DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.014
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
398 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0398-03

大鼠慢性脑灌注不足脑内小胶质细胞活化和脑的病理改变

李露斯[1],刘之荣[2] ([1]第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038;[2]兰州军区总医院干三科,兰州 730000)

提 要:目的 探讨慢性脑灌注不足脑内小胶质细胞活化规律与脑病理改变的关系。方法 利用大鼠双侧颈总动脉持久性结扎所致慢性脑灌注不足的动物模型,用OX_{18}抗MHC Ⅰ类抗原和OX_6抗MHC Ⅱ类抗原的免疫组化染色,观察不同脑区小胶质细胞变化规律;用光镜观察脑的病理改变。结果 慢性脑灌注不足可引起脑内小胶质细胞的活化,随着缺血时间的延长,小胶质细胞在皮层和白质的活化有所增加;缺血后脑的病理改变以神经细胞变性、固缩和退变,皮层下白质的神经纤维和髓鞘溃变为主,普遍存在胶质细胞增生,形成胶质小结。经环孢素A治疗后以上变化明显减轻。结论 慢性脑灌注不足所致脑内小胶质细胞的活化与脑内病理改变有关,免疫抑制剂环孢素A对此有一定的治疗作用。

关键词:慢性脑灌注不足;小胶质细胞;病理改变;环孢素A
中图法分类号:R322.81;R743.31 文献标识码:A

Activation of microglia and pathological changes in chronically hypoperfused brain of rats

LI Lu-si, LIU Zhi-rong (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the pattern of activities of microglia, the patholgical changes of chronically hypoperfused brain of rats and the interrelationship between them. Methods Model of chronically hypoperfused brain was established in rat by the ligation of both common carotid arteries, and the histopathological changes of brain were observed with light microscope. The activity of microglia of the brain were also observed with immunohistochemistry method and the number of microglia was measured with image analyzer. Results Extensive activation of microglia was observed after chronic cerebral hypoperfusion and the activation was increased with the elapse of time of hypoperfusion. There were obvious pathological change in the brain after the chronic cerebral hypoperfusion, such as myelinic degeneration and formation of glial nodule in white matter. After treated with cyclosporin A, the number of microglia was obviously reduced, but the pathological change was evidently decreased. Conclusion The activation of microglia resulted from chronic cerebral hypoperfusion is relates to the pathological changes of the brain. However, cyclosporin A can decrease the pathological change and inhibit the activation of microglia.

Key words: chronic cerebral hypoperfusion; microglia; pathological change; cyclosporin A

随着缺血性脑损害机制研究的不断深入,免疫炎症在缺血性脑损害中的作用渐为人们所关注。研究发现小胶质细胞对脑缺血损伤反应迅速,数分钟即被活化[1],在神经元发生致死性损害后转变为阿米巴样小胶质细胞(脑内的吞噬细胞)[2,3]。但这些研究多集中在急性脑缺血损伤上,对可导致多发性脑梗塞和老年性痴呆的慢性脑灌注不足的研究相对不够,尤其是把脑内免疫细胞的活化与脑的病理改变一起研究更鲜有报道。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

实验动物由四川省中药研究所及本校实验动物中心提供。选用健康、老龄Wistar大鼠(月龄12~16个月),雌雄不限,重300~400 g,用于实验。分为对照组、持久双侧颈总动脉结扎1、2、3、4月和治疗组。每组6~12只动物。

1.2 模型制作[4]

参照Ohta等制作慢性脑灌注不足(Chronically cerebral hypoperfused, CCH)的动物模型[1]。大鼠术前12 h禁食,4 h禁水。用20%乌拉坦按800~1 000 mg/kg体重,腹腔麻醉。颈前部去毛消毒后沿颈正中切开,分离出双侧颈总动脉,双重丝线结扎,皮肤常规缝合。治疗组动物采用国产环孢素A胃灌(10 mg/kg),术前1 d、术前各1次;术后1周1次/d;术后2周1次/2 d;术后3周1次/3 d。对照组仅切开颈前,不结扎颈总动脉。

1.3 冰冻切片制作

取缺血1、2、3、4月、对照组和治疗组各3只,20%乌拉坦腹腔深麻醉,生理盐水250 ml经左心室灌注去除血管内血细胞后,用4℃ 4%多聚甲醛200 ml灌注固定后分离出大脑,切去脑干、小脑和嗅脑,正中冠状切开,置入4%多聚甲醛中放置10~12 h,再入10%蔗糖溶液浸泡至沉底,-20℃连续冰冻切片,片厚约20 μm。切片放入0.01 mol/L PBS液中4℃保存备用。

1.4 病理切片制作

取缺血1、2、3、4月、对照组和治疗组各3只,按以上步骤取出大脑,经4%多聚甲醛后固定24~48 h,石腊包埋后切片,片厚约5 mm,行HE染色,光镜观察。

1.5 免疫组化实验

冰冻切片入3%H_2O_2浸泡15 min,去除内源性过氧化物酶活性,0.01 mol/L PBS液漂洗5 min×2次,入10%正常山羊血清封闭室孵育10 min。切片分别与下列单抗OX_{18}(1∶100)抗MHC Ⅰ类抗原,单抗OX_6(1∶100)抗MHC Ⅱ类抗原,37℃孵育1 h并4℃过夜,0.01 mol/L PBS液漂洗5 min×3次,切片入生物素标

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770273)
作者简介:李露斯(1945-),女,黑龙江省哈尔滨市人,主任医师,教授,主要从事缺血性脑血管病的发病机制方面的研究,发表论文26篇。电话:(023)65318301-73070
收稿日期:2000-05-25;修回日期:2000-12-10

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

记的二抗(普通型 S-P 试剂盒, 1∶100), 37℃孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 液漂洗 5 min×3 次。接着切片再与辣根过氧化酶标记的卵白素三抗(普通型 S-P 试剂盒, 1∶100)37℃孵育 30 min, 切片继续在 0.01 mol/L PBS 液漂洗 5 min×3 次。最后切片经 DAB 试剂显色, 显色的切片经表片、风干、脱水及透明后存放备用。

1.6　图像分析

采用重庆大学研制的 Tiger 图像分析仪。检测对照组、持久性双侧颈总动脉结扎后 1、2、3、4 月和治疗组小胶质细胞数量, 每个时相点检测 4 个标本, 每个标本检测皮层、海马、胼胝体和内囊 4 个部位。细胞个数以个/0.3 mm^2 表示。

1.7　统计学处理

采用 SPLM 软件处理。图像分析所得的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 作同部位各组之间方差分析及组内不同部位之间方差分析。

2　结果

2.1　小胶质细胞免疫组化检测分析

对照组未发现 OX_{18}、OX_6 单抗标记的小胶质细胞。缺血 1 月后皮层、海马、胼胝体和内囊处均可见 OX_{18}、OX_6 单抗标记的小胶质细胞活动。以皮层最显著, 见图 1, 其次是海马, 再次是胼胝体和内囊, 形态多呈高分枝状, 部分呈阿米巴状、圆状和杆状, 经统计学处理差异有非常显著性。在梗死区, 小胶质细胞高度聚集, 形态多异, 以阿米巴状、圆状为主, 梗死区周边见高分枝状小胶质细胞聚集。从缺血 1~4 月, 皮层、胼胝体和内囊处小胶质细胞活动增多; 而海马区小胶质细胞活动则减少, 经统计学处理差异有非常显著性。CsA 治疗后皮层、海马、胼胝体和内囊处小胶质细胞活动明显减少, 见图 2, 统计学处理差异有非常显著性。

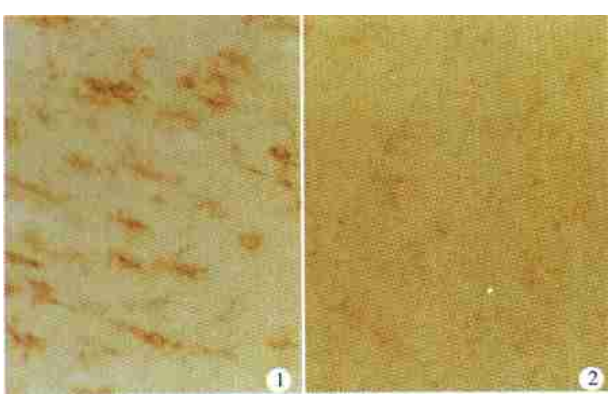


图 1　CCH 1 月后小胶质细胞在皮层广泛活动, 形态多呈高分枝状, 少数呈阿米巴状　(S-P× 200)

Fig 1　After one month of CCH, microglia move extensively in the cortexes, and most of them were highly branched and a few were amoeboid in shape　(S-P× 200)

图 2　CsA 治疗后小胶质细胞在皮层的活动显著减少, 形态多呈高分枝状　(S-P× 200)

Fig 2　After treated with cyclosporin A, the activity of microglia reduced in the cortexes and most microglia were highly branched　(S-P× 200)

2.2　病理检查分析

光镜检查对照组未发现明显的病理变化。缺血 2 个月后皮层下、内囊区及海马区白质出现较大的软化灶, 伴有胶质细胞和小血管增生, 其它白质内散在胶质细胞增生小结。灰质内见单个或多个神经元缺血性改变, 胞体呈三角形, 胞浆致密, 周围出现空晕, 见图 3。缺血 4 个月后, 皮层和白质梗死发生率无明显变化, 但皮层和海马处神经元固缩、退变更明显, 神经纤维、髓鞘溃变增多。同时, 胶质细胞增生小结增多, 并出现噬神经细胞现象, 见图 4。CsA 治疗后皮层内偶见小软化灶, 散在小胶质细胞结节, 其它无明显病变。

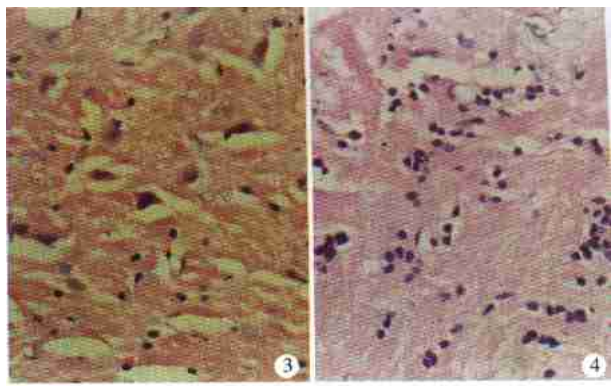


图 3　CCH 2 月后灰质内神经元缺血性改变, 胞体呈三角形, 胞浆致密, 周围出现空晕　(HE× 400)

Fig 3　After two months of CCH, ischemic change took place in the neurons of grey matter　(HE× 400)

图 4　CCH 4 月后皮层内胶质增生小结增多, 并出现噬神经细胞现象　(HE× 400)

Fig 4　After four months of CCH, the number of glial nodules were incresed　(HE× 400)

3　讨论

3.1　慢性脑灌注不足后脑内小胶质细胞的活化

正常情况下脑内小胶质细胞处于静止状态, 不具备吞噬细胞的功能[6], 而单核吞噬细胞又被阻隔于血脑屏障之外, 使得正常状态下脑内免疫处于低水平, 脑组织免受免疫介导的损害。本实验中, 缺血区出现不同形态的小胶质细胞, 有圆状、阿米巴状、杆状和高分枝状。圆状、阿米巴状及杆状小胶质细胞代表完全活化的小胶质细胞, 高分枝状小胶质细胞则代表部分活化的小胶质细胞[6]。圆状、阿米巴状及杆状小胶质细胞分布在梗死区, 而高分枝状小胶质细胞则散在分布在广大无梗死的区域, 提示小胶质细胞的形态能反映慢性脑灌注不足脑损害的部位和严重性。从缺血 1~4 月, 皮层和白质区小胶质细胞渐增多, 尤其在梗死区更明显, 而海马区小胶质细胞数量则下降, 提示缺血损害是渐进发展的, 主要表现为皮层和白质的损害。小胶质细胞转化为吞噬细胞可以清除坏死的神经元, 保护周围存活的神经元的完整性; 但活化的小胶质细胞通过释放氧自由基、一氧化氮、蛋白酶、炎症细胞因子而行使细胞毒效应; 也可通过分泌神经生长因子支持组织修复[7]。本实验结果还发现, 圆状、阿米巴状及杆状小胶质细胞与缺血梗死高度相关, 而高分枝状小胶

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

质细胞分布区未见梗死，这与 Kato 等[8]报道的完全活化的小胶质细胞有杀伤神经元效应，而中等活化的小胶质细胞则没有杀伤神经元效应的结论是一致的。本实验的另一个发现是慢性脑灌注不足后小胶质细胞 MHC 抗原表达上调，在对照组，无 MHC Ⅰ、Ⅱ抗原阳性的小胶质细胞出现。而慢性脑灌注不足后小胶质细胞 MHC 抗原表达明显上调。MHC 抗原的表达提示脑内免疫应答水平的提高，是 T 细胞参与脑内免疫应答的基础。

3.2 慢性脑灌注不足后脑的病理改变

本实验发现，持久缺血 2 个月后，皮层和海马神经元出现缺血性固缩、退变，4 个月后这种变性更为明显。持久缺血 2 个月后，白质内出现散在的神经纤维及髓鞘的溃变，神经毡内出现软化灶，缺血 4 个月后这种溃变加重，神经毡内软化灶增多。可以认为这些损害源于慢性缺血效应。另一种发现是，胶质细胞增生，形成增生小结，缺血 2～4 月明显加重，考虑这是一种代偿作用。一方面形成胶质疤痕，填充神经细胞丢失的空间；另一方面增生的胶质细胞对存活的神经元起支持营养作用。

3.3 慢性脑灌注不足后脑的病理改变和免疫细胞活化的关系

免疫炎症反应是脑缺血级联反应的一环。白细胞从血中迁移至脑实质及小胶质细胞的激活是脑缺血免疫炎症反应的最重要的两个过程。本实验发现大鼠持久性双侧颈总动脉结扎诱导的慢性脑灌注不足脑内相应的缺血区出现的小胶质细胞的激活；组织损伤重的区域，小胶质细胞高度活化，形态多样；组织损伤轻的区域，小胶质细胞部分活化，多呈高分枝状。随着缺血的演进，小胶质细胞在皮层和白质处的活化渐进增多，在海马的活动减少。提示慢性脑灌注不足后免疫细胞，尤其是小胶质细胞在脑白质损害中起重要作用。

3.4 慢性脑灌注不足药物干预治疗

CsA 作为一种免疫抑制剂，被广泛用于自身免疫疾病的治疗，疗效肯定。但先前少用于脑缺血的防治。本实验发现，经 CsA 治疗后免疫细胞的活动明显减弱，表达 MHC 抗原的小胶质细胞数量大大减少，活化程度减低。同时，病理改变较未治疗组明显减轻，仅见个别的神经元固缩、退变，出现小的梗死灶，白质损害轻，胶质细胞增生小结减少。提示，免疫抑制剂 CsA 可减轻慢性脑灌注不足后脑内免疫细胞的活化，防止由这些免疫细胞活化而诱发的脑损害。

参考文献：

[1] Morioka T, Kalehua A N, Streit W J. The microglia reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1991, 11(3): 966－973.

[2] Giulian D. Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system[J]. J Neurosci Res, 1987, 18(1): 155－171.

[3] Streit W J. Microglia-neuronal interactions[J]. J Chem Neuroanat, 1993, 6(1): 161－266.

[4] 李露斯，刘之荣，肖桃元. 大鼠慢性脑血流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): 805－807.

[5] Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg G W. Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1995, 20(3): 269－287.

[6] Morioka T, Kalehua A N, Streit W J. Progressive expression of immunomolecules on microglial cells in rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia[J]. Acta Neuropathol Berl, 1992, 83(2): 149－157.

[7] Gehrmann J, Banati R B, Wiessner C, *et al*. Reactive microglia in cerebral ischemia: an early mediator of tissue damage[J]? Neuropathol Appl Neurobiol, 1995, 21(4): 277－289.

[8] Kato H, Kogure K, Araki T, *et al*. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemia tolerance[J]. Brain Res, 1994, 664(1-2): 69－76.

[9] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia[J]. Brain Res, 1994, 653(2): 231－236.

（编辑 薛国文）

（上接 397 页）

fl（$P<0.01$），加服叶酸后恢复正常（90.8±2.5）fl；6 例无效者 HCT、Hb 较加叶酸前稍上升，但差异无显著性（$P>0.05$），MCV 无明显变化（$P>0.05$）；6 例骨髓穿刺示增生不良 4 例，增生活跃 2 例，未见明确血液系统疾病。

治疗前叶酸、$VitB_{12}$水平，利用放免法测定的治疗前叶酸、$VitB_{12}$水平均在正常范围。

3 讨论

EPO 治疗肾性贫血尽管取得了较好的疗效，但影响 EPO 疗效的因素很多，已知的如感染、铁缺乏、甲状旁腺功能亢进等现已受到足够重视[2]。那么，补充叶酸的疗效和补充的临床和实验室指征有待探讨。我们在治疗前检测所有患者叶酸的水平均在正常范围，但在 EPO 治疗无效者中，补充叶酸后，大多数病人 Hb、HCT 较前明显改善，往往是那些 MCV 增大者疗效明显，尽管铁过多可导致 MCV 增加，但我们检测血清铁、铁蛋白均正常，且补充叶酸后 MCV 恢复正常，因而排除铁过剩引起的 MCV 改变。根据我们的临床研究，当 EPO 治疗期间存在疗效不佳时和 MCV 增大时，高水平的叶酸是必需的，补充叶酸可改善 EPO 的疗效，有效率提高 20%。在我们临床观察中，仍有部分疗效欠佳，骨髓检查未见明显异常，可能与肾性贫血时 EPO 受体异常有关[3]，说明影响 EPO 疗效的因素仍需探讨。

关键词：叶酸；促红细胞生成素；肾性贫血
中图法分类号：R692.063 文献标识码：B

参考文献：

[1] Winearls C G, Oliver D O, Pippard M J, *et al*. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis[J]. Lancet, 1986, 2(8 517): 1 175－1 178.

[2] Erslev A J, Besarab A. The rate and control of baseline red cell production in hematologically stable patients with uremia[J]. J Lab Clin Med, 1995, 126(1): 283－286.

[3] 吕秋军，叶棋浓，温利清. 慢性肾功能衰竭对大鼠红细胞生成素受体基因表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志，1999, 15(1): 21－23.

（编辑 陈聪连）

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