论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2080-04

碱性成纤维细胞生长因子对高胆红素血症模型鼠海马神经元形态改变的影响

王 昱[1],朱宇熹[2],孔祥英[1] ([1]第三军医大学西南医院儿科,重庆 400038;[2]重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016)

提 要:目的 利用形态学的方法观察高胆红素血症对大鼠中枢神经系统的影响,探讨碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在不同应用途径中的对抗作用的差异。**方法** 大鼠随机分成对照组(CG)、未治疗组(BG)、治疗1组(T_1G)、治疗2组(T_2G)。腹腔注射胆红素溶液建立高胆模型。模型制作后30 min、1、3、5、7 d,治疗组大鼠于分别经腹腔注射(T_1G)和颅内开窗(T_2G)给bFGF,6 U/(g·次),对照组注射等量磷酸盐缓冲溶液。实验第2、8、28、60天分批处死大鼠,海马组织分送光镜、免疫组化测量GAP-43阳性光密度值及电镜。**结果** ①通过脑标本大体、镜下观察及血清和脑组织胆红素浓度等指标鉴定模型建立成功。②GAP-43:BG、T_1G、T_2G中GLIN均较CG明显增多,以T_1G、T_2G明显($P<0.05$, $P<0.01$),T_2G变化明显高于T_1G;胆红素对脑组织的电镜超微结构有明显的损害作用,bFGF能改善这种变化,不同给药途径改善程度有显著的差别($P<0.05$)。**结论** ①高胆红素血症可以造成实验动物神经系统的确定的持续性损伤。②bFGF对胆红素源性脑损伤有可靠的治疗作用,近/远期各项指标改善明显,且治疗途径不同,bFGF的治疗效果不同。

关键词:高胆红素血症;GAP-43;电镜;bFGF

中图法分类号:R322.81;R329.24;R722.170.2 **文献标识码**:A

Therapeutic effects of basic fibroblast growth factor on morphological features of hippocampal neurons in hyperbilirubinemia rats

WANG Yu[1], ZHU Yu-xi[2], KONG Xiang-ying[1] ([1]Department of Paediatrics, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the morphological damages of hyperbilirubinemia on rat central nervous system, and evaluate the therapeutic effects of different routes of basic fibroblast growth factor (bFGF) administration. **Methods** Totally 90 Wistar rats were inflicted to hyperbilirubinemia models and then divided randomly into 3 groups: untreated group (BG), treated-1 group (T_1G), treated-2 group (T_2G), and another 30 rats served as control group (CG). bFGF injection were given at 30 min, 1, 3, 5 and 7 d by abdominal cavity (T_1G,) and cranial cavity (T_2G). GAP-43 expression levels and the micro-morphological features were observed with immunohistochemical assay and transmission electron microscopy respectively at 2 nd, 8 st, 28 st and 60 st day. **Results** ①Hyperbilirubinemia rat model was verified by gross and microscopic observation, bilirubin concentrations in the plasma and brain. ②Compared to CG, the expression level of GAP-43 was significantly up-regulated in BG, T_1G and T_2G, especially in the later 2 groups ($P<0.05$, $P<0.01$), ③Ultrastructural observation represented significantly changes in the brain tissue in the hyperbilirubinemia rats, including lipofuscin deposit in the neurons which was firstly reported. ④bFGF enhanced GAP-43 expression and improved the negative changes in slices of electro-microscope, with T_2G more remarkable than T_1G. **Conclusion** ①Bilirubin exerts certain neurotoxicity on the nervous system for a long time. ②bFGF is helpful on alleviating the pathological changes in the brain from hyperbilirubinemia, and different routes of administration show different therapeutic effects.

Key words: hyperbilirubinemia; GAP-43; electromicroscopy; bFGF

作者简介:王 昱(1973-),女,山东省荣成市人,硕士,主治医师,主要从事新生儿神经系统疾病方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68765413

通讯作者:孔祥英,电话:(023)68753467

收稿日期:2005-11-05;**修回日期**:2006-06-09

随着无临床脑病表现的高胆红素血症仍可造成神经系统损伤的观点引起广泛的重视，探寻有效防治损伤、改善远期预后的方法成为临床工作者的目标[1]。碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）作为一种公认的神经营养因子，基础实验中促神经再生作用可靠，但临床应用尚未广泛展开，更鲜见将其应用于胆红素源性脑损伤，使用方法极不成熟，本实验旨在利用形态学方法，初步探讨 bFGF 在不同给药方式下对胆红素源性脑损伤的影响，以期对临床治疗提供一定参考。

1　材料与方法

1.1　动物模型的建立

1.1.1　动物分组　出生 1 周的健康 Wistar 大鼠 120 只（由第三军医大学实验动物中心提供），体质量 14.6～18.4 g，雌雄不拘，分成正常对照组（CG，$n=30$），胆红素模型组（BG，$n=30$），治疗 1 组（T_1G，$n=30$），治疗 2 组（T_2G，$n=30$）。

1.1.2　注射用胆红素溶液的配制　参照 Wennberg，避光称取晶体胆红素 20 mg，溶于 1 ml 0.5 mol/L NaOH 中，加入双蒸水 9 ml，用 0.5 mol/L HCL 调节 pH 至 8.5，浓度为 3.42 mmol/L（2 mg/ml）[1]。

1.1.3　动物模型的制作　参见文献[2]除对照组外的大鼠腹腔内注射胆红素溶液，剂量为 0.342 μmol/g 体质量。对照组以生理盐水 0.5 ml 取代胆红素溶液，余条件相同。

1.1.4　动物模型鉴定　恒温、恒湿、避光环境中自然哺育 48 h后，每组动物各 5 只，断头取血约 0.5 ml，后取左侧海马组织甲醛溶液固定，HE 染色光镜观察；右侧海马待用。剩余脑组织用重氮反应法[3]测定血清和脑组织胆红素浓度。

1.2　bFGF 治疗方法

模型制作后 30 min、1、3、5、7 d，治疗 1 组：经大鼠腹腔注射 bFGF-0.1% 肝素-磷酸盐缓冲溶液共 5 次[6 U/（g · 次）每次 25 μl]。治疗 2 组：乙醚麻醉，在大鼠头部矢状缝左右旁开 1 mm处作 2 个方形开窗（3 mm × 3 mm），翻开颅骨片暴露大脑顶叶皮质，同上时间内用微量注射器分别向皮质内注射 bFGF－0.1% 肝素－磷酸盐缓冲溶液 25 μl 共 5 次（剂量同上），暴露处覆盖浸有磷酸盐缓冲溶液的海绵胶粒并固定，对照组、胆红素组以等量肝素－磷酸盐缓冲溶液替代。

1.3　检测指标及方法

1.3.1　免疫组化形态学观察　实验第 2、8、28、60 天大鼠每组 5 只，取右侧部分海马用 4% 多聚甲醛固定，送检 GAP-43 免疫组化。

1.3.1.1　染色方法　常规免疫组化方法。

1.3.1.2　数据记录　每组每时段含海马部位且断面相似的脑切片 1～2 张，OLympus 双目显微镜（×40）下画出双侧背海马，应用 Leica-Q570C 真彩色图像分析仪，测定规定区域内所有 GAP-43 免疫阳性细胞光密度值（OD），每张切片随机测 10 个单位面积，经计算机自动处理出每个单位面积 OD 相对含量的平均值及标准差，取测定值减去背景测定值的绝对值，以避免非特异性染色所造成的误差。

1.3.2　超微结构观察　以上时间段剩余海马组织切成1 mm ×1 mm ×4 mm 薄片入戊二醛固定，4 ℃保存，丙酮-环氧树脂包埋，超薄切片，JEM-2000EX 型透射电镜观察。

1.4　统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析及配对 t 检验。

2　结果

2.1　动物模型的鉴定

2.1.1　一般行为观察　建立模型后 48 h 内，CG 未见异常表现。实验组（BG）给药 24 h 后部分出现烦躁、呼吸急促，活动减少，对刺激反应微弱，可见翻滚、肢体阵发性痉挛，俯伏现象多见，BG、T_1G、T_2G 死亡例数分别为 6、4、4 只（死亡样本将由同批次建立的预备模型动物补充至原数量值）。

2.1.2　脑标本大体观察　BG 组大鼠海马区、小脑、基底核部位散在深浅不一黄染区。

2.1.3　海马脑片（HE 染色）　镜下可见棕黄色的胆红素颗粒沉积。

2.1.4　实验动物血清、脑组织胆红素浓度　BG、T_1G、T_2G 的血清胆红素浓度分别为（846.37 ± 25.01）、（822.16 ± 18.04）、（831.10 ± 17.14）nmol/L，组间无明显的差异（$P>0.05$），但均明显高于 CG（14.28 ± 1.27 nmol/L），差异有显著性（$P<0.01$）。CG 脑组织均浆胆红素浓度为 0，BG、T_1G、T_2G 脑组织胆红素浓度分别为（142 ± 2.4）、（158 ± 11.3）、（154 ± 0.2）μmol/L，组间无明显的差异性（$P>0.05$）。以上表明，胆红素动物模型建立成功。

2.2　形态学指标

2.2.1　GAP-43 的表达　GAP-43 样免疫阳性细胞为棕黄色，胞体及其突起呈多极、双极样（GLIN）。图像分析提示各组 GAP-43 的阳性 OD 值均在 8 d 达到最高峰，28 d 时开始下降，60 d 时增强的免疫染色密度达到最低，但神经元突起形成的网络以 28 d 最为明显。

bFGF 的治疗能增加 GLIN 及神经元突起的形成，这让神经网络却更趋于完善。我们从实验数据中可以看出，2 个治疗组的阳性 OD 值的下降速度均明显减缓，实验第 8、28、60 天，与 BG 组相比差异有统计学意义（$P<0.01$）（表 1）。而这种差异在 T_2G 中表现显著，明显粗大的免疫阳性颗粒，更加密集的神经网络以及更加典型的星形细胞突起是在 T_1G 中不曾观察到的。

表 1　海马区 GAP-43 阳性染色的 OD 值（$n=5$）

组别	2 d	8 d	28 d	60 d
BG 组	152.37 ± 3.34	224.02 ± 2.07	185.83 ± 2.13	153.63 ± 3.44
T_1G 组	189.27 ± 3.19	288.00 ± 0.90[a]	225.19 ± 3.14[a]	187.02 ± 5.47
T_2G 组	241.27 ± 3.19[bc]	364.17 ± 2.43[bc]	291.16 ± 2.97[bc]	280.24 ± 2.83[bd]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 BG 组比较，c：$P<0.05$，d：$P<0.01$ 与 T_1G 组比较

2.2.2 超微结构变化 CG 细胞结构清楚，形态正常，突触结构明显，小泡密集。BG 全视野下神经元细胞膜及核膜均皱缩，部分有破裂，细胞核不规则比例明显增高，染色质浓缩，细胞质内细胞器模糊，粗面内质网罕见，代之为大量的滑面内质网、游离核糖蛋白体和终极溶酶体，预示有在光镜下的尼氏体的溶解(chromatolysis)。另外细胞质内还可见较多高电子密度的脂褐质(lipofuscin)沉积；神经轴突及血管周围严重肿胀，突触结构模糊，小泡少见，脱髓鞘变性普遍；小胶质细胞、少突胶质细胞增生异常活跃。

T_1G 部分细胞核形态虽然仍欠规则，但膜结构的皱缩破裂已有明显减少，突触及神经细胞元形态的改变改善明显，但少数异染色质和线粒体肿胀仍可见，小胶质细胞及少突胶质细胞增生活跃情况改善不理想，细胞内可见吞噬小泡；脱髓鞘变性与未治疗组区别不明显。

与 T_1G 相比，T_2G 明显的变化是神经细胞膜和核膜保持完整、饱满，核形态基本正常，脂褐质明显减少，细胞及血管周围肿胀程度有明显减轻，髓鞘样变性明显改善，但小胶质细胞增生活跃情况仍与未治疗组类似。

3 讨论

因为新生儿期胆红素的神经毒性可以轻微到临床上难以发现或易被忽略，因此单凭血清胆红素水平并不总能确定预后[1]。

GAP-43 是神经细胞膜上的一种特异性磷酸蛋白，在神经系统的发育和再生事件中常能观察到GAP-43在 mRNA 和蛋白水平上的表达增高[5]，国际上将 GAP-43 作为指示神经生长发育和损伤修复的首选分子探针。在以往的实验中我们观察到，胆红素可使动物模型的 GAP-43 的表达水平高于正常对照组($P < 0.05$)，但这种变化持续时间和强度显然有限[6]。本实验中，胆红素的干涉可使同时段、同部位的 GAP-43 的表达上调，GLIN 较对照组明显增多，且随修复事件的完成呈减缓趋势，提示有神经系统的损伤及随之的神经元修复和突触再生存在。但胆红素毒性作用的长期性使这种修复最终无法恢复正常水平。

既往认为，脂褐质主要积聚在大脑皮层和海马部位，是动物衰老的重要形态学指标，大量脂褐质的存在会导致神经元的死亡，引起脑功能的衰退[7]。处于幼龄期的动物脑内可以发现很少量脂褐质，是神经系统发育过程中因形态和功能塑形的需要而出现的自发性程序死亡。但本实验中，BG 海马中脂褐质的沉积范围广，数量多，伴随着神经细胞膜的皱缩、破裂，神经轴突的水肿及严重的脱髓鞘变性，及突触结构的模糊消失，以上均提示有神经元显著而肯定的损伤。

由于机体对损伤的反应性修复因多种原因无法完成，因此，补充外源性生长因子成为维持损伤神经元的存活并提高其更替能力的最直接手段之一[8]。本实验观察到 bFGF 可使 GAP-43 的表达水平明显的上调，电镜显示更有包括神经细胞形态和凋亡标志物明显减少等更为形象细致的反应。目前认为，这种对远期预后的改善来自于对病理神经细胞的修复以及相应突触功能的重建。其作用途径可能有如下几点：①稳定细胞微环境中 Ca^{2+} 的平衡，减少神经细胞的凋亡[9]。②减轻 N-甲基门冬氨酸的神经毒性，阻止一氧化氮中毒性损害[10]。③促进形成反应性星形胶质化(reactive astrogliosis)，继而以自分泌 bFGF 的方式维持星形胶质化的进程[11]。④正性调节 rRNA 前体转录以及多聚核糖体的组装和活化，提高蛋白质的合成效率。

bFGF 符合神经营养因子(NTFs)判断标准[12]的结论已被广泛接受。本实验观察到，bFGF 直接注入颅内，对神经细胞的保护和促修复作用十分肯定，这与国内汪春风等[13]的实验结果一致，但临床上对新生婴儿实行颅内连续性给药的可行性极小，部分学者就此对腹腔注射治疗做了一些探索：Miyasaka 等[14]用放射自显影的方法观察发现 bFGF 能够通过大鼠缺血区的血脑屏障；洪岸等[15]发现经腹腔注射的 bFGF 可部分到达脑组织，特别在新生鼠、血脑屏障受损、加大剂量等情况下，通过量有明显的增加。在本实验中，腹腔内注射 bFGF 确实取得了一定的正性作用，虽然程度较颅内给药有差异，但仍证明了 bFGF 确可部分通过血脑屏障进入颅腔取得治疗作用。通过对 bFGF 进行化学修饰以增加血脑屏障通透性、特异性操纵内源性 bFGF 的合成、释放等环节，会让 bFGF 在临床的应用领域日益扩大。

参考文献：

[1] 庄筱玲，郭 伟，鞠亦男，等. 新生儿高胆红素血症的远期随访观察[J]. 新生儿科杂志，2001，16(6)：251－252，247.

[2] WENNBERG R P，HANCE A J. Experimental bilirubin encephalopathy：importance of total bilirubin，protein binding，and blood-brain barrier[J]. Pediatr Res，1986，20(8)：789－792.

[3] 陈舜年，贲晓明，李佩红，等. 胆红素脑病动物模型制作与鉴定[J]. 新生儿科杂志，1997，12(4)：166－168.

[4] SYKES E，EPSTEIN E. Laboratory measurement of bilirubin[J]. Clin Perinatol，1990，17(2)：397－416.

[5] TSE K F，INAYAT M S，MORROW J K，*et al*. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and its receptor expression (bek and flg) in bone marrow stroma of murine AIDS[J]. Virus Res，2004，101(2)：175－184.

[6] 王 昱，朱宇熹，孔祥英. 高胆红素血症对大鼠海马长时程增强的影响[J]. 重庆医学，2004，33(4)：484－486.

[7] 高围澈,黄连珍,李 涛,等. 锌对D-半乳糖诱导的衰老小鼠学习和记忆行为的影响[J]. 营养学报,2004,26(2):98-102.
[8] JANG J H. Identification and Characterization of soluble isoform of fibroblast growth factor receptor 3 in human SaOS-2 osteosarcoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(2): 378-382.
[9] RENOLLEAU S, AGGOUN-ZOUAOUI D, BEN-ARI Y, *et al*. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis[J]. Stroke, 1998, 29(7): 1454-1461.
[10] GALVIN K A, OORSCHOT D E. Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study[J]. Neuroscience, 2003, 118(4): 1023-1032.
[11] 李立新,叶诸榕,朱建辉. 5-甲基硫代腺苷对培养鼠脑星形胶质细胞反应性胶质化的抑制[J]. 上海医科大学学报,1997,24(3):177-180.
[12] HATTINGER C M, TARKKANEN M, BENINI S, *et al*. Genetic analysis of fibrosarcoma of bone, a rare tumour entity closely related to osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone? [J]. Eur J Cell Biol, 2004, 83(9): 483-491.
[13] 汪春风,黄连碧. bFGF对成年大鼠损伤的大脑皮质神经元的作用[J]. 神经解剖学杂志,1995,11(4):327-330.
[14] MIYASAKA N, MATSUOKA I. Identification of basic fibroblast growth factor-responsive genes by mRNA-differential display in an immortalized neural stem cell line[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(3): 349-351.
[15] 洪 岸,沈宝林,林 剑,等. 脑缺血再灌流模型大鼠血脑屏障对bFGF通透的研究[J]. 中国老年学杂志,2001,21(4):279-280.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2006)20-2083-01

个案与短篇

眼眶间叶性软骨肉瘤1例

王庭刚,秦 伟,谢汉平 (第三军医大学西南医院眼科,重庆 400038)

1 临床资料

女性,22岁,1995年无意中发现右眼球轻度突出,无明显视力下降,无复视、斜视,无头疼、眼痛、眼胀等不适,未治疗。2004年12月分娩后患者出现右眼球明显前突,并眼睑不能闭合,眼红,视物不见,于2005年1月22日以"右眼眶肿瘤"诊断入院。全身及左眼检查未见异常。右眼检查见:视力光感,光定位 ,眼球向下方突出,突出度约26 mm,眼球固定,右眼睑肿胀(+),不能闭合,结膜充血、水肿(++++),角膜混浊、水肿(++),上皮大片脱落,隐约可见瞳孔约4 mm,余结构不清。CT检查示:右侧眼球明显向前突出,右侧眼眶扩大,球后可见一肿块影,大小约2.5 cm×2.5 cm×3.2 cm,密度不均匀,中心大片钙化,周围软组织密度影,与球后壁界限尚清,与眼肌边缘界限不清。MRI增强扫描示:右眼球向右前下方突出,眶腔明显增宽,球后肌锥内见分叶状肿块,边界清晰,呈不均匀等T1,长T2信号改变,内见大块状、条状钙化,增强扫描呈不规则明显强化,肿块向后侵犯眶尖脂肪,致视神经孔扩大。术前诊断:1. 右眼眶内神经鞘瘤? 2. 脑膜瘤? 2005年1月28日在全麻下行了眶内肿瘤摘除术。术中见肿瘤呈灰白色,包膜完整,分叶状,质硬。病理学诊断为:右眼眶间叶性软骨肉瘤。术后4个月右眼眶内肿瘤复发,建议患者行右眼眶内容物剜除术,患者未同意手术。

2 讨论

眼眶间叶性软骨肉瘤可发生于骨或骨外组织,是一种由原发性软骨间质组成的恶性肿瘤[1],国内外文献少见报道。此瘤平均年龄25岁,范围在18-84岁之间[2]。间叶性软骨肉瘤临床主要表现为单侧渐近性眼球突出,发展较迅速,可持续数月到数年,根据肿瘤部位不同可造成不同方向的眼球移位,很少伴有视力下降、上睑下垂、复视与疼痛等。组织病理学上表现为分化差的成片间质细胞,细胞核圆或梭型,染色很深,胞浆少,其中散在岛状的相对分化较好的软骨组织,较多的血管分布在瘤体组织内,有时被误认为血管外皮细胞瘤[1]。本例患者的病程可能有10年,肿瘤向眶尖及颅内生长,也未压迫到静脉,故眼突不明显,此次因分娩时眶压突然急剧升高,肿瘤压迫静脉致血流障碍,进而右眼突出明显加重。由于该瘤在眼眶发病率极低,我们对其认识不足而诊断为"脑膜瘤? 视神经鞘瘤?"对于间叶性软骨肉瘤有远距离转移到淋巴结与肺的倾向,治疗宜早行眶内容物剜除术,如手术不彻底可补充放疗与化疗。

关键词:间叶软骨肉瘤;眶肿瘤
中图法分类号:R739.7+2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 吴中耀. 现代眼肿瘤眼眶病学[M]. 北京:人民军医出版社,2002:340-341.
[2] TUNCER S, KEBUDI R, PEKSAYAR G, et al. Congenital mesenchymal chondrosarcoma of the orbit: case report and review of the literature[J]. Ophthalmology, 2004, 111(5): 1016-1022.

(编辑 薛国文)

作者简介:王庭刚(1975-),男,四川省南部县人,硕士研究生,医师,主要从事角膜病方面的研究。电话:(023)60706011
通讯作者:谢汉平,电话:(023)68754401
收稿日期:2005-09-15;修回日期:2006-03-25