基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1521-03

大鼠脑外伤后 BDNF 的表达及其死后稳定性的研究

王 敏,邓世雄
(重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨脑外伤后脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophical factor,BDNF)表达的变化和损伤时间的关系及其死后稳定性。方法:将健康 SD 大鼠 105 只,随机分成 4 组:正常组、假手术组、脑外伤组、死后稳定性组。采用重物砸伤脑组织建立脑外伤模型(创伤组、稳定性组),运用免疫组化和图像分析技术,检测各组 BDNF 的表达变化规律。结果:与正常组、假手术组比较,损伤后 0.5 h,BDNF 的免疫反应阳性细胞在损伤区周围增多,损伤后 6 h BDNF 阳性细胞数达高峰,以后逐渐下降,24 h 后降至接近正常;死后稳定性组各时间点 BDNF 表达无显著性差异($P>0.05$)。结论:脑外伤后 BDNF 表达与损伤时间具有相关性;在 -20℃条件下,死后稳定性好。

【关键词】法医病理学;免疫组织化学;脑外伤;脑源性神经营养因子;死后稳定性
【中国图书分类法分类号】R892 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-22

Study on expression and postmortem stability of BDNF after traumatic brain injury in rat

WANG Min ,et al
(*Department of Forensic Medicine , College of Basic Medicine , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of BDNF after traumatic brain injury and postmortem stability *Methods*: 105 healthy SD rats were randomly divided into 4 groups: normal group, sham operation group, traumatic brain injury group and postmortem stability group. The model of brain injury were established by weight-drop impact (traumatic brain injury group and postmortem stability group). After that, the regulation of BDNF expression in each group was detected by immunohistochemistry technique, and evaluated with image analysis technique and statistic system. *Results*: 0.5 hour after impact, the BDNF positive neurons increased in each traumatic brain injury group compared with normal group and sham group. 6 hour after injury, The BDNF positive neurons reached the peak number. Then, the BDNF positive cells reduced to normal after 24 hours. but there was no significant difference in BDNF expression among each subgroups of postmortem stability group($P>0.05$). *Conclusion*: There is dependability between the BDNF expression after traumatic brain injury and brain injury time, and postmortem stability is nice at -20℃.

【Key words】Forensic pathology; Immunohistochemistry; Brain injury; Brain derived neurotrophical factor(BDNF); Postmortem stability

脑损伤在交通事故和其它机械性损伤最为常见,如何利用比较客观的方法和标准推断损伤时间一直是法医学的一大难题,脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophical factor,BDNF)是神经营养因子中的一种,在正常的脑组织中微量表达,在脑损伤时表达增强,不仅具有神经元保护作用,还可以促进神经细胞的分化和再生,对大脑损伤后脑功能的恢复起重要作用,目前国内外对 BDNF 的研究多侧重于其对神经损伤的治疗作用,对于内源性 BDNF 在脑损伤的不同时间的表达的强弱及死后稳定性的研究甚少。本文拟运用免疫组化技术对外伤性脑损伤后,BDNF 的表达及其死后稳定性作一研究,以探讨其在法医学上的意义。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康 SD 大鼠 105 只,体重(240 ± 30)g,雌雄不限(由重庆医科大学实验动物中心提供),随机分为正常组(5 只)、假手术组(5 只)、脑外伤组(50 只)、死后稳定性组(45 只)。其中脑外伤组分为 10 个亚组,即伤后 0、0.5、1、2、4、6、8、12、

作者介绍:王 敏(1972-),男,硕士,
研究方向:法医病理学。
通讯作者:邓世雄,男,教授,E-mail:dengshixiong1963@163.com。

24、48 h 组；死后稳定性组分为 9 个亚组，即死后 6、12 h、1、2、3、4、5、6、7 d 组；每个亚组均 5 只大鼠。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗鼠 BDNF 抗体、SABC 试剂盒和 DAB 显色剂（武汉博士德生物工程有限公司）；牙科钻（佛山市中熙医疗器材有限公司）；BX-41 显微镜图像采集系统（日本 Olympus 公司）；GD-8 型病理影像多媒体操作系统（成都金盘电子科大多媒体技术）。Quantiment 570C 型图像分析系统。

1.3 模型建立与取材

参照吴旭，王宝捷等[1]建立大鼠脑损伤模型，实验前 12 h 大鼠禁食，自由饮水，实验当日用戊巴比妥钠（30 mg/kg）腹腔注射麻醉。脑外伤组大鼠麻醉后俯卧位固定于脑立体定向仪上，消毒皮肤，头皮正中切开，切口长 2 cm，剥离骨膜，暴露前囟和左顶骨，用牙科钻在冠状缝后 2 mm，矢状缝左侧 2 mm 处钻一直径 5 mm 圆形骨窗，保持硬膜完整。将撞杆置于硬膜上，用 10 g 砝码从 20 cm 高处沿外周导管坠落，撞击撞杆从而撞击硬膜，致左顶叶发生脑挫裂伤。打击后切口内滴注 4 万单位硫酸庆大霉素 4、5 滴，骨蜡封闭骨窗，缝合头皮，按实验分组要求分别于伤后即刻（0）、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48 h 取脑。死后稳定性组大鼠模型建立同脑外伤组，在伤后 6 h 处死大鼠，置于 -20℃冰箱，按实验分组要求分别在死后 6、12 h、1、2、3、4、5、6、7 d 取脑。假手术组仅开颅窗后用骨蜡封闭，不施加打击。正常对照组不作任何处理直接处死取材。

1.4 标本处理

所有脑组织均用 4%多聚甲醛固定 24 h 后，石蜡包埋，取损伤周围脑组织连续切片，切片厚 3 μm，分别做 HE 染色和 BDNF 免疫组化染色，免疫组织化学染色依照 SABC 试剂盒说明书操作，PBS 代替一抗作阴性对照

1.5 图像分析及统计学处理

显微镜下观察免疫反应阳性细胞在损伤周围部位神经元的分布，BDNF 蛋白免疫阳性反应物质呈棕黄色，胞质着色，胞核无染色。应用 Quantiment 570C 型图像分析系统分析 BDNF 阳性反应灰度。每张切片在相同结构部位随机选取 5 个 200 倍镜下视野进行计数阳性细胞数，取平均值。阳性反应强度用灰度值（gray level）表示，从最大（1）到最小（256）共分为 256 个灰度阶，灰度值越大表示阳性反应越弱（Tab 1）。资料以均数 ± 标准差表示，采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析，多组间比较采用方差分析，两组间的比较采用 LSD 法。同一时间点的实验组与对照组比较采用配对 t 检验；以 $P<0.01$ 表示差异存在显著性。

2 结 果

2.1 光镜下脑组织 HE 染色显示

正常组和假手术组脑组织结构清楚，未见明显改变；损伤组大鼠的损伤区皮质见局限性的楔形挫裂伤区，伴出血灶形成，损伤深达皮质的多形细胞层。挫裂伤区表面的蛛网膜下腔可见出血；部分细胞体积变小，胞浆和胞核固缩，嗜碱性增强；部分神经元及胶质细胞出现肿胀坏死、尼氏小体溶解，胞浆呈伊红色颗粒状，细胞边界模糊不清，灰质中可见囊腔变化，白质中有脱髓鞘变化。死后稳定性组改变同损伤组。

2.2 免疫组织化学染色

BDNF 免疫组织化学染色切片中，阳性表达信号为棕黄色。正常组、假手术组呈弱阳性表达，外伤性脑损伤组伤后 0.5 h 后出现阳性表达，此后表达逐渐增强，至 6 h 呈强阳性表达。24 h 后基本降至正常，48 h 组与 24 h 组 BDNF 表达变化不大。死后稳定性各亚组表达情况与伤后 6 h 组相似。

2.3 免疫组织化学染色图像分析与统计学处理

见图 1~4 和表 1、2。

3 讨 论

BDNF 作为神经营养素中的一员，是由德国神经化学家 Barde 及其同事于 1982 年首次从猪脑中分离纯化出具有促进神经生长活性的一种蛋白质，能通过增强神经细胞的增殖、分化和移行来对抗脑损伤。Griesbach GS 等[2]在对大鼠冲击性脑损伤模型研究中发现，大脑海马回的 BDNF 的表达量与损伤程度和损伤时间具有相关性。由此可见，外伤性脑损伤后，可以引起 BDNF 表达的上调。

在暴力性伤害死亡案件中，脑外伤发生后个体的存活时间推断，对于确定案发时间、鉴别生前伤和死后伤，划定犯罪嫌疑人、以及临床法医活体鉴定等均具有重要意义。BDNF 主要在人体中枢神经系统中稳定表达，而且在损伤发生的早期，其表达就开始升高。本研究表明，大鼠脑损伤后不同时间段 BDNF 阳性细胞的表达呈时相性变化，外伤性脑损伤后 0.5 h，即有 BDNF 阳性细胞表达增加，这与



图 1 脑外伤 0 h 损伤周围 BDNF 表达（SABC，×400）



图 2 脑外伤 0.5 h 损伤周围 BDNF 表达（SABC，×400）

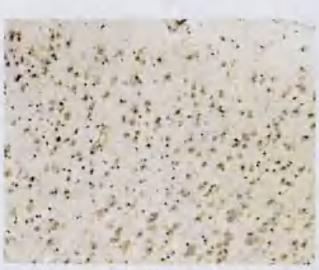


图 3 脑外伤 6 h 损伤周围 BDNF 表达（SABC，×400）



图 4 死后 7 d BDNF 表达（SABC，×400）

表 1 BDNF 在脑损伤不同时间阳性细胞表达数及灰度值

组别	阳性细胞数	灰度值
对照组	7.22 ± 0.19	136.98 ± 0.18
伤后 0.5 h	21.00 ± 0.84	114.18 ± 0.61
伤后 1 h	30.28 ± 0.62	92.26 ± 0.53
伤后 2 h	45.40 ± 0.89	64.54 ± 0.48
伤后 4 h	50.78 ± 0.67	51.08 ± 0.58
伤后 6 h	56.90 ± 0.60	44.52 ± 0.44
伤后 8 h	41.08 ± 1.06	74.78 ± 0.86
伤后 12 h	22.00 ± 0.98	114.49 ± 0.87
伤后 24 h	11.02 ± 17.64	125.36 ± 0.69
伤后 48 h	7.40 ± 17.64	135.51 ± 0.90

注:各时间相临 2 组之间阳性细胞数和阳性反应灰度相比均有显著差异($P<0.01$),其中伤后 6 h 组 BDNF 阳性细胞数与其它各时间组相比均有显著差异

表 2 伤后 6 h 处死测定死后稳定性各时间段的数据

组别	阳性细胞数	灰度值
0 h	54.91 ± 0.42	44.13 ± 0.75
6 h	54.96 ± 0.43	44.12 ± 0.70
12 h	54.82 ± 0.51	44.35 ± 0.60
1 d	55.04 ± 0.56	44.12 ± 0.81
2 d	54.86 ± 0.73	44.79 ± 1.07
3 d	54.98 ± 0.39	44.59 ± 0.44
4 d	54.93 ± 0.44	44.23 ± 0.65
5 d	54.79 ± 0.59	44.65 ± 0.50
6 d	54.93 ± 0.40	44.55 ± 0.95
7 d	55.02 ± 0.59	44.32 ± 0.94

注:伤后 6 h 处死后不同时间段 BDNF 相临两组之间阳性细胞数,阳性反应灰度值和对照组(0 h)相比均无显著性差异(各组 $P>0.05$)

扬江河[3]等的研究相符,在伤后 4 h,BDNF 阳性细胞数进一步增多,6 h 达到高峰,24 h 后基本降至正常,24 h 与 48 h 变化不明显。这可能与损伤周围神经细胞缺血缺氧引起 BDNF 表达上调以阻断神经元凋亡有关[4,5]。

参照 GA/T148-1996 标准,冻存尸体时间最长不得超过 1 周[6],本实验将外伤性脑损伤 6 h 后死亡大鼠存放于-20℃环境 1 周,以对 BDNF 的死后稳定性进行研究。结果显示,死后 6 h 至 7 d,各时间组 BDNF 表达强度与死后即刻比较无显著性差异($P>0.05$),各组间比较也无显著性差异($P>0.05$)。这表明,在-20℃条件下,1 周内 BDNF 表达强度受时间因素的影响不大,稳定性好。这可能与低温环境下,各种酶活性处于很低水平,组织自溶和蛋白质降解受到抑制有关。

综上所述,通过本研究可得出:外伤性脑损伤后 BDNF 可迅速增量表达,与时间相关,呈一定的规律性,且 BDNF 的表达具有较强的死后稳定性,可作为 2 h 以内的颅脑损伤时间推断的一个参考指标。

参 考 文 献

[1] 吴 旭,王宝捷,张国华,等.大鼠脑损伤分级自由落体打击模型的建立[J].中国法医学杂志,2005,20(1):1-3.

[2] Griesbach G S, Hovda D A, Molteni R, et al. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function[J]. Neuroscience, 2004, 125(1): 129-139.

[3] 杨江河,章 翔,宋少军,等.犬颅脑损伤后脑组织 BDNF 蛋白的表达及意义[J].第四军医大学学报,2003,24(22):2063-2065.

[4] Tokuoka H, Saito T, Yorifuji H, et al. Brain derived neurotrophic factor induced phosphorylation of neurofilament H subunit in primary cultures of embryo rat cortical neurons[J]. J Cell Sci, 2000, 113(6): 1059-1068.

[5] Mamounas L A, Altar C A, Blue M E, et al. BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain[J]. J NeuroL Sci, 2000, 20(2): 771-782.

[6] GA/T148-1996, 法医病理学检材的提取、固定、包装、送检方法[S].

(责任编辑:冉明会)