DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.020

论著

文章编号:1000-5404(2003)05-0420-03

慢性哮喘豚鼠及其在低氧干预下海马脑区超微结构的变化

孔祥英,熊建平,白家驷,肖桃元 (第三军医大学附属西南医院儿科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨慢性哮喘动物模型海马超微结构变化及其在低氧干预后的改变。方法 复制慢性哮喘动物模型,分为低压低氧(低压舱)治疗组、常压低氧吸入治疗组及不治组,并设正常对照组,电镜观察海马超微结构变化。结果 电镜下慢性哮喘豚鼠海马神经元粗面内质网扩张,线粒体脊断裂、模糊,突触小泡减少、突触后膜稍肿胀;星状、小胶质细胞增生、胞浆肿胀、空泡形成;血管周围间隙增宽、基底膜肿胀、模糊、管腔狭窄。低氧干预后海马神经元核仁明显,细胞器丰富,粗面内网轻度扩张,突触小泡较丰富,突触后膜较致密,突触间隙略显增宽,胶质细胞及血管未见明显病变。结论 反复发作的慢性哮喘可因缺氧致海马超微结构发生变化,经低压低氧及常压低氧治疗后因哮喘所致的海马超微结构损伤明显好转。

关键词:哮喘;海马;超微结构
中图法分类号:R338.26;R562.25;R845.22 文献标识码:A

Ultrastructural changes of hippocampus in guinea pigs with chronic asthma and the effects of hypoxia treatment

KONG Xiang-ying, XIONG Jian-ping, BAI Jia-si, XIAO Tao-yuan (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the ultrastructural changes of hippocampus in the guinea pigs with chronic asthma and the effects of hypoxia treatment on the hippocampal ultrastructures. Methods The replicated animal model of chronic asthma was divided into hypoxia(low pressure chamber) treatment group, normal pressure hypoxia inhaling treatment group, non-treatment group and control group. The ultrastructural changes of hippocampus were observed with electron microscope. Results Expanded rough endoplasmic reticulum, ruptured cloudy mitochondrion carina, decreased synaptic vesicles and swollen postsynaptic membrane, proliferation of astrocytes and microglia proliferated, swelling of cytoplasm, vacuolation, broadened milieu interspace of blood vessels, swelling of cloudy basement membrane with constricted duct cava were found. After hypoxia, clear neuron nucleoli, plenty organells, slightly expanded rough endoplasmic reticulum, fairly plenty synaptic vesicles, more dense post-synaptic membrane and slightly broadened synaptic space were also found. No apparent pathologic changes were found in glial cells and the blood vessels. Conclusion Recurrent chronic asthma may result in the ultrastructural changes of hippocampus due to hypoxia. Treatment with low pressure hypoxia and normal pressure hypoxia may be helpful to the improvement of ultrastructural injury of hippocampus due to asthma.

Key words: asthma; hippocampus; ultrastructure

支气管哮喘是一种由嗜酸性粒细胞(EOS)及淋巴细胞等炎症细胞介导的迟发性变态反应所引起的气道高反应性疾病,严重影响儿童的身心健康。数十年来国内外众多学者对哮喘的发病机制和治疗进行了大量的研究,但少有对脑超微结构影响的报道。我们建立动物哮喘模型,并采用低压低氧及常压低氧吸入进行干预,观察了哮喘动物模型脑海马超微结构的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

采用本校实验动物中心提供的青年豚鼠16只,雌雄各半,体重(200±25)g,随机分为正常对照组(NCG)、哮喘组(AG)、低压低氧治疗组(HHTG)和低氧吸入治疗组(HITG),每组4只。雌雄分笼,喂以小颗粒饲料和青菜胡萝卜,每天自由饮水。动物房清洁干燥、通风,定期紫外线消毒空气(1次/周),室温控制在22~25 ℃,湿度40%~50%,隔日更换、清扫巢穴1次。

1.2 动物模型复制

AG、HHTG、HITG 3组豚鼠采用卵蛋白致敏并诱发哮喘,即

作者简介:孔祥英(1944—),女,山西省昔阳市人,主任医师,教授,主要从事呼吸系统疾病方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68753467
收稿日期:2001-01-18;修回日期:2002-06-27

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

第 1 天用 10%卵蛋白(OA)1 ml 腹腔注射致敏, 第 15 天将致敏的豚鼠放入半封闭的有机玻璃箱内, 用 1% OA 超声雾化吸入诱发哮喘, 以出现烦躁、打喷嚏、咳嗽、呼吸急促、腹肌强烈收缩等典型哮喘样发作为标准, 隔日 1 次, 共 5 次, 每次 30 min。第 1 次诱发前 45 ~ 60 min 给予苯海拉明 10 mg/kg 耳后皮下注射, 以预防豚鼠哮喘发作时突然窒息死亡。NCG 用生理盐水代替 OA 同法处理。

1.3　治疗干预

1.3.1　低压低氧治疗　　在 5 次诱喘成功后次日, 将 HHTG 豚鼠放入动物低压舱(第三军医大学高原研究室提供)内, 通过抽吸舱内空气逐渐减压, 15 min 内达相当于海拔 4 000 m 高度, 并保持 90 min 后在 15 min 内缓慢恢复到常压状态, 结束 1 次治疗, 共 2 h。每日 1 次, 共 10 次。

1.3.2　常压低氧吸入治疗　　在 5 次诱喘成功后次日, 将 HITG 豚鼠放在有机玻璃箱内盖上涂有凡士林的箱盖以防漏气, 从进气孔通入含(13±0.5)%氧气的 O_2/N_2 混合气体, 流量 2 L/min, 并保持出气孔通畅, 每日 2 次, 第 1 次持续 5 min, 以后每次增加 3 min, 共 10 d。常规喂养至处死前。

1.3.3　AG 和 NCG 豚鼠分别经卵蛋白致敏诱喘成功后和生理盐水处理后, 不作任何处理, 喂养 10 d。

1.4　检测指标和方法

各组豚鼠均于诱喘成功后第 12 天上午 10 时前处死, 留取标本进行如下检测。

1.4.1　光镜观察　　每组取 2 只豚鼠经股动脉放血后立即开胸取出肺组织放入 10%的福尔马林溶液中固定, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 用于光镜观察。

1.4.2　电镜观察　　每组取 2 只豚鼠经股动脉放血后立即开胸经左心室升主动脉灌注生理盐水, 同时剪破右心耳, 冲净血液后再灌注 4%多聚甲醛磷酸缓冲液 300 ~ 400 ml 内固定, 置 4 ℃ 冰箱 2 h 后断头取脑, 分离出海马切成 1 mm× 1 mm× 0.5 mm 小块, 经 2.5%磷酸缓冲的戊二醛溶液固定 5 h, 浸入 20%蔗糖硫酸缓冲液中 4 ℃冰箱过夜, 1%锇酸后固定 2 h, 常规丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋, 制成 1 μm 半薄切片, 美蓝染色, 定位, 用 LKV-B 切片机切成 50 nm 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双染后, 在 TEM-2000 EX 型透射电镜 60 kV 下观察。

2　结果

2.1　肺组织病理学变化

光镜下 NCG 豚鼠气道粘膜上皮完整, 粘膜及粘膜下未见 EOS 浸润。AG 豚鼠气道粘膜上皮细胞坏死脱落, 管腔内有时可见脱落的上皮细胞和 EOS, 粘膜及粘膜下可见 EOS 聚集。HHTG 和 HITG 豚鼠气道上皮部分修复, 粘膜及粘膜下少见或偶见 EOS 浸润。

2.2　脑海马超微结构变化

电镜下 NCG 豚鼠海马突触体前后膜清晰, 突触小泡丰富, 血管基底膜完整, 血管内皮细胞结构正常, 胶质突起无肿胀, 与基底膜接触良好。髓鞘结构无异常, 神经突起内微管系清晰。

AG 豚鼠海马神经元粗面内质网扩张, 线粒体脊断裂模糊, 突触小泡少、后膜肿胀, 见图 1。胶质细胞增生, 胞浆肿胀, 空泡形成、破裂。血管周围胶质足板肿胀, 破裂细胞器稀少、消失, 髓鞘样结构形成, 基底膜肿胀、模糊, 管壁皱缩, 管腔狭窄, 见图 2。

经低压低氧和低氧吸入治疗后, 豚鼠海马神经元核仁明显, 细胞器丰富, 粗面内质网轻度扩张, 突触后膜较致密, 突触间隙未见明显增宽, 突触小泡较丰富, 血管及胶质细胞未见明显病变, 见图 3。余神经毡无明显异常。

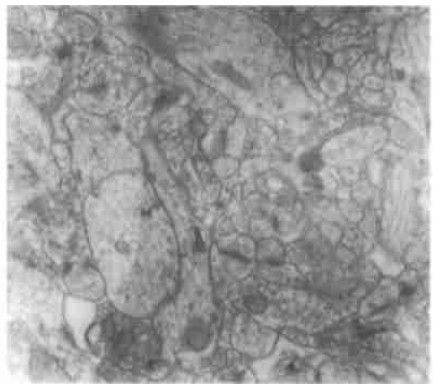


图 1　AG 突触小泡减少, 突触后膜稍肿胀　(TEM× 12 000)

Fig 1　Decrease of synaptic vesicles accompanied by swollen postsynaptic membrane in AG　(TEM× 12 000)



图 2　AG 血管周间隙增宽, 基底膜肿胀, 管腔狭窄　(TEM× 10 000)

Fig 2　Perivascular spaces are widened and basement membrane is swollen, with narrowed lumen of the vessels in AG　(TEM× 10 000)

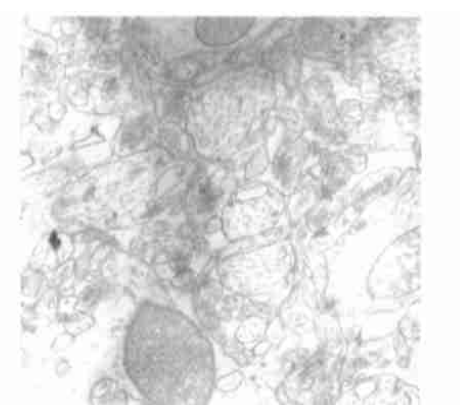


图 3　HHTG 突触小泡丰富, 后膜间隙稍扩张　(TEM× 12 000)

Fig 3　Synaptic vesicles are plentiful and interstitial space is slightly thickened in HHTG　(TEM× 12 000)

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

3 讨论

支气管哮喘发作时患儿端坐，以呼气困难为主，面色苍白鼻翼扇动，额头乃至周身冷汗，软弱无力，严重时烦躁不安、恐慌易怒、张口点头样呼吸，唇周及甲床发绀，大汗淋漓。往往需要积极抢救，而且并发症甚多，如肺部感染、肺气肿、支气管扩张、气胸及纵隔气肿、肺心病、桶胸、鸡胸及生长发育迟缓等，严重影响患儿的身心健康。由于哮喘发作时常导致严重缺氧，有时甚至会出现意识模糊乃至半昏迷、昏迷状态。哮喘时脑海马超微结构有何影响，目前国内外尚少见报道。

本研究显示给予低压低氧和常压低氧干预组哮喘豚鼠的肺组织病理变化明显较 AG 轻，表现为气道上皮部分修复，粘膜及粘膜下少见或偶见 EOS 浸润，且哮喘发作时的一些检测指标血浆皮质醇高于哮喘缓解期组，内皮素则明显低于哮喘发作组等[1~3]；同时低压低氧治疗的哮喘缓解期患儿的病情也得以缓解[4]，提示低压低氧和常压低氧吸入治疗有可能成为减少哮喘发作的一种有效方法。但低压低氧及常压低氧吸入对脑有无损伤尚不清楚。因此本实验选用对缺氧敏感的海马进行超微结构的观察，发现慢性哮喘豚鼠海马超微结构的变化以因血管周水肿压迫、血管痉挛收缩而狭窄、变形、血管基底膜部分肿胀模糊、胶质细胞增生等改变为主。考虑这些变化主要由于哮喘反复发作缺氧所致。经 HHT 和 HIT 干预后，哮喘豚鼠海马超微结构明显好于 AG，尤其是血管周围无水肿，胶质突起、髓鞘正常，细胞器、突触小泡丰富，结构正常。提示在我们所采用的低压低氧和常压低氧情况下对哮喘豚鼠海马超微结构不但无不良影响，而且在该浓度的常压低氧和该高度的低压低氧下可改善慢性哮喘豚鼠海马超微结构的变化。

参考文献：

[1] 孔祥英，桂 芹，白家驷. 低压缺氧对哮喘豚鼠的影响[J]. 中国病理生理杂志，2001，17(6)：550－552.

[2] 桂 芹，孔祥英，白家驷. 低压低氧对哮喘豚鼠血浆皮质醇含量和血液淋巴细胞β受体的影响[J]. 重庆医学，1999，28(1)：7－10.

[3] 熊建平，孔祥英，白家驷. 模拟高原低压舱治疗哮喘缓解期豚鼠对血清皮质醇和嗜酸性粒细胞的影响[J]. 第三军医大学学报，1999，25(5)：338－340.

[4] 桂 芹，孔祥英. 低压缺氧治疗哮喘临床疗效观察[J]. 重庆医学，2000，29(1)：25－27.

（编辑 薛国文）

（上接419页）

曲线，本组 NMP22 以 10.0 U/ml 为最适临界值。膀胱肿瘤组 NMP22 中位值为 45.2 U/ml，其他疾病组为 7.5 U/ml，两组差别有非常显著性意义（$P<0.01$）。NMP22 检测总体敏感性为 82.1%，与细胞学（21.4%）比较，差别有非常显著性意义（$P<0.01$）。NMP22 的敏感随肿瘤级别、期别的增高而升高，肿瘤越大，数目越多，NMP22 阳性率越高。NMP22 敏感性与肿瘤大小关系有显著性意义（$P<0.05$）；与肿瘤分期、数目关系有极显著性意义（$P<0.01$）。NMP22 敏感性与肿瘤分级无明显关系。NMP22 检测特异性为 75.4%，而尿细胞学为 100%。

讨论

目前临床上诊断膀胱癌的主要手段仍然是膀胱镜检查和尿脱落细胞学检查。膀胱镜和活检是诊断膀胱癌的金标准，但其为有创检查，用于筛查膀胱癌病人受到很大限制。脱落细胞学检查具有较高特异性，但其敏感性低，在本研究中只有 21.4%。因此，寻找无创伤、高敏感性、高特异性的检测方法一直是膀胱癌诊断研究的热点。

NMP22 是核基质的重要组成部分，与 DNA 的复制、转录、RNA 合成、基因表达的调控有关。NMP22 为核有丝分裂装置蛋白（NuMA）的一个亚单位。NuMA 与有丝分裂期间纺锤体的形成有关，其主要功能为协调核有丝分裂期间染色体正确、均匀地分配到子代细胞。当细胞发生恶变时，核内遗传物质在有丝分裂末期分配极度异常，NuMA 合成激增。本研究亦显示膀胱癌组尿 NMP22 含量明显高于对照组。

Ponsky 等[1,2] 分别对 608 例、187 例血尿病人进行 NMP22 检测，以 10 U/ml 为最适临界值，敏感性分别为 88.5% 和 61.2%，特异性分别为 83.5% 和 89.9%，而细胞学检查敏感性分别为 30.7% 和 35.4%。本组检测结果与文献报道相似，表明 NMP22 具有较高的敏感性，明显高于尿细胞学，可作为膀胱镜检查的辅助手段，对膀胱癌病人的筛查十分有利。本实验中 NMP22 敏感性与膀胱癌期别、大小、多发/单发均有显著相关性。尤其是对浅表性膀胱癌（Tis，Ta，T1）NMP22 检测仍具有较高的敏感性（78.3%），明显高于细胞学（8.7%）。这说明 NMP22 检测能较早期发现膀胱癌。

膀胱乳头状瘤和内翻性乳头状瘤的病理归类和治疗方式历来存有争议。目前多数学者将其看作癌前病变，治疗上则按低级浅表性膀胱癌对待。本组共 6 例，NMP22 检测均为阴性，这一方面说明 NMP22 检测特异性较高；另一方面说明目前 NMP22 检测只能作为膀胱镜检的辅助手段，而不能替代之。

关键词：膀胱肿瘤；癌；核基质蛋白

中图法分类号：R737.140.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] Ponsky L E，Sharma S，Pandrangi L，*et al*. Screaning and monitoring for bladdder cancer：Refining the use of NMP22[J]. J Urol，2001，166(1)：75－78.

[2] Sanchez Carbayo M，Urrutia M，Silva J M，*et al*. Comparative predictive values of urinary cytology，urinary bladder cancer antigen，CYFRA21-and NMP22 for evaluating symptomatic patients at risk for bladder Cancer[J]. J Urol，2001，165(5)：1462－1467.

（编辑 张大春）

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