突棘是树突分支上由神经元胞膜形成的棘状小突起,可隔离和放大突触接收的电信号,其数量和形态的改变直接影响突触传递效率即突触可塑性,因而其与学习记忆密切相关^[14-15]。BDNF 是中枢神经系统中广泛存在的一类参与神经元发育、分化和存活的营养因子,通过作用于酪氨酸激酶受体 B 而调节树突棘的生长^[16]。本研究结果显示,七氟醚组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 和蛋白的相对表达量低于对照组,七氟醚组大鼠海马锥体神经元树突棘密度小于对照组,说明七氟醚暴露可使大鼠海马组织中 BDNF 表达降低,锥体神经元树突棘密度减少,推测七氟醚可能使 GABA_AR 过度兴奋,BDNF 表达下调,进而影响神经元的突触可塑性,导致大鼠学习记忆功能受损。荷包牡丹碱组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 和蛋白的相对表达量高于七氟醚组,荷包牡丹碱组大鼠海马锥体神经元树突棘密度大于七氟醚组,说明 GABA_AR 拮抗剂荷包牡丹碱可改善七氟醚所致大鼠远期学习记忆功能损伤。

综上所述,七氟醚可致新生大鼠远期学习记忆功能障碍,GABA_AR 竞争性拮抗剂荷包牡丹碱可明显改善七氟醚所致的新生大鼠远期认知功能障碍,其机制可能与上调海马组织内 BDNF 表达及增强海马突触可塑性有关;GABA_AR 可能参与了七氟醚所致新生大鼠远期学习记忆损伤的过程,这为七氟醚神经发育毒性的预防提供一定的理论基础。

参考文献:

[1] GRAHAM M R,BROWNELL M,CHATEAU D G,*et al.* Neurodevelopmental assessment in kindergarten in children exposed to general

anesthesia before the age of 4 years;a retrospective matched cohort study[J]. *Anesthesiology*,2016,125(4):667-677.

[2] SCHAEFER M L,WANG M,PEREZ P J,*et al.* Nitric oxide donor prevents neonatal isoflurane-induced impairments in synaptic plasticity and memory[J]. *Anesthesiology*,2019,130(2):247-262.

[3] VUTSKITS L,XIE Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain;mechanisms and relevance[J]. *Nat Rev Neurosci*,2016,17(11):705-717.

[4] RAPPAPORT B A,SURESH S,HERTZ S,*et al.* Anesthetic neurotoxicity:clinical implications of animal models[J]. *N Engl J Med*,2015,372(9):796-797.

[5] ALKIRE M T,HUDETZ A G,TONONI G. Consciousness and anesthesia[J]. *Science*,2008,322(5903):876-880.

[6] ITO S. GABA and glycine in the developing brain[J]. *J Physiol Sci*,2016,66(5):375-379.

[7] WAKASUGI M,HIROTA K,ROTH S H,*et al.* The effects of genemal anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus *in vitro*[J]. *Anesth Analg*,1999,88(3):676-680.

[8] 张新科,李保林. 不同浓度七氟烷全程吸入对行先天性心脏病矫治术患儿心肌的影响[J]. 新乡医学院学报,2019,36(7):629-633.

[9] BEN-ARI Y. NKCC1 chloride importer antagonists attenuate many neurological and psychiatric disorders[J]. *Trends Neurosci*,2017,40(9):536-554.

[10] SALARI A A,BAKHTIARI A,HOMBERG J R. Activation of GABA-A receptors during postnatal brain development increases anxiety- and depression-related behaviors in a time- and dose-dependent manner in adult mice[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*,2015,25(8):1260-1274.

[11] BEN-ARI Y,KHALILOV I,KAHLE K T,*et al.* The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders[J]. *Neuroscientist*,2012,18(5):467-486.

[12] FURUKAWA M,TSUKAHARA T,TOMITA K,*et al.* Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2017,493(3):1243-1249.

[13] JU L S,YANG J J,GRAVENSTEIN N,*et al.* Role of environmental stressors in determining the developmental outcome of neonatal anesthesia[J]. *Psychoneuroendocrinology*,2017,81:96-104.

[14] NISHIYAMA J. Plasticity of dendritic spines:molecular function and dysfunction in neurodevelopmental disorders[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*,2019,73(9):541-550.

[15] 郝金斗,段军,刘培辉,等. 孕中期脂多糖暴露对孤独症谱系障碍小鼠神经免疫系统的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(7):534-537.

[16] DE VINCENTI A P,RÍOS A S,PARATCHA G,*et al.* Mechanisms that modulate and diversify BDNF functions:implications for hippocampal synaptic plasticity[J]. *Front Cell Neurosci*,2019,13:135-142.

(本文编辑:徐自超)