文章编号:1000-5404(2014)19-1981-06

论著

proBDNF对培养鼠小脑颗粒细胞增殖和凋亡的影响

陈 甲,张 涛,刘 娟,蒋晓江,许志强 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科)

[摘要] **目的** 观察脑源性神经营养因子前体(proBDNF)对培养的小鼠小脑颗粒细胞(CGCs)的增殖和凋亡的影响,探讨p75神经营养因子受体(p75NTR)和VPS10P-结构域家族成员sortilin的介导机制。**方法** 采用出生后7 d(P7)的129SV转基因小鼠(p75NTR$^{+/+}$和p75NTR$^{-/-}$)进行CGCs的原代培养。分为BSA组(10 ng/mL)、proBDNF干预组(10 ng/mL)和proBDNF(10 ng/mL)+sortilin-Fc(20 ng/mL)干预组。免疫荧光染色法观察p75NTR和sortilin在培养细胞的表达,BrdU标记阳性增殖细胞以及TUNEL法检测凋亡细胞。**结果** 成功培养出高纯度的原代小脑颗粒细胞。免疫荧光显示p75NTR和sortilin共同表达于野生型小鼠培养的小脑神经元胞膜和突起上。给予proBDNF干预后,p75NTR$^{+/+}$型CGCs的BrdU阳性细胞比例较对照组明显减少($P<0.01$),而TUNEL阳性细胞比例较对照组明显增加($P<0.01$),且这两种效应都可被sortilin-Fc竞争性抑制并中和;p75NTR$^{-/-}$型CGCs中各组之间BrdU阳性细胞以及TUNEL阳性细胞比例均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** proBDNF可能通过与p75NTR、sortilin结合形成功能三聚体抑制神经细胞的增殖、促进细胞凋亡,proBDNF具有神经毒性作用。

[关键词] 脑源性神经营养因子前体;小脑颗粒细胞;增殖;凋亡
[中图法分类号] R322.81; R329.28; R341 [文献标志码] A

proBDNF inhibits cell proliferation and apoptosis in cultured cerebellar granule cells

Chen Jia, Zhang Tao, Liu Juan, Jiang Xiaojiang, Xu Zhiqiang (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of brain-derived neurotrophic factor precursor (proBDNF) on the proliferation and apoptosis of cultured cerebellar granule cells (CGCs) and investigate the underlying mechanism of p75 neurotrophin receptor (p75NTR)/VPS10P-domain family member sortilin pathway. **Methods** CGCs was isolated from 7-day-old transgenic 129SV mice (p75NTR$^{+/+}$ and p75NTR$^{-/-}$) and then primarily cultured followed by identification. Then the cells were treated with BSA (10 ng/mL), proBDNF (10 ng/mL), proBDNF (10 ng/mL) + sortilin-Fc (20 ng/mL) respectively. Immunofluorescent staining was performed to detect the expression of p75NTR and sortilin in the cultured cells. BrdU and TUNEL positive cells were detected to calculate the proportion of proliferation and apoptosis, respectively. **Results** Primary CGCs were successfully cultured with high purity. Immunofluorescent staining showed a co-expression of p75NTR and sortilin was seen in the cultured p75NTR$^{+/+}$ cerebellar neurons, locating in the cell membrane and neurites. proBDNF treatment resulted in the percentage of BrdU positive cells were significantly decreased ($P<0.01$), but the TUNEL positive cells increased ($P<0.01$) in p75NTR$^{+/+}$ cultured CGCs. But these effects were inhibited and neutralized by sortilin-Fc. However, no such change was observed in p75NTR$^{-/-}$ cultured CGCs ($P>0.05$). **Conclusion** proBDNF inhibits the proliferation and apoptosis of CGCs probably *via* forming a triple with p75NTR and sortilin, and exerts a toxic effect on nervous system.

[**Key words**] brain-derived neurotrophic factor precursor; cerebellar granule cells; proliferation; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271411) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10098). Corresponding author: Xu Zhiqiang, Tel: 86-23-68757862, E-mail: xzq881@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271411);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10098)
[通信作者] 许志强,电话:(023)68757862,E-mail:xzq881@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140807.1554.001.html(2014-08-07)

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)是神经营养因子家族中的重要一员,具有促进神经细胞增殖、存活、分化以及突触可塑性的作用[1]。BDNF由脑源性神经营养因子前体(brain-derived neurotrophic factor precursor,proBDNF)在多种蛋白酶作用下裂解而成,proBDNF与BDNF共同广泛存在于中枢神经系统[2]。目前认为,proBDNF不只是BDNF的前体,其本身可能有着与BDNF功能截然不同的作用,如促进海马长时程抑制(long-term depression,LTD)神经肌肉接头的形成[3]等。我们既往的研究表明,proBDNF与其受体p75神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor,p75NTR)和VPS10P-结构域家族成员sortilin共存于新生鼠小脑颗粒层,proBDNF可能通过同时与受体p75NTR、sortilin结合形成功能三聚体而介导对小脑颗粒细胞迁移的抑制作用[4],但有关proBDNF及其受体在小脑发育过程中的作用及机制尚不明确。为此,我们采用抗裂解重组蛋白proBDNF研究离体条件下其对新生鼠小脑颗粒细胞增殖和存活的影响,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

抗裂解重组蛋白ProBDNF、青链霉素双抗(100 U/mL,P/S)、多聚赖氨酸(PDL)购自美国Sigma公司;胎牛血清(FBS)、Neurobasal培养液、B27添加剂、L-谷氨酰胺(L-Glu)购自美国Gibco公司;融合了人IgG Fc段的sortilin蛋白(sortilin-Fc)由南澳大利亚大学周新富教授赠送;多聚甲醛、D-Hanks解剖液、甲基绿染色液购自中国碧云天公司。细胞培养箱(Thermo forma,美国),荧光显微镜(Olympus,日本)。

1.2 原代神经元培养、鉴定

实验小鼠为p75NTR$^{+/+}$(野生型)或p75NTR$^{-/-}$(突变纯合子型)新生转基因小鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。本实验选择鼠小脑颗粒层发育最佳的出生后7 d作为收集原代小脑颗粒细胞的时机[5]。主要过程如下:75%乙醇消毒后断头,分离小脑,剥离皮质颗粒层,剪碎至1 mm^{3}大小,0.125%胰酶消化20 min,15% FBS终止消化,轻轻吹打至混浊,900 r/min离心5 min,种植培养液(94% Neurobasal +2% B27 +1% L-Glu +2% FBS + 1% P/S)重悬细胞,计数后接种于PDL包被过夜的圆形玻片上,6孔板内37 ℃、5% CO_2条件下培养,6 h后全量更换为维持培养液(96% Neurobasal +2% B27 +1% L-Glu +1% P/S),继续培养72 h后进行鉴定。采用兔抗神经元前体细胞微管相关蛋白Doublecortin(DCX)抗体(1∶200,Abcam,英国)特异性标记新生神经元,荧光二抗(488-驴抗兔IgG,1∶500,Invitrogen,美国)进行染色,4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(1 μg/mL,碧云天,中国)复染细胞核,计算培养神经元的纯度。野生型培养神经元分组:牛血清白蛋白(BSA)组(10 ng/mL)、proBDNF干预组(10 ng/mL)和proBDNF(10 ng/mL) + sortilin-Fc (20 ng/mL)干预组。突变纯合子培养神经元分组:BSA组(10 ng/mL)、proBDNF干预组(10 ng/mL)。

1.3 免疫荧光检测p75NTR和sortilin的表达

原代小脑颗粒细胞培养36 h后,4%多聚甲醛固定细胞30 min,PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)洗涤(5 min,3次),5% BSA封闭20 min,相同封闭液稀释的一抗(大鼠抗p75NTR,1∶200,Abcam;兔抗sortilin,1∶200,Abcam)4 ℃下孵育过夜,荧光标记的二抗(Cy3-山羊抗大鼠IgG,1∶500,Abcam;488-驴抗兔IgG,1∶500),37 ℃避光孵育1 h。DAPI染色后甘油封片,荧光显微镜下观察照相。

1.4 BrdU检测增殖细胞

各组细胞按20 ng/mL给予5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU,购自Sigma)标记增生的细胞,37 ℃、5% CO_2继续培养2 h,4%多聚甲醛室温下固定30 min,PBS洗涤后滴加盐酸(2 nmol/L,37 ℃,20 min)进行核酸变性,5% BSA封闭20 min,4 ℃下一抗(大鼠抗BrdU,1∶1 000,Sigma;兔抗DCX,1∶200)分别孵育并过夜,室温下荧光标记的二抗(Cy3-山羊抗大鼠IgG,1∶500;488-驴抗兔IgG,1∶500)避光孵育1 h,DAPI染色,封片,荧光显微镜下观察照相。随机选取10个视野(×200)进行BrdU阳性细胞和DAPI阳性细胞计数,分别取平均值即为BrdU阳性细胞数和DAPI阳性细胞数,BrdU阳性细胞百分比 = BrdU阳性细胞数/DAPI阳性细胞数×100%。

1.5 TUNEL检测神经元凋亡

采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记测定法(TUNEL)检测凋亡细胞。根据说明书操作,并进行甲基绿复染。主要过程如下:细胞培养36 h后4%多聚甲醛固定30 min,0.1% Triton X-100孵育5 min,0.3% H_2O_2的甲醇室温下孵育20 min,生物素标记液(TdT酶与生物素标记的dUTP为1∶24)孵育细胞(37 ℃、60 min),终止反应,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素,室温孵育30 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,甲基绿染色液复染5~10 min,镜下观察。细胞核中有棕色颗粒者为TUNEL阳性细胞,随机计数10个视野(×200)并取平均值即为TUNEL阳性细胞数,TUNEL阳性细胞百分比 = TUNEL阳性细胞数/细胞总数 ×100%。

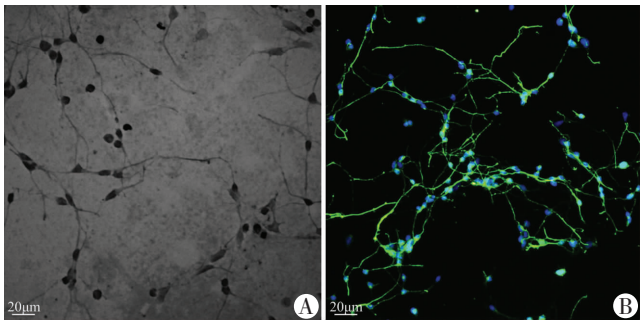
1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用 t 检验。

2 结果

2.1 新生小脑颗粒细胞的培养鉴定

倒置显微镜观察培养72 h的原代小脑颗粒细胞:细胞贴壁生长良好,部分成簇,神经突起生长良好,相互连接(图1A)。DCX抗体标记新生神经元并进行免疫荧光染色,DAPI复染胞核。结果显示,绝大多数的培养细胞为DCX阳性细胞(图1B)。随机观察8个视野(×200),计算DCX阳性细胞数(绿色)和DAPI阳性细胞数(蓝色)平均值,计算神经元纯度。神经元纯度 = 平均DCX阳性细胞值/平均DAPI阳性细胞值,结果为96.8%,说明培养的小脑颗粒细胞具有很高的纯度。



A:倒置显微镜观察细胞形态变化(结晶紫染色);B:荧光显微镜观察细胞形态变化(免疫荧光染色和 DAPI 染色)

图 1 72 h 的新生小脑颗粒细胞的培养鉴定

2.2 p75NTR 和 sortilin 在小脑颗粒细胞中的表达

我们分别在 p75NTR$^{+/+}$ 和 p75NTR$^{-/-}$ 基因型来源的培养细胞中进行 p75NTR 和 sortilin 表达的检测。结果显示,在培养的 p75NTR$^{+/+}$ 鼠小脑颗粒细胞中,p75NTR(红色)和 sortilin(绿色)分布于新生鼠培养的小脑颗粒细胞的胞膜和神经突起上;在培养的 p75NTR$^{-/-}$ 鼠小脑颗粒细胞中,p75NTR 未见表达(阴性结果),而 sortilin(绿色)分布于胞膜和神经突起上。结果显示 p75NTR 和 sortilin 能够广泛分布于野生型新生鼠小脑颗粒细胞的胞膜和突起上,而 p75NTR 基因表达缺失不影响 sortilin 的正常表达(图 2)。

2.3 proBDNF 对培养小脑颗粒细胞增殖的影响

采用 BrdU 标记法检测新生小鼠培养的小脑颗粒细胞的增殖情况。我们分别利用了野生型(p75NTR$^{+/+}$)和突变纯合子型(p75NTR$^{-/-}$)小鼠来源的小脑颗粒细胞来检验proBDNF对细胞增殖的作用(表 1)。p75NTR$^{+/+}$ 组结果显示,加入 10 ng/mL proBDNF 后,培养的野生型小脑颗粒细胞增殖比例明显少于对照组($P<0.01$),当加入 sortilin-Fc 后,增殖比例多于 proBDNF 组($P<0.01$),与对照组相当($P>0.05$,图 3);p75NTR$^{-/-}$ 组结果显示,加入 proBDNF 后细胞增殖比例与对照组相比无明显变化($P>0.05$,图 4)。结果表明,proBDNF 能够抑制培养的野生型小脑颗粒细胞的增殖,而这种作用能够因 p75NTR 表达的缺失或 sortilin-Fc 的加入而消除。

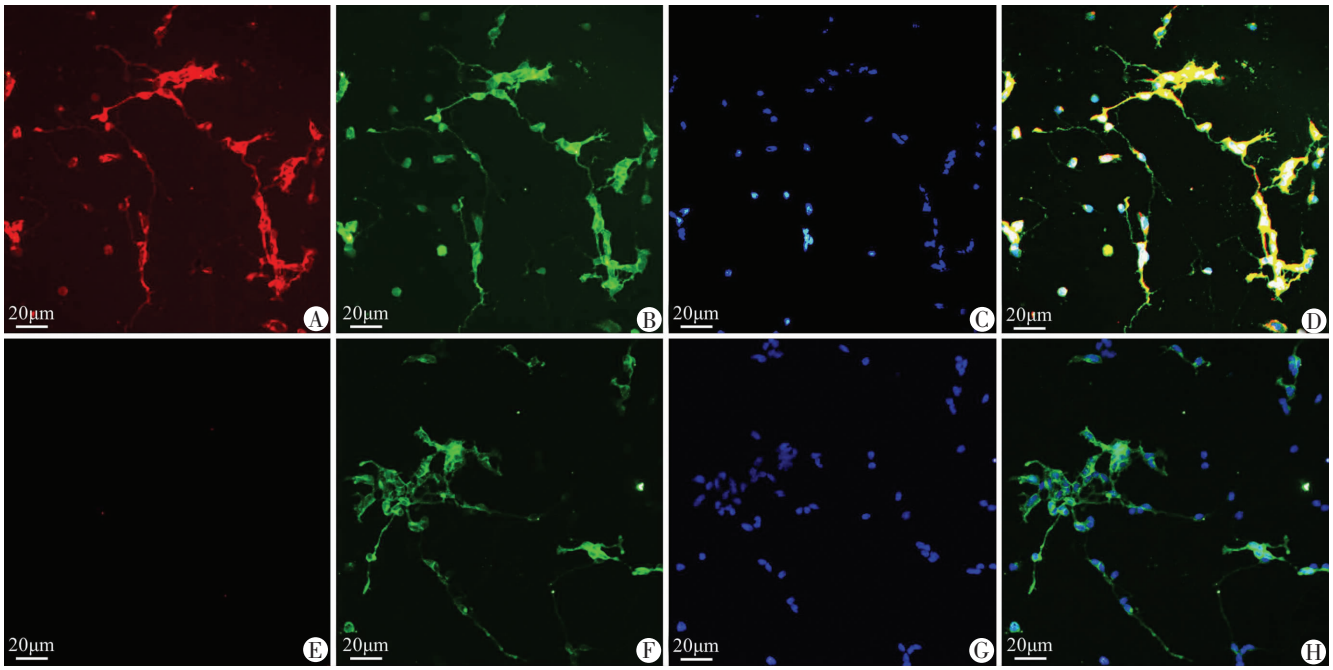
2.4 proBDNF 对培养小脑颗粒细胞凋亡的影响

不同基因型新生小鼠培养的小脑颗粒细胞的凋亡情况通过 TUNEL 检测(表 1)。p75NTR$^{+/+}$ 组结果显示,加入 10 ng/mL proBDNF 后,培养的野生型小脑颗粒细胞凋亡数量明显多于对照组($P<0.01$),加入终浓度为 20ng/mL 的 sortilin-Fc 后,凋亡数量少于 proBDNF 组($P<0.01$),与对照组相当($P>0.05$);p75NTR$^{-/-}$ 组结果显示,加入 proBDNF 后细胞凋亡数量与对照组相比无明显变化($P>0.05$,图 5)。结果表明,proBDNF 能够促进培养的野生型小脑颗粒细胞的凋亡,而这种作用能够因 p75NTR 的缺失或 sortilin-Fc 的加入而消除。

表 1 各组不同基因型的培养小脑颗粒细胞 BrdU、TUNEL 阳性细胞百分比($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

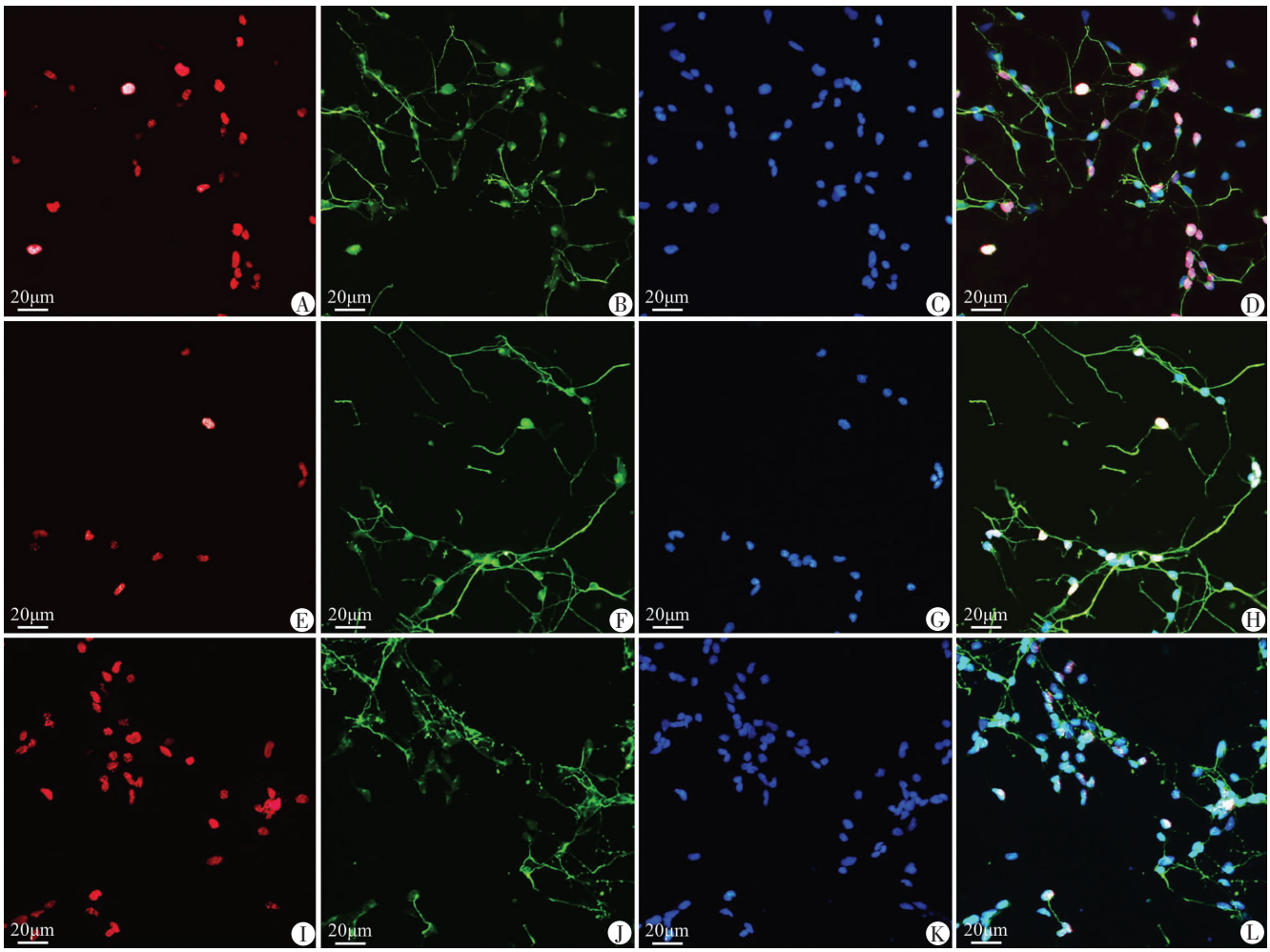
组别	BrdU 阳性细胞百分比(%)		TUNEL 阳性细胞百分比(%)	
	p75NTR$^{+/+}$	p75NTR$^{-/-}$	p75NTR$^{+/+}$	p75NTR$^{-/-}$
BSA 组	29.3±2.1	33.6±2.8	15.4±2.1	14.2±1.8
proBDNF 组	18.1±4.5[a]	31.1±3.9	19.9±2.4[a]	16.5±2.2
proBDNF + sortilin-Fc 组	30.6±5.2[b]	–	14.5±2.1[b]	–

a: $P<0.01$,与 BSA 组比较;b: $P<0.01$,与 proBDNF 组比较



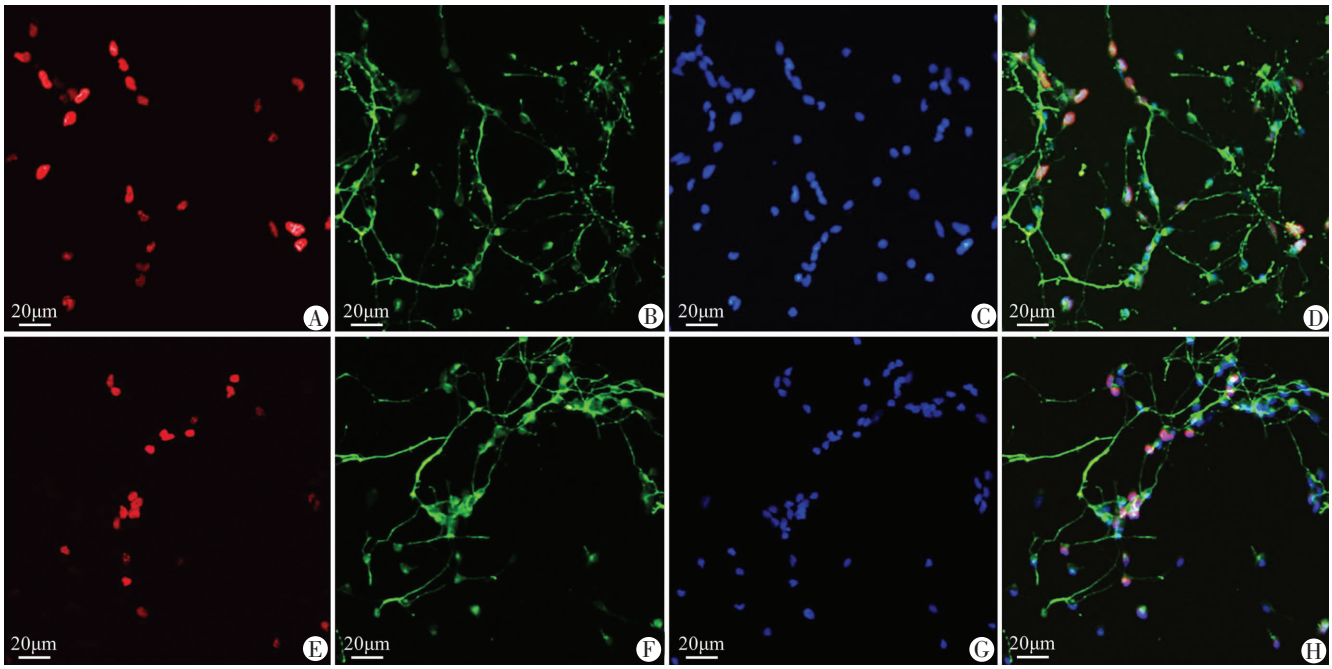
A~D:p75NTR$^{+/+}$ 型细胞;;E~H:p75NTR$^{-/-}$ 型细胞;A、E:p75NTR,红色;B、F:sortilin,绿色;C、G:DAPI,蓝色;D、H:融合图像

图 2 免疫荧光染色观察 p75NTR 和 sortilin 在小脑颗粒细胞中的表达情况



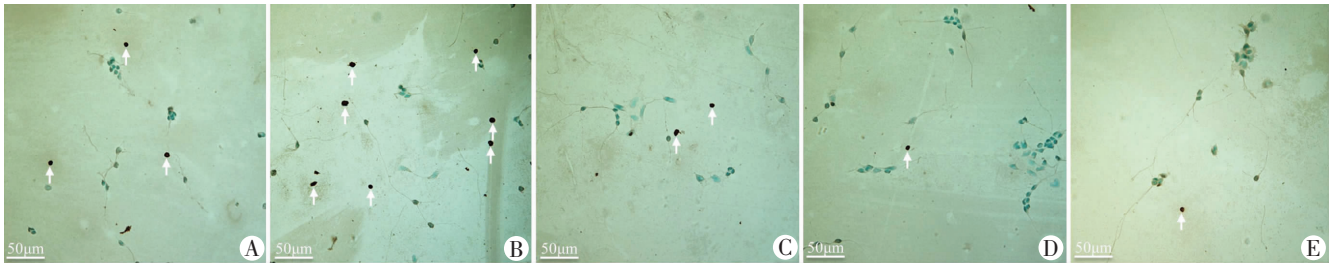
A～D：对照组；E～H：proBDNF组；I～L：proBDNF＋sortilin-Fc组；A、E、I：BrdU，红色；B、F、J：DCX，绿色；C、G、K：DAPI，蓝色；D、H、L：融合图像

图3　免疫荧光染色观察proBDNF对野生型（$p75NTR^{+/+}$）小脑颗粒细胞增殖的影响



A～D：对照组；E～H：proBDNF组；A、E：BrdU，红色；B、F：DCX，绿色；C、G：DAPI，蓝色；D、H：融合图像

图4　免疫荧光染色观察proBDNF对突变纯合子型（$p75NTR^{-/-}$）小脑颗粒细胞增殖的影响



A～C:p75NTR$^{+/+}$型细胞;D、E:p75NTR$^{-/-}$型细胞;A:对照组;B:proBDNF 组;C:proBDNF + sortilin-Fc 组;D:对照组;E:proBDNF 组(↑:示凋亡细胞)

图 5 TUNEL 检测不同干预后原代小脑颗粒细胞凋亡情况

3 讨论

BDNF 是神经营养因子家族中的重要成员,在中枢神经系统内分布广泛,它对促进神经细胞的发育、存活、突起生长以及突触形成有重要作用,并能加强突触可塑性,参与长时程增强(LTP),在神经网络形成和记忆中发挥重要影响[6]。BDNF 由前体蛋白 proBDNF 裂解生成,近年研究证实,proBDNF 含有保守结构域 pro-domain,部分能够以前体形式分泌到细胞外,并通过被多种蛋白酶裂解的方式与其成熟体保持一定的平衡[2]。与成熟体 BDNF 不同,前体形式的 proBDNF 往往有着对细胞功能的负性调节作用。研究表明,proBDNF 在脊髓损伤后能促进损伤细胞的死亡[7],在人神经胶质瘤细胞内高表达并抑制瘤细胞生长[8],诱导神经突起和神经肌肉接头结构的瓦解[9-10]、强化 LTD 并重塑神经突触功能[11]等。proBDNF 对小脑神经细胞作用的报道相对较少。新生的小脑颗粒细胞具有一定的增殖能力,且在一定时期出现迁移并向下整合,这些特点使其成为干预实验非常好的模型。我们前期的研究结果显示,proBDNF 能够抑制鼠新生小脑颗粒细胞的迁移,影响小脑的发育,说明 proBDNF 对新生小脑颗粒细胞具有重要影响[4]。本研究采用抗裂解重组蛋白 proBDNF 来研究其对鼠新生小脑颗粒细胞增殖和凋亡的影响,结果表明,proBDNF 能够抑制新生小脑颗粒细胞的增殖,促进凋亡的发生,这种毒性效应与既往的相关报道一致。

proBDNF 发挥对神经细胞的毒性作用是通过 p75NTR 和 sortilin 的共同介导完成的。p75NTR 属肿瘤坏死因子超家族,在神经系统等许多组织中表达,是神经营养因子的低亲和力受体,与神经营养因子的高亲和力受体酪氨酸激酶(Trks)受体产生协同作用,参与调控细胞的凋亡。proBDNF 显示出与 p75NTR 的高亲和力,当这些前体蛋白相对于其裂解后的成熟体占优势时,由 p75NTR 途径介导的生物效应会掩盖 Trks 途径介导的效应,最终表现出促进凋亡等作用。Fan 等[7]通过对脊髓损伤大鼠的研究,发现 proBDNF 能促进轴索断裂的感觉神经元的死亡,且这种作用伴有 p75NTR 的表达增高,说明 p75NTR 介导效应的增强与神经细胞死亡有密切联系。proBDNF 通过 p75NTR 受体发挥效应还需要跨膜辅助蛋白受体 sortilin 的结合。sortilin 与 p75NTR 共同存在于多处神经细胞膜上[12],sortilin 的表达调节与 p75NTR 有关。Saadipour 等[13]利用 β-淀粉样蛋白干预培养的神经细胞后发现 sortilin 表达上调,而阻断 p75NTR 后这种现象消失,说明 sortilin 的表达上调是通过 p75NTR 实现的,且相互作用介导对细胞的毒性作用。多项研究表明,proBDNF 需要同时与 proBDNF 和 sortilin 结合才能发挥一系列生物效应[9,14],但这种相互联系是否在小脑神经细胞中存在及其他的功能尚不明确。我们既往的研究[4]表明,p75NTR 和 sortilin 共同表达于小脑颗粒细胞上,并介导 proBDNF 对新生鼠小脑颗粒细胞迁移的抑制作用,且这种作用需要 p75NTR 及 sortilin 的同时存在。在本研究中,我们采用 p75NTR 转基因小鼠作为离体神经元培养的来源,来观察 proBDNF 的效应,并应用 sortilin-Fc 竞争性抑制 proBDNF 与 sortilin 可能的结合,研究 proBDNF、p75NTR 和 sortilin 之间的关系,结果表明,proBDNF 是通过与 p75NTR 及 sortilin 形成三聚体来介导对神经元的毒性作用的,缺少其中的任何一种,这种介导作用都难以实现。

我们观察了离体条件下 proBDNF 对新生小脑颗粒细胞增殖和存活的影响,但也存在一些可能的影响因素。例如,小脑颗粒细胞除表达 p75NTR 外,还可能表达有 Trks 受体,尽管加入外源性 proBDNF 后前者的介导效应占优势,但 Trks 受体能够高亲和力结合成熟的神经营养因子,并介导抑制细胞凋亡的作用,这可能对实验结果产生一定影响;同样,在 p75NTR 基因敲除的神经细胞上,sortilin、Trks 受体的表达可能出现变化,关于下游效应的研究需要进一步研究。尽管如此,本研究采用抗裂解 proBDNF,观察其对新生小脑颗粒细胞增殖和凋亡的影响,证实了前体蛋白 proBDNF 的毒性作用,对了解其更多的生物功能提供参考。

参考文献:

[1] Park H, Poo M M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function[J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(1): 7-23.

[2] Yang J, Siao C J, Nagappan G, *et al*. Neuronal release of proBDNF

[J]. Nat Neurosci, 2009, 12(2): 113 – 115.
[3] Je H S, Yang F, Ji Y, *et al*. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(39): 15924 – 15929.
[4] Xu Z Q, Sun Y, Li H Y, *et al*. Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice[J]. Eur J Neurosci, 2011, 33(8): 1376 – 1384.
[5] Xu H, Yang Y, Tang X, *et al*. Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development[J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(2): 833 – 844.
[6] Lu B, Nagappan G, Guan X, *et al*. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases[J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(6): 401 – 416.
[7] Fan Y J, Wu L L, Li H Y, *et al*. Differential effects of pro-BDNF on sensory neurons after sciatic nerve transection in neonatal rats[J]. Eur J Neurosci, 2008, 27(9): 2380 – 2390.
[8] Xiong J, Zhou L, Yang M, *et al*. ProBDNF and its receptors are up-regulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells *in vitro*[J]. Neuro Oncol, 2013, 15(8): 990 – 1007.
[9] Sun Y, Lim Y, Li F, *et al*. ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35883.
[10] Je H S, Yang F, Ji Y, *et al*. ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions[J]. J Neurosci, 2013, 33(24): 9957 – 9962.
[11] Yang J, Harte-Hargrove L C, Siao C J, *et al*. proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus[J]. Cell Rep, 2014, 7(3): 796 – 806.
[12] Koshimizu H, Hazama S, Hara T, *et al*. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons[J]. Neurosci Lett, 2010, 473(3): 229 – 232.
[13] Saadipour K, Yang M, Lim Y, *et al*. Amyloid beta1-42 (Aβ42) up-regulates the expression of sortilin *via* the p75(NTR)/RhoA signaling pathway[J]. J Neurochem, 2013, 127(2): 152 – 162.
[14] Taylor A R, Gifondorwa D J, Robinson M B, *et al*. Motoneuron programmed cell death in response to proBDNF[J]. Dev Neurobiol, 2012, 72(5): 699 – 712.

(**收稿**:2014-04-27;**修回**:2014-06-11)
(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)19-1986-04

连续性肾脏替代治疗法洛四联症术后合并急性肾损伤婴儿1例

程思炜,王代红,王沂芹,倪 妮,赵景宏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[**关键词**] 连续性肾脏替代治疗;婴儿;急性肾损伤;法洛四联症
[**中图法分类号**] R726.920.5 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患儿,女性,年龄11个月,体质量9 kg,因"口唇甲床发绀11个月"于2014年6月10日入院。患儿出生后即发现其面唇甲床发绀,哭闹后加重,于当地医院就诊,查体发现心脏杂音,考虑为复杂性先天性心脏病。近日来上述症状加重,家属带患儿就诊于我院。入院查体:T 36.5 ℃,R 26/min,P 132/min,Bp 83/51 mmHg,SpO_2 85%;神志清楚,口唇紫绀,双肺呼吸音清。心尖搏动位于左侧第5肋间锁骨中线处,未扪及震颤,心律齐,心前区可闻及收缩期杂音,P2明显减弱,双下肢无水肿,杵状指(趾)。入院查肾功能提示肌酐29.00 μmol/L,尿素5.03 mmol/L。血常规提示:WBC 15.26×10^9/L,NEUT 6.20×10^9/L、NEUT% 40.5%,Hb 137 g/L,PLT 407×10^9/L。心脏超声提示法洛四联症。入院诊断:复杂性先天性心脏病,法洛四联症。入院后经完善相关检查、对症处理后在全麻、体外循环心脏停搏下行"法洛四联症根治术"。术后患儿逐渐出现全身水肿,24 h尿量从术后第1~5天进行性减少,最低至135 mL,肾功能进行性恶化,血肌酐和尿素进行性升高,最高血肌酐361.00 μmol/L,尿素50.91 mmol/L,根据pRIFLE标准[1],考虑为法洛四联症根治术后合并急性肾损伤(Failure期),故于术后第5天切开直视下股静脉置管(7F双腔静脉导管,美国箭牌)后行连续性肾脏替代治疗(continuous renal replacement therapy,CRRT),CRRT机为Prisma flex(金宝,瑞典),滤器为配套管路M60(AN69膜,膜面积0.6 m^2,预冲量84 mL),采用红细胞悬液50 mL联合0.9%氯化钠注射液预冲管路,治疗模式为连续性静-静脉血液滤过(CVVH),置换液剂量500 mL/h,前后稀释比例90%:10%,治疗血流量25~30 mL/min;抗凝剂为肝素首量4 mg,0.9~1 mg/h维持。治疗过程中患儿血压波动于79~128/48~71 mmHg,心率波动于121~158/min。首次治疗时间共计为76 h,净超滤总量2 432 mL,患儿水肿明显缓解。术后8 d复查肾功肌酐64.00 μmol/L,尿素6.67 mmol/L,24 h尿量增加至150 mL,暂停CRRT治疗并观察。术后10 d患儿尿量增加不明显,浮肿逐渐加重,24 h尿量180 mL,复查血肌酐148.50 μmol/L,尿素14.39 mmol/L,予日间连续性肾脏替代治疗(day-time continuous renal replacement therapy,DCRRT),治疗模式、治疗剂量及血流量同前,抗凝剂首量肝素3 mg,不维持,每日持续时间7~14 h,DCRRT治疗4次后24 h尿量增至535 mL,停DCRRT治疗,尿量逐渐恢复正常,术后15 d复查血肌酐49.50 μmol/L,尿素6.37 mmol/L,患儿病情好转于术后34 d出院。

2 讨论

法洛四联症术后并发症的发生率较高,一旦发生急性肾损

(下转1995页)

[**通信作者**] 赵景宏,E-mail:zhaojh@tmmu.edu.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140911.0850.002.html(2014-09-11)