文章编号:1000-5404(2006)06-0531-04

论著

全脑缺血再灌注后神经元凋亡的时相和分布特征

陈力学[1],姜利人[2],刘宝松[2],陈恒胜[2],康格非[1] ([1]重庆医科大学检验系临床生物化学教研室,重庆 400016; [2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨大鼠全脑缺血再灌注后神经元凋亡的时相和分布特征,为神经元损伤的早期干预和继发性脑损害的防治提供实验依据。**方法** 建立大鼠全脑缺血模型,采用TTC染色、原位细胞凋亡检测(原位末端标记法,TUNEL)及AO/EB荧光比色法观察脑缺血再灌后海马、皮层凋亡发生的数量和分布,用荧光指示剂Fura-2 AM标记,检测脑海马细胞内游离钙的浓度。**结果** TUNEL显示再灌注3 h海马部位即出现散在凋亡细胞,并向皮层区域扩展,24~48 h达高峰;坏死细胞迟于凋亡出现,弥散分布于凋亡细胞周围,再灌注48 h后坏死细胞增多,72 h最多。AO/EB法显示海马、额叶和顶叶凋亡细胞总数分布在再灌注后24 h和72 h达高峰,并显著高于对照组($P<0.05$)。TTC染色证实全脑缺血再灌注后不出现梗死灶,而是在海马及大脑皮层有弥散性坏死。胞内$[Ca^{2+}]i$各时间点与对照相比匀显著升高($P<0.01$)。**结论** 全脑缺血再灌后受累神经元经历了由凋亡到死亡的过程,对缺血敏感的海马神经元首先受损,并向顶叶和额叶皮层扩展,细胞质内$[Ca^{2+}]i$增加是主要原因。利用凋亡时间窗进行早期干预可能有益于保护和挽救凋亡前期神经元,减小继发性损害的严重程度。

关键词: 脑缺血;细胞凋亡;AO/EB;TUNEL;TTC
中图法分类号: R338.1;R741.02;R743.31 **文献标识码**: A

Time and distribution characteristics of neuron apoptosis in rat after ischemic insult

CHEN Li-xue[1], JIANG Li-ren[2], LIU Bao-song[2], CHEN Heng-sheng[2], KANG Ge-fei[1] ([1]Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [2]Department of Clinic Biochemistry, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the time and distribution characteristics of neuron apoptosis occurred after global cerebral ischemia in rats, so as to provide some helpful experimental basis both for the early interference of injured neuron and the prevention and treatment of brain secondary damage. **Methods** In the global cerebral ischemia model with modified 4-vessel occlusion method, the amount and distribution of apoptotic neuron in hippocampus and cortex after ischemia and reperfusion were detected with TTC staining, TUNEL labeling and AO/EB fluorescence examination techniques. Intracellular free calcium concentration was measured with Fura-2 AM fluorescent indicator. **Results** TUNEL showed that apoptotic neurons scattered in hippocampus 3 h after reperfusion, then spread around to cortex. The amount of apoptotic cell reached to the peak at 24 – 48 h. The died cells appeared later and mainly dispersed around the apoptotic cells. There was a significant increase of the amount of died cells 72 h after ischemia and reperfusion. AO/EB fluorescence examination showed that the total amount of the apoptotic neurons in hippocampus, frontal cortex and parietal cortex reached their peak at 24 h and 72 h respectively, and they were significantly higher than that in control group ($P<0.05$). The infarct focuses were not found after reperfusion by TTC staining, which expanded around hippocampus and cortex. Intracellular free calcium concentration was significantly higher than that in control group ($P<0.01$). **Conclusion** The injured neuron underwent a process from apoptosis to death after global cerebral ischemia and

基金项目:重庆市科委应用基础研究资助项目(2003-8107)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2003-8107)
作者简介:陈力学(1973-),男,重庆市云阳县人,博士研究生,检验师,主要从事中枢神经系统继发性损害发生机制方面的研究。电话:(023)66679047
通讯作者:刘宝松,电话:(023)68757703, E-mail:bsliu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-09-06;**修回日期**:2005-10-11

reperfusion. Hippocampal neurons, which are quite sensitive to ischemia, were injured first, and then the apoptotic process extended to frontal and parietal cortex. The early interferences in the apoptotic time window were of help both in the protection of neuron in pre-apoptosis stage and reduce of secondary damage severity.

Key words: global cerebral ischemia; apoptosis; AO/EB; TUNEL; TTC

细胞凋亡是一种以细胞DNA早期降解为特征、具有特征性形态变化和生化改变的细胞主动死亡过程，不同于细胞坏死过程。在脑缺血性损伤发生发展过程中，神经元的凋亡与坏死共存[1]；伤后迟发性神经元死亡主要源于凋亡途径，凋亡神经元的多寡直接决定着神经元坏死数量和梗死区域的面积，与缺血损伤后继发性损害的程度密切相关，及时遏制凋亡启动环节是挽救凋亡前期的神经元的关键[2]。目前对于全脑缺血再灌注后神经元凋亡的研究已有报道，而其时相和分布特征尚少见报道。本研究采用Fura-2 AM检测细胞内游离钙的浓度、TTC染色、TUNEL原位凋亡检测、AO/EB荧光法检测凋亡总量等方法详细探讨了脑缺血损伤后神经元凋亡的动态变化过程和分布规律，对有的放矢地采取相关措施，挽救缺血凋亡前期神经元具有指导性价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级健康成年雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)120只，体质量230～270 g。将动物依次编号，利用随机数字表将动物分为正常对照组、假手术组、手术组；其中手术组又依缺血5 min后恢复颈总动脉供血的时间分为：再灌流3、6、12、24、48、72 h组，每组15只，假手术组为对照。

1.2 模型制作

参照Pulsinelli 4血管阻断致全脑缺血方法[3]，首先将双侧椎动脉烧闭，次日分离暴露双侧颈总动脉，夹闭5 min后恢复颈总动脉供血，于再灌流不同时相点进行相应检测。

1.3 TTC染色[4]

于相应时间点断头处死大鼠，迅速取出脑组织，-20 ℃冰冻3 min后，以矢状缝后人字形分叉点为起始标记点切成1.0～2.0 mm厚(6片/只)脑片置于2%氯化2,3,5-三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride，TTC，Sigma公司)溶液中，37 ℃避光温育30 min，然后移至PBS配制的4%多聚甲醛液中固定，脑梗死区呈白色，照相。

1.4 吖啶橙/溴乙啶(AO/EB)荧光比色

在相应时间点断头处死动物，迅速取出脑组织，在人工脑脊液[ACSF，主要成分(g/L)：NaCl 7.3，KCl 0.18，NaH_2PO_4 0.15，$NaHCO_3$ 2.18，Glucose 3.60，$MgSO_4$ 0.17，$CaCl_2$ 0.23，pH 7.4]中分离脑膜(所有操作均在冰上进行)，分别取两大脑半球的海马、额叶皮质及顶叶皮质(3份标本)，电子天平称重，0.25%胰酶消化，剪碎，加ACSF 200 μl混匀，4 ℃ 1 000 r/min离心5 min，取沉淀加50 μl AO/EB染液，混匀，反应1 min，ACSF洗涤，离心，取沉淀用ACSF稀释至200 μl，荧光读板机上(AO激发波长420～485 nm，发射波长520 nm；EB激发波长530 nm，发射波长590 nm)读取测定管和空白对照OD值。

1.5 原位细胞凋亡检测(TUNEL)

于相应时间点麻醉动物，开胸暴露心脏，左心室穿刺并经升主动脉用0.01 mol/L PBS快速灌注后，以300 ml 4%多聚甲醛缓冲液由快到慢灌注固定3～4 h，取脑，30%蔗糖液固定24 h，以海马范围为准，做脑连续冠状冰冻切片(10 μm)，按TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)试剂盒(美国罗氏公司)说明进行操作。

凋亡细胞观察与计数：光镜下凋亡细胞呈棕黄色，可破裂成小碎片或出现凋亡小体[5]。于高倍镜下(×400)计数海马各部位凋亡细胞数，每个区域计数10个视野(来自不同切片)；细胞计数采用图像分析软件进行定量分析，以像素数校正切片大小等差异。

1.6 组织病理学观察

留取上述相邻冰冻切片，进行常规HE染色，观察脑组织梗死区域分布和神经元坏死情况。

1.7 细胞内游离钙的测定[6]

大鼠断头、无菌操作取海马，于D-hanks液中洗尽血迹。0.125%的胰蛋白酶消化30 min (37 ℃)，冰RPMI1640液(5%的小牛血清)终止消化，过200目筛网，滤液1 500 r/min离心5 min，弃上清液，D-hanks液洗2次，悬浮在RPMI1640培养液中，细胞数达10^6～10^7/ml。检测时将上述悬液37 ℃预温5 min，加入10 μl Fura 2-AM(1 mmol/L)，37 ℃孵育30 min，1 500 r/min离心5 min，弃上清液，悬浮在NB培养基中，Synergy HT型(美国Bio-TEK公司)分光光度计测定钙离子荧光强度。

根据下列公式计算细胞内游离钙的浓度：$[Ca^{2+}]i = K_d (sf_2/sb_2) \times (R-R_{min})/(R_{max}-R)$，其中$K_d = 224$ nmol/L，R_{min}为加入EGTA(至终浓度8 μmol/L)时340 nm和380 nm的荧光比值；R_{max}为加入0.2% Triton时340 nm和380 nm的荧光比值；sf_2为零钙时380 nm的荧光值，sb_2为细胞内最大钙含量时380 nm的荧光值。荧光分光光度计发射波长为510 nm，激发波长为340 nm和380 nm，发射狭缝为5 nm，激发光栅10 nm，结果以nmol/L计。

1.8 统计学处理

本研究中荧光强度、图像面积及相应比值均作为计量资料处理，计量数据均以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件对两样本均数进行独立性t检验。

2　结果

2.1　伤后梗死区域分布

TTC 是目前常用的脑组织缺血性损伤的标记物，其可被各类活细胞线粒体琥珀酸脱氢酶还原生成红色光敏脂溶性的 Formazan 物质，使正常脑组织染成红色；缺血梗死区域神经元线粒体功能障碍，不能还原 TTC 生成为红色 Formazan 物质，故该区域脑组织呈苍白色，从而与正常组织区别开来。结果显示，缺血组未见局灶性梗死灶，出现弥散性坏死（图 1）。



图 1　对照组与缺血 24 h TTC 染色

2.2　凋亡细胞总数的变化

结果显示，缺血再灌 3 h 组海马组织的 OD 值即开始增高，至伤后再灌 12 h 显著高于正常对照组和假手术组，伤后再灌 24 h 海马组织的 OD 值达峰值，此后呈缓慢下降趋势。额叶皮质和顶叶皮质组织的 OD 值在伤后再灌 3 h 开始略有增高，分别在 72 h 达峰值，但二者的 OD 值均低于海马组织，其中又以顶叶皮质组织为著。提示海马组织对缺血损伤最为敏感，神经元凋亡发生早；额叶和顶叶皮质神经元凋亡过程略晚于海马组织，但持续时间可能延长（图 2）。

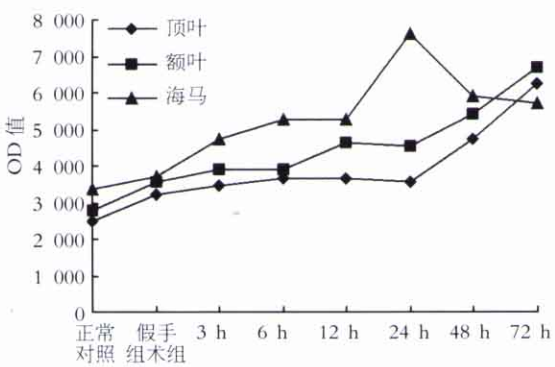


图 2　AO/EB 法测得海马、额叶、顶叶的 OD 值

2.3　坏死细胞和凋亡细胞的时相关系

正常对照组和假手术组偶见凋亡细胞，伤后再灌 3 h 凋亡细胞已有增加，伤后再灌 12 h 凋亡细胞数量已明显增多，周围散在分布坏死细胞，随着再灌注时间的延长，凋亡细胞和坏死细胞均呈逐渐增加趋势，至再灌后 24 ~ 48 h，凋亡细胞数量达高峰，海马颗粒和锥体细胞层以及大脑皮层均可见大量的凋亡细胞（图 3）。凋亡细胞周围分布较多的坏死细胞，两者往往同时存在，伤后再灌 72 h 时坏死细胞数量已明显增多，核周染色质浓缩形成环状，斑片状或新月状，部分细胞有空泡，在 3、6、12、24、48 h 海马区凋亡和坏死细胞数量有显著性差异（$P < 0.05$）（表 1）。

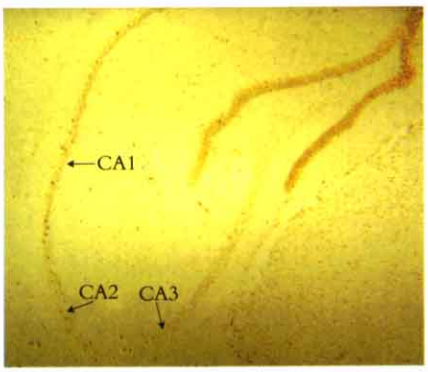


图 3　大鼠全脑缺血再灌 24 h 海马区凋亡　（TUNEL ×40）

表 1　再灌后海马凋亡细胞和坏死细胞数量

细胞	对照组	缺血（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）					
	（$n=5$）	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
凋亡	3.4 ± 2.97	20.72 ± 7.69[a]	29.24 ± 7.32[a]	48.74 ± 7.16[a]	107.28 ± 20.08[a]	98.78 ± 17.64[a]	89.08 ± 10.55[a]
坏死	1.8 ± 1.64	3.58 ± 0.96[b]	17.04 ± 2.75[ab]	25.22 ± 4.66[ab]	61.48 ± 4.49[ab]	71.16 ± 8.51[ab]	90.38 ± 12.98[a]

a：$P < 0.05$，与对照组比较；b：$P < 0.05$，与相同时间点的凋亡细胞比较

2.4　神经细胞质游离钙的变化

脑损伤后各时相点细胞质内游离钙明显高于对照组，其中伤后 3 h 组细胞质内游离钙为（563.15 ± 34.88）nmol/L，明显高于正常对照组（$P < 0.01$），约为对照组的 5 倍；伤后 12 h 组约为对照组的 11 倍，达最高峰；在 24 h 后略有下降，但仍维持在 10 倍左右（表 2）。

表 2　脑缺血后海马神经元胞浆游离钙浓度变化（$\bar{x}\pm s$，nmol/L）

组别	$[Ca^{2+}]i$
对照组	124.63 ± 9.19
3 h	563.15 ± 34.88[a]
6 h	855.65 ± 39.21[a]
12 h	1 398.92 ± 61.08[a]
24 h	1 302.17 ± 66.38[a]
48 h	1 287.42 ± 38.88[a]
72 h	1 157.42 ± 59.29[a]

a：$P < 0.01$，与对照组比较

3　讨论

细胞凋亡是真核细胞常见的死亡形式，是机体为维持自身稳态而进行的生理性自杀过程。凋亡细胞在细胞核和细胞质结构上常出现特征性改变，如质膜的

快速突起发泡和钙依赖性核酸内切酶激活引起的DNA断裂以及细胞核解体、凋亡小体形成等[5,7]。细胞凋亡的发生一方面与基因表达有关;另一方面则与Ca^{2+}、自由基、兴奋性氨基酸等外在环境因素作用有关,这与我们测定细胞内钙离子浓度的结果相吻合,即细胞内钙离子浓度升高早于细胞凋亡,并在较高水平上维持很长时间,继而引起迟发性神经元死亡。越来越多的研究表明,细胞凋亡不仅存在于缺血性神经元损伤过程之中,而且在迟发性神经元死亡和继发性损害发生过程中占重要地位[7]。

本研究结果显示,全脑缺血再灌流后早期神经细胞的损害以细胞凋亡为主要方式,所以在缺血再灌后3 h利用TUNEL法进行原位凋亡细胞标记即可见散在的凋亡细胞;随后进入凋亡的高峰期同时伴有坏死发生,缺血再灌后24~48 h可见大量凋亡细胞,此后凋亡细胞呈减少的趋势,而晚期则细胞坏死增长较快,但数量上仍较凋亡细胞少,这与Charriaut-Marlangue等[8]的"轻度脑缺血以细胞凋亡为主,严重脑缺血以坏死为主"的结论一致。TTC染色没有坏死灶出现,缺血后恢复血液灌流,可挽救受损的脑组织,减少神经元凋亡和死亡数量,血液灌流恢复越早,脑组织梗死的区域就越小。但血液再灌流也同时引起"再灌注损伤",其原因与血液再灌注过程中产生的大量氧自由基有关;氧自由基可引起细胞DNA的损伤,当细胞自然修复能力不足以完成修复时,则导致损伤DNA的积聚并启动细胞凋亡过程[5,9]。此外,兴奋性氨基酸毒性作用、膜表面受体分布及组成结构变化及其所致的Ca^{2+}超载等因素也是引起神经元凋亡的重要原因[3,5]。

采用AO/EB染色方法可观察各取材部位凋亡细胞总量的变化,AO(激发波长485 nm,发射波长528 nm)能透过细胞膜而嵌入DNA,使之呈现绿色;EB(激发波长530 nm,发射波长590 nm)仅能透过破损的细胞膜而嵌入DNA使之呈橘红色,凋亡的细胞由于染色质高度浓缩使其细胞核着色均匀一致,可以检测细胞的凋亡率。本研究AO/EB凋亡染色结果显示,细胞凋亡首先发生在对缺血损害敏感的海马CA1、CA3区,并随时间延长逐渐向额叶和顶叶皮层区域扩展,顶叶和额叶凋亡细胞数量达峰值的时间迟于海马组织,与TUNEL测得的结果一致,该结果为脑缺血后根据不同时间选取不同部位进行靶向治疗提供了理论依据。目前关于脑缺血再灌流后细胞凋亡出现的时间,结果尚有差异。有研究显示,大鼠大脑中动脉阻塞2 h,再灌注后0.5 h就可出现凋亡细胞,24~48 h达到高峰,造成这种现象的原因可能与选用的动物、观察的部位以及缺血程度的轻重有关。

本研究中凋亡先于死亡出现,提示脑缺血再灌后受累神经元经历了由凋亡到死亡的演变过程,其间存在一个相对较长的时间窗,这就为药物早期干预提供了可能。脑缺血后应首先恢复血液灌注,与此同时,应积极采取相应措施,控制诱发凋亡过程的各类因素,避免凋亡的发生,从而最多程度的保护和挽救凋亡前期神经元,减小继发性损害的严重程度。

参考文献:

[1] 兰希发, 姚文秀, 郭 阳. 脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的机制[J]. 中国临床康复, 2003, 7(19): 2726-2727.

[2] 李小刚, 朱 克, 李 楠, 等. 谷氨酸对神经元钙离子内流和凋亡的影响及谷氨酸受体拮抗剂保护作用的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2001, 3(2): 122-125.

[3] BLONDEAU N, LAURITZEN I, WIDMANN C, *et al*. A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(7): 821-834.

[4] MAEDA M, FURUICHI Y, UEYAMA N, *et al*. A combined treatment with tacrolimus (fk506) and recombinant tissue plasminogen activator for thrombotic focal cerebral ischemia in rats: increased neuroprotective efficacy and extended therapeutic time window[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(10): 1205-1211.

[5] KAWAGUCHI M, DRUMMOND J C, COLE D J, *et al*. Effect of isoflurane on neuronal apoptosis in rats subjected to focal cerebral ischemia[J]. Anesth Analg, 2004, 98(3): 798-805.

[6] 邵 阳, 曾 琳, 龙在云, 等. 瞬间冲击力致颅脑损伤过程中细胞内钙的变化[J]. 医用生物力学, 2003, 18(1): 20-22, 27.

[7] YIN D, ZHOU C, KUSAKA I, *et al*. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(7): 855-864.

[8] CHARRIAUT-MARLANGUE C, MARGAILL I, REPRESA A, *et al*. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis[J]. J cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(2): 186-194.

[9] 尹昌林, 熊健琼, 文 亮. Caspase-3在缺血再灌注大鼠脑海马神经元凋亡中作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(14): 1245-1247.

(编辑 薛国文)