孕鼠染铝对仔鼠脑皮质神经元的影响

蒋 鹆,康朝胜,余资江 (贵阳医学院基础医学院人体解剖学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 探讨母体孕期染铝对子代脑神经发育的毒性作用。**方法** 4~5 月龄 SD 大鼠,雌雄各 30 只,1∶1 合笼喂养,每日早晨查雌鼠阴栓,发现阴栓即进入实验(E0),将孕鼠随机平分为 2 组。染铝组 E0~E18 期间以三氯化铝 100 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃;正常对照组以等量蒸馏水灌胃。分别取孕鼠两个年龄段子代即生后继续喂养的 1 月子代及 3 月子代鼠脑组织,每只孕鼠任取其子代 2 只,每小组子代 30 只。常规石蜡切片,经神经元特异烯醇酶(NSE)免疫组化染色,分别对大脑皮质 Par1 区内锥体细胞层 NSE 免疫组化染色阳性反应细胞进行计数,并用细胞形态学计量方法测量阳性反应产物的平均光密度。**结果** 染铝组子代 NSE 免疫组化染色阳性细胞均明显少于对照组子代($P<0.05$),阳性反应产物平均光密度均低于对照组子代($P<0.05$)。**结论** 大鼠孕期染铝可导致子代鼠脑神经元数量减少,从而导致子代鼠神经发育障碍。

[关键词] 孕期;铝;脑;神经元;子代

[中图分类号] R135.1;R995;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)02-0142-03

Effect of aluminum on cerebral cortex neurons in offsprings of pregnant rats

JIANG Dong, KANG Chao-sheng, YU Zi-jiang (Department of Anatomy, Guiyang Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To investigate the toxic effect of aluminum on cerebral cortex neurons in offsprings of pregnant rats. **Methods** Totally 60 Sprague-Dawley rats (30 male and 30 female) at an age of 4~5 months were employed and mated according to the proportion of 1∶1. The female rats which were discovered to have vaginal plug were enrolled into the experiment. The pregnant rats were randomly divided into two groups equally: aluminum exposed group ($AlCl_3$ 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} was administrated intragastrically from EO to El8) and control group (equal amount of distilled water was used). The offsprings of the pregnant rats were divided into 2 groups: 1 month group and 3 month group (2 offsprings from 1 pregnant rat and 30 offsprings in each group). The brains of the offsprings were removed to do traditional parafin section preparation and immunohistochemical staining through neuron specific enolase (NSE). NSE-positive cells in Par1 layer of cerebral cortex were counted and their average optical densities were analyzed with cell morphometric technique. **Results** The numbers of NSE positive cells were obviously fewer in aluminum exposed group than those in control group ($P<0.05$); the average optical densities were obviously lower in aluminum exposed group than those in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Exposure to aluminum during pregnancy can decrease the numbers of neurons in offspring rats, which may induce neurodevelopmental disorder.

Keywords: pregnancy; aluminium; brain; neuron; offspring

70 年代以前,人们普遍认为铝不经胃肠道吸收,广泛用于非处方药、混凝剂、食品添加剂及制作食具。近年来,有研究表明铝可通过饮水、食品添加剂、药品等途径进入人体并在神经系统内蓄积,造成神经系统慢性退行性改变[1-2]。以往认为胚胎和胎儿对铝的生物利用度很低,较少关注铝对胚胎和胎儿的神经发育毒性作用。随着抗酸剂用以缓解孕期“消化不良”症状的普遍使用,而抗酸剂中铝的含量较高,人们开始关注铝的神经发育毒性。氯化铝可经胎盘或乳汁转入胎鼠或乳鼠脑内[3],虽然铝可以柠檬酸铝的形式从脑内排出,但有部分铝长期滞留,导致脑内蓄积,柠檬酸铝、乳酸铝、三氯化铝经口染毒可引起大、小鼠不同程度母体和胎儿毒性[4]。铝的神经发育毒性已被研究者所共识,但极少见孕期染铝对子代脑神经元影响的报道。本实验采用 NSE 免疫组化染色及形态计量分析的方法,探讨母体孕期染铝对子代脑神经元的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选择 60 只 4~5 月龄健康清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(250±32.5) g,由贵阳医学院实验动物中心提供(合格证号:SCXK(黔)2000-0001)。实验用试剂为氯化铝(广州化学试剂厂)、神经元特异烯醇酶抗体、即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色

[基金项目] 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教科 2007-031)

[作者简介] 蒋 鹆(1977-),女,湖南省邵东县人,讲师,硕士,主要从事重金属对中枢神经影响方面的研究。E-mail: jiangdong770126@yahoo.com.cn

[通讯作者] 康朝胜,男,副教授,硕士研究生导师。E-mail: gykcs@163.com

[收稿日期] 2010-10-15 [修回日期] 2010-12-11

试剂盒(武汉博士德公司)。60 只大鼠 1∶1 合笼喂养,每日早晨查雌鼠阴栓,发现阴栓为 E0,将孕鼠分为两组。染铝组 15 只,E0 ~ E18 期间用蒸馏水配制 2% 的氯化铝溶液按 100 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃;正常对照组 15 只,每日灌服等量蒸馏水。均用普通饲料喂养,自由饮用自来水。

1.2　取材与制片

分别取孕鼠两个年龄段子代即生后继续喂养的 1 月子代及 3 月子代鼠大脑,每只孕鼠任取其子代 2 只,每小组子代 30 只。1 月及 3 月子代鼠用 3.6% 水合氯醛按每 100 g 体重腹腔注射 1 mL 麻醉后,通过左心室至升主动脉插管,剪开右心耳,先用生理盐水冲洗,再灌注 4% 多聚甲醛约 300 mL 固定,开颅取脑,再用 4% 多聚甲醛进一步固定。每只鼠脑冠状切成三段,取中段经脱水、石蜡包埋后,进行连续冠状切片,片厚 6 μm,隔 3 取 1,进行 NSE 免疫组化染色。

1.3　免疫组化染色

石蜡切片常规脱蜡至水,置 3% H_2O_2 中 10 min,以灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次。微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5 ~ 10 min 后,重复 1 次,以修复抗原,冷却后 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 2 次。滴加 5% 正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余的液体,不洗;滴加一抗(rabbit anti-NSE,滴度为 1∶200),湿盒中孵育,4 ℃过夜。0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 2 min × 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,湿盒中 37 ℃孵育 20 min,0.02 mol/L磷酸盐缓冲液洗 2 min × 3 次;滴加 SABC,湿盒中 37 ℃孵育 20 min,0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 5 min × 4 次。二氨基联苯胺显色,镜下控制显色深度,蒸馏水洗涤。脱水、透明、封片。结果判定以胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。对照组切片用磷酸盐缓冲液取代一抗,其余步骤同实验组。

1.4　图像分析

光镜下采用 Mias 图像分析软件,每个鼠脑取相同间隔的 3 张切片,对每张切片的相应部位各测 3 个视野,同一放大倍数,同一视场面积,同一背景光强度下,计数大脑皮质 Par1 区内锥体细胞层 NSE 免疫组化染色阳性细胞,测定 NSE 阳性反应产物的平均光密度值。

1.5　统计学方法

用 SPSS 12.0 统计软件行统计处理,数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本对应参数平均值方差齐性用 F 检验,组间比较用 t 检验;检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

光镜下,正常对照组子代大脑皮质 Par1 区内锥体细胞层 NSE 免疫组化染色阳性神经元较多,细胞呈圆形或锥体形,胞体发出突起伸向皮质表面,胞浆及突起内有丰富的棕黄色阳性反应产物,染色深,胞核大位于中央,不着色(图 1a、c)。染铝组子代 Par1 区内锥体细胞层 NSE 阳性细胞数较相应年龄段正常对照组子代阳性细胞少($P < 0.05$),胞浆内棕黄色反应颗粒染色稍淡,胞体发出突起伸向皮质表面,胞核大位于中央,不着色(图 1b、d)。胞浆内 NSE 免疫反应阳性产物平均光密度降低($P < 0.05$),见表 1。

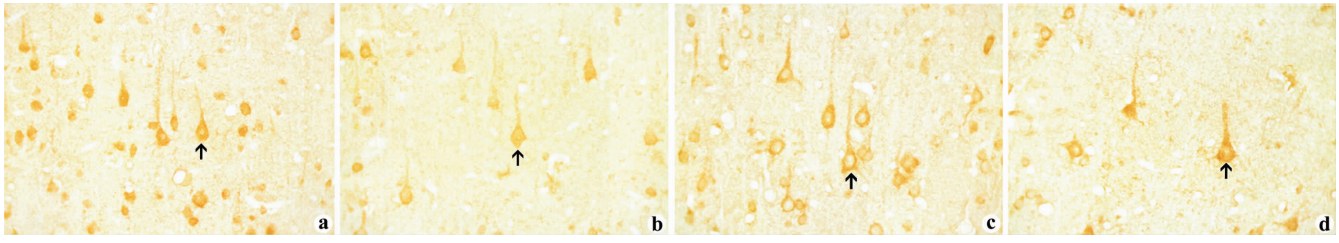
表 1　两组 NSE 阳性细胞计数和平均光密度比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	NSE 阳性细胞数(个/视野)		平均光密度	
	1 月子代	3 月子代	1 月子代	3 月子代
对照组	11.30 ± 1.44	10.07 ± 1.50	0.298 ± 0.022	0.304 ± 0.019
染铝组	9.93 ± 1.76 *	9.00 ± 1.55 #	0.291 ± 0.023 *	0.299 ± 0.023 #

*:与对照组 1 月子代比较,$P < 0.05$;#:与对照组 3 月子代比较,$P < 0.05$

3　讨论

神经元是神经系统的结构和功能单位,研究发现,许多神经系统疾病的发生都是由于神经元数量、形态或功能的异常所致[4]。铝离子(Al^{3+})积聚可导致神经元死亡,引起神经系统疾病,如铝与早老性痴呆、透析性脑病综合征密切相关[5-6]。铝可诱导大鼠脑神经元凋亡[7],对原代培养皮层神经细胞具有细胞毒性,并可抑制皮层神经细胞生长[8]。本实验研究发现孕鼠染铝,其子代大脑皮质神经元与相应对照组子代比较数量减少。综合文献资料,孕鼠染铝导致仔鼠大脑皮质神经元减少的原因如下:①孕期染铝,铝在子代大鼠脑内蓄积,铝对神经元的毒性作用致使神经元数量减少;孕期染铝,铝在子代脑内蓄积,铝可通过改变神经元的钙稳定,或与神经细胞的 DNA 结合[9],以及铝



a:对照组 1 月子代大脑皮质 Par1;b:染铝组 1 月子代大脑皮质 Par1;c:对照组 3 月子代大脑皮质 Par1;d:染铝组 3 月子代大脑皮质 Par1;↑:神经元

图 1　NSE 免疫组化染色(SABC 法　×200)

蓄积产生活性氧等影响神经元结构和功能。另据 Virgilia 等[10]报道,铝致脑组织 ATP 酶活性降低,细胞膜完整性被破坏,可能也是铝的神经毒性机理之一。②孕鼠染铝,铝在仔鼠脑内蓄积,铝抑制仔鼠脑神经干细胞向神经元分化致使神经元数量减少;神经干细胞具有分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞的能力,因此神经干细胞在神经系统发育过程中具有特别重要的作用。神经干细胞的分裂增殖受很多因素影响,包括基因方面、细胞因子、细胞外基质、细胞黏附分子等[11]。胡琼等[12]报道铝可抑制大脑皮层神经干细胞向神经元分化。③孕鼠染铝致仔鼠脑神经干细胞减少,使其分化的神经元数量减少。本文作者在前期研究中发现孕鼠染铝可导致仔鼠海马齿状回神经干细胞数量减少[13],由于神经干细胞数量减少可能导致其分化的神经元数量减少。以上原因均可导致孕期染铝子代脑神经元的减少,从而引起子代神经行为和智力发育的异常。

[参考文献]

[1] 陈 雅,张本忠. 硫酸铝钾对小鼠胚胎中脑细胞增殖和分化的影响[J]. 中国职业医学,2007,34(6):458 – 459.

[2] 李百祥,任 锐,杨德文. 氯化铝对原代培养大鼠大脑皮层神经细胞的毒性作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2006,24(3):179 – 182.

[3] Yumoto S, Nagai H, Matsuzaki H, et al. Aluminium incorporation into the brain of rat fetuses and sucklings [J]. Brain Res Bull, 2001, 55(2):229 – 234.

[4] Corain B, Bombi GG, Tapparo A, et al. Aluminium toxicity and metal speciation: established data and open question[J]. Coordination Chem Rev, 1996, 149(2):11 – 22.

[5] 孙宝飞,余资江,康朝胜. 慢性砷中毒对小鼠齿状回超微结构及学习记忆的影响[J]. 局解手术学杂志,2009,18(6):444.

[6] 梁 峰. 铝与人类疾病研究现状[J]. 微量元素与健康研究,2006,23(1):64 – 66.

[7] Johnson VJ, Kim SH, Sharma RP. Aluminum-maltolate induces apoptosis and necuro-2a cells: potential role for p53 signaling[J]. Toxicol Sci, 2005, 83(2):329 – 339.

[8] 李百祥,任 锐,杨德文. 氯化铝对原代培养大鼠大脑皮层神经细胞的毒性作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2006,24(3):179 – 182.

[9] 胡 琼,王取南. 铝对神经系统的毒性作用研究进展[J]. 国外医学·卫生学分册,2005,32(2):113 – 116.

[10] Silva VS, Duarte AI, Rego AC, et al. Effect of chronic exposure to aluminium on isoform expression and activity of rat (Na^+/K^+) ATPase [J]. Toxicol Sci, 2005, 88(2):485 – 494.

[11] 赵 峰,马 晶,余 鸿. 影响神经干细胞增殖、分化的外部因素[J]. 四川解剖学杂志,2008,16(4):36 – 38.

[12] 胡 琼,王取南,李嘉嘉,等. 铝对大鼠神经干细胞向神经元细胞分化的影响[J]. 安徽医科大学学报,2005,40(3):210 – 213.

[13] 蒋 鹍,康朝胜. 孕鼠铝暴露对仔鼠齿状回神经干细胞的影响[J]. 解剖学杂志,2009,32(5):657 – 659.

(编辑:左艳芳)

·个案与短篇·

早期切削痂网状植皮联合 VSD 持续负压吸引治疗液氨冻烧伤 1 例

石宏伟,张永生 (新疆库尔勒第 273 医院烧伤整形科,新疆 库尔勒 841000)

[**关键词**] 切削痂网状植皮;VSD 持续负压吸引;液氨冻烧伤
[**中图分类号**] R644 [**文献标识码**] B [**文章编号**] 1672-5042(2011)02-0144-01

液氨为低温液体,除引起化学性烧伤和冻伤外,还可皂化脂肪引起创面进一步加深。对液氨冻烧伤创面早期切削痂,除清除坏死组织,引流组织中残余的碱性物质,防止创面继续损伤加深。维斯第(VSD)是一种新型引流技术,用医用泡沫材料包裹多侧孔引流,使泡沫材料成为引流管和被引流区之间的中介,再利用透性粘贴薄膜封闭被引流区,使之与外界隔绝,接通负压源形成一个高效引流系统,是处理创面的全新方法[1]。我院 2010 年 7 月应用早期切削痂网状植皮联合 VSD 持续负压吸引治疗液氨冻烧伤 1 例,患者疗效满意,现报告如下。

[**收稿日期**] 2010-12-05 [**修回日期**] 2010-12-28

1 资料与方法

1.1 临床资料

因液氨外泄喷,患者双下肢被 – 77.7 ℃液氨烧伤。查体:双小腿及双脚 10% 的创面,双下肢创面可见水疱,内为淡血性,创基红肿明显可见红色点状栓塞血管,双脚创面表面大部分呈黑红色改变,可见栓塞的粗大血管,深度为深Ⅱ度及Ⅲ度混合创面。

1.2 治疗方法

伤后 3 h 内用大量清水冲洗创面,尽量去除创面残留氢氧

(下转第 148 页)