DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.033
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1074 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1074-04

两种不同脑损伤后星形胶质细胞反应性变化的比较研究

杨 忠,李红丽,蔡文琴,孙 榆 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨不同类型脑损伤后星形胶质细胞(AST)活化的时空分布及形态学变化特征。方法 本实验建立Wistar大鼠短暂性全脑缺血30 min再灌注模型及脑皮质针刺伤模型,采用胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体免疫组化方法及图像分析技术对两种脑损伤后AST的反应进行对比观察。结果 ①脑缺血1 d后可见AST活化,5 d即达高峰。脑皮质针刺伤后AST的活化开始于第5~7天,第14天达高峰。②两种脑损伤后不同部位反应性AST的形态有明显差异。结论 本实验表明不同类型脑损伤后AST的反应不同,活化AST在形态上的差异可能与神经营养因子的运输,神经的修复与再生等功能相适应。

关键词:星形胶质细胞活化;脑缺血;皮质针刺伤;胶质纤维酸性蛋白(GFAP);大鼠
中图法分类号:R322.81;R329.24;R651.15 文献标识码:A

Comparative studies of astrocyte reactions after global ischemia/reperfusion injury and cerebral cortex stab wound in rats

YANG Zhong, LI Hong-li, CAI Wen-qin, SUN Yu (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract **Objective** To explore the temporal and spatial distributions and morphological changes of astrocytic activation in two different types of brain injury in rats. **Methods** The models of transient global brain ischemia/reperfusion (IR) and cerebral cortex stab wound were established in Wistar rats. The morphological changes of reactive astrocytes were investigated with glial fibrillary acidic protein(GFAP) immunohistochemical staining and stereological analysis. **Results** ①The astrocytic activation was observed on the 1st day and reached a peak on the 5th after IR. Astrocytes were activated during d 5 to d 7 and peaked on d 14 after stab lesion. ②Different shapes of reactive astrocytes were found distinctly in different brain regions in two types of brain injury. **Conclusion** Results indicate that there are different astrocyte reactions after different types of brain injury, suggesting that the morphological changes of astrogliosis may be adapted to its functions, including the transportation of nerve trophic factors and the recovery and regeneration of neuron following brain injury.

Key words astrocytic activation; brain ischemia; cerebral stab wound; glial fibrillary acidic protein; Wistar rat

星形胶质细胞(Astrocyte, AST)的活化,又称反应性胶质增生(Reactive gliosis),是中枢神经系统(CNS)在许多病理生理情况下常见的反应,表现为星形胶质细胞胞体肥大、肿胀、突起增多延长、免疫组化染色胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达增强等。其功能意义包括与CNS损伤修复的关系,多年来一直是人们研究的热点问题。然而有关不同类型脑损伤后AST反应的时空分布规律及形态变化是否一致,文献报道尚少。本实验建立两种不同的脑损伤模型,运用胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化染色结合光、电镜技术观察并比较两种脑损伤后皮质、海马、室周区及室管膜下区等处AST的反应性变化特征,为进一步认识AST活化在脑损伤及神经的修复、再生中的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立

成年Wistar大鼠65只,雌雄不拘,体重200~250 g,由本校实验动物中心提供,其中正常对照5只。短暂性全脑缺血再灌注组(n=30):使用4血管阻塞模型[1],阻断30 min后恢复灌流。脑皮质针刺损伤组(n=30):用直径2 mm去尖端的腰穿针,以前囟为"0"点,损伤坐标为AP=3.5 mm;L=2.5 mm;H=3.5 mm,留针5 min。

1.2 标本制备

模型动物分别在伤后1、3、5、7、14及30 d各取5只,乙醚麻醉后,经心脏灌注生理盐水150 ml,再灌注4%多聚甲醛300~400 ml,取脑,后固定4~6 h,转入20%蔗糖磷酸缓冲液(pH 7.4)内4 ℃过夜,次日恒冷箱切片,片厚25 μm。

1.3 尼氏染色及电镜制样

采用Pischigner尼氏小体染色,主要步骤为:①固定后脑组织冰冻切片,入Pischigner尼氏小体染色作用液数秒钟;②或不加美蓝的上液冲洗;③以4%钼酸铵水溶液固定染色数秒钟,④蒸馏水洗,脱水,透明,封片。电镜标本组织块经3%戊二醛固定后,1%锇酸后固定(4 ℃ 2 h),醋酸铀染色,丙酮逐级脱水,包埋,超薄切片行铅染色,JTEM-2000EX电子显微镜观察。

1.4 免疫组化染色

AST标记物GFAP多克隆抗体、免疫组化试剂盒购自博士德(BOSTER)公司,工作浓度1∶100。用我室常规免疫组化SABC法,各步骤间用PBS漂洗3次,主要步骤为:①3% H_2O_2 室温孵育20 min;②1% BSA-0.3% TritonX-100 37 ℃ 20 min,③一抗(GFAP) 37 ℃ 1 h,后4 ℃过夜;④二抗(Biotin-IgG,1∶100) 37 ℃ 1 h,⑤三抗(Avidin-HRP,1∶100) 37 ℃ 1 h;⑥0.05% DAB-0.01% H_2O_2-TBS(0.05 mol/L, pH 7.5)显色;⑦PBS终止反应,脱水,透

作者简介:杨 忠(1968—),男,四川省崇州市人,博士,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752229

收稿日期:2001-05-14;修回日期:2001-07-30

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

明, 封片, 光镜下观察摄片。对照实验用 PBS 代替 GFAP 一抗, 结果为阴性。

1.5　图像分析及统计学处理

将两组各时相点皮质、海马(Hip)、室周区(PVZ)、室管膜下区(SVZ)的阳性细胞摄入图像分析仪, 用"MDIO 型彩色图像分析系统"软件, 检测 GFAP ICC 染色的积分光密度值。结果用医用数理统计程序进行参数估计及单因素方差分析。

2　结果

2.1　光镜尼氏染色与电镜观察

正常大鼠脑组织神经毡致密, 神经元核仁及尼氏体清楚。全脑缺血再灌注后 1~3 d, 顶叶皮质、海马、侧脑室及室周区均见部分神经元肿胀或固缩; 电镜下神经细胞与周围间隙增大, 部分线粒体嵴断裂, 毛细血管皱缩, 腔内有瘀血, 神经毡肿胀。术后 5~14 d, 神经元数目明显减少, 尼氏体溶解或消失, 故染色浅淡, 尤以海马显著, 见图 1; 神经毡间隙增大, 线粒体呈空泡样变。脑皮质针刺伤组术后 1~3 d 针道周围见大量渗出红细胞和少量深染的坏死细胞; 电镜下神经细胞核膜模糊, 线粒体嵴不清, 神经毡水肿。术后 5~14 d 针道周围变性坏死神经元减少, 胶质细胞增多, 少数神经毡内线粒体呈空泡状, 嵴断裂, 见图 2。

2.2　GFAP 免疫组化染色

正常对照组: 大鼠脑皮质 GFAP 阳性细胞数目少、染色浅, 分布稀疏, 胞体小, 突起细短; 海马区阳性细胞则规律排布, 染色淡而均匀; 室周区及室管膜下区阳性细胞少, 染色稍强, 轮廓清晰。全脑缺血再灌注组: 术后 1~3 d, 顶叶皮质、海马 CA1、CA2 区及室周区阳性细胞数目增多, 染色加深。术后 5~7 d 上述反应达高峰, 胞体增大, 突起增粗增长, 见表 1、图 3, 其中室管膜下区(尤其是侧脑室边缘)阳性细胞胞体不明显, 突起较其它区域更长, 形似垂柳状, 见图 4, 海马 CA1、CA2 区则见突起短而粗、胞体大的阳性细胞呈簇状分布, 见图 5; 与齿状回细胞分界清楚。术后 14~30 d 仍见上述反应。

脑皮质针刺伤组: 术后 1~3 d 伤侧皮质、海马 CA1、CA2 区及室周区的染色结果与正常对照无明显差别, 伤道周围未见典型 GFAP 阳性细胞。术后 5~7 d, 伤侧海马 CA1、CA2 区及室周区可见深染、增大的阳性细胞胞体和纤维; 伤道周围阳性纤维长短不一, 见图 6。术后 14~30 d, 伤侧上述区域阳性细胞数目进一步增多, 见表 2, 胞体增大, 突起增长增粗, 伤道附近阳性纤维横向排列, 几乎垂直于伤道。伤侧室管膜下区较健侧 GFAP 阳性细胞突起伸长、染色深。健侧海马及侧脑室也见染色增强。

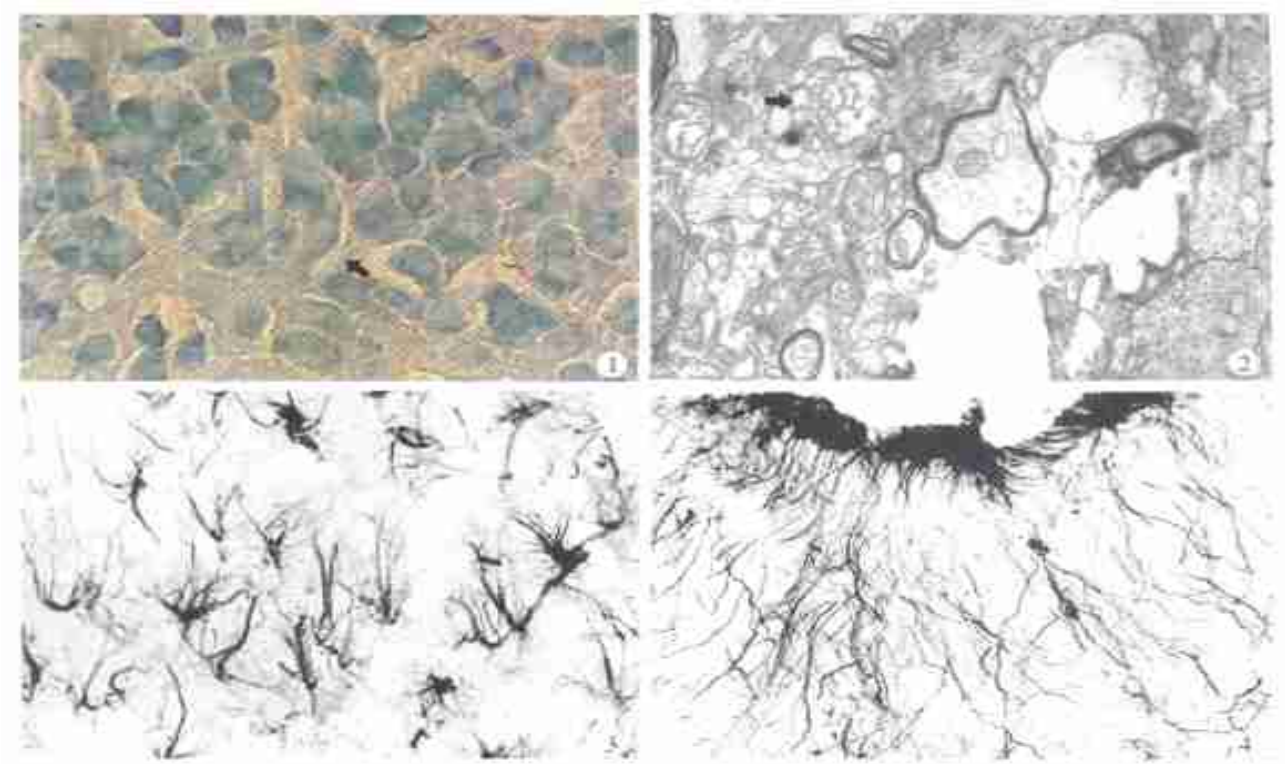


图 1　全脑缺血 7 d, 海马神经元尼氏体溶解(➡)　(尼氏染色×400)

Fig 1　Dissolution of nissl body of neuron in hippocampus 7 d after IR (➡)　(Nissl stain× 400)

图 2　脑皮质针刺伤后 7 d, 伤道周围神经毡间隙增大, 线粒体嵴断裂(➡)　(TEM× 6 600)

Fig 2　Spaces of neuropils enlarged, mitochondrion crest broken (➡) 7 d after stab leision　(TEM× 6 600)

图 3　全脑缺血/再灌注后 5 d, 室周区活化的 AST 细胞胞体增大、突起增粗增长　(ICC× 400)

Fig 3　Activated astrocytes in PVZ enlarged with thick and long processes 5 d after IR　(ICC× 400)

图 4　全脑缺血/再灌注后 5 d, 室管膜下区 GFAP 阳性细胞突起伸长　(ICC× 400)

Fig 4　GFAP positive astrocytes of SVZ with long processes 5 d after IR　(ICC× 400)

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

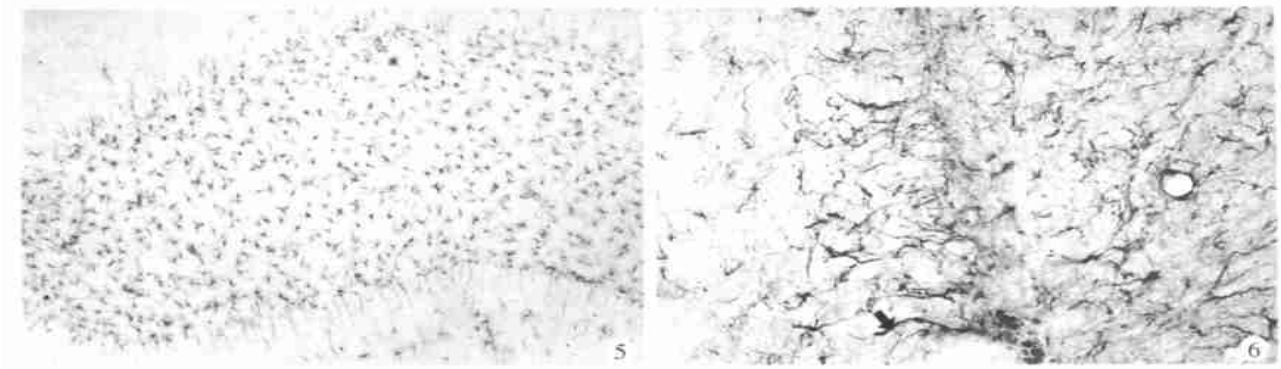


图 5 全脑缺血/再灌注 5 d 海马内 GFAP 阳性细胞胞体增大，突起短而粗 (ICC× 100)

Fig 5 Body of GFAP positive astrocytes in hippocampus enlarged with thick shortened processes 5 d after IR (ICC× 100)

图 6 脑皮质针刺伤后 7 d 伤道周围 GFAP 阳性细胞增多，突起长(➡)、短不等 (ICC× 200)

Fig 6 GFAP positive astrocytes increased and with long(➡) or short processes near the wounded tract 7 d after stab leision (ICC× 200)

表 1 全脑缺血后 GFAP ICC 染色图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Results of image analysis of GFAP stain after IR($\bar{x}\pm s$)

	Control	1~3 d	5~7 d	14 d	30 d
Cortex	1 933±88	4 368±401	5 683±337 *	4 852±137	4 421±456
Hip	2 593±669	5 197±450	9 905±165 * *	7 984±945 *	6 929±105 *
PVZ	2 259±238	6 992±890 *	12 351±158 * *	8 134±340 *	6 435±115 *
SVZ	1 928±76	4 860±265	8 843±384 * *	7 907±298 *	6 040±251 *

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

表 2 针刺伤后伤侧 GFAP ICC 染色图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Results of image analysis of GFAP stain after stab wound in injured side ($\bar{x}\pm s$)

	Control	1~3 d	5~7 d	14 d	30 d
Cortex	1 933±88	3 158±460	9 203±861 * *	9 301±463 * *	4 208±951
Hip	2 593±669	3 802±343	4 842±432	8 733±249 * *	5 623±345 *
PVZ	2 259±238	2 608±637	4 078±265	8 686±278 *	8 619±354 * *
SVZ	1 928±76	2 715±615	4 538±148	9 431±570 * *	7 861±418 *

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

3 讨论

既往的研究表明，引起 AST 活化的原因可能是多方面的，如创伤后脑组织碎片的增多，小胶质细胞迅速活化并释放细胞因子，来自 AST 自身、神经元、单核细胞及粒细胞释放的活性物质等[2]。本实验显示全脑缺血再灌注后 AST 的活化发生较快，于早期(3~5 d)即达高峰，并维持至 30 d，以海马 CA1、CA2 区最显著；而脑皮质针刺损伤后 AST 于 3~5 d 开始活化，术后 14 d 左右达高峰，部位多集中在伤道周围、伤侧侧脑室及室周区。我们的结果与 Van-Beek 及 Hill 等[3,4] 的报道一致。脑皮质针刺伤造成组织与细胞的坏死和炎性细胞浸润多集中在伤道局部，因此引起 AST 活化的诸多因子多在伤道附近释放，而伤后侧脑室及室周区等部位的 AST 活化，可能与活化因子容易通过脑脊液扩散到这些部位有关。我们也观察到全脑缺血早期有广泛多部位的神经细胞肿胀、坏死，后期尤其是海马内出现神经元数目减少，尼氏染色变浅，尼氏体溶解等改变，Beilharz 等[5] 认为是缺血造成延迟性的细胞凋亡，因而这些区域具备更充分的引起 AST 活化的条件，尽管一般认为胶质化形成的瘢痕影响了神经的再生与修复，近年大量研究发现活化的 AST 能分泌包括神经营养因子在内的大量活性物质[1]；同时活化的 AST 具有异质性即在形态结构、生理功能、胞质活性物质、对创伤的反应等方面存在明显的差异性[4]，提示它具有复杂广泛的作用。本实验中我们也注意到两种脑损伤后各部位的活化 AST 在形态上存在明显差异，如脑缺血后海马内活化的 AST 胞体增大、突起增粗且短，呈簇状分布；室管膜下区活化的 AST 仅见突起伸长，似垂柳状。脑皮质针刺伤后，活化的 AST 沿伤道周围排列，突起长短不等、横向生长。这些形态上的差异可能与不同区域脑损伤的程度不同有关；也可能是由于 AST 应答损伤性刺激，上调 GFAP mRNA 造成 GFAP 阴性细胞转变为阳性细胞所致且程度不同的缘故；以及脑缺血时 AST 摄取和代谢受损神经元释放的谷氨酸、K^+ 增多[6]，加上 AST 自身也受损伤而出现肿胀。脑皮质针刺伤后，活化 AST 增多、增长的突起不仅参与了伤后胶质界膜的形成，而且参与了损伤区新生血管的建立，Hill 等[4] 认为这些突起在正常和损伤区之间起特殊的运输作用，有利于创造一种良好的神经修复环境。

GFAP 作为 AST 活化的一个重要特征，其合成的多少对脑损伤程度有直接影响，GFAP 缺失的小鼠对脑缺血性损伤高度敏感[7]。一方面活化的 AST 膜上有 5-羟色胺、γ-氨基丁酸等许多受体，在伤后作用于不同神经递质和神经肽，具有维持脑损伤后内环境的稳定、神经细胞的可塑性和神经递质的作用[8]；另一方面活化 AST 是伤后 AST 自身分泌功能增加的表现，可分泌 NGF、bFGF 和 TGF-β 等生长因子，加速损伤后脑组织的修复[1]，这些因子反过来又刺激 AST 分裂和增生。由此提示 AST 的形态的差异也是与其不同的功能状态相适应。当然也不排除 AST 能分泌某些毒性物质，如

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

S-100 蛋白、NO 等在各种病理情况下的表达被证明对神经细胞有害[9]，加重神经组织的损伤。

总之，研究不同损伤条件下 AST 活化在时间、空间、形态上的差异性，为进一步揭示神经胶质网络在脑损伤及损伤后的修复、再生中的作用机制提供实验室依据，但对反应性 AST 的研究还有许多问题仍待深入。

参考文献：

[1] Pulsinelli W A, Buchan A M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation[J]. Stroke, 1988(19): 913－914.

[2] Culmsee C, Stumm R K, Schafer M K, *et al*. Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage[J]. Eur J Pharmacol, 1999, 379(1): 33－45.

[3] Van-Beek J, Chan P, Bernaudin M, *et al*. Glial responses, clusterin, and complement in permanent focal cerebral ischemia in the mouse[J]. Glial, 2000, 31(1): 39－50.

[4] Hill S J, Barbarese E, McIntosh T K. Regional heterogeneity in the response of astrocytes following traumatic brain injury in the adult rat[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55(12): 1 221－1 229.

[5] Beilharz E J, Williams C E, Dragunow M, *et al*. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss[J]. Mol Brain Res, 1995, 29(1): 1－14.

[6] 韩济生 主编. 神经科学纲要[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1993. 123－196.

[7] Nawashiro H, Brenner M, Fukui S, *et al*. High susceptibility to ischemia in GFAP-null mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(7): 1 040－1 044.

[8] Valentim L M, Michalowski C B, Gottardo S P, *et al*. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunocontent in rat hippocampus[J]. Neuroscience, 1999, 91(4): 1 291－1 297.

[9] Koprowski H, Zheng Y M, Heber-Katz E, *et al*. *In vivo* expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(7): 3 024－3 027.

（编辑　冷怀明）

文章编号：1000-5404(2001)09-1077-01

个案与短篇

镍钛记忆合金网状带膜支架治疗食管恶性狭窄的疗效及护理

Therapeutic effect and nursing of esophageal stenosis with malignant diseases treated by Ni-Ti alloy medical stent

刘龙碧，赵晓晏　（第三军医大学附属新桥医院消化内科，重庆 400037）

我科自 2000-01 开展胃镜下放置国产镍钛记忆合金网状带膜支架（简称支架）治疗食管恶性狭窄 15 例，取得了较好的近期效果，现报告如下。

1　临床资料

1.1　病例选择

本组 15 例唤者，均经胃镜及病理检查确诊为中、晚期食管癌，其中男 9 例，女 6 例，年龄 35～75 岁，平均 61.8 岁。吞咽困难程度采用 Stooler 分级标准，Ⅱ级 3 例、Ⅲ级 8 例、Ⅳ级 4 例。食管上段狭窄 1 例，中段 9 例，下段 5 例。狭窄段长度 4～13 cm，其中＜4 cm 5 例，4～7 cm 7 例，＞7 cm 3 例。狭窄口径 0.3～0.6 cm。

1.2　器械

国产镍钛记忆合金网状带膜支架、支架置入器、savary 锥形硅胶扩张器、导引钢丝、Olympus GIF-XQ230 电子胃镜。

1.3　操作方法

1.3.1　术前准备　术前均做胃镜或上消化道钡餐检查，了解狭窄病灶的内径及长度。禁食、禁饮 8 h 以上，肌注安定、654-2 各 10 mg。

1.3.2　置入方法　先插入胃镜，选择不同型号的扩张器扩张狭窄部至胃镜得以通过，准确定位后退镜，保留导引钢丝，选择支架，同文献报道的方法一样置入支架。

2　结果

本组 15 例均一次置入成功，一次置入成功率达 100%，全部显效，术后患者吞咽困难迅速缓解，经透视、摄片观察，支架多在 3 d 内膨胀到设计直径，所有病例皆能经口进食。观察并发症发现所有患者术后都有轻、中度胸痛及不同程度的反流症状，3 例出现低热，1 例发生吸入性肺炎（经对症治疗后消失）；1 例发生食物嵌顿，经胃镜下处理后再通。本组除术中局部有少量渗血外，未发生大出血与穿孔。随访中 10 例患者死亡，平均生存期 8 个月，死因为肿瘤全身转移和衰竭。4 例已生存 8～10 个月，进食仍通畅，另 1 例失访。

3　护理

3.1　术前护理

①常规胃镜或上消化道钡餐检查确诊。②常规检查心肺功能，血、尿、粪常规。③做好心理护理，交待术中配合方法及注意事项。④禁食、禁饮 8 h 以上。⑤准备好器械、急救物品。

3.2　术后护理

3.2.1　术后并发症的处理　术后常见并发症有反流性食管炎（最常见，为 100%）胸痛、发热、吸入性肺炎，经抗生素、止痛药、制酸剂及粘膜保护剂对症治疗后能很快缓解或消失。但多篇文献报道，术后可能发生食管穿孔、出血、支架移位及堵塞等

（下转 1080 页）

作者简介：刘龙碧（1972－），女，重庆市人，护师。电话：(023)68755604
收稿日期：2001-06-30；修回日期：2001-08-05

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