

全脑缺血再灌注损伤早期脑皮质超微结构的变化

王涛¹, 赵继宗¹, 孙异临², 曲宝卿²

[摘要] 目的 探讨全脑缺血再灌注损伤大鼠早期脑皮质神经元、胶质细胞和血脑屏障的变化。方法 将 6 只 Wistar 大鼠随机分为缺血再灌注组($n=3$)和假手术对照组($n=3$)。制备大鼠全脑缺血再灌注模型。缺血再灌注组于缺血再灌注 1 h, 假手术组于手术后 1 h 取脑, 电镜观察皮质超微结构的变化。结果 缺血再灌注早期(1 h)皮质神经细胞发生不同程度的固缩, 胶质细胞肿胀, 核内染色质溶解, 核膜不清; 血管周围足突轻度肿胀, 与基膜分离; 微管有部分溶解。结论 再灌注损伤早期皮质神经元、胶质细胞、细胞骨架和血脑屏障即发生变化。

[关键词] 脑缺血; 神经元; 超微结构

Changes of the ultrastructure of global cerebral ischemia and reperfusion damage in rats WANG Tao, ZHAO Ji-zong, SUN Yi-lin, et al. The Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

[Abstract] Objective To investigate the changes of ultrastructure of global cerebral ischemia and reperfusion damage in rats. Methods Six adult male Wistar rats were randomly divided into the ischemia group ($n=3$), and sham injury group ($n=3$). Global cerebral ischemia and reperfusion model were established with Pulsinelli's method. Cortical ultrastructure changes were investigated on the first hour after reperfusion. Results In the ischemia group, different degrees of pyconosis neurons, abnormal organell and microtubule of neurons were observed. In addition, glial cell and microvessels were damaged in ischemia group, but that in sham injury group were not damaged. Conclusion Cortical neurons, neuroglia cells, cytoskeleton and blood-brain barrier changed at early stage of reperfusion damage.

[Key words] cerebral ischemia; neuron; ultrastructure

中图分类号: R743.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)01-0008-03

[本文著录格式] 王涛, 赵继宗, 孙异临, 等. 全脑缺血再灌注损伤早期脑皮质超微结构的变化[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(1): 8-10.

缺血期发生的病理生理变化并不是已经定型和不可逆的, 而是随后一系列病理过程的启动阶段, 循环恢复后脑得到再灌注, 如上述过程任其发展并形成内源性损伤因子, 将次发地加速和加重脑细胞的损伤, 这就是所谓再灌注损伤(reperfusion damage)或再氧合损伤(re-oxygenation damage)。许多学者报道了全脑缺血再灌注损伤模型形态学上的变化^[1-6], 但再灌注早期皮质, 特别是血脑屏障超微结构的变化未见报道。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组 雄性健康 Wistar 大鼠 6 只, 清洁级, 体质量 250~300 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 医学实验动物合格证号/实验动物中心许可证号: SCXK1100-0006/2000-006(总 051 号), 清洁环境下分笼饲养。随机将动物分为缺血再灌注组($n=3$)和假手术对照组($n=3$)。制备大鼠全脑缺血再灌注模型。腹腔内注射 100 g/L 水合氯醛 0.03 mL/kg, 分离

双侧翼孔并电凝烧闭椎动脉; 2 d 后, 腹腔内注射 100 g/L 水合氯醛 0.03 mL/kg, 分离双侧颈总动脉, 在双侧颈总动脉环绕丝线, 经丝线提出颈总动脉, 用临时阻断夹夹闭颈总动脉造成全脑缺血, 10 min 后松开阻断夹行再灌注, 缝合皮肤。温度探头插入颞肌, 观察头部温度, 白炽灯照射大鼠头部, 维持温度在 37℃ 左右。颅骨钻孔, 采用瑞典 Perimed 公司 Periflux 5010 型激光多普勒血流仪(laser doppler flowmetry, LDF), PE-420 型纤维探头安置于右侧顶叶皮质, 深度 1 mm, 监测局部脑血流(夹闭颈总动脉后脑血流降低 < 50% 者剔除)。假手术对照组分离翼孔和颈总动脉, 但不造成缺血。

1.2 标本取材及处理 缺血再灌注组于缺血再灌注 1 h, 假手术组于手术后 1 h 麻醉动物, 开胸, 心尖穿刺置管至主动脉, 40 g/L 多聚甲醛灌注固定, 断头取脑, 取左侧顶叶皮质脑组织修成 1 mm³ 小块; 25 g/L 戊二醛 4℃ 固定 2 h; 磷酸缓冲液(pH = 7.2)冲洗 3 次(10 min/次); 10 g/L 锇酸 4℃ 固定 2 h; 双蒸水冲洗 3 次(10 min/次); 梯度乙醇脱水, 500 g/L、700 g/L、900 g/L 各 10 min, 1000 g/L 2 次各 15 min; 环氧丙烷置换 2 次各 15 min(环氧丙烷: 树脂 = 1:1, 室温 1 h; 环氧丙

作者单位: 1. 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 北京市 100050; 2. 北京市神经外科研究所, 北京市 100050。作者简介: 王涛(1969-), 男, 山东莱州市人, 主治医师, 主要研究方向: 神经外科围术期脑保护。

烷:树脂=1:4,室温 1 h;纯树脂浸透,室温 2 h),纯树脂包埋,聚合,35℃ 16 h,45℃ 8 h,55℃ 14 h,60℃ 48 h;修块后半薄切片天青-美蓝染色,光镜下定位;超薄切片醋酸双氧铀、枸橼酸铅染色,电镜观察。

2 结果

假手术对照组大鼠脑皮质神经元内可见正常细胞器,包括高尔基体、粗面内质网、多聚核糖体、线粒体、溶酶体等,而且神经细胞轴索、微管、胶质细胞、血管内皮细胞均正常(见图 1、图 3、图 5、图 7、图 9)。

缺血再灌注组大鼠脑皮质神经细胞不同程度固缩,胞浆、胞核电子密度明显增高,核膜凹陷,高尔基体扩张呈大泡状,多聚核糖体解聚;胶质细胞肿胀,核内染色质溶解,核膜不清,胞浆内空泡形成,有大量水肿液;细胞器稀疏,胞浆内胶质微丝消失;血管周围足突轻度肿胀,与基膜分离;血脑屏障受损;微管有部分溶解;神经细胞胞浆内散在溶酶体(见图 2、图 4、图 6、图 8、图 10)。

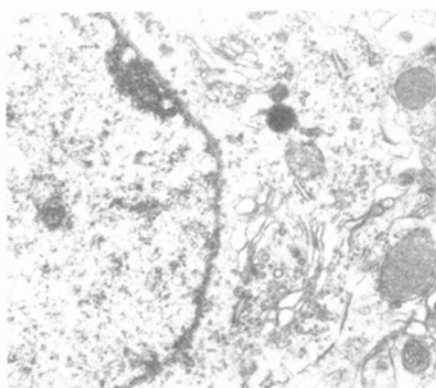


图 1 对照组神经细胞(16000×)

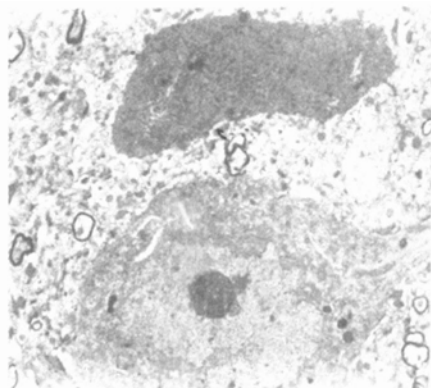


图 2 缺血组神经细胞(4000×)

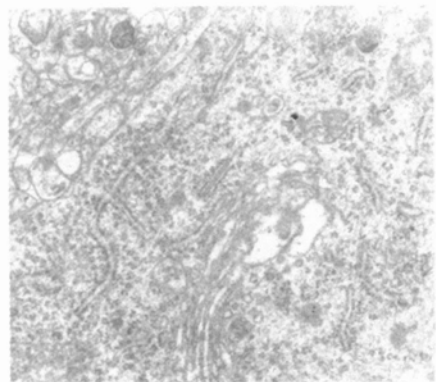


图 3 对照组神经细胞器(20000×)

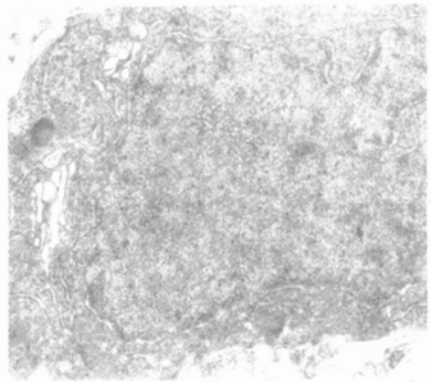


图 4 缺血组神经细胞器(16000×)

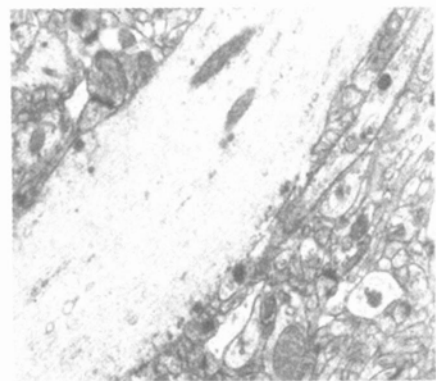


图 5 对照组神经细胞轴索(12500×)

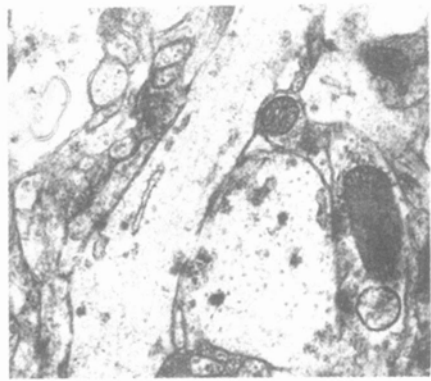


图 6 缺血组神经细胞轴索(25000×)

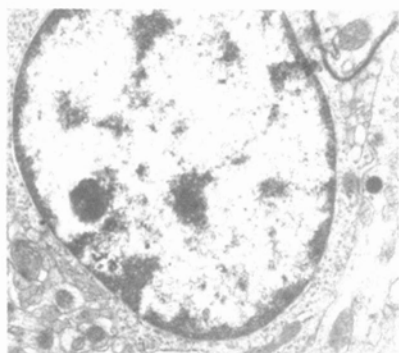


图 7 对照组神经胶质细胞(12500×)

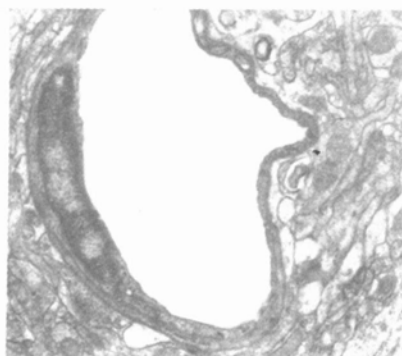


图 9 对照组血管内皮细胞(12500×)

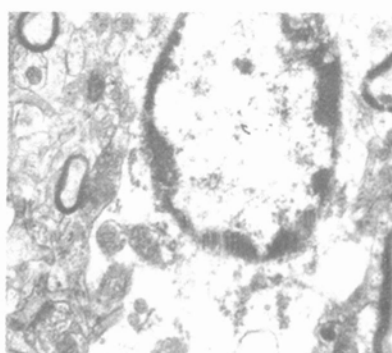


图 8 缺血组神经胶质细胞(16000×)

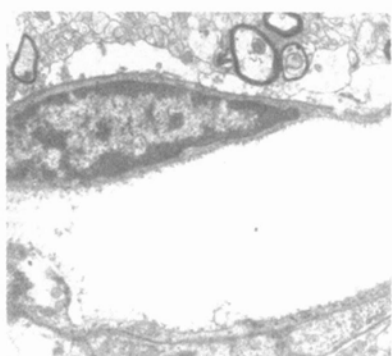


图 10 缺血组血管内皮细胞(10000×)

3 讨论

全脑缺血再灌注多见于临床心跳骤停、复杂心外科手术及大出血等急症的复苏。由于临床观察的限制,我们应用大鼠实验性脑缺血再灌注模型进行研究。四动脉阻断模型(双侧椎动脉和双侧颈总动脉阻断)由于椎动脉与脊髓前动脉间有交通支、个体差异大、模型稳定性较差等原因,使用时需要筛选。本研究通过激光多普勒血流仪监测脑血流作为模型成功与否的筛选指标,筛选手段先进,结果客观。

本研究结果显示,缺血再灌注 1 h 神经细胞即呈现不同程度固缩,细胞器破坏,胶质细胞发生肿胀,细胞器稀疏,血管周围足突轻度肿胀,与基膜分离,微循环障碍,微管有部分溶解。从病理生理角度看,脑组织缺血、缺氧使血脑屏障发生破坏,表现为内皮细胞变性,血管周围胶质足突肿胀及血管外水肿裂隙出现,最终导致血管塌陷,进一步减少微循环血流量。由于缺血、缺氧,组织乏氧代谢加剧,产生大量酸性代谢产物,使血脑屏障损伤更为严重,甚至导致微循环消失。本研究结果提示,在全脑缺血再灌注损伤早期就应充分保护神经元、胶质细胞和细胞骨架即微管结构,早期还应合用抗栓药及采取其他改善微循环的措施,以防止继发性脑损害的进一步发展,降低神经元缺血再灌注损伤的程度。我们以前的研究显示,异丙酚对全脑缺血再灌注损伤大鼠有脑保护作用^[7]。

缺血性脑损伤的发生机制中,脑水肿占重要地位。细胞毒性水肿和血管源性水肿同时存在造成脑水

肿^[8]。本研究结果显示,在缺血再灌注早期,甚至 1 h 后,血管周围水肿特别是胶质细胞突起的肿胀尤为明显,而且同时存在血管内皮细胞空化和血管周围间隙扩大。而细胞毒性水肿在早期主要体现在胶质细胞上,特别是在血管壁附近的胶质纤维水肿明显,这与以往对大鼠局灶性脑缺血模型的研究^[8]结果一致。这一结果表明,降低脑水肿的发生和发展也是治疗再灌注损伤早期应当采取的必要措施。

[参考文献]

- [1] Franko J, Pomfy M, Prosbova T, et al. Temporal kinetics of calcium in neocortical neuronal nuclei after global cerebral ischemia and reperfusion. An ultrastructural study[J]. Sb Lek, 2001, 102(2): 149—152.
- [2] Solenski NJ, di Pierro CG, Trimmer PA, et al. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia[J]. Stroke, 2002, 33(3): 816—824.
- [3] Franko J, Pomfy M, Novakova B, et al. Stobadine protects against ischemia-reperfusion induced morphological alterations of cerebral microcirculation in dogs[J]. Life Sci, 1999, 65(18-19): 1963—1967.
- [4] 张梅奎, 刘买利, 尹岭, 等. 益脑通络胶囊对缺血再灌注大鼠弥散加权像及能量代谢的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(7): 507—508.
- [5] Zhao Y, Ma HJ. The Changes of ultrastructure and nitrotyrosine expression following cerebral ischemia/reperfusion in rat brain[J]. Suzhou Yike Daxue Xuebao, 2003, 23(2): 154—158.
- [6] 徐立新, 袁芳. 改良的大鼠脑局部缺血模型[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(1): 23—24.
- [7] 王涛, 刘晓媛, 赵继宗, 等. 异丙酚对全脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用及其机制研究[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(8): 464—465.
- [8] 赵性泉, 周剑, 王拥军. 大鼠脑出血模型水肿周围继发损害及超微结构变化研究[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(8): 469—471.

(收稿日期: 2005-10-08)