

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2025. 04. 019

论著 · 基础

# CGRP 通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对七氟醚诱导新生大鼠神经毒性的影响

李兔平, 韩毅, 孙韬, 雷易, 刘臻, 贾丽玲, 张林忠

基金项目: 山西省基础研究计划青年科学研究项目 (202203021222392)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第二医院麻醉科

通信作者: 张林忠, E-mail: zlz1974@139.com



**【摘要】目的** 探讨降钙素基因相关肽 (CGRP) 对七氟醚诱导的新生大鼠神经毒性及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路的影响。**方法** 于 2023 年 1 月—2024 年 6 月在山西医科大学第二医院麻醉研究室进行实验。构建七氟醚诱导的新生大鼠模型, 将造模大鼠随机分为模型组 (Model 组)、CGRP 组、CGRP + LY294002 组, 每组 12 只, 另取 12 只正常大鼠作对照组 (Control 组); Morris 水迷宫实验检测各组大鼠认知功能; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测氧化应激水平; 苏木素—伊红染色法 (HE) 检测脑组织病理损伤情况; 缺口末端标记法 (TUNEL) 检测神经元凋亡情况; 免疫组化检测自噬相关蛋白表达; 免疫印记法 (Western blot) 检测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及凋亡相关蛋白表达。**结果** 与 Control 组比较, Model 组脑组织结构遭到破坏, 神经元排列紊乱, 数量减少, 核固缩深染; 大鼠逃逸潜伏期延长、目标象限停留时间缩短, 丙二醛 (MDA) 水平及神经元凋亡率、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax)、重组人自噬效应蛋白 (Beclin1) 表达升高, 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-px) 水平及 Bcl-2、p62、磷酸化 (p)-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 表达降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与 Model 组比较, CGRP 组脑组织结构相对正常, 神经元排列相对整齐, 少量神经元凋亡, 核固缩现象明显减轻; 大鼠逃逸潜伏期缩短, 目标象限停留时间延长, MDA 水平及神经元凋亡率、Bax、Beclin1 表达降低, SOD、GSH-px 水平及 Bcl-2、p62、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 表达升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与 CGRP 组比较, CGRP + LY294002 组脑组织破坏严重, 神经元病理损伤加重; 逃逸潜伏期延长, 目标象限停留时间缩短, MDA 水平及神经元凋亡率、Bax、Beclin1 表达升高, SOD、GSH-px 水平及 Bcl-2、p62、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 表达降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。**结论** CGRP 可减轻七氟醚诱导新生大鼠神经毒性, 其作用机制与激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关。

**【关键词】** 七氟醚; 神经毒性; 降钙素基因相关肽; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路; 大鼠

**【中图分类号】** R741.05

**【文献标识码】** A

**Effect of CGRP on sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal rats by regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway**

Li Tuping, Han Yi, Sun Tao, Lei Yi, Liu Zhen, Jia Liling, Zhang Linzhong. Department of Anesthesiology, Shanxi Medical University Second Hospital, Shanxi, Taiyuan 030001, China

Funding program: Youth Science Research Project of Shanxi Basic Research Program (202203021222392)

Corresponding author: Zhang Linzhong, E-mail: zlz1974@139.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on sevoflurane-induced neurotoxicity and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in neonatal rats. **Methods** Conducted the experiment in the Anesthesia Research Laboratory of the Second Hospital of Shanxi Medical University from January 2023 to June 2024. The neonatal rat model induced by sevoflurane was constructed, the model rats were randomly divided into model group (Model group), CGRP group and CGRP + LY294002 group, with 12 rats in each group, another 12 normal rats were taken as control group (Control group). The cognitive function of rats in each group were detected by Morris water maze. The level of oxidative stress was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological damage of brain tissue was detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. Neuronal apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) staining. Through the use of immunohistochemistry, the expression of proteins associated to autophagy was found. The PI3k/Akt/mTOR signaling pathway and apoptosis-related proteins were detected by Western blot. **Results** The brain tissue structure of the Model

group was destroyed compared with Control group, the arrangement of neurons was disordered, the number of neurons was reduced, the nuclear pyknosis was deeply stained, the escape latency of rats was prolonged, the residence time in the target quadrant was shortened, the malondialdehyde (MDA) level and neuronal apoptosis rate, the expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)-related X protein (Bax) and recombinant human autophagy effector protein (Beclin1) were increased, the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) and the expression of Bcl-2, p62, Phosphorylated (p) -Akt/PI3k, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR were decreased ( $P < 0.05$ ). The brain tissue structure of CGRP group was relatively normal compared with Model group, the neurons were arranged relatively neatly, a small amount of neurons were apoptotic, the phenomenon of nuclear pyknosis was significantly reduced, the escape latency of the rats was shortened, the target quadrant residence time was prolonged, the MDA level and neuronal apoptosis rate, Bax, Beclin1 expression decreased, SOD, GSH-px levels and Bcl-2, p62, p-PI3k/PI3k, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR expression increased ( $P < 0.05$ ). The brain tissue of CGRP + LY294002 group was more severely damaged than that of CGRP group, the pathological damage of neurons was aggravated, the escape latency was prolonged, the target quadrant residence time was shortened, the MDA level and neuronal apoptosis rate, Bax, Beclin1 expression were increased, SOD, GSH-px levels and Bcl-2, p62, p-PI3k/PI3k, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR expression were decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CGRP can reduce sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal rats, and its mechanism is related to the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

**[Key words]** Sevoflurane; Neurotoxicity; Calcitonin gene-related peptide; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Rats

随着手术麻醉技术的成熟,越来越多的婴幼儿接受全身麻醉治疗,然而长期全身麻醉易对婴幼儿的身心产生负面影响,如发育迟缓、认知障碍、多动症等<sup>[1]</sup>。其中吸入性麻醉药物七氟醚因其使用方便且对呼吸道刺激小,麻醉效果好而常用于小儿麻醉诱导与维持,但长期暴露易对婴幼儿产生神经毒性,促使海马神经元凋亡,导致空间学习能力障碍等多种神经功能缺陷<sup>[2]</sup>。了解七氟醚致病机制,寻求新型抑制或治疗其引起的损伤是目前的研究重点。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是具有强大的扩张血管作用的生物活性多肽,其在脑梗死、脑出血、脑创伤等多种中枢神经系统损害中发挥神经保护作用,可抑制重症中暑大鼠脑细胞凋亡<sup>[3]</sup>。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是自噬相关通路,在神经损伤相关疾病的研究中发挥重要作用,其中激活 PI3K/Akt/mTOR 自噬信号途径可减弱  $\alpha\beta 1-42$  诱导的自噬,抑制氧化应激反应及细胞凋亡,进而发挥神经保护作用<sup>[4]</sup>。而七氟醚可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导大鼠神经细胞凋亡,使大鼠认知能力衰退<sup>[5]</sup>。CGRP 可通过调控 Akt/mTOR 信号通路介导的凋亡和自噬,减少炎症反应改善受损脑组织能量及代谢,减轻创伤性颅脑损伤,对脑组织发挥保护作用<sup>[6]</sup>。CGRP 能否通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路减轻七氟醚诱导的新生神经大鼠神经毒性尚不清楚,因此,本研究探索 CGRP 对七氟醚诱导的新生神经大鼠神经毒性及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响,以期治疗七氟醚诱导产生的神经毒性寻求更多可能性,报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 动物、药物与试剂 (1) 动物:7 日龄、体质量 12 ~ 14 g 清洁级新生 SD 雄性大鼠 48 只,购自武汉云克隆动物有限公司[生产许可号为 SCXK(鄂)2023-0021];大鼠饲养条件:温度 23 ~ 27℃,湿度 55% ~ 60%,12 h 明/12 h 暗,期间自由饮食饮水,适应性饲养 1 周。(2) 药物与试剂: CGRP (HPLC  $\geq 97\%$ , C118574) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;七氟醚(SRUS-1612540) 购自上海赛可锐生物科技有限公司;LY294002(PI3K 阻断剂) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px) 酶联免疫吸附试验(ELISA) 试剂盒(GD-JG1922、GD-S1921-J、GD-G12276) 购自上海古朵生物科技有限公司;重组人自噬效应蛋白(Beclin1)、p62 一抗抗体(24352、12804) 购自北京博雷德生物科技有限公司;磷酸化(p)-PI3K 一抗抗体(AF5905) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司;PI3K 一抗抗体(abs149758) 购自爱必信(上海)生物科技有限公司;p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 一抗抗体(sc-81433、sc-81434、sc-293133、sc-517464) 购自 Santa Cruz Biotechnology;B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 一抗抗体(FNab00809、FNab00839) 购自武汉菲恩生物科技有限公司。

1.2 方法 本研究已获得山西医科大学第二医院实验动物伦理委员会审批(DW2023016),于 2023 年 1 月—2024 年 6 月在山西医科大学第二医院麻醉研究室进行实验。

1.2.1 七氟醚诱导的新生大鼠模型构建与分组:将新

生大鼠置于透明半封闭的呼吸环路麻醉箱,吸入 3% 七氟醚及 3 L/min 氧气 6 h,每天 1 次,连续 3 d,待大鼠恢复翻正反射后将其放回鼠笼,全程温度维持在 37℃ 左右<sup>[7]</sup>。将造模成功大鼠随机分为模型组 (Model 组)、CGRP 组、CGRP + LY294002 组,每组 12 只;另取 12 只正常大鼠作对照组 (Control 组),只吸入 3 L/min 氧气不作麻醉,正常喂养。CGRP 组麻醉前 30 min 颈动脉注射 0.5 ml (2 μg)/ml CGRP<sup>[3]</sup>; CGRP + LY294002 组麻醉前 30 min 颈动脉注射 0.5 ml (2 μg)/ml CGRP 及侧脑室注射 20 μmol/L LY294002<sup>[8]</sup>; Control 组与 Model 组麻醉前 30 min 颈动脉注射与 CGRP 组等量生理盐水,每天 1 次,给药 3 d。

1.2.2 Morris 水迷宫实验:给药结束后,继续喂养大鼠至 6 周龄开始 Morris 水迷宫实验,先将水池平均划分 4 个象限并注水,在第四象限水下 2 cm 置入平台。实验前先让大鼠停留平台 10 s,然后将大鼠面向池壁从 4 个象限放入水中,记录大鼠找到平台的时间,记为逃逸潜伏期,计时 60 s,若 60 s 内未找到,让其在平台停留 15 s,继续训练。实验进行 5 天,第 6 d 撤去平台,将大鼠从目标象限对侧面向池壁放入,记录 60 s 内其在目标象限停留的时间。

1.2.3 氧化应激水平检测:训练结束,戊巴比妥钠麻醉大鼠后腹主动脉取血,静置后离心取血清,ELISA 试剂盒检测血清 SOD、MDA、GSH-px 水平。

1.2.4 HE 病理染色观察:取血结束断头处死各组大鼠,剥离脑组织,清理干净后,各组任选其中 6 个进行甲醛固定,浸蜡包埋组织后切片,随后将切片脱蜡至水,然后进行苏木素—伊红 (HE) 染色,最后显微镜下观察脑组织病理损伤情况。

1.2.5 神经元凋亡检测:取石蜡切片,常规脱蜡水化后,浸入 3% 双氧水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),随后室温血清封闭,再将其置于 0.1% Triton x-100 通透液反应,漂洗后,加入缺口末端标记法 (TUNEL) 染液反应,二氨基联苯氨显色法 (DAB) 室温显色,苏木素复染,水洗后干燥密封,显微镜下观察切片,凋亡细胞核为绿色,所有细胞核 DAPI 染色为蓝色,并进行图像合并 (Merge)。计数每个视野下的 TUNEL 阳性细胞数和总细胞数,计算细胞凋亡率 = TUNEL 阳性细胞/总细胞数 × 100%。

1.2.6 自噬相关蛋白检测:取石蜡切片,常规处理后,进行抗原修复,然后加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应,血清封闭,再加入 Beclin1、p62 一抗抗体低温过夜反应,次日与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗反应, DAB 显色,苏木素复染,干燥后封闭,显微镜采集图像并分析其光密度值。

1.2.7 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及凋亡相关蛋白检测:将各组剩余 6 个脑组织研碎后与蛋白裂解液充分

反应,提取总蛋白定量,然后进行沸水浴,随后将蛋白样品进行凝胶电泳、转膜封闭,然后将封闭膜与 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、Bax、Bcl-2 一抗置 4℃ 冰箱反应,次日再与山羊抗兔二抗室温反应 1 h,最后电化学发光 (ECL) 反应,凝胶成像系统采集图像并进行蛋白条带分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠认知功能比较 与 Control 组比较, Model 组逃逸潜伏期延长,目标象限停留时间缩短 ( $P < 0.05$ );与 Model 组比较, CGRP 组逃逸潜伏期缩短,目标象限停留时间延长 ( $P < 0.05$ );与 CGRP 组比较, CGRP + LY294002 组逃逸潜伏期延长,目标象限停留时间缩短 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠认知功能比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of cognitive function among groups of rats

| 组 别               | <i>n</i> | 逃逸潜伏期                     | 目标象限停留时间                  |
|-------------------|----------|---------------------------|---------------------------|
| Control 组         | 12       | 18.56 ± 1.93              | 38.59 ± 3.98              |
| Model 组           | 12       | 31.29 ± 3.22 <sup>a</sup> | 19.64 ± 2.07 <sup>a</sup> |
| CGRP 组            | 12       | 20.67 ± 2.15 <sup>b</sup> | 35.23 ± 3.65 <sup>b</sup> |
| CGRP + LY294002 组 | 12       | 30.04 ± 3.17 <sup>c</sup> | 21.47 ± 2.23 <sup>c</sup> |
| <i>F</i> 值        |          | 69.591                    | 114.441                   |
| <i>P</i> 值        |          | <0.001                    | <0.001                    |

注:与 Control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 Model 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 CGRP 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠氧化应激水平比较 与 Control 组比较, Model 组 MDA 水平升高, SOD、GSH-px 水平降低 ( $P < 0.05$ );与 Model 组比较, CGRP 组 MDA 水平降低, SOD、GSH-px 水平升高 ( $P < 0.05$ );与 CGRP 组比较, CGRP + LY294002 组 MDA 水平升高, SOD、GSH-px 水平降低 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠氧化应激水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of oxidative stress levels among groups of rats

| 组 别               | <i>n</i> | MDA<br>(nmol/mL)         | SOD<br>(U/mL)            | GSH-px<br>(U/L)          |
|-------------------|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control 组         | 12       | 0.61 ± 0.07              | 7.22 ± 0.75              | 5.53 ± 0.58              |
| Model 组           | 12       | 0.95 ± 0.10 <sup>a</sup> | 3.89 ± 0.40 <sup>a</sup> | 3.11 ± 0.33 <sup>a</sup> |
| CGRP 组            | 12       | 0.66 ± 0.07 <sup>b</sup> | 7.03 ± 0.72 <sup>b</sup> | 5.28 ± 0.54 <sup>b</sup> |
| CGRP + LY294002 组 | 12       | 0.91 ± 0.10 <sup>c</sup> | 4.16 ± 0.43 <sup>c</sup> | 3.39 ± 0.35 <sup>c</sup> |
| <i>F</i> 值        |          | 47.826                   | 108.453                  | 87.772                   |
| <i>P</i> 值        |          | <0.001                   | <0.001                   | <0.001                   |

注:与 Control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 Model 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 CGRP 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。



2.3 各组大鼠脑组织病理损伤情况比较 Control 组脑组织结构正常,神经元形态规则,排列紧密;Model 组脑组织结构遭到破坏,神经元排列紊乱,数量减少,核固缩深染;CGRP 组脑组织结构相对正常,神经元排列相对整齐,少量神经元凋亡,核固缩现象明显减轻;CGRP + LY294002 组脑组织破坏严重,神经元病理损伤加重,见图 1。

2.4 各组大鼠神经元凋亡及凋亡相关蛋白表达情况比较 与 Control 组比较,Model 组神经元凋亡率、Bax 表达升高,Bcl-2 表达降低( $P < 0.05$ );与 Model 组比较,CGRP 组神经元凋亡率、Bax 表达降低,Bcl-2 表达升高( $P < 0.05$ );与 CGRP 组比较,CGRP + LY294002 组神经元凋亡率、Bax 表达升高,Bcl-2 表达降低( $P < 0.05$ ),见图 2、3 及表 3。

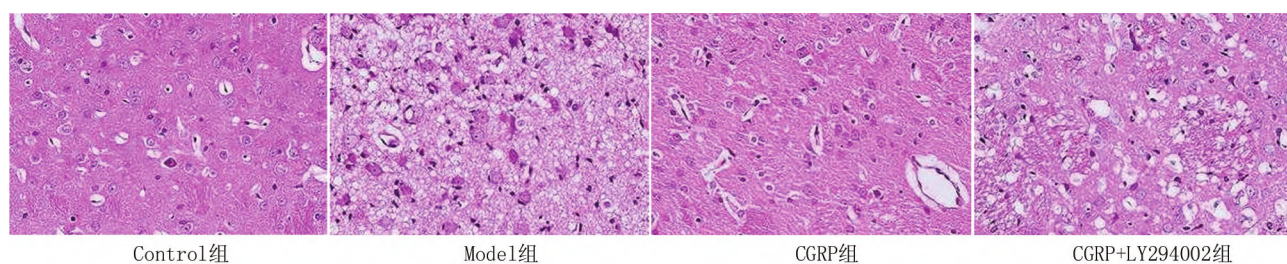


图 1 各组大鼠脑组织病理损伤情况(HE 染色, ×400)

Fig. 1 Pathological damage in brain tissues of rats from different groups (HE staining, ×400)

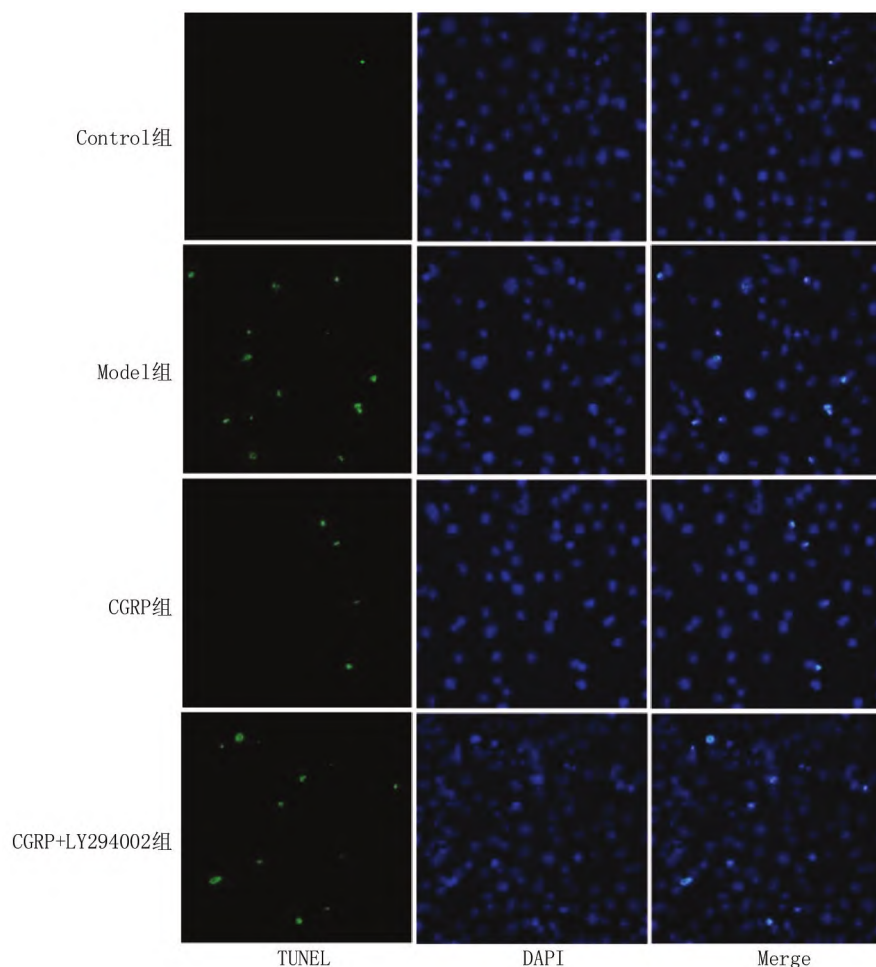


图 2 各组大鼠神经元凋亡情况(TUNEL 染色, ×400)

Fig. 2 Detection of neuronal apoptosis in rats from different groups by TUNEL staining (×400)

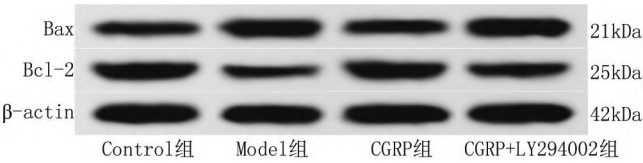


图 3 各组大鼠 Bax、Bcl-2 表达情况

Fig. 3 Expression of Bax and Bcl-2 in rats from different groups detected by Western blot

表 3 各组大鼠神经元凋亡率及凋亡相关蛋白比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 3 Comparison of neuronal apoptosis rate and apoptosis-related proteins among groups of rats

| 组 别               | <i>n</i> | 神经元凋亡率 (%)                | Bax                      | Bcl-2                    |
|-------------------|----------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control 组         | 6        | 2.25 ± 0.26               | 0.36 ± 0.04              | 0.77 ± 0.08              |
| Model 组           | 6        | 26.17 ± 2.71 <sup>a</sup> | 0.89 ± 0.10 <sup>a</sup> | 0.28 ± 0.03 <sup>a</sup> |
| CGRP 组            | 6        | 9.83 ± 1.02 <sup>b</sup>  | 0.47 ± 0.05 <sup>b</sup> | 0.69 ± 0.07 <sup>b</sup> |
| CGRP + LY294002 组 | 6        | 23.76 ± 2.45 <sup>c</sup> | 0.81 ± 0.09 <sup>c</sup> | 0.33 ± 0.04 <sup>c</sup> |
| <i>F</i> 值        |          | 215.731                   | 71.523                   | 107.290                  |
| <i>P</i> 值        |          | <0.001                    | <0.001                   | <0.001                   |

注:与 Control 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 Model 组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.05;与 CGRP 组比较,<sup>c</sup>*P* < 0.05。

2.5 各组大鼠自噬相关蛋白表达比较 与 Control 组比较,Model 组 Beclin1 表达升高,p62 表达降低 (*P* < 0.05);与 Model 组比较,CGRP 组 Beclin1 表达降低,p62 表达升高 (*P* < 0.05);与 CGRP 组比较,CGRP + LY294002 组 Beclin1 表达升高,p62 表达降低 (*P* < 0.05),见图 4、表 4。

2.6 各组大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白表达比较 与 Control 组比较,Model 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 表达降低 (*P* < 0.05);与 Model 组比较,CGRP 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 表达升高 (*P* < 0.05);与 CGRP 组比较,CGRP + LY294002 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 表达降低 (*P* < 0.05),见图 5、表 5。

3 讨 论

大脑发育关键时期神经元生理活动受到干扰易导致中枢神经系统功能损害,七氟醚作为婴幼儿常用全身麻醉药物,其可干扰神经元树突棘发育和突触形成,导致婴幼儿出现广泛凋亡性神经退行性改变及神经行为缺陷<sup>[9-10]</sup>。其中七氟醚可诱导海马细胞凋亡,引发神经毒性,损害学习记忆能力<sup>[11]</sup>。七氟醚还可诱导老年大鼠海马神经元凋亡,Aβ 大量积累,引起认知功能障碍<sup>[12]</sup>。七氟醚发病机制可能与氧化应激、神经细胞凋亡、神经元凋亡、自噬等相关,但其具体作用机制尚不清楚<sup>[13]</sup>。内源性神经肽 CGRP 表达于整个神经系

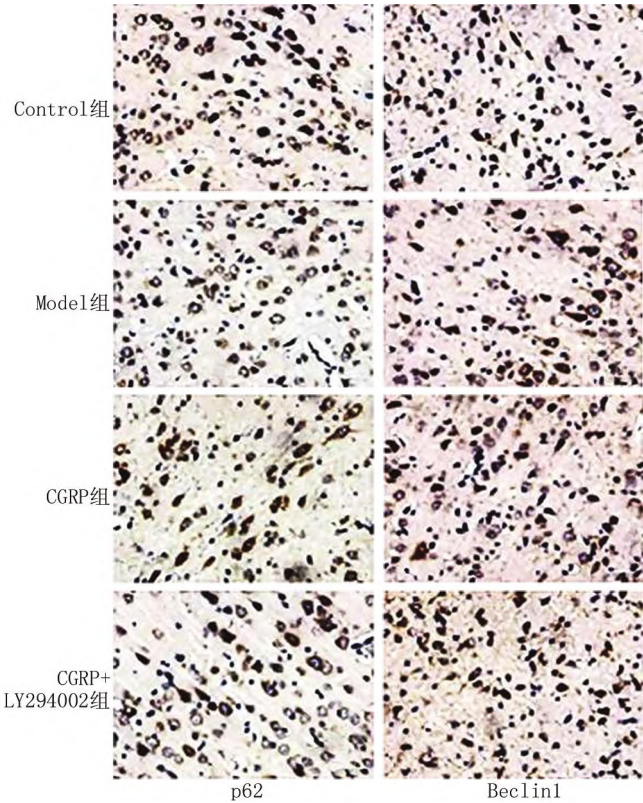


图 4 各组大鼠 p62、Beclin1 表达情况(免疫组化染色,×400)

Fig. 4 Expression of p62 and Beclin1 in rats from different groups detected by immunohistochemistry (×400)

表 4 各组大鼠自噬相关蛋白比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 4 Comparison of autophagy-related proteins among groups of rats

| 组 别               | <i>n</i> | p62                      | Beclin1                  |
|-------------------|----------|--------------------------|--------------------------|
| Control 组         | 6        | 0.82 ± 0.09              | 0.44 ± 0.05              |
| Model 组           | 6        | 0.35 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.92 ± 0.10 <sup>a</sup> |
| CGRP 组            | 6        | 0.73 ± 0.08 <sup>b</sup> | 0.56 ± 0.06 <sup>b</sup> |
| CGRP + LY294002 组 | 6        | 0.42 ± 0.05 <sup>c</sup> | 0.83 ± 0.09 <sup>c</sup> |
| <i>F</i> 值        |          | 68.215                   | 50.207                   |
| <i>P</i> 值        |          | <0.001                   | <0.001                   |

注:与 Control 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 Model 组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.05;与 CGRP 组比较,<sup>c</sup>*P* < 0.05。

统,可导致毛细血管通透性增加、炎性细胞聚集等多种生理反应,其中在偏头痛和其他疼痛性神经血管疾病中发挥重要作用,另外其表达还与脑损伤的发生、发展紧密相关,进而对中枢神经系统损害发挥保护作用<sup>[14-15]</sup>。研究显示,CGRP 在镉暴露小鼠股骨颈表达显著降低,升高其表达可以减轻镉暴露小鼠的疼痛相关行为,抑制神经毒性<sup>[16]</sup>。过表达 CGRP 可缩短疼痛潜伏期,增快神经传导,促进神经血管扩张,增加血流,改善糖尿病周围神经病变<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,



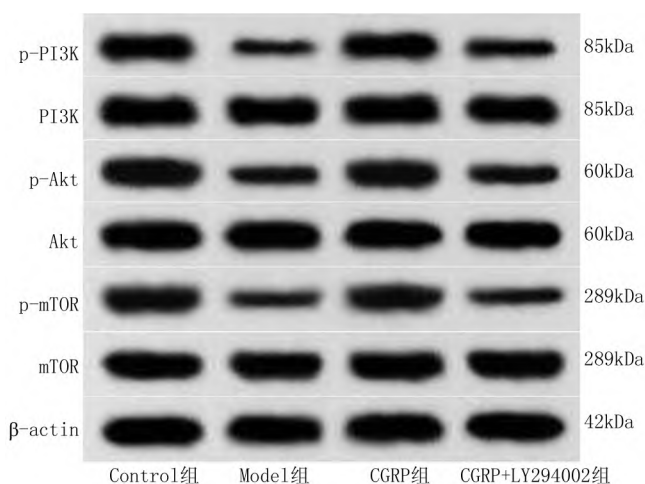


图 5 Western blot 检测 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 表达

Fig. 5 Expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, and mTOR detected by Western blot

表 5 各组大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 Comparison of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway-related proteins among groups of rats

| 组 别               | n | p-PI3K/PI3K              | p-Akt/Akt                | p-mTOR/mTOR              |
|-------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control 组         | 6 | 0.76 ± 0.08              | 0.85 ± 0.09              | 0.68 ± 0.07              |
| Model 组           | 6 | 0.29 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.34 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.23 ± 0.03 <sup>a</sup> |
| CGRP 组            | 6 | 0.68 ± 0.07 <sup>b</sup> | 0.76 ± 0.08 <sup>b</sup> | 0.61 ± 0.07 <sup>b</sup> |
| CGRP + LY294002 组 | 6 | 0.35 ± 0.04 <sup>c</sup> | 0.41 ± 0.05 <sup>c</sup> | 0.27 ± 0.03 <sup>c</sup> |
| F 值               |   | 95.652                   | 82.323                   | 109.845                  |
| P 值               |   | <0.001                   | <0.001                   | <0.001                   |

注:与 Control 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 Model 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 CGRP 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

CGRP 可缩短逃逸潜伏期,延长目标象限停留时间,改善七氟醚诱导新生大鼠产生的认知功能障碍,对其发挥神经保护作用。

氧化应激与神经元凋亡是七氟醚诱导新生大鼠产生神经毒性的主要病理机制,当新生大鼠受到长期七氟醚刺激,促使脑组织产生大量活性氧,促进脂质过氧化产物等大量产生,抑制 SOD、GSH-Px 等抗氧化活性酶的活性,导致氧化与抗氧化反应失衡,进而促使神经元发生氧化应激损伤,刺激线粒体凋亡通路促凋亡相关蛋白 Bax 表达,抑制抑凋亡相关 Bcl-2 表达,促进神经元凋亡,引发神经毒性。研究显示,降低活性氧生成及 Bax/Bcl-2 比值,促进内源性抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性,可降低神经毒素诱导的氧化损伤和凋亡,发挥神经保护作用<sup>[18]</sup>。下调 MDA 水平及 Bax 表达,升高 SOD、GSH-Px 活性和 Bcl-2 表达,可抑制氧化应激反应

及神经细胞凋亡,进而减轻锰诱导的神经毒性<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,CGRP 可下调 MDA 水平及 Bax 表达,上调 SOD、GSH-Px 活性和 Bcl-2 表达,说明其可通过抑制氧化应激及神经元凋亡,对七氟醚诱导新生大鼠产生的神经毒性发挥保护作用。

另外自噬在七氟醚诱导新生大鼠神经毒性发生过程中发挥重要作用,其中 p62、Beclin1 是参与自噬的重要蛋白。研究发现,干扰自噬通量,促进 p62 大量积累,可促进细胞凋亡,诱导神经毒性<sup>[20]</sup>。下调自噬标志物 p62 表达,上调 Beclin1 表达可抑制自噬激活,减轻海马神经元病理损伤,减轻铅诱导的神经毒性,进而提高大鼠学习记忆能力<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,CGRP 可下调 p62 表达,上调 Beclin1 表达,说明 CGRP 可抑制自噬,减轻七氟醚诱导新生大鼠产生的神经毒性。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路是中枢神经系统中重要的自噬相关通路,参与调控中枢神经系统细胞的存活、增殖分化、自噬等进程。正常生理情况下,胞内磷脂酰肌醇激酶 PI3K 被激活,然后催化膜表面磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP<sub>2</sub>)磷酸化形成磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP<sub>3</sub>),并作为第二信使促使丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 从胞浆内转移到细胞膜,随后被磷酸化,然后直接或间接磷酸化 mTOR,激活 mTOR 催化一系列自噬起始蛋白磷酸化,从而抑制自噬形成。研究显示,阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可促进神经元凋亡和自噬,促进缺血性卒中的发生<sup>[22]</sup>。而激活 PI3K/Akt/mTOR 通路可对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)损伤 SH-SY5Y 细胞发挥保护作用,进而保护缺血性脑卒中大鼠脑缺血再灌注损伤<sup>[23]</sup>。另外研究显示,激活 PI3K/Akt 信号通路可减少海马神经元细胞凋亡,改善七氟醚诱导的大鼠神经功能缺陷<sup>[24]</sup>。激活 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路可促进丙泊酚致新生大鼠海马神经元细胞损伤,引发神经毒性<sup>[25]</sup>。本研究结果显示,CGRP 可上调 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 表达,减轻七氟醚诱导新生大鼠神经毒性,推测 CGRP 可能通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路减轻七氟醚诱导新生大鼠神经毒性。故本研究对 CGRP 处理的七氟醚诱导新生大鼠进行 LY294002 处理,发现其可部分逆转 CGRP 对七氟醚诱导新生大鼠神经毒性的改善作用,说明 CGRP 可通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路减轻七氟醚诱导新生大鼠神经毒性。

综上所述,CGRP 可减轻七氟醚诱导新生大鼠神经毒性,其作用机制与激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关。本研究仍存在局限性,CGRP 对七氟醚诱导产生的神经毒性可能通过调控其他通路发挥作用,有待

后续的实验进行研究。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

李免平:提出研究思路,设计研究方案,论文撰写,论文修改;韩毅:可行性分析,实施实验过程;孙韬、雷易:实施实验过程、数据收集;刘臻、贾丽玲:进行统计学分析;张林忠:分析实验数据,论文审核

**参考文献**

- [1] Zaccariello MJ, Frank RD, Lee M, et al. Patterns of neuropsychological changes after general anaesthesia in young children:Secondary analysis of the Mayo Anesthesia Safety in Kids study[J]. Br J Anaesth, 2019, 122(5):671-681. DOI: 10.1016/j.bja.2019.01.022.
- [2] Apai C, Shah R, Tran K, et al. Anesthesia and the developing brain: A review of sevoflurane-induced neurotoxicity in pediatric populations[J]. Clin Ther, 2021, 43(4):762-778. DOI: 10.1016/j.clinthera.2021.01.024.
- [3] 邱婷, 刘志峰, 陆程翔. 降钙素基因相关肽对重症中暑大鼠脑细胞凋亡的作用研究[J]. 海南医学, 2022, 33(1):1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2022.01.001.
- [4] Song L, Yao L, Zhang L, et al. Schizandrol A protects against A $\beta$ 1-42-induced autophagy via activation of PI3K/AKT/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and primary hippocampal neurons[J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2020, 393(9):1739-1752. DOI: 10.1007/s00210-019-01792-2.
- [5] 程亮亮, 田毅, 谭义文, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探究七氟醚麻醉对大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 西北药学杂志, 2024, 39(2):47-52. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2024.02.008.
- [6] 田军. 降钙素基因相关肽(CGRP)通过调控 Akt/mTOR 信号通路介导的凋亡和自噬减轻创伤性颅脑损伤的实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2021.
- [7] 吴勇, 陈健, 陈爱鸾, 等. 微量胰岛素对七氟醚吸入麻醉诱导新生大鼠认知功能障碍的预防作用及其可能的作用机制[J]. 解剖学报, 2021, 52(6):882-888. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2021.06.007.
- [8] 邹振庄, 王少华, 黄元露, 等. 降钙素基因相关肽通过增加自噬对抗新生大鼠氧化应激性肺损伤[J]. 生理学报, 2022, 74(4):548-554. DOI: 10.13294/j.aps.2022.0057.
- [9] Gao QS, Zhang YH, Xue H, et al. Brief inhalation of sevoflurane can reduce glial scar formation after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(6):1052-1061. DOI: 10.4103/1673-5374.300456.
- [10] 孙静怡, 季雨薇, 安立新, 等. CoQ10 通过 NADPH/GPX4 抑制铁死亡减轻七氟醚对幼年大鼠发育神经毒性作用[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2024, 45(4):347-353. DOI: 10.3760/cma.j.cn321761-20230605-01008.
- [11] Suo L, Wang M. Dexmedetomidine alleviates sevoflurane-induced neurotoxicity via mitophagy signaling[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(10):7893-7901. DOI: 10.1007/s11033-020-05868-8.
- [12] Zhou HS, Cao SM, Liao HS, et al. Hirsutanol A exhibits neuroprotective activities against sevoflurane-induced neurotoxicity in aged rats[J]. Anat Rec (Hoboken), 2021, 304(3):591-601. DOI: 10.1002/ar.24473.
- [13] 赵祥坤, 田毅. 七氟醚对发育期大脑神经损伤的药物干预研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2021, 43(3):462-468. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.12732.
- [14] Russo AF, Hay DL. CGRP physiology, pharmacology, and therapeutic targets: migraine and beyond[J]. Physiol Rev, 2023, 103(2):1565-1644. DOI: 10.1152/physrev.00059.2021.
- [15] Hendrikse ER, Bower RL, Hay DL, et al. Molecular studies of CGRP and the CGRP family of peptides in the central nervous system[J]. Cephalalgia, 2019, 39(3):403-419. DOI: 10.1177/0333102418765787.
- [16] Torres-Rodríguez HF, Graniel-Amador MA, Cruz-Camacho CJ, et al. Characterization of pain-related behaviors, changes in bone microarchitecture and sensory innervation induced by chronic cadmium exposure in adult mice[J]. Neurotoxicology, 2022, 89(1):99-109. DOI: 10.1016/j.neuro.2022.01.009.
- [17] 李宏丽, 宋勇丽, 王政霖, 等. 过表达降钙素基因相关肽(CGRP)改善糖尿病小鼠周围神经病变[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(3):250-255. DOI: 10.13423/j.cnki.cjmi.008760.
- [18] Chen B, Zhao J, Zhang R, et al. Neuroprotective effects of natural compounds on neurotoxin-induced oxidative stress and cell apoptosis[J]. Nutr Neurosci, 2022, 25(5):1078-1099. DOI: 10.1080/1028415X.2020.1840035.
- [19] Tan Y, Cheng H, Su C, et al. PI3K/Akt signaling pathway ameliorates oxidative stress-induced apoptosis upon manganese exposure in PC12 cells[J]. Biol Trace Elem Res, 2022, 200(2):749-760. DOI: 10.1007/s12011-021-02687-1.
- [20] Feng R, Liu J, Yang Z, et al. Realgar-induced neurotoxicity: Crosstalk between the autophagic flux and the p62-NRF2 feedback loop mediates p62 accumulation to promote apoptosis[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(10):6001-6017. DOI: 10.1007/s12035-023-03452-2.
- [21] Wang M, Xia Y, Ai S, et al. Kaempferol improves Pb-induced cognitive impairments via inhibiting autophagy[J]. J Nutr Biochem, 2024, 125(1):109556-109566. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2023.109556.
- [22] Wang Y, Wang B, Liu Y, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by NDRG2 contributes to neuronal apoptosis and autophagy in ischemic stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2023, 32(3):106984-106994. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2023.106984.
- [23] Xian M, Cai J, Zheng K, et al. Aloe-emodin prevents nerve injury and neuroinflammation caused by ischemic stroke via the PI3K/AKT/mTOR and NF- $\kappa$ B pathway[J]. Food Funct, 2021, 12(17):8056-8067. DOI: 10.1039/d1fo01144h.
- [24] 李珍, 张颖, 屈青玲. microRNA-124 通过调控 PI3K/Akt2 信号通路改善七氟醚诱导的新生大鼠神经缺陷[J]. 解剖科学进展, 2022, 28(5):592-596. DOI: 10.16695/j.cnki.1006-2947.2022.05.021.
- [25] 杜引, 马晓真, 王龙, 等. 七叶莲花醇提取物通过调节 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路减轻丙泊酚所致新生大鼠神经毒性[J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(21):2249-2253. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2022.21.003.

(收稿日期:2024-11-05)