

[文章编号] 1671-587X(2026)01-0035-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260105

GRIK2过表达对七氟烷暴露幼鼠空间学习和记忆能力的改善作用及其机制

田雨禾^{1,2,3,4}, 张婧彬^{1,3,4}, 李群涛^{1,3,4}, 马莹芳^{2,3,4}, 高 娃^{2,3,4}, 马克涛^{1,2,3,4}, 司军强^{1,2,3,4}, 殷姜文^{1,2,3,4}
(1. 石河子大学第一附属医院麻醉科, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学医学院生理学教研室, 新疆 石河子 832000; 3. 中亚高发病防治中心重点实验室, 新疆 石河子 832000; 4. 新疆地方病和民族病重点实验室, 新疆 石河子 832000)

[摘要] **目的:** 探讨过表达红藻氨酸受体亚基 (GluK) 2 对于七氟烷 (Sevo) 暴露幼鼠空间学习和记忆能力的改善作用, 并阐明其可能的分子机制。**方法:** 将 44 只 C57BL/6J 新生仔鼠随机分为对照组、Sevo 组、Sevo+OE-NC 组 (病毒空载组) 和 Sevo+OE-GRIK2 组 (GRIK2 过表达组)。分子实验每组 3 只, 行为学实验每组 8 只。Morris 水迷宫实验检测各组幼鼠的逃避潜伏期、在目标象限停留时间和穿越隐藏平台次数。仔鼠于出生后第 6 天 (P6) 构建 Sevo 麻醉模型, 免疫荧光法观察各组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白表达情况及病毒转染情况。Western blotting 法检测各组幼鼠海马组织中钠钾氯转运体 1 (NKCC1)、钾氯共转运体 2 (KCC2) 和 GluK2 蛋白表达情况。**结果:** Morris 水迷宫实验训练第 3、4 和 5 天, 与对照组比较, Sevo 组幼鼠逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Morris 水迷宫实验训练第 4 和 5 天, 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, Sevo 组幼鼠在目标象限停留时间减少 ($P < 0.05$); 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠在目标象限停留时间增加 ($P < 0.01$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠在目标象限停留时间增加 ($P < 0.01$)。与对照组比较, Sevo 组幼鼠穿越隐藏平台次数减少 ($P < 0.001$); 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠穿越隐藏平台次数增加 ($P < 0.001$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠穿越隐藏平台次数增加 ($P < 0.001$)。免疫荧光法, 与对照组比较, Sevo 组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白荧光强度降低 ($P < 0.05$); 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白荧光强度升高 ($P < 0.01$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白荧光强度升高 ($P < 0.01$)。Western blotting 法, 与对照组比较, Sevo 组幼鼠海马组织中 KCC2 和 GluK2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), NKCC1/KCC2 比值明显升高 ($P < 0.05$); 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 KCC2 和 GluK2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$), NKCC1/KCC2 比值降低 ($P < 0.05$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 KCC2 和 GluK2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$), NKCC1/KCC2 比值降低 ($P < 0.05$)。**结论:** GRIK2 过表达使 Sevo 暴露的仔鼠海马组织中 GluK2 和 KCC2 蛋白表达上调, 改善幼鼠空间学习和记忆能力, 其机制可能与降低海马组织中 NKCC1/KCC2 比值有关。

[关键词] 七氟烷; 全麻药物; 红藻氨酸受体亚基 2; 钠钾氯转运体 1; 钾氯共转运体 2

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-03-25 **[录用日期]** 2025-05-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82160235); 石河子大学第一附属医院博士基金项目 (BS202101)

[作者简介] 田雨禾 (1997—), 女, 广东省深圳市人, 在读硕士研究生, 主要从事全麻药物发育毒性方面的研究。

[通信作者] 殷姜文, 副教授, 博士研究生导师 (E-mail: yjw6654328@163.com);

司军强, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: sijunqiang@shzu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Improvement effect of GRIK2 overexpression on spatial learning and memory ability of sevoflurane-exposed young rats and its mechanism

TIAN Yuhe^{1,2,3,4}, ZHANG Jingbing^{1,3,4}, LI Quntao^{1,3,4}, MA Yingfang^{2,3,4}, GAO Wa^{2,3,4}, MA Ketao^{1,2,3,4},
SI Junqiang^{1,2,3,4}, YIN Jiangwen^{1,2,3,4}

(1. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
2. Department of Physiology, School of Medicine Shihezi University, Shihezi 832000, China;
3. National Health Commission Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases, Shihezi 832000, China; 4. Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the improvement effect of overexpressing kainate receptor subunit (GluK) 2 on the spatial learning and memory abilities of juvenile mice exposed to sevoflurane (Sevo), and to clarify its possible molecular mechanism. **Methods:** A total of 44 C57BL/6J neonatal mice were randomly divided into control group, Sevo group, Sevo+OE-NC group (virus empty vector group), and Sevo+OE-GRIK2 group (GRIK2 overexpression group). There were 3 mice in each group for molecular experiments and 8 mice in each group for behavioral experiments. Morris water maze test was used to detect the escape latency, the residence time in the target quadrant, and the number of platform crossings of the juvenile mice in various groups. The Sevo anesthesia model was established in the mice on postnatal day 6 (P6); immunofluorescence method was used to observe the expression of GluK2 protein and the virus transfection situation in hippocampus tissue of the juvenile mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of sodium-potassium-chloride cotransporter 1 (NKCC1), potassium-chloride cotransporter 2 (KCC2), and GluK2 proteins in hippocampus tissue of the juvenile mice in various groups. **Results:** The Morris water maze test results showed that on days 3, 4, and 5 of training, compared with control group, the escape latency of the young mice in Sevo group was significantly prolonged ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Morris water maze test results showed that on days 4 and 5 of training, compared with Sevo group, the escape latency of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was significantly shortened ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with Sevo+OE-NC group, the escape latency of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was significantly shortened ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Morris water maze test results showed that compared with control group, the residence time in the target quadrant of the young mice in Sevo group was decreased ($P < 0.05$); compared with Sevo group, the residence time in the target quadrant of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was increased ($P < 0.01$); compared with Sevo+OE-NC group, the residence time in the target quadrant of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was increased ($P < 0.01$). The Morris water maze test results showed that compared with control group, the number of platform crossings of the young mice in Sevo group was decreased ($P < 0.001$); compared with Sevo group, the number of platform crossings of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was increased ($P < 0.001$); compared with Sevo+OE-NC group, the number of platform crossings of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was increased ($P < 0.001$). The immunofluorescence results showed that compared with control group, the expression level of GluK2 protein in hippocampus tissue of the young mice in Sevo group was decreased ($P < 0.05$); compared with Sevo group, the expression level of GluK2 protein in hippocampus tissue of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was increased ($P < 0.01$); compared with Sevo+OE-NC group, the expression level of GluK2 protein in hippocampus tissue

of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group was increased ($P<0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of KCC2 and GluK2 proteins in hippocampus tissue of the young mice in Sevo group were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the NKCC1/KCC2 ratio was increased ($P<0.05$); compared with Sevo group, the expression levels of KCC2 and GluK2 proteins in hippocampus tissue of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group were increased ($P<0.001$), and the NKCC1/KCC2 ratio was decreased ($P<0.05$); compared with Sevo+OE-NC group, the expression levels of KCC2 and GluK2 proteins in hippocampus tissue of the young mice in Sevo+OE-GRIK2 group were increased ($P<0.001$), and the NKCC1/KCC2 ratio was decreased ($P<0.05$).

Conclusion: Overexpression of GRIK2 upregulates the expression levels of GluK2 and KCC2 proteins in hippocampus tissue of Sevo-exposed juvenile mice and improves the spatial learning and memory abilities of juvenile mice, and its mechanism may be related to reducing the NKCC1/KCC2 ratio in hippocampus tissue.

KEYWORDS Sevoflurane; General anesthetics; Kainate receptor subunit 2; Sodium-potassium-chloride cotransporter 1; Potassium-chloride cotransporter 2

随着舒适化医疗的普及,许多婴幼儿选择在全麻药物的诱导下进行手术或者操作治疗,全麻药物对于大脑发育的影响越来越受到广泛关注。七氟烷(sevoflurane, Sevo)作为临床上常见的麻醉药物,因其相对安全和快速诱导恢复的特性常被应用于婴幼儿的全身麻醉诱导。虽然幼年单次或短暂吸入Sevo已经被证实不会对大脑发育产生影响^[1-2]。然而近期的研究^[3]表明:反复或长时程暴露于Sevo会引起儿童成年后精细活动和数学能力障碍,然而其具体的病理学机制尚不明确。谷氨酸能和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能信号传递的相互作用对于促进神经网络突触连接的精细化和成熟至关重要。神经递质传递平衡的损害可能导致多种神经发育和精神疾病^[4-6]。红藻氨酸受体亚基(glutamate receptors, GluK)2是由其基因GRIK2所编码的离子型谷氨酸通道亚基,研究^[7]表明:GluK2与钾氯共转运体2(K^+ - Cl^- co-transporter 2, KCC2)相互作用,调节其在海马区神经元的转运和表达。KCC2与钠钾氯转运体1(Na^+ - K^+ - Cl^- co-transporter 1, NKCC1)是氯离子转运蛋白,其表达平衡维持着神经元内外的氯离子稳态^[8]。在大脑发育早期,神经元NKCC1的表达较KCC2多,导致细胞内高氯状态,GABA因此产生去极化的兴奋性电刺激,这种机制具有增强发育期神经网络兴奋性的作用^[9-10]。相关研究^[11]表明:Sevo暴露的小鼠在麻醉诱导期和恢复期海马区含GluK2亚基的红藻氨酸受体(kainic acid receptors, KARs)过表达,小鼠在恢复期产生癫痫的异常行为。然而,其具体的机制尚需要深入探讨。基于以

上理论依据,本研究通过建立Sevo长时程暴露麻醉模型,通过观察小鼠在出生后第14天(P14)海马组织中KCC2、NKCC1和GluK2蛋白的表达情况,采用腺相关病毒转染技术调控GluK2表达,并基于观察NKCC1/KCC2比值及小鼠成年后的行为学改变进一步探讨Sevo长时程麻醉所致神经发育毒性的具体病理学机制,为疾病提供新的研究靶点和治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 20只SPF级繁育雌鼠C57BL/6J(8周龄)购自北京斯贝福生物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(新)2023-0003。动物饲养于石河子大学实验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(新)2023-0003。饲养期间维持恒定温度($24\text{ }^\circ\text{C}\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$),维持相对湿度($60\%\pm 5\%$),光照/黑暗交替时间控制在12h/12h。所有动物在饲养期间均被提供充足的水和食物,母鼠繁育后与幼崽同笼继续饲养,直至幼崽出生后第21天分笼。每笼3~4只幼崽。在整个动物实验中尽最大限度缓解动物的痛苦,实验由石河子大学实验动物伦理委员会批准(伦理学批准号:A2023-233-98),并严格遵守石河子大学动物实验要求与准则。Sevo购自中海威基因科技有限公司,双辛可宁酸测定法(bicinchoninic acid assay, BCA)试剂盒和GluK2抗体购自美国赛默飞世尔有限公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染液、KCC2抗体、NKCC1抗体和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)山羊抗兔IgA抗体购自美国Abcam公司,

辣根酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司, rAAV-hSyn-Grik2-mCherry 和 rAAV-hSyn-mCherry 购自武汉枢密公司, 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自北京索莱宝公司, 组织固定液、电泳缓冲液干粉和电转电泳缓冲液干粉购自武汉赛维尔公司。微量注射泵购自深圳瑞沃德公司, 小鼠脑立体定位仪(型号:71001-S) 购自瑞沃德公司, 动物行为分析系统 V3.0(型号:ID26G) 购自北京众实迪创公司, 荧光显微镜(型号:LSM880) 购自德国蔡司公司。

1.2 仔鼠 Sevo 麻醉、实验分组和处理 采用随机数字表法将 44 只 C57/BL6J 幼鼠随机分为 4 组, 即对照组、Sevo 组、Sevo 麻醉+病毒空载对照组 (Sevo+OE-NC 组) 和 Sevo 麻醉+GRIK2 过表达组 (Sevo+OE-GRIK2 组); 分子实验每组 3 只, 行为学实验每组 8 只。具体处理: ①对照组, 仔鼠出生后第 6 天接受 6 h 的 30% O₂ 和 70% N₂ 处理, 处理结束后放回母鼠笼内, 等待至 P21 分笼, 在 P27 进行 Morris 水迷宫实验。②Sevo 组, 仔鼠出生后第 6 天接受 6 h 的 3% Sevo 暴露处理, 结束后放回母鼠笼内, 等待至 P21 分笼, 在 P27 进行 Morris 水迷宫实验。③Sevo+OE-NC 组, 仔鼠在出生当天接受 rAAV-hSyn-mCherry 注射, 在出生后第 6 天接受 6 h 的 3% Sevo 暴露处理, 待翻正反射恢复, 放回母鼠笼内, 等待至 P21 分笼, 在 P27 进行 Morris 水迷宫实验。④Sevo+OE-GRIK2 组, 仔鼠在出生当天接受 rAAV-hSyn-Grik2-mCherry 病毒注射, 在出生后第 6 天接受 6 h 的 3% Sevo 暴露处理, 结束后放回母鼠笼内, 等待至 P21 分笼, 在 P27 进行 Morris 水迷宫实验。

仔鼠出生后第 6 天与母鼠暂时分离, 放入一个特制的动物麻醉箱 (20 cm×20 cm×40 cm), 箱底部铺上石灰石用于吸收呼出的 CO₂。麻醉设备安装依次为制氧机、空气泵、麻醉挥发罐、麻醉诱导箱和麻醉药浓度监测仪。设置 Sevo 浓度为 3%, 对照组为 30% O₂ 和 70% N₂ 持续暴露 6 h。麻醉期间观察仔鼠的呼吸频率和皮肤颜色以确保仔鼠在麻醉期间不会缺氧。麻醉后整窝放入母鼠笼内, 等待后续的实验操作。

1.3 脑立体定位海马区注射 rAAV 实验方案基于现有的文献^[12] 描述, 稍作调整。将刚出生的仔鼠置于冰上冷冻麻醉 5~6 min, 放置在脑立体定位

上固定其头部, 由于小鼠前囟点未发育完全, 故以后囟点为定位原点, 注射过表达病毒 rAAV-hSyn-Grik2-mCherry 与病毒载体 rAAV-hSyn-mCherry, 仔鼠海马区注射坐标为后囟向前 1 mm, 左右旁开 1 mm, 深度 1.2 mm。注射速度为 100 nL·min⁻¹, 注射量为每侧海马区 500 nL, 注射完毕后针头留置 5 min, 缓慢移除。

1.4 Morris 水迷宫检测各组幼鼠空间学习和记忆能力 水迷宫场地为直径 120 cm、深度 15 cm 的圆型水池, 隐藏平台为直径 10 cm、高度 6 cm 的圆柱。实验开始前, 将 28℃~29℃ 的水加到隐藏平台上 1~2 cm, 在水迷宫的 4 个象限悬挂不同颜色的导航图形, 并将幼鼠提前放入行为学室适应 30 min。实验分为 2 个部分: 定向巡航实验和空间探索实验。①定向巡航实验: 此实验目的为评估幼鼠的学习能力, 实验周期为 5 d。将幼鼠依次从 4 个象限放入水池中, 同时跟踪计时 60 s, 如在 60 s 内幼鼠未找到隐藏平台则记录 60 s, 并用引导棒将幼鼠引导至隐藏平台, 任其停留记忆 1 min 后拿出, 待烘干毛发, 放回鼠笼。②空间探索实验: 此实验目的为评估幼鼠空间记忆能力, 实验周期为 1 d, 在定向巡航实验结束后 1 d 进行。撤去隐藏平台, 将幼鼠从随机 1 个象限放入水池, 跟踪记录 60 s, 最后评估其穿越隐藏平台区域次数。

1.5 免疫荧光法检测各组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白表达情况 P14 仔鼠深度麻醉后开胸灌流, 于冰上快速取脑, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗后放入 4% 多聚甲醛溶液固定后冷冻切片。切片从冰箱取出复温 30 min, PBS 缓冲液冲洗 3 遍, 放入 5% 胎牛血清中封闭过夜, PBS 缓冲液冲洗 3 遍后滴加抗 GluK2 抗体 (1:200) 后放入 4℃ 冰箱孵育过夜。PBS 缓冲液冲洗 3 次后滴加山羊抗兔 IgG (1:200) 后放入 38℃ 水浴中避光孵育 2 h, PBS 缓冲液清洗二抗, 滴加配置好的 DAPI 溶液, 染核 5 min。滴加抗荧光衰减封片剂后封片, 待显微镜观察。

1.6 Western blotting 法检测各组幼鼠海马组织中 NKCC1、KCC2 和 GluK2 蛋白表达水平 仔鼠于 P14 深度麻醉后开胸灌流, 于冰上快速取海马组织, PBS 缓冲液清洗后加入匀浆。采用 BCA 法测定蛋白浓度后于 100℃ 水域煮 10 min 以固定, 冷却后放入冰箱。经过上样、电泳、电转后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, Tris 缓冲盐吐温溶液 (Tris-buffered

saline with Tween[®] 20, TBST) 清洗后滴加配置好的内参抗体 GAPDH(1:1 000), 抗 KCC2(1:1 500), 抗 NKCC1(1:1 500), -4 °C 摇床过夜。清洗一抗, 滴加山羊抗兔 IgG(1:2 000), 室温 2 h, TBST 溶液清洗后按 A 液 : B 液为 1 : 1 加入配置好的发光液, 充分接触 PVDF 膜后上机曝光。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / GAPDH 蛋白条带灰度值。

1.7 统计学分析 采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析。各组幼鼠逃避潜伏期时间、穿越象限次数、象限停留时间以及各组幼鼠海马组织中 GluK2、NKCC1 和 KCC2 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 Dunnett'*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组幼鼠的学习能力 Morris 水迷宫实验结果显示: 在定向巡航实验的第 1 和 2 天各组小鼠逃避潜伏期比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 3 和 4 天, 与对照组比较, Sevo 组小鼠逃避潜伏期延长 ($P < 0.01$); 第 5 天, 与对照组比较, Sevo 组小鼠逃避潜伏期延长 ($P < 0.05$)。第 1~5 天, 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-NC 组小鼠逃避潜伏期无明显改变, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 4 天, 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组小鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组小鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$)。第 5 天, 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组小鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组小鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。

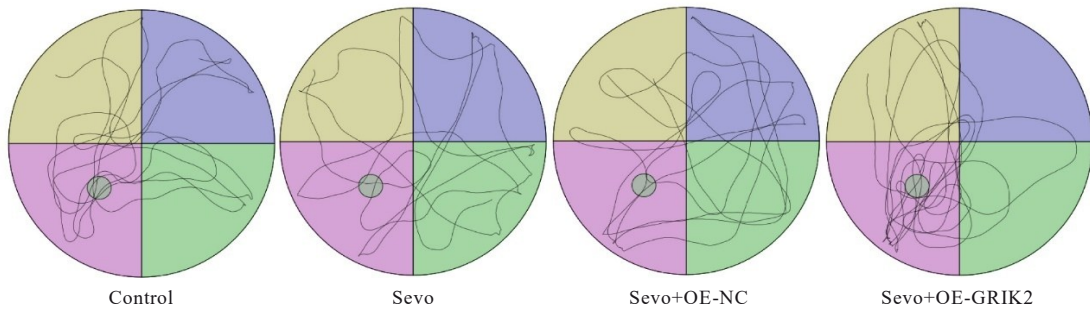


图 1 各组幼鼠水迷宫空间定向巡航实验轨迹图

Fig. 1 Trajectory diagram of the water maze spatial orientation cruising experiment of mice in various groups

表 1 各组幼鼠不同时间点逃避潜伏期

Tab. 1 Escape latencies of young mice in various groups at different time points

($n=8, \bar{x} \pm s, t/s$)

| Group | Escape latency | | | | |
|---------------|----------------|--------------|----------------|------------------------------|----------------------------|
| | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 4 | Day 5 |
| Control | 52.14 ± 3.10 | 43.38 ± 5.62 | 33.27 ± 4.48 | 27.53 ± 5.10 | 13.26 ± 5.20 |
| Sevo | 51.01 ± 4.55 | 44.23 ± 4.10 | 40.73 ± 2.93** | 36.12 ± 5.88** | 21.69 ± 5.05* |
| Sevo+OE-NC | 51.41 ± 4.64 | 44.31 ± 4.64 | 42.60 ± 3.93 | 35.46 ± 3.49 | 24.52 ± 4.84 |
| Sevo+OE-GRIK2 | 50.70 ± 4.30 | 41.05 ± 4.10 | 37.51 ± 5.33 | 28.75 ± 3.96 ^{△△##} | 16.15 ± 5.70 ^{△#} |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs Sevo group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Sevo+OE-NC group.

2.2 各组幼鼠空间记忆能力 Morris 水迷宫空间探索能力检测结果显示: 与对照组比较, Sevo 组幼鼠在目标象限停留时间减少 ($P < 0.05$), 穿越隐藏平台次数减少 ($P < 0.01$)。与 Sevo 组比较, Sevo+OE-NC 组幼鼠在目标象限停留时间和穿越隐藏平台次数无明显改变, 差异无统计学意义 ($P >$

0.05)。与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠目标象限停留时间增加 ($P < 0.01$), 穿越隐藏平台次数增加 ($P < 0.001$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠在目标象限停留时间增加 ($P < 0.01$), 穿越隐藏平台次数增加 ($P < 0.001$)。见图 2 和表 2。

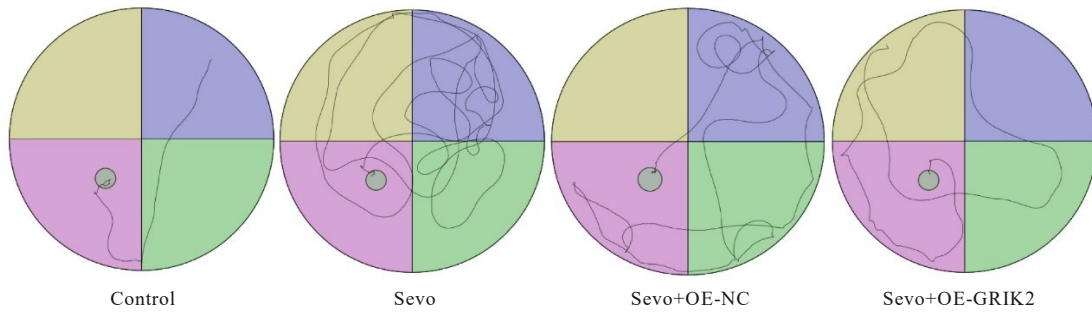


图2 各组幼鼠Morris水迷宫空间探索实验轨迹图

Fig. 2 Trajectory diagram of water maze space exploration experiment of young mice in various groups

表2 各组幼鼠目标象限停留时间和穿越隐藏平台次数

Tab. 2 Number of platform crossings and residence time in target quadrant ($n=8, \bar{x} \pm s$)

| Group | Residence time in target quadrant (t/s) | Number of platform crossing |
|---------------|---|-----------------------------|
| Control | 23.20±3.50 | 5.63±1.06 |
| Sevo | 18.16±4.42* | 3.15±1.13** |
| Sevo+OE-NC | 19.31±3.76 | 2.23±0.83 |
| Sevo+OE-GRIK2 | 27.56±5.85 ^{△#} | 5.50±1.31 ^{△△##} |

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.01$, ^{△△} $P<0.001$ vs Sevo group; [#] $P<0.01$, ^{##} $P<0.001$ vs Sevo+OE-NC group.

2.3 各组幼鼠海马组织中NKCC1、KCC2和GluK2蛋白表达水平以及NKCC1/KCC2比值

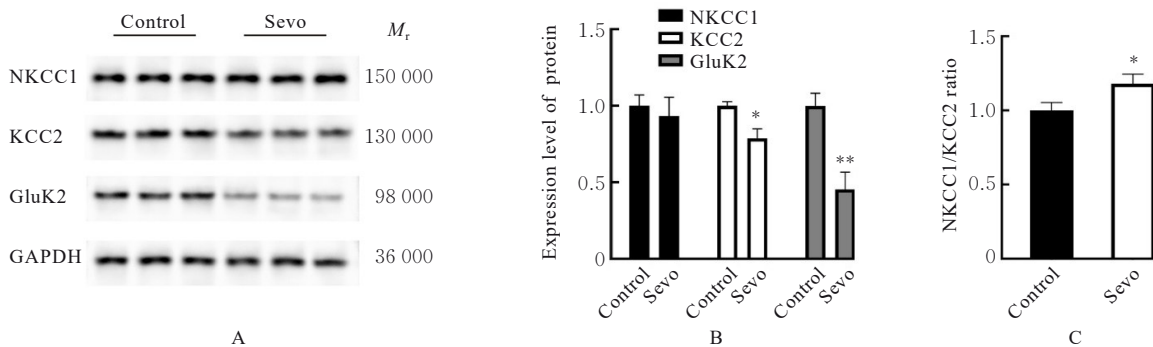
Western blotting法检测结果显示:与对照组比较,Sevo组幼鼠海马组织中NKCC1蛋白表达水平无明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$);Sevo组幼鼠海马组织中KCC2和GluK2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$);Sevo组幼鼠海马组织中NKCC1/KCC2比值明显升高($P<0.05$)。见图3。

2.4 各组幼鼠海马组织中GluK2蛋白表达情况

在荧光显微镜下观察病毒转染情况,可见病毒扩散至小鼠海马区,病毒表达为红色荧光,蓝色为神经元细胞核。免疫荧光法检测结果显示:与对照组比较,Sevo组幼鼠海马组织中GluK2蛋白荧光强度降低($P<0.05$)。与Sevo组比较,Sevo+OE-NC组幼鼠海马组织中GluK2蛋白荧光强度无明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$)。与Sevo组比较,Sevo+OE-GRIK2组幼鼠海马组织中GluK2蛋白荧光强度明显增加($P<0.01$);与Sevo+OE-NC组比较,Sevo+OE-GRIK2组幼鼠海马组织中GluK2蛋白荧光强度明显增加($P<0.01$)。见图4。

2.5 各组幼鼠海马组织中NKCC1、KCC2和GluK2蛋白表达水平及NKCC1/KCC2比值

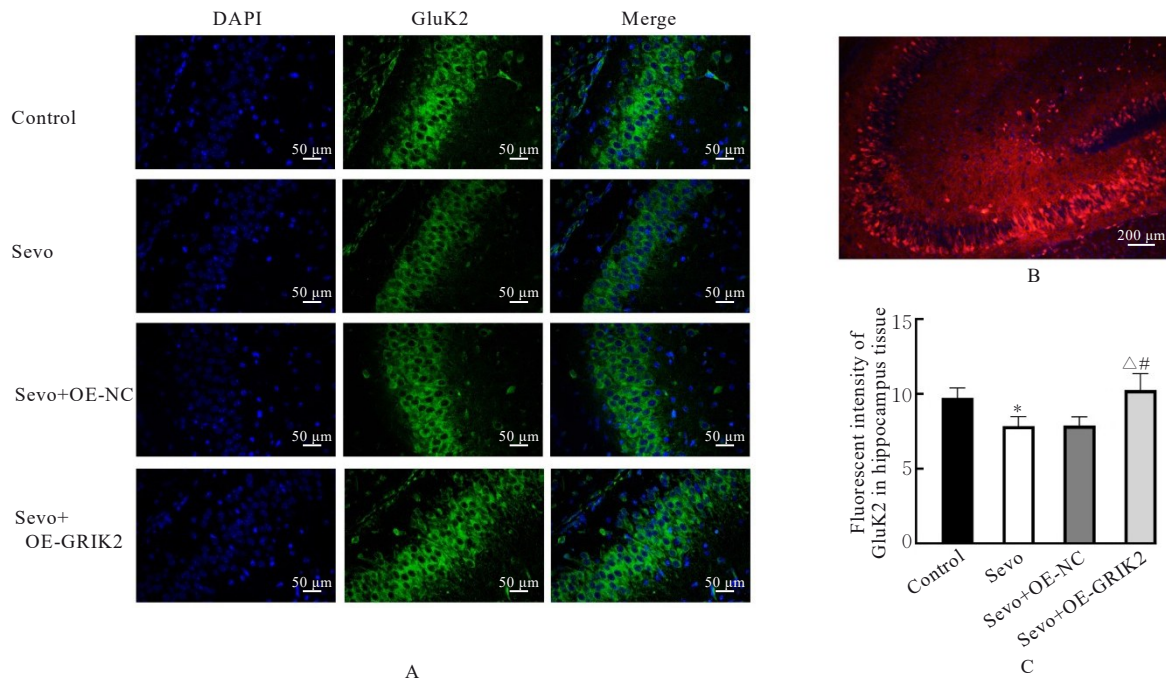
Western blotting法检测结果显示:与Sevo组比较,Sevo+OE-NC组幼鼠海马组织中NKCC1蛋白表达水平无明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$);与Sevo+OE-NC组比较,Sevo+OE-GRIK2组幼鼠海马组织中NKCC1蛋白表达水平无明显改变,差



A: NKCC1, KCC2 and GluK2 protein bands; B: Quantitative analysis of NKCC1, KCC2 and GluK2 expression levels; C: Analysis of NKCC1/KCC2 expression ratios, * $P<0.05$, ** $P<0.001$ vs control group.

图3 各组小鼠海马组织中NKCC1、KCC2和GluK2蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)及NKCC1/KCC2比值(C)

Fig. 3 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of NKCC1, KCC2, and GluK2 proteins and ratios of NKCC1/KCC2 (C) in hippocampus tissue of mice in various groups



A: GluK2 immunofluorescence graph; B: mCherry viral transfection graph; C: Fluorescence intensity of GluK2. * $P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.01$ vs Sevo group; $^{\#}P < 0.01$ vs Sevo+OE-NC group.

图4 免疫荧光法检测各组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白表达及病毒转染情况

Fig. 4 Expression of GluK2 protein and viral transfection in hippocampus region of young mice in various groups

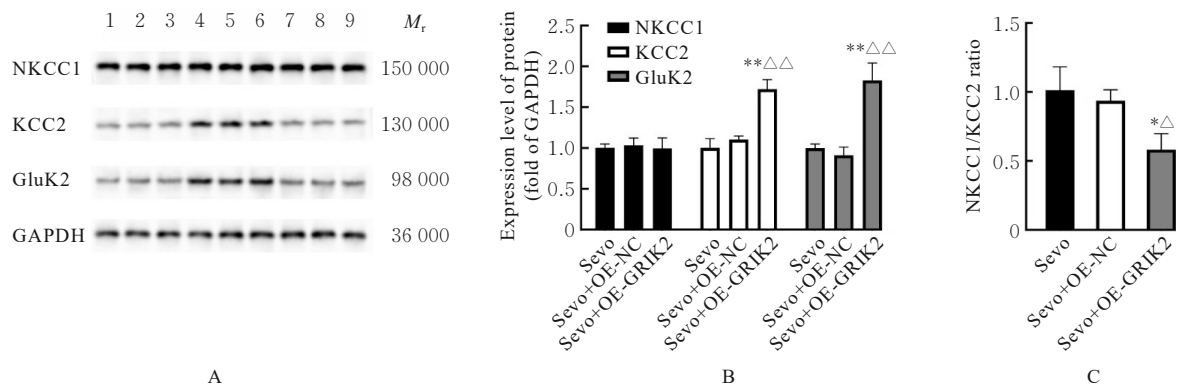
异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Sevo 组比较, Sevo+OE-NC 组幼鼠海马组织中 KCC2 蛋白表达水平无明显改变, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 KCC2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 KCC2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$)。与 Sevo 组比较, Sevo+OE-NC 组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白表达水平无明显改变, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 GluK2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$)。与 Sevo 组比较, Sevo+OE-NC 组幼鼠海马组织中 NKCC1/KCC2 比值无明显改变, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Sevo 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 NKCC1/KCC2 比值降低 ($P < 0.05$); 与 Sevo+OE-NC 组比较, Sevo+OE-GRIK2 组幼鼠海马组织中 NKCC1/KCC2 比值降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

随着医疗科技的进步, 全麻药物得到了广泛的

应用, 其对于大脑发育的影响越来越受到人们的关注。幼年反复多次或长时程地接受 Sevo 暴露会导致成年产生行为障碍。动物实验^[13]结果表明: 幼年的反复多次或长时程的 Sevo 暴露会引起神经元凋亡和突触可塑性受损等神经病理变化。本研究的造模时间选择了 P6 仔鼠是因这一时间点处于仔鼠大脑突触发育的高峰期, 此期神经元快速分化、迁徙以及突触形成, 相当于人类妊娠晚期至新生儿时期, 对麻醉药物十分敏感^[14]。3% 的 Sevo 主要是基于此浓度为 Sevo 诱导神经发育毒性的常用诱导剂量, 能够维持稳定的麻醉状态, 同时避免过深麻醉导致的不良反应, 如呼吸抑制、心脏抑制或死亡等。在临床上婴幼儿的 Sevo 麻醉维持浓度通常为 2.5%~3.0%。小鼠实验中应用 3% 浓度的麻醉, 与临床麻醉药浓度相接近, 且能较好地观察 Sevo 所引起的神经发育毒性机制^[15-16]。麻醉时间的选择则是基于 6 h 的 Sevo 麻醉可导致幼鼠产生神经炎症和远期的认知障碍^[17-18]。6 h 的 Sevo 麻醉可导致幼鼠海马组织中 NKCC1/KCC2 比值增大^[19]。

GluK2 作为离子型谷氨酸受体亚基, 在发育海马中通过调节谷氨酸释放来调节神经网络的自发电活性和电同步化从而影响幼鼠大脑的突触可塑



Lane 1-3: Sevo group; Lane 4-6: Sevo+OE-GRIK2 group; Lane 7-9: Sevo+OE-NC group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs Sevo group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs Sevo+OE-NC group.

图5 各组幼鼠海马组织中NKCC1、KCC2和GluK2蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)以及NKCC1/KCC2比值(C)
Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of NKCC1, KCC2 and GluK2 proteins and ratios of NKCC1/KCC2 (C) in hippocampus tissue of young mice in various groups

性^[20-21]。GluK2的缺失或基因突变可引发多种神经发育类疾病,如精神分裂症、孤独症以及智力发育障碍等^[22-23]。本研究结果显示:在P14 Sevo暴露组幼鼠海马组织中GluK2蛋白表达降低,并伴随远期空间学习和记忆能力受损。而通过过表达GluK2蛋白,幼鼠远期空间学习和记忆能力得到改善。这表明GluK2参与了Sevo暴露所引起的幼鼠远期空间学习和记忆能力受损的分子机制。

仔鼠长时程Sevo暴露可能是通过下调GluK2蛋白表达、增大NKCC1/KCC2比值导致幼鼠远期空间学习和记忆能力障碍。NKCC1/KCC2介导的氯离子稳态在大脑发育过程中扮演着重要的调控作用,未成熟的大脑NKCC1蛋白表达水平较高,其作用是将氯离子转运至细胞内而维持胞内的高氯状态,此时的GABA作为兴奋性递质,可增强发育大脑内的电活性,促进神经网络的成熟。而成年后KCC2逐渐增多,其作用是将氯离子转运出细胞而维持胞内的低氯状态,此时GABA作为抑制性递质,标志着大脑发育的相对成熟状态,这一时期在小鼠出生后的第2周^[24-25]。既往研究^[26]表明:GluK2可通过与KCC2结合维持海马神经元的氯离子稳态。结合本研究结果表明:长时程Sevo暴露仔鼠海马组织中GluK2/KCC2的比值下降,NKCC1/KCC2的比值增大,同时影响幼鼠远期的空间学习和记忆能力。过表达幼鼠海马组织中GluK2上调KCC2表达水平,降低NKCC1/KCC2比值改善了Sevo所致的幼鼠远期空间学习和记忆能力。这提示上调GluK2可能是通过改善幼鼠海马组织中的氯

离子稳态而改善Sevo暴露所致的远期空间学习和记忆能力。

综上所述,GRIK2过表达使Sevo暴露的仔鼠海马组织中GluK2和KCC2蛋白表达上调,改善幼鼠空间学习和记忆能力,其机制可能与降低海马组织中NKCC1/KCC2比值导致氯离子稳态失衡有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

田雨禾和张婧彬参与论文撰写,李群涛和马莹芳参与数据的统计学分析,高娃参与动物实验,马克涛、司军强和殷姜文参与研究整体设计和论文审阅。

[参考文献]

- [1] ZHANG J H, DENG H X, HUANG X L, et al. Pre-school children single inhalation anesthetic exposure and neuro-psychological development: a prospective study and Mendelian randomization analysis [J]. *Front Neurol*, 2024, 15: 1389203.
- [2] POOR ZAMANY NEJAT KERMANY M, ROODNESHIN F, AHMADI DIZGAH N, et al. Early childhood exposure to short periods of sevoflurane is not associated with later, lasting cognitive deficits [J]. *Paediatr Anaesth*, 2016, 26(10): 1018-1025.
- [3] WARNER D O, ZACCARIELLO M J, KATUSIC S K, et al. Neuropsychological and behavioral outcomes after exposure of young children to procedures requiring general anesthesia: the mayo anesthesia safety in kids (MASK) study [J]. *Anesthesiology*, 2018, 129(1):

- 89-105.
- [4] 王俊宽, 许柯炎, 秦瑞鸿, 等. 七氟烷后处理对脑缺血再灌注成年大鼠远期神经功能的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2024, 59(2): 178-181.
- [5] 刘宝林, 曹维福. SIRT1介导的铁死亡在老年小鼠术后认知功能障碍中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(3): 332-340.
- [6] KOK M, SINGH I, AIZENMAN E, et al. Inefficient maturation of disease-linked mutant forms of the KCC2 potassium-chloride cotransporter correlates with predicted pathogenicity[J]. *J Biol Chem*, 2025, 301(4): 108399.
- [7] PRESSEY J C, MAHADEVAN V, KHADEMULLAH C S, et al. A kainate receptor subunit promotes the recycling of the neuron-specific K^+ - Cl^- co-transporter KCC2 in hippocampal neurons[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(15): 6190-6201.
- [8] BRANCHEREAU P, CATTART D. Chloride homeostasis in developing motoneurons [J]. *Adv Neurobiol*, 2022, 28: 45-61.
- [9] BLAESSE P, AIRAKSINEN M S, RIVERA C, et al. Cation-chloride cotransporters and neuronal function[J]. *Neuron*, 2009, 61(6): 820-838.
- [10] GALANOPOULOU A S. Developmental patterns in the regulation of chloride homeostasis and GABA (A) receptor signaling by seizures[J]. *Epilepsia*, 2007, 48(Suppl 5): 14-18.
- [11] LIANG P, LI F, LIU J, et al. Sevoflurane activates hippocampal CA3 kainate receptors (GluK2) to induce hyperactivity during induction and recovery in a mouse model[J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(5): 1047-1054.
- [12] 周 斌, 胡镐申, 陈玲敏, 等. 腺相关病毒介导的小鼠发育期大脑中的特定细胞和特定脑区的基因编辑及潜在应用探索[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(3): 225-229.
- [13] SUN M Y, XIE Z C, ZHANG J Q, et al. Mechanistic insight into sevoflurane-associated developmental neurotoxicity[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2022, 38(6): 927-943.
- [14] JEVTOVIC-TODOROVIC V, ABSALOM A R, BLOMGREN K, et al. Anaesthetic neurotoxicity and neuroplasticity: an expert group report and statement based on the BJA Salzburg Seminar[J]. *Br J Anaesth*, 2013, 111(2): 143-151.
- [15] HOU Q, YUAN J H, LI S, et al. Autophagic degradation of DHCR7 activates AKT3 and promotes sevoflurane-induced hippocampal neuroinflammation in neonatal mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 222: 304-316.
- [16] WANG S, LI Z J, LIU X, et al. Repeated postnatal sevoflurane exposure impairs social recognition in mice by disrupting GABAergic neuronal activity and development in hippocampus [J]. *Br J Anaesth*, 2024, 133(4): 810-822.
- [17] ZHANG W H, CHEN Y X, QIN J W, et al. Prolonged sevoflurane exposure causes abnormal synapse development and dysregulates beta-neurexin and neuroligins in the hippocampus in neonatal rats[J]. *J Affect Disord*, 2022, 312: 22-29.
- [18] ZHOU B, CHEN L M, LIAO P, et al. Astroglial dysfunctions drive aberrant synaptogenesis and social behavioral deficits in mice with neonatal exposure to lengthy general anesthesia[J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(8): e3000086.
- [19] CABRERA O H, TESIC V, TAT Q L, et al. Sevoflurane-induced dysregulation of cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 in neonatal mouse brain[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(1): 1-10.
- [20] ZHU Y W, ARMSTRONG J N, CONTRACTOR A. Kainate receptors regulate the functional properties of young adult-born dentate granule cells [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(12): 109751.
- [21] DUAN G F, TANG X H, JIA M, et al. Kainate receptors GluK1 and GluK2 differentially regulate synapse morphology[J]. *Synapse*, 2023, 77(1): e22255.
- [22] TAKEISHI Y, YAGUCHI H, KUDO A, et al. The importance of early immunotherapy in anti-GluK2 antibody-positive autoimmune cerebellar ataxia: a case report[J]. *J Neurol Sci*, 2024, 467: 123306.
- [23] STOLZ J R, FOOTE K M, VEENSTRA-KNOL H E, et al. Clustered mutations in the GRIK2 kainate receptor subunit gene underlie diverse neurodevelopmental disorders[J]. *Am J Hum Genet*, 2021, 108(9): 1692-1709.
- [24] WATANABE M, FUKUDA A. Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 371.
- [25] RIVERA C, VOIPIO J, PAYNE J A, et al. The K^+ / Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation [J]. *Nature*, 1999, 397(6716): 251-255.
- [26] MAHADEVAN V, PRESSEY J C, ACTON B A, et al. Kainate receptors coexist in a functional complex with KCC2 and regulate chloride homeostasis in hippocampal neurons[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(6): 1762-1770.