右美托咪啶通过 ERK1/2 MAPK 信号通路缓解七氟醚神经毒性

杨淑引¹,陈伟红¹,金荷照¹,胡双飞²,沈社良²,王文元^{2*}(1.诸暨市中医院,浙江诸暨 311800; 2.浙江省人民医院, 杭州 310014)

摘要:目的 研究右美托咪啶对中枢神经系统发育期七氟醚神经毒性的影响,以及 ERK1/2 MAPK 信号通路在其中所起的作用。方法 对离体培养 7 d 的海马神经细胞及出生后 7 d 的 Sprague-Dawley 幼鼠进行七氟醚处理(3%, 6 h),制备七氟醚神经毒性模型。分别给予右美托咪啶或右美托咪啶+U0126 处理后,应用流式细胞仪及 TUNEL 染色检测细胞凋亡;应用免疫印迹检测 total ERK1/2、Phospho-ERK1/2、Bax 及 Bcl-2 的蛋白表达水平;应用 Morris 水迷宫检测实验动物的空间学习记忆功能变化。结果 3%七氟醚处理 6 h 使海马神经细胞凋亡增加(P=0.007),应用右美托咪啶则可明显缓解七氟醚神经毒性(P=0.032)。七氟醚处理可降低 Phospho-ERK1/2 及 Bcl-2 的蛋白表达(P<0.05),增加 Bax 的蛋白表达(P<0.05); 右美托咪啶可增加 Phospho-ERK1/2 及 Bcl-2 表达(P<0.05),降低 Bax 表达水平(P<0.05)。右美托咪啶的神经保护作用可被U0126 所逆转。此外,右美托咪啶还明显缓解发育期七氟醚处理引起的空间学习记忆功能异常。结论 右美托咪啶可缓解七氟醚神经毒性,其机制可能与 ERK1/2 MAPK 信号通路有关。

关键词: 七氟醚; 右美托咪啶; 细胞凋亡; ERK1/2 MAPK 信号; 神经发育; 神经毒性 中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)05-0523-06 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.002

Dexmedetomidine Prevents Sevoflurane Neurotoxicity via ERK1/2 MAPK Signaling in the Developing Brain

YANG Shuyin¹, CHEN Weihong¹, JIN Hezhao¹, HU Shuangfei², SHEN Sheliang², WANG Wenyuan^{2*} (1.Traditional Chinese Medical Hospital of Zhuji, Zhuji 311800, China; 2.Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effects of dexmedetomidine on sevoflurane neurotoxicity and the role of ERK1/2 MAPK signaling pathway in the developing brain. **METHODS** The developmental sevoflurane neurotoxicity model was prepared by exposure of primary hippocampal neurons(7 days *in vitro*) and Sprague-Dawley rat pups(7 postnatal days) with sevoflurane (3%, 6 h). The cells were treated with dexmedetomidine or combined with U0126. The neuronal apoptosis was analyzed by flow cytometry(FCM) and TUNEL-staining. The relative expressions of total ERK1/2, phospho-ERK1/2, Bax and Bcl-2 were detected by western blot. The spatial learning and memory abilities were determined by Morris water maze. **RESULTS** Sevoflurane exposure(3%, 6 h) significantly enhanced the neuronal apoptosis(P=0.007), which can be ameliorated by dexmedetomidine(P=0.032). Sevoflurane treatment decreased the expressions of Phospho-ERK1/2 and Bcl-2(P<0.05), but increased Bax(P<0.05). Administration of dexmedetomidine significantly elevated the expressions of phospho-ERK1/2 and Bcl-2, but decreased Bax(P<0.05). The neuronal protective role of dexmedetomidine was abolished by U0126. In addition, treatment with dexmedetomidine significantly improved the cognitive disorders induced by postnatal sevoflurane exposure. **CONCLUSION** These data indicated that application of dexmedetomidine can prevent sevoflurane neurotoxicity, and the ERK1/2 MAPK signaling pathway may be involved.

KEY WORDS: sevoflurane; dexmedetomidine; cell apoptosis; ERK1/2 MAPK signaling; neuronal development; neurotoxicity

在中枢神经系统发育期,临床麻醉中常用的 吸入麻醉药如七氟醚等可引起神经细胞凋亡及持 续到成年的学习、记忆等认知功能损害^[1-2],但其 机制尚不完全清楚。本研究探讨α-2-肾上腺素能受 体激动剂右美托咪啶对中枢神经系统发育期七氟 醚神经毒性的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器

细胞培养箱(德国 Binder);超净台(上海上净 净化设备有限公司);七氟醚处理装置(自制);气 体浓度检测仪(美国 Datex Ohmeda);流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson);免疫印迹电泳仪(美国

· 523 ·

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302858);浙江省自然科学基金项目(LY12H08005)

作者简介:杨淑引,女,主治医师 Tel: (0575)87011384 E-mail: yang-shuyin@hotmail.com ^{*}通信作者: 王文元,男,博士,主治 医师 Tel: (0571)85893300 E-mail: Anesth.neuron@gmail.com

Bio-Rad);凝胶电转仪(美国 Bio-Rad);扫描仪(美 国 Hewlett-Packard); 超速离心机(美国 Beckman); 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss)。

1.2 试剂

七氟醚(中国 Baxter, 纯度>98%); 盐酸右美 托咪啶(美国 Abbott Laboratories, 纯度: 99%药物 活性分子); Neurobasal media、DMEM、HBSS、 B27、L-谷氨酰胺、胎牛血清、poly-L-lysine 等细 胞培养液及添加剂(美国 Gibco Invitrogen); ECL 检测试剂盒(美国 Upstate, 批号: WP20005/788966); 1,4-二氨基-2,3-二氰基-1,4-双(邻氨基苯巯基)丁二 烯(U0126, 纯度 \geq 98%)、anti-total ERK1/2、 anti-Phospho-ERK1/2 及 anti-β-Tubulin Ⅲ一抗抗 体(美国 Sigma-Aldrich); anti-Bcl-2 及 anti-Bax 一 抗抗体(美国 Cell Signaling Technology); 二抗抗 体、抗体稀释液、蛋白分子量标准、PVDF 膜、细 胞裂解液及蛋白上样缓冲液等(中国碧云天); TUNEL 染色试剂盒(美国 Roche); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD Biosciences)。

1.3 细胞培养

取孕18d的 Sprague-Dawley 大鼠,乙醚麻醉 后打开腹腔取胎鼠。将胎鼠置于 HBSS 培养皿内 解剖胎鼠取海马组织。加入 0.125%胰酶置入细胞 培养箱消化 10 min。超速离心机(800 r·min⁻¹, 4 ℃) 离心 8 min。弃掉上清,加入 DMEM 缓慢摇匀, 并计数细胞。将细胞以 4×10⁵·mL⁻¹ 浓度接种于 6 cm 培养皿或玻片上,置于细胞培养箱内。每隔 2~3 d 半量换液,直至体外培养至7 d 时进行七氟 醚处理。

1.4 药物处理

本研究所采用的七氟醚处理装置是根据已发 表文献自制,并目已经在研究者前期的实验中得 到了充分的验证^[3-5]。先将神经细胞(在体实验的研 究对象为出生后7d的Sprague-Dawley幼鼠)取出 置于自制的七氟醚处理装置内密闭,再将混合气 体(92% O2、5% CO2及 3%七氟醚混合气体)引入。 密闭装置内的混合气体由气体检测仪持续检测, 混合气体流速为2L·min⁻¹。处理6h后将细胞取出 进行后续实验。离体实验 U0126(20 µmol·L⁻¹)作用 时间为 6 h。右美托咪啶离体实验浓度为: 1 μmol·L⁻¹; 在体作用浓度为: 25 μg·kg⁻¹, 腹腔注 射,作用时间均为6h。

1.5 流式细胞仪检测

先用 PBS(0.01 mol·L⁻¹)将七氟醚处理过的神 经细胞洗涤 3 遍, 每遍 10 min, 再用 0.25% 胰酶将 细胞轻轻吹散至悬浮状态。加入 100 µL 缓冲液、 5 µL Annexin V-FITC 及 0.5 µg·mL⁻¹ 碘化丙啶 (propidium iodide, PI)置于 4 ℃环境下避光反应 15 min。加入 400 µL 缓冲液后上机检测细胞凋亡 状况。Annexin V-FITC 阳性及 PI 阴性标记的细胞 即为凋亡细胞。 1.6 免疫印迹

> 收集七氟醚处理过的神经细胞加入细胞裂解 液,置于4 ℃环境裂解 10 min。12 000 r·min⁻¹超 速离心 10 min 后弃掉细胞残渣, 取蛋白进行定量。 加入上样缓冲液置于 100 ℃煮沸 5 min。配制 12% 凝胶,上样后进行蛋白电泳。取凝胶叠于 PVDF 膜上进行电转(1.5 mA·cm⁻² 恒流转膜 90 min)。取 出 PVDF 膜加入一定浓度的一抗 4 ℃环境孵育过 夜。PBS 洗涤 3 遍, 每遍 10 min。加入二抗抗体 室温孵育1h。PBS洗涤3遍,每遍10min。均匀 加入 ECL 检测液,叠放 X 胶片避光显影 5 min。 扫描 X 胶片进行灰度值分析。

1.7 TUNEL 染色

从细胞培养皿内取出玻片用 PBS 洗涤 3 遍, 每遍 10 min。加入 TUNEL 试剂后,4 ℃环境孵育 1 h。PBS 洗去残余 TUNEL 试剂,加入荧光二抗 室温孵育 30 min。PBS 洗涤玻片 3 遍, 每遍 5 min。 加入 DAPI 后即置于激光共聚焦显微镜下,每玻片 随机取 20 个视野进行摄片。计数 TUNEL 阳性细 胞数进行统计学分析。

1.8 动物行为学

本研究采用 Morris 水迷宫检测实验动物的空 间学习记忆能力^[3-5]。SD 幼鼠经七氟醚或七氟醚+ 右美托咪啶处理后继续饲养至 35 PND 行空间学 习能力检测,历时3d。令实验动物在水迷宫内自 由游泳1 min 寻找水下平台(1.5 cm),并记录找到 平台所需时间。检测空间学习能力时,拆掉水下 平台,同样令实验动物自由游泳 1 min,全程视频 记录运动轨迹,利用软件分析其在目标象限(即原 平台所在象限)的总停留时间。此外,为排除空间 学习记忆能力的差异可能来自于实验动物本身的 运动功能所致,分析了各组动物的平均游泳速度。 1.9 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理。计量资 料采用 x ± s 表示。组间比较采用 one-way ANOVA 进行统计学分析,设 P<0.05 为差异有统计学意义。 2 结果

2.1 右美托咪啶可缓解七氟醚引起的神经细胞凋亡

海马神经细胞应用 3% 七氟醚或联合 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ 右美托咪啶处理 6 h,细胞经 Annexin V-FITC 和 PI 双标后用流式细胞仪检测。结果显示,与对照组相比,3%七氟醚处理 6 h 可导致神经细胞调亡明显增加(7.5%±1.6% vs 29.1±4.8%, P=0.007)。加入 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的右美托咪啶可明显缓解七氟醚引起的神经细胞调亡(10.3±3.79%, P=0.032)。结果见图 1。



图1 右美托咪啶缓解七氟醚神经毒性 A-对照组; B-七氟醚组; C-七氟醚+右美托咪啶组 与对照组相比,¹⁾P<0.01; 与七氟醚组相比,²⁾P<0.05

Fig 1 Dexmedetomidine ameliorates sevoflurane neurotoxicity A-control group; B-sevoflurane group; C-sevoflurane+dexmedetomidine group

Compared with control group, $^{1)}P\!\!<\!\!0.01;$ compared with sevoflurane group, $^{2)}P\!\!<\!\!0.05$

2.2 右美托咪啶增加 Phospho-ERK1/2 表达

海马神经细胞与 10 μmol·L⁻¹ 右美托咪啶共孵 育后经 3%七氟醚处理 6 h。提取全细胞蛋白应用 免疫印迹法检测磷酸化和总 ERK1/2 表达水平,每 组实验重复 5 遍,β-Tubulin III为内参。结果显示, 3%七氟醚处理 6 h 使 Phospho-ERK1/2 表达降低 (P=0.022);加入 10 μmol·L⁻¹ 右美托咪啶则可使 Phospho-ERK1/2 表达增加(P=0.036)。单独应用 10 μmol·L⁻¹右美托咪啶对 Phospho- ERK1/2 表达 没有明显影响。七氟醚处理或加入 10 μmol·L⁻¹ 的 右美托咪啶对 total ERK1/2 表达的影响没有统计 学差异。结果见图 2。

2.3 右美托咪啶降低 Bax, 增加 Bcl-2 表达

为了进一步探究 ERK1/2 MAPK 信号通路在 右美托咪啶神经保护中的作用,我们在七氟醚神 经毒性模型中应用该信号通路的抑制剂 U0126, 同时选择Bcl-2和Bax作为线粒体凋亡途径的标志 蛋白。假如 ERK1/2 MAPK 信号发挥关键作用,那 么 U0126 则可以逆转右美托咪啶的作用。原代海 马神经细胞中加入 10 µmol·L⁻¹ 右美托咪啶或 20 umol·L⁻¹ U0126 后经 3% 七氟 醚 处理 6 h。 应用 免疫印迹法检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平。 β-Tubulin III 为内参。免疫印迹结果显示, 七氟醚 处理可以降低 Bcl-2(P=0.018), 增加 Bax 表达 (P=0.023, lane 2)。加入 10 umol·L⁻¹的右美托咪 啶可使 Bcl-2 和 Bax 的变化得以恢复(P<0.05, lane 3)。在此基础上, 再加入 20 µmol·L⁻¹ U0126 则几乎完全逆转了右美托咪啶的神经保护效应 (P<0.05, lane 4)。结果见图 3。

2.4 ERK1/2 MAPK 信号在七氟醚神经毒性中的 作用

为了在细胞整体上验证 ERK1/2 MAPK 信号 在右美托咪啶神经保护中的作用,应用可特异性 识别 DNA 断裂片段的 TUNEL 染色方法。在暴露 于 3%七氟醚 6 h 之前,神经细胞中先经如下处理: 加入 10 µmol·L⁻¹ 右美托咪啶或联合加入 20 µmol·L⁻¹ U0126。然后神经细胞经 DAPI 及 TUNEL 染色。TUNEL 阳性细胞(即凋亡神经细胞) 应用激光扫描共焦显微镜(LSCM)拍片,每张玻 片随机记录 20 个视野的细胞。研究结果显示,七 氟醚处理可明显增加 TUNEL 阳性细胞数[(28.3±



图 2 右美托咪啶增加磷酸化 ERK1/2 的表达水平(*n*=5) A-对照组; B-七氟醚组; C-七氟醚+右美托咪啶组; D-右美托咪啶组 与对照组相比,¹⁾P<0.05; 与七氟醚组相比,²⁾P<0.05

Fig 2 Dexmedetomidine enhances phospho-ERK1/2 expression(*n*=5) A-control group; B-sevoflurane group; C-sevoflurane+dexmedetomidine group; D-dexmedetomidine group Compared with control group, ¹⁾*P*<0.05; compared with sevoflurane group, ²⁾*P*<0.05

· 525 ·







图 3 右美托咪啶降低 Bax, 增加 Bcl-2 表达(n=5)

A-对照组;B-七氟醚组;C-七氟醚+右美托咪啶组;D-七氟醚+右美托咪啶+U0126组

与对照组相比,¹⁾P<0.05;与七氟醚组相比,²⁾P<0.05;与七氟醚+右美托咪啶组相比,³⁾P<0.05

Fig 3 Dexmedetomidine decreases Bax, and increases Bcl-2 (n=5)

A-control group; B-sevoflurane group; C-sevoflurane+dexmedetomidine group; D-sevoflurane+dexmedetomidine+U0126 group

Compared with control group, ${}^{1)}P < 0.05$; compared with sevoflurane group, ${}^{2)}P < 0.05$; compared with sevoflurane+dexmedetomidine group, ${}^{2)}P < 0.05$

5.7)%, *P*=0.008]。加入 10 μmol·L⁻¹ 右美托咪啶可 降低 TUNEL 阳性细胞数[(12.8±3.5)%, *P*=0.021]。 联合应用 10 μmol·L⁻¹ 右美托咪啶和 20 μmol·L⁻¹ U0126 则又可使 TUNEL 阳性细胞数增加[(32.1± 6.4)%, *P*=0.006]。综上细胞凋亡蛋白(Bcl-2 和 Bax) 和细胞凋亡染色(TUNEL)的结果可以推测, ERK1/2 MAPK 信号通路在右美托咪啶对七氟醚 神经毒性的保护作用中起关键作用。结果见图 4。 2.5 右美托咪啶改善动物空间认知功能损害

为了在整体动物层面上进一步验证右美托咪 啶的对七氟醚神经毒性的保护作用,应用 Morris 水迷宫研究实验动物的空间学习和记忆功能变 化。记录分析 3 组实验动物的平均游泳速度,研 究结果显示,在历时 3 d 的定向巡航实验中,各组 实验动物的平均游泳速度没有明显变化。但七氟 醚组动物的潜伏期(潜伏期定义为动物到达平台所 需的时间)明显延长(P=0.022);而应用右美托咪啶 动物的潜伏期明显缩短(P=0.030)。在空间探索实 验中,分析动物在每个象限中所停留的时间,七 氟醚组动物在目标象限停留的时间明显缩短 (P=0.018),右美托咪啶组动物的停留时间比七氟 醚组延长(P=0.032)。这些结果显示,右美托咪啶可明显改善七氟醚处理引起的空间学习和记忆功能损害。结果见图 5。



图 4 ERK1/2 MAPK 信号通路在发育期七氟醚神经毒性 中的关键作用(*n*=4)

A-对照组; B-七氟醚组; C-七氟醚+右美托咪啶组; D-七氟醚+右美 托咪啶+U0126 组

与对照组相比,¹⁾P<0.01;与七氟醚组相比,²⁾P<0.05;与七氟醚+右 美托咪啶组相比,³⁾P<0.01

Fig 4 The essential role of ERK1/2 MAPK signaling pathway in the developmental sevoflurane neurotoxicity(*n*=4) A-control group; B-sevoflurane group; C-sevoflurane+dexmedetomidine group; D-sevoflurane+dexmedetomidine+U0126 group

Compared with control group, ${}^{1)}P$ <0.01; compared with sevoflurane group, ${}^{2)}P$ <0.05; compared with sevoflurane+dexmedetomidine group, ${}^{2)}P$ <0.01



图5 右美托咪啶改善发育期七氟醚暴露引起的空间学习和记忆功能损害

与对照组相比,¹⁾P<0.05;与七氟醚组相比,²⁾P<0.05

Fig 5 Dexmedetomidine improved the spatial learning and memory disabilities induced by neonatal sevoflurane exposure Compared with control group, ${}^{1)}P < 0.05$; compared with sevoflurane group, ${}^{2)}P < 0.05$

3 讨论

近期一项累计5000例的回顾性研究发现,3 岁之前接受全身麻醉的小儿术后出现认知功能损 害的概率是对照组小儿的2倍^[6]。另一项队列研究 也显示, 中枢神经系统发育期接受全身麻醉的小 儿更容易出现学习、记忆功能异常^[7]。中枢神经系 统的发育过程是一个相对较长的阶段。对啮齿类 动物来讲(如: Sprague-Dawley 大鼠), 它将从妊娠 后期至出生后 2 周左右: 但对人类来讲, 这将从 妊娠中后期一直持续到出生后数年^[8]。在这相对较 长的时间窗内,许多孕妇、新生儿及小儿将可能 接受麻醉和手术,全麻药的应用无疑会对该类人 群造成潜在的风险。因此,探究全麻药神经毒性 的机制及可能的预防措施将是该领域亟待解决的 前沿科学问题。本研究以吸入性麻醉药七氟醚为 例探讨了 α-2-肾上腺素能受体激动剂右美托咪啶 对全麻药神经毒性的保护作用及其作用机制。

中枢神经系统发育期, α-2-肾上腺素能受体释 放的内源性去甲肾上腺素可以调控细胞内的 Ras-Raf-pERK 信号通路,后者在神经发育方面发 挥重要作用^[9]。此外,在 NMDA 受体抑制剂引起 的神经细胞凋亡模型中,激活 Ras-Raf-pERK 信号 可起到明显的缓解作用^[10]。已有研究显示,α-2-肾上腺素能受体激动剂右美托咪啶可缓解发育期 异氟醚引起的神经细胞凋亡^[11],但作为小儿临床 麻醉中更为常用的七氟醚(可抑制 NMDA 受体)所 产生的神经毒性,右美托咪啶对其所产生的作用 尚不得而知。

前期的研究结果已经证实,在中枢神经系统 发育期吸入全麻药七氟醚可导致神经细胞凋亡及 空间学习记忆功能异常,同时研究结果也提示 ERK1/2 MAPK 信号通路可能在其中发挥重要作 用^[3-4]。本研究发现右美托咪啶对离体七氟醚神经 毒性模型具有较好的神经保护作用,应用 ERK1/2 MAPK 信号通路的抑制剂 U0126 可以完全逆转右 美托咪啶的神经保护作用,该结果进一步表明 ERK1/2 MAPK 信号在全麻药神经毒性机制中的 关键作用。

Bcl-2 家族成员如: Bcl-2、Bcl-XL、Bad、Bax 及 Caspases 等在中枢神经系统发育期的神经细胞 凋亡中起重要作用^[12]。本研究选择 Bcl-2 和 Bax 作为内源性细胞凋亡途径的标志蛋白,研究发现 右美托咪啶可以增加 Bcl-2,降低 Bax 的蛋白表达,

这说明右美托咪啶的神经保护作用可能主要是通 过抑制线粒体凋亡途径而实现的。右美托咪啶在 上调 ERK1/2 MAPK 和 Bcl-2 的同时,还参与正向 调控脑源性神经生长因子^[13]、磷酸化的 cAMP 反应 元件结合蛋白(phosphorylated-cyclic-AMP response element binding protein, P-CREB)^[14]及抗凋亡蛋白 mdm2^[15]等。因此,右美托咪啶还可能通过这些信 号通路共同缓解中枢神经系统发育期全麻药神经 毒性^[16]。

中枢神经系统发育期全麻药引起的神经细胞凋 亡与其后的空间学习记忆及情绪记忆密切相关^[2-5]。 本研究仅在离体七氟醚神经毒性模型中对右美托 咪啶的神经保护作用进行了评估。因而,在体中 右美托咪啶对七氟醚引起的学习记忆方面的影响 还有待进一步研究。尽管如此,此研究支持这样 的结论:α-2-肾上腺素能受体激动剂右美托咪啶可 缓解发育期七氟醚处理导致的神经细胞凋亡,其 机制与 ERK1/2 MAPK 信号通路密切相关。

REFERENCES

- ISTAPHANOUS G K, HOWARD J, NAN X, et al. Comparison of the neuroapoptotic properties of equipotent anesthetic concentrations of desflurane, isoflurane, or sevoflurane in neonatal mice [J]. Anesthesiology, 2011, 114(3): 578-587.
- [2] SATOMOTO M, SATOH Y, TERUI K, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice [J]. Anesthesiology, 2009, 110(3): 628-637.
- [3] WANG W Y, WANG H, LUO Y, et al. The effects of metabotropic glutamate receptor 7 allosteric agonist N, N⁻dibenzhydrylethane-1, 2-diamine dihydrochloride on developmental sevoflurane neurotoxicity: role of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. Neuroscience, 2012(205): 167-177.
- [4] WANG W Y, YANG R, HU S F, et al. *N*-stearoyl-*L*-tyrosine ameliorates sevoflurane induced neuroapoptosis via MEK/ ERK1/2 MAPK signaling pathway in the developing brain [J]. Neurosci Lett, 2013(541): 167-172
- [5] WANG W Y, LUO Y, JIA L J, et al. Inhibition of aberrant cyclin-dependent kinase 5 activity attenuates isoflurane neurotoxicity in the developing brain [J]. Neuropharmacology, 2014(77): 90-99.
- [6] DIMAGGIO C, SUN L S, 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]. J Neurosurg Anesthesiol, 2009, 21(4): 286-291.
- [7] WILDER R T, FLICK R P, SPRUNG J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort [J]. Anesthesiology, 2009, 110(4): 796-804.
- [8] DOBBING J, SANDS J. Comparative aspects of the brain growth spurt [J]. Early Hum Dev, 1979, 3(1): 79-83.

- [9] SONG Z M, ABOU-ZEID O, FANG Y Y. alpha2a adrenoceptors regulate phosphorylation of microtubuleassociated protein-2 in cultured cortical neurons [J]. Neuroscience, 2004, 123(2): 405-418.
- [10] HANSEN H H, BRIEM T, DZIETKO M, et al. Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain [J]. Neurobiol Dis, 2004, 16(2): 440-453.
- [11] SANDERS R D, XU J, SHU Y, et al. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats [J]. Anesthesiology, 2009, 110(5): 1077-1085.
- [12] BLOMGREN K, LEIST M, GROC L. Pathological apoptosis in the developing brain [J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 993-1010.
- [13] DEGOS V, CHARPENTIER T L, CHHOR V, et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression [J].

Anesthesiology, 2013, 118(5): 1123-1132.

- [14] YAN M, DAI H, DING T, et al. Effects of dexmedetomidine on the release of glial cell line-derived neurotrophic factor from rat astrocyte cells [J]. Neurochem Int, 2011, 58(5): 549-557.
- [15] ENGELHARD K, WERNER C, EBERSPACHER E, et al. The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats [J]. Anesth Analg. 2003, 96(2): 524-531.
- [16] SHEN S L, HU S F, ZHANG Y L. Comparison of dexmedetomidine and etomidate in providing conscious sedation for awake craniotomy on cerebral functional area [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(8): 890-896.

收稿日期: 2013-08-04

新诺明分子印迹传感器的制备及应用研究

覃燕平,黄学艺,余会成*,谭学才,唐响妹,黄雪花(广西民族大学化学化工学院,广西林产化学与工程重点实验室,南宁 530006)

摘要:目的 以吡咯为单体在玻碳电极表面电聚合一种新诺明分子印迹膜。方法 研究了聚吡咯、新诺明浓度、扫描圈 数及扫描速率对印迹膜制备的影响,并探讨检测液的 pH 值、乙腈与水的体积比对响应电流的影响。采用循环伏安法及 电化学交流阻抗技术对分子印迹膜进行表征。结果 在最佳实验条件下新诺明的浓度在 2.50×10⁻⁵~7.50×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 及 7.50×10⁻⁴~2.00×10⁻³ mol·L⁻¹内时,差分脉冲伏安法的峰电流响应值呈现线性关系(线性相关系数分别为0.995 8和0.996 7), 检出限(S/N=3)为 2.80×10⁻⁶ mol·L⁻¹。结论 印迹电极也显示出较好的选择性、重复性、稳定性。将此印迹传感器对复方 新诺明药品中磺胺甲噁唑的含量进行了测定,回收率在 94.2%~105.0%。

关键词:分子印迹聚合物;电聚合;新诺明;聚吡咯

中图分类号: R917.05 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)05-0528-07 **DOI**: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.003

Preparation and Its Application of Sulfamethoxazole Molecularly Imprinted Polymer Sensor

QIN Yanping, HUANG Xueyi, YU Huicheng^{*}, TAN Xuecai, TANG Xiangmei, HUANG Xuehua(Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To electroploymerize a molecularly imprinted polymer(MIP) film for sulfamethoxazole detection on a glassy carbon electrode by the use of pyrole monomer. **METHODS** The effects of sulfamethoxazole concentration, polypyrole concentration, number of scan cycle and scan rate on the MIP film were investigated respectively. The effects of pH value and acetonitrile-water ratio of detection liquid on response current were also explored. The imprinted film was characterised by electrochemical impedance spectroscopy(EIS) and cyclic voltammetry (CV). **RESULTS** The results indicated the DPV peak current showed a linear dependence on the sulfamethoxazole concentration in the ranges of $2.50 \times 10^{-5} - 7.50 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹ and $7.50 \times 10^{-4} - 2.00 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹ of sulfamethoxazole(each correlation coefficient of 0.995 8 and 0.996 7, respectively) with the detection limit (S/N=3) of 2.80×10^{-6} mmol·L⁻¹, under the optimal experimental conditions. **CONCLUSION** This MIP

基金项目: 广西民族大学研究生创新项目(gxun-chx2013t19); 广西高校大学生创新创业训练计划项目(2013CX051) 作者简介: 覃燕平, 女 Tel: (0771)3260558 E-mail: 422861877@qq.com ^{*}通信作者: 余会成, 男, 博士, 副教授 Tel: (0771)3260558 E-mail: doyhc@126.com