DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.022
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)02-0139-03

论著

大鼠实验性尾状核区血肿周围组织线粒体膜流动性及超微结构变化的研究

李 玮,王景周,周中和 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究颅内血肿后脑组织线粒体功能及结构的变化。方法 以50 μl鼠尾血注入大鼠尾状核制作大鼠颅内血肿模型,注血后分别于12 h、1、3、7 d处死大鼠,断头取血肿周围脑组织,测定以上不同时相点血肿周围组织线粒体膜流动性,并在电镜下观察线粒体结构变化。结果 颅内血肿早期(12 h)线粒体膜流动性并无明显减退。出血后1 d线粒体膜流动性较对照组下降($P<0.05$);电镜下观察线粒体结构有一定变化。出血3 d及7 d后线粒体膜流动性较对照组明显下降($P<0.01$);线粒体结构明显紊乱。结论 颅内血肿早期血肿周围组织线粒体功能无明显下降,结构无显著变化,晚期则明显受损。

关键词:颅内血肿;大鼠;线粒体;线粒体膜流动性
中图法分类号:R743.34;R322.81;R329.27 文献标识码:A

Changes in membrane fluidity and ultrastructural changes of rat cerebral mitochondria around the experimental hematoma

LI Wei, WANG Jing-zhou, ZHOU Zhong-he (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the changes of the mitochondrial membrane fluidity of brain and its ultrastructural changes after intracerebral hematoma (ICH) in rats. **Methods** Rat ICH model was established by means of injection of 50 μl tail blood into the caudoputamen. Rats were sacrificed at 12 h, 1 d, 3 d, and 1 w after injection of blood. The brain tissue around the hematoma was collected for the determination of the mitochondrial membrane fluidity of rat brain around the hematoma at different time points, i.e. at 12 h, 1 d, 3 d, and 1 w after injection of blood. The ultrastructural changes of mitochondria were observed electron microscopically. **Results** At 12 h after injection, the membrane fluidity of cerebral mitochondria remained at a higher level ($P>0.05$), but it began to decrease ($P<0.05$) at 1 d after injection of blood, and decreased markedly at 3 d and 7 d after injection of blood ($P<0.01$). The mitochondrial ultrastructure around the hematoma changed mildly in 1 d group, but it was severely damaged in 7 d group. **Conclusion** The cerebral mitochondrial function can be destroyed markedly at the late stage after ICH in rats.

Key words: intracerebral hematoma; rat; mitochondria; membrane fluidity

脑出血是神经科常见病、多发病,致残率高、病死率高。对脑出血神经损伤机制的研究有助于寻找有效的治疗靶点。脑组织对能量代谢具有独特的需求。本研究颅内血肿大鼠血肿周围组织线粒体结构及功能变化,探讨脑出血后神经损伤的病理机制,为脑出血治疗寻求新靶点。

1 材料与方法

1.1 动物模型

1.1.1 实验动物 健康Wister雄性大鼠30只,体质量200~250 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2 动物分组 大鼠随机分为对照组(control group,6只),颅内血肿组(ICH group,24只)。颅内血肿组又分为出血后12 h、1、3、7 d 4个时相点。每时相点动物6只。

1.1.3 动物模型的建立 采用江湾II型立体定位仪取50 μl鼠尾血注入大鼠尾状核,建立大鼠尾状核颅内血肿动物模型。对照组进针位置相同,但不注血。

1.2 方法

1.2.1 脑线粒体分离 大鼠断头处死,30 s内取出血侧大脑半球,取血肿周围约3 mm范围的脑组织,采用改良的Clark技术梯度离心得线粒体悬液。(分离介质为0.25 mol/L蔗糖,10 mmol/L Tris,10 mmol/L K_2^+-EDTA,用HCl调pH值至7.4;梯度离心过程中用3%、6%的Ficoll介质悬浮沉淀。整个过程均在0~4 ℃条件下完成。)用Lowry法测定悬浮液蛋白含量。

1.2.2 线粒体膜流动性 按聂青松等[1]方法进行。取脑线粒体液2 ml(膜蛋白浓度0.3 mg/ml),加入2×10^{-6} mol/L DPH溶

基金项目:重庆市卫生局"十五"重点科研基金资助项目(00-1007)
Supported by the Foundation for the Key Scientific Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of Bureau of Public Health of Chongqing (00-1007)
作者简介:李 玮(1975-),女,河北省蠡县人,硕士研究生,医师,主要从事脑出血发病机制方面的研究。电话:(023)68757363
收稿日期:2003-01-04;修回日期:2003-09-28

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

液2 ml中25 ℃温育30 min。采用F-4500型荧光分光光度计测定荧光强度。激发波长362 nm，发射波长432 nm，按下列公式求得荧光偏振度ρ，ρ= $I_{vv}-GI_{vv}/I_{vv}+GI_{vv}$，G= I_{HV}/I_{HH} 其中 I_{vv} 为起偏器和检偏器光轴均在垂直方向时的荧光强度，I_{VH} 为起偏器光轴在垂直方向，检偏器光轴在水平方向的荧光强度，为起偏器检偏器光轴均在水平方向的荧光强度，I_{HV} 为起偏器光轴在水平方向，检偏器光轴在垂直方向的荧光强度。求得ρ值后进一步计算出平均微黏度η，η=2ρ/0.46−ρ，膜流动性以平均微粘度表示，η越大，膜流动性越低。

1.2.3 电镜观察血肿周围组织线粒体超微结构 选取脑出血后第1天及第7天的大鼠，用4%多聚甲醛灌注成功后迅速取出脑组织，选取血肿周围组织1 mm×1 mm×1 mm置于3%戊二醛固定液中固定。经包埋、制超薄切片后在透射电镜下观察、记录并照相。

1.2.4 统计学处理 实验所得数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，利用SPSS 10.0软件做独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 脑出血后血肿周围组织线粒体膜平均微粘度变化

出血后12 h血肿周围组织线粒体膜平均微粘度与对照组比较无明显差异。出血1 d平均微粘度(η)较对照组增大，即膜流动性减小($P<0.05$)。出血3 d及7 d线粒体膜平均微粘度(η)较对照组则明显增大($P<0.01$)，见表1。

表1 脑出血后血肿周围组织线粒体膜平均微粘度(η)变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1 Changes of the average viscosity(η) of mitochondrial membrane around the hematoma after ICH ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

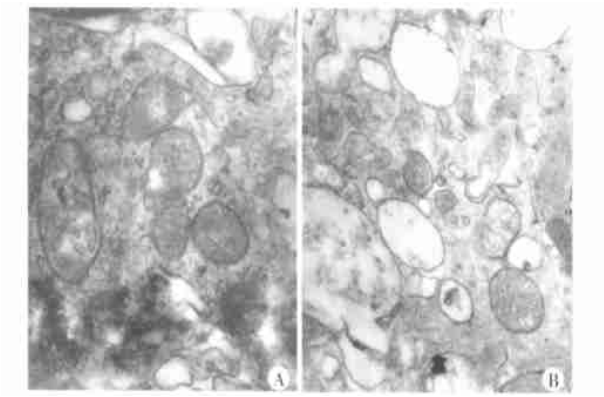
	Control	12 h	1 d	3 d	7 d
η	2.3014±0.0402	2.3249±0.0882	2.3589±0.0425 *	2.3760±0.0190 **	2.4452±0.0201 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

2.2 线粒体超微结构改变

出血后1 d：线粒体结构的病理变化主要表现为基质疏松，部分线粒体膜变为单层界膜，大部分线粒体仅出现嵴排列紊乱，但大小、结构基本正常。

出血后7 d：较之出血后1 d时线粒体的病变更为明显，可见线粒体肿胀，嵴减少或断裂，病变轻重不一，见图1。



A：1 d after ICH (TEM×34 000)；B：7 d after ICH (TEM×20 000)

图1 颅内血肿后线粒体结构变化

Fig 1 Ultrastructual changes of mitochondria

3 讨论

脑出血后神经细胞损伤是由多种复杂因素共同作用的结果。而脑作为一个高耗能的器官，能量供应的紊乱对出血后神经功能的损害有着重要影响。线粒体通过氧化磷酸化生成大量ATP供细胞内各种化学反应与功能需要，是极为重要而敏感的细胞器。长久以来，线粒体功能与细胞死亡的因果关系一直存有争议。

近期研究表明，线粒体功能障碍最终导致细胞死亡[1,2]。线粒体膜的流动性为膜发挥各种重要生理功能，如能量转换、信息传递等提供必要条件，是代表线粒体功能状态的灵敏指标。实验已显示神经细胞线粒体的结构改变、膜流动性变化与神经功能障碍有密切关系[3,4]。由于受到对细胞线粒体的提取技术的限制，无论是在缺血性脑损伤、脑外伤等情况下，还是在本实验对血肿周围组织的线粒体功能研究中，都不能做到绝对分离出神经元或神经胶质细胞的线粒体进行观察，因而有可能造成一定的实验偏差，但在缺血性脑损伤中所取的脑组织为大脑皮层，本实验脑组织取材源于血肿周围的尾状核区，均是以神经元占绝对优势的区域，因此所提取的线粒体也主要来自神经元细胞。

目前对于脑出血后血肿周围组织细胞的线粒体功能变化的相关研究尚少。在脑缺血模型中，发现缺血30 min后线粒体膜流动性明显下降，再灌注早期呼吸控制率一度有短时间恢复。但随时间延长又逐渐下降[5]。自发性脑出血的发病机制与脑梗塞有明显不同，在本实验中脑出血后组织线粒体结构功能的变化也与脑缺血有较大差异。出血早期(12 h)，血肿周围组织线粒体膜流动性与对照组比较无明显变化，在24 h后开始下降，在3 d时与对照组比较已有明显差异，出血后7 d，线粒体膜流动性进一步下降至更低水平。对血肿周围组织细胞线粒体超微结构变化的观察结果与线粒体膜流动性变化情况吻合：所选取的1d组脑出血大鼠的脑线粒体结构发生一定改变，但多表现为线粒体嵴排列紊乱，结构基本正常。至出血后第7天时，线粒体多为空泡样改变，嵴减少或断裂，线粒体结构的破坏非常明显。Wagner等[6]在对猪的脑出血后能量代谢变化的观察中也证实出血早期(1～8 h)血肿周围组织的ATP含量无明显变化。本实验显示，脑出血后线粒体功能会遭到明确损害，与缺血不同的是这一损害出现相对较晚。

生物大分子结构是生物功能的基础，一般认为分子结构改变在先，功能改变在后。而本实验表明脑出血后细胞线粒体结构可在相对较长时间内保持稳定，这无疑给出血后的医疗干预提供了较为充足的时间。

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

近年研究证实，细胞凋亡参与脑出血后的神经损伤[7,8,9]。而此过程由于需要合成新的蛋白，所以是一个耗能的过程。由我们的实验结果也可以推断，在出血早期，能量供应基本正常，有可能启动凋亡程序而引起神经细胞损伤。对于坏死性神经元死亡目前没有有效的治疗。而凋亡性细胞死亡由基因控制，从凋亡基因的启动到神经元死亡有一个较长的过程。因此，采取有针对措施对脑出血后脑组织线粒体结构进行有效保护，增强生物膜稳定性，有可能成为脑出血治疗的一个新方向。

参考文献：

[1] 聂青松. 蜂王精对大鼠红细胞膜流动性的影响[J]. 北京医学院学报，1983，53：249.
[2] Siesjo B K, Elmer E, Janelidze S, *et al*. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure[J]. Acta Neurochir Suppl (Wien) 1999, 73: 7—13.
[3] Mecocci P, Beal M F, Cecchetti R, *et al*. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain [J]. Mol Chem Neuropathol, 1997, 31(1): 53—64.
[4] Wang Q S, Zhou J N, Xu T L, *et al*. A phospholipase C inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride, ameliorates ischemic injury to brain mitochondria in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(3): 249—252.
[5] 李露斯，汪青松，闫国和，等. 大鼠脑缺血后脑线粒体功能的改变[J]. 中华神经科杂志，1996，29(6)：329—331.
[6] Wagner K R, Xi G, Hua Y, *et al*. Early metabolic alterations in edematous perihematomal brain regions following experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1998, 88(6): 1058—1065.
[7] Matsushita K, Meng W, Wang X, *et al*. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(2): 396—404.
[8] Gong C, Boulis N, Qian J, *et al*. Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death[J]. Neurosurgery, 2001, 48(4): 875—882.
[9] 周中和，王景同，李　玮，等. 凝定酶对大鼠原状核区神经细胞 DNA 损伤的动态研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(12)：1405—1407.

（编辑　张大春）

文章编号：1000-5404(2004)02-0141-01

个案与短篇

血友病血小板聚集率测定及其意义

Determination of platelet aggregation rate in hemophilia patients and its significance

王世一，徐西华　（重庆医科大学儿童医院血液及遗传研究室，重庆 400014）

血友病(hemophilia)是一组遗传性凝血功能障碍性疾病，包括血友病甲、血友病乙及血友病丙。血友病的发病率为 5～10/10 万人群[1]。血友病患者的血小板聚集功能研究甚少。现将 48 例血友病患者的血小板聚集率测定结果进行分析报告如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料

1.1.1　临床资料　血友病 48 例，均为男性，年龄：＜1 岁者 6 例占 12.5%，1～3 岁者 14 例占 29.2%(14/48)，＞3 岁者 28 例占 58.3%。其中血友病甲 37 例占 77%，血友病乙 11 例占 23%。48 例都有轻重不等的外伤史。其表现为皮下血肿 35 例占 72.8%(35/48)，外伤后出血不止 32 例占 66.7%(32/48)，关节肿胀 23 例占 48%(23/48)，全身瘀斑 28 例占 58.3%(28/48)、瘀点 11 例占 23%(11/48)。

1.1.2　血常规结果　48 例外周血常规检查，白细胞总数(WBC)：＜4.0×10^9/L 4 例，(4.0～10.0)×10^9/L 35 例，＞10.0×10^9/L 9 例；红细胞计数(RBC)：＜3.3×10^{12}/L 12 例，(3.3～5.3)×10^{12}/L 36 例；血红蛋白(HGB)：＜60 g/L 4 例，60～89 g/L 11 例，90～109 g/L 17 例，＞110 g/L 15 例；血小板计数(PLT)全部在(100～300)×10^9/L 范围内。

1.1.3　凝血象检查　测定 48 例患者的凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、白陶土部分凝血活酶时间(KPTT)，每次用正常人血浆作正常对照。

1.1.4　血小板聚集率检测(platelet aggregation rate, PAR)　用 ADP 作诱聚剂，在 TYXN～91 智能血液凝集仪测定 48 例患者血小板聚集率(PAR)，包括 1、5 min 及最大聚集率。

1.5　统计学方法

采用 t 检验。

2　结果

48 例血友病的血小板聚集率检测(PAR)结果见表 1。

表 1　血小板聚集率($\bar{x}\pm s$)%

	例数		PAR(1)	PAR(5)	PAR(M)
	甲	乙			
正常组	28	7	(57±26)	(83.9±19.6)	(87.2±14.7)
减低组	9	4	(17.3±18)	(8.5±10.3)	(24.3±19)

作者简介：王世一(1964－)，男，重庆市梁平县人，主管技师，主要从事小儿血液及遗传性疾病方面的研究，发表论文 6 篇。电话：(023)63632756-3406

收稿日期：2003-06-07；修回日期：2003-11-26

（下转 145 页）

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