文章编号:1000-5404(2005)13-1355-02

论著

必需脂肪酸对新生大鼠小脑细胞构筑结构的影响

张 侃[1],曾 琳[2],龙在云[2],李应玉[2],刘 媛[2],陶翠兰[2],伍亚民[2],何凤慈[2] ([1]重庆医科大学附属儿童医院儿保科,重庆 400014;[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨发育期补充必需脂肪酸(essential fatty acid, EFA)对大鼠小脑细胞构筑发育的影响。**方法** 新生1个月大鼠90只分为正常组、EFA缺乏组和补充鱼油组,分别以不同饲料喂养3个月,HE染色、尼氏染色和嗜银染色观察小脑细胞构筑形态结构的变化。**结果** EFA缺乏组与正常组相比,小脑皮层的浦肯野氏细胞数目明显减少、排列不规则、稀疏,可见大量的蓝状细胞肿胀、变性坏死,攀缘纤维、苔藓纤维数目明显减少、变短、排列稀疏不规整。EFA补充组小脑细胞构筑结构与正常无差异。**结论** 发育期EFA缺乏可导致小脑细胞受损、细胞构筑发育异常,发育期补充EFA能促进小脑的正常发育和功能。

关键词:必需脂肪酸;小脑;发育;细胞构筑
中图法分类号:R322.81; R329.24; R977.6 **文献标识码**:A

Effects of essential fatty acids on the cell construction of cerebella in neonatal rats

ZHANG Kan[1], ZENG Lin[2], LONG Zai-yun[2], LI Ying-yu[2], LIU Yuan[2], TAO Cui-lan[2], WU Ya-min[2], HE Feng-ci[2] ([1]Department of Child Care, Children's Hospital affiliated to Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of essential fatty acids (EFA) on the cell construction of cerebella in neonatal rats. **Methods** Ninety neonatal rats, one month old, were randomly divided into normal, EFA deficiency and fish oil supplement groups and given different feeding stuff for three months respectively. The changes of morphology and structure in cerebella were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining, Nissl and silver staining. **Results** As compared with the normal group, the number of Purkinye's cells in cerebellum was much less than the fish oil supplement group and the array of cells mentioned above was atactic, and there were many basket cells which were swollen, degenerated and dead in the molecular stratum, and meanwhile the climbing fibers and mossy fibers became sparse, shorter and turbulent in EFA deficiency group. But there were remarkable differences in the cell construction of cerebellum between the normal group and the fish oil supplement group. **Conclusion** Deficiency of EFA at developmental period can cause the damage of neuron and cell construction in cerebellum. It is necessary for the promoting development and function of cerebellum supplemented EFA during the developing period.

Key words: essential fatty acids; cerebella; development; cell construction

必需脂肪酸(essential fatty acid, EFA)主要指不饱和脂肪酸,包括二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)[1]。EFA是细胞膜和核膜结构脂质的主要成分,在绝大多数膜的特性中起关键作用[2],初步研究表明,如果缺乏EFA会导致大鼠大脑皮层和海马结构受损、学习记忆能力降低,同时有部分大鼠还表现出其它行为功能异常,如反应迟钝、运动失调等[3],而后者与小脑功能密切相关。发育期缺乏EFA是否会导致小脑发育异常、结构受损,为此进行本研究。

作者简介:张 侃(1958-),女,重庆市人,硕士,副教授,主要从事儿童保健与营养学方面的研究。电话:(023)68757433
通讯作者:曾 琳,电话:(023)68757433
收稿日期:2004-11-14;**修回日期**:2005-02-03

1 材料和方法

1.1 饲料配制

普通饲料:大鼠商品颗粒饲料;EFA缺乏颗粒饲料:无脂肪配料,增加蛋白质、糖,能量与普通饲料相似;EFA缺乏补充脂肪酸饲料:EFA缺乏饲料基础上,减少糖和蛋白质含量,加用鱼油(占总体积5%),能量与普通饲料相似。

1.1.1 普通饲料配方 玉米34%,鱼粉16%,麸皮13%,面粉16%,豆饼14.5%,鸡蛋2%,骨粉3%,奶粉1%,盐0.5%,饲料中含粗蛋白23.455%,粗脂肪5.071%,消化能3 335 kcal/kg。

1.1.2 EFA缺乏饲料的配方 玉米18%,鱼粉4%,麸皮12%,面粉33%,豆粕26%,骨粉1%,脱脂奶粉5.5%,盐0.5%,饲料中含粗蛋白22.967%,粗脂肪2.798%,消化能3 115 kcal/kg。

1.1.3 EFA缺乏补充脂肪酸饲料的配方 在第2种配方的

基础上加入鱼油，鱼油按总重量的5%加入，能量与普通饲料相似(以上鱼粉均为浙江鱼粉)。

1.2 动物分组

Wistar断乳新生鼠90只，雌雄不拘，由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供，分为3组，每组30只：Ⅰ组饲以普通饲料；Ⅱ组饲以EFA缺乏饲料；Ⅲ组饲以EFA缺乏补充脂肪酸饲料；每天定时定量喂养，饲养3个月后，体质量在250～300 g。大鼠的喂养与管理严格按照中国动物饲养与管理办法和重庆市动物保护协会规则的要求进行。

1.3 试剂

多聚甲醛，1%天青Ⅱ水溶液，1%焦油紫溶液，0.2 mol/L醋酸，0.2 mol/L醋酸钠，0.2 mol/L硼酸溶液，0.05 mol/L硼砂溶液，10%吡啶水溶液，1%硝酸银，对苯二酚，无水亚硫酸钠，石蜡，二甲苯，无水乙醇，双蒸水，生理盐水。

1.4 取材

根据实验的总体设计，3组动物饲养3个月后，1%戊巴比妥钠腹腔麻醉，开胸暴露心脏，经左心室-主动脉先灌注生理盐水300 ml(至右心室流出的液体基本无血色是为止)，然后灌注用PB配置的4%多聚甲醛300 ml。灌注固定后2 h取出小脑组织，投入相同固定液再继续固定24 h。

修整、石蜡包埋后，切5、10 μm连续切片，分别进行HE染色、尼氏染色和嗜银染色，光镜下观察观察其小脑皮层各层的细胞构筑结构。

1.5 病理学观察观察指标

1.5.1 HE染色 按常规方法进行。

1.5.2 尼氏染色 为了避免单纯焦油紫染色方法中本底无色和核仁染色不明显而产生的观察问题，我们把文献[4]焦油紫染色方法与天青-伊红染色法结合起来，形成了显示尼氏体的天青-伊红-焦油紫染色法。染色时将10 μm石蜡切片经2次二甲苯和梯度乙醇脱水，然后浸入工作液染色37 ℃ 10 min，蒸馏水简单冲洗(约30 min)后入70%乙醇脱水2 min，再入无水乙醇-伊红(0.01%)液于显微镜下分色，分色后的切片用乙醇、二甲苯脱水、透明，最后用DPX封固切片。染色结果为尼氏体和核仁呈紫蓝色，背景呈粉红色。

1.5.3 Holmes嗜银染色 神经元中的主要嗜银成分是神经元纤维，当用银溶液处理后再用还原剂还原，银盐便会沉淀在神经元纤维上，从而显示出神经元。具体方法和步骤基本按文献[4]进行。

2 结果

通过HE染色观察不同组大鼠小脑的整体细胞构筑，以尼氏染色着重显示小脑浦肯野细胞的形态及排列、嗜银染色观察神经元突起轴突纤维的变化。结果本实验观察到：3组小脑皮质的整体细胞构筑基本形成由表及里的3层结构，即分子层、浦肯野细胞层和粒层，但EFA缺乏组大鼠小脑的浦肯野氏细胞层和粒层与正常组和补充鱼油组相比稍薄。尼氏染色、嗜银染色显示补充鱼油组大鼠大脑小脑整体细胞构筑发育正常，其粒层结构教正常组稍厚；EFA缺乏组大鼠小脑皮质浦肯野氏细胞数目明显减少、排列不规则、稀疏、可见细胞水肿、核固缩等变性坏死改变，在分子层中可见星形细胞，尤其是分子深层的蓝状细胞可见大量的细胞肿胀、变性坏死；嗜银染色观察到EFA缺乏组小脑攀缘纤维、苔藓纤维等轴突纤维数目明显减少、纤维变短、排列稀疏也不规整。

3 讨论

EFA主要指不饱和脂肪酸，包括EPA和DHA、EFA是细胞膜和核膜结构脂质的主要成分，在脑发育和脑功能方面具有重要作用，近年引起国内外学者的关注[5]。但大多数学者关注的重点在大脑发育和功能情况。我们前期的实验也观察到，在发育期间，低EFA饲养大鼠的大脑皮层和海马结构受损、条件反应式学习记忆能力降低，同时有部分大鼠还表现出其他行为功能异常，如反应迟钝、运动失调等[3]，而后者与小脑功能密切相关。为此，我们推测发育阶段缺乏EFA不仅造成大脑发育和功能异常，也可以造成小脑的结构和功能异常。

本研究中3组大鼠饲养3个月后，通过HE染色观察细胞整体细胞层次、尼氏染色观察神经元结果、嗜银染色观察神经元传出、出入纤维情况，结果观察到：尽管3组大鼠小脑细胞构筑分层结构基本正常，但EFA缺乏组大鼠小脑皮层的浦肯野氏细胞数目明显减少、排列不规则、稀疏，在分子层中神经元可见大量的细胞肿胀、变性坏死，攀缘纤维、苔藓纤维等轴突纤维数目明显减少、纤维变短、排列稀疏不规整；而补充鱼油组大鼠小脑皮质的整体细胞结构清晰、发育良好，甚至粒层细胞比正常组还厚。说明EFA缺乏将延迟甚至损害小脑皮质神经元的发育和轴突生长。这就是低EFA饲养大鼠反应迟钝、运动失调等运动功能障碍的细胞学基础[6]。由此可见，EFA对小脑发育和小脑功能也具有重要作用，对此加强研究十分必要。

参考文献：

[1] Dyerberg J, Bang H O, Stoffersen E, *et al*. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis[J]? Lancet, 1978, 2(8081): 117－119.

[2] 李云甫，周庆安，刘文刚，等. 脂类在动物营养中的作用与研究进展[J]. 中国油脂，2001，26(6)：84－87.

[3] 张 侃，何凤慈，曾 琳，等. 必需脂肪酸对新生大鼠脑发育与学习记忆功能的影响[J]. 中国临床康复，2004，8(4)：624－625.

[4] 鞠 躬，万选才，董新文. 神经解剖学方法[M]. 北京：人民卫生出版社，1985. 25－27.

[5] Youdim K A, Martin A, Joseph J A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications[J]. Int J Dev Neurosci, 2000, 18(4-5): 383－399.

[6] 张 侃，曾 琳，龙在云，等. 必需脂肪酸对大鼠脑组织中EAA含量的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(1)：53－55.

(编辑 陈聪连)