

蛛网膜下隙出血对皮质神经元损害的实验研究

傅丹 姚益群 荣亮 金杰 汪凌 吴星

【摘要】 采用经枕大池注射自体血方法制备蛛网膜下隙出血兔模型,光学显微镜和电子显微镜下观察神经元凋亡并计算凋亡指数。组织病理学观察神经元呈现延迟性损伤,胞体固缩,胞质及胞核深染,核质不均匀,胞核内染色质部分凝聚;甚至胞核溶解,线粒体肿胀、嵴消失。与空白对照组相比,蛛网膜下隙出血组动物细胞凋亡指数明显升高,且组间差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。提示细胞凋亡在蛛网膜下隙出血后的迟发性神经元死亡过程中起重要作用。

【关键词】 蛛网膜下腔出血; 细胞凋亡; 神经元; 疾病模型,动物

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.03.018

Damage of cortical neurons after subarachnoid hemorrhage in rabbits

FU Dan, YAO Yi-qun, RONG Liang, JIN Jie, WANG Ling, WU Xing

Department of Neurosurgery, Huangshi Centre Hospital, Huangshi 435000, Hubei, China

Corresponding author: FU Dan (Email: hsfudan@sina.com)

【Abstract】 Fresh autologous blood was injected into the cisterna magna to establish the model of spontaneous subarachnoid hemorrhage (SSAH) in the rabbit groups. The neuron apoptosis was observed by optical microscope and electron microscope, and determination in apoptotic index. Observation by histopathology, neurons show tardive detriment, as cell body pyknosis, cytoplasm and nucleus hyperchromasis, karyoplasms uneven, fraction intranuclear caryotin agglomeration; even caryolysis, bioblast engorgement, crista resorbed. Contrast to blank groups, apoptotic index increased obviously in SAH groups, and statistical significant difference was seen among groups (all $P < 0.05$). Apoptosis plays an important role in delayed neuronal death after subarachnoid hemorrhage.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Apoptosis; Neurons; Disease models, animal

自发性蛛网膜下隙出血(SSAH)是由于非外伤性原因引起的颅内出血,而且系指血液进入颅内或椎管内蛛网膜下隙所引起的一组综合征。蛛网膜下隙出血后约有40%~80%的患者可因迟发性脑血管痉挛(DCVS)而产生脑组织供血不足,严重者尚可能发生缺血性卒中甚至死亡^[1]。而对于自发性蛛网膜下隙出血后迟发性脑血管痉挛的发生机制至今仍未明确,动物实验研究和临床观察结果显示,由自发性蛛网膜下隙出血引起的迟发性脑血管痉挛为多种因素相互作用的结果^[2-3],目前鲜有文献报道迟发性脑血管痉挛对神经元的损害作用。本研究旨在探讨蛛网膜下隙出血与皮质神经元损害间的关系及其病理学机制,以为神经保护性研究提供一些理论依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物 选择5~6月龄大耳白兔40只,雌雄不限,平均体质量为 (2.25 ± 0.25) kg,由武汉大学医学院实验动物中心提供(合格证号:WYDWNO2002-059)。按照实验室常规饲养条件[室温 (22 ± 2) °C、湿度 $(55 \pm 5)\%$ 、12 h白昼-12 h黑夜]普通饲料喂养,自由饮食;每周更换垫料2次。根据随机数字表法将40只动物随机分为空白对照组(对照组,A组,8只)和蛛网膜下隙出血组(SAH组,32只),SAH组进一步分为蛛网膜下隙出血1 d(B组)、3 d(C组)、5 d(D组)和7 d(E组)共4个亚组,每组各8只动物。

2. 主要试剂 蛋白酶K工作液、原位缺口末端标记(TUNEL)反应液、转化剂过氧化物酶(POD)溶

作者单位:435000 湖北省黄石市中心医院神经外科

通讯作者:傅丹(Email:hsfudan@sina.com)

液等试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

二、实验方法

1. 蛛网膜下隙出血模型建立 (1) 制备方法: 参照脑池内注射自体血液^[1]的方法制备蛛网膜下隙出血模型。采集 SAH 组大耳白兔颈动脉血液 1.00 ml, 经枕大池缓慢注射, 对照组动物注射等体积生理盐水。(2) 结果判断: 根据 Endo 等^[4]神经功能评分标准, 将制模后兔进食量减少程度分为 4 级, 1 级进食量 (100%); 2 级进食量减少至 50%~100%; 3 级进食量 < 50%; 4 级进食量为 0。与此同时, 观察动物平面运动, 并将其神经功能障碍分为 4 级, 1 级无神经功能障碍; 2 级为轻度或可疑神经功能障碍 (嗜睡、活动减少); 3 级为中度神经功能障碍 (肢体无力、跛行); 4 级为重度神经功能障碍 (划圈运动或行走困难)。当动物进食量和平面运动评级均 \geq 3 级时为制模成功^[4]。

2. 脑组织标本制备 分别于制模后第 1、3、5 和 7 天时, 以质量分数为 2% 戊巴比妥钠 (25 mg/kg) 经耳缘静脉注射麻醉, 空气栓塞法分别处死不同处理组动物, 于无菌条件下分层切开颅骨、硬脑膜, 显露双侧颞叶; 切取大小为 0.50 cm \times 0.50 cm、层厚 2 mm 的颞叶组织标本共 2 份。(1) 光学显微镜标本的制备: 0.50 cm \times 0.50 cm 大小的颞叶脑组织经质量浓度为 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明、浸蜡、包埋, 制成层厚为 5 μ m 的组织切片, HE 染色、封片, 日本 OLYMPUS BX51T-32901 型显微镜 (\times 400) 下观察不同处理组动物皮质神经元结构。(2) 电子显微镜标本的制备: 切取 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小的颞叶皮质组织标本, 经体积分数为 2% 戊二醛溶液固定、漂洗, 质量浓度为 1% 锇酸后固定 1.50~2.00 h, 梯度乙醇脱水、浸透、包埋、修块, 制作层厚为 60~90 nm 的超薄组织切片。重金属盐 (醋酸双氧铀和枸橼酸铅) 进行双重染色, 日立 H-600 透射电子显微镜 (\times 10 000~30 000) 下观察皮质神经元超微结构。

3. 原位缺口末端标记法观察细胞凋亡 (1) 检测方法: 石蜡包埋的脑组织切片经预处理后常规脱蜡至水, 二甲苯浸洗 5 min (\times 2 次), 梯度乙醇各浸洗 3 min, 体积分数为 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 浸洗 10 min, 磷酸盐缓冲液漂洗 5 min (\times 2 次)。滤纸吸干周围液体, 湿盒中以蛋白酶 K 工作液 100 μ l 处理脑组织标本, 覆盖样品区, 反应约 15 min 后磷酸盐缓冲液漂洗 5 min (\times 2 次); 暗湿盒中于玻片上滴加 50 μ l

TUNEL 反应液、加盖玻片, 37 $^{\circ}$ C 反应 1.50 h (阴性对照组仅滴加标记液 50 μ l、阳性对照组同时滴加 DNase1), 磷酸盐缓冲液漂洗 5 min (\times 3 次); 然后滴加 50 μ l 转化剂、加盖玻片, 暗湿盒中反应 30 min, 磷酸盐缓冲液漂洗 5 min (\times 3 次); 滴加 50 μ l DAB 底物, 显微镜下控制反应时间, 二甲苯透明、中性树脂封片观察。(2) 结果判定: 于光学显微镜下观察细胞着色情况, 以细胞核呈黄色者为凋亡细胞, 计数每张组织切片 \geq 1000 个细胞中出现的凋亡细胞个数, 即为凋亡指数 (AI)。

三、统计分析方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据计算与分析。所得实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析, 不同处理组之间的两两比较行 SNK-*q* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、行为学观察与解剖学改变

SAH 组 32 只动物解剖学观察显示, 枕大池片状积血, 其中 1 只发生肢体偏瘫, 其余均无明显异常表现, 神经功能评级为 1 级。空白对照组动物术后未见蛛网膜下隙积血, 神经功能评级均为 1 级。

二、皮质神经元形态及超微结构变化

1. 光学显微镜观察 HE 染色显示, 空白对照组动物皮质神经元结构完整、形态正常, 呈三角形, 无肿胀; 核圆形、淡染; 核质均匀 (图 1)。SAH 组动物在蛛网膜下隙出血第 1 天时, 大部分皮质神经元形态正常, 少数细胞水肿, 核圆形、淡染; 第 3、5 和 7 天时, 部分神经元胞体固缩、胞质及胞核深染, 核质不均匀, 胞核内染色质部分凝聚 (图 2)。

2. 电子显微镜观察 空白对照组动物神经元结构基本正常, 极少数细胞电子密度增高; 核膜完整, 染色质均匀无凝聚; 线粒体无肿胀、嵴清晰; 内质网及高尔基复合体形态无异常 (图 3)。SAH 组动物出血第 1 天时, 极少数皮质神经元胞核染色质聚边, 沿核膜形成“环”状凝聚带 (图 4); 第 3 和 5 天时, 神经元胞核固缩明显, 核膜皱缩、核膜下染色质凝聚, 核内染色质呈斑片状, 部分神经元胞核核膜溶解, 线粒体肿胀、嵴消失 (图 5); 至第 7 天时可见个别肿胀细胞, 核溶解, 细胞内无定形成分较多 (图 6)。

三、细胞凋亡检测

空白对照组动物 TUNEL 法检测, 细胞核未见棕

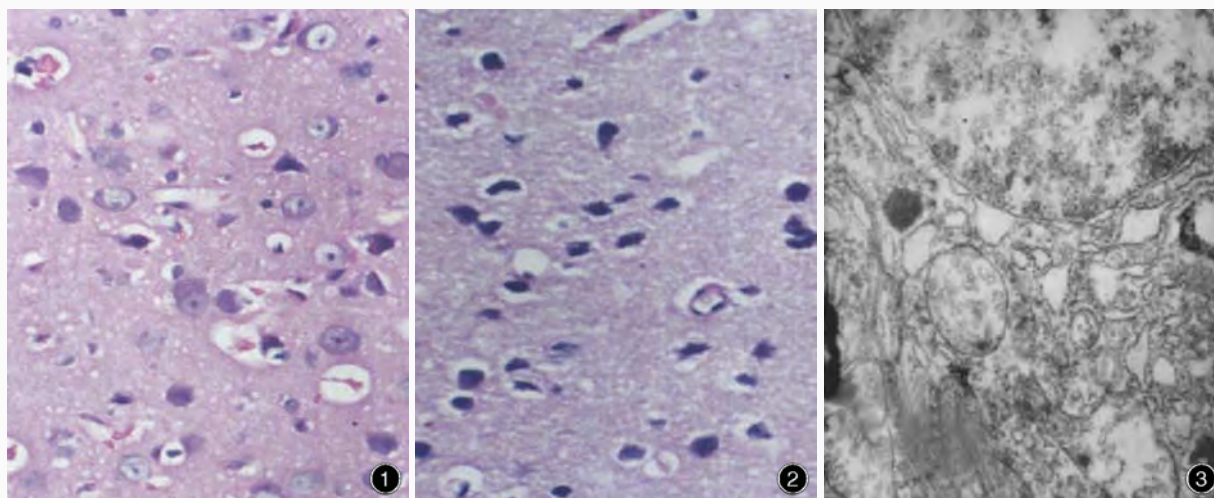


图1 空白对照组动物皮质神经元光学显微镜下观察呈正常神经元形态 HE染色 ×400 图2 蛛网膜下隙出血第3天(C组), 皮质神经元胞体固缩,胞质及胞核呈深染 HE染色 ×400 图3 空白对照组动物皮质神经元电子显微镜观察呈正常神经元形态 铅铀染色 ×17000

Figure 1 Optical microscope picture: normal neuron HE staining ×400 Figure 2 Injured neuron pyknosis, endochylema and nucleus hyperchromasis at the 3rd day of SAH HE staining ×400 Figure 3 Electron microscope picture: normal neuron Lead and uranium staining ×17000

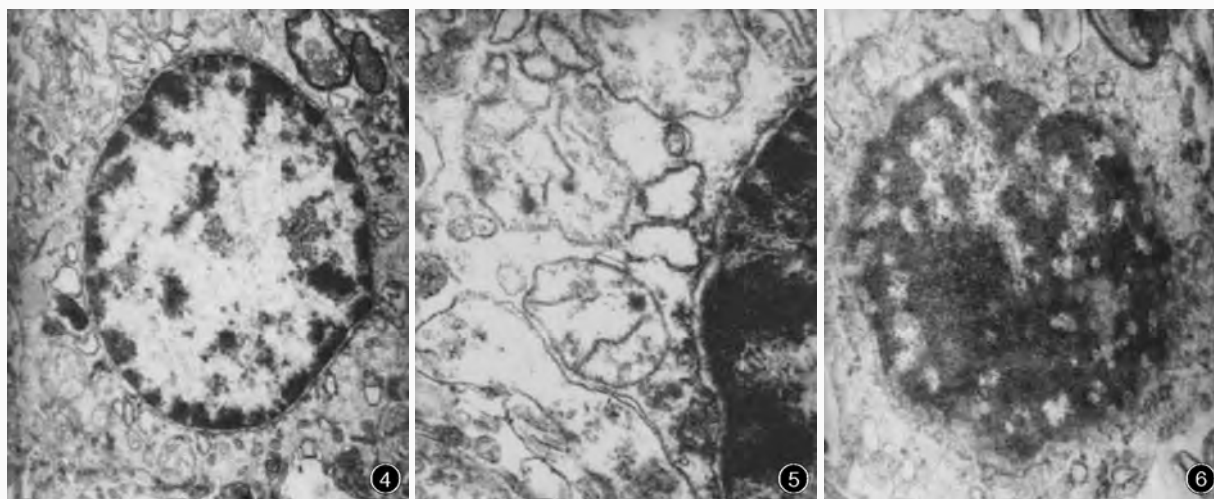


图4 蛛网膜下隙出血第1天(B组),皮质神经元胞核染色质聚边 铅铀染色 ×10000 图5 蛛网膜下隙出血第5天(D组),皮质神经元染色质凝聚,线粒体肿胀、嵴消失 铅铀染色 ×17000 图6 蛛网膜下隙出血第7天(E组),皮质神经元胞核溶解 铅铀染色 ×10000

Figure 4 Nerve cell nuclear chromatin gathered to the border at the 1st day of SAH Lead and uranium staining ×10000 Figure 5 Chromatin agglutination, bioblast engorge, crista disappeared at the 5th day of SAH Lead and uranium staining ×17000 Figure 6 Nerve cell karyolysis at the 7th day of SAH Lead and uranium staining ×10000

黄色颗粒(图7);SAH组动物蛛网膜下隙出血第1天仅极少数神经元胞核内可见棕黄色颗粒,至第3、5和7天大量神经元胞核内出现棕黄色颗粒(图8)。与空白对照组比较,蛛网膜下隙出血各亚组动物细胞凋亡指数升高,组间差异具有统计学意义($P=0.000$,表1),其中出血后第3、5和7天时的细胞凋亡指数高于第1天(B组),不同测量时间点之间差异亦有统计学意义(均 $P<0.05$,表2)。

讨 论

本研究结果显示,蛛网膜下隙出血后皮质神经元结构损害特点呈现:(1)出血数日之后出现的迟发性损害。(2)超微结构损害表现为胞核凝聚、核膜皱缩、核溶解;细胞器中线粒体肿胀、嵴消失。(3)细胞凋亡发生在出血后第3~7天。有研究显示,蛛网膜下隙出血后的神经元损害可能与迟发性脑血管

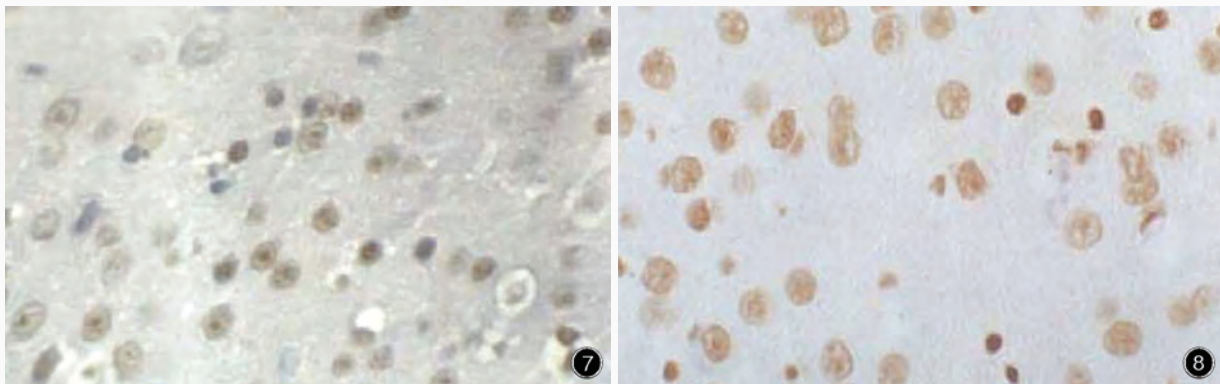


图 7 空白对照组动物皮质神经元光学显微镜下观察未见神经元凋亡现象 HE 染色 ×400 图 8 蛛网膜下隙出血第 3 天(C 组), 皮质神经元胞核固缩, 呈黄染 HE 染色 ×400

Figure 7 Optical microscope picture: normal neuron apoptosis is not seen HE staining × 400 Figure 8 Injured neuron pyknosis and stained yellow at the 3rd day of SAH HE staining × 400

表 1 蛛网膜下隙出血后皮质神经元凋亡指数的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of apoptotic index of cortical neuron at different observation time after subarachnoid hemorrhage ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本例数	凋亡指数
A 组	8	0.25 ± 0.46
B 组	8	3.38 ± 0.77
C 组	8	11.00 ± 2.62
D 组	8	13.25 ± 2.49
E 组	8	10.50 ± 2.73
F 值		113.938
P 值		0.000

表 2 不同处理组凋亡指数两两比较的 SNK-q 检验

Table 2. Group comparison of apoptotic index at different observation time after SAH (SNK-q test)

组间两两比	P 值	组间两两比	P 值
A : B	0.000	B : D	0.021
A : C	0.000	B : E	0.045
A : D	0.000	C : D	0.128
A : E	0.000	C : E	0.142
B : C	0.028	D : E	0.087

痉挛所致的脑缺血相关^[5-6]。

1982 年, Kirino^[7]通过脑缺血动物实验率先提出迟发性神经元死亡(DND)的概念。本项研究表明,蛛网膜下隙出血后因脑血管痉挛所致皮质神经元死亡发生于出血后数日。近年来,迟发性神经元死亡的发生机制日益受到国内外学者的关注^[8],但其确切机制仍不十分清楚。20 世纪 90 年代以来,开始重视细胞凋亡与迟发性神经元死亡关系的研究,发现凋亡一般发生在缺血后第 1~3 天^[9]。在本实验中,我们采用 TUNEL 和电子显微镜观察神经元超微结构变化,结果显示:蛛网膜下隙出血后第 1 天皮质神经元即可出现凋亡,以出血后第 3~7 天为高峰时间;电子显微镜下可见神经元核膜皱缩、染色质浓缩、沿核膜下浓聚分布,呈现细胞凋亡的典型病理改变。然而,梗死灶外的皮质神经元未发现碎裂、溶解等坏死表现,而且梗死灶内细胞凋亡检测呈阴性,推测凋亡细胞可能已被吞噬,或梗死灶内的细胞死亡形式以坏死为主。

在正常状态下,脑脊液不存在细胞毒性物质。但蛛网膜下隙出血后脑脊液中可产生氧合血红蛋白(HbO₂)、兴奋性氨基酸和氧自由基等细胞毒性物质,导致脑血管痉挛、神经元缺血缺氧,直接产生神经元毒性作用。氧合血红蛋白虽不具有周围末梢动脉收缩作用,但能够选择性地收缩脑血管平滑肌且作用缓慢而持久,同时可使脑血管内皮细胞脱落、平滑肌细胞坏死。表明氧合血红蛋白既是能够促进脑血管收缩的激动剂,又是细胞毒性物质。根据本实验观察结果,同时结合文献,我们提出如下假说:氧合血红蛋白激活磷脂酶 C(PLC)使其水解磷脂酰肌醇二磷酸(PIP₂)生成二酰甘油(DAG)和肌醇三磷酸(IP₃),IP₃激活肌浆网上的 IP₃受体导致肌浆网上 Ca²⁺释放增多,已释放的 Ca²⁺可通过钙诱导性钙释放机制进一步促进 Ca²⁺释放,此即通常所说的细胞内 Ca²⁺增多。与此同时,氧合血红蛋白亦可使细胞膜钙通道开放, Ca²⁺内流,引起细胞内 Ca²⁺浓度增加并与钙调蛋白结合,激活肌球蛋白轻链激酶

(MLCK),使肌球蛋白轻链(MLC)上的丝氨酸-19 发生磷酸化,肌球蛋白 ATP 酶活性增加,肌丝滑行,平滑肌收缩,导致脑血管痉挛。

Abe 等^[8]研究发现,神经元缺血早期即可出现线粒体 DNA 表达紊乱,随后发生呼吸链电子传递障碍,从而导致神经元死亡。我们采用电子显微镜对损伤神经元进行超微结构观察,发现在蛛网膜下隙出血初期线粒体结构基本正常、嵴清晰,多沿细胞核聚集;随后出现肿胀、嵴消失、破碎等病理改变,提示迟发性神经元死亡可能与细胞呼吸功能障碍存在关系。目前,对迟发性神经元死亡的机制尚未阐明,可能是多环节、多因素协同作用的结果;神经元凋亡主要发生在蛛网膜下隙出血后的第 3~7 天,提示蛛网膜下隙出血可引起迟发性神经元死亡,细胞凋亡在迟发性神经元死亡中起重要作用。

参 考 文 献

[1] Wang ZC. Neurosurgery. Wuhan: Hubei Science and Technology

Press, 1998: 593-594.[王忠诚. 神经外科学. 武汉: 湖北科技出版社, 1998: 593-594.]

- [2] Robinson SR, Dang TN, Dringen R, et al. Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke. Redox Rep, 2009, 14:228-235.
- [3] Meng W, Jia J, Mao HJ. Non - aneurysal SAH surrounding midbrain clinical analysis. Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2010, 10:390-391.[孟伟, 贾军, 毛宏杰. 中脑周围非动脉瘤性蛛网膜下隙出血临床分析. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10:390-391.]
- [4] Endo S, Branson PJ, Alksne JF. Experimental model of symptomatic vasospasm in rabbits. Stroke, 1988, 19:1420-1425.
- [5] Rabinstein AA, Wijdicks EF. Cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. Curr Treat Options Neurol, 2005, 7:99-107.
- [6] Zubkov AY, Nanda A, Zhang JH. Signal transduction pathways in cerebral vasospasm. Pathophysiology, 2003, 9:47-61.
- [7] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res, 1982, 239:57-69.
- [8] Abe K, Aoki M, Kawagoe J, et al. Ischemic delayed neuronal death: a mitochondrial hypothesis. Stroke, 1995, 26:1478-1489.
- [9] Manno EM. Subarachnoid hemorrhage. Neurol Clin, 2004, 22: 347-366.

(收稿日期:2012-04-27)

2012' 第八届海河之滨心脏病学会会议

由心血管病学老前辈石毓澍教授倡导并任名誉主席的海河之滨心脏病学会会议已圆满召开七届,受到国内外广大知名专家和同仁的一致好评,已成为国内具有较大影响的全国性品牌学术盛会。2012 年,由天津心脏病学研究所、中华医学会天津分会主办,中国高血压联盟、中国老年学会医学委员会心血管病专家委员会、中国心力衰竭协会、中国心电信息学会、天津市心律学会、天津市中西医结合学会、中华心血管病杂志、中华心律失常学杂志、国际心血管及相关疾病杂志、临床心电学杂志、中国心血管杂志、中国实用内科杂志、医学综述杂志、心电学杂志、中国现代神经疾病杂志、北京高血压联盟研究所、天津医科大学第二医院等单位共同主办,天津市数十家医院共同协办的第八届海河之滨心脏病学会会议将于 7 月 12-15 日在天津市召开,由胡大一、李广平教授任大会主席,将延续原有特色,注重先进性和实用性。届时将邀请国内老中青知名专家就心血管病学(临床、心电图、影像、介入、药理),特别是与心脏病学相关的呼吸、内分泌、肾脏、神经、消化、护理、心外科、中西医结合,以及社区防治等领域作精彩学术报告,并突出与多学科相关专业的预防医学和急症诊断处理。对急性和慢性心力衰竭临床和基础、诊疗规范,以及和相关疾病间的关系和转化医学进行深入交流和讨论;并同期举办学术专场介绍国际和国内最新进展。会议采用大会报告、介入手术交流、热点辩论、病例讨论、优秀论文交流以及卫星会等形式,突出心血管和各专业领域的联系与融合,强调双心医学和人文医学。为参会者提供广泛学术交流平台,遵循科学发展观的要求,不断探索、发展和创新,与国际和国内高水平学术活动全面接轨。在此我们诚挚地邀请心血管病和相关专业同仁积极参会并投稿。各位专家和同仁将在美丽的新天津共同交流学习,见证津门巨大变化。预祝您在会议期间生活愉快,身体健康!

1. 会议内容 影像学和临床药理学论坛、心血管病治疗论坛、心电及信息学论坛、心律学论坛、起搏和心律失常介入论坛、冠心病介入论坛、心力衰竭论坛、高血压论坛、流行病学和循证医学论坛、肺循环论坛、相关疾病论坛、心脏外科论坛、双心医学与人文医学论坛,以及心血管和内科急症及其护理论坛。同时举办疑难病例讨论和介入病例讨论。

2. 投稿要求 800 字以内的中文或英文摘要和 4000 字以内的论文全文各 1 份,书写格式请按照《中华心血管病杂志》投稿要求。大会只接受电子邮件投稿,请发送至:tjcardio126@126.com,以邮件发送日期为准。优秀论文将获得奖励并被推荐至《中国心血管杂志》等期刊择优发表,参会者可获得国家级继续医学教育学分 10 分。

3. 稿件截止日期 2012 年 5 月 27 日。

4. 联系方式 天津市河西区平江道 23 号天津医科大学第二医院心脏科,天津心脏病学研究所。邮政编码:300211。联系人:李秀英。联系电话:(022)88328631。传真:(022)28261158。详情请登录:www.tjcardio.com.cn。