文章编号:1000-5404(2006)16-1663-04

论著

持续惊厥后海马神经营养因子表达及其影响因素

胡 越,蒋 莉,张晓萍 (重庆医科大学儿童医院神经内科,重庆 400014)

提 要:目的 观察持续惊厥(status convulsion, SC)发作后海马神经细胞内BDNF、NGF表达的规律,探讨年龄、惊厥持续时间对BDNF、NGF表达的影响。**方法** 选用幼年和成年Wistar鼠诱发SC,分别于30 min SC及3 hSC后不同时间点处死实验动物。采用免疫组化观察海马表达BDNF、NGF的细胞类型与定位,并应用酶联免疫吸附实验对海马BDNF、NGF含量进行定量分析。**结果** ①Wistar鼠BDNF、NGF主要分布于齿状回颗粒细胞和锥体细胞。②SC后,幼年和成年鼠海马BDNF、NGF的表达均呈增加趋势。但NGF增加的水平和持续时间均较BDNF明显为低,呈现双相升高的特点。③海马BDNF的表达与惊厥时程呈正相关性;而NGF表达却并未随惊厥时间的延长而增加。④无论是短时或长程的SC发作,幼鼠海马内BDNF的表达速度和强度均快于、强于成年鼠;且随惊厥发作持续时间的延长,此种年龄差异性更为明显。**结论** ①SC主要诱发大鼠海马神经细胞BDNF表达,对NGF表达的影响较小。②SC后大鼠海马神经细胞BDNF的表达受惊厥持续时间和年龄的影响。幼年鼠的表达速度和强度均优于成年鼠,其差异与惊厥持续时间呈正相关($P<0.05$)。

关键词: 惊厥持续状态;海马;神经营养因子;年龄;惊厥持续时间

中图法分类号: R341;R741.02;R742 **文献标识码:** A

Expression of neurotrophic factor in hippocampus and its correlative factors after status convulsion

HU Yue, JIANG Li, ZHANG Xiao-ping (Department of Neurology, The Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in hippocampus after status convulsion (SC) and explore the influence of age and duration of SC on the expression of BDNF and NGF. **Methods** Animal model with the different durations of SC (30 min, 3h) were established by intraperitoneal injection of 3 mEq/kg lithium chloride, 18 – 20 h later, followed by 5 mg/kg pilocarpine in 40 adult Wistar rats aged 2 – 3 months and 40 20-day-old Wistar rats. The normal control and experimental control were made in ten adult rats and ten 20-day-old rats ($n=5$ for each control). The rats were sacrificed at 3 h, 6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 7 d after 30-minute SC, or 3 h, 1 d after 3-hour SC respectively. The location and cell type expression of BDNF and NGF in the hippocampus were observed by immunohistochemistry. The levels of BDNF and NGF at different time points were quantitatively analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The cells expressing BDNF and NGF located mainly in the dentate granule cells and CA1-CA4 pyramidal cells of hippocampus. The most positive immunoreactivity was in cytoplasm, partly in axons. The expression of BDNF had the tendency of increase in all rats after 3-hour SC, peaked at 1 d and 3 d respectively. These increases lasted for at least 7 d. Moreover, a several-fold increase was observed at the peak levels. The patterns of NGF expression were similar to that of BDNF after SC. The elevated degree and duration of NGF expression were remarkably lower than that of BDNF, declining abruptly to below control levels by 12 h with the characteristic of biphasic increase. The expression of hippocampal BDNF had the positive correlation with the duration of SC, but that of NGF was not. No matter the duration of SC, there was more rapid and evident induction of BDNF in 20-day-old rats and adult rats. Moreover, the age-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271382)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271382)

作者简介: 胡 越(1977 –),女,四川省广汉市人,硕士,医师,主要从事脑发育与癫痫性脑损伤方面的研究。电话:(023)60970703, E-mail: huyue915@163.com

通讯作者: 蒋 莉,电话:(023)63632756-3535,E-mail: jiangli@hotmail.com

收稿日期: 2005-09-06;**修回日期:** 2006-03-15

related difference was more obvious for the longer duration of SC. **Conclusion** SC induced the expression of BDNF chiefly in hippocampus, and had minor influence on that of NGF. The expression of BDNF was related to age and duration of SC. There was a more rapid and marked induction of BDNF in 20-day-old rats and adult rats. The age-related difference had the positive correlation with the duration of SC.

Key words: status convulsion; hippocampus; neurotrophic factor; age; duration of status convulsion

神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)是一类特异性神经元存活、再生、发育、分化和细胞损伤后修复不可缺少的多肽类物质,主要包括脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经营养因子-4(neurotrophin-4, NT-4)和神经营养因子-5(neurotrophin-5, NT-5)。近年来研究提示,NTFs 在癫痫发生发展的分子机制中具有重要意义。

未成熟脑内神经元及其轴突尚在发育过程中,可能对 NTFs 的反应性与成年大脑神经元存在差异。因此,持续惊厥发作后,在不同年龄期脑内神经营养因子的表达是否存在差异,从而影响其对惊厥性损伤的耐受性? 目前尚不清楚。

本研究通过制造不同发育期、不同时程的 SC 动物模型,研究 SC 后海马神经元 BDNF、NGF 表达的动态变化及其影响因素。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年(2~3 月龄)及生后 20 d 幼年 Wistar 鼠各 50 只(重庆医科大学实验动物中心提供)。每组各 40 只用于制作 SC 模型,于 30 min 及 3 h SC 后不同时间点处死($n=5$)。另设正常对照和实验对照组(正常大鼠腹腔注射阿托品 + 水合氯醛),每组 5 只。

1.2 SC 模型制作[1]

大鼠经腹腔注射氯化锂 3 mEq/kg,18~20 h 后再腹腔注射匹罗卡品 50 mg/kg。按 Simialowski 6 级评定法,持续 30 min 以上的Ⅳ级或Ⅴ级发作确认为本组 SC 模型。大鼠惊厥发作 15 min 后,腹腔注射阿托品(1 mg/kg)。在惊厥发作 30 min 和 3 h 时,腹腔注射水合氯醛(400 mg/kg)终止惊厥发作。于 30 min SC 后 3、6、12 h、1、3、7 d 以及 3 h SC 后 3 h、1 d 不同时点断头取脑。

1.3 免疫组化定位观察 BDNF、NGF 蛋白表达

实验动物断头取脑。其左半球自视交叉至侧脑室后角平面连续冠状冰冻切片(8 μm),裱片于多聚赖氨酸处理的载玻片。取相邻脑组织切片用免疫组化观察 BDNF、NGF 的定位。按即用型 S-P 免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司)说明操作。重点观察阳性细胞的类型与细胞分布部位。

1.4 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测海马 BDNF、NGF 含量

直接断头取脑,右半球分离海马($n=5$)。单侧海马称湿重后,按 W∶V = 1∶100 加入蛋白裂解液,1 ml 匀浆器充分匀浆。4 ℃匀浆液 14 000 × g 离心 15 min,收集上清液。考马斯亮蓝染料结合法测匀浆液的总蛋白含量(μg/ml)。ELISA 的方法测匀浆液中 BDNF 含量(Promega 公司)。结果以 BDNF(pg/ml)/总蛋白(μg/ml)表示。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件对实验数据进行统计处理。所有计量资料均值均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素多均数间差异作 F 检验,均值间两两比较作 q 检验;成组设计资料两样本均数间比较采用 t 检验;两变量间关系采用偏相关参数分析。

2 结果

2.1 SC 后不同龄期大鼠海马 BDNF、NGF 含量的动态变化

表 1 显示,SC 后 3 h,幼年鼠海马 BDNF 含量明显高于惊厥前($P<0.05$),至惊厥后 1 d 达到高峰,7 d 内逐渐回落至正常。SC 后成年鼠海马 BDNF 呈缓慢上升趋势,至发作后 1 d 才显著高于发作前($P<0.05$);SC 后 3 d 达到高峰,后逐渐下降,持续 7 d 左右。以惊厥前后 BDNF、NGF 上升的绝对值为观察指标,从表 1 发现成年鼠海马 NGF 增多的水平较 BDNF 明显低,且持续时间也较短暂,呈双相升高,分别于惊厥停止后 6 h 和 3 d 出现两次高峰。幼年大鼠海马 NGF 变化趋势与成年大鼠类似,但升高幅度较成年大鼠低,与惊厥前相比无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 不同处理后不同龄期大鼠海马 BDNF、NGF 表达的动态变化(pg/μg)

组别	BDNF 含量		NGF 含量	
	幼年组	成年组	幼年组	成年组
正常组	6.65 ± 1.60	5.91 ± 1.63	2.63 ± 0.80	3.83 ± 1.93
实验对照组	6.13 ± 1.47	6.98 ± 1.56	3.06 ± 0.93	4.77 ± 0.42^{c}
30 min SC 后实验组				
SC 后 3 h	11.22 ± 2.44^{a}	9.97 ± 1.12	3.30 ± 0.66	5.25 ± 1.86
SC 后 6 h	10.35 ± 1.52^{a}	9.33 ± 1.25	3.75 ± 1.02	6.01 ± 1.28^{ac}
SC 后 12 h	12.16 ± 2.68^{a}	10.60 ± 2.06	1.56 ± 1.53	2.36 ± 1.14
SC 后 1 d	13.16 ± 2.05^{a}	13.37 ± 5.61^{a}	2.09 ± 1.24	5.36 ± 2.51^{c}
SC 后 3 d	10.27 ± 1.76^{a}	13.96 ± 2.80^{ac}	3.04 ± 1.66	6.07 ± 2.22^{ac}
SC 后 7 d	7.75 ± 2.17	9.04 ± 2.80	3.27 ± 0.29	4.65 ± 0.69^{d}
3 h SC 后实验组				
SC 后 3 h	28.58 ± 2.96^{bf}	12.44 ± 1.45^{bd}	5.52 ± 1.02^{b}	5.28 ± 1.30
SC 后 1 d	32.57 ± 3..72^{b}	35.11 ± 5.15^{b}	4.31 ± 0.78^{a}	5.78 ± 0.96^{e}

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与同年龄正常组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与相同时点间幼年组比较; e: $P<0.05$, f: $P<0.01$, 与 30 min SC 后实验组相同时点比较

2.2 惊厥持续时间对大鼠海马 BDNF、NGF 表达的影响

根据以上结果,选择 30 min 惊厥后幼年大鼠海马 BDNF 开

始明显增加及到达高峰的时点(SC 后 3 h、1 d)，对比观察持续惊厥 30 min 和 3 h 后，海马 BDNF、NGF 表达的变化。结果见表 1。

延长惊厥持续时间至 3 h 后，无论从海马 BDNF 的绝对含量变化或者改变速率，幼年和成年鼠均较同年龄组 30 min SC 发作后有明显增加($P<0.01$)。在惊厥停止后 3 h 时点观察，幼年鼠海马 BDNF 含量是发作前的 3.3 倍，是 30 min SC 组的 1.5 倍；成年组 BDNF 含量发作前的 1.1 倍；是 30 min SC 组的 0.3 倍。随后均呈持续性上升趋势。SC 后 1 d，两年龄组海马 BDNF 表达高于 SC 后 3 h，且成年鼠略超过幼年鼠水平。经偏相关参数分析示，在排除年龄的影响后，不同惊厥持续时间与海马 BDNF 的含量二者偏相关系数为 0.860，$P=0.028$，有统计学意义，提示 SC 后海马 BDNF 表达的增加与惊厥持续时间呈正相关性。

延长惊厥持续时间至 3 h，两组大鼠海马 NGF 含量亦均呈上升表现。在惊厥停止后 3 h 时点观察，幼年鼠海马 NGF 含量是发作前的 1.1 倍，是 30 min SC 组的 0.67 倍；成年组 NGF 含量是发作前 0.37 倍，是 30 min SC 组的 0.005 倍。幼年大鼠海马 NGF 表达与同年龄正常组相比较差异有统计学意义，其增加速度较成年大鼠更快，但其绝对含量无明显年龄差异性。随后，幼年鼠海马 NGF 表达开始回落，而成年大鼠海马 NGF 含量仍呈上升趋势，惊厥后 1 d 高于幼年鼠，两组比较有统计学意义($P<0.05$)。

偏相关参数分析示，在排除年龄的影响后，不同惊厥持续时间与海马 NGF 的含量二者偏相关系数为 0.692，$P=0.128$，无统计学意义。结果提示，SC 后海马 NGF 表达的增加与惊厥持续时间无明显相关性。

2.3　免疫组化定位观察 BDNF、NGF

正常大鼠 BDNF、NGF 主要分布于海马 CA1～CA4 区锥体细胞和齿状回颗粒细胞，以细胞质着色为主，部分可见轴突着色。

3　讨论

持续惊厥发作后将导致海马神经元坏死及凋亡，产生惊厥性脑损伤。众所周知，正常组织细胞在受到外界刺激时，将激活其损伤与抗损伤机制，由此决定细胞的死亡或存活。因此，持续惊厥不仅引起了神经元缺失以及轴突重建等形态学的改变，也将引发脑组织的一系列生化改变，从而促进神经元存活，保护惊厥性脑损伤。

3.1　持续惊厥发作后大鼠海马 BDNF 和 NGF 的动态改变及其可能机制

BDNF、NGF 主要分布于中枢神经系统，尤以海马的含量最高。研究表明，伴有谷氨酸释放和钙内流的各种对脑的伤害性刺激，如惊厥发作[2]、脑缺血[3]、脑外伤[4]等均可导致海马和皮层神经元内 NTFs 表达的改变。但是 BDNF 和 NGF 在产生部位、数量和时间上存在差异。本研究提示惊厥发作后主要诱发大鼠海马 BDNF 的表达变化。较之 NGF，SC 后海马神经细胞内 BDNF 的快速增加，对惊厥的发生与发展具有更重要的作用。

SC 后，BDNF 和 NGF 表达改变的差异，可能与不同神经细胞在应激反应后，通过不同的信号传导途径产生应答反应有关。Timmusk 等[5]认为 AP-1 位点是 NGF 基因表达的激活位点，启动 AP-1 位点，可以调控 NGF 基因表达；而 BDNF 启动子区域均没有 AP-1 位点。这可能是惊厥发作后 BDNF 和 NGF 的应答反应存在差异的一个原因。Bengzon 等[6]认为，惊厥后 NGF 变化呈双相升高的特点，是因为神经细胞存在对原发刺激(如细胞除极化、钙离子内流等)和继发反应(惊厥激活激素或其他营养因子表达)应答的结果。

3.2　惊厥对未成熟大脑 BDNF 的影响

BDNF 能促进神经元生长、分化及存活，影响突触传递、触发可塑性反应及突触重构。在生后 30 d 内，大鼠大脑的 BDNF 表达水平呈上升趋势[7]。而在海马，即使神经元活性已经严重丧失，其表达水平仍持续增加[8]。因此维持一定水平的 BDNF 对大脑的发育以及正常功能具有十分重要的意义。但惊厥是否影响未成熟大脑 NTFs 的表达目前尚有争议。Dugich 等[9]发现海人酸处理后，P7 大鼠大脑 BDNF 水平没有改变，P14 大鼠齿状回颗粒细胞 BDNF 水平有微弱上升，提示发育早期 BDNF 表达不受神经元活动调节。Kornblum 等[10]证实惊厥可以上调新生以及幼年大鼠大脑 BDNF 的表达，高峰效应可能在发育早期。

基于以上研究结果，我们采用相当于人类婴儿期的 P20 Wistar 大鼠研究惊厥发作后 NTFs 表达的变化，对比分析不同时程惊厥发作后成年与幼年海马细胞内 BDNF 蛋白表达水平及规律。结果表明，惊厥发作后 3 h，幼年大鼠海马细胞 BDNF 含量即显著高于发作前水平($P<0.05$)。无论是短程或长时程 SC 发作后，幼年鼠海马细胞 BDNF 的表达速度均快于成年鼠，而且随惊厥发作持续时间的延长，其年龄差异性更为明显。但幼年大鼠海马对 BDNF 维持程度则不如成年大鼠。海马对 BDNF 维持程度的年龄差异性可能与细胞内信号转导途径，以及调节这些效应的离子通道的成熟程度有关。BDNF 在癫痫发作后长时间存在，可能对维持神经元存活、再生以及癫痫发作后神经系统的重塑(尤其是苔藓纤维发芽)具有重要意义。

本实验提示，持续惊厥发作后，将主要诱导大鼠海马细胞对 BDNF 的快速应达。BDNF 表达的年龄差异性主要反映在对惊厥刺激的应答速度及程度，幼年鼠海马细胞内 BDNF 的反答显著快于且强于成年鼠，而且，随惊厥发作持续时间的延长，这种年龄差异性更为明显。结合本课题前期实验结果[11]，惊厥后神经细胞凋亡与年龄和惊厥持续时间存在相关性，与惊厥后海

马BDNF表达呈相反变化，提示BDNF可能对惊厥性脑损伤具有保护作用。幼年鼠可能正是因为存在BDNF的快速应答反应，从而较成年大鼠能更早地启动抵抗惊厥性脑损伤的内在保护性机制，主动抑制了神经元的凋亡过程。

参考文献：

[1] 胡 越，蒋 莉. 控制氯化锂-匹罗卡品诱发惊厥持续状态发作的实验研究[J]. 儿科药学杂志，2003，9(4)：5-8.

[2] KOYAMA R, IKEGAYA Y. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus[J]. Neuroscientist, 2005, 11(4): 282-287.

[3] PERA J, ZAWADZKA M, KAMINSKA B, *et al*. Neurotrophic factor expression after focal brain ischemia preceded by different preconditioning strategies[J]. Cerebrovasc Dis, 2005, 19(4): 247-252.

[4] KAZANIS I, GIANNAKOPOULOU M, PHILIPPIDIS H, *et al*. Alterations in IGF-I, BDNF and NT-3 levels following experimental brain trauma and the effect of IGF-I administration [J]. Exp Neurol, 2004, 186(2): 221-234.

[5] TIMMUSK T, PALM K, METSLS M, *et al*. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene [J]. Neuron, 1993, 10(3): 475-489.

[6] BENGZON J, SODERSTROM S, KOKAIA Z, *et al*. Widespread increase of nerve growth factor protein in the rat forebrain after kindling-induced seizures [J]. Brain Res, 1992, 587(2): 338-342.

[7] KATOH-SEMBA R, TAKEUCHI I K, SEMBA R, *et al*. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain [J]. J Neurochem, 1997, 69(1): 34-42.

[8] KATOH-SEMBA R, SEMBA R, TAKEUCHI I K, *et al*. Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3[J]. Neurosci Res, 1998, 31(3): 227-234.

[9] DUGICH DJORDJEVIC M M, TOCCO G, WILLOUGHBY D A, *et al*. BDNF mRNA expression in the developing rat brain following kainic acid-induced seizure activity[J]. Neuron, 1992, 8(6): 1127-1138.

[10] KORNBLUM HI, SANKAR R, SHIN D H, *et al*. Induction of brain derived neurotrophic factor mRNA by seizures in neonatal and juvenile rat brain [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 44(2): 219-228.

[11] 胡 越，蒋 莉，李 欣，等. 持续惊厥后影响海马神经元凋亡的相关因素[J]. 中华神经科杂志，2006，39(1)：36-39.

（编辑 龙 亮）

（上接1662页）

2 讨论

2.1 操作中注意事项

穿刺成功后，妥善固定穿刺针；在送导丝过程中，若遇阻力，说明穿刺针抵触血管壁或滑出血管外，这时不可强行再进导丝，应退出导丝；调整穿刺针位置，如稍前进或后退，抽吸有回血时再送入导丝；或重新穿刺成功后，再送入导丝。

扩开皮下隧道方法正确：导丝送入成功后，扩皮器扩开皮下隧道时，应沿着导丝的方向操作，以免扭曲导丝，造成送入导管困难或无法送入。

导管送入长度适宜：颈内静脉与锁骨下静脉汇合为头臂（无名）静脉进入上腔静脉。从胸锁乳突肌中点至上腔静脉的距离，成人右侧为10～12 cm，左侧为12～15 cm[1]。临床上通常从右颈内静脉插入导管15 cm，以便使导管到达上腔静脉与右心房交界处。插管过程中密切观察有无气胸、空气栓塞等并发症发生。

2.2 导管使用注意事项

保持通畅：输液前、快速输入0.9%氯化钠注射液冲管，若滴速偏慢又排除了体位因素时，则从头皮针注入0.9%氯化钠注射液10 ml冲管。输完液后，经肝素帽向导管内注入稀释肝素钠3～4 ml，1好管夹。

防止感染：输液前，用皮肤消毒剂达直消毒肝素帽；做好穿刺点局部及缝线处皮肤护理，普通敷贴每1～2天更换1次，透明敷贴可3～5 d更换1次。若穿刺点有明显红肿时，可予金霉素软膏消炎。

保护导管：乳腺癌患者化疗周期长（一般本面2～4个疗程，术后4～6个疗程），相应导管留置时间也较长，应妥善固定导管，防止导管弯曲、折叠，对患者及亲属的宣教也要到位，防止脱管、洗澡等不小心拽脱导管。

监测导管：留置导管期间若T＞38.5 ℃，应常规从导管抽血及周围静脉抽血作血培养，血常规，排除其他因素引起的发热，则考虑为导管感染引起的发热，应立即拔除导管并常规做导管尖端细菌培养。

2.3 体会

反复多次从手背或前臂静脉穿刺以及化疗药物对血管的较强刺激，引起局部疼痛，静脉炎发生率高达60%～78%[2]，颈内静脉穿刺插管并发症少，特别是右侧穿刺，导管很容易从颈内静脉进入上腔静脉而到达理想位置[3]，且插管后不影响手术操作。既解决了乳腺癌患者手术后输液部位的限制以及手术前后多个疗程化疗的问题，又预防或减少了静脉炎发生，减轻了患者痛苦，确保了化疗顺利进行。本组病例导管留置时间最短15 d，最长45 d，平均25 d，输化疗药期间患者无疼痛、肿胀、胀木等不适感觉，不影响其休息、活动，因而颈内静脉插管成为乳腺癌患者首选的深静脉插管途径。

关键词：颈内静脉；穿刺插管；乳腺癌患者

中图法分类号：R472.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] 石中柔，盛卓夫. 麻醉解剖学[M]. 北京：中国医学科技出版社，1991：48.

[2] 刘俊杰，赵 俊. 现代麻醉学[M]. 北京：人民卫生出版社，1987：1056.

[3] 张晓云，翟向岩，李亚珍. 头甲长春花碱不同给药方式局部反应的观察及护理[J]. 中国肿瘤临床与康复，1999，6(1)：70-71.

[4] 裘法祖. 外科学[M]. 第4版. 北京：人民卫生出版社，1998：151.

（编辑 陈聪连）