

一重和三重脑震荡大鼠脑固缩的神经细胞定量变化研究

曹珍珍¹⁾, 于建云^{2, 4)}, 李娟娟³⁾, 张 桓²⁾, 朱 乔²⁾, 郭泽云³⁾

(1) 昆明医科大学基础医学实验教学中心; 2) 法医学院; 3) 人体解剖学与组织胚胎学系; 4) 脑损伤研究室, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 建立一重脑震荡 (PCC) 和三重脑震荡 (MCC) 大鼠模型, 通过计数固缩的神经细胞数目变化, 观察 PCC 和 MCC 鼠脑的神经细胞病理学变化规律, 以探讨 MCC 大鼠脑损伤的累加效应. **方法** 用自制金属单摆式闭合性脑损伤打击装置复制 PCC 和 MCC 大鼠模型 96 只, 随机分为 PCC 鼠 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 组和 MCC 鼠 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 组 (n=6) 共 12 个实验组, 另设一正常对照组 (n=6). 运用 HE 组织化学染色、尼氏染色, 对中隔断面的前额叶皮质 (PFC)、梨状皮质 (Pir)、尾壳核 (CPu)、伏隔核 (AcbC)、终纹床核 (BST); 背侧海马断面的无颗粒细胞皮质 (RSA)、海马 CA1-4 区、上、下齿状回、丘脑背外侧核 (LD); 脑干白质以及被盖区等 15 个脑区进行固缩神经细胞计数. **结果** 大鼠 PCC 和 MCC 后绝大多数脑区的固缩神经细胞数目均呈明显上升改变, 且 MCC 后 PFC、Pir、CPu、BST、RSA、LD 和上齿状回部位的 MIG 数目上升变化比 PCC 鼠更加显著 ($P < 0.05$). **结论** 大鼠 PCC 和 MCC 后绝大多数脑区的固缩神经细胞数目均呈上升性改变, 而且 MCC 后小胶质细胞的升高变化比 PCC 更加显著, 为 MCC 具有累积性损伤效应提供了病理学依据.

[关键词] 一重脑震荡; 三重脑震荡; 固缩神经细胞; H 染色

[中图分类号] R338 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 07 - 0012 - 05

A Study on the Quantitation of Brain Microglia Cells of Pure Cerebral Concussion and Multiple Cerebral Concussions in Rats

CAO Zhen-zhen¹⁾, YU Jian-yun^{2, 4)}, LI Juan-juan³⁾, ZHANG Huan²⁾, ZHU Qiao²⁾, GUO Ze-yun³⁾

(1) Experimental Teaching Center of Basic Medicine; 2) College of forensic medicine; 3) Dept. of Histology and Embryology; 4) Dept. of TBI Research, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To establish Pure Cerebral Concussion (PCC) and Multiple Cerebral Concussion (MCC) rats model and observe the changes of pycnosis nerve cells by cell count after injury, so as to understand the additive effect mechanisms of MCC. **Methods** PCC and MCC model were duplicated by using a metallic pendulum-striker concussive device. 96 female and male Sprague-Dawley rats were randomly divided into twelve groups, namely, 2 d, 4 d, 8 d, 16 d, 24 d groups and MCC1d, 2d, 4d, 8d, 16d, 24d groups, and one control group was used. Each group had eight animals (n=6). Each animal was injured and fixed by 4% paraformaldehyde perfused on time. The freezing sections were staining by Hematoxylin and Eosin (HE) and Nissl for microglia cell count in the following areas, namely, PFC, Pir, Cpu, BST, RSA, CA1-4, upper and under dentate gyrus, LD, white matter of brain stem and prerubral region. **Result** Firstly, the numbers of pycnosis nerve cells in most areas and most test points of both PCC and MCC increased compared with the control group after-injury. Secondly, the quantity of MIG in MCC indicated a more increase compared with PCC in the following areas, namely, PFC, Pir, CPu, BST, RST, CA3, LD and under dentate gyrus ($P < 0.05$).

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (3056004); 云南省自然科学基金资助项目 (2005C0026Q, 2008CD52)

[作者简介] 曹珍珍 (1982~), 女, 山西太原市人, 医学硕士, 主要从事人体解剖学实验室及科研工作.

[通讯作者] 于建云. E-mail: jianyunyu@sina.com

Conclusion The numbers of pycnosis nerve cells in both PCC and MCC increase after injury and then recover gradually. MCC has the accumulation of damage compared with PCC.

[Key words] Pure cerebral concussion; Multiple cerebral concussion; pyknotic neurocytes; HE staining

脑震荡 (brain concussion, BC) 为轻度闭合性脑损伤, 占颅脑外伤患者的 75.5% ~ 78.2%。脑震荡曾被广泛认为是一过性功能障碍, 而近来的研究发现, 不论是一次或三次性脑震荡后均存在有一定程度的弥漫性神经元的损伤^[1,2]。大量研究证实, 脑震荡后认知功能障碍与学习记忆密切相关脑区的神经元受损有密切关系, 但关于这些神经元损伤的具体生物学形态、机制尚不完全清楚, 尤其是多重脑震荡是否存在累积效应尚不完全清楚。本课题组前期的研究也发现多重脑震荡后中枢神经系统不同脑区的脑神经元可出现早期与迟发型的神经元变性。为探索 MCC 大鼠脑损伤后神经细胞的累加性损伤反应, 特设计了本实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康 SD 大鼠 150 只, 雌雄各半, 体质量 (230 ± 30) g, 购自昆明医科大学实验动物中心。动物饲养于 12 h 明暗交替的环境中。依据先前于建云等^[3]建立的脑震荡鼠判别标准, 对符合标准的实验动物随机分为一重脑震荡组和三重脑震荡组 (n=6), 另设一正常对照组 (n=6)。

1.2 不同损伤次数脑震荡大鼠模型的复制

PCC 大鼠模型: 采用于建云等^[3]金属单摆闭合性脑损伤打击装置构建脑震荡的方法。给 SD 大鼠额顶部单次钝性打击, 建立 PCC 大鼠模型。MCC 大鼠模型: 按前述同样方法, 每天 1 次, 连续 3 d 给 SD 大鼠额顶部钝性打击 3 次, 建立 MCC 大鼠模型。

1.3 组化样品制备及染色

各组动物定时用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液灌注固定取脑。然后以嗅沟后缘和大脑脚后缘为界将全脑冠状切为 3 块组织, 脑干自正中矢状切开, 分别行连续冰冻切片, 切片厚 15 μm。每组每只动物在不同平面取 6 张切片, 进行 HE 和 Nissl's 组织化学染色。光镜下对不同脑区结构的固缩的神经细胞进行计数, 400 倍计数视野 1 ~ 12 个不等。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 软件包对计数的固缩的神经元进行单因素方差分析, 数据均采用均数 ± 标准差 (\bar{x}

± s) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCC 和 MCC 后不同时间点中隔断面不同部位变性固缩神经元数目的变化

PCC 大鼠伤后不同时间点中隔断面不同部位变性固缩神经元数目均呈现上升趋势。与正常组相比, 前额叶皮质 (prefrontal frontal cortex, PFC) 在伤后 4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组有显著差异 ($P < 0.05$); 梨状皮质 (piriform cortex, Pir)、外侧隔核 (LSD) 在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组有明显差异 ($P < 0.05$); 尾壳核 (caudate putamen, CPu) 在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d 明显上升, 与对照组有明显差异; 终纹床核 (bed nucleus of stria terminalis, BST) 在伤后 2 d、8 d、明显上升, 与对照组有明显差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

MCC 大鼠伤后不同时间点中隔断面不同部位变性固缩神经元数目均呈现上升趋势。与正常组相比, 前额叶皮质 (PFC) 梨状皮质 (Pir)、尾壳核 (CPu)、外侧隔核 (LSD)、终纹床核 (BST) 在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 PCC 组相比, 前额叶皮质在伤后 1 d、8 d、24 d 明显上升, 与 PCC 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 梨状皮质 (Pir) 在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、24 d 明显上升, 与 PCC 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 尾壳核 (CPu) 在伤后 16 d、24 d 明显上升, 与 PCC 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 外侧隔核 (LSD)、终纹床核 (BST) 在伤后 2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与 PCC 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 PCC 和 MCC 后不同时间点海马断面不同部位变性固缩的神经元数目的变化

PCC 大鼠伤后不同时间点海马断面不同部位变性固缩的神经元数目均呈现上升趋势。与正常组相比, 压部后颗粒细胞皮质 (retrosplenial agranular cortex, RSA) 在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA1 区在伤后 4 d、8 d 明显上升与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA2 去在

伤后在伤后 8 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 去海马 CA3 区在伤后 1 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA4 区、上齿状回、下齿状回在伤后 2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 丘脑背外侧核 (laterodorsal thalamic nucleus, LD) 在伤后 2 d、8 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$), 见表 1、2。

MCC 大鼠伤后不同时间点海马断面不同部位变性固缩的神经元数目均呈现上升趋势. 与正常组相比, 压部后颗粒细胞皮质 (RSA) 在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA1 区在伤后 2 d、8 d、16 d 明显上升, 与对照组有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA2 区在伤后 16 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA3 区在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA4 区、上齿状回、下齿状回在伤后 1 d、2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 丘脑背外侧核 (LD) 在伤后 2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$). 与 PCC 组相比, 压部后颗粒细胞皮质 (RSA) 在伤后 8 d、16 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 梨状皮质 (Pir) 在伤后

2 d、4 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA1 区在伤后 8 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA2 区在伤后 16 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA3 区在伤后 1 d、2 d、8 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 海马 CA4 区在伤后 1 d、24 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 上齿状回在伤后 1 d、2 d、8 d、16 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 下齿状回在伤后 1 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$); 丘脑背外侧核 (LD) 在伤后 2 d、4 d、8 d、16 d、24 d 明显上升, 与 PCC 组比较有明显差异 ($P < 0.05$), 见表 1、2。

3 讨论

传统观念认为的脑震荡仅是中枢神经系统一过性的功能障碍, 并无可见的器质性损害早已被打破, 许多学者通过组织病理学观察^[3-5], 伤后早期电镜观察发现, 脑震荡后全脑有一定程度的弥漫性轴索损伤 (diffuse axonal injury, DAI), 较广泛的神经细胞和小血管的损害^[6], 但对于一重和三重脑震荡对比的实验病理学改变尚未见报道. 鉴于此, 本研究特设计了大鼠一重和三重脑震荡 24 d 大脑不同部位病理学系列动态观察研究, 能够对于大鼠

表 1 不同时间中隔断面不同部位变性固缩的神经元数目的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The changes of pyknotic neurocytes at the different positions of different time point in septum section ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	前额叶皮质	梨状皮质	尾壳核	外侧隔核	终纹床核	压部后颗粒细胞皮质
		5 个视野	9 个视野	4 个视野	5 个视野	4 个视野	5 个视野
对照组	6	23.25 ± 4.39	28.50 ± 3.16	15.75 ± 3.65	35.50 ± 7.60	12.50 ± 3.20	24.12 ± 1.24
PCC-1 d	6	30.37 ± 2.50	71.50 ± 18.61*	31.37 ± 5.60*	52.50 ± 8.60*	22.25 ± 5.72	52.5 ± 10.36*
PCC-2 d	6	35.87 ± 8.52	78.75 ± 8.10*	37.25 ± 4.66*	31.25 ± 4.66*	21.62 ± 3.58*	52.00 ± 8.41*
PCC-4 d	6	49.75 ± 7.17*	70.87 ± 8.72*	41.75 ± 16.69*	53.00 ± 9.27*	16.00 ± 3.81	48.00 ± 7.14*
PCC-8 d	6	69.50 ± 4.60*	147.50 ± 16.57*	44.50 ± 6.07*	46.50 ± 6.07*	21.50 ± 1.60*	68.00 ± 6.84*
PCC-16 d	6	57.25 ± 11.87*	144.63 ± 19.70*	40.75 ± 6.69*	49.75 ± 6.05*	16.75 ± 1.66	51.75 ± 4.39*
PCC-24 d	6	90.50 ± 26.66*	150.75 ± 17.71*	19.75 ± 1.66	39.75 ± 4.66*	11.75 ± 1.66	98.62 ± 4.24*
MCC-1 d	6	48.75 ± 6.69*#	77.75 ± 16.69*#	24.75 ± 6.90*#	62.75 ± 9.05*	19.75 ± 1.66*	47.00 ± 5.21*
MCC-2 d	6	57.25 ± 5.59*	115.38 ± 9.54*#	40.75 ± 6.69*	59.75 ± 6.69*#	31.75 ± 9.05*#	57.00 ± 4.02*
MCC-4 d	6	72.62 ± 9.79*	89.12 ± 14.43*#	41.50 ± 4.56*	71.00 ± 8.51*#	30.00 ± 1.85*#	54.00 ± 5.23*
MCC-8 d	6	98.00 ± 13.65*#	116.12 ± 9.03*#	59.25 ± 7.74*	89.50 ± 16.03*#	32.50 ± 1.60*#	104.75 ± 5.41*#
MCC-16 d	6	63.62 ± 5.04*	160.87 ± 11.51*	46.50 ± 8.60*#	99.75 ± 14.36*#	27.50 ± 3.60*#	85.00 ± 8.84*#
MCC-24 d	6	129.75 ± 17.69*#	170.00 ± 18.88*#	35.62 ± 7.67*#	68.75 ± 4.05*#	23.75 ± 3.66*#	107.50 ± 8.75*

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PCC 组比较, # $P < 0.05$.

递质系统的研究相一致, 呈现伤后早期与迟发性损害两个高峰。

本研究还发现, MCC 鼠在大多数部位的 8 d、16 d、24 d 组, 一般与 PCC 鼠有明显差别, 特别是在高峰的 8 d 时, MCC 鼠固缩变性的神经元数目为 PCC 鼠的 1.01 ~ 2.11 倍, 说明其损伤程度明显重于 PCC 组, 而在 1 d、2 d、4 d 这些损伤后的早期组, MCC 鼠与 PCC 鼠的差别不像损伤后晚期组明显, 说明随着时间的推移 MCC 鼠的远期损害逐渐重于 PCC 组。也为三重脑震荡的累加效应提供了病理学的基础。

损伤的部位不同, 损伤程度也不同。本实验发现, 损伤的直接冲击部位如中隔断面的 PFC、RSA 以及对冲部位如 Pir 等近脑底区域的损伤较其他部位更重。中间部位: CA1-CA4、上、下齿状回的损伤则没有其他部位损伤那么严重。顶枕部受击后作用力在皮质到海面的传播中由浅至深递减, 故中间部位区域并没有其他区域损伤那么明显。本研究还发现 CPU 区与胼胝体相连的部位固缩变性的神经元数目更多, 推测原因可能是与灰白质相交接更易产生较大的牵拉, 剪切作用有关。脑室周围部位: BST、LSD、LD 的部位损伤程度不定, 有轻有重, 可能是由于机械性暴力作用之后, 流体作用力对于不同部位的大小不同造成的, 具体原因还有待进一步研究。

固缩变性的神经元可能是坏死, 也可能是凋亡, 即细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)。细胞坏死是因病理而长生的被动死亡, 坏死细胞的膜通透性增高, 致使细胞肿胀, 细胞器变性或肿大, 早期核无明显形态学变化, 最后细胞破裂。另外坏死的细胞裂解要释放出内含物, 并常常引起炎症反应, 在愈合过程中常常伴随组织器官的纤维化, 形成瘢痕。细胞凋亡是生命的基本现象之一, 参与许多病理生理过程。细胞凋亡是受细胞内活性基因、酶和信号转导途径调控的一个瀑布式过程。细胞凋亡发生时的形态改变时多阶段的, 首先是细胞缩小, 胞质凝缩内质网疏松并和细胞膜融合, 核糖体、线粒体等聚集, 但结构无明显改变, 染色质逐渐凝集成新月状,

附在核膜周围, 嗜碱性增强, 之后细胞核固缩成均一的致密物, 进而核碎裂, 包膜完整。继之核膜出芽, 固缩染色质脱落, 形成膜包凋亡小体 (Apoptotic bodies)。最终凋亡小体被周围吞噬细胞吞噬降解。所谓的固缩变性的神经细胞, 其形态极其类似于细胞凋亡过程中的一个形态。出现这种现象的原因推测为脑震荡后, 神经细胞受到损伤并没有完全坏死, 而是通过酶或信号转导途径启动了凋亡基因, 进而完成凋亡的这系列瀑布式过程。这些固缩变性的细胞究竟是坏死的细胞还是处于凋亡过程一个阶段的凋亡细胞还需更进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 于建云, 李俊祥, 郭泽云, 等. 实验大鼠轻中型闭合性脑损伤分级的昏迷指标与量化标准研究[J]. 法医学杂志, 2008, 1 (24): 8 - 11.
- [2] 李娟娟, 于建云, 郭泽云, 等. 多重脑震荡大鼠脑神经元病理变化的研究[J]. 神经解剖学杂志, 2007, 23 (6): 645 - 649.
- [3] 于建云, 李树华, 韩晓华, 等. 脑震荡鼠细胞组织病理学研究[J]. 昆明医学院学报, 2003, 24 (2): 1 - 5.
- [4] 于建云, 李俊祥, 李娟娟, 等. 三重脑震荡鼠模型建立及组织病理学动态改变观察[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2010, 9 (4): 337 - 340.
- [5] WADAE, MEKINNOND, HEINEMANN, et al. The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (alpha5) in the rat central nervous system[J]. Brain Res, 1990, 526 (1): 45 - 53.
- [6] 康健捷, 黎海蒂, 徐海伟, 等. 慢性低剂量梭曼染毒对大鼠学习记忆及脑组织胆碱酯酶活性的影响 [J]. 中国行为医学科学, 2004, 13 (4): 1 879 - 1 881.
- [7] 张东辉. 弥漫性轴索损伤研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13 (1): 64 - 65.
- [8] AHMAD I, DAS A V, JAMES J, et al. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation [J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15 (1): 53 - 62.
- [9] PAUL J P, CHRIS M N, MARSHALL G, et al. Striatal lesions interfere with acquisition of a complex maze task in rats[J]. Behav Brain Res, 2009, 197 (1): 138 - 143.

(2013 - 03 - 19 收稿)