CO_2 气腹对胎鼠脑超微结构和 Caspase-3 表达的影响

薛 翔[1],刘 青[2],周海燕[3] (1. 西安交通大学第二医院妇产科,陕西 西安 710004;2. 济南市第四人民医院妇产科,山东 济南 250031;3. 陕西省妇幼保健院,陕西 西安 710004)

[摘 要] **目的** 探讨 CO_2 气腹对胎鼠脑组织结构及脑组织 Caspase-3 表达的影响。**方法** 选择不同 CO_2 气腹压力,建立孕鼠的 CO_2 气腹模型,于鼠孕 17 d 的 24 h 内取胎鼠脑组织分别进行 HE 染色、免疫组化、电镜制片,观察胎鼠脑组织结构变化和胎鼠脑组织 Caspase-3 表达。**结果** 透射电镜观察显示随气腹压力的增加,胎鼠脑组织可见细胞轻微可逆性损害。Caspase-3 在实验组与对照组间胎鼠脑组织表达无明显变化($P>0.05$),同时组间 Caspase-3 的表达也无显著性差异($P>0.05$)。**结论** CO_2 气腹压力升高对胎鼠大脑细胞产生可逆性轻度损伤。

[关键词] CO_2 气腹;胎鼠脑组织;Caspase-3;大鼠
[中图分类号] R714.5;R322.81 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0236-03

Effects of CO_2 pneumoperitoneum on the ultra-structure of rat fetus brain tissue and Caspase-3 expressions

XUE Xiang, LIU Qing, ZHOU Hai-yan (Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shaanxi 710004, China)

Abstract: Objective To observe the effects of CO_2 pneumoperitoneum on the ultra-structure of rat fetus brain tissue and Caspase-3 expressions. **Methods** CO_2 pneumoperitoneum was set up under different pressure. The rat fetal brain tissues were taken out on the 17th day of pregnancy within 24 hours. HE staining, immunohistochemistry and electron microscopy were applied to detect the changes in the ultra-structure and the expressions of Caspase-3. **Results** Slight reversible cell damage was observed in rat fetal brain tissue when the pressure was elevated. There was no significant change in the expression of Caspase-3 in fetal rat brain tissue between the experimental group and the control group ($P>0.05$) and the expression of Caspase-3 was also different within the groups ($P>0.05$). **Conclusion** The results show that the elevated CO_2 pneumoperitoneum can exert slight irreversible damage in rat fetal brain tissue.

Keywords: CO_2 pneumoperitoneum; rat fetus brain tissue; Caspase-3; rat

妊娠期间腹部外科急症后对胎儿发育的影响比正常孕妇要高,但妇女妊娠期间能否进行创伤较小的腹腔镜手术,目前仍存在争议,其焦点集中在 CO_2 气腹对胎儿发育是否有影响[1]。CO_2 气腹是否会对胎儿脑组织的结构以及 Caspase-3 的表达有影响,目前报道较少[1-3]。胎龄处于 16 ~ 21 d 的胎鼠大脑皮层以及海马区的细胞处于迁移期,对各种刺激比较敏感,本实验应用 CO_2 气腹对这个时期的孕鼠进行作用,观察其对胎鼠脑组织的影响。

1 材料与方法

1.1 孕鼠模型与分组

健康 SD 大鼠雌雄按 2∶1 合笼,次晨对雌鼠行阴道涂片检查,低倍镜下见到精子,确定为孕 0 d,共 36 只。按腹腔内 CO_2 灌注压力的不同将孕鼠随机分为 4 组,每组 9 只:A 组压力 5 mmHg 持续 2 h;B 组压力 10 mmHg 持续 2 h;C 组压力 15 mmHg 持续 2 h;对照组于麻醉下穿刺气腹针,不注入气体,持续 2 h。

1.2 标本制作

建立 CO_2 气腹模型后,孕鼠 17 d 后的 24 h 内,每只孕鼠子宫中随机取出 3 只胎鼠,剥离出胎脑,分别进行 HE 染色、制作电镜标本以及 Caspase-3 的免疫组化染色。Caspase-3 单抗稀释度为 1∶50,阴性对照用 PBS 缓冲液代替一抗。

1.3 结果判定

细胞质或者细胞核中出现淡黄至深棕色颗粒为阳性细胞。每个样本于大脑皮层以及海马区随机选取 5 个高倍视野(×400),计数阳性细胞数,计算出阳性细胞占视野中所有细胞的百分率。阳性判定以染色强度及阳性细胞数综合判定。阳性细胞百分数:无细胞显色定为 0,阳性细胞 1% ~24% 定为 1,阳性细胞25% ~50% 定为 2,阳性细胞大于 50% 定为 3。再与背景色相对比确定显色强度:不显色或显色不清视为 0,浅黄色视为 1,棕黄色为 2,深棕色为 3。最后按上述两项值之和确定结果:0 ~ 1 为阴性(-),2 ~ 3 为弱阳性(+),4 ~ 5 为阳性(++),大于 5 为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件统计学处理,组间采用多组等级资料 Kruskal-Wallis H 秩和检验。$P<0.05$ 表示有统计学意义。

[作者简介] 薛 翔(1963 -),男,陕西省韩城市人,硕士,副教授,副主任医师。主要从事妇产科临床与基础研究。电话:(029)87679558,E-mail: xgxue@263.net

[收稿日期] 2012-01-20 [修回日期] 2012-02-24

2 结果

2.1 HE 染色胎鼠脑组织

对照组胎鼠的大脑皮层以及海马区神经元密集,细胞层次清楚,间质细胞少。相较于对照组,A、B、C 组均未见明显的改变,未发现细胞稀疏,分层紊乱的现象,也未见明显的细胞肿胀、核皱缩、核碎裂、间质水肿以及炎性反应(图 1)。

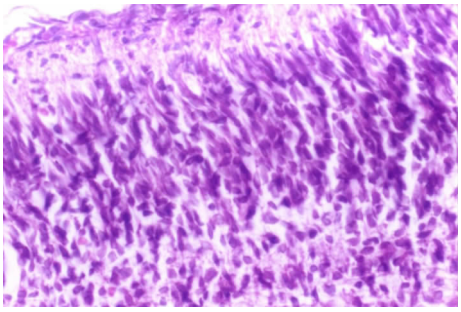
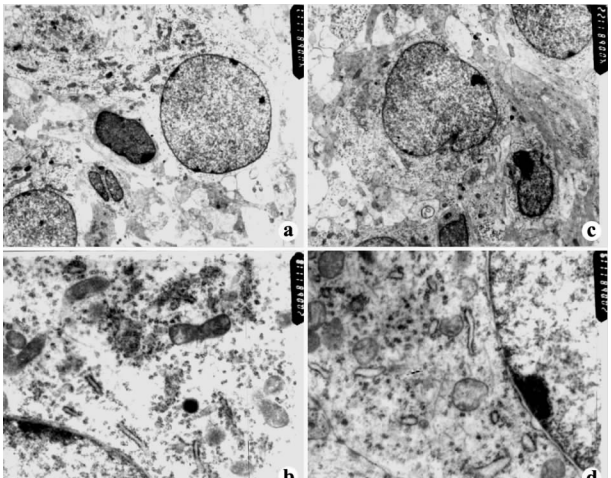


图 1 C 组胎鼠脑组织光镜观察(HE ×400)

2.2 电镜观察胎鼠脑组织

对照组胎鼠脑组织神经元结构清晰,胞核圆形或卵圆形,核膜清晰,常染色质占具胞核的绝大部分(图 2a);线粒体数量较多,椭圆形或杆状,嵴排列整齐,致密。游离核糖体丰富,粗面内质网短小,内质网上核糖体明显(图 2b)。随压力升高,细胞核开始变得不规则,线粒体以及内质网的形态发生改变。C 组中细胞核形态不规则,出现明显切迹,但染色质边集现象不明显,未见染色质凝集,细胞核固缩,破裂等细胞凋亡征象(图 2c);细胞质中,线粒体肿胀呈球形,嵴排列紊乱,但结构仍依稀可见,内质网呈池样扩张,脱颗粒明显(图 2d)。

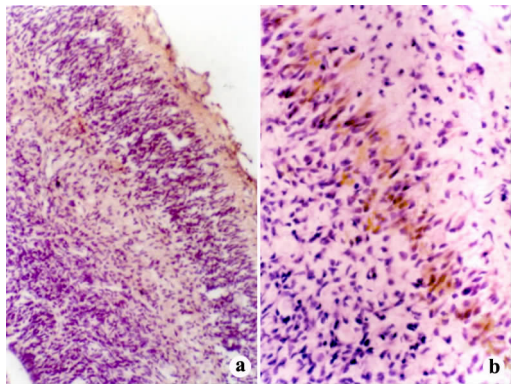


a:对照组(×4 000);b:对照组(×20 000);c:C 组(×4 000);d:C 组(×20 000)

图 2 胎鼠脑组织电镜下超微结构

2.3 胎鼠脑组织 Caspase-3 表达

对照组见大脑皮层以及海马区细胞层次清楚,偶可见到胞浆以及胞核均匀淡黄染色的细胞(图 3a)。随着气腹压力增加,阳性细胞的数量并没有明显增多的趋势,染色的强度的变化也不明显。压力最高 (15 mmHg,2 h)的 C 组,细胞染色的数量仍很少,总体在 25% 以内,组间比较$P>0.05$(表 1),阳性细胞的染色强度以淡黄为主,与对照组的差别不明显(图 3b)。



a:对照组;b:C 组

图 3 胎鼠脑组织 Caspase-3 表达(SABC ×200)

表 1 Caspase-3 在胎鼠脑组织中的表达($n=9$)

组别	−(n)	+(n)	++(n)	+++(n)	阳性率(%)
对照组	9	0	0	0	0
A 组	8	1	0	0	11.1
B 组	7	2	0	0	22.2
C 组	6	3	0	0	33.3

3 讨论

目前对妊娠期腹腔镜手术的研究主要集中于 CO_2 气腹对胎儿的影响。CO_2 气腹能造成母体以及胎儿的呼吸性酸中毒,甚至在母体反应不明显的时候,胎儿的酸中毒就已经发生[4-6]。气腹压力的增高又可能会减少子宫胎盘血流灌注量,可能造成胎儿的缺血缺氧性损害,缺血缺氧以及酸中毒会引起胎儿脑细胞的过度凋亡。Caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键酶,目前认为 Caspase-3 可以作为凋亡的标记物[7-9],它的表达能够反应细胞的凋亡程度。中枢神经系统对各种刺激比较敏感,尤其在发育时期对刺激更敏感,刺激产生的反应涉及到胎儿与胎盘以及母体之间的生理以及生化的相互关系。在 CO_2 气腹以及气腹条件下结扎一侧子宫动脉不会对豚鼠胎儿脑组织产生光镜下可见的病理学损害[10],本实验也发现 CO_2 气腹没有对胎鼠脑组织造成明显的损害,与文献报道一致。

对于电镜下 C 组中细胞核形态不规则,出现明显的切迹,说明至少增加核质间接触面积,影响脑细胞内物质交换。异染色质边集一般被认为是导致细胞死亡不可逆损伤发生后,核内出现的相当早期的变化[11],在本组实验中,没有出现异染色质边集现象,说明一定压力及一定持续时间范围内的 CO_2 气腹没有对胎鼠脑

组织造成不可逆损伤性改变。线粒体形态变化常被用来作为鉴别细胞功能的一项指标。本次实验中,对照组和研究组的线粒体没有明显的形态学变化,但是 C 组中部分线粒体出现了肿胀,嵴紊乱,电子密度降低等变化,没有出现线粒体变性以及破裂、解体现象。比较光镜与电镜结果,一定范围的 CO_2 气腹压及作用时间对胎鼠脑造成了一定程度的损害,但是这种损害是轻微的,没有引起光镜下可见的病理学改变。

本实验中所有组别的 Caspase-3 的表达都很微弱,并且没有随着压力升高而表达升高,说明 CO_2 气腹没有对脑组织及脑细胞造成不可逆的损伤,考虑可能为以下原因:①母体、胎盘、胎儿三者对应激的反应。1995 年有作者发现在 1 h,20 mmHg 的气腹中,胎羊有足够的胎盘血流储存以及代偿机制保证足够的气体交换[12]。大脑皮层缺血以及代谢降低 50% 才会造成永久性的脑损害。高碳酸血症促使毛细血管内皮细胞合成前列腺素 E2 增多从而引起胎脑毛细血管扩张,加之缺氧时胎儿可以通过生理以及机械性的调节提高大脑血流量,降低脑温度以减少脑的代谢,机体缓冲体系的代偿在一定的限度内可以维持细胞内的 pH 值在一个比较恒定的水平,因而即使是胎鼠出现了酸中毒的改变[13-16],由于上述诸多代偿机制的调节,使得 CO_2 气腹对胎鼠脑细胞的内环境改变不大,不会造成脑组织及细胞较大的损伤性改变。②体内各种保护性因子的作用。脑细胞内存在诸多因子,它们可以抵抗各种损伤因子,使细胞免于受损[17-18]。本实验中,Caspase-3 在所有组中表达的强度以及阳性率都很低,推测是一定范围内的气腹压力以及持续时间的应激造成损伤性改变在各种保护性因子的保护范围之内,这些保护性因子从某些方面阻断了 Caspase-3 的激活,避免了细胞凋亡的发生[16-17]。

长时间 CO_2 气腹后大鼠胎盘组织透射电镜下出现早期缺氧的改变已有报道[19]。本研究表明,随 CO_2 气腹压力升高,CO_2 气腹对胎鼠的大脑产生一定的影响,但是这种损害不是很明显,没有引起脑细胞的不可逆性损伤。本研究所选用的压力范围及持续时间限定在一定范围内,是否提高压力或者延长时间可能会对脑组织造成不可逆的损伤有待进一步研究。我们认为,对需要在妊娠期进行手术的孕妇而言,可以采用降低气腹压力或者缩短手术时间来降低对胎儿的影响。

[参考文献]

[1] Augustin G, Majerovic M. Non-obstetrical acute abdomen during pregnancy[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2007, 131(1): 4 – 12.

[2] Jensen D, Webb KA, O'Donnell DE. The increased ventilatory response to exercise in pregnancy reflects alterations in the respiratory control systems ventilatory recruitment threshold for CO_2[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2010, 171(2): 75 – 82.

[3] Li GP, White KL, Aston KI, et al. Colcemid-treatment of heifer oocytes enhances nuclear transfer embryonic development, establishment of pregnancy and development to term[J]. Mol Reprod Dev, 2009, 76(7): 620 – 628.

[4] 蔡东红,张 颖,廖 靖,等. CO_2 气腹对妊娠中晚期大鼠血清胎盘泌乳素含量的影响[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(20): 3151-3152.

[5] 叶占勇,刘合年,李 军,等. CO_2 气腹对兔血流动力学和微循环的影响[J]. 西南国防医药, 2010, 20(7): 711 – 713.

[6] 孙 涛,葛春林. CO_2 气腹对细胞因子的影响[J]. 中华腔镜外科杂志(电子版), 2010, 3(1): 8 – 11.

[7] 陈 旭,黄润瀚,刘海防,等. CO_2 气腹对大鼠子宫内膜异位症病灶 MMP-2 和 TIMP-1 蛋白表达的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2009, 10(3): 214 – 217.

[8] Chang LR, Liu JP, Song YZ, et al. Expression of caspase-8 and caspase-9 in rat hippocampus during postnatal development[J]. Microsc Res Tech, 2011, 74(2): 153 – 158.

[9] Li L, Su Q, Wang Y, et al. Effect of atorvastatin (Lipitor) on myocardial apoptosis and caspase-8 activation following coronary microembolization[J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 61(2): 399 – 406.

[10] GarciOria M, Ali A, Reynolds JD, et al. Histologic evaluation of fetal brains following maternal pneumoperitoneum[J]. Surg Endosc, 2001, 15(11): 1294 – 1298.

[11] 高俊峰,刘今方. 医用组织细胞学电镜图谱[M]. 沈阳:辽宁教育出版社, 1993: 51 – 59.

[12] Barnard JM, Chaffin D, Droste S, et al. Fetal response to carbon dioxide pneumoperitoneum in the pregnant ewe[J]. Obstet Gynecol, 1995, 85(5 Pt 1): 669 – 674.

[13] Fauconnier J, Meli AC, Thireau J, et al. Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(32): 13258 – 13263.

[14] Monnier PP, D'Onofrio PM, Magharious M, et al. Involvement of caspase-6 and caspase-8 in neuronal apoptosis and the regenerative failure of injured retinal ganglion cells[J]. J Neurosci, 2011, 31(29): 10494 – 10505.

[15] Pei ZH, Chen BY, Tie R, et al. Infrasound exposure induces apoptosis of rat cardiac myocytes by regulating the expression of apoptosis-related proteins[J]. Cardiovasc Toxicol, 2011, 11(4): 341 – 346.

[16] 毛德文,陈月桥,王 丽,等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 148 – 150.

[17] 蒋 鹍,康朝胜,余资虹. 孕鼠染铝对仔鼠脑皮质神经元的影响[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(2): 142 – 144.

[18] Terzi M, Aksam S, Marici S, et al. Acute abdomen caused by adnexal torsion in the first trimester of pregnancy: a case report[J]. Srp Arh Celok Lek, 2011, 139(3-4): 239 – 241.

[19] 邹 琳,张 颖,廖 靖,等. 不同作用时间二氧化碳气腹对妊娠中期大鼠胎盘组织的影响[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(7): 504-506.

(编辑:蒋登金)