

## 全麻药对发育期大脑神经毒性的研究进展

宋兴荣

(广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心麻醉科, 广东 广州 510623)



作者简介:宋兴荣,博士生导师,广州市妇女儿童医疗中心麻醉科主任。中华医学会麻醉学分会委员及小儿学组副组长,广东省医师协会麻醉学分会主委。1995年获中山大学麻醉学硕士学位;1995-2009年就职于广东省人民医院心血管病研究所麻醉科;2006年赴美国麻省总医院和波士顿儿童医院学习;2009年底至今就职于广州市妇女儿童医疗中心麻醉科。擅长先心病手术、胎儿手术及重症产科手术的临床麻醉处理。研究方向为全麻药对发育大脑的神经毒性、产后抑郁及麻醉治疗学,主持多项国家及省市级科研项目,发表SCI论文多篇。E-mail: sxjess@126.com。

**摘要:**随着外科学的快速发展,手术治疗的适应症扩大,妊娠期非外科手术及婴幼儿手术的数量均不断增加。这些手术大多数需要在全身麻醉下实施,致胎儿和婴幼儿发育期的大脑不可避免地暴露于全麻药。故近年来,全麻药对发育大脑的神经毒性成为医学科学界关注和争论的热点。尤其是2016年,美国食品药品监督管理局(FDA)对临床常用全麻药添加黑框警告,造成医患及相关领域人员的困惑。因此,我们结合发育大脑的特点,对全麻药发育期神经毒性的临床前及临床研究作一阐述。

**关键词:**非外科手术;婴幼儿;发育期大脑;全麻药;神经毒性

中图分类号:R61 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2019)04-0493-10

### Research Progress of Developmental Neurotoxicity Induced by General Anesthetics

SONG Xing-rong

(Department of Anesthesiology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510623, China)

Correspondence to: SONG Xing-rong; E-mail: sxjess@126.com

**Abstract:** With the rapid development of surgery and the expansion of indications for surgical treatment, the number of non-obstetric operations during pregnancy and infant operations has been increasing. Most of these operations need to be performed under general anesthesia, and the developing brain of fetus and infants are inevitably exposed to general anesthetics. Therefore, in recent years, the neurotoxicity effects of general anesthetics on the developing brain have become the focus and controversy in the medical sciences. Especially in 2016, US Food and Drug Administration (FDA) added black box for warning of general anesthetics commonly used in clinic, which caused confusion among doctors, patients and staffs in the related fields. Therefore, we will elaborate the preclinical and clinical studies of neurotoxicity of general anesthetics in combination with the characteristics of developing brain.

**Key words:** non-obstetric surgery; infants; developing brain; general anesthetics; neurotoxicity

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(4): 493-502]

收稿日期:2019-04-30

基金项目:国家自然科学基金(81671116, 81870823);广州市科技计划项目(201803010025)

麻醉是进行手术或部分检查之前必不可少的医疗措施,据统计美国每年约10%的儿童需要在麻醉下行手术、检查等诊疗操作,其中95%为全身麻醉<sup>[1]</sup>。妊娠期非外科手术的发生率为0.75%~2.0%,大部分此类手术需要在全身麻醉下进行<sup>[2]</sup>。全麻药主要作用于N-甲基-D天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptors, NMDAR)和 $\gamma$ -氨基丁酸受体( $\gamma$ -aminobutyric acid receptors, GABA<sub>A</sub>R)。且全麻药脂溶性高,分子量小,易透过血脑屏障和胎盘。因此,全麻药可能对胎儿和婴幼儿发育的大脑具有毒性作用。近20年来,大量临床前研究表明,临床常用全麻药可致发育的大脑病理损伤,及远期行为学异常。部分临床回顾性研究也表明生命早期全麻药暴露可致远期认知功能障碍。为此,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)在2016年对全麻药和镇静药使用发出安全警告:3岁以下儿童或妊娠晚期重复或长时间(>3 h)使用全麻药和镇静药物会影响儿童大脑的发育<sup>[3]</sup>。该警告将全麻药对发育大脑的神经毒性问题推向高峰。由于机制不明,且临床数据多来源于回顾性研究,因此,FDA强烈呼吁更多的证据和明确的机制,尤其是妊娠期全麻药暴露对子代神经发育的影响。鉴于此,结合发育大脑的特点,对全麻药发育期神经毒性的临床前及临床研究作一综述。

## 1 发育期大脑的解剖及生理特性

脑发育遵循有组织的、预先确定的模式,虽然大脑在子宫内经历了最快速和最重要的物理和化学变化,但影响大脑结构的许多过程,包括突触发生和修剪、神经环路的精确化、髓鞘形成一直持续

至成年期<sup>[4]</sup>。在人类,神经细胞增殖的高峰期在5~25孕周,迁移主要发生在12~20孕周内,随神经胶质细胞的支架迁移到皮质的最终目的地。从妊娠19周到出生后4周为神经细胞快速凋亡时期,可致神经元细胞减少50%~70%。而突触发生,在妊娠20周左右开始,出生后迅速增加,在1~2岁时,突触的数量比成人多50%,称为“发育峰期”,多余的突触经过修剪使神经环路优化和精确化,大脑的髓鞘形成在妊娠中期末开始,持续至整个生命过程<sup>[5]</sup>。大脑病理损伤(如药物、毒素、缺氧等)对认知的影响,取决于发育事件发生的时间。神经发育期对损伤的易感性增加似乎与神经发育事件的关键时期一致,包括增殖、迁移、分化、凋亡、胶质细胞发生、髓鞘和突触形成等。目前全麻药对发育大脑神经毒性的造模时间点多为出生后2周内,因为这个阶段是凋亡、突触发生、胶质细胞发生和髓鞘化的关键阶段。P7是突触的“发育峰期”,因此多数研究选用P7为造模时间,可以最大程度的观察到损伤后的变化。以上脑发育过程发生的重大事件在人类的发生时间如下图所示(图1)。

## 2 全麻药作用靶点的受体在中枢神经系统内的时空性分布和功能

中枢神经系统内主要的神经递质是谷氨酸和 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid receptors, GABA)。谷氨酸受体是中枢神经系统内的兴奋性神经递质受体,离子型谷氨酸受体有两种: $\alpha$ -氨基羟甲基恶唑丙酸(AMPA-type glutamate receptors, AMPAR)和NMDAR。全麻药主要作用于NMDAR,也可作用于AMPA。NMDAR是一种电压、配体双重门控通道,由NR1、NR2和NR3亚基

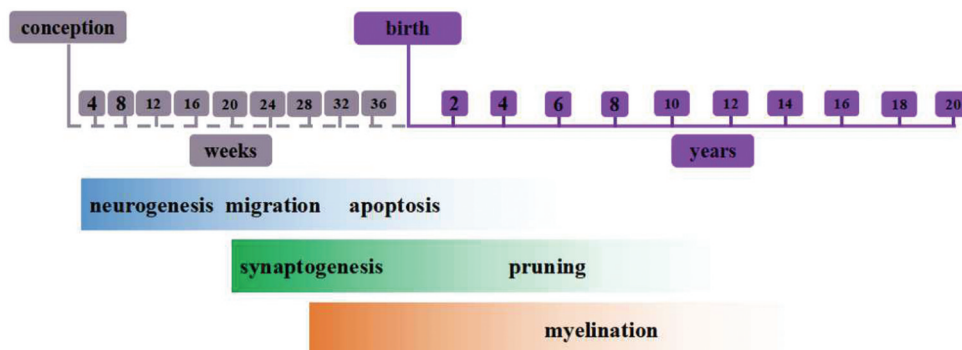


图1 人类大脑中关键神经发育事件过程的轨迹<sup>[5]</sup>

Fig.1 Key events of neural development in human brain

组成的异聚体。NMDAR亚单位组合方式的多样性是其生理学多样性的基础,如NR2B有较慢的通道动力学及较低的开放概率;NR2A具有更快的动力学、更大的通道开放概率<sup>[6]</sup>。各亚基分布在神经发育过程中具有时空性,即在发育的不同阶段和不同脑区具有不同的表达,其中NR1是受体的必须成分,在脑内各区均有分布,胚胎期NR1表达不高,出生后开始增长直至青春期。NR2A和NR2B亚基主要在前脑表达, NR2B和NR2D是胚胎时期主要的亚单位,在出生后2周, NR2A开始部分代替NR2B直到大脑成熟。突触发生和NR2B向NR2A的转换在时间上是同步的, NR2A/NR2B的比率调控树突生长、突触的发生和可塑性<sup>[7]</sup>。全麻药氯胺酮、一氧化二氮(nitrous oxide, N<sub>2</sub>O)、氙气主要通过拮抗NMDAR发挥中枢抑制作用。GABA<sub>A</sub>R是中枢神经系统中最丰富的快速抑制性神经递质受体由两个 $\alpha$ 亚基,两个 $\beta$ 或 $\theta$ 亚基,和1个 $\gamma/\delta$ 或 $\varepsilon$ 亚基组成五边形异质性多肽类寡聚体。其中GABA结合位点位于 $\beta$ 亚基、苯二氮(BDZ)位点由位于 $\alpha$ 亚基中间的Cl<sup>-</sup>门控通道组成。GABA<sub>A</sub>R亚基的表达也表现出独特时空性,如 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 亚基的表达在胚胎期占主导,而其他亚基的表达在出生后或成人大脑中占主导。 $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ 型受体的数量最多,在海马和皮质中表达丰富<sup>[8]</sup>。而 $\alpha 2/3\beta 2\gamma 2$ 型约为35%,主要分布于纹状体、海马、大脑皮质,因为每一种GABAR都具有明显的生物物理和药理特性,因而对突触传递和突触整合的影响也不同。异氟醚、七氟醚等吸入麻醉药及静脉全麻药丙泊酚、依托咪酯等主要作用于GABA<sub>A</sub>R的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 亚基,增强GABA<sub>A</sub>R对GABA的反应或直接激活(高浓度时)GABA<sub>A</sub>R,增强抑制性突触传递,改变兴奋性神经元的电兴奋性,从而产生全麻作用<sup>[9]</sup>。此外,全麻药也可不同程度地作用于其他受体和离子通道,如烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChR)、甘氨酸受体、5-羟色胺3受体(5-hydroxytryptamine-3 receptors, 5-HT<sub>3</sub>R)、钠、钾离子通道等。全麻药也可能改变许多细胞信号蛋白的功能,如蛋白激酶C,改变其下游信号传递产生血管扩张或肌肉松弛等作用<sup>[10]</sup>。在目前临床使用的全麻药中,没有任何一种是只通过对单一离子通道发挥作用的,因此每一种全麻药都是通过不同程度地改变多个作用位点来改变神经元的活

动。综合上述可知,不同全麻药对NMDAR和GABA<sub>A</sub>R作用的位点不同,即使是同一种全麻药,不同发育阶段暴露、不同剂量暴露,作用的受体位点和诱导的信号通路亦不同,因此而产生的神经生理改变也可能不同。

### 3 全麻药对发育期大脑神经毒性作用的动物研究

在神经发育早期,谷氨酸和GABA主要的作用并不是作为神经递质进行信息传递,而是作为营养因素调节大脑发育的几个重要过程,包括神经细胞增殖、迁移、分化、突触的形成和修剪,及神经网络的构建。发育中的大脑处于建立神经连接的动态状态,此时神经增殖和凋亡、迁移、轴突和突触发生均处于高速发展阶段, GABA<sub>A</sub>R和NMDAR通过不同亚型的选择性表达改变自身结构和功能,配合神经发育过程中的重要事件的发生和完成,调控神经系统的发育<sup>[11]</sup>。此外,发育期大脑血脑屏障尚未发育完全,对神经毒性物质易通透。因此,不难想象,在这时期的大脑暴露于全麻药-NMDAR拮抗剂和(或)GABA<sub>A</sub>R增强剂,可干扰神经发育的微环境,阻断神经元活动致神经细胞丢失、分化和迁移异常、神经元超微结构的损伤,及远期神经行为学的异常。

早在20世纪70年代,已经有全麻药神经毒性的研究,主要来源于医护人员的职业暴露和全麻药生殖毒性研究,如Uemura等<sup>[12]</sup>发现妊娠期氟烷暴露致子代鼠突触成熟延迟和行为缺陷,但并未引起重视。且当时使用的氟烷等全麻药很快被新药所替代,比如全麻药氯胺酮,具有良好的镇痛、镇静作用,在麻醉剂量下呼吸循环稳定,因此在婴幼儿麻醉中,具有无可替代的优势。但1999年, Ikonomidou等<sup>[13]</sup>研究发现新生鼠及妊娠晚期氯胺酮暴露致神经细胞广泛凋亡,这一结果引起研究者们强烈关注。紧接着他们发现新生鼠和妊娠期乙醇暴露亦可致神经细胞凋亡显著增加<sup>[14]</sup>。乙醇和全麻药的主要作用靶点相同,即NMDAR和/或GABA<sub>A</sub>R,因此研究者们很容易联想到其他全麻药是否也具有和氯胺酮、乙醇相似的神经毒性。2003年Jevtovic-Todorovic等<sup>[15]</sup>用临床儿科常用的全麻药组合(咪达唑仑、氧化亚氮、异氟烷)麻醉出生后7 d(postnatal day, P)的大鼠,以外科手

术水平的麻醉深度维持6 h,结果显示多个脑区神经元凋亡显著增加,且成年后学习记忆能力受损。这一研究结果让学术界震惊,也使全麻药发育期神经毒性成为相关研究领域的热点。自此,大量在体和离体实验对多种全麻药进行研究,确认了“损伤”这一事实:从线虫到非人类灵长动物的相关研究几乎复制了所有常见的NMDAR拮抗剂和(或)GABA<sub>A</sub>R增强剂引起的急性神经退行性变、永久的神经病理学改变和远期的神经行为损害结果<sup>[16]</sup>。病理学改变包括多个脑区广泛的细胞凋亡,神经发生和神经增殖的抑制,突触和树突棘数量和形态的改变,胶质细胞骨架结构损害等<sup>[17]</sup>。其中,凋亡现象是引起全麻药对发育大脑毒性的最早线索,也是最为广泛确认的结果。最早的两个具有里程碑意义的研究,分别是1999年Ikonomidou等<sup>[13]</sup>及2003年Jevtovic-Todorovic等<sup>[15]</sup>的研究。此后很多研究确认了这一结果,并且在非人灵长类动物得到证实,如Slikker等<sup>[18]</sup>采用静脉氯胺酮麻醉妊娠122 d、P5、P35的恒河猴,暴露时间为24 h或3 h。结果显示24 h组胎儿和P5新生猴的大脑对氯胺酮诱导的神经细胞凋亡比P35的大脑更敏感;且较短的氯胺酮暴露时间(3 h)未导致P5恒河猴神经细胞的凋亡,这表明凋亡效应和暴露阶段、暴露时间有关。进一步的对比研究发现,新生恒河猴静脉给予氯胺酮持续5 h即可引起显著的凋亡<sup>[19]</sup>。同样地,中等外科手术麻醉水平的异氟醚(1.5%)、丙泊酚暴露5 h,亦可致发育期恒河猴大脑多个脑区显著凋亡<sup>[20]</sup>。全麻药引起的神经细胞凋亡有两条激活途径:内源性通路(或线粒体依赖通路)和外源性通路(或受体依赖通路),据报道全麻药对线粒体或内质网的损伤尤为严重。除了激活线粒体依赖的凋亡途径,全麻药也可通过氧自由基的过度生成,致粒体融合和分裂异常,使线粒体动力学和能量代谢异常<sup>[21]</sup>。如前所述,凋亡是神经发育早期必须的事件,但这不排除全麻药暴露后观察到的凋亡神经细胞,本来已处于程序性凋亡的早期阶段,因此对全麻药暴露更为敏感,全麻药的暴露加速了程序性凋亡的速度,致短时间内凋亡显著增加。而且,目前尚不能证明发育早期短暂的凋亡增加和认知障碍是否有直接的因果关系。神经细胞数量的减少可能是因为凋亡增加,和/或神经发生和神经增殖受到抑制。确实,在体研究和离体研究的结果均

表明,临床相关浓度的全麻药暴露均可抑制神经细胞的发生或增值<sup>[22]</sup>。但是,也有研究表明低浓度的七氟醚(1.2%)暴露6 h,显著增加海马区神经增殖,因此,全麻药对神经发生的影响亦依赖于暴露的剂量和时间<sup>[23]</sup>。海马区出生后的神经发生参与空间学习记忆、情绪调节等高级认知功能,全麻药所致持久的神经增殖抑制是其远期学习记忆及情绪障碍的原因之一。

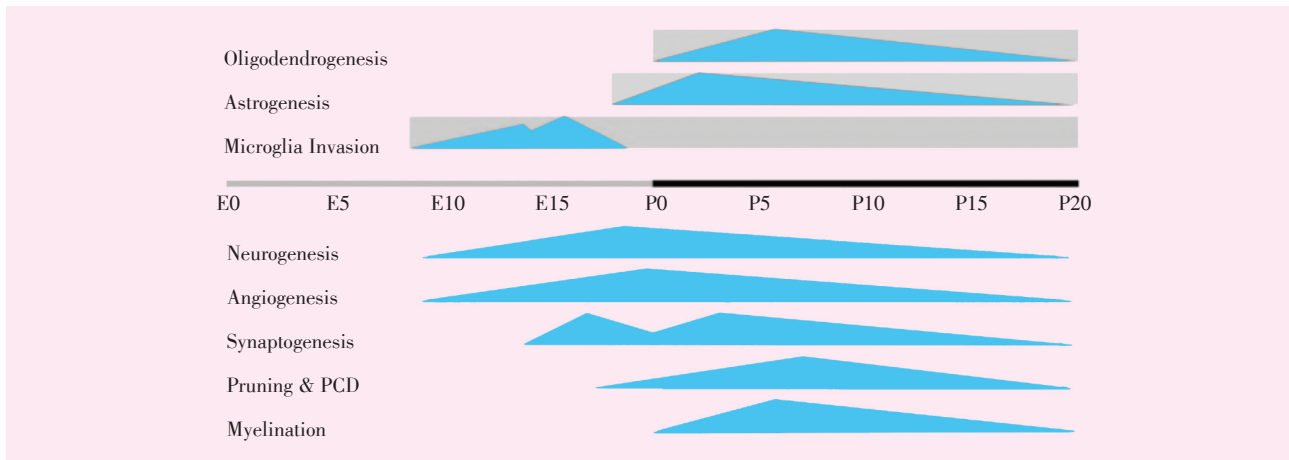
突触是神经元之间进行信息传递的结构基础,神经元功能和认知的发展取决于神经元之间突触连接的形成和神经环路的精确化。突触是神经环路可塑性最易变的环节和关键部位,大部分(>90%)兴奋性突触定位于树突棘。在整个生命过程中,树突棘的数量和形态呈现复杂且有序的动态变化,出生后早期树突棘数量迅速增加,这一阶段也是突触发生和神经环路形成的高峰期。随后在青少年进入树突棘的修剪期,这一阶段和神经环路的精确化有关。树突棘的变化不仅是学习与记忆在突触水平的关键机制,而且自闭症、精神分裂症等神经系统疾病病变的重点部位<sup>[24]</sup>。树突棘发育过程中受到一系列信号分子精确的时空性调控,如GABA<sub>A</sub>R、NMDAR、细胞内钙、神经营养因子、突触粘附分子等,并受神经电活动的调控。因此,发育早期全麻药暴露改变改变树突棘的“成长轨迹”,表现为数量和形态的变化。如Briner<sup>[25]</sup>等的研究表明,给予不同年龄阶段(P5、P10、P15、P20、P30)的大鼠间断腹腔注射丙泊酚维持深度镇静6 h,一个月后发现,P5和P10暴露的大鼠内侧前额叶皮层的第5层锥体神经元树突棘密度显著降低,而P15、P20、P30暴露的大鼠,该区域树突棘的密度显著增加,且异丙酚诱导的树突棘密度改变持续至P90。这表明,异丙酚暴露对大鼠树突棘的损害呈年龄依赖性,且损害一直持续至成年。Head<sup>[26]</sup>等的研究进一步表明,异氟醚和丙泊酚对树突棘的抑制可能和BDNF有关,通过营养因子受体P75及下游的RhoA信号通路,致肌动蛋白解聚,轴突运输障碍。同样,P16大鼠进行异氟醚(1.5%)、七氟醚(2.5%),或地氟醚(7%)麻醉30 min、60 min、120 min,并没有导致显著的凋亡,但著增加前额叶皮质第5锥体神经元树突棘的密度<sup>[25]</sup>。这些研究说明,树突棘快速发生阶段和树突棘修剪阶段暴露,对树突棘可塑性的影响是不同的,抑制树突棘发生将导致树突棘密度下降;

但在修剪期, GABA<sub>A</sub>R 依赖的信号是阻止树突棘的过度修剪的信号, 对树突棘修剪起“刹车”作用, 且在青春期, GABA 信号可促进树突棘发生<sup>[27]</sup>。

目前大部分的研究集中在谷氨酸能锥体神经元, 对中间能神经元研究较少, GABA 能信号调控中间能神经元的迁移和分化, 因此宫内全麻药暴露可能会干扰中间能神经元的迁移和分化等过程。且中间能神经元和锥体神经元之间形成广泛的电、化学突触相联系, 调控抑制性信息传递, 在整个皮层神经环路中起重要的调控和整合作用。中间能神经元的发育异常, 致皮质兴奋/抑制失调, 是多种神经发育性疾病(如自闭症、精神分裂症等)的重要机制<sup>[28]</sup>。出生后全麻药暴露有可能损害中间能神经元, 导致兴奋/抑制失调和神经环路异常。很遗憾, 目前对于这一可能的神经毒性机制研究尚未发现有报道。非神经细胞包括胶质细胞(星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞)和血脑屏障的研究较少。事实上, 这些神经细胞对于大脑的发育和稳态非常重要。星形胶质细胞是神经递质合成代谢及营养因子生产的重要场所, 而且通过各种分泌和直接接触介导的信号, 强有力地控制突触的形成、成熟、和消除, 参与许多由突触缺陷引起的精神和神经疾病的病理生理过程<sup>[29]</sup>。星形胶质细胞发育和少突胶质细胞的发育高峰期分布为出生后 1~2 周和 2~3 周。小胶质细胞的发育高峰期在宫内阶段(图 2)。非神经细胞中星形胶质细胞数量最多, 来源于神经细胞系, 在神经发育早期, 神经上皮细胞转变为放射状胶质细胞, 随着神经元迁移和定位接近尾声, 放射状胶质细胞逐渐转变为星形胶质细胞<sup>[30]</sup>。星形胶质细胞发育过程中的神经上皮细胞、放射状胶质细胞以及未成熟星形胶质细胞膜上均有 GABA<sub>A</sub>R 受体, 且大脑发育早期主要是 GABA<sub>A</sub>R 活动形成的兴奋性神经环路, 这些 GABA<sub>A</sub>R 对外源性 GABA 等化学药物及环境改变非常敏感, 研究表明 GABA<sub>A</sub>R 的活动和稳定可影响放射状胶质细胞的分化<sup>[31]</sup>。因此, 宫内暴露和出生后暴露对星形胶质细胞的影响及机制可能不同。多项研究表明, 麻醉暴露会改变出生后早期星形胶质细胞的正常发育, 在组织培养中, 未成熟星形胶质细胞暴露于 3% 异氟醚 24 h 后, 其形态学上发生了类似于星形胶质细胞延迟成熟的变化, 这种效应只存在于未成熟的星形胶质细胞中, 对

成熟星形胶质细胞培养无明显影响<sup>[32]</sup>。而且, 星形胶质细胞暴露于异氟醚后, 再与新生神经元共同培养, 无法促进和支持正常的轴突生长<sup>[33]</sup>。同样, P7 大鼠暴露 2.5% 七氟醚 6 h, 星形胶质细胞的表达显著下降<sup>[34]</sup>。关于全麻药对少突胶质细胞毒性的文献很少, 已有的研究是在非人类灵长类动物中进行的。作者将 P6 的猕猴暴露于临床麻醉剂量的异氟醚中 5 h, 并在暴露后 3 h 收集它们的大脑, 其中 52% 的凋亡细胞为少突胶质细胞, 且最易受影响的是正在髓鞘形成的少突胶质细胞<sup>[35]</sup>。胎儿或新生恒河猴丙泊酚暴露 5 h, 得到同样的结论<sup>[20]</sup>。小胶质细胞被认为是大脑中的免疫细胞, 不仅是促炎细胞因子的主要来源, 而且在调控神经元的增殖、突触的发生和修剪过程中发挥着关键的作用。研究表明, P6 的小鼠, 3% 七氟醚暴露 2 h, 连续 3 d, 海马区小胶质细胞激活, 且 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著升高<sup>[36]</sup>。由于胶质细胞的形态异常和功能障碍可影响神经细胞发育和神经环路的形成, 因此, 非神经细胞和神经细胞对全麻药损害的敏感性、时间先后、相互的因果关系和暴露阶段和剂量有关, 尚需要进一步的研究证实。这需要精心设计多个时间点进行系统观察, 但是目前大多数的研究只涉及的某一个时间点, 这难以体现神经发育过程的动态性和联系性。

全麻药神经毒性的神经行为损害结果主要表现为认知功能受损, 如学习记忆的损害。Jevtic-Todorovic<sup>[15]</sup>等研究对 7 d 龄幼鼠给予儿科常用全麻药组合(咪达唑仑, 氧化亚氮和异氟醚)维持手术水平的麻醉深度 6 h, 首次系统地采用多个行为学观察全麻药暴露对远期行为学的影响, 感觉运动及听觉均无异常, 麻醉组大鼠表现出持续的学习和记忆障碍<sup>[22]</sup>。此后多个研究重复了这一结果, 包括妊娠期全麻药暴露对子代远期认知功能的影响, 如妊娠期 14 d, 1.3% 的异氟醚暴露 4 h, 子代表现出空间学习和记忆的缺损<sup>[37-38]</sup>。Paule<sup>[39]</sup>等给新生恒河猴持续静脉注射氯胺酮 24 h, 维持相当于轻度外科水平的麻醉深度, 通过测试颜色辨别、动机、学习、短期记忆、发现氯胺酮暴露组恒河猴得分明显低于对照组, 且这种缺陷一直持续至 3 岁。值得关注的是, 也有少数研究关注远期情绪异常如焦虑、抑郁<sup>[22, 40]</sup>。认知障碍和情绪障碍的关系复杂, 或互为因果, 或并存而共同发生发展。情绪异常的很多疾病如抑郁等与认知障碍共



Rectangles indicate the estimated periods during/through which microglia, astrocytes and oligodendrocytes remain present in the brain. Triangles indicate the onset and peaks of the indicated developmental processes. Age(days) E=Embryonic day P=Postnatal day PCD=programmed cell death

图2 胶质细胞入侵、胶质生成和其他神经发育过程中的重要事件<sup>[37]</sup>

Fig.2 Timeline of microglia invasion, gliogenesis and several developmental processes in the developing mouse brain

存或并发,认知障碍可能只是情绪障碍发展到一定阶段的症状<sup>[41]</sup>。本课题组研究发现妊娠14 d的大鼠,静脉持续泵注深度镇静水平的氯胺酮2 h,通过多个行为学测试,结果显示,氯胺酮组子代鼠表现出抑郁和焦虑样情绪异常并认知功能损害<sup>[40]</sup>。新生猴多次七氟醚或异氟醚麻醉,半年后及一年后行为学测试表明,暴露组焦虑相关行为显著增加,社交-情感行为显著异常<sup>[42]</sup>。情绪异常是全麻药发育期大脑神经毒性后果非常重要的一个方面,或者是更为严重的损害,但是目前这方面的研究非常少,有待进一步深入研究。

综合上述,临床前研究和离体研究体系已经确认全麻药对发育大脑的神经毒性作用,且损伤程度和暴露阶段、暴露剂量即暴露次数相关,这种以年龄、性别、麻醉剂量依赖的研究方式为全麻药物对发育大脑的影响提供了非常有价值的信息。但是,动物实验的数据不能直接外推应用于人类,人类也无法像动物研究一样,对暴露于全麻后的脑组织进行组织学检查,也无验证大脑损伤的直接可靠血清学标志,及敏感直观的影像学技术来检查凋亡和超微结构改变。故在动物研究中的发现是否适用于人类有待进一步验证。

#### 4 全麻药对发育大脑影响的临床研究

自2009年,与此相应的临床研究逐渐多起来。回顾性队列研究表明,新生儿期的大手术与

神经发育不良之间存在关联<sup>[43]</sup>。与一般人群相比,出生时患有食道闭锁儿童的远期学习和不良情绪行为增加<sup>[44]</sup>。2009年,Wilder等<sup>[45]</sup>使用梅奥诊所的大规模出生队列,比较在4岁之前接受过手术或没有接受过手术的儿童,他们发现学习障碍的风险随着孩子接受的麻醉药物增加而增加。但是,没有证据表明只接受一次麻醉暴露会增加学习障碍风险。当对慢性疾病进行调整时,学习障碍与多次接触麻醉药之间的关系仍然存在。Di Maggio等<sup>[46]</sup>使用纽约医疗援助记录进行了一项队列研究,比较在3岁前接受疝修补术的儿童与未接受手术治疗的儿童。在调整了几个潜在混杂因素后,他们发现接受疝修补术的儿童患有行为或发育障碍的风险是未接受手术儿童的两倍。

GAS是目前唯一一项比较婴儿期不同麻醉方式对发育大脑影响的国际性、前瞻性的随机对照等效性试验,从澳大利亚,意大利,美国,英国,加拿大,荷兰和新西兰的28家医院招募了矫正胎龄小于60周、孕周大于26周,并接受过腹股沟疝修补术的婴儿。婴儿被随机分配(1:1)接受清醒局部麻醉或七氟醚全身麻醉。以两个或四个为一组进行随机化分组,并按出生时的部位和孕龄进行分层。如果婴儿存在神经损伤的危险因素,则将其排除在外。该试验的主要结果是5岁时韦克斯勒学前儿童智力量表Ⅲ(WPPSI-Ⅲ)的全智能智商评分,次要结果是2岁时Bayley量表的综合认知得分。2007年2月9日至2013年1月31日期间,

363名婴儿被随机分配接受清醒局部麻醉,359名全身麻醉,全身麻醉组麻醉的中位持续时间为54 min。2015年,该团队将随访至2岁的研究结果发表至Lancet,纳入研究的包括清醒局麻组的238名儿童和全身麻醉组的294名儿童,结果表明:与清醒局部麻醉相比,婴儿期间不到1h的七氟醚全身麻醉不会增加2岁时不良神经发育结局的风险<sup>[47]</sup>。2019年2月,该团队在Lancet发表了随访至5岁的结果,纳入研究的包括清醒局麻组的205名儿童和全身麻醉组的242名儿童。研究者发现:与清醒局部麻醉相比,早期婴儿接受不到1h的全身麻醉不会改变5岁时的神经发育结局<sup>[48]</sup>。然而GAS研究纳入对象多为男性,对女性的影响还需进一步探讨。儿童麻醉中常使用多种全麻药物,而该试验只使用了七氟醚,这可能会限制研究结果的普遍性。另外,一些更晚期才会发展的执行或社交能力,可能在儿童5岁时还无法发现是否有影响。

PANDA是一项目前规模最大的通过详尽的神经发育测试评估认知功能预后的同胞匹配队列研究,观察健康幼儿单次麻醉是否与儿童晚期神经认知发育受损和行为异常有关。在2009年5月至2015年4月期间,暴露组的婴幼儿在3岁前接受腹股沟疝修补手术时单次暴露于全身麻醉,未暴露组的婴幼儿没有麻醉暴露。纳入105对同胞对,目前为8~15岁。通过回顾性记录的麻醉暴露数据从而前瞻性评估神经认知功能和行为结果。所有暴露的儿童均接受吸入麻醉剂,麻醉持续时间为20~240 min,中位持续时间为80 min。研究发现:同胞对在记忆/学习,运动/处理速度,视觉空间功能,注意力,执行功能,语言或行为之间的平均得分没有统计学上的显著差异。因而得出结论:在3岁前单次麻醉暴露的健康儿童中,与没有麻醉暴露的健康兄弟姐妹相比,儿童晚期的智商分数没有统计学上的显著差异<sup>[49]</sup>。需要进一步研究多次暴露、长时间暴露和易感人群。

MASK检验了这样的假设,即3岁前多次麻醉暴露,与不良神经发育结局相关。采用倾向性匹配分层方法,将入组患儿分为无麻醉暴露、3岁前单次麻醉和3岁前多次麻醉组。此前该团队的回顾性队列研究表明,多次麻醉暴露引起学习障碍的发生率高于单次麻醉<sup>[45]</sup>。为更新该结果,回顾性MASK研究纳入1996~2006年出生,就读于美国

罗切斯特校区的学生,其中无麻醉暴露组465例,单次麻醉组466例,多次麻醉组126例,评估其学习和行为情况。初步结果表明,多次麻醉可引起学习障碍和注意缺陷多动障碍,与上世纪70年代的研究有相同结论,也就是说,尽管麻醉药物和术中监测技术均在进步,早期接受全麻手术依然可能损伤认知功能。前瞻性MASK研究纳入1994年至2007年在明尼苏达州奥姆斯特德县出生的儿童,分为未暴露、单次暴露和多次暴露组,并在8至12岁或15至20岁时进行神经心理学测试。总共有997名儿童完成了测试(411名未暴露,380名单次暴露和206名多次暴露)。主要结果是Wechsler智力简化量表的全面智商标准评分,次要结果包括个别领域的综合神经心理学评估和家长报告。结果显示,各组间智商的主要结果没有显著差异;多次暴露和单独暴露的儿童分别比未暴露的儿童得分低1.3分(95% CI, -3.8~1.2;  $P=0.32$ )和0.5分(95% CI, -2.8~1.9;  $P=0.70$ )。对于次要结果,处理速度和精细运动能力在多次暴露儿童中降低;其他领域没有差异。多次暴露儿童的父母报告:与执行功能、行为和阅读相关的问题增多。结论:3岁前的麻醉暴露与一般智力的主要结果缺陷无关。虽然必须谨慎解释次要结果,但他们提出的假设是,多次暴露与行为和学习困难的特定神经心理学领域的变化相关<sup>[50]</sup>。这项研究给出了一个让临床医生和家庭比较放心的结论:3岁前的麻醉暴露与智力缺陷无关。但发现多次暴露与处理速度的适度降低和精细的运动协调有关。家长报告中发现,多次暴露在麻醉下的儿童在行为和阅读方面更有困难,因此需要更多的研究去探索麻醉暴露与可能会导致学习和行为障碍的损伤模式间的关联。

GAS、PANDA和MASK是现有的三个深具影响力的人群研究,都表明单次短时间接受全身麻醉并不会对婴幼儿的神经发育产生不良影响。这一发现意味着,不再需要因担忧麻醉风险,而让儿童承受延迟手术所带来的潜在风险。但是婴幼儿时期的不良神经发育受到多种风险因素和保护因素的综合作用,包括遗传因素、医疗环境、家族和环境条件等。此外,参与研究的大多是男孩,对女孩的影响还需要更多研究来确认。而最重要的是,这一结论无法拓展到长期接触全身麻醉,或在同一台手术中接受多种全麻药的儿童。因此,

课题组在2018年4月和广州市出生队列共同开展了“儿童长时间或多次全麻暴露与认知发育的队列研究”(http://www.chictr.org.cn/showproj.aspx?proj=23418)。有望进一步明确婴幼儿长时间全麻药暴露对远期认知功能的影响。

## 5 小 结

关于全麻药对发育大脑神经毒性的研究越来越多,在动物实验中多数都证实了全麻药的神经毒性,但这些结果与临床研究不一致,说明动物实验的结论并不能直接外推至人类。首先,人类与动物的大脑结构与生理存在差异,人类的大脑结果比动物的相对复杂得多,人类与动物大脑发育存在时间和空间上的差异,需要进行进一步的比较才能得出更具说服力的结果;其次,发育早期的神经具有易损性,但同时也具体最强的可塑性,尤其在人类,早期的环境丰富、康复训练、专项培训等均可使认知功能得到显著提高。此外,虽然临床前数据显示,在没有疼痛刺激的情况下,全麻药暴露与幼年动物神经认知能力下降之间存在着强有力的关联,和这个数据对应的临床情况如门诊中深度镇静剂下行磁共振成像、心脏超声检查,以

及在重症监护室需要连续镇静的情况。但这个模型并不能很好地模拟手术疼痛刺激情况下的全麻药暴露。因为生命早期未经治疗的痛苦经历、不良精神刺激与神经可塑性变化有关,会导致生命后期对有害刺激产生痛觉过敏、增加神经精神疾病和人格障碍的发生。且疼痛也能引起大鼠发大脑多个脑区的凋亡,尤其是丘脑、下丘脑和杏仁核的凋亡,从而导致神经发育和记忆受损。临床前实验表明,全麻药氯胺酮、七氟醚等可减轻与疼痛相关的认知功能障碍,具有神经保护作用。因此,对于不可避免的手术治疗,疼痛造成的损害作用大于全麻药可能的神经毒性,使用全麻药麻醉师用不仅是必须的,更是利大于弊的。这要求麻醉医师面对这一临床问题的时候,综合考虑和衡量,不可“因噎废食”,延误必要的手术治疗。最后,目前尚缺乏妊娠期全麻药暴露对子代神经发育的影响、婴幼儿时期长时间全麻药暴露对远期行为影响的临床数据,需要进一步精心设计临床研究,以明确宫内暴露和长时间暴露对神经发育的影响,只有当临床和动物实验的结论达到一致时,关于全麻药对发育大脑的神经毒性才能更具说服力。

### 参考文献

- [1] Wanderer JP, Rathmell JP. Complex information for anesthesiologists presented quickly and clearly [J]. *Anesthesiology*, 2014, 120(6): A23.
- [2] Goodman S. Anesthesia for nonobstetric surgery in the pregnant patient [J]. *Semin Perinatol*, 2002, 26(2): 136-145.
- [3] Pinyavat T, Saraiya NR, Chen J, et al. Anesthesia exposure in children: Practitioners respond to the 2016 fda drug safety communication [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2019, 31(1): 129-133.
- [4] Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development [J]. *Neuropsychol Rev*, 2010, 20(4): 327-348.
- [5] Tymofiyeva O, Hess CP, Xu D, et al. Structural microneurotome in development: Challenges of the changing brain [J]. *Br J Radiol*, 2014, 87(1039): 20140086.
- [6] Hadzic M, Jack A, Wahle P. Ionotropic glutamate receptors: Which ones, when, and where in the mammalian neocortex [J]. *J Comp Neurol*, 2017, 525(4): 976-1033.
- [7] Lujan R, Shigemoto R, Lopez-Bendito G. Glutamate and gaba receptor signalling in the developing brain [J]. *Neuroscience*, 2005, 130(3): 567-580.
- [8] Jembrek MJ, Vlainic J. Gaba receptors: Pharmacological potential and pitfalls [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(34): 4943-4959.
- [9] Garcia PS, Kolesky SE, Jenkins A. General anesthetic actions on gaba(a) receptors [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2010, 8(1): 2-9.
- [10] Yu J, Tokinaga Y, Ogawa K, et al. Sevoflurane inhibits angiotensin ii-induced, protein kinase c-mediated but not  $ca^{2+}$ -elicited contraction of rat aortic smooth muscle [J]. *Anesthesiology*, 2004, 100(4): 879-884.
- [11] Janssens N, Lesage AS. Glutamate receptor subunit

- expression in primary neuronal and secondary glial cultures [J]. *J Neurochem*, 2001, 77 (6) : 1457-1474.
- [12] Uemura E, Levin ED, Bowman RE. Effects of halothane on synaptogenesis and learning behavior in rats [J]. *Exp Neurol*, 1985, 89(3) : 520-529.
- [13] Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, et al. Blockade of nmda receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain [J]. *Science*, 1999, 283 (5398) : 70-74.
- [14] Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome [J]. *Science*, 2000, 287(5455) : 1056-1060.
- [15] Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(3) : 876-882.
- [16] Vutskits L, Xie Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: Mechanisms and relevance [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(11) : 705-717.
- [17] Crosby G, Culley DJ, Patel PM. At the sharp end of spines: Anesthetic effects on synaptic remodeling in the developing brain [J]. *Anesthesiology*, 2010, 112 (3) : 521-523.
- [18] Slikker W, Jr, Zou X, Hotchkiss CE, et al. Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 98(1) : 145-158.
- [19] Zou X, Patterson TA, Divine RL, et al. Prolonged exposure to ketamine increases neurodegeneration in the developing monkey brain [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27(7) : 727-731.
- [20] Creeley C, Dikranian K, Dissen G, et al. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain [J]. *Br J Anaesth*, 2013, 110(S1) : i29-i38.
- [21] Sanchez V, Feinstein SD, Lunardi N, et al. General anesthesia causes long-term impairment of mitochondrial morphogenesis and synaptic transmission in developing rat brain [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(5) : 992-1002.
- [22] Jevtovic-Todorovic V, Absalom AR, 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.
- [23] Chen X, Zhou X, Yang L, et al. Neonatal exposure to low-dose (1.2%) sevoflurane increases rats' hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity in later life [J]. *Neurotox Res*, 2018, 34(2) : 188-197.
- [24] Spruston N. Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(3) : 206-221.
- [25] Briner A, De Roo M, Dayer A, et al. Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during synaptogenesis [J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(3) : 546-556.
- [26] Head BP, Patel HH, Niesman IR, et al. Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology*, 2009, 110 (4) : 813-825.
- [27] Oh WC, Lutz S, Castillo PE, et al. De novo synaptogenesis induced by gaba in the developing mouse cortex [J]. *Science*, 2016, 353(6303) : 1037-1040.
- [28] Ansen-Wilson LJ, Lipinski RJ. Gene-environment interactions in cortical interneuron development and dysfunction: A review of preclinical studies [J]. *Neurotoxicology*, 2017, 58 : 120-129.
- [29] Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(5) : 311-321.
- [30] Namihira M, Nakashima K. Mechanisms of astrocytogenesis in the mammalian brain [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23(6) : 921-927.
- [31] Velez-Fort M, Audinat E, Angulo MC. Central role of gaba in neuron-glia interactions [J]. *Neuroscientist*, 2012, 18(3) : 237-250.
- [32] Lunardi N, Hucklenbruch C, Latham JR, et al. Isoflurane impairs immature astroglia development in vitro: The role of actin cytoskeleton [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(4) : 281-291.
- [33] Ryu YK, Khan S, Smith SC, et al. Isoflurane impairs the capacity of astrocytes to support neuronal development in a mouse dissociated coculture model [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2014, 26(4) : 363-368.
- [34] Wang W, Lu R, Feng DY, et al. Sevoflurane inhibits glutamate-aspartate transporter and glial fibrillary acidic protein expression in hippocampal astro-

- cytes of neonatal rats through the janus kinase/signal transducer and activator of transcription (jak/stat) pathway[J]. *Anesth Analg*, 2016, 123(1):93-102.
- [35] Brambrink AM, Back SA, Riddle A, et al. Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(4):525-535.
- [36] 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.
- [37] Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, et al. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development [J]. *Front Hum Neurosci*, 2016, 10: 566.
- [38] Kong F, Xu L, He D, et al. Effects of gestational isoflurane exposure on postnatal memory and learning in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(1): 168-174.
- [39] Paule MG, Li M, Allen RR, et al. Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2011, 33(2):220-230.
- [40] Zhao T, Li Y, Wei W, et al. Ketamine administered to pregnant rats in the second trimester causes long-lasting behavioral disorders in offspring [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 68: 145-155.
- [41] Okon-Singer H, Hendler T, Pessoa L, et al. The neurobiology of emotion-cognition interactions: Fundamental questions and strategies for future research [J]. *Front Hum Neurosci*, 2015, 9: 58.
- [42] Raper J, Alvarado MC, Murphy KL, et al. Multiple anesthetic exposure in infant monkeys alters emotional reactivity to an acute stressor [J]. *Anesthesiology*, 2015, 123(5):1084-1092.
- [43] Walker K, Holland AJ, Winlaw D, et al. Neurodevelopmental outcomes and surgery in neonates [J]. *J Paediatr Child Health*, 2006, 42(12):749-751.
- [44] Bouman NH, Koot HM, Hazebroek FW. Long-term physical, psychological, and social functioning of children with esophageal atresia [J]. *J Pediatr Surg*, 1999, 34(3):399-404.
- [45] Wilder RT, Flick RP, Sprung J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4):796-804.
- [46] Di Maggio C, Sun LS, Kakavouli A, et al. A retrospective cohort study of the association of anesthesia and hernia repair surgery with behavioral and developmental disorders in young children [J]. *Journal of neurosurgical anesthesiology*, 2009, 21(4): 286-291.
- [47] Davidson AJ, Disma N, de Graaff JC, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years of age after general anaesthesia and awake-regional anaesthesia in infancy (gas): An international multicentre, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2016, 387(10015):239-250.
- [48] McCann ME, de Graaff JC, Dorris L, et al. Neurodevelopmental outcome at 5 years of age after general anaesthesia or awake-regional anaesthesia in infancy (gas): An international, multicentre, randomised, controlled equivalence trial [J]. *Lancet*, 2019, 393(10172):664-677.
- [49] Sun LS, Li G, Miller TL, et al. Association between a single general anesthesia exposure before age 36 months and neurocognitive outcomes in later childhood [J]. *Jama*, 2016, 315(21):2312-2320.
- [50] Warner DO, Zaccariello MJ, Katusic SK, 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.

(编辑 余菁)