DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.010
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
264 2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0264-03

血管性痴呆大鼠的突触超微结构改变及结构参数分析

张艳玲[1],李露斯[1],肖桃元[2],可金星[2] ([1]第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038;[2]第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究血管性痴呆时大脑的皮层、海马的突触超微结构和结构参数改变,探讨血管性痴呆的病理机制。方法 采用老年大鼠持久双侧颈总动脉结扎造成慢性脑缺血动物模型。分为正常对照组、缺血2、4月组。电镜下观察突触超微结构改变,应用体视学方法和图像分析,对突触数密度、突触活性带长度、圆盘面积、表面密度和三种突触弯曲型比率进行分析。结果 皮层及海马在缺血2、4月组突触数密度(Nv)均明显下降,而缺血2与4月组之间无显著性差异。海马在缺血2、4月组突触活性带长度(L)、突触连接带圆盘面积(S)及突触表面密度(Sv)均下降,缺血2与4月组之间无显著性差异;皮层在缺血2、4月组未见明显改变。三种突触弯曲型比率在缺血后未见明显改变。结论 血管性痴呆的突触数密度、突触活性带长度减小可能与血管性痴呆的神经递质紊乱有关。

关键词:血管性痴呆;突触;结构参数;体视学;图像分析
中图法分类号:R322.81;R749.16 文献标识码:A

Ultrastructure changes and texture parameters analyses of the synapses in the vascular dementia rat

ZHANG Yan-ling, LI Lu-si, XIAO Tao-yuan, KE Jin-xing (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the ultrastructure and texture parameters changes of the synapses in the cerebral cortex and hippocampi of the vascular dementia rats. Methods The vascular dementia rat model was established by the ligation of both carotids of the aged rats. Three groups of rats were examined: the normal group, the 2-month-ischemia group and the 4-month-ischemia group. The ultrastructure changes of the synapses were observed with electron microscopy. The number density, length of activity cord, area of synapses disk, area density and the ratio of 3 curvatural forms of synapses were studied with stereology and image analysis. Results The number density (Nv) of the synapses in the cerebral cortex and hippocampi decreased in the 2-month-ischemia group and the 4-month-ischemia group, with no diferrence between them. The length of activity cord(L), the area of synapses disk(S), the area density(Sv) in the hippocampi decreased in the 2-month ischemia group and the 4-month-ischemia group, with no difference between them, but had no change in the cerebral cortex. No changes of the ratio of 3 curvatural forms of synapses after ischemia were found. Conclusion The decrease of Nv and L of synapses in the vascular dementia is probably related to disorder of the neurotransmitter.

Key words: vascular dementia; synapses; texture parameters; stereology; image analysis

随着人口的老龄化进程,以认知功能减退为特点的痴呆越来越受到人们重视。已有的研究证实,痴呆和神经递质的紊乱有关,而突触在神经递质的传递过程中起重要作用。在老年痴呆人口中,血管性痴呆占很大比例(20%)。临床上常见的血管性痴呆的病理基础是多发性脑梗塞和皮层下动脉硬化性脑病,这两种病变的常见病因是慢性脑灌注不足。本实验通过老年大鼠持久双侧颈总动脉结扎的慢性脑缺血模型,观察脑皮层、海马在缺血2和4月时突触的超微结构和数量的改变,探讨血管性痴呆中神经递质紊乱和突触改变的关系。

1 材料和方法

研究慢性脑灌注不足的实验中,国外学者采用大鼠持久双侧颈总动脉结扎7 d至4月作为慢性脑灌注不足的动物模型,造成的慢性脑血流灌注不足的结果是确切的[1]。我们选用老龄Wistar大鼠(月龄≥12月,雌雄不限)共9只,体重300~400 g,随机分为正常对照组(n=3),缺血2月组(n=3),缺血4月组(n=3),参照Obta等制作慢性脑灌注不足的模型。大鼠术前12 h禁食,4 h禁水,用20%乌拉坦按800~1 000 mg/kg腹腔麻醉,保证手术操作期间大鼠有自主呼吸,仰卧固定,颈前部去毛消毒后沿正中线切开,分离出双侧颈总动脉,双重丝线结扎。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,对照组仅切开颈前,不结扎颈总动脉。

电镜观察取颈总动脉结扎后2月、4月、对照组各3只大鼠,乌拉坦深麻醉,生理盐水250 ml经心脏灌注去除血细胞,用4 ℃ 4%多聚甲醛250 ml灌注固定后分离出大脑,于脑皮层、海马取1 mm^3大小组织放入3%磷酸缓冲的戊二醛中固定,1%锇酸中后固定,常规脱水浸透,环氧树脂618包埋,超薄切片(片厚50 nm),JEM-2000EX电镜80 kV下观察。

电镜下观察神经元、胶质细胞、血管等超微结构改变,选取神经毡部位,在6 000倍放大倍率下随机选取视野,每例标本拍摄6张突触结构照片。应用体视学方法及图像分析技术,对突触进行定量分析[2~6]。确认突触的标准:①可见突触的前后膜;②可见致密带;③突触前膨大内可见3个以上突触小泡;④

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770273)
作者简介:张艳玲(1974-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,医师,主要从事脑血管病研究。电话:(023)68752905
收稿日期:2001-11-13;修回日期:2002-02-15

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

可见突触间隙。根据公式计算如下的突触结构参数: 突触数密度(Nv) $Nv = Na/(L+T)$; 突触连接带圆盘面积(S) $S = \pi r^2$ $r = (\pi/4) \cdot L$; 突触表面密度(Sv) $Sv = Nv \cdot S$。(公式中 L 代表突触连接带圆盘的截线平均长度, T 代表超薄切片的厚度, $\pi = 3.14$)。参照 Markus 等[7]的突触界面弯曲分型法, 对各组突触分型, 计算比例。三种弯曲型突触为: 正向弯曲型即突触后向突触前凸入; 平坦型; 负向弯曲型即突触前向突触后凸入, 见图 1。

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用 Microsoft excel 软件处理。

2　结果

2.1　慢性脑灌注不足时突触的超微结构改变[8]

缺血 2 及 4 月组, 可见大脑皮层和海马内出现软化灶(表现为轴突和髓鞘的变性、溶解), 胶质细胞及小血管增生。4 月组可见小血管塌陷和微血栓形成。缺血 2 及 4 月组神经元呈不同程度的退变和固缩, 胞浆内溶酶体和脂褐素增多。突触病变明显, 分别表现为突触前膜或后膜肿胀、空化; 突触小泡变得致密、聚集成堆, 有的小泡稀疏、减少; 突触后膜致密物增厚或减薄; 突触间隙模糊, 有的间隙增宽, 见图 1、2。

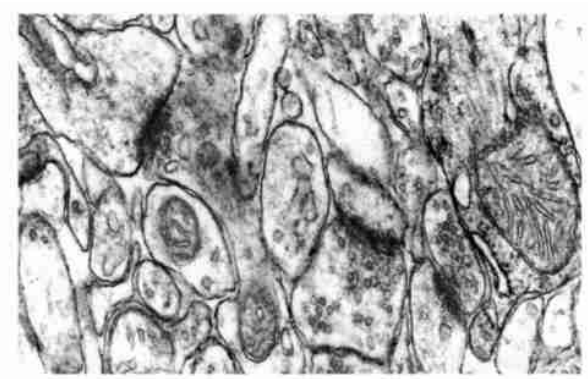


图 1　缺血 2 月组皮层: 突触前膜肿胀, 小泡稀疏, 间隙模糊, 突触 3 种弯曲型　(TEM× 10 000)

Fig 1　Cerebral cortex in the 2-month-ischemia group: swelling of the presynaptic membranes, rarefaction of the synaptic vesical, clouding of the synaptic gap and 3 kinds of curvature forms of synapses　(TEM× 10 000)



图 2　缺血 2 月组皮层: 突触前膜肿胀, 小泡聚集成堆, 后膜致密区增厚, 间隙模糊　(TEM× 6 000)

Fig 2　Cerebral cortex in the 2-month-ischemia group: swelling of the presynaptic membranes collection of the synaptic vesical, thickening of the postsynaptic dense body, clouding of the synaptic gap　(TEM× 6 000)

2.2　突触结构参数改变

2.2.1　皮层突触数量及大小改变　　皮层在脑缺血后, 突触的数量和大小发生改变, 见表 1。皮层突触数密度(Nv)、表面密度(Sv)在慢性脑灌注不足 2 月后, 与正常对照组相比有显著差异($P < 0.05$), 在慢性脑灌注不足 4 月后突触数密度无进一步下降。皮层突触活性带长度(L)及突触连接带圆盘面积(S), 在慢性脑灌注不足 2、4 月组未见明显改变。皮层突触表面密度(Sv)在慢性脑灌注不足 2 月后, 与正常对照组相比有显著差异($P < 0.05$), 在慢性脑灌注不足 4 月后突触数密度进一步下降。

表 1　皮层突触数量及大小改变

Tab 1　Changes of number and size in the synapses in cerebral cortex

	Control group	2-month-ischemia-group	4-month-ischemia group
Nv (μm^{-3})	0.153 ±0.037	0.091 ±0.022 *	0.084 ±0.025 *
L (μm)	0.919 ±0.387	1.024 ±0.303	0.886 ±0.391
S (μm^2)	1.918 ±1.513	2.203 ±1.431	1.804 ±1.495
Sv (μm^{-1})	0.293 ±0.056	0.200 ±0.031 *	0.152 ±0.037 *#

*: $P < 0.05$ *vs* control group; #: $P < 0.05$ *vs* 2-month-ischemia group

2.2.2　皮层突触三种弯曲型比例　　皮层在脑缺血后, 突触的三种弯曲型比例变化, 见表 2。统计学处理未发现各组间有明显差异。

表 2　皮层突触三种弯曲型比例改变

Tab 2　Changes of ratio of curvature form in the synapses in cerebral cortex

	Control group	2-month-ischemia group	4-month-ischemia group
Positive curvature form(%)	48.89	55.17	53.33
Flat curvature form(%)	37.78	31.03	33.33
Negative curvature form(%)	13.33	13.79	13.33

$P > 0.05$ *vs* control group

2.2.3　海马突触数量及大小改变　　海马在脑缺血后, 突触的数量和大小发生改变, 见表 3。海马突触数密度(Nv)在慢性脑灌注不足 2 月后, 与正常对照组相比差异非常显著($P < 0.01$), 在慢性脑灌注不足 4 月后突触数密度无进一步下降。海马突触活性带长度(L)及突触连接带圆盘面积(S), 在慢性脑灌注不足 2 月后即明显缩小, 慢性脑灌注不足 2 月组和 4 月组相比无明显差异。海马突触表面密度(Sv)在慢性脑灌注不足 2 月后, 与正常对照组相比有显著差异($P < 0.01$), 在慢性脑灌注不足 4 月后突触数密度进一步下降。

表 3　海马突触数量及大小改变

Tab 3　Changes of number and size in the hippocampi synapses

	Control group	2-month-ischemia group	4-month-ischemia group
Nv (μm^{-3})	0.140±0.039	0.080±0.025 **	0.065 ±0.023 **
L (μm)	1.135±0.393	0.861±0.205 **	0.849 ±0.311 **
S (μm^2)	2.781±2.218	1.512±0.696 **	1.574 ±1.168 *
Sv (μm^{-1})	0.389±0.087	0.121±0.017 **	0.102 ±0.027 **#

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* control group; #: $P < 0.05$ *vs* 2-month-ischemia group

2.2.4　海马突触三种弯曲型比例　　海马在脑缺血后, 突触的三种弯曲型比例变化, 见表 4。统计学处理未发现各组间有明显差异。

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

表4 海马突触三种弯曲型比例改变

Tab 4 Changes of ratio of curvature form in the hippocampi synapses

	Control group	2-month-ischemia group	4-month-ischemia group
Positive curvature form(%)	48.48	53.85	42.86
Flat curvature form(%)	33.33	34.62	23.81
Negative curvature form(%)	18.18	11.54	33.33

$P>0.05$ *vs* control group

3 讨论

慢性脑灌注不足导致的血管性痴呆逐渐被大家重视,随着研究的深入,人们希望可以阻断其疾病进程,从而减轻痴呆对老年人生活质量的影响。

已有的研究发现急性脑缺血脑血流量降低50%~60%以上,出现急性缺血改变,以组织水肿、渗出和细胞器损伤为主;而慢性脑缺血脑血流减少低于25%~50%就可能出现神经元功能降低,病理改变以神经元变性、神经纤维变性、髓鞘溃变、突触变化为主,并出现增生、修复、功能增强改变以及胶质细胞增生现象[8]。目前慢性脑缺血引起的脑损伤的机制研究尚薄弱[9]。

我们对突触的结构参数[10~11]的研究中发现:在慢性脑灌注不足时,脑皮层及海马突触数密度(N_V)明显下降,这种数量减少在缺血2月内已经形成,而2月后无进一步减少;海马突触活性带长度(L)及突触连接带圆盘面积(S)随缺血时间的延长逐渐减小,皮层突触活性带长度(L)及突触连接带圆盘面积(S),在慢性脑灌注不足后未见明显改变;突触的表面密度(S_V)是突触数量和大小的综合性指标,反映的是突触连接带表面积在组织中的密度,本实验中发现皮层及海马S_V随缺血时间的延长逐渐减小;突触的弯曲类型认为与突触连接带的表面积有关,而正向弯曲型可以增加突触连接带的表面积,已有的研究结果提示缺血后,作为代偿机制,正向弯曲型突触增加,负向弯曲型突触减少[4,12],本实验中未发现缺血后突触弯曲类型的改变。以上结果提示血管性痴呆大鼠脑组织中存在突触数量减少及突触连接活性带缩小,导致传递神经递制的突触连接带的表面积减少。

在血管性痴呆、阿尔采默氏病痴呆等多种痴呆患者中,神经递质的改变非常相似。研究证实,痴呆患者大脑内多数神经递质都呈减少趋势,包括胆碱能神经递质[13]、单胺类神经递质[14](去甲肾上腺素NA、多巴胺DA和5-羟色胺5-HT)。晚期Alzheimer型(AD)痴呆病人中,存在着严重的氨基酸代谢障碍,其神经递质类氨基酸显著减少[15]。也有报道发现少数神经递质含量增高,拟痴呆小鼠大脑组织中γ-氨基丁酸(GABA)含量增高[16]。突触作为神经递质的传递结构,在血管性痴呆的神经递质紊乱中起什么作用?本实验中发现的慢性脑灌注不足条件下的突触数量及体积的向下调节,与神经递质含量的下调是一致的。但是本实验缺乏神经递质的检测,也没有突触小泡的分类和计数,不能直接的反映突触和神经递质的关系。慢性脑灌注不足情况下的突触数量减少,体积改变,从而导致神经递质的释放减少,可能是血管性痴呆的重要发病机制。引起上述改变的病理过程,以及突触和神经递质的相互关系,尚需要进一步研究,以明确认知功能减退的根本原因。

参考文献:

[1] Hideaki W, Hidekazu T, Ichiro A. Protective effect of cyclosporin A on white matter changes in the rat brain after chronic cerebral hypoperfusion[J]. Stroke, 1995, 26(6): 1 415—1 422.

[2] 田春海, 周从乐, 苗鸿才. 新生大鼠缺氧缺血后远期海马CA1区神经元和突触的变化和药物干预的效果[J]. 中国围产医学杂志, 1999, 2(1): 33—35.

[3] 宿宝贵, 许鹿希. 大鼠海马结构在空间辨别性学习记忆时的突触形态可塑性的定量研究[J]. 解剖学研究, 2000, 22(1): 40—42.

[4] 王怀星, 姚志彬, 顾耀铭等. 老年性记忆减退大鼠内侧隔核突触结构的改变[J]. 神经解剖学杂志, 2000, 16(1): 40—44.

[5] 章子贵, 杜红燕, 姜建明等. 衰老过程中小鼠学习记忆和脑内突触结构参数变化的相关性[J]. 神经解剖学杂志, 1998, 14(2): 147—151.

[6] Brunso Bechtold J K, Linville M C, Sonntag W E. Age-related synaptic changes in sensorimotor cortex of the Brown Norway X fischer 344 rat[J]. Brain Res, 2000, 872(1—2): 125—133.

[7] Markus E J, Petit T L. Synaptic structural plasticity: role of synaptic shape [J]. Synapse, 1989, 3(1): 1—11.

[8] 李露斯, 刘之荣, 肖桃元. 大鼠慢性脑血流关灌注不足脑的病理组织学和超微结构变化[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(11): 805—808.

[9] Sekhon L H, Spence I, Morgan M K, *et al*. Chronic cerebral hypoperfusion in the rat: temporal delineation of effects and the in vitro ischemic threshold [J]. Brain Res, 1995, 704(1): 107—111.

[10] Horvath T L, Garcia Segura L M, Naftolin F. Lack of gonadotropin—positive feedback in the male rat is associated with lack of estrogen-induced synaptic plasticity in the arcuate nucleus[J]. Neuroendocrinology, 1997, 65(2): 136—140.

[11] Pierce J P, Milner T A. Parallel increases in the synaptic and surface areas of mossy fiber terminals following seizure induction[J]. Synapse, 2001, 39(3): 249—256.

[12] Weeks A C, Ivanco T L, Leboutillier J C, *et al*. Sequential changesin the synaptic structural profile following long-term potentiation in the ratdentate gyrus: III. Long-term maintenance phase[J]. Synapse, 2001, 40(1): 74—84.

[13] 王玉春. 早老性痴呆症的治疗药盐酸多奈哌齐的开发应用[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2000, 21(5): 232—235.

[14] 马晓明, 朱笛霓, 韦 强, 等. BKHJ中药对6-OHDA损毁NA上行背束大鼠脑内单胺类递质的影响[J]. 陕西中医, 2000, 21(8): 381—382.

[15] 许 晶, 韩 杰, 梁战华. 晚期老年性痴呆患者氨基酸代谢的研究[J]. 临床神经病学杂志, 1998, 11(6): 334—336.

[16] 秦红友, 蒋林男, 宋菊敏, 等. 补肾中药对拟痴呆小鼠大脑组织中γ-氨基丁酸和谷氨酸含量的影响[J]. 中医杂志, 1998, 39(8): 490—492.

(编辑 郭建秀)

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