BMP4 参与海人酸损伤后成年大鼠海马齿状回颗粒细胞增殖及胶质增生

阴金波[1],范晓棠[2],徐海伟[3],安 宁[1],刘仕勇[1],杨 辉[1] (第三军医大学:1. 新桥医院神经外科,重庆 400037;2. 基础医学部神经生物学教研室,重庆 400038;3. 基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨海人酸(KA)侧脑室注射致大鼠海马损伤后骨形成蛋白-4(BMP4)的表达变化及其与颗粒细胞增殖和胶质细胞增生的关系。**方法** 将成年大鼠分为对照组与实验组。侧脑室注射 KA 7 d 后,用尼氏染色检测海马神经元丢失,用免疫组织化学与原位杂交的方法检测海马齿状回 BMP4 mRNA 阳性细胞与 BrdU 标记细胞、GFAP 阳性细胞数的变化。**结果** 正常成年大鼠 BMP4 mRNA 阳性细胞主要分布于海马齿状回的门区、颗粒下层、CA3、CA1 区。BrdU 标记细胞主要分布在齿状回颗粒下层。GFAP 阳性细胞主要分布在齿状回、CA3 区。在 KA 侧脑室注射致海马损伤后 7 d,海马 CA3、CA4 区神经元丢失明显,BMP4 mRNA 阳性细胞与 BrdU、GFAP 阳性细胞均明显增加。**结论** KA 侧脑室注射致海马损伤后,成年大鼠海马齿状回颗粒细胞增殖增强和胶质增生可能与 BMP4 表达增加有关。

[关键词] 骨形成蛋白-4;海人酸;海马;增殖;损伤

[中图分类号] R329.28;R338.26;Q253 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)03-0242-04

Involvement of BMP4 in kainic acid-induced proliferation of granular cells and gliosis in hippocampusl dentate gyrus of adult rats

YIN Jin-bo, FAN Xiao-tang, XU Hai-wei, AN Ning, LIU Shi-yong, YANG Hui (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the changes in the expression of bone morphogenetic protein-4 (BMP4) and their relationships with the proliferation of granular cells and gliosis in the injured hippocampus after the intracerebroventricular injection of kainic acid (KA) in adult rat. **Methods** Adualt rats were divided into the control group and experiment group. The loss of hippocampus neuron was observed by nissl staining after the intracerebroventricular injection of KA. The changes of the BrdU labeled cells, BMP4 mRNA positive cells and GFAP positive cells of the hippocampus denate gyrus were observed by immunohistochemical and hybridization in situ. **Results** The BMP4 mRNA positive cells were mainly distributed in the hilus and granular layer of dentate gyrus as well as in CA3, CA1 region of the hippocampus in adult rats. The BrdU labeled cells were mainly distributed in the subgranular zone and the GFAP positive cells were mainly in the dentate gyrus and CA3 region. The neuron losses were mainly occurred in CA3, CA4 region and the numbers of BMP4 mRNA positive cells, BrdU labeled cells and GFAP positive cells were increased significantly seven days after the intracerebroventricular injection of KA. **Conclusion** BMP4 is involved in the proliferation of granular cells and gliosis in adult rat hippocampus after the intracerebroventricular injection of KA.

Keywords: bone morphogenetic protein-4; kainic acid; hippocampus; proliferation; injury

室下区(subventricular zone, SVZa)及海马齿状回是成年脑内两个神经发生最集中的部位。在海人酸(kainic acid, KA)致海马损伤后,海马齿状回下颗粒层神经增殖及胶质细胞增生均明显增加,同时伴有神经细胞迁移和神经细胞突触可塑性的增加[1]。骨形成蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP4)对发育期及成年中枢神经系统神经元的增殖、分化、迁移及维持神经元的正常功能均有重要作用[2]。但 BMP4 对神经干细胞的作用较为复杂,在不同部位和发育阶段,以及不同的浓度,BMP4 所起的作用并不相同。它既可以促进神经干细胞增殖,也可以抑制其增殖,既可以诱导神经干细胞向神经元分化,也可促使其向星形胶质细胞分化[3]。BMP4 在 KA 致海马损伤后齿状回颗粒细胞增殖、胶质细胞增生中的作用,目前未见相关报道。为此,本实验采用 KA 侧脑室注射致海马损伤模型,观察成年大鼠在 KA 侧脑室注射 7 d 后,海马神经元丢失,海马齿状回 BrdU 标记细胞数、GFAP 阳性细胞与 BMP4 表达的关系,为阐明 BMP4 对海马齿状回颗粒细胞增殖与胶质增生的作用提供依据。

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目(2009BB5147)

[作者简介] 阴金波(1974-),男,河北省石家庄市人,主治医师,讲师,博士,主要从事神经干细胞方面的研究。电话:(023)68774910, E-mail:yjb1974@tom.com

[通迅作者] 杨 辉,电话:(023)68755610, E-mail:huiyang64@yahoo.com

[收稿日期] 2011-01-03 [修回日期] 2011-01-25

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 24 只,体重(200 ± 10) g,购自第三军医大学实验动物中心。分为对照组和实验组,实验组 8 只,对照组 16 只分为生理盐水对照组和空白对照组,各 8 只。实验组大鼠侧脑室注射 KA,生理盐水对照组注射相同剂量的生理盐水,空白对照组不作任何处理,各组动物于术后 7 d 灌注取材。

1.1.2 试剂 海人酸、鼠抗 BrdU 一抗(1∶1 000)、兔抗 GFAP 地高辛标记的 BMP4 cRNA 探针、NBT/BCIP 显色液、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒、抗地高辛抗体。

1.2 方法

1.2.1 KA 致兴奋性毒性大鼠脑损伤模型 大鼠用 0.3% 戊巴比妥钠麻醉后,将 KA 0.5 μg 溶于 1.0 μl 的生理盐水中,用脑立体定位仪注入大鼠右侧侧脑室,按 Paxinos 和 Watson 立体定位图谱,注射坐标为(AP: +4.3;ML: +4.4;DV: -3.4)。生理盐水对照组大鼠右侧侧脑室注射 1.0 μl 生理盐水。7 d 后取材。

1.2.2 大鼠脑组织固定及尼氏染色 大鼠按常规进行组织灌注、固定、取出脑组织行冰冻切片(片厚 30 μm)。梯度酒精脱脂,于 55 ℃的 1% 甲苯胺蓝溶液染色 30 min 后自来水冲洗;75% 酒精分化数秒,95% 酒精持续分化,直至背景干净、尼氏小体清晰为止。100% 酒精数秒 2 次,二甲苯透明,DPX 封片。

1.2.3 GFAP 免疫组化染色 切片经 0.01 mol/L PBS 漂洗后,3% 双氧水封闭 15 min。0.3% TritonX-100 孵育 30 min,山羊血清封闭液孵育 30 min,GFAP 一抗 4 ℃孵育 12 h。羊抗兔二抗孵育 2 ~ 3 h,SABC 三抗 37 ℃孵育 1 ~ 2 h。DAB-H_2O_2 显色,镜下观察适时终止反应。裱片后待其自然干燥,梯度酒精脱水,常规透明,封片。

1.2.4 BrdU 标记及免疫组化染色 BrdU 溶于无菌生理盐水,终浓度 10 mg/mL。自 KA 注射后第 5 天开始腹腔注射(100 mg/kg),每日 2 次,每次间隔 4 h,注射 2 d 共 4 次,最后一次 BrdU 注射后 24 h 处死大鼠。脑组织行冰冻切片(片厚 30 μm),0.01 mol/L PBS 漂洗后,3% 双氧水封闭。0.3% TritonX-100 孵育 30 min,在 2 mol/L HCl 中 37 ℃孵育 0.5 ~ 1 h。正常山羊血清封闭液 30 min 后,在含 BrdU 抗体 4 ℃孵育 48 h。以后操作步骤与 GFAP 免疫组化相同。

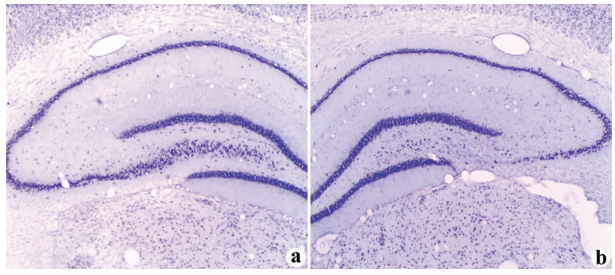
1.2.5 BMP4 原位杂交 切片在 0.1 mol/L PBS 及 0.1 mol/L甘氨酸/PBS 中漂洗后,再加入 0.3% TritonX-100/PBS 漂洗,2 mg/L 蛋白酶 K 37 ℃孵育 25 min,4% 多聚甲醛漂洗后,0.1 mol/L Tris-HCl 漂洗 10 min,2 × SSC 漂洗 10 min。按每张切片 10 μl,取杂交液(含 0.5 mg/L 地高辛标记的 BMP4 cRNA 探针)于离心管中,切片移入杂交管中,42 ℃孵育 12 ~ 24 h。切片依次移入 4 × SSC、2 × SSC、1 × SSC 及 0.5 × SSC 中各漂洗 10 min(37 ℃),将切片移入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(1∶1 000)中孵育 4 h(37 ℃)。室温下 TSM1、TSM2 中各漂洗 10 min × 2 次。NBT/BCIP 室温避光反应 3 ~ 5 h,EDTA 终止反应,裱片、脱水、DPX 封片。阳性细胞为深蓝色。

1.2.6 细胞计数及统计学分析 取相邻部位 4 张切片分别行尼氏染色、BMP4 原位杂交、BrdU 和 GFAP 免疫组化。每只大鼠每项检测取 5 张脑切片。光镜下观察并计算每张切片海马齿状回 BMP4 mRNA 阳性细胞及 BrdU 标记细胞、GFAP 阳性细胞的数量。用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,所得数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 海马神经元数量观察

大鼠注射 KA 后 7 d,尼氏染色显示,生理盐水对照组双侧海马无明显神经元丢失(图 1a)。右侧脑室注射 KA 的大鼠,注射侧海马 CA3、CA4 区神经元丢失明显(图 1b),而对侧海马神经元丢失不明显。

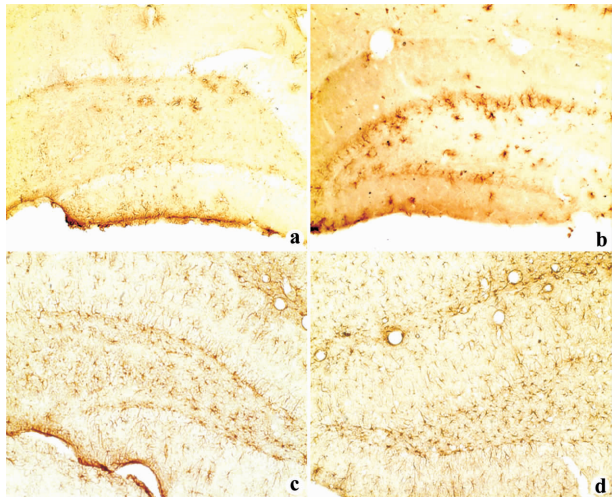


a:生理盐水对照组;b:实验组

图 1 海马尼氏染色显示 CA3、CA4 区神经元(×100)

2.2 海马 GFAP 阳性细胞观察

GFAP 阳性细胞在对照组主要位于海马齿状回、CA3 区,侧脑室注射 KA 7 d 后,海马 GFAP 阳性细胞均明显增加,但以齿状回、CA3 区增加最为明显(图 2)。注射侧海马齿状回阳性细胞数较生理盐水对照组升高 632.4% ($P < 0.01$),较对侧升高 34.2% ($P < 0.05$)。生理盐水对照组双侧海马均有少量 GFAP 阳性细胞,两侧之间比较以及与空白对照组比较,细胞数无明显差异。

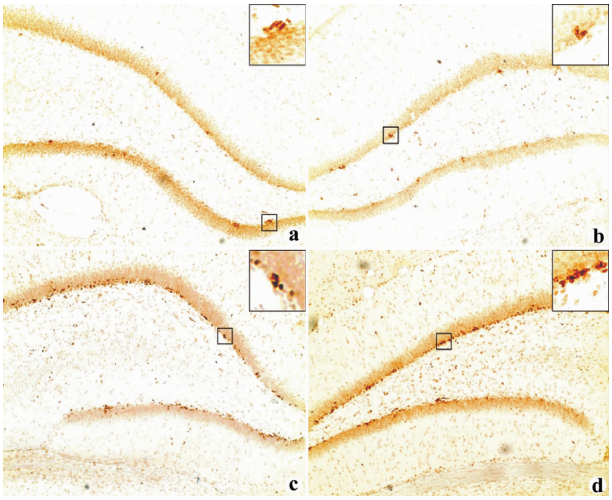


a:对照大鼠左侧;b:对照大鼠右侧(生理盐水注射侧);c:实验大鼠左侧;d:实验大鼠右侧(KA 注射侧)

图 2 大鼠齿状回 GFAP 阳性细胞切片观察(×100)

2.3 海马齿状回颗粒下区 BrdU 标记细胞观察

BrdU 标记的细胞表现为两种形态，一种是细胞核形态不规则，成簇分布在海马颗粒细胞层和海马门区交界处颗粒下区的 BrdU 标记细胞，这类细胞被认为是刚刚产生的细胞。另一类为细胞核形态规则，成线状分布在颗粒下区的 BrdU 标记细胞。大鼠侧脑室注射 KA 后 7 d，生理盐水对照组双侧海马均有 BrdU 标记的细胞，但与空白对照组相比，无明显差异，生理盐水对照组大鼠双侧海马 BrdU 标记细胞数无明显差异（图 3a、b）。右侧脑室注射 KA 后 7 d，注射侧海马 BrdU 标记细胞数较生理盐水对照组升高 278.5%（$P<0.01$），较对侧升高 34.6%（$P<0.01$），见图 3c、d。



a：对照大鼠左侧；b：对照大鼠右侧（生理盐水注射侧）；c：实验大鼠左侧；d：实验大鼠右侧（KA 注射侧）

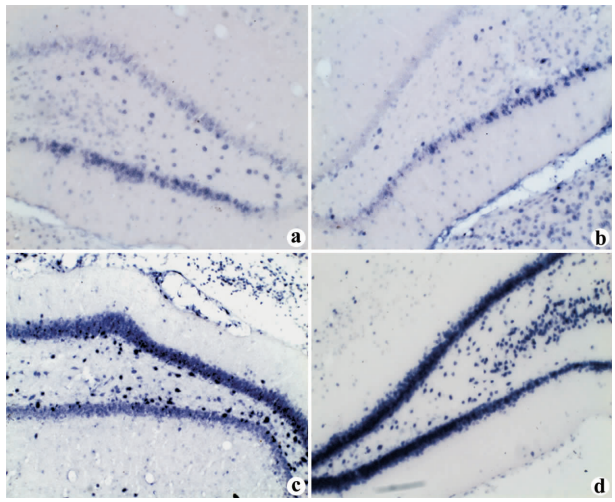
图 3 大鼠齿状回 BrdU 阳性细胞切片观察（×100）

2.4 海马齿状回 BMP4 mRNA 阳性细胞观察

BMP4 mRNA 阳性细胞胞体较小，呈圆形或梭形，突起较短。正常情况下，海马 BMP4 mRNA 阳性细胞数量不多。主要分布在齿状回颗粒层、颗粒下层、门区以及 CA1、CA3、CA4 等部位。其中 BMP4 mRNA 阳性细胞分布最多的是齿状回（图 4a、b），CA3 区次之。在 KA 侧脑室注射后，海马 BMP4 mRNA阳性细胞数量进行性增加（图 4c、d），仍以齿状回颗粒细胞层增加最为明显，其次为 CA3 区，可见密集深染的 BMP4 mRNA 阳性细胞，细胞形态与正常时相似；实验组 BMP4 mRNA 阳性细胞计数较生理盐水对照组显著升高（$P<0.01$）。

3 讨论

海人酸结构类似谷氨酸，其进入脑内后与海马齿状回颗粒细胞轴突末梢上的海人酸受体结合，通过增加突触末梢膜的通透性，使颗粒细胞中的谷氨酸释放增加而重吸收减少，从而引起突触后神经元，尤其是 CA3 区锥体细胞过度兴奋，最后导致 CA3、CA4 区的锥体细胞减少、消失，以及齿状回神经细胞增殖、胶质增生等一系列病理改变，从而诱发颞叶癫痫，即海人酸癫



a：对照大鼠左侧；b：对照大鼠右侧（生理盐水注射侧）；c：实验大鼠左侧；d：实验大鼠右侧（KA 注射侧）

图 4 大鼠齿状回 BMP4 mRNA 阳性细胞切片观察（×100）

痫模型[4]。海人酸诱发的边缘性惊厥和海马结构损伤与人类颞叶癫痫的惊厥行为及 Ammon's 角硬化有很多相似之处，是目前研究颞叶癫痫的良好动物模型[5]。在本实验也发现，侧脑室注入 KA 后引起海马 CA3、CA4 区神经元丢失明显，以及海马齿状回、CA3 区等胶质细胞明显增生，与人颞叶癫痫病理一致。

位于侧脑室附近的室管膜下区（subventricular zone，SVZ）和海马齿状回是目前公认的成年个体两个神经发生最为集中的区域[6]。在各种有害性刺激，如癫痫发作、外伤、缺氧等作用下，均可引起大鼠海马齿状回神经干细胞明显增殖，以及胶质细胞增生。同时齿状回分子层出现苔藓纤维发芽，表明神经元可塑性增加[1]。有害刺激引起海马神经增殖和胶质增生的机理目前还不清楚，海马齿状回神经增殖和胶质增生机理的研究对于揭示癫痫发生的机理有重要意义。

BMPs 属于转化生长因子 β（TGF-β）超家族成员。该家族成员包括 TGF-β、抑制素（inhibin）、活化素（activin）、dpp 和 BMPs 等[7]。对室区新皮层神经前体细胞和成年室下区神经干细胞的研究已证实，新生及成年体内的 BMP4 通过自分泌和旁分泌对神经干细胞的分化与特化有重要作用[8]。BMP4 可能对发育期神经发生起重要作用[9]。因此，本文推测在 KA 损伤诱导的神经增殖和胶质增生中，BMP4 可能也起了重要作用。目前对于 BMP4 在此过程中在海马齿状回的表达，以及在此区神经细胞增殖、分化、迁移中的作用尚缺乏相应的研究资料。

KA 侧脑室注射后 3 ~ 7 d，海马神经增殖及胶质增生最为明显，因此本实验采用 KA 侧脑室注射后 7 d

大鼠为模型,研究 BMP4 表达与海马神经增殖及胶质增生的关系。本研究表明,在 KA 损伤 7 d 后,海马齿状回颗粒下层神经增殖明显增加,齿状回、CA3 区胶质增生也明显增加,同时 BMP4 表达明显增高,BMP4 阳性细胞数目较生理盐水对照组明显增高。BMP4 的表达增高与齿状回下颗粒层神经细胞增殖增高的时间变化基本一致,且表达位置也基本一致,表明 BMP4 可能在 KA 损伤诱导的神经干细胞增殖、迁移、分化及胶质增生中扮演一定的角色。但 BMP4 对神经干细胞的作用却较为复杂,在不同部位和发育阶段,以及不同的浓度,其对神经干细胞的作用并不相同。它可以促进或抑制神经干细胞增殖、诱导神经干细胞向神经元或星形胶质细胞分化。因此,BMP4 在 KA 损伤诱导的神经增殖和胶质增生中起了何种作用,及其通过何种途径影响癫痫易感性,仍需进一步研究证实。

[参考文献]

[1] Jessberger S, Zhao C, Toni N, et al. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling [J]. J Neurosci, 2007, 27(35): 9400 – 9407.

[2] Moon BS, Yoon JY, Kim MY, et al. Bone morphogenetic protein 4 stimulates neuronal differentiation of neuronal stem cells through the ERK pathway[J]. Exp Mol Med, 2009, 41(2): 116 – 125.

[3] Mikawa S, Wang C, Sato K. Bone morphogenetic protein- 4 expression in the adult rat brain[J]. J Comp Neurol, 2006, 499(4): 613 – 625.

[4] Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity [J]. Neuroscience, 2009, 158(1): 309 – 323.

[5] Bragin A, Engel J Jr, Wilson CL, et al. Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection[J]. Epilepsia, 1999, 40(9): 1210 – 1221.

[6] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287 (5457): 1433 – 1438.

[7] Sabo JK, Kilpatrick TJ, Cate HS. Effects of bone morphogenic proteins on neural precursor cells and regulation during central nervous system injury[J]. Neurosignals, 2009, 17(4): 255 – 264.

[8] Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis[J]. Neuron, 2000, 28 (3): 713 – 726.

[9] 范晓棠,黄云剑,蔡文琴,等. 骨形成蛋白 4 在大鼠中枢神经系统发育过程中的表达[J]. 解剖学报, 2003, 34(6): 568 – 572.

(编辑:余汇洋)

· 个案与短篇 ·

155 例甲状腺手术后并发症的护理

高 娴,肖 莉,黄海英 (解放军第 161 中心医院普通外科,湖北 武汉 430010)

[关键词] 甲状腺;术后并发症;护理
[中图分类号] R653;R473.6 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2011)03-0245-01

甲状腺由于其解剖结构的复杂性,血管、神经相对丰富,手术难度系数较大,极易引起血管、神经损伤,出现术后出血、喉返神经或喉上神经损伤、甲状旁腺损伤、甲状腺危象等并发症,严重时危及生命。术前充分准备以及术后及时发现和护理,可降低术后并发症的发生,对患者的预后具有重要意义。本文回顾性分析我院 2008 年 6 月至 2010 年 4 月 155 例甲状腺手术患者术后并发症的临床资料,现将护理体会报告如下。

1 临床资料

本组患者 155 例,男 65 例,女 90 例,年龄 21 ~ 68 岁,平均 39.6 岁。甲状腺功能亢进 25 例,甲状腺腺瘤 71 例,结节性甲状腺肿 38 例,甲状腺癌 21 例。腺叶部分切除术 58 例,腺叶大部分切除术 51 例,腺叶切除术 19 例,腺叶加峡部加对侧腺叶部分切除术 7 例,甲状腺癌根治术 20 例。本组患者有 21 例出现术后并发症,其中出血 2 例,结节性甲状腺肿 1 例,甲状腺腺瘤 1 例,喉返神经损伤 4 例,喉上神经外支损伤而出现音调降低 2 例,喉上神经内支损伤出现饮水呛咳 3 例,甲状腺危象 3 例,甲状旁腺损伤 2 例,甲状腺功能减退 2 例,抢救无效死亡 1 例。本组有 2 例甲状腺功能减退患者需终生服药,其中 1 例永久性气管切开,1 例死亡。其余 153 例患者均治愈后顺利出院。

2 并发症的护理

2.1 出血的护理

术前对患者及家属行健康安全教育,消除患者及家属的顾虑;术中动作轻柔,在切口最低部留有引流管并保持通畅,定时观察流出液的量及颜色等。术后取半卧位,嘱患者勿咳嗽,少讲话,减少颈部活动。术后 48 h 内定期巡视,观察患者生命体征变化,有无烦躁不安、呼吸困难、颈部增粗、切口渗血等现象,如出现以上情况立即通知医生处理,必要时行气管切开术[1]。

2.2 神经损伤的护理

本组资料显示出现喉返神经损伤 4 例,单侧损伤表现为声

[收稿日期] 2011-01-06 [修回日期] 2011-02-09

(下转第 248 页)