

论著·基础研究

长链非编码 RNA *Peg13* 在七氟烷所致的发育期原代神经元凋亡中的作用

蒋云凤, 程燕咏, 孙 宇

上海交通大学医学院附属第九人民医院麻醉科, 上海 200011

[摘要] **目的**·研究长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) *Peg13* (paternally expressed 13) 在七氟烷所致的发育期原代神经元凋亡中的作用。**方法**·以胎龄为 14.5 d 的小鼠胎鼠的原代神经元为研究对象, 实时定量 PCR 检测七氟烷处理不同时间后 lncRNA *Peg13* 的表达水平。荧光原位杂交实验检测 lncRNA *Peg13* 在原代神经元中的定位。构建 lncRNA *Peg13* 过表达和敲减质粒, 分别转染原代神经元。4.1% 的七氟烷处理 6 h 后, 荧光显微镜观察原代神经元的形态改变; 采用 CCK-8 分析原代神经元的活力; 采用 TUNEL、Western blotting 检测原代神经元的凋亡程度。**结果**·在七氟烷处理的原代神经元中, lncRNA *Peg13* 的表达水平呈时间依赖性下降。lncRNA *Peg13* 在原代神经元的细胞质和轴突中广泛表达。过表达 lncRNA *Peg13* 可明显缓解七氟烷处理所致的神经元形态改变, 导致神经元活力提高, 凋亡细胞比例减少, Bcl-2、Bax 蛋白表达量的比值 (Bcl-2/Bax) 升高, caspase-3 的表达水平降低。敲减 lncRNA *Peg13* 可明显加剧七氟烷处理所致的神经元形态改变, 导致神经元活力降低, 凋亡细胞比例增加, Bcl-2/Bax 降低, caspase-3 的表达水平升高。**结论**·lncRNA *Peg13* 能够缓解七氟烷诱导的发育期原代神经元的凋亡。

[关键词] 七氟烷; 长链非编码 RNA *Peg13*; 发育期原代神经元; 细胞活性; 细胞凋亡

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.05.006 **[中图分类号]** R614 **[文献标志码]** A

Role of long non-coding RNA *Peg13* in apoptosis of developing primary neurons following sevoflurane injury

JIANG Yun-feng, CHENG Yan-yong, SUN Yu

Department of Anesthesiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the role of long non-coding RNA (lncRNA) *Peg13* (paternally expressed 13) in the apoptosis of developing primary neurons following sevoflurane injury. **Methods**·Primary neurons were prepared from fetal mice with 14.5 d of gestational age. The expression of lncRNA *Peg13* after sevoflurane treatment was detected by quantitative PCR. The localization of lncRNA *Peg13* in primary neurons was detected by *in situ* hybridization. *Peg13* overexpression and knockdown plasmids were constructed and transfected into primary neurons. The morphology of primary neurons was observed by fluorescence microscope. Cell viability was assessed by CCK-8 assay. Cell apoptosis was determined by TUNEL assay and Western blotting. **Results**·The expression of lncRNA *Peg13* in primary neurons decreased in a time-dependent manner after sevoflurane treatment. lncRNA *Peg13* was widely expressed in the cytoplasm and axon of primary neuron. Overexpression of lncRNA *Peg13* resulted in decreased sevoflurane-induced apoptosis. The primary neurons were restored to normal morphology with increased cell viability. The percentage of TUNEL-positive cells was decreased. The expression ratio of Bcl-2/Bax was increased and the expression of caspase-3 was decreased. However, knockdown of lncRNA *Peg13* aggravated the sevoflurane-induced apoptosis. The primary neurons had visible morphological deterioration and decreased cell viability, with increased percentage of TUNEL-positive cells, decreased ratio of Bcl-2/Bax, and increased expression of caspase-3. **Conclusion**·lncRNA *Peg13* may alleviate sevoflurane-induced apoptosis in developing primary neurons.

[Key words] sevoflurane; long non-coding RNA *Peg13*; developing primary neuron; cell viability; apoptosis

七氟烷是临床产科和小儿麻醉中较常用的吸入麻醉药^[1]。然而, 七氟烷暴露可引起严重的神经系统不良反应, 如认知障碍、行为异常以及类似自闭症谱系障碍的症状。临床研究^[2-4]表明, 早期长时间或反复的麻醉暴露会增加儿童日后出现学习障碍、发育障碍和行为障碍的风

险。动物实验研究^[5-7]显示, 七氟烷暴露容易导致灵长类动物和啮齿类动物认知功能障碍。此外, 尽管七氟烷能够诱导发育期大脑发生广泛的细胞凋亡和病理改变, 但其潜在的神毒性机制尚不完全清楚^[8]。

越来越多的研究^[9-12]表明, 长链非编码 RNA (long

[基金项目] 上海市自然科学基金 (18ZR1422900) (Natural Science Foundation of Shanghai, 18ZR1422900)。

[作者简介] 蒋云凤 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: 15996931019@163.com。

[通信作者] 孙 宇, 电子信箱: dr_sunyu@163.com。



noncoding RNA, lncRNA) 不仅参与调控神经系统的多种生物学过程 (包括神经发育、可塑性、分化和凋亡), 还在多种神经系统疾病 (如阿尔茨海默病、自闭症谱系障碍、神经性疼痛) 中异常表达。研究^[13-14]显示, 七氟烷处理可改变脑内多种 lncRNA 的表达水平。本课题组前期研究采用 RNA 测序获得小鼠发育期原代神经元在七氟烷暴露前后的 lncRNA 差异表达谱, 并通过实时定量 PCR 证实七氟烷暴露后原代神经元中 lncRNA *Peg13* (paternally expressed 13) 的表达量显著下调; 因此推测 lncRNA *Peg13* 可能在七氟烷诱导的神经损伤中发挥作用。

本研究通过在小鼠神经元中过表达和敲减 lncRNA *Peg13* 来探索 lncRNA *Peg13* 在七氟烷暴露所致的神经系统损伤中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 胎龄为 14.5 d 的清洁级 C57 小鼠 (共 4 只) 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2018-0006。本实验符合上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理操作规范。实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2016-0016。

1.1.2 主要试剂和仪器 Neurobasal 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清、B27 无血清补充剂、多聚赖氨酸、0.25% 胰酶、双抗 (GIBCO, 美国), 原位杂交试剂盒 (BOSTER, 美国), CCK-8 试剂盒、TUNEL 试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司), Bcl-2、Bax、caspase-3 抗体、 β -actin 抗体 (Cell Signaling Technology, 美国), 电穿孔转染试剂、电泳液 (上海生工生物工程有限公司), TRIzol (Invitrogen, 美国), PrimeScript 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本), BCA 蛋白定量试剂盒 (上海威奥生物科技有限公司)。lncRNA *Peg13* 敲减载体和过表达载体 (上海吉满生物科技有限公司)。

超净工作台、细胞培养箱 (Thermo Fisher, 美国), 多功能酶标仪 (Bio Tek, 美国), 倒置相差显微镜 (Nikon, 日本), QuantStudio 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国), 激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国), 电泳仪 (Bio-Rad, 美国), 超敏化学发光成像系统 (GE, 美国)。

1.2 细胞培养

1.2.1 原代神经元分离培养 将胎龄为 14.5 d 的 C57 小鼠处死, 取出胚胎, 用 75% 乙醇浸泡消毒。用精细镊子取出脑组织, 加入 0.25% 的胰酶在培养箱中消化 18 min。移除管中多余的消化液, 加入 10 mL 含 10% 胎牛血清

的 DMEM 培养基终止消化。将上清液置于离心机中以 $600\times g$ 离心 5 min 后, 用含 10% 胎牛血清的 Neurobasal 接种培养基重悬。以 3×10^6 个 /mL 的密度接种于多聚赖氨酸 (50 $\mu\text{g/mL}$) 包被的培养板中, 置于 37℃ 培养箱中培养。4 h 后将接种培养基换成含 2% B27 的 Neurobasal 维持培养基继续培养。使用倒置相差显微镜观察原代神经元的生长情况。

1.2.2 细胞转染 实验分为 lncRNA *Peg13* 过表达组、过表达对照组、lncRNA *Peg13* 敲减组、敲减对照组。设计 3 条 lncRNA *Peg13* RNA 干扰序列 (表 1)。

表 1 靶向 lncRNA *Peg13* 的 RNA 干扰序列
Tab 1 RNA interference sequences targeting lncRNA *Peg13*

名称	RNA 干扰序列 (5'→3')
对照	TTCTCCGAACGTGTCACGT
序列 1	GCCTGTACAGCTCTTTGTTAT
序列 2	GCAGCACTGGGTATGATAAC
序列 3	GGTGTTTAGCCTTCCTCTTTG

将上述 “1.2.1 原代神经元分离培养” 步骤中获得的原代神经元细胞悬液, 用接种培养基稀释成 3×10^6 个 /mL。吹匀细胞悬液, 吸取 1 mL 置于 1.5 mL EP 管中, 在常温下以 $600\times g$ 离心 7 min。吸除上清液, 加入 100 μL 电穿孔转染试剂重悬, 加入 3 μg 质粒, 混匀。以 “Neurons Mouse” 模式使用电穿孔转染仪进行转染。将电穿孔转染后的细胞悬液吸至 EP 管中, 并补齐相应体积的接种培养基, 接种至六孔培养板。第 3 日加入 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素筛选, 第 5 日半量换液, 第 7 日提取 RNA 验证质粒转染效果。

1.3 七氟烷处理原代神经元

原代神经元于贴壁后第 7 日进行七氟烷处理。根据是否接受七氟烷处理将细胞分为: ①空白组, 不做任何处理。②七氟烷组, 使细胞在 4.1% 的七氟烷中分别暴露 2、4、6 h, 在每个时间点取样检测。根据是否接受七氟烷处理以及是否改变 lncRNA *Peg13* 的表达情况, 将细胞分为: ①过表达对照组。②过表达对照 + 七氟烷组。③ lncRNA *Peg13* 过表达组。④ lncRNA *Peg13* 过表达 + 七氟烷组。⑤敲减对照组。⑥敲减对照 + 七氟烷组。⑦ lncRNA *Peg13* 敲减组。⑧ lncRNA *Peg13* 敲减 + 七氟烷组。细胞在 4.1% 的七氟烷中暴露 6 h 后, 取样本检测。

1.4 RNA 提取及定量

按照说明书用 TRIzol 提取原代神经元总 RNA。使用 PrimeScript 反转录试剂将 RNA 反转录为 cDNA。反转录

条件: 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s。以 cDNA 为模板, 使用标准的 SYBR-Green 法进行 PCR, 评估每个目标基因的表达水平。PCR 扩增条件: 预变性 95 ℃ 30 s; 变性 95 ℃ 5 s, 退火 60 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 30 s, 重复 40 个循环。以 *Gapdh* 为内参基因, 引物序列见表 2。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示目标基因的相对表达水平。

表 2 实时定量 PCR 引物序列
Tab 2 Sequences of primers for real-time PCR

基因	引物 (5'→3')
<i>lncRNA Peg13</i>	
正向引物	CTCACTTTGGTTTGAATGGGAT
反向引物	AAGACGATTAGATTGGGTTGC
<i>Gapdh</i>	
正向引物	AATGGATTGGACGCATTGGT
反向引物	TTTGCACTGGTACGTGTTGAT

1.5 CCK-8 检测细胞活力

将电穿孔转染后的原代神经元以密度为 $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ 接种于多聚赖氨酸 (50 $\mu\text{g/mL}$) 包被的 96 孔板中。培养第 7 日时, 用 4.1% 的七氟烷处理细胞 6 h。弃去原有培养基, 每孔加入 100 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8 溶液, 混匀后置于培养箱中继续培养 4 h。在酶标仪上于 450 nm 波长处检测吸光度值。

1.6 TUNEL 染色检测细胞凋亡

原代神经元在多聚赖氨酸处理的盖玻片上培养。用 4.1% 的七氟烷处理细胞 6 h, 将盖玻片放在 4% 多聚甲醛中固定 25 min, 再置于通透液中 (0.2% Triton X-100) 5 min。每张盖玻片加 50 μL TUNEL 反应液, 37 ℃ 避光孵育 60 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 遍, 每次 5 min。用抗荧光衰减封片剂封片后, 荧光显微镜下观察。

1.7 原位杂交

原代神经元在多聚赖氨酸处理的盖玻片上进行培养。细胞培养第 4 日, 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 3 次, 每次 2 min。4% 多聚甲醛 (用 0.1 mol/L PBS 配制, 含 0.1% 焦碳酸二乙酯)。室温固定 20 ~ 30 min。滴加新鲜配制的以 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶, 37 ℃ 消

化 60 s。0.5 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min。蒸馏水洗 1 次, 每张盖玻片加 20 μL 预杂交液, 置于 42 ℃ 恒温箱 4 h。用杂交液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针 (正义链 AAGACGATTAGCTTGGGTTGC, 反义链 CTCACCTTG GTTTGAATGGGAT), 浓度 1 $\mu\text{g/mL}$ 。每张切片加 20 μL 杂交液, 恒温箱 42 ℃ 杂交过夜 (12 ~ 16 h)。滴加封闭液 37 ℃ 孵育 30 min, 滴加生物素化鼠抗地高辛 (1:100) 37 ℃ 孵育 60 min。0.5 mol/L PBS 洗 4 次, 每次 5 min。取 10 μL 链霉亲和素 - 生物素化过氧化物酶复合物 (strept avidin biotin-peroxidase complex, SABC) -CY3, 加原位杂交用的 PBS 990 μL 混合。每张切片加 50 μL 样品, 37 ℃ 孵育 30 min。0.5 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用抗荧光衰减封片剂封片后, 激光共聚焦显微镜观察。

1.8 Western blotting 检测细胞凋亡

使用裂解缓冲液 (RIPA) 裂解原代神经元, 用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜。用 5% 牛奶封闭 1 h。Bcl-2、Bax、caspase-3、 β -actin (1:1 000) 抗体孵化过夜。使用抗鼠二抗 (1:1 000) 孵育 1 h。将增强化学发光显色试剂 A 与 B 按 1:1 混合配制显色剂。将样品放入化学发光显影仪, 滴加显色剂后进行曝光显影。用 ImageJ 软件对显影条带进行灰度分析。

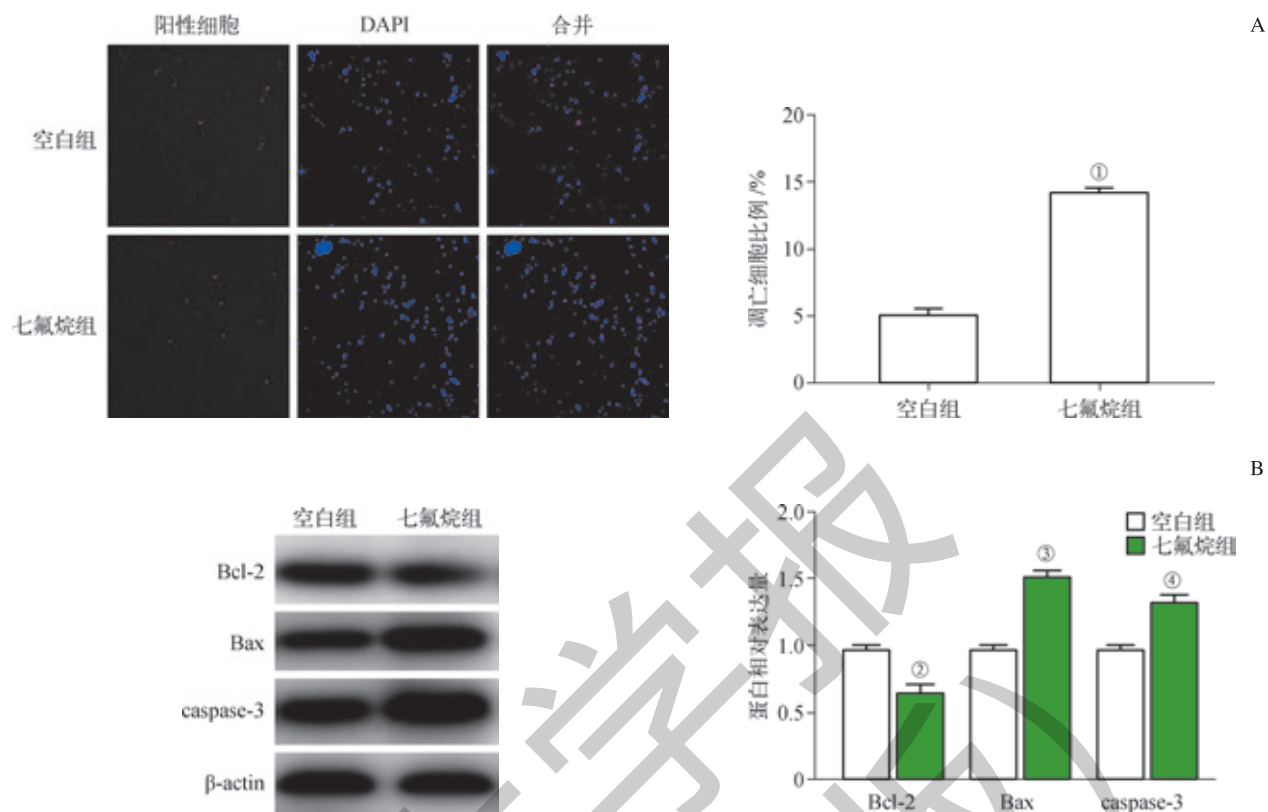
1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7 软件统计并作图。使用单因素方差分析以及 *t* 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 七氟烷对原代神经元细胞的凋亡的影响

在 TUNEL 检测中, DAPI 染料标记细胞核, Alexa Fluor 647 染料标记凋亡细胞 (图 1A); 凋亡细胞统计结果显示, 4.1% 七氟烷暴露 6 h 后原代神经元的凋亡细胞比例较对照组显著增多, 差异有统计学意义 ($P=0.043$) (图 1A)。Western blotting 结果显示, 与对照组相比, 七氟烷暴露后抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下降, 促凋亡蛋白 Bax、caspase-3 表达水平增加 ($P=0.032$, $P=0.022$, $P=0.036$) (图 1B)。

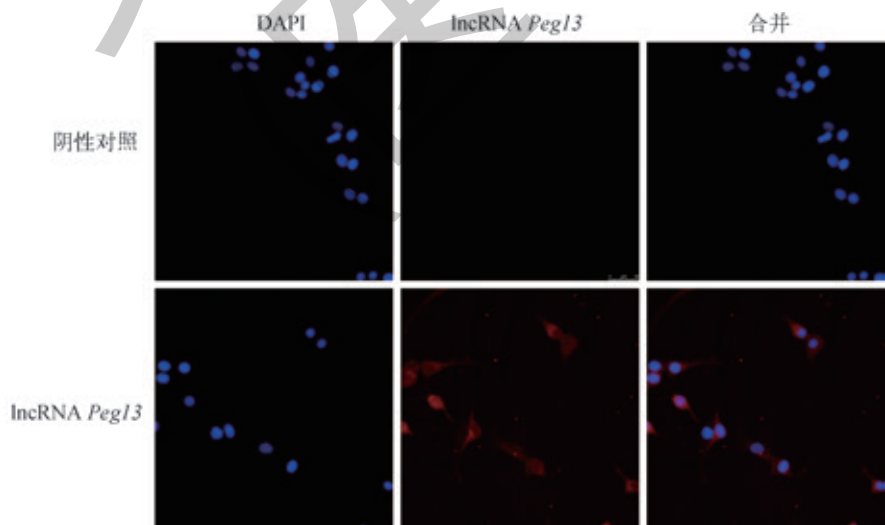


注: A. TUNEL 染色检测神经元的凋亡情况; B. Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达。^① $P=0.043$, ^② $P=0.032$, ^③ $P=0.022$, ^④ $P=0.036$, 与空白组比较。
图 1 七氟烷导致原代神经元的凋亡
Fig 1 Sevoflurane-induced apoptosis of primary neurons

2.2 LncRNA Peg13 在原代神经元中的定位

原位杂交检测中, DAPI 标记细胞核, 荧光原位标记 lncRNA Peg13 分子。图片合并后可见 lncRNA Peg13 主要

定位于原代神经元的细胞质, 在神经元的细胞质和突触中均有表达 (图 2)。



注: 寡核苷酸探针正义链作为原位杂交的阴性对照。
图 2 原位杂交显示 lncRNA Peg13 在原代神经元中的分布 ($\times 100$)
Fig 2 Localization of lncRNA Peg13 shown in primary neurons by in situ hybridization ($\times 100$)

2.3 七氟烷暴露时间对原代神经元 *lncRNA Peg13* 表达的影响

为了检测七氟烷不同处理时间后 *lncRNA Peg13* 在原代神经元中的表达水平的变化, 控制七氟烷的浓度不变,

将七氟烷的暴露时间分别设置为 2、4、6 h。实时定量 PCR 结果显示, 七氟烷对 *lncRNA Peg13* 表达水平的影响呈现剂量依赖性, 其中七氟烷 6 h 处理组与空白组 (0 h) 相比 *lncRNA Peg13* 表达水平的下降最为明显 (图 3)。

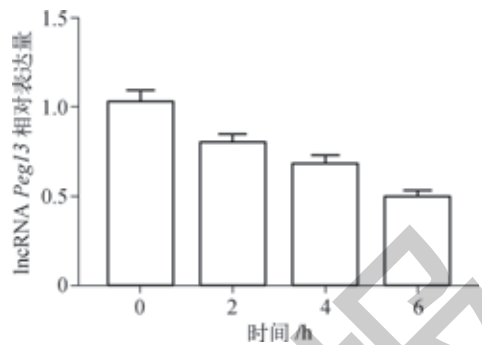
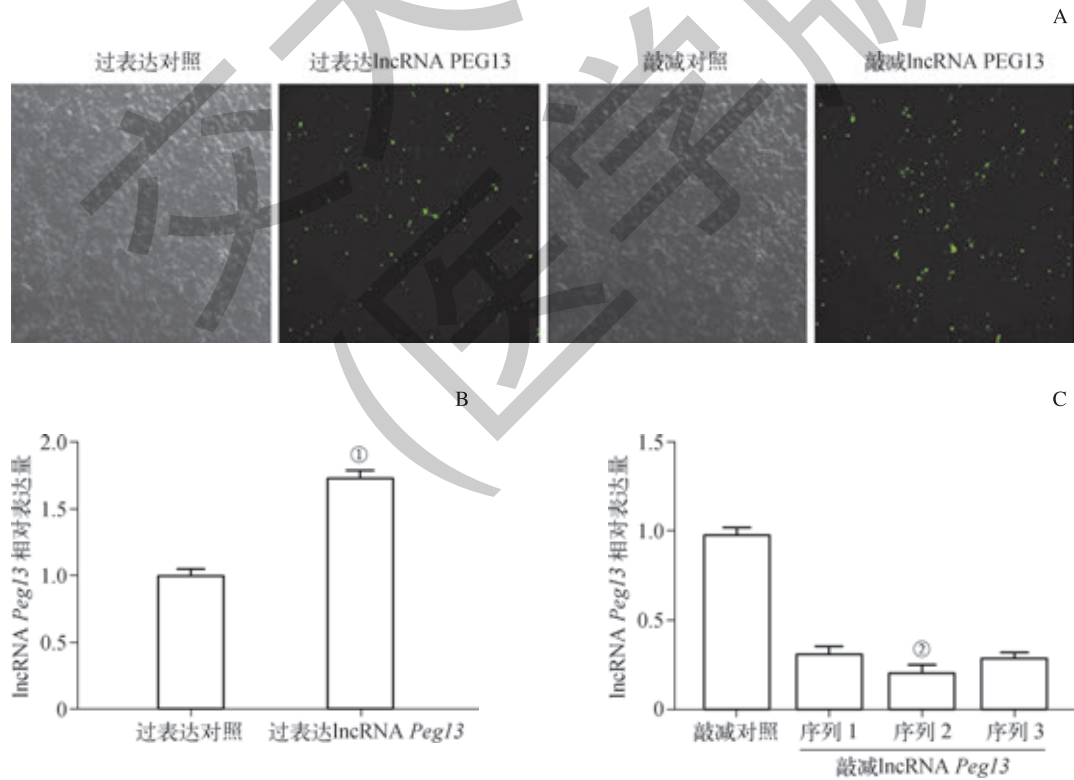


图 3 七氟烷暴露时间对原代神经元 *lncRNA Peg13* 表达的影响
Fig 3 Effect of sevoflurane exposure time on the expression of *lncRNA Peg13* in primary neurons

2.4 过表达和敲减 *lncRNA Peg13* 的转染效果

通过电穿孔转染法将质粒转入原代神经元, 显微镜下观察转染效果较好 (图 4A)。在转染后第 7 日提取原代神经元的 RNA 并进行反转录。实时定量 PCR 结果显示, 与

过表达对照组比较, 转染 *lncRNA Peg13* 过表达质粒使得原代神经元内的 *lncRNA Peg13* 的表达水平上升 ($P=0.005$) (图 4B)。通过实时定量 PCR 筛选出了 *lncRNA Peg13* 敲减效果较好的序列 2 用于后续研究 ($P=0.002$) (图 4C)。



注: A. 荧光显微镜观察原代神经元转染效果 ($\times 10$); B. *lncRNA Peg13* 的过表达效率; C. 筛选 *lncRNA Peg13* 敲减效率较高的质粒。^① $P=0.005$, 与过表达对照组比较; ^② $P=0.002$, 与敲减对照组比较。

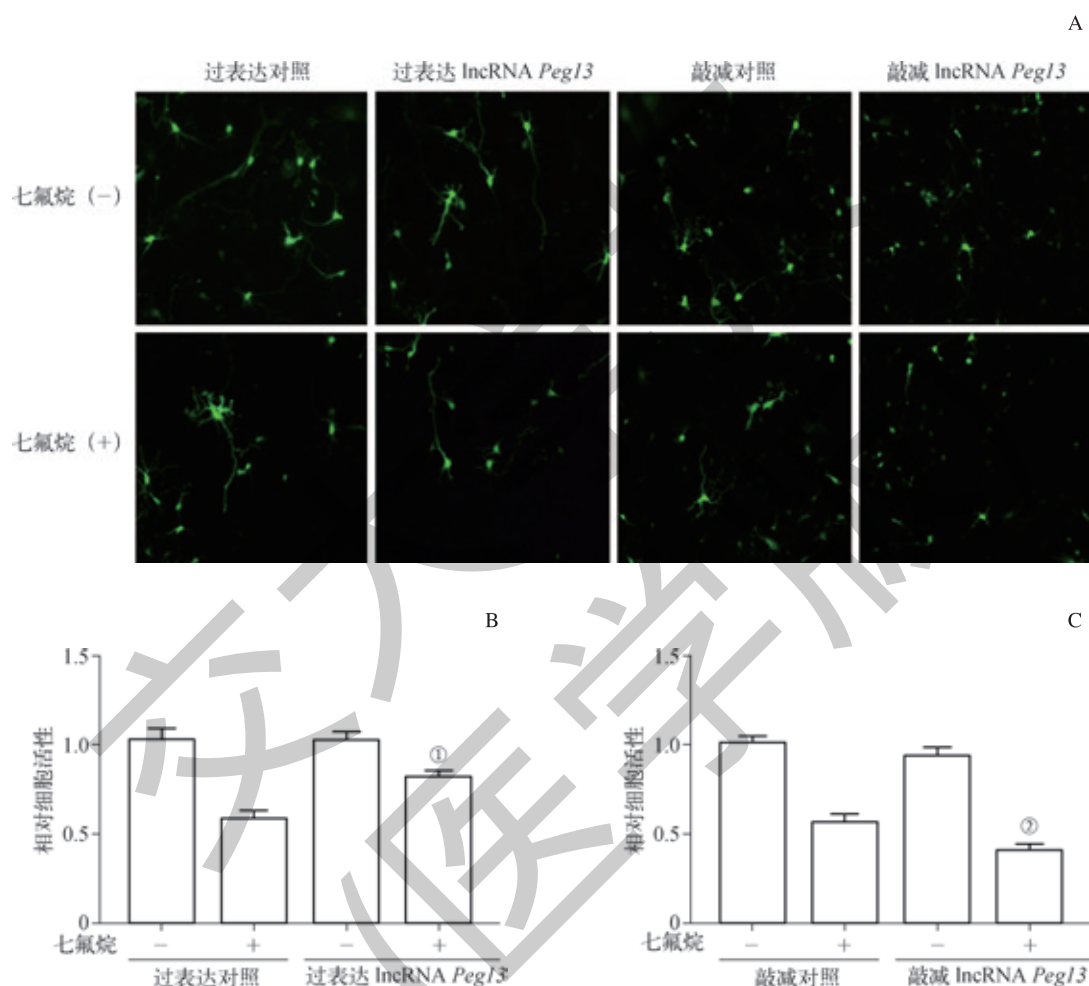
图 4 *lncRNA Peg13* 过表达和敲减质粒的转染效果
Fig 4 Transfection effect of *lncRNA Peg13* overexpression and knockdown plasmids

2.5 LncRNA *Peg13* 在七氟烷暴露所致原代神经元细胞形态和细胞活力改变中的作用

4.1% 七氟烷处理 6 h 后, 荧光显微镜下观察发现七氟烷处理使得原代神经元贴壁程度减弱, 部分神经元脱落、排列紊乱、分布稀疏, 胞体肿胀变形、轮廓模糊, 神经元突起发育受到影响; 过表达 *lncRNA Peg13* 可以减少七氟烷对原代神经元产生的形态学上的改变; 敲减 *lncRNA Peg13*

则加剧七氟烷对原代神经元的形态学上的改变 (图 5A)。

CCK-8 结果显示, 过表达 *lncRNA Peg13* 可以缓解由七氟烷诱导的原代神经元的活性降低 ($P=0.024$) (图 5B); 而敲减 *lncRNA Peg13* 可以加剧由七氟烷诱导的原代神经元的活性降低 ($P=0.045$) (图 5B)。以上数据表明, *lncRNA Peg13* 过表达可改善七氟烷暴露导致的原代神经元活性降低。



注: A. 各组原代神经元细胞形态学改变 ($\times 20$); B. CCK-8 检测 *lncRNA Peg13* 过表达组细胞活力; C. CCK-8 检测 *lncRNA Peg13* 敲减组细胞活力。^① $P=0.024$, 与过表达对照 + 七氟烷组比较; ^② $P=0.045$, 与敲减对照 + 七氟烷组比较。

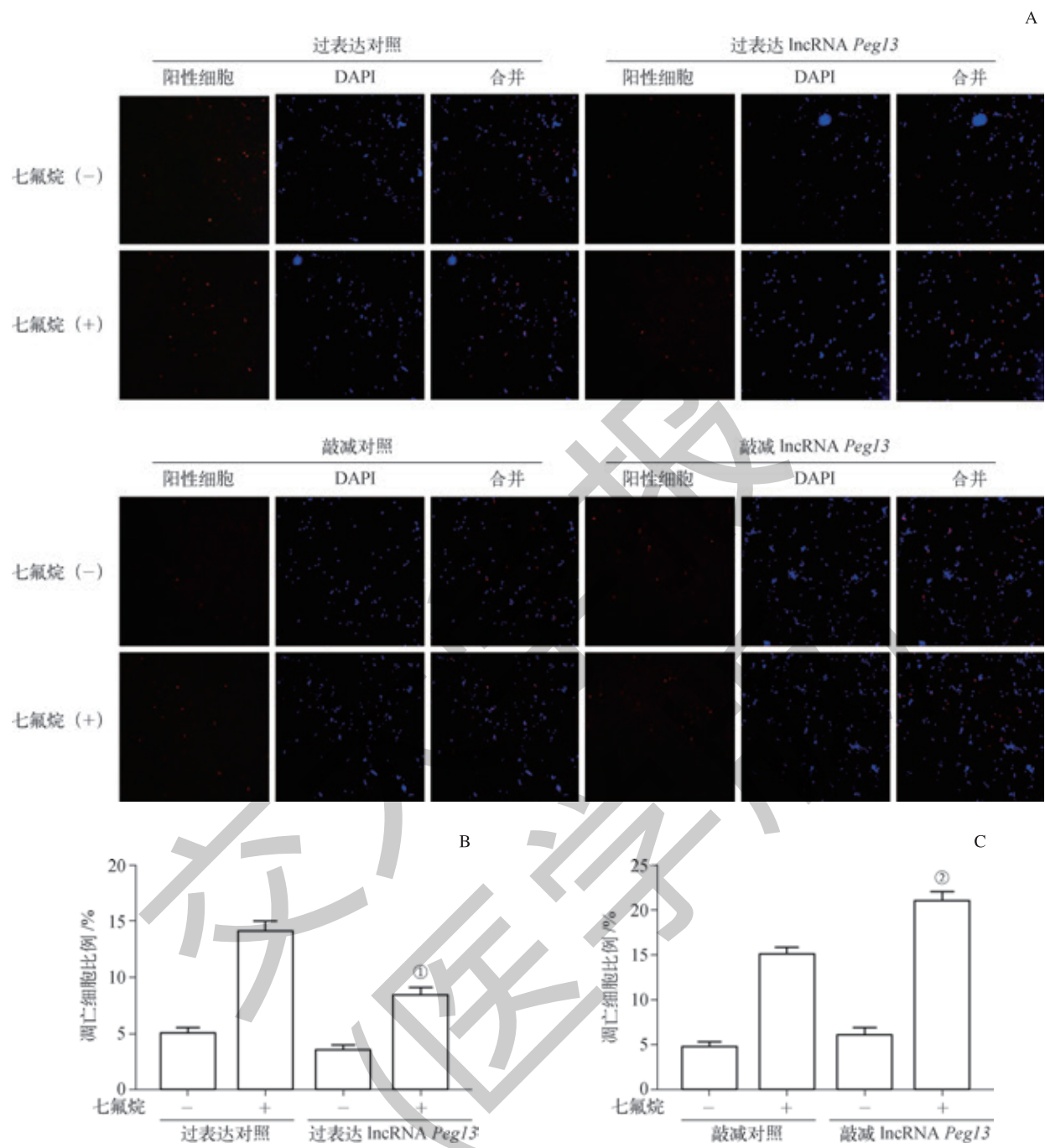
图 5 *lncRNA Peg13* 在七氟烷暴露导致的原代神经元细胞形态和细胞活力改变中的作用

Fig 5 Effect of *lncRNA Peg13* on the morphology and cell viability of primary neurons after sevoflurane exposure

2.6 LncRNA *Peg13* 对七氟烷暴露的原代神经元凋亡的影响

通过 TUNEL 检测分析各组凋亡细胞比例 (图 6A)。结果显示, 七氟烷暴露后转染对照质粒的原代神经元的凋亡比例较相应的七氟烷未暴露的组别明显增加; 过表

达 *lncRNA Peg13* 可以降低由七氟烷暴露所致的升高的原代神经元的凋亡比例 ($P=0.002$) (图 6B); 敲减 *lncRNA Peg13* 则可以提高由七氟烷暴露所致的升高的原代神经元的凋亡比例 ($P=0.004$) (图 6C)。



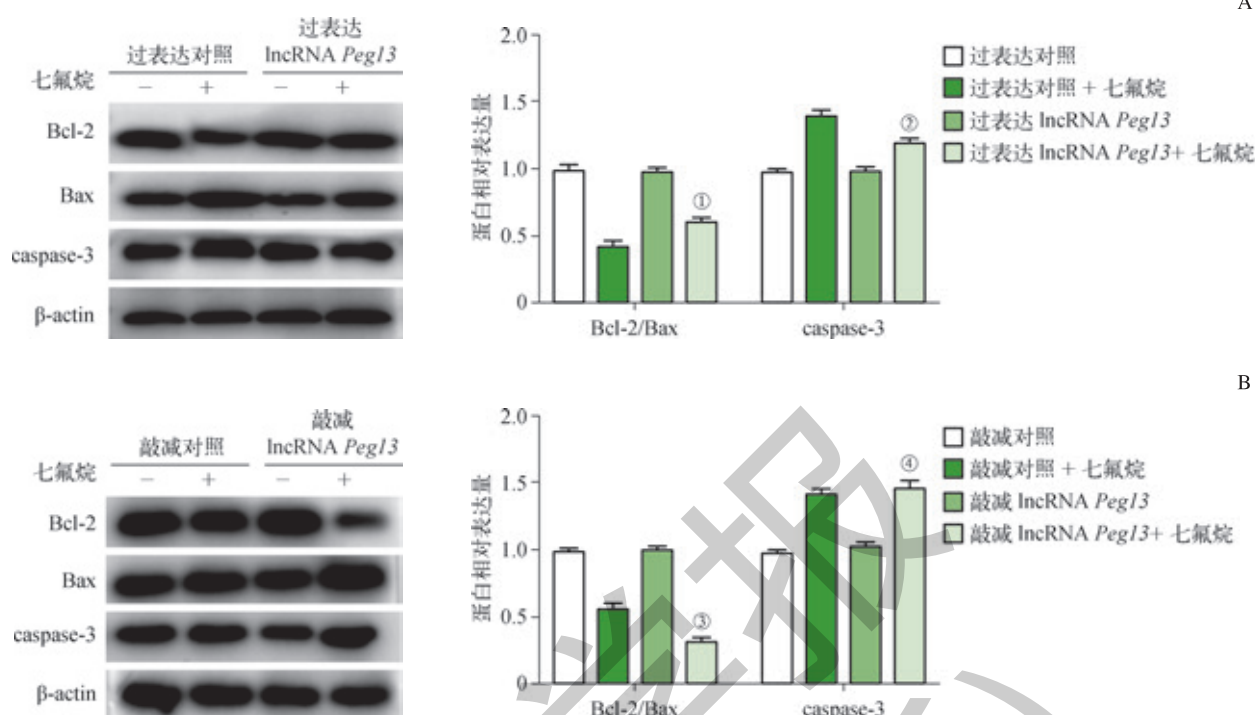
注: A. TUNEL 染色检测各组神经元的凋亡情况 ($\times 10$); B. *lncRNA Peg13* 过表达组凋亡统计结果; C. *lncRNA Peg13* 敲减组凋亡统计结果。^① $P=0.002$, 与过表达对照 + 七氟烷组比较; ^② $P=0.004$, 与敲减对照 + 七氟烷组比较。

图 6 *lncRNA Peg13* 对七氟烷暴露的原代神经元凋亡的影响
Fig 6 Effect of *lncRNA Peg13* on apoptosis after sevoflurane exposure in primary neurons

2.7 *lncRNA Peg13* 对七氟烷暴露的凋亡相关蛋白的影响

Western blotting 结果显示, 七氟烷暴露后抗凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 表达量的比值 (Bcl-2 / Bax) 下降, 促凋亡蛋白 caspase-3 表达水平增加 (图 7)。

lncRNA Peg13 过表达组 Bcl-2/Bax 明显增加 ($P=0.024$), caspase-3 的表达水平下降 ($P=0.023$) (图 7A); *lncRNA Peg13* 敲减组 Bcl-2/Bax 明显降低 ($P=0.026$), caspase-3 表达水平增加 ($P=0.033$) (图 7B)。



注: A. lncRNA Peg13 过表达组凋亡相关蛋白表达情况; B. lncRNA Peg13 敲减组凋亡相关蛋白表达情况。^① $P=0.024$, ^② $P=0.023$, 与过表达对照 + 七氟烷组比较, ^③ $P=0.026$, ^④ $P=0.033$, 与敲减对照 + 七氟烷组比较。

图 7 lncRNA Peg13 对七氟烷暴露的原代神经元凋亡相关蛋白表达水平的影响

Fig 7 Effect of lncRNA Peg13 on expression of apoptosis-related proteins after sevoflurane exposure in primary neurons

以上结果表明, lncRNA Peg13 在七氟烷所致的原代神经元凋亡中起到了重要的作用, 过表达 lncRNA Peg13 可以缓解七氟烷暴露所致的原代神经元凋亡。

3 讨论

全国每年约有 300 万新生儿接受麻醉。七氟烷是临床小儿麻醉中应用广泛的吸入麻醉药。发育期的动物大脑暴露包括七氟烷在内的常用麻醉剂下, 可能会导致脑损伤, 造成广泛的神经细胞凋亡和长期的神经认知功能缺失^[15]。但目前对于七氟烷暴露有关的神经毒性的具体机制尚未完全阐明。本研究发现, 4.1% 的七氟烷暴露 6 h 能够诱导发育期神经元的凋亡和 lncRNA Peg13 的表达下降, 过表达和敲减 lncRNA Peg13 改变了凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达水平, 提示 lncRNA 参与七氟烷暴露所致神经元凋亡的过程。

lncRNA 是一组长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA, 几乎无蛋白质编码能力; 从基因组的不同位置转录而来, 通过多种机制在表观遗传、转录和转录后水平调控基因表达^[16]。此外, lncRNA 还参与神经发育过程, 与神经退行性变、神经免疫学和神经肿瘤学疾病的发生发展有关, 在中枢神经系统功能调节中具有重要作用^[17-18]。相关

研究^[19]表明, lncRNA 脑源性神经营养因子 - 反义 (brain derived neurotrophic factor-antisense, BDNF-AS) 保护局部麻醉药诱导的背根神经节的神经毒性。lncRNA 牛磺酸上调基因 1 (taurine upregulated gene 1, TUG1) 通过上调 Bcl-2 样蛋白 11 (Bcl-2-like protein 11, Bcl2l11) 蛋白促进了缺血缺糖神经元的凋亡^[20]。lncRNA 肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 通过 PI3K/Akt 信号通路介导青光眼大鼠视网膜神经节细胞凋亡^[21]。以上研究提示调控 lncRNA 是麻醉药物介导神经细胞凋亡的机制之一。

大规模的基因表达研究^[13]发现, 暴露于七氟烷后, 许多编码基因在未成熟的大脑中出现差异表达, 其中相当一部分的 lncRNA 定位在凋亡功能相关基因周围。lncRNA Peg13 已被发现在脑血管内皮细胞的缺血缺糖模型中差异性表达^[22], 提示其在神经系统损伤中的潜在作用。关于 lncRNA Peg13 的研究还处于前期阶段。本研究中 lncRNA Peg13 过表达后可缓解七氟烷处理造成的原代神经元活性损伤, 减少凋亡细胞比例, 使得凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 升高, caspase-3 表达水平降低, 提示 lncRNA Peg13 在七氟烷所致的神经元损伤和凋亡中的重要作用。

Sanchez 等^[23]的研究发现吸入性麻醉药会造成发育期

大鼠长期的线粒体形态变异。本课题组前期研究^[24]表明, 七氟烷能诱导人神经胶质瘤 H4 细胞产生超氧化物等活性氧, 引起氧化应激反应, 使线粒体功能发生衰退、ATP 供能减少。相关研究^[25]也表明, 神经元凋亡的损伤过程中, 七氟烷可能是通过对 Bcl-2 调节促进凋亡。本研究发现, 七氟烷暴露引起凋亡途径相关蛋白的表达改变, 使得 Bax 表达升高, Bcl-2 表达降低, caspase-3 表达升高。基于以上研究结果, 我们推测七氟烷所致的发育期大脑的神经毒

性损伤可能与神经元的凋亡有关。

本研究发现调控 lncRNA *Peg13* 可能是七氟烷介导神经元凋亡的机制之一。lncRNA *Peg13* 表达水平的改变影响了七氟烷所致的原代神经元的凋亡。对 lncRNA *Peg13* 的功能进行进一步研究, 探索并建立 lncRNA 与其在凋亡信号通路中的靶蛋白编码基因之间的表达关系和调控机制, 有助于拓宽我们对七氟烷诱导发育期神经元凋亡分子机制的理解。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Gibert S, Sabourdin N, Louvet N, et al. Epileptogenic effect of sevoflurane: determination of the minimal alveolar concentration of sevoflurane associated with major epileptoid signs in children[J]. *Anesthesiology*, 2012, 117(6): 1253-1261.
- [2] Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, et al. Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery[J]. *Pediatrics*, 2011, 128(5): e1053-e1061.
- [3] Dimaggio C, Sun LS, Li G. Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort[J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(5): 1143-1151.
- [4] Zhou X, Lu D, Li WD, et al. Sevoflurane affects oxidative stress and alters apoptosis status in children and cultured neural stem cells[J]. *Neurotox Res*, 2018, 33(4): 790-800.
- [5] Takaenoki Y, Satoh Y, Araki Y, et al. Neonatal exposure to sevoflurane in mice causes deficits in maternal behavior later in adulthood[J]. *Anesthesiology*, 2014, 120(2): 403-415.
- [6] Tao G, Zhang J, Zhang L, et al. Sevoflurane induces tau phosphorylation and glycogen synthase kinase 3 β activation in young mice[J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(3): 510-527.
- [7] Liu F, Rainosek SW, Frisch-Daiello JL, et al. Potential adverse effects of prolonged sevoflurane exposure on developing monkey brain: from abnormal lipid metabolism to neuronal damage[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 147(2): 562-572.
- [8] Zhou X, Song FH, He W, et al. Neonatal exposure to sevoflurane causes apoptosis and reduces nNOS protein expression in rat hippocampus[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(3): 543-546.
- [9] Briggs JA, Wolvetang EJ, Mattick JS, et al. Mechanisms of long non-coding RNAs in mammalian nervous system development, plasticity, disease, and evolution[J]. *Neuron*, 2015, 88(5): 861-877.
- [10] de Rubeis S, Buxbaum JD. Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(R1): R24-R31.
- [11] Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. Targeting *BACE1* with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(10): 1343-1349.
- [12] Zhao X, Tang Z, Zhang H, et al. A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing *Kcna2* in primary afferent neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(8): 1024-1031.
- [13] Chen X, Zhou X, Lu D, et al. Aberrantly expressed long noncoding RNAs are involved in sevoflurane-induced developing hippocampal neuronal apoptosis: a microarray related study[J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(5): 1031-1040.
- [14] Li XF, Wang ZQ, Li LY, et al. Downregulation of the long noncoding RNA MBNL1-AS1 protects sevoflurane-pretreated mice against ischemia-reperfusion injury by targeting *KCNMA1*[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(9): 115.
- [15] Boscolo A, Milanovic D, Starr JA, et al. Early exposure to general anesthesia disturbs mitochondrial fission and fusion in the developing rat brain[J]. *Anesthesiology*, 2013, 118(5): 1086-1097.
- [16] Knauss JL, Sun T. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs in vertebrate central nervous system development and function[J]. *Neuroscience*, 2013, 235: 200-214.
- [17] Bian S, Sun T. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 44(3): 359-373.
- [18] Ramos AD, Attenello FJ, Lim DA. Uncovering the roles of long noncoding RNAs in neural development and glioma progression[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 625: 70-79.
- [19] Zhang Y, Yan L, Cao Y, et al. Long noncoding RNA BDNF-AS protects local anesthetic induced neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 80: 207-212.
- [20] Chen S, Wang M, Yang H, et al. LncRNA TUG1 sponges microRNA-9 to promote neurons apoptosis by up-regulated Bcl2l11 under ischemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(1): 167-173.
- [21] Li HB, You QS, Xu LX, et al. Long non-coding RNA-MALAT1 mediates retinal ganglion cell apoptosis through the PI3K/Akt signaling pathway in rats with glaucoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(5): 2117-2132.
- [22] Zhang J, Yuan L, Zhang X, et al. Altered long non-coding RNA transcriptomic profiles in brain microvascular endothelium after cerebral ischemia[J]. *Exp Neurol*, 2016, 277: 162-170.
- [23] 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.
- [24] Cheng Y, Jiang Y, Zhang L, et al. Mesenchymal stromal cells attenuate sevoflurane-induced apoptosis in human neuroglioma H4 cells[J]. *BMC Anesthesiol*, 2018, 18(1): 84.
- [25] Yi W, Zhang Y, Guo Y, et al. Elevation of sestrin-2 expression attenuates sevoflurane induced neurotoxicity[J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(5): 1161-1166.

[收稿日期] 2019-01-24

[本文编辑] 崔黎明

