烫伤对大鼠学习记忆能力与额叶皮质神经元凋亡的影响

徐佳丽,张小林,龙天霖 (贵州省毕节地区医院烧伤整形科,贵州 毕节 551700)

[摘 要] **目的** 观察严重烫伤对大鼠学习记忆能力、抗氧化能力与额叶皮质神经元凋亡的影响。**方法** 随机将 50 只 SD 大鼠,分为正常对照组和烫伤组,烫伤组又分为烫伤后 3 h、6 h、12 h 和 24 h 组。采用 Y-型迷宫检测大鼠学习记忆能力,于行为检测完毕后取额叶皮质行超氧化物歧化酶(SOD)和脑组织含水量检测;然后 TUNEL 免疫组织化学染色,光镜下观察额叶皮质神经元凋亡的形态变化并进行计量分析。**结果** 随着烫伤后时间的延长,大鼠的学习记忆能力逐渐下降($P<0.05$);脑组织 SOD 逐渐下降,而含水量与凋亡神经元逐渐增多($P<0.05$)。**结论** 烫伤可致大鼠行为能力下降,神经元凋亡增多,这些可塑性变化可能是烫伤后的继发性中枢损害。

[关键词] 烫伤;学习和记忆;神经元;凋亡;大鼠

[中图分类号] R644;R338.64 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)06-0606-03

Effects of burns on learning and memorizing ability as well as frontal cortex neuronal apoptosis in rats

XU Jia-li, ZHANG Xiao-lin, LONG Tian-lin (Department of Burns and Plastic Surgery, Bijie Local Hospital of Guizhou Province, Bijie Guizhou 551700, China)

Abstract: Objective To observe the effects of severe burns on learning and memorizing ability, antioxidation ability and neuronal apoptosis in frontal lobe of rats. **Methods** Totally 50 mature Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group and burn injury group. Burn injury group was subdivided into 3, 6, 12 and 24 hours subgroups randomly according to the operation time. The learning and memorizing abilities were detected by Y-maze. The cortex of frontal lobe was obtained to do superoxide dismutase (SOD) detection and cerebral tissue water content measurement. Simultaneously, TUNEL immunopositive neurons of in frontal lobe were observed under light microscopy and quantitative analysis was performed by cell morphometric technique. **Results** The learning and memorizing abilities were significantly decreased as the time of injury prolonged ($P<0.05$). The SOD was decreased while cerebral tissue water content and apoptotic neurons were increased ($P<0.05$). **Conclusion** The burn injury can impair the learning and memorizing ability, increase the apoptotic neurons, which might be the secondary lesion of central nervous system.

Keywords: burns; learning and memorizing; neuron; apoptosis; rat

在烧(烫)伤、感染等应激状态下,机体免疫功能低下,机械屏障作用削弱,从而使大量内毒素侵入血循环,通过直接或间接激活一系列活性介质的作用,导致全身各器官损害,脑是最容易受损的器官之一[1]。烧伤后早期机体发生了一系列病理生理变化,虽未直接伤及大脑,却出现了某种程度的神经、精神异常[2-3]。本研究采用高压蒸汽烫伤制作烧伤动物模型,从行为学、组织病理学等方面对大鼠行为能力、额叶皮质神经元等进行观察,旨在为研究烧伤后的神经行为和生理功能提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组和实验材料

选用 SPF 级 SD 大鼠 50 只,体质量 180 ~ 220 g,随机分为正常对照组与烫伤组,烫伤组又分为烫伤后 3 h、6 h、12 h 与 24 h 组,每组 10 只,雌雄不拘。大鼠由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(黔)2002-0001。超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒与细胞凋亡(TUNEL)试剂盒均购自武汉博士德公司。YLS-5Q 型台式超级控温烫伤仪购自广州飞迪生物科技有限公司;BH-2 型显微镜购自日本 Olympus 公司;LEICA-RM2016 石蜡切片机购自上海莱卡仪器有限公司品;Mias 图像分析软件购自四川大学图形图像研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 烫伤模型构建 单笼喂养 1 周后制成烫伤模型,烫伤前禁食 12 h。参照文献[4]的方法略做改良进行,将烫伤仪温度设置在 105 ℃,待压力锅内压力达到 70 kPa 时,多次启动通气开关,使整个通气管道温度加热到所设定值,管出口处凝结水减少,设定通气时间为 10 s。所有动物烫伤前 1 d 用 10% 硫化钠(Na_2S)脱去背部的毛,制作烫伤模型前腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,将烫伤仪喷射盘置于大鼠背部固定,启动控制器开关,9 s 后喷射口蒸气停止,完成致伤过程。烫伤面积约 30%,烫伤程度Ⅲ度(病理切片证实)。伤后迅速脱离热源,保温。

[作者简介] 徐佳丽(1978 -),女,主治医师,学士,主要从事烧伤整形方面的研究。E-mail:xujiali78@126.com

[收稿日期] 2011-06-10 [修回日期] 2011-07-15

1.2.2 行为学检测 所有实验大鼠采用 Y-型迷宫法检测学习记忆行为能力,并记录 24 h 学习记忆正确的次数。学习成绩以连续 10 次电击有 9 次(9/10)逃避至安全区(无电击的区域)为达标,以每组小鼠达标所需平均电刺激次数表示智力程度,最后计算学习和记忆的正确率。

1.2.3 脑组织 SOD 检测 各组随机取 2 只大鼠,采用脱颈椎法处死取脑,置冷生理盐水中冲净血液后取出,用滤纸吸干水分,低温环境下迅速称重,用移液管量取冷生理盐水,生理盐水的体积总量是组织块重量的 9 倍,在生理盐水中剪碎组织块。倒入匀浆管中进行匀浆,制备 10% 的组织匀浆。将其置于冷冻离心机中,以 3 500 r/min 离心 10 min,提取上清液严格按试剂盒说明行 SOD(比色法)的测定。

1.2.4 脑组织含水量检测 采用干湿法测定脑组织百分含水量,各组随机取 2 只大鼠,麻醉下取出全脑,用滤纸吸干周围水分后分析天平称湿重,置于(100 ± 2)℃的干燥箱内 72 h,待脑组织干燥至恒重后,称其干重。用 Elliot 公式计算脑组织百分含水量:脑组织含水量 = [(湿质量 - 干质量)] ÷ 湿质量 × 100%。

1.2.5 样品制备与观察 各组剩余 6 只大鼠在麻醉下通过左心室及升主动脉插管,右心房放血,37 ℃生理盐水冲洗后,4% 多聚甲醛 PB 液灌注固定,开颅取脑;4% 多聚甲醛 PB 液进一步固定,每只鼠脑经脱水、石蜡包埋,进行连续冠状切片,片厚 6 μm,隔片 4 取 1 片,每只鼠脑切片分成 2 套,分别进行尼氏染色、TUNEUL 免疫组织化学染色光镜观察,并对 5 组大鼠额叶皮质凋亡神经元进行形态计量分析。

1.2.6 TUNEL 免疫组织化学染色 切片常规脱蜡入水,采用新鲜配制的 3% H_2O_2 室温处理 10 min,标本片加 0.01 mol/L 的枸橼酸缓冲液(TBS)新鲜稀释蛋白酶 K 37 ℃消化 5 min。每标本片加标记缓冲液 20 μl,置湿盒中 2 h,每片加封闭液 50 μl,室温下反应 30 min,甩去封闭液;用抗体稀释液 1∶100 稀释生物素化的地高辛抗体,每片 50 μl,湿盒中 37 ℃反应 30 min;用体积比为 1∶100 的抗体稀释液稀释 SABC,混匀后加至切片上,37 ℃反应 30 min;DAB 室温下显色,水洗;脱水、透明、封片,并进行镜检,以细胞核中有棕黄色颗粒为阳性细胞,即凋亡细胞。

1.2.7 图像分析 用 Mias 图像分析软件,对每个鼠脑额叶皮质取相同间隔的 3 张切片,对每张切片额叶皮质各测 5 个视野,在同一放大倍数(物镜 ×40)、同一视场面积、同一背景光强度下,分别对凋亡神经元进行计数。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计处理,数据用均数 ± 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,均值间比较用 LSD 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为变化

烫伤大鼠致伤后烫伤部位创面发白,呈皮革状;6 h 后出现发黑现象,12 h 后局部可见少量脓痂、脓液形成。各时相点烫伤大鼠处死前活动明显减少,主要表现为精神萎靡、自主活动减少、嗜睡、毛发松散、摄食和饮水量减少等。

2.2 学习记忆测定结果

经 Y-型迷宫检测,随着烫伤后时间的延长,大鼠的学习和记忆能力逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组 SD 大鼠的学习记忆能力($\bar{x} \pm s$,%)

组别	学习正确率	记忆正确率
正常对照组	89.41 ± 1.13	90.12 ± 1.35
烫伤后 3 h 组	76.21 ± 1.39*	85.12 ± 1.35*
烫伤后 6 h 组	54.21 ± 1.39*#	60.12 ± 1.35*#
烫伤后 12 h 组	32.21 ± 1.39*#▲	45.12 ± 1.35*#▲
烫伤后 24 h 组	25.98 ± 1.36*#▲△	38.12 ± 1.35*#▲△

*:与正常对照组比较,$P < 0.05$;#:与烫伤后 3 h 组比较,$P < 0.05$;▲:与烫伤后 6 h 组比较,$P < 0.05$;△:与烫伤后 12 h 组比较,$P < 0.05$

2.3 SOD 与脑组织含水量测定结果

比色法与干湿法测得,随着烫伤后时间的延长,大鼠的脑组织 SOD 逐渐下降,而含水量逐渐增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 大鼠凋亡细胞计数、SOD 及脑组织含水量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(μmol/L)	脑组织含水量(%)	凋亡细胞(个)
正常对照组	89.25 ± 1.83	69.12 ± 0.67	9.41 ± 0.57
烫伤后 3 h 组	75.44 ± 1.75*	80.12 ± 0.72*	12.24 ± 0.49*
烫伤后 6 h 组	62.67 ± 1.63*#	82.12 ± 0.39*#	16.35 ± 0.56*#
烫伤后 12 h 组	54.53 ± 1.92*#▲	84.12 ± 0.54*#▲	20.73 ± 0.72*#▲
烫伤后 24 h 组	49.28 ± 1.87*#▲△	87.12 ± 0.62*#▲△	25.96 ± 0.58*#▲△

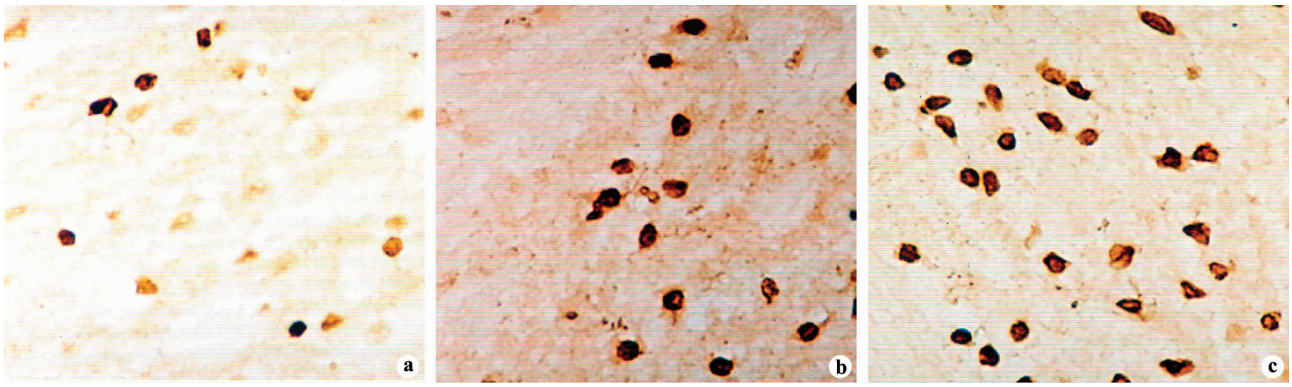
*:与正常对照组比较,$P < 0.05$;#:与烫伤后 3 h 组比较,$P < 0.05$;▲:与烫伤后 6 h 组比较,$P < 0.05$;△:与烫伤后 12 h 组比较,$P < 0.05$

2.4 尼氏染色结果

正常对照组大鼠额叶皮质神经元排列整齐、规则,神经元结构完整。神经元胞体体积较大,成椭圆形或锥体形,胞浆丰富,胞质呈蓝色,尼氏体粗大、染色深,均匀分布于核周,胞核居中,着色淡,核仁明显。烫伤组皮质神经元排列紊乱,不规则。神经元肿胀,胞浆淡染,体积增大。6 h 组神经元胞体开始缩小,呈三角形,可见核固缩、核溶解。尼氏体溶解、消失,以 12 h 组最严重。

2.5 TUNEL 免疫组织化学染色结果

正常对照组大鼠额叶皮质见少量凋亡神经元,即细胞呈圆形或椭圆形,胞核较周围正常神经元明显缩小,胞核固缩呈棕黄色,不规则形或圆形,部分胞核裂解呈深棕色(图 1a)。在烫伤组可见大量 TUNEL 染色阳性神经元(图 1b、c)。TUNEL 阳性神经元计数见表 2。随着烫伤后时间的延长,凋亡神经元逐渐增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



a:正常对照组;b:烫伤 6 h 组;c:烫伤 24 h 组

图 1 凋亡神经元 TUNE 免疫组织化学染色(×400)

3 讨论

临床流行病学资料显示严重烫伤多器官功能不全综合征(mutiple organ dysfunction syndrome, MODS)患者病死率为 70%[4],MODS 已成为烫伤后最严重、最主要的死因。研究发现,当人或动物处于强烈的急性应激或长期慢性应激的状态时,其学习和记忆能力会受到明显的影响[5]。在中枢神经系统中,海马是与学习、记忆和情绪行为功能密切相关的重要脑区,也是应激易累及损伤的主要靶区。从 Y 迷宫实验可以看出,烫伤刺激对学习能力的影响主要是降低学习记忆能力,烧伤组大鼠空间学习能力明显低于正常对照组大鼠。提示可能与烧伤造成大鼠脊柱弓形,影响了烫伤大鼠的活动能力有关。

烫伤早期脏器损害的发生机制有:①缺血再灌注损伤引起的组织细胞坏死。以往认为在这种情况下细胞以坏死为主,但最近研究显示,凋亡亦参与这一过程,而且占相当大的比例[2]。本实验观察到,烫伤后伴随大量的细胞凋亡。烫伤后微血管通透性增加,体液外渗,有效循环血量降低,导致微循环灌注不足,组织器官及细胞发生缺血、缺氧、能量代谢障碍,成为可能引起细胞凋亡的因素之一。烫伤后细胞凋亡很可能是由严重烫伤引起细胞的神经体液微环境的紊乱所诱导的。这种紊乱包括烧、创伤后糖皮质激素水平的急剧升高,内毒素血症或败血症、氧化应激产物的大量产生、各种细胞因子的大量释放,以及由此引起的细胞内离子的变化、各种酶活性的改变。②血管内皮细胞损伤致脑水肿。严重烫伤后脑水肿是烫伤后主要内脏并发症之一。本实验结果证实烫伤后脑组织水肿随着时间延长而加重。烫伤后脑水肿发生的病因复杂,目前认为严重烫伤后由于体液的大量丢失导致全身有效循环血量锐减。为保证重要脏器的血液供应,机体进行血液重新分配,血脑屏障因缺血缺氧而破坏,通透性增加,导致脑水肿的发生。③过度炎症反应,自由基的产生。细胞内产生的氧自由基通过不同途径诱导细胞发生凋亡[6]:直接损伤 DNA,诱导细胞凋亡;攻击蛋白质,导致许多蛋白质尤其具有酶活性蛋白质功能的丧失;影响核基因转录,改变细胞的表型特征,诱导细胞发生凋亡;作用于细胞膜,诱发脂质过氧化,从而影响信号传递系统,激发有关调控基因,导致细胞凋亡[7]。

本实验结果表明,在远离大脑致伤,非颅脑直接损伤特定条件下,中枢神经系统确有不同范围、不同程度的应激受损,不同的应激强度对中枢神经系统产生不同的影响,导致不同的应变效应。这可能与大鼠遭受严重的大面积烫伤的强烈刺激后,机体及脑缺氧、内毒素、酸中毒、多器官功能衰竭及全身炎症反应等多种因素有关。

[参考文献]

[1] Iskit AB, Guc O. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(10): 953 – 957.

[2] 林雪群,戴育成,祝高春,等. 烫伤大鼠脑底动脉血管内皮素-1 mRNA 的表达及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(18): 2220 – 2224

[3] Barone CM, Jimenez DF, Huxley VH, et al. In vivo visualization of cerebral microcirculation in systemic thermal injury[J]. J Burn Care Rehabil, 2000, 21(1 Pt 1): 20 – 25.

[4] 叶建勋,叶伟洪,蔡立民,等. 创面灵治疗烧烫伤的药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 7(1): 38 – 39.

[5] Amoyal NR, Mason ST, Gould NF, et al. Measuring coping behavior in patients with major burn injuries: a psychometric evaluation of the BCOPE [J]. J Burn Care Res, 2011, 32(3): 392 – 398.

[6] Koizumi T, Goto H, Tanaka H, et al. Lecithinized superoxide dismutase suppresses free radical substrates during the early phase of burn care in rats[J]. J Burn Care Res, 2009, 30(2): 321 – 328.

[7] 文 灿,朱星红. 大鼠大脑中动脉超微结构的衰老性变化[J]. 局解手术学杂志, 2003, 12(4): 268 – 269.

(编辑:余汇洋)