

[文章编号] 1000- 4718(2006)05- 0968- 04

局灶性脑梗死后半暗带区皮层血流量与神经细胞凋亡的实验研究*

王贤军¹, 夏青², 蔡洪信¹, 夏作理¹(¹泰山医学院脑微循环研究所, 山东泰安 271000; ²北京大学药学院化学生物系, 北京 100083)

[摘要] 目的: 研究大鼠局灶性脑梗死后半暗带区皮层血流量及神经细胞凋亡。方法: 光化学法诱导大鼠局灶性脑梗死模型, 应用激光多普勒微循环测量仪检测局灶性脑梗死后各时间点坏死区和半暗带皮层血流量; TdT-介导 dUTP-生物缺口末端标记(TUNEL)法检测凋亡细胞。结果: 脑梗死后坏死区皮层血流量呈波浪样改变, 3 h降至最低, 为正常血流量的 9.36% ± 1.72%, 6h 后回升, 12 h 达高峰, 为正常 31.18% ± 1.44%, 24- 48 h 血流量再度下降, 与 3 h 相比无显著差异 ($P > 0.05$)。半暗带皮层血流量 6 h 降至最低, 为正常皮层血流量的 30.88% ± 7.11%, 9- 48 h 上升, 至 48 h 血流恢复至正常 91.90% ± 4.56%, 与其它组差异显著 ($P < 0.05$)。TUNEL 结果显示, 局灶性脑梗死组 6 h 开始出现凋亡细胞, 主要集中于半暗带区, 呈半球状向四周放射样扩展, 随梗死时间的延长凋亡细胞逐渐增多, 梗死 48 h 后凋亡细胞达峰值。结论: 局灶性脑梗死后半暗带区皮层血流量与神经细胞凋亡具有明显的关系, 其血流量的恢复引起的再灌注损伤最终导致了迟发性神经细胞凋亡。

[关键词] 神经元; 细胞凋亡; 大脑梗死; 光

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Relation between rCBF and neuronal apoptosis in penumbra following focal cerebral infarction

WANG Xian- jun¹, XIA Qing², CAI Hong- xin¹, XIA Zuo- li¹(¹Institute of Cerebral Microcirculation, Taishan Medical College, Taian 271000, China; ²Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study regional cerebral blood flow (rCBF) and neuronal apoptosis in penumbra following focal cerebral infarction in rats. **METHODS:** To establish the model of focal cerebral infarction based on the principle of photochemical initiation of thrombosis. Laser Doppler flowmetry was used to measure rCBF in ischemic core and penumbra. The numbers and anatomic distribution of apoptosis cells were examined *in situ* histologically with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) - mediated dUTP- fluorescein nick end- labeling (TUNEL) assay in adjacent sections. **RESULTS:** rCBF in penumbra decreased to the minimum at 6 h in which it was 30.88% ± 7.11% of normal. From 9 h to 48 h, rCBF in penumbra increased gradually. At 48 h, 91.90% ± 4.56% of normal cerebral blood flow was recovered which was significant differences than others. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) - mediated dUTP- fluorescein nick end- labeling (TUNEL) assay demonstrated that TUNEL- positive cells occurred at 6 h and were expanding in a radial fashion only in penumbra. The numbers of apoptosis cells were progressively increased with time and to the maximum in penumbra after 48 h following focal cerebral infarction. **CONCLUSION:** There were delayed neuronal apoptosis following focal cerebral infarction. The mechanism may be related to ischemia- reperfusion injury induced by the recovery of rCBF in penumbra.

[KEY WORDS] Neurons; Apoptosis; Cerebral infarction; Light

光化学诱导大鼠局灶性脑梗塞模型, 已被从病理、生理等方面证明与人类脑血栓形成的发病过程相似^[1]。随着对再灌注损伤的不断研究, 溶栓时间窗的不同理解, 使脑梗死的早期溶栓治疗再度引起

争议, 成为研究的焦点。本研究旨在探讨大鼠局灶性脑梗死后半暗带区皮层血流量与神经细胞凋亡的关系, 验证再灌注损伤在局灶性脑梗死后的迟发性神经细胞凋亡中的作用, 为临床的溶栓治疗提供理

[收稿日期] 2004- 09- 09 [修回日期] 2004- 11- 25

* [基金项目] 山东省自然科学基金资助项目

Tel: 0538- 6225275; E- mail: wangxianjun008@163.com

论依据。

材 料 和 方 法

1 实验动物与分组

健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重(260 ± 10) g, 由山东大学实验动物中心提供。随机分为正常对照组 ($n = 6$)、假手术组 ($n = 6$)、局灶性脑梗塞组 ($n = 48$), 根据光照后时间分 30 min、3、6、9、12、24、36 及 48 h, 共 8 组, 每组 6 只大鼠。

2 仪器及试剂

2.1 冷光源 由徐州恒发有限公司研制, 型号为 LG-150。金属卤化灯(150 W, 24 V)为发光光源, 滤去全部紫外线与红外线, 投射出单一绿色光束, 波长为(560 ± 30) nm, 光导纤维输出口至照射区距离为 1.5 mm, 光束投射中心直径为 3 mm, 光照强度为 5.6×10^5 cd/m², 照射中心最高温度为 27 °C。

2.2 微循环激光多普勒测量仪 由瑞典研制的 PeriFlux System, 型号为 PF5001。

2.3 玫瑰红 (rose bengal, RB) 和伊文思兰 (Evens blue, EB) 由美国 Sigma 公司购买。

2.4 原位细胞凋亡检测试剂盒 (In Situ Cell Apoptosis Detection Kit, POD) 由 Sino-American Biotechnology Co 购买。

3 局灶性脑梗死模型的复制

根据 Waston 等^[2]的方法略行改动, 室温 25 °C 条件下, 水合氯醛(0.35 g/kg ip)麻醉, 立体定位仪固定大鼠头部, 常规消毒后, 沿头正中切口分离至暴露完整的颅骨。以矢状缝右侧 3 mm、冠状缝后 3 mm 为中心用牙科平钻开直径约 6 mm 的骨窗, 去除颅骨表层骨板, 保留下层骨板及硬脑膜。经股静脉缓慢注入 5% 玫瑰红(50 mg/kg), 5 min 后用冷光源照射骨窗 10 min。分时点断头取脑, 处死前 1h 注射 1% 伊文思兰 1 mL(光照后 30 min 的时间组未注射 EB)。利用激光多普勒测量仪在矢状缝右侧 3 mm、冠状缝后 3 mm 即坏死中心测量光照前后的皮层血流量, 利用其比值以证实模型是否复制成功。

4 观测指标及方法

4.1 模型制作过程中和麻醉清醒后进行一般情况的观察。

4.2 记录各时点的坏死区、半暗带大脑皮层血流量。

4.3 按要求时间麻醉大鼠, 经心脏行主动脉插管, 先用 4 °C 生理盐水 200 mL 灌注至右心耳流出液清澈, 再用 4% 多聚甲醛 200 mL 内固定 20 min 后取脑, 经 6 h 4% 多聚甲醛后固定, 10%、20%、30% 蔗糖梯度脱水, 制作 8 μm 的冰冻切片, 进行 HE、TUNEL 染

色。阳性反应的细胞定量采用显微计数法, 每个时点选取 5 张切片, 随机选取 25 个高倍视野计数。

5 统计学处理

实验数据采用单因素方差分析, 数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据均应用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理。

结 果

1 一般情况的观察

模型制作过程中大鼠生命体征稳定: 平均心率(261 ± 42) beats/min, 平均呼吸(68 ± 24) times/min, 无缺氧征象, 直肠温度 36.8–37.2 °C, 照射局部颅骨表面温度 38.0–38.8 °C。麻醉清醒后, 精神萎靡, 活动及摄食减少, 但均无明显肢体瘫痪。

2 脑组织大体观察

正常和假手术组无明显变化。局灶性脑梗死组大脑皮层光照区在光照后各时点均可见明显的红染区, 其周围可见蓝染区, 提示光照后血脑屏障破坏。梗死灶冠状切面呈“碗形”, 尖端指向侧脑室, 深达皮质全层, 同一时点梗死灶大小一致。红染区随着时间的延长逐渐增大, 光照后 48 h 达高峰, 而蓝染区大小呈明显的双峰样改变。

3 HE 染色的病理形态学观察

HE 染色显示正常和假手术组无明显变化。局灶性脑梗死组光照后 3 h 坏死中心出现急性细胞坏死, 细胞减少, 核碎裂或溶解, 随着时间的延长可见坏死区不断扩大, 上述表现不断加重, 24 h 最明显。同时在梗死区可见微血管内血栓形成, 3–6 h 最明显, 以后逐渐减少。半暗带可见胞质浓缩脱水, 细胞皱缩变小、空泡化, 细胞核凝缩而无明显的溶解现象, 其范围先增大后减小。

4 坏死区、半暗带区的皮层血流量

正常和假手术组皮层血流量无明显变化。局灶性脑梗死组坏死区大脑皮层血流量随梗死时间的延长呈明显的波浪样改变。光照后 30 min 即降至正常的 27.75% ± 2.52%, 3 h 后降至最低, 为正常的 9.36% ± 1.72%。6h 后血流量开始回升, 12 h 升至最高, 达正常的 31.18% ± 1.44%, 与 30 min 比差异显著($P < 0.05$)。24–48 h 血流量再度下降, 与 3 h 相比无显著差异($P > 0.05$)。

局灶性脑梗死组半暗带皮层血流量 30 min 明显下降, 为正常的 44.47% ± 2.85%, 伴随缺血时间的延长皮层血流量继续下降, 6 h 后降至最低, 为正常的 30.88% ± 7.11%, 与 30 min 比差异显著($P < 0.05$)。9–24 h 皮层血流量呈现缓慢上升, 24 h 至正

常血流量的 53.29% ± 2.74%。36、48 h 血流量大幅度上升, 48 h 血流量恢复至正常的 91.90% ± 4.56%, 与其它组比差异显著 ($P < 0.05$)。

5 凋亡细胞的时空、时效关系

TUNEL 阳性细胞呈核固缩、块状浓染的棕色颗粒, 不显示正常的胞浆结构, 外观上很类似于缩小的

神经元, 部分呈现凋亡小体特征。正常和假手术组未发现凋亡细胞; 局灶性脑梗死组 6h 开始出现凋亡细胞, 主要集中于半暗带区, 呈半球状向四周放射样扩展, 随梗死时间的延长凋亡细胞逐渐增多, 梗死 48 h 后凋亡细胞达峰值, 较其它各时点差异显著 ($P < 0.05$)。

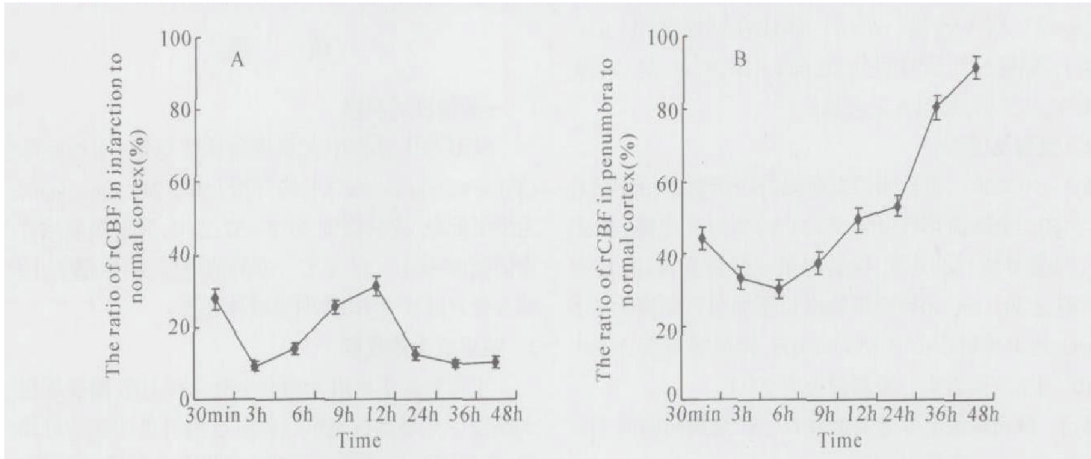


Fig 1 The dynamical curves of rCBF in infarction and penumbra following focal cerebral infarction (% . $\bar{x} \pm s$. $n = 5$). A: infarction; B: penumbra.

图 1 局灶性脑梗死组坏死区和半暗带区 rCBF 的变化曲线

表 1 局灶性脑梗死组坏死区、半暗带区与正常皮层血流量的比值变化

Tab 1 The ratio of rCBF in infarction and penumbra following focal cerebral infarction (% . $\bar{x} \pm s$. $n = 5$)

Region	30 min	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	36 h	48 h
Infarction	27.75 ± 2.52*	9.36 ± 1.72 [△]	13.95 ± 1.68* [△]	25.68 ± 2.55*	31.18 ± 1.44*	10.42 ± 1.37 [△]	9.75 ± 1.18 [△]	10.26 ± 2.34 [△]
Penumbra	44.47 ± 2.85*	33.44 ± 4.18* [△]	30.88 ± 7.11* [△]	37.09 ± 4.13*	49.45 ± 3.26*	53.29 ± 2.74*	80.26 ± 7.54* [△]	91.90 ± 4.56 [△]

* $P < 0.05$ vs 48 h; [△] $P < 0.05$ vs 30 min.

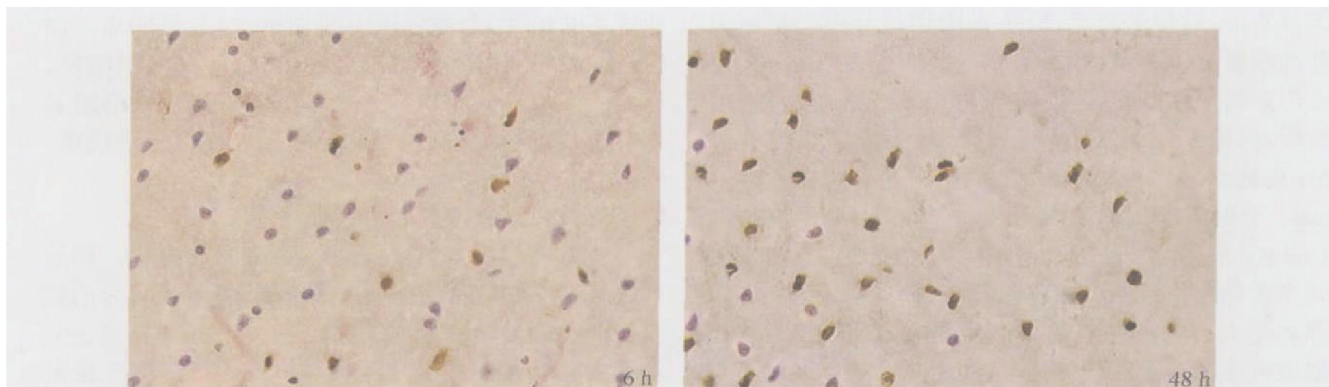


Fig 2 Apoptosis cells detected by *in situ* histologically with terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-fluorescein nick end-labeling ($\times 200$).

6 h: apoptosis cells at 6 h in the group of focal cerebral infarction;
48 h: apoptosis cells at 48 h in the group of focal cerebral infarction.

图 2 局灶性脑梗死后细胞凋亡的 TUNEL 分析

讨 论

本模型利用光化学法诱导血栓形成的原理模拟了人类脑血栓形成的过程。通过瞬间产生大量的

氧自由基, 造成严重的血管内皮损伤, 短时间光照区内血管发生完全血栓性堵塞, 形成局灶性脑梗死^[1]。

生命体征如心率、呼吸、直肠温度的检测及麻醉时间和照射区温度的严格控制, 其主要目的是使模

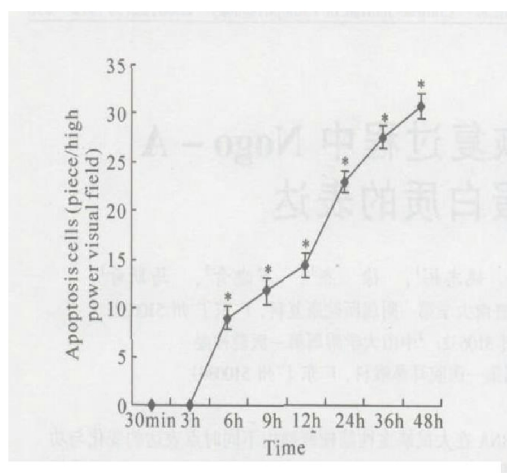


Fig 3 The dynamical progress of apoptosis cells following focal cerebral infarction. $\bar{x} \pm s$. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs the former.

图3 局灶性脑梗死后凋亡细胞的动态变化

型的各种指标更接近临床患者的生理状态。

半暗带是脑血流量介于坏死区和正常脑组织之间的一部分区域,其病理改变位于功能改变和形态损害之间,是一可以被挽救的区域。然而伴随大脑皮层血流量的增加,半暗带的测量区域虽然不断缩小,但并不能阻止已经损伤的区域,本实验研究表明,通过脑组织的大体观察,坏死区仍不断增大,48 h达高峰,这种坏死区进行性扩大的现象有研究表明可能是由于半暗带区的扩散性抑制或细胞凋亡造成的^[3]。本研究结果显示,梗死后3 h出现大量坏死细胞,而凋亡细胞梗塞后6 h才出现,随着梗死时间的延长,两者均有明显的增加,坏死细胞在梗死后24 h达高峰,而凋亡细胞在梗死48 h后最多,我们另有实验证明凋亡细胞在梗死后3 d达高峰。脑缺血损伤以往认为是由急性能量衰竭导致的细胞坏死所造成,但脑循环障碍未进一步加重时神经功能缺损仍进行性加重,神经元的急性坏死显然无法解释,以往动物实验观察到的迟发性神经元死亡这种延迟损伤的可能机制为凋亡^[1,4]。从而认为光化学法诱导的大鼠局灶性脑梗死存在两种形式的细胞死亡方式:损伤急性期以细胞坏死为主,伴随梗死时间的延长以坏死和凋亡两种形式共存。但坏死细胞开始减少时凋亡细胞继续增加,半暗区仍向梗死区发展,提示迟发性神经元死亡可能由凋亡所引起。

HE染色显示光照中心出现急性坏死区,3-6 h可见梗死区大量的微血管内血栓形成,随时间的延

长,血栓逐渐减少,提示此模型在光照6 h后出现了微血栓的自融和血管再通。这与其它文献报道的结果一致^[5]。同时皮层血流量检测显示,光照后3-6 h坏死区和半暗带区血流量均降至最低,6 h后半暗带区的血流量逐渐升高,48 h基本恢复至正常,上述结果进一步验证了模型缺血再灌注的特点。已有研究表明脑缺血再灌注时会引起细胞内钙超载,氧自由基的产生增加,能量代谢障碍等,进而引起细胞凋亡的级联反应^[6,7]。

对局灶性脑梗死后半暗带区皮层血流量与神经细胞凋亡的研究表明,其皮层血流量的恢复引起的再灌注损伤最终导致了迟发性神经细胞凋亡。这就意味着脑梗死早期的溶栓治疗是一把双刃剑,一方面,血流量的恢复可以改善缺血,而另一方面,再灌注性损伤又加重了梗死。如何正确地利用缺血再灌注,最大程度上减少其所带来的负面影响,将成为治疗脑梗死的关键。

[参 考 文 献]

- [1] Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, pathophysiology and treatment strategies [J]. *Anaesthesist*, 2001, 50(12): 905-920.
- [2] Waston DB, Dietrich WD, Busto R. Induction of reproducible brain infarctions by photochemically initiated thrombosis [J]. *Ann Neurol*, 1985, 17(5): 497-504.
- [3] Witte OW, Stoll G. Delayed and remote effects of focal cortical infarction: secondary damage and reactive plasticity [J]. *Adv Neurol*, 1997, 73: 207-227.
- [4] Iwai T, Hara A, Niwa M, et al. Temporal profile of nuclear DNA fragmentation *in situ* gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia [J]. *Brain Res*, 1995, 671(2): 305-308.
- [5] 韩东, 廖福龙, 李文, 等. 冷光源光化学诱导局灶性脑梗死及血管损伤半暗带大鼠模型 [J]. *中国微循环*, 2001, 5(1): 71-75.
- [6] Yuko Morita, Fujimura, Miki Fujimura, Takashi Yoshimoto, et al. Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke [J]. *Stroke*, 2001, 32(10): 2356-2361.
- [7] Li JS, Ren XQ, Liu ZG, et al. Study on changes of neuron apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion in the aged rats [J]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2004, 16(3): 151-154.