

颈交感干离断对局灶性脑缺血大鼠脑组织病理学及热休克蛋白70的影响

董莹¹ 马克宁¹ 卢晓维¹ 李兴志^{1,2}

摘要

目的:通过观察热休克蛋白70(HSP70)在局灶性脑缺血中的表达,探讨颈交感干离断(TCST)对局灶性脑缺血损伤的保护作用。

方法:建立大鼠永久的大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,以TCST模拟星状神经节阻滞(SGB),以MCAO动物模型为基础,观察TCST对其一般状态的影响;HE染色光镜观察各组大鼠术后不同时间点(术后第6、24、48及72小时)脑组织的形态学变化;采用免疫组织化学方法检测脑组织的海马CA1区HSP70表达变化情况。

结果:颈交感干离断治疗可以显著改善局灶性脑缺血动物的一般状态,改善缺血区的病理组织学变化。各组HSP70在局灶性脑缺血后第6小时表达开始增强,第24小时达高峰,后逐渐下降,治疗组HSP70表达低于模型组。

结论:TCST可以显著改善局灶性脑缺血动物的一般状态,改善缺血区的病理组织学变化,可以减少局灶性脑缺血后HSP70的表达,具有神经保护作用。

关键词 局灶性脑缺血;颈交感干离断;星状神经节阻滞;热休克蛋白70

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-05-0451-04

Effects of transection of cervical sympathetic trunk on the expression of heat shock protein 70 and brain histopathology after focal ischemic damage in rats/DONG Ying, MA Kening, LU Xiaowei, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(5): 451—454

Abstract

Objective: To study effects of transection of cervical sympathetic trunk(TCST) on the expression of heat shock protein 70(HSP70) and brain histopathology after focal ischemic damage in rats.

Method: Ninety-six healthy Wistar rats (weight 250—300g) were recruited to establish the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model by the ligation of right carotid artery. The focal ischemic brain tissues were sectioned and the cerebral pathological changes were observed at the 6th, 24th, 48th, 72th after MCAO respectively. The expressions of HSP70 in focal ischemic brain tissues at different time points after MCAO were assayed by immunohistochemistry. The neurological behavior defects of rats were assessed.

Result: The expression of HSP70 was low in the common brain tissue. The expressions of HSP70 in the controlled and treatment group increased from the 6th after MCAO, and reached their peaks at the 24th after ischemia respectively. The expressions of HSP70 in treatment group were less than those in controlled group.

Conclusion: TCST could lessen the neurological defects of animal models, ameliorate the pathological changes of ischemic brain tissues, reduce the expressions of HSP70. It possessed neuroprotective effect and was good for the rehabilitation of neurological function.

Author's address Dept. of Rehabilitation and Pain, The First Hospital of Jilin University, Changchun, 130021

Key word focal cerebral ischemia; transection of cervical sympathetic trunk; stellate ganglion block; heat shock protein70

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.05.013

1 吉林大学第一医院康复疼痛科,吉林长春,130021; 2 通讯作者

作者简介:董莹,女,硕士,住院医师; 收稿日期:2010-04-04

脑血管病是神经系统的常见病和多发病,其中缺血性脑血管病占70%左右,是当前危害人类生命和健康最严重的疾病之一。早期有效的治疗对降低死亡率、改善预后至关重要。急性缺血性脑血管病治疗的主要目的是尽早改善闭塞的血管循环状态,恢复血流,抢救受缺血损害但尚未死亡的脑细胞。

近年来星状神经节阻滞(stellate ganglion block, SGB)除应用于疼痛性疾病的治疗外,在缺血性脑血管病的治疗方面也得到了良好的效果。但其具体作用机制不甚明确。本实验主要采用免疫组化技术,探讨星状神经节阻滞神经保护作用的机制,为临床工作提供理论依据和实验基础,为脑血管病的治疗开拓一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

健康雄性Wistar大鼠96只,鼠龄3—4个月,重250—300g,清洁级,由长春市高新医学动物实验研究中心提供。实验动物随机分为三组:MCAO模型组(M组)、TCST组(T组)及假手术组(S组);三组大鼠并按栓塞的时间随机分为术后第6,24,48,72小时4个亚组,每亚组各8只。T组是在MCAO的同时行颈交感干离断(transection of cervical sympathetic trunk, TCST);S组进行麻醉及手术操作,对血管及神经不夹闭及离断。大鼠术前12h禁食不禁水。

1.2 行为学观察

神经病学评分:待动物清醒后参照Zea Longa^[1]的评分标准进行评分,评分1分以上即为模型成功。

颈交感干离断成功的判定标准:麻醉清醒后若出现同侧眼睑下垂,眼裂变窄,瞳孔缩小等典型的霍纳综合征(Horner's syndrome),则证明颈交感干离断成功。

1.3 标本的采集及处理

①病理标本制备及HE染色:以10%水合氯醛腹腔注射麻醉,依次以37.0℃,0.9%生理盐水,4%多聚甲醛进行心腔灌注,然后断头取脑,继续用4%多聚甲醛,4℃固定24h后取视交叉及其后4mm前的脑组织用PBS漂洗,进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋,连续冠状切片厚度5μm,切片间距50μm。常规HE

染色。光镜下观察右侧神经元的变化。②免疫组化标本的制备:制备连续冠状面切片同前,片厚5μm每一标本随机抽取2张切片进行HSP70免疫染色。采用SABC免疫组化方法检测右侧海马CA1区HSP70的表达。对照免疫组化检测设阳性对照,用福州迈新生物工程公司的阳性对照片作阳性对照,结果为阳性;阴性对照,用PBS液代替一抗作空白对照,结果为阴性。用显微镜观察右侧海马CA1区HSP70的表达情况,并摄片,在CA1区锥体细胞层任选5个相邻的具有代表性的视野(×200),测定HSP70阳性细胞数,取平均值作为每只动物的阳性细胞密度值。

1.4 统计学分析

测得的数据应用SPSS11.5统计软件进行统计学处理,实验结果以均数±标准差表示,组内比较用 t 检验,HSP70的多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 行为学观察

M组及T组大鼠在麻醉清醒后均出现神经功能缺失的体征,T组同时出现同侧眼睑下垂,眼裂变窄,瞳孔缩小等典型的霍纳综合征;S组未见神经功能缺失及霍纳综合征的体征。S组一般状态良好,活动正常,食欲良好,皮毛光泽;M组一般状态较差,活动较少,食欲差,皮毛不光泽,随着脑缺血时间的延长,上述情况逐渐加重;T组一般状态良好,右眼裂变小,较M组明显活跃,食欲较好,皮毛较M组明显光泽,但较S组一般状态差。

2.2 HE染色结果

光镜下可见:梗死区主要位于尾状核、壳核、丘脑前部及外侧部、海马CA1、CA2、CA3区。观察海马CA1区神经元的变化,结果显示:S组有3—4层锥体细胞,排列紧密、整齐;高倍镜下可见细胞大而圆,核仁明显,随着缺血时间的延长,上述情况未见变化。M组第6小时神经元变化以肿胀为主,神经元数量无明显变化,第24小时后随着缺血时间的延长,神经元数量开始逐渐减少,细胞变性。T组在各时间点也出现了缺血性改变,但较M组轻。

2.3 HSP70的表达

阳性的结果是细胞的胞浆、胞核有棕黄色颗粒的大量表达。在CA1区锥体细胞层任选5个相邻的具有代表性的视野,测定HSP70阳性细胞数,取平均值作为每只动物的阳性细胞数(如图1—4)。结果显示HSP70在脑缺血后第6小时即开始表达增强,在第24小时达高峰,后逐渐下降,T组的HSP70表达明显低于M组(见表1)。

表1 HSP70的表达 ($\bar{x}\pm s$, 阳性细胞数)

时间点	鼠数	假手术组	模型组	TCST组
第6小时	8	5.63±1.06	40.88±3.00 ^②	19.50±2.83 ^{①②}
第24小时	8	10.88±2.36	60.50±4.38 ^②	38.50±3.42 ^{①②}
第48小时	8	6.00±1.51	34.75±4.03 ^②	20.25±2.31 ^{①②}
第72小时	8	2.38±1.41	15.88±1.56 ^②	10.10±1.85 ^{①②}

①与M组比较 $P<0.05$;②与S组比较 $P<0.05$

图1 第24小时T组HSP70的表达 (SABC免疫组化方法, ×200)

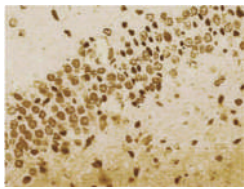


图2 第24小时M组HSP70的表达 (SABC免疫组化方法, ×200)

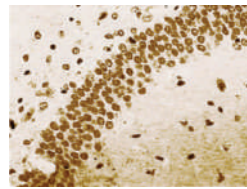


图3 第48小时T组HSP70的表达 (SABC免疫组化方法, ×200)

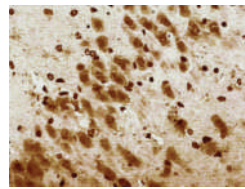
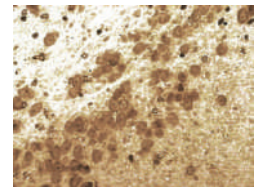


图4 第48小时M组HSP70的表达 (SABC免疫组化方法, ×200)



3 讨论

星状神经节是位于颈部的交感神经节,由C6、7颈部神经节构成的颈下神经节和第1胸椎神经节融合而成,可调节颅内、上肢、心脏的血管功能。SGB显著的生理学效应是使其支配区域内的血管扩张、血流速度加快,缓解因交感神经兴奋导致的血管阻力升高和血流速度减慢,从而改善脑血流量,使灌注压升高,脑缺血、缺氧状态得到改善,使半暗带组织向正常组织转变,挽救濒临死亡的脑组织,缩小梗死灶范围。Gupta等^[2]的研究表明SGB能够不受大脑血管容量自动调节的影响而降低脑血管的紧张度。Ide等^[3]还发现SGB可抵消 β_1 受体阻滞药引起的大脑中动脉血流减慢的作用。临床上也观察到SGB可抑制气管插管^[4]以及减少手术中刺激的应激反应^[5],并对不稳定型心绞痛患者心肌损伤有一定保护作用^[6]。SGB可以干扰应激产生的交感-肾上腺髓质的反应,降低血浆儿茶酚胺水平,阻断或改善随后发生的一系列病理改变。故可以用来治疗缺血性脑血管病。临床观察SGB治疗脑梗死后遗症也取得了确切的疗效^[7-8]。在实验室,我们通常通过对实验动物进行颈TCST来达到模拟人类SGB的目的。实验证明,大鼠的TCST可以显著提高MCAO后大鼠的生存率,并且能够有效地提高局灶性脑缺血大鼠的血浆中降钙素基因相关肽的含量,可能对局灶性脑缺血所致的感觉及功能障碍有治疗作用^[9-10]。

海马是大鼠脑组织缺血性损伤最敏感的区域,其中最易受损的CA1区在缺血后将产生迟发性神经元死亡,故选择海马CA1区作为观察的主要区域,探讨TCST对脑缺血后脑组织病理变化的影响。本实验通过HE染色方法观察了缺血脑组织病理学的动态变化,结果显示:缺血第6小时组HE染色病理改变主要以肿胀为主,随缺血时间延长,可出现神经元固缩及神经元脱失。M组大鼠随着缺血时间的延长,海马CA1区的病理损伤逐渐加重,从第6小时的细胞肿胀变化为主,逐渐演变为神经细胞的变性、坏死,细胞核碎裂、溶解、消失。T组梗死面积小,细胞缺血程度较轻,核固缩、溶解程度轻。我们认为颈交感干离断可以减轻脑缺血对脑组织损伤的病理学影响。

HSP70是热休克蛋白的五个家族中最丰富的一种,它无论在正常或应激情况下,对于细胞的蛋白合成均发挥着重要作用,尤其在脑缺血过程中扮演了重要角色,是细胞受损的标志。由于脑组织对缺血性损伤这一严重的热休克反应极为敏感,HSP70在多种脑缺血模型中均有表达。目前已将HSP作为中枢神经系统损伤,特别是脑损伤的标志物,用于判断脑损伤的部位和损伤的程度。在神经元受到损伤时,HSP70的表达随着损伤程度的增加而增强^[11]。缺血时间越长,HSP表达越高^[12]。据Northern^[13]研究,在发生局灶性缺血、损伤时,大鼠脑HSP70基因

表达较正常时明显增加。已发现高热、癫痫、脑缺血缺氧、脑卒中及脑损伤均会导致中枢神经系统HSP大量表达,并对机体和脑有明显的保护作用^[14]。郑玲玲等^[15]的研究显示,大鼠臂丛神经损伤2个月后,神经损伤组与臂丛神经切断组的脊髓运动神经元内HSP70表达显著高于对照组,且两组运动神经元胞体较对照组胞体大,处于功能活跃状态,提示HSP70在运动神经元再生过程中可能起到作用。在对兔全脑缺血再灌注损伤的研究中发现,SGB可降低兔神经细胞HSP70的过度表达^[16]。本次实验结果显示,S组在术后第6小时也有少量HSP70的表达,考虑出现的原因是手术应激所致。M组及T组与S组比较在脑缺血后第6小时表达已明显增加($P<0.05$),表明局灶性脑缺血造成的脑损伤诱导HSP70的合成增加,以抵抗缺血、缺氧而产生应激反应。由于在神经元受到损伤时,HSP70的表达随着损伤程度的增加而增强^[11],故由上述结果可以判定模型组损伤的程度较假手术组重。免疫阳性细胞数随缺血时间的延长而逐渐增高,这与Vargas等^[12]发表的结果一致。HSP70为脑缺血后组织损伤的早期标志,它的存在意味着损伤尚处于可复阶段。但是随着缺血损伤时间的进一步延长及HSP70的时间性,HSP70的合成进一步减少,HSP70表达逐渐下降。故M及S组HSP70在第24小时达到高峰,后逐渐降低。T组的HSP70表达的变化时程与两组表达变化相同,在第6小时即发现明显表达,到第24小时至高峰后逐渐下降。但是T组各时间点HSP70的表达较M组比较均降低($P<0.05$)。考虑为TCST通过改善脑缺血的状态,降低缺血造成的损伤,减轻应激反应而使HSP70的表达下降。

本实验通过应用TCST改善脑血流、降低应激反应,能有效地改善脑缺血大鼠一般状态,起到挽救半暗带区神经元的作用,减轻神经元坏死,改善脑水肿。这表明TCST对局灶性脑缺血的损伤有保护作用。但是半暗带向梗死灶的转化受多种复杂因素的影响,还包括自由基、一氧化氮、兴奋性递质、酸中毒、炎性介质等,TCST的全部生物学意义及功能目前还不是完全清楚。所以应用TCST的全部后果还不能完全体现在实验当中,还有待于科学研究的进一步深入。但此次实验证明了TCST对脑缺血大鼠

的影响,这为临床应用SGB治疗缺血性脑血管病提供了实验依据。

参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—89.
- [2] Gupta MM, Bithal PK, Dash HH, et al. Effects of stellate ganglion block on cerebral haemodynamics as assessed by transcranial Doppler ultrasonography[J]. Br J Anaesth, 2005,95(5):669—673.
- [3] Ide K, Boushel R, Sorensen HM, et al. Middle cerebral artery blood velocity during exercise with beta-1 adrenergic and unilateral stellate ganglion blockade in humans[J]. Acta Physiol Scand, 2000,170:33—38.
- [4] 赵素真, 刘胜群. 星状神经节阻滞与气管插管应激反应[J]. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(9): 564—565.
- [5] 赵春亭, 吕国蔚. 星状神经节阻滞在侧脑室腹腔分流术中的应用[J]. 首都医科大学学报, 1998, 19(2): 152—154.
- [6] 岳修勤, 钟世镇, 原林, 等. 星状神经节阻滞对不稳定型心绞痛患者心肌损伤的影响[J]. 中国疼痛医学杂志, 2006, 12(6): 332—334.
- [7] 邱继忠, 温德伟, 李艳娟, 等. 星状神经节阻滞治疗脑梗死后遗症32例[J]. 中国临床康复, 2003, 7(1): 283.
- [8] 徐华阳, 石元洪, 王礼彬. 星状神经节阻滞治疗枕叶脑梗死引起的视野缺损的疗效观察[J]. 中国疼痛医学杂志, 2006, 12(5): 313.
- [9] 李兴志, 董莹, 任丽娟, 等. 颈交感干离断对局灶性脑缺血大鼠生存率影响的实验研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23(4): 436—438.
- [10] 李兴志, 张鉴栩, 卢晓维, 等. 颈交感干离断对局灶性脑缺血大鼠血浆中降钙素基因相关肽的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(3): 216—218.
- [11] Burdon RH. Heat shock proteins in relation to medicine[J]. Mol Aspects Med, 1993, 14 (2):83—165.
- [12] Vargas-Alarcon G, Londono JD, Hernandez-pacheco G, et al. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies[J]. Ann Rheum Dis,2002, 61: 48—51.
- [13] Yakubov E, Gottlieb M, Gil S, et al. Over expression of genes in the CA1 hippocampus region of adult rat following episodes of global ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 127(1—2): 10—26.
- [14] Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, et al. Over expression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures[J]. Neurosurgery,2003, 53 (5): 1179—1188.
- [15] 郑玲玲, 吴建中, 支晔, 等. 臂丛神经损伤对热休克蛋白和神经型一氧化氮合成酶表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23 (8): 729—731.
- [16] 全守波, 王清秀, 刘菊英, 等. 星状神经节阻滞对全脑缺血再灌注损伤家兔海马及颞叶皮质热休克蛋白70表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2004, 24 (2): 133—137.