DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.018
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1175-03

论著

大鼠实验性脑出血后细胞凋亡和神经损伤的关系

张艳玲[1],陈康宁[1],邵淑琴[1],王 英[2] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科,[2]基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究脑出血后血肿周围水肿带细胞凋亡随出血时相点的变化规律,以及脑出血后神经细胞凋亡和神经功能的关系。方法 健康雄性Wistar大鼠体质量200~250 g,随机分组,脑内尾状核注射分别Ⅳ型胶原酶/肝素生理盐水溶液、单纯生理盐水,分为术后6、12、24 h、3、7 d共5个时相点。术后在相应时相点评价大鼠神经功能缺损后,制作冰冻切片,对切片进行HE染色和TUNEL染色,之后利用图像分析仪,观察阳性细胞数。结果 脑出血后动物出现不同程度神经功能缺损,在3 d神经功能损害最严重。出血6 h后血肿周围出现TUNEL阳性细胞,3 d左右TUNEL阳性细胞范围最广。结论 脑出血后细胞凋亡与神经功能损害程度一致,细胞凋亡在脑出血后神经功能损伤中起重要作用。

关键词:脑出血;细胞凋亡;神经损伤;大鼠;胶原酶
中图法分类号:R329.28;R743.34 文献标识码:A

Relationship between apoptosis and neurological impairment in experimental cerebral hemorrhage in rats

ZHANG Yan-ling[1], CHEN Kang-ning[1], SHAO Shu-qin[1], WANG Ying[2] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Department of Pathogenic Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the changes of apoptosis at different time points around the hematoma after cerebral hemorrhage and the relationship between apoptosis and injury of nerve. **Methods** Healthy male Wistar rats weighing from 200 to 250g were randomly divided into different groups. Collagenase/heparin in saline solution or pure saline solution was injected into the caudate nucleus. Neurological impairment was evaluated at 6, 12, and 24 h, and 3 and 7 d after the injection, respectively. HE and TUNEL stainings were employed for the frozen sections. The positive cells were observed by the image analysis. **Results** Neurological impairment occurred in each rat after cerebral hemorrhage, and the most severe neurological impairment was found at 3 d after injection. TUNEL positive cells were found at 6 h after injection first, widespread at 3 d after injection. **Conclusion** The degree of the neurologic impairment is the same as that of the apoptosis. Apoptosis may play an important role in neurological impairment after cerebral hemorrhage.

Key words: cerebral hemorrhage; apoptosis; neurological impairment; rat; collagenase

脑出血是神经系统的常见疾病,是影响人类生存及生活质量的最严重的疾病之一。脑出血具有发病率高、病残率高、病死率高的特点。脑出血最重要的病理生理改变为血肿本身的变化及血肿周围的继发性损伤(血肿周围的神经元损伤及脑水肿)。血肿本身的变化主要是血肿的扩大,其机制[1,2]已比较清楚。但针对血肿扩大治疗方法的疗效甚微[3]。因而人们开始把重点转向了对血肿周围神经细胞损伤的研究[4~6]。令人遗憾的是我们对脑出血引起的神经元损伤的机制知之尚少,对脑出血的治疗仍停留在仅仅以应用甘露醇为代表的脱水剂的基础上。为此,近几年来各国都开始重视脑出血血肿周围神经元损伤的研究,以期揭开脑出血后血肿周围神经细胞损伤机制的面纱,为改善脑出血患者的预后,提高患者的生活质量奠定理论基础。有研究已经证实脑出血后存在细胞凋亡现象,细胞凋亡与脑出血后神经损伤有什么关系?为此,本研究通过大鼠脑出血模型,在出血后不同时间观察神经功能和细胞凋亡的变化趋势,研究脑出血后细胞凋亡和神经损害的关系。

1 材料和方法

1.1 动物分组

健康雄性Wistar大鼠,60只,由大坪医院实验动物中心提供,体质量200~250 g,随机分段分为生理盐水对照组、Ⅳ型胶原酶/肝素钠组,功能检查及形态学观察后2组分别分为术后6、12、24 h、3、7 d共5个时相点,每组每时相点动物6只。

1.2 动物模型制作

用Ⅳ型胶原酶建立脑出血模型,参照文献[7,8]报道,大鼠

作者简介:张艳玲(1974-),女,河北省石家庄市人,硕士,主治医师,主要从事脑血管病方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752905
通信作者:陈康宁,E-mail:dkn640827@163.com
收稿日期:2003-06-09;修回日期:2003-09-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

术前 12 h禁食, 4 h 禁水, 0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg/kg), 必要时乙醚补充麻醉, 保证手术操作期间大鼠有自主呼吸, 俯卧固定于江湾型动物头颅立体定位仪上, 头皮丁字形切开, 取前囟为原点, 向右 3 mm, 向后 1 mm, 深度 5 mm 为注射点(尾状核), 骨钻钻开颅骨, 进针后缓慢注射Ⅳ型胶原酶/肝素/生理盐水溶液(每 1 μl 含Ⅳ型胶原酶 0.2 U 及肝素 2 U), 留针 2 min, 缓慢退针, 骨蜡封闭颅骨钻孔, 缝合皮肤。术中大鼠肛温保持在 36.5~37.5 ℃, 手术后动物被送至通风和有空调的动物房饲养。对照组(control)仅注射同样体积的生理盐水。

1.3 病理切片制作

术后在相应时相点用过量乙醚麻醉动物, 迅速开胸暴露心脏, 从左心室插管至主动脉根部, 在右心耳剪开一小口做出口。4 ℃生理盐水 100 ml 快速灌注, 之后稍减慢灌注速度冲洗至流出液清亮, 换 4% 多聚甲醛 100 ml 快速灌注, 之后稍减慢灌注速度继续固定, 灌注约 30 min 至动物四肢变硬。断头取脑, 以注射针道为中心做冠状切片, 厚度约 5 mm。部分标本按常规程序制成厚度 5 μm 的石蜡切片, 部分标本在恒冷冰冻切片机下制成厚度 30 μm 的冰冻切片。

1.4 大鼠神经功能缺损评价

参照 Longa 5 级评分法[9], 对神经功能评分: 0 级: 无体征, 记 0 分。1 级: 动物不能完全伸直其前肢, 记 1 分。2 级: 动物一侧肢体瘫痪, 有追尾现象, 记 2 分。3 级: 动物不能站立或打滚, 记 3 分。4 级: 无自发性活动, 有意识障碍记 4 分。

1.5 染色

HE 染色按常规步骤完成。脱氧核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynedeotidyl transferase mediated d-UTP nick end labeling, TUNEL)染色按 Roche 公司试剂盒的步骤完成。

1.6 图像分析

光学显微镜下, DAB 染色阳性细胞呈棕黄色或褐色, 利用 Tiger 920 图像分析仪, 随机观察阳性细胞数。每只大鼠在血肿周围随机选择 1 张冰冻切片, 在图像分析仪放大 200 倍的情况下, 随机选择 3 个视野, 对图像分析的计数结果进行统计学处理。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行重复测量方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 脑出血大鼠的神经功能评分

麻醉苏醒后, 脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)组动物均出现不同程度神经功能缺损。6 h 左右将大鼠尾提起, 左侧前肢略回收屈曲于腹下, Longa 评分 1 级之后神经功能缺损逐渐加重, 3 d 左右神经功能缺损最严重, Longa 评分 2~3 级, 7 d 左右神经功能基本恢复。生理盐水对照组无神经功能缺损表现, Longa 评分 0~1 级。

2.2 HE 染色病理形态观察

在大鼠右侧尾状核注射 2.0 μl Ⅳ型胶原酶/肝素/生理盐水溶液后 6 h, 沿注射针道出现明显渗血现象, 针尖注药部位无明显血肿形成, 针道周围脑组织结构紊乱, 神经细胞无明显水肿表现。12 h 时针道周围渗血基本消失, 针尖注药部位血肿逐渐扩大。到 24 h 血肿大小达高峰, 血肿直径在 3 mm 左右(图 1)。24 h 后血肿逐渐吸收, 7 d 左右血肿吸收基本完全。紧邻血肿周围有较局限的水肿带, 脑组织结构紊乱、淡染, 纤维样结构不连续、断裂及空泡化, 血肿区及血肿周围见较多中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润, 血肿周边神经细胞轻度肿胀, 胞浆染色淡, 部分细胞核染色质浓缩。水肿表现在 24 h~3 d 达高峰, 3~7 d 减轻, 7 d 水肿表现不明显。

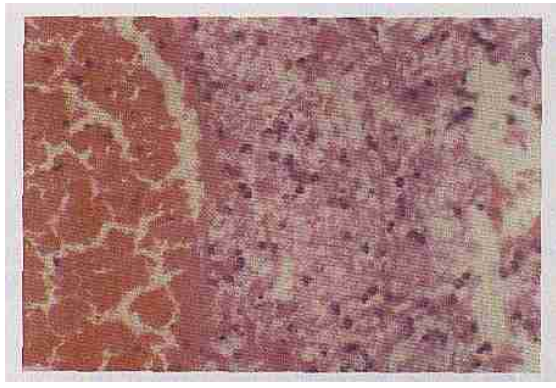


图 1 胶原酶注射后 **24 h** 光镜下血肿(左侧) 示血肿周围水肿, 神经细胞减少 (HE× 400)

Fig 1 Hematoma at 24 h after injection of collagenase: edema around the hematoma and decreased nerve cells (HE× 400)

在对照组大鼠右侧尾状核注射 2.0 μl 生理盐水后 6 h, 沿注射针道出现轻微渗血现象, 12 h 时针道周围渗血基本消失。针尖注药部位无明显血肿形成, 机械性损伤针道周围脑组织结构紊乱, 神经细胞无明显水肿表现。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡的结果

正常脑组织及生理盐水对照组中各视野偶见 TUNEL 阳性细胞。

在大鼠右侧尾状核注射 2.0 μl Ⅳ型胶原酶/肝素/生理盐水溶液后: 6~12 h 组, 针道周围有渗血及组织结构破坏, 针道周边有 TUNEL 阳性细胞; 24 h~3 d 组, 针道周边、血肿周围有 TUNEL 阳性细胞(图 2); 出血侧及出血对侧的扣带皮质和额皮质区见 TUNEL 阳性细胞, 且 3 d 左右出现 TUNEL 阳性细胞的范围较 24 h 组增宽(图 3); 7 d 组, 血肿周围及同侧较局限范围的皮层, 可见到 TUNEL 阳性细胞。



图 2 胶原酶注射后 **24 h**, 血肿旁见较多阳性细胞表达, 胞核呈棕褐色 (TUNEL× 100)

Fig 2 More TUNEL positive cells around the hematoma with brown-stained nuclei at 24 h after injection of collagenase (TUNEL× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

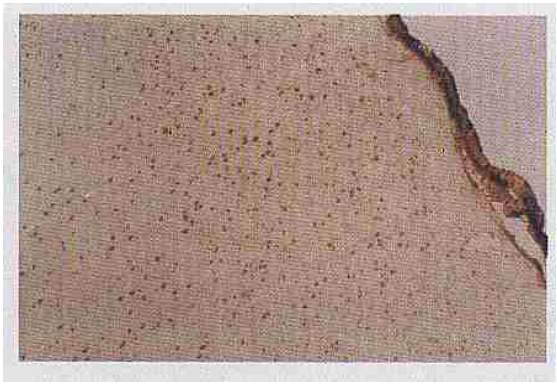


图 3　胶原酶注射后 3 d, 皮层远隔区见大量阳性细胞表达, 胞核呈棕褐色　(TUNEL× 100)

Fig 3　Lots of TUNEL positive cells in the cortex with brown-stained nuclei at 3 d after injection of collagenase　(TUNEL× 100)

对上述阳性细胞数进行图像分析, 并统计分析, 提示脑出血组较对照组 TUNEL 阳性细胞数有明显差异(F= 2 336. 469, P= 0. 000), 且脑出血组在出血开始 6 h 后 TUNEL 阳性细胞逐渐增多, 3 d 左右最多, 范围最广, 7 d 左右 TUNEL 阳性细胞逐渐减少。

3　讨论

脑出血通过以甘露醇为代表的脱水剂治疗, 不能取得满意的疗效; 近年来血肿的微创穿刺术为脑出血的治疗提供了一种治疗手段, Lopez 等[3] 在脑内植入可充胀的微气囊, 模拟脑出血的占位效应和手术清除血肿的过程, 说明微创血肿抽吸术仅改善了脑出血后的颅内高压, 一定程度上避免了脑疝的发生, 对于脑出血的神经功能损伤无明显改善。从而说明脑出血后血肿周围的继发性损伤是影响脑出血预后的重要因素。

在血肿周围继发性损伤的机制中, 本研究观察到血肿周围存在细胞凋亡, 血肿同侧及对侧远隔区皮质同样存在细胞凋亡, 且在出血后 3 d 凋亡的范围最大、程度最重。这与以往的研究结果[10] 接近, 说明细胞凋亡参与了神经损伤的过程。

导致脑出血后细胞凋亡的原因[11] 有多种: 血肿周围, 在出血部位血管活性物质、血液成分、血肿的压迫等综合作用下, 造成微循环受压以及机械性崩解、脑血流量下降及难以恢复、缺血性损害及凋亡的产生。研究显示脑出血 10 min 后脑血流量下降, 3 d 后脑血流量基本恢复正常, 但脑的缺血性结构损害仍持续存在, 表明和自由基连锁反应、超氧化物酶减少及离子转运功能损害有关。研究证实化学因子, 包括凝血酶、血肿周围的强烈白细胞反应、钙超载和兴奋性氨基酸等均参与了脑出血后的缺血性损害[12]。

血肿远隔区出现细胞凋亡的原因[13] 有: 血肿在同侧皮层的脑血流量下降, 考虑是脑出血水肿带的延伸; 对侧相应部位的脑血流量下降称为"镜像"远隔功能障碍; 对侧小脑的脑血流量下降称为"交叉性"远隔功能障碍。这种温和的缺血易导致细胞凋亡。

本研究显示: 脑出血后的细胞凋亡现象与神经损伤的变化趋势一致。提示细胞凋亡是影响脑出血后神经损伤的重要因素。而细胞凋亡的发生途径尚需进一步研究, 阻断细胞凋亡有望成为改善脑出血预后的有效治疗措施。

参考文献:

[1] Chambers I R, Banister K, Mendelow A D. Intracranial pressure within a developing intracerebral haemorrhage[J]. Br J Neurosurg, 2001, 15(2): 140—141.

[2] Xi G, Keep R F, Hoff J T. Pathophysiology of brain edema formation[J]. Neurosurg Clin N Am, 2002, 13(3): 371—383.

[3] Lopæ V E, Hernandez L A, Calandre L, *et al*. Time window for clinical effectiveness of mass evacuation in a rat balloon model mimicking an intraparenchymatous hematoma[J]. J Neurol Sci, 2000, 174(1): 40—46.

[4] Del Bigio M R, Yan H J, Xue M. Intracerebral infusion of a second-generation ciliary neurotrophic factor reduces neuronal loss in rat striatum following experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Neurol Sci, 2001, 15, 192(1-2): 53—59.

[5] Fotheringham A P, Davies C A, Davies I. Oedema and glial cell involvement in the aged mouse brain after permanent focal ischaemia[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2000, 26(5): 412—423.

[6] Xi G, Hua Y, Keep R F, *et al*. Systemic complement depletion diminishes perihematomal brain edema in rats[J]. Stroke, 2001, 32(1): 162—167.

[7] Del Bigio M R, Yan H J, Buist R, *et al*. Experimental intracerebral hemorrhage in rats magnetic resonance imaging and histopathological correlates [J]. Stroke, 1996, 27(12): 2312—2319.

[8] Peeling J, Yan H J, Chen S G, *et al*. Protective effects of free radical inhibitors in intracerebral hemorrhage in rat[J]. Brain Res, 1998, 795(1 2): 63—70.

[9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.

[10] Xue M, Del Bigio M R. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death[J]. Neurosci Lett, 2000, 283(3): 230—232.

[11] 周中和, 王景周. 出血性脑损伤细胞凋亡机制研究进展[J]. 国外医学神经病学、神经外科学分册, 2001, 28(4): 250—252.

[12] Egashira T, Goto H, Takeda H, *et al*. Alterations in neurotransmitter, amino acid and free radical related substances in cerebrospinal fluid in patients with cerebrovascular diseases[J]. Nippon Ronen Igakkai Zasshi, 1999, 36(4): 256—261.

[13] 郭富强. 实验性脑出血的缺血性损害及其防治的研究进展[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 1998, 6(4): 231—234.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net