DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.022

犬脑干缺血后细胞内钙含量和超微结构的改变

何 英 王东武 邓志宽 (第三军医大学附属新桥医院神经内科)重庆,630037
张 蔚 (第三军医大学预防医学系统计学教研室)重庆,630038

提 要 通过建立犬脑干局灶性缺血模型,采用原子吸收分光光度法(AAS)测量脑组织细胞内钙含量[Ca^{2+}]i并观察了电镜下神经元超微结构的改变。结果表明脑干缺血后,Ca^{2+}内流,细胞内钙含量([Ca^{2+}]i)增高,且神经元超微结构发生破坏,脑干缺血时间越长,脑组织细胞内钙含量越高,神经元超微结构破坏越严重。

关键词 脑缺血;钙;细胞内含量;神经病理学
中图法分类号 R743.31

起始于80年代初的神经细胞损伤与钙稳态失调关系的研究,经过大量的实验探索和临床实践,现认为细胞内钙离子浓度增高可能是产生神经元死亡的最后径路[1]。

基底动脉缺血所致的脑干功能障碍是脑血管病的主要死亡原因之一,由于脑干缺血模型制作困难,实验条件高,且多应用鼠、猫等动物,国内外研究不多。我科已成功建立了犬脑干局灶性缺血模型,本实验拟就脑干缺血后细胞内钙含量([Ca^{2+}]i)和超微结构的变化进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

采用成年杂种健康犬25只,雌雄不限,体重10～14 kg(第三军医大学新桥医院实验动物中心提供),随机分成假手术对照组(SH组),脑干缺血后0.5、3、6、12 h组,每组5只动物。

1.2 脑干局灶性缺血模型的建立

犬脑干血液供应非常丰富,当犬双侧椎动脉和颈内动脉完全结扎后,通过侧枝循环,脑干仍有充分的血液供应,因而犬脑干缺血模型建立困难。我科在Branstm和Kuwabara及Joan的基础上经过多年研究不断改进,经一个入路,同时结扎基底动脉的上下端,下端包括小脑下动脉,建立了较简单的犬脑干缺血模型[2,3]。经氯化-2,3,5-三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride,TTC)灌注染色显示:脑桥下部延髓整个断面染色明显较浅,背外侧部更淡,而颈髓和中脑以上区域均染成鲜红色。在光镜下可见局灶性严重缺血性损害,电镜下见耳蜗核处也有严重缺血性改变。本实验模型缺血可靠,制作较简单,重复性和动物耐受性好,可进行脑干缺血方面的研究。

用3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)静脉麻醉犬,行股静脉插管,维持通道以补液及追加麻醉药物。行气管切开术并插管,犬取仰卧位,头部过伸,取颈前正中切口,逐层分离皮肤、皮下组织、肌肉,咬断舌骨,暴露颅底及枕骨大孔,用咬骨钳由枕骨大孔腹侧向前开3 cm×0.5 cm的条形骨窗,切开硬膜,暴露基底动脉下端,再逐一夹闭基底动脉中段和上段。证实银夹确实夹闭基底动脉后,分层缝合,模型建立完毕。假手术组暴露基底动脉后不予结扎,其余操作相同。

实验中犬股动脉插管接LMS-2B型二导电生理记录仪,连续监测血压,动脉采血用美国IL-130型pH-血气分析仪监测缺血前后PO_2和PCO_2,维持PO_2在12 kPa以上,PCO_2在4～5.3 kPa之间,并监测心率和肛温,其中缺血组2只犬由于呼吸抑制故辅以呼吸机改善通气。

1.3 取材与测定

1.3.1 脑组织细胞内钙含量([Ca^{2+}]i)的测定 脑干缺血后0.5、3、6、12 h及SH组观察12 h后,行双侧颈总动脉、椎动脉插管,用三蒸水配制分析纯0.9%的NaCl溶液作为灌流液而灌流1 h,用量3000 ml,尽量冲洗去胞外钙。取桥脑下端与延髓上端交界靠中线处约1 g湿组织,剔除软脑膜,置于37℃镧离子(La^{3+})溶液[其组成(mmol/L):NaCl 122,KCl 5.9,$MgCl_2$ 1.25,Glucose 11,$LaCl_3$ 50,Tris 15,pH 7.4]中温育0.5 h,以此将大部分胞外钙置换掉。脑组织块呈瓷白色,取出后用灌流液冲洗3次,置于72℃烤箱3 d至恒重后称重。将干燥脑组织以1∶1(体积比)在硝酸溶液中消化24 h,常温下以50 g离心0.5 h,取其上清液以0.5%$LaCl_3$－0.1 mmol/L HCl溶液以1∶5的比例稀释后,在IL-951型原子吸收分光光度计上测定脑组织细胞内钙含量,结果以每克干组织所含[Ca^{2+}]i的μg量即μg/g表示。

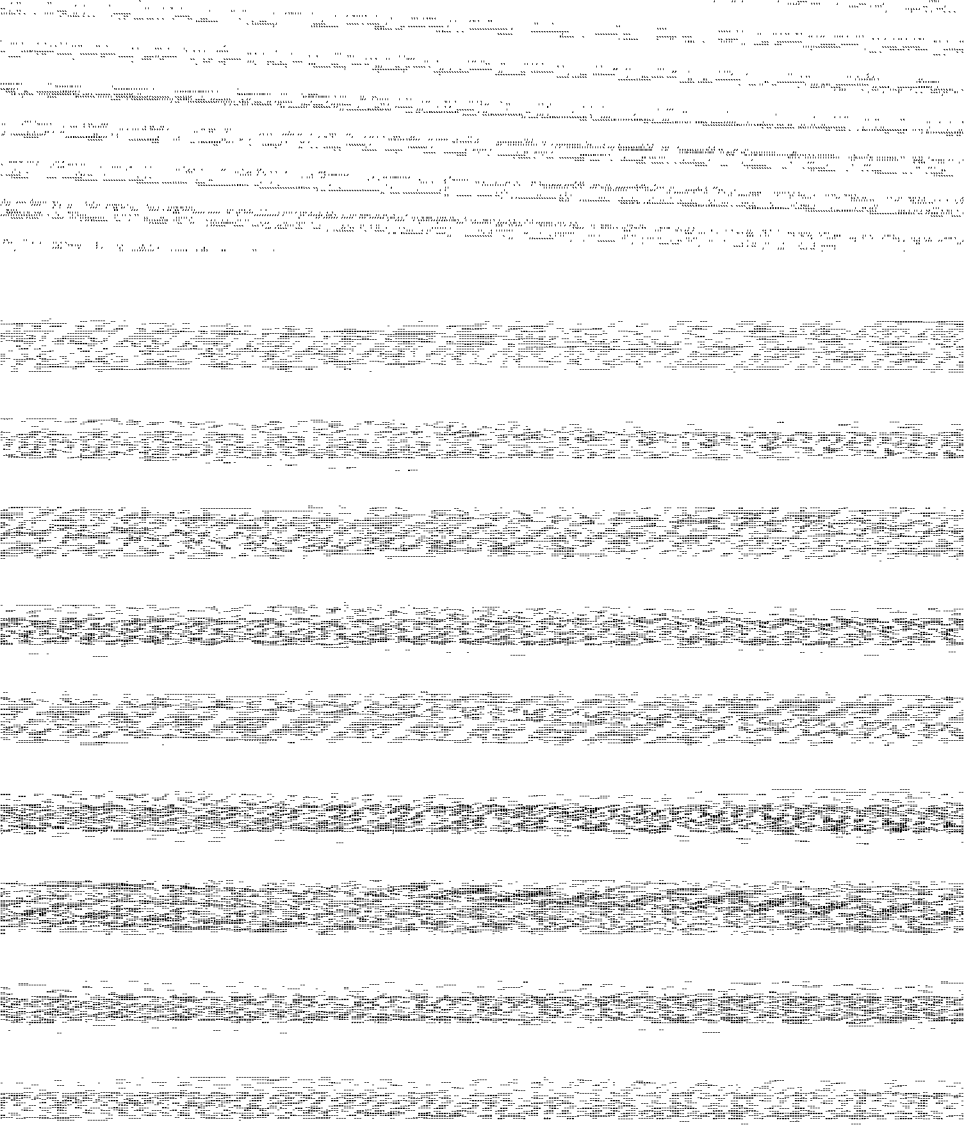
1.3.2 透射电镜观察 脑干缺血后0.5、3、6、12及SH组观察12 h后,迅速在活体上取脑干耳蜗核处组织块3～5 mm^3,置于预先冷却的3%戊二醛槽,用刀片将组织块修成1 mm×1 mm×1mm,盛于装有预冷的3%戊二醛小瓶中,置4℃冰箱固定24 h后,经透射电镜常规脱水、包埋、切片、染色,在H-300透射电镜下观察并照像。

2 结果

2.1 脑组织细胞内钙含量([Ca^{2+}]i)的改变

脑干缺血后0.5、3、6、12 h组与SH组相比较,[Ca^{2+}]i值均非常显著地升高($P<0.01$),在缺血0.5 h时即升高约1.5倍,缺血时间越长则[Ca^{2+}]i值越高,以缺血12 h[Ca^{2+}]i值最高($P<0.01$)比SH组升高约4倍(见附表)。

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



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

3 讨论

3.1 细胞内钙含量($[Ca^{2+}]i$)的改变

目前测定细胞内钙的方法很多，有原子吸收光谱分析、离子选择性微电极、发光光谱技术、荧光光谱和荧光比率成像技术及核磁共振波幅技术等。Deshpande用原子吸收光谱法证实，脑缺血动物脑组织钙含量明显增加，其增加程度与缺血时间、程度有关，缺血时间越长，程度越重，组织钙含量增加越明显[4]。实验动物脑缺血梗死灶内钙含量升高，神经元钙沉积，缺血损伤程度与钙含量呈平行关系。我们用原子吸收光谱技术检测脑组织细胞内钙含量观察到脑干缺血0.5 h$[Ca^{2+}]i$值比SH组升高约1.5倍，缺血时间越长，$[Ca^{2+}]i$值越高，在缺血12 h时$[Ca^{2+}]i$值最高，比SH组高约4倍，这同以往的实验结果相符合[2]。

3.2 神经元超微结构的改变

脑组织缺血能量衰竭导致离子紊乱，细胞内钙超载并触发一系列有害反应。线粒体氧化磷酸化失耦联，细胞结构破坏，使胞膜、核膜连续性破坏，微管、微丝解聚，线粒体和神经元突触膜的破坏最明显[5]。胞核染色质浓缩、聚集、周边化，胞浆内线粒体肿胀，嵴排列不规则或断裂，神经毡中髓鞘发生分层状改变，星形胶质细胞肿胀压迫毛细血管导致毛细血管变形[6]。

本实验中观察到脑干缺血后0.5 h可见胶质细胞胞体周围水肿，髓鞘层面松散，轴突内微管、微丝减少；缺血后3 h神经元胞核染色质浓缩、边集，线粒体嵴排列不规则或断裂；缺血后6 h及12 h，核染色质明显浓缩，边集，胞膜及核膜不完整，线粒体空泡化，髓鞘样结构在轴突内出现。这些改变可能与脑干缺血后能量障碍及缺氧时间的延长有关。

参考文献

1 Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part Ⅰ: Mechanisms of damage and treatment. J Neurosurg, 1992; 77(3): 337

2 赵士富，王东武，李黔宁等. 实验性脑干缺血BAEP改变及病理损害. 第三军医大学学报，1993；15(3)：267

3 Joan C. Basilar artery occulation in rats. Stroke, 1990; 22(2): 247

4 Deshpande JK, Siesjo BK, Wieloch T. Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 1987; 7(1): 89

5 姜明辉，刘多三，张　昱等. 实验性脑缺血后神经细胞、星形胶质细胞超微结构观察. 中风与神经疾病杂志，1990；7(1)：5

6 王竹筠，邱培伦. 绞股蓝皂甙对家兔急性不完全性脑缺血的保护作用. 中国药理学与毒理学杂志，1992；6(3)：204

(收稿：1995-06-08；修回：1996-03-02)

(编辑　张大春)

Changes of intracellular calcium content and cerebral ultrastructures after brainstem ischemia in dogs

He Ying, Wang Dongwu, Den Zhikuan (Department of Neurology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Zhang Wei (Department of Statistics, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract After local ischemia of the brain-stem was inflicted to the dogs, the intracellular calcium content of the cerebral tissue was determined with atomic absorption spectroscopy and the changes of cerebral ultrastructures observed with electron microscopy. It was found that the intracellular calcium content was increased and the ultrastructures of cerebral neurons damaged and the severity of these changes were positively correlated to the intensity of brain-stem ischemia.

Key words brain-stem; calcium; intracellular content; neuropathology; ischemia; dog

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