DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.005
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
826 2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)09-0826-05

创伤性脑损伤诱导海马细胞凋亡模型的建立

王国强,廖维宏,李 芳,沈 岳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 建立用于研究创伤性脑损伤诱导海马细胞凋亡的模型。方法 Wistar大鼠单侧大脑皮质承受不同高度(2、5、和10 cm)下落的10 g重锤打击(皮质压缩幅度3 mm),致轻、中、重度脑损伤。观查1~7 d脑含水量、组织病理学变化及原位末端标记法(TUENL)检测伤侧海马凋亡细胞的变化。结果 伤侧皮质和海马损伤程度与重锤下落的高度有关,轻、中度损伤各时相点脑含水量无明显变化,重度损伤组3~7 d脑含水量显著高于轻、中度损伤组。2 cm·10 g仅致皮质轻微挫伤;5 cm·10 g致皮质挫裂伤,而海马结构正常;10 cm·10 g使皮质及海马均发生挫裂伤。电镜下凋亡小体的呈现以及海马TUNEL阳性呈色反应出现于中度损伤组的各时相点,而轻度和重度损伤组凋亡小体及TUNEL阳性反应的呈现则不明显。结论 中度重锤打击损伤可有效诱导伤侧海马发生凋亡样细胞死亡。

关键词:创伤性脑损伤;海马;凋亡;模型
中图法分类号:R-332;R329.25;R651.15 文献标识码:A

Establishment of hippocampal cellular apoptosis model induced by traumatic brain injury in rats

WANG Guo-qiang, LIAO Wei-hong, LI Fang, SHEN Yue (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish a model of traumatic brain injury for studying hippocampal cellular apoptosis. Methods Mild, middle and severe brain injury were established by a 10 g weight bar dropped from 2 cm, 5 cm, and 10 cm, respectively, upon the Wistar rat's cortex of brain, the compression of the cortex was limited to 3 mm. Changes of water contents of brain and histopathology were observed and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling 1 d to 7 d post-injury were studied. Results Degree of damage of cortex and hippocampus ipsilateral to the focus was related to the height from which the bar was dropped. Brain water-contents had few changes in groups of mild and middle, except group of severe which was significantly increased as compared with that of the formers. Strike with 2 cm·10 g led to cortex slight contusion without hippocampus injury. Hit with 5 cm·10 g brought about cortex contusion and laceration and kept hippocampus intact. 10 cm·10 g caused both cortex and hippocampus damages. Changes of apoptotic body and TUNEL positive reactions were found in groups of middle at each time-point, but which was not obvious in mild or severe groups. Conclusions Traumatic brain injury caused by middle weight-drop can effectively induce hippocampal cellular apoptosis.

Key words: traumatic brain injury; hippocampus; apoptosis; model

正常发育过程中的细胞凋亡,以及内外界环境改变所诱导的细胞凋亡信号介导机制是当今神经科学研究的热点之一。严重创伤性脑外伤(Traumatic brain injury, TBI)的结局不单纯取决于神经元所受的物理损伤的程度,还取决于神经内分泌、血流动力学、能量代

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670740)
作者简介:王国强(1959-),男,山西省沁县人,博士,副主任医师,主要从事中枢神经系统损伤与修复方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68757433
收稿日期:2000-01-05;修回日期:2000-05-06

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

谢及神经化学等方面改变所致的迟发性神经元损害[1,2]。目前对于 TBI 后海马迟发神经元死亡的方式, 海马神经元凋亡的时空特点及其发生发展机制, 以及海马细胞凋亡信号传导机制等均不很清楚。因此, 建立 TBI 诱导海马细胞凋亡的实验模型, 对于研究创伤后海马迟发神经元死亡、对于进一步了解 TBI 的发生发展机制及有效治疗措施都非常重要。

1　材料与方法

1.1　动物与分组

Wistar 大鼠, 雌雄不拘, 体重 218～246 g (第三军医大学第三附属医院实验动物中心提供)。随机分为假手术组(8 只)和损伤组。损伤组根据打击参数的不同分为轻度、中度和重度损伤组, 各组设伤后 1、3 和 7 d 3 个时相点, 每组 8 只动物。1 只用于电镜检查, 3 只用于脑水肿检测, 4 只用于 TUNEL 法凋亡细胞检测及 HE 染色。

1.2　模型制备

1.2.1　打击装置　　Allen's 打击法, 加以修改致伤, 见图 1。打击锤是一根直径 4 mm 的铜棒, 将其一端绕圆心磨制成直径 2.5 mm、长 3.5 mm 的打击头, 铜棒总重量 10 g。致伤时, 重锤的头端向下穿过一根内径 5 mm 的导向玻璃管。玻璃管下端固定一个 0.5 mm 厚 U-型铜片, 铜片正对玻璃管下口处开一个直径为 3.3 mm 圆孔。铜片限制重锤下落时对脑形成的压缩幅度为 3 mm。

1.2.2　致伤过程　　术前自由进食水。动物称重后, 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉。固定大鼠于立体定位头架(ST-7 Setagaya-Ku, Tokyo-Japan)。头顶部备皮, 0.1%新吉尔灭局部消毒。沿正中线切开头皮, 切口长 2 cm。牙科台式电钻机(307-2B 型, 上海医疗器械厂), 1.5 mm 钻头(转速 4 000 r/min)于前后囟之间、中线右旁 2.5 mm 处钻开颅骨, 见图 2, 以此为中心, 用蚊式血管钳咬开直径为 5 mm 的圆形骨窗, 保持硬脑膜完整。

打击装置保持直立, U-型铜片下面接触颅骨, 圆孔正对准骨窗, 打击头从 2、5 或 10 cm 高度经导向管垂直落向骨窗下的硬脑膜。打击后, 立即移去打击装置。假手术组开骨窗后不进行打击致伤。

切口处滴注 4 万 U 注射用硫酸庆大霉素 3～4 滴, 缝合切口。手术全过程 10～15 min。麻醉后及手术期间, 100 W 白炽灯保持肛温 37 ℃。术后动物放在 27 ℃孵育箱内至苏醒, 分笼饲养。

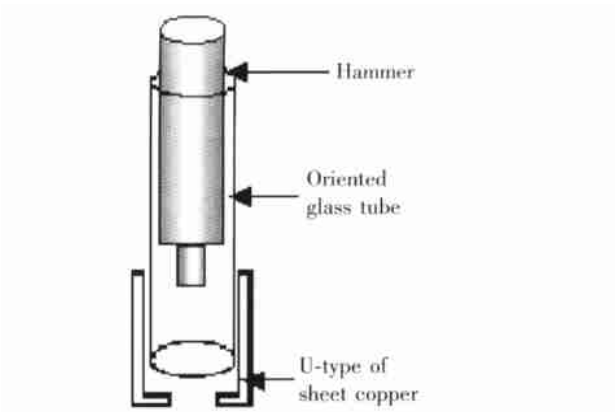


图 1　打击装置

Fig 1　Strike device

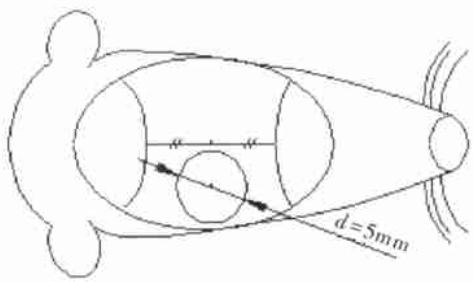


图 2　开颅部位

Fig 2　Position of cranial fenestra

1.3　取材及固定

动物按实验设计到达时相点后, 动物称重, 乙醚麻醉。根据实验分组, 用于不同实验的标本取材方法如下。

1.3.1　用于电镜检测的动物　　4 ℃生理盐水 300 ml 及 4 ℃ 2.5%戊二醛/2%多聚甲醛 300 ml 经左心室快速灌注固定, 取脑。切取打击部位及对侧相应部位的大脑皮质和其正下方的海马组织块, 2.5%戊二醛 4 ℃后固定。

1.3.2　用于光镜检查及 TUNEL 凋亡细胞检测的动物　　4 ℃生理盐水 300 ml 及 4 ℃ 4%多聚甲醛 300 ml 经左心室快速灌注固定, 取脑。4%多聚甲醛 4 ℃后固定。

1.4　脑含水量(湿-干重)检测

按 Mansfield 等[3]的方法检测脑湿-干重, 按下述公式计算脑水含量:

$$\omega(H_2O)=\frac{\text{湿重}-\text{干重}}{\text{湿重}}\times 100\%$$ [4]

1.5　组织病理学检查

1.5.1　光镜检查　　按文献[5]介绍的方法进行脑标本的石蜡包埋、切片及 HE 染色, 光镜观察。

1.5.2　电镜检查　　2.5%戊二醛固定的标本经水洗后, 丙酮脱水, 环氧树脂 618 包埋, 半薄及超薄切片, 透射电子显微镜

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

观察。

1.6 TUNEL法凋亡细胞原位检测

原位末端标记检测凋亡细胞DNA，按试剂盒说明进行操作。

1.7 统计学处理

各种染色重点观察右侧大脑皮质(18a区)和右侧海马(CA1、CA3、DH区)，结果采用图像半定量分析，组间差异采用单因素方差分析及Student's *t* test。所用统计包为Original Statistics 5.5。

2 结果

2.1 一般情况

致伤前及致伤后动物体重无组间差异。伤后3～4 h动物苏醒，活动少；伤后次日动物均可自由进食、饮水，无肢体瘫痪或活动受限。2 d后，动物的饮食活动与伤前相比差别不明显。轻度损伤组动物无死亡，中度损伤组2只动物死亡(2/24)。重度损伤损伤组死亡11只，占该组的41.83%。死亡动物均如数补足。

2.2 脑含水量改变见表1

表1 脑含水量检测结果[$\omega(H_2O)$/%，$n=3$，$\bar{x}\pm s$]

Tab 1 Changes of water contents of brain[$\omega(H_2O)$/%，$n=3$，$\bar{x}\pm s$]

Group		Time after injury		
		1 d	3 d	1 week
Control	R	79.51±0.82	80.78±0.89	80.34±0.80
	L	79.45±0.85	79.53±0.93	80.82±0.64
Mild	R	78.91±1.04	80.60±1.10	80.07±0.72
	L	78.81±0.94	79.96±0.62	80.06±0.93
Middle	R	80.24±0.71	80.35±0.95	80.40±0.92
	L	78.45±0.54	79.59±0.93	80.34±0.90
Severe	R	78.63±0.96	82.62±0.84[ac]	83.16±0.95[bc]
	L	79.70±1.02	80.41±0.82	80.69±0.88

Mild, middle and severe injury index strike of 10 g·2 cm, 10 g·5 cm, and 10 g·10 cm, respectively; R: Right side; L: Left side; a: $P<0.05$; b: $P<0.01$ *vs* control; c: $P<0.05$ *vs* L

2.3 病理形态学改变

2.3.1 大体观察 打击后即刻，轻度损伤组受力点3～4 mm^2范围渗血。中度及重度损伤组1 min内，受力点处硬脑膜呈紫红色，明显肿胀，局部急性硬膜下血肿形成，见图3 A。数分钟后渗血自动停止。伤后3 d，中度和重度损伤组血肿液化，局部皮质缺损，形成直径约3 mm的空洞，见图3 B～D，取脑时颅底稍有粘连。

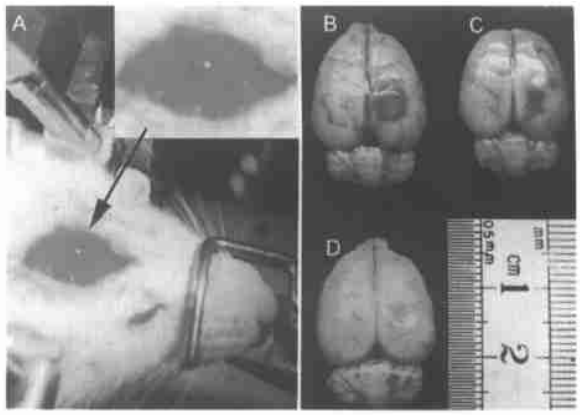


图3 中度脑损伤(锤重10 g，下落距离5 cm)所致急性硬膜下血肿

A：伤后即刻；B：伤后1 d；C：伤后3 d；D：伤后1周

Fig 3 Acute subdural hematoma caused by middle degree injury (10 g·5 cm weight drop)

A: Immediately after injury; B: 1 d, C: 3 d, D: 1 week after injury

2.3.2 光镜观察 轻度损伤组无明显改变，中度和重度损伤组致伤点处大脑皮质明显挫裂伤，残存皮层内及邻近皮层内神经细胞肿胀、部分核固缩，细胞间隙增大，可见弥散性出血、渗出及白细胞浸润。少量血细胞沿海马槽向下，沉积在侧脑室附近。中度组海马齿状回、上下颗粒细胞层内散在核固缩细胞，见图4 A、B，重度组海马各区明显细胞肿胀、散在出血，见图4 C、D。

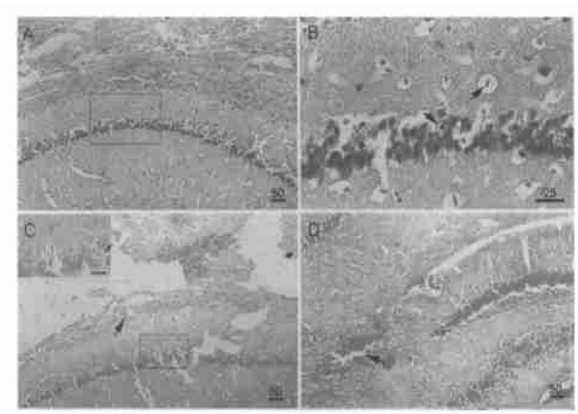


图4 脑损伤后海马病理形态学改变

A、B：中度脑损伤(锤重10 g，下落距离5 cm)，海马细胞核固缩(箭头)；C、D：重度脑损伤(锤重10 g，下落距离10 cm)，海马挫裂伤(箭头)及散在出血(箭头)(A，C，D：HE×100；B：HE×400)

Fig 4 Pathological changes of hippocampus after brain injury

A and B: 10 g·5 cm injury, pyknosis of hippocampl cellular nucleolus (arrow); C and D: 10 g·10 cm injury, contusion and laceration of hippocampus (arrow), and scattered haemorrhage (arrow)(A, C, D: HE×100; B: HE×400)

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

2.3.3　电镜检查　　轻度损伤组海马超微结构基本正常。中度损伤组伤后各时间点均可于伤侧海马见到体积小于正常、呈固缩状态、胞浆内有大量颗粒及空泡的凋亡细胞, 及"凋亡小体", 见图 5 A, 细胞器基本正常。重度组除可见到凋亡样改变外, 尚可见到明显的细胞肿胀, 部分细胞破裂, 见图 5 B。

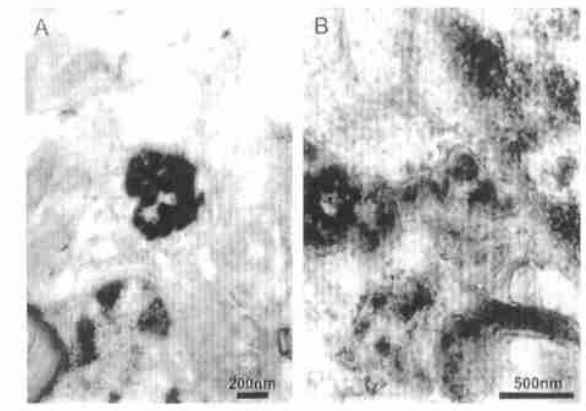


图 5　脑损伤后海马细胞超微结构的改变

A: 中度脑损伤(锤重 10 g, 下落距离 5 cm), 可见凋亡小体; B: 重度脑损伤(锤重 10 g, 下落距离 10 cm), 可见细胞崩溃　(A: TEM× 8 000; B: TEM× 19 000)

Fig 5　Ultrastructural changes of hippocampal cells after brain injury

A: Apoptotic body in middle injury; B: Cellular disintegration in severe injury　(A: TEM× 8 000; B: TEM× 19 000)

2.4　TUNEL 检测结果

假手术组及轻度损伤组伤侧海马细胞无明显凋亡样改变, 中度损伤后 1~7 d 均可见到显著的 TUNEL 阳性标记, 见图 6 A~D, 重度组伤侧海马仅有少量 TUNEL 阳性细胞。

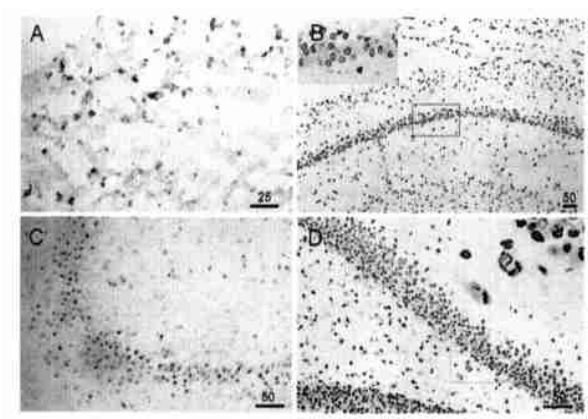


图 6　中度脑损伤后(锤重 10 g, 下落距离 5 cm), TUNEL 阳性反应细胞

A: 大脑皮质; B~D: 分别为海马 CA1 区、CA3 区和齿状回门区(A, C: TUNEL× 100; B, D: TUNEL× 200)

Fig 6　TUNEL positive cells after middle injury (10 g·5 cm)

A: Cerebral cortex; B~D: CA1, CA3 and dentate gyrus hila area of hippocampus (A, C: TUNEL× 100; B, D: TUNEL× 200)

3　讨论

脑损伤研究中采用的模型有许多种, 气压[4]或液压冲击[6]致单侧或双侧脑损伤模型虽然可诱导海马神经元发生凋亡, 但存在着损伤范围广泛、模型制备过程需要专用致伤装置、操作相对复杂等缺点。

本模型在 Allen's 重锤下落致伤模型基础上略加修改, 玻璃导管下端增加的"U"铜片限定了重锤下落时对大脑皮质形成的压缩幅度, 从宏观上将损伤深度控制在大脑皮质。铜片与玻璃导管下端之间的空隙也很重要, 在铜棒自由下落时起到疏导玻璃管内空气从而降低管内空气阻力的作用, 从而最大程度地保证了自由落体对脑组织的打击负荷。

轻度损伤(10 g·2 cm)仅致皮质内少量散在出血, 电镜下观察海马正常, TUNEL 检测不出凋亡细胞。这种程度的损伤, 不能诱导海马细胞凋亡。

重度损伤(10 g·10 cm)局部皮质和海马都出现严重挫裂伤, 伤后 3 d 及 1 周脑含水量明显高于对照组。HE 染色以电镜观察都证实重度损伤时, 海马出现原发性细胞死亡。TUNEL 检测呈现较弱的阳性反应。

中度损伤(10 g·5 cm)组各时间点脑含水量左右侧比较、与对照组比较均无明显差异。伤后立即(1 min 内)虽然在局部形成急性硬膜下血肿, 但 HE 染色及光镜检查证实, 挫裂伤局限在伤侧受力点处的大脑皮质, 邻近的大脑皮质及其下方的海马结构无明显原发损伤, 伤后 1 d 至 1 周海马 CA1 区锥体细胞层及海马 DH 区的腔隙分子层可见到细胞萎缩、核固缩, 标志着细胞凋亡的病理改变, 各时相点 TUNEL 阳性反应非常明显。

决定细胞以坏死方式或以凋亡方式死亡的因素很多, 如细胞所处的发育阶段、细胞类型、氧化代谢情况及线粒体损伤程度, 即神经元或胶质细胞的病理性凋亡的发生与刺激的强度有关, 较轻的刺激可诱导凋亡, 而较重的刺激则可诱导细胞坏死[7,8]。

本研究表明, 打击致中度脑损伤的动物模型制备过程简单, 不需要特殊的设备, 稳定性好, 重复性好, 感染率及死亡率均较低, 对脑含水量及体重无明显影响, 可有效诱导海马细胞发生凋亡性死亡。因此, 可以用于创伤性脑损伤后海马细胞凋亡机制的研究。

模型存在的不足在于: 伤后局部遗留的开放骨窗相当于临床的紧急减压措施, 从而明显影响脑水肿形成, 这不符合临床未经处理的急性闭合性颅脑创伤病理过程。

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

解决这一问题的方法，可采用牙科封固剂在打击后封堵骨窗，但骨窗封闭后对脑含水量改变的影响及其脑含水量改变与海马细胞凋亡之间的关系有待进一步研究。

参考文献：

[1] Teasdale G M, Graham D T, Graniocerebral trauma: protection and retraival of the neuronal poputation after injury[J]. Neurosurgery, 1998, 43(4): 723—737.

[2] Jordan J, Galindo M F, Prehn J H M, *et al*. p53 expression induces apoptosis in hippocampal pyramidal neuron culture[J]. J Neurosci, 1997, 17(4): 1 397—1 405.

[3] Mansfield R T, Schiding J K, Hamilton R L, *et al*. Effects of hypothermia on traumatic brain injury in immature rats[J]. J Cereb Blood Flow Meta, 1996, 16(6): 244—252.

[4] Duvadevani R, Roof R L, Fulop Z, *et al*. Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: does hormonal status play a role[J] ? J Neurotrauma, 1995, 12(1): 65—75.

[5] 王国强，邵淑琴，姜燕平. 苏木素在体染色在全脑缺血模型的应用[J]. 第三军医大学学报，1997，10(2)：184—185.

[6] Perri B R, Smith D H, Murai H, *et al*. Metabolic quantification of lesion volume following experimental traumatic brain injury in the rat [J]. J Neurotrauma, 1997, 114(1): 15—22.

[7] Montal M. Mitochondria, glutamate neurotoxicity and the death cascade[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1 366(1—2): 113—126.

[8] Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, *et al*. Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells[J]. Glia, 1999, 25(2): 154—164.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)09-0830-01

垂体腺瘤合并脊髓毛细血管瘤1例

A case of pituitary adenoma associated with capillary hemangioma in the spinal cord

陈立朝，邹咏文，许民辉，陈广鑫 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经外科，重庆 400042）

患者男性，64岁，因性欲减退3年，双下肢乏力5 d入院。查体：皮肤细腻，双眼视力1.0，无视野缺损，双眼底未见异常，双侧T_4平面以下痛觉减退，双下肢肌力Ⅳ级，头颅MRI提示：鞍区肿瘤，由鞍内向鞍上发展，呈束腰状，大小约2 cm×2.5 cm×2.5 cm，注射Gd-DTPA后包膜有明显增强效应，瘤实质不均匀增强；胸椎MRI提示：T_{3-4}髓外硬膜下肿瘤，大小约2 cm×0.5 cm×1 cm，边界清楚，注射Gd-DTPA后表现为条索状不均匀增强效应。术前诊断考虑为垂体腺瘤合并胸椎管内神经鞘膜瘤，先行胸椎管内肿瘤切除术，术中见肿瘤位于胸髓左后外侧，呈粉红色块状，与神经根及脊髓粘连较紧，基底部在软膜上，仔细分离，完整切除肿瘤，病理报告为毛细血管瘤。术后1月双下肢肌力恢复至Ⅴ级，行右翼点入路垂体腺瘤切除术，术后病理报告为混合型垂体腺瘤(ACTH+PRL)，术后1月行局部放疗。

作者简介：陈立朝(1971—)，男，湖南省沅江市人，医师，主要从事脑外伤后继发性脑损害方面的研究。电话：(023)68757666

收稿日期：1999-10-05；修回日期：2000-03-08

讨论

垂体腺瘤合并脊髓毛细血管瘤的病例文献未见报道。仔细询问病史，认真查体结合相应辅助检查，对本例病人不难作出诊断[1~2]，否则有可能将胸椎管内肿瘤漏诊。至于先做哪个部位的手术，应根据哪个部位肿瘤的病情严重优先手术。本例病人胸椎管内脊髓毛细血管瘤导致双侧T_4平面以下痛觉减退，双下肢肌力Ⅳ级，且有恶化趋势，而垂体腺瘤仅有内分泌改变，无视力视野改变，故先切除胸椎管内脊髓毛细血管瘤。

关键词：垂体腺瘤；脊髓毛细血管瘤；外科治疗
中图法分类号：R736.406 文献标识码：B

参考文献：

[1] 隋帮森 主编. 磁共振诊断学[M]. 北京：人民卫生出版社，1995. 234—239，550.

[2] 王忠诚 主编. 神经外科学[M]. 武汉：湖北科学技术出版社，1998. 501—505，844—846.

（编辑 冯崇英）

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