

一重和三重脑震荡大鼠损伤后早期小胶质细胞变化的研究

王 剑¹⁾, 董 阳¹⁾, 张 桓¹⁾, 徐林成¹⁾, 于建云¹⁾, 李树华¹⁾, 曹珍珍²⁾

(1) 昆明医科大学法医学院; 2) 解剖与组织胚胎学系, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 建立单纯性脑震荡 (pure cerebral concussion, PCC) 和三重脑震荡 (multiple cerebral concussion, 3MCC) 大鼠模型, 观察上述 2 种大鼠损伤后早期中隔冠状断面小胶质细胞的反应变化, 探讨小胶质细胞 (MG) 在不同脑损伤后的病理变化规律. **方法** (1) 动物分组: 成年健康 SD 大鼠 30 只, 体重 (260 ± 20) g, 随机分为正常组、PCC 和 3MCC 模型组, 各模型组再随机分为 1 d 组、4 d 组二个观测点, 各组含动物 6 只. (2) 采用金属单摆闭合性脑损伤打击装置复制 PCC、3MCC 大鼠模型, 其中 PCC 大鼠 12 只, 3MCC 大鼠 12 只. (3) 采用抗 CD11b 抗体行免疫组化染色, 用显微图像分析系统, 对鼠脑中隔冠状断面的额顶叶皮质区 (FrPa)、胼胝体 (CC)、尾壳核 (CPu)、侧脑室旁中央间隔区 (MS-LV) 等脑区的 CD11b 阳性细胞数进行观测分析. **结果** (1) 正常状态下, CD11b 阳性细胞很少; (2) PCC、3MCC 模型组中隔断面上述各脑区的 CD11b 阳性细胞数在伤后明显增加, 与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); (3) 3MCC 组 CD11b 阳性细胞数的增加高于 PCC 组 ($P < 0.05$). **结论** (1) PCC 和 3MCC 伤后 1~4 d 中隔断面 MG 出现明显激活, 提示 MG 参与了 PCC 和 3MCC 的伤后病理生理改变过程; (2) 随损伤次数增加, CD11b 阳性细胞数呈明显损伤累积性增加.

[关键词] 单纯性脑震荡; 三重脑震荡; 小胶质细胞; 大鼠

[中图分类号] R651.1+5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0004-05

A Study on the Quantitative Changes of Microglia in the Early Period after Pure Cerebral Concussion and Multiple Cerebral Concussion in Rats

WANG Jian¹⁾, DONG Yang¹⁾, ZHANG Huan¹⁾, XU Lin-cheng¹⁾, YU Jian-yun¹⁾, LI Shu-hua¹⁾, CAO Zhen-zhen²⁾

(1) School of Forensic Medicine; 2) Dept. of Anatomy & Embryology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To establish a rat model of the Pure Cerebral Concussion (PCC) and Multiple Cerebral Concussion (3MCC), so as to observe and make comparison of the reactions and changes in microglia in the saeptum coronary section of the early injured rats. **Methods** (1) Rats grouping: 30 healthy adult SD rats with weight of 260 ± 20g, were divided randomly into normal group, PCC model group and 3MCC model group. The model groups were regrouped into 1d group and 4d group for observation. (2) The Metal pendulum closed brain injury blow device was used to set up PCC model and MCC model in order to replicate 12 rats of PCC model and MCC model respectively. (3) The immunohistochemical S-P method was adopted to dye the CD11b antibodies. After that, we observed the expressions of rats' CD11b in FrPa, cc, CPu and MS-LV in the septal coronary denomination parietal lobe. Then we measured and analyzed the reactant of the CD11b through Image Analysis Technology. **Results** (1) Under normal condition, the expression of the CD11b was rare; (2) The expression of CD11b in different brain areas which were partitioned in PCC model and MCC model increased gradually after injury. And compared with

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81360467); 云南省应用基础研究 (联合专项) 重点项目 (2013FB104).

[作者简介] 王剑 (1989~), 男, 山东潍坊市人, 在读硕士研究生, 主要从事脑损伤工作.董阳和王剑对本文有同等贡献.

[通讯作者] 于建云.E-mail:jianyunny@sina.com

the normal group, they were significantly different ($P < 0.05$). (3) The expression increase tendency of CD11b in 1d and 4d of MCC group after injure were higher than the 1d and 4d in PCC group. **Conclusions** (1) MG in the partition surface can be activated in the early injure of PCC and MCC, suggesting that MG is involved in the pathological changes of PCC and MCC after injury; (2) The expression of CD11b increases regularly with the exacerbation of injury severity.

[**Key words**] PCC; MCC; Microglia; Rat

脑震荡 (cerebral concussion, CC) 是创伤性脑损伤 (TBI) 中的轻度损伤类型, 其发生率较高, 机制不明. 在拳击、跆拳道、橄榄球、足球、曲棍球、棒球等运动员紧密接触、竞技激烈的项目中, 运动性脑震荡 (sports-related cerebral concussion, SRCC) 发病率高达 80% ~ 90%^[1-4]. SRCC 的特点是在同一运动参与者身上发生多次性脑震荡 (multiple cerebral concussion, MCC). 临床观察发现 CC 后常给伤者留下较持久的脑震荡综合征 (PCS), 表现为学习、记忆等方面的障碍^[1,2]. 小胶质细胞 (MG) 作为中枢神经的一个重要效应细胞, 广泛分布于中枢神经系统. 各种颅脑损伤可使小胶质细胞迅速激活, 其活化和增殖是中枢神经系统炎症反应的重要表现. 研究 MG 在不同脑震荡类型中的激活时程变化规律, 对进一步探讨脑震荡及其 PCS 的病理变化具有重要意义, 故特设计本实验研究.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

冰冻切片机, Leica DFC280 显微照相系统, Image-Pro Plus 6.0 高清晰图文分析系统, 10%水合氯醛, 多聚甲醛, 二甲苯、中性树胶, 小鼠抗-CD11b 单克隆抗体, S-P 即用型超敏试剂盒: Kit-9702, 生物素标记的二抗 (山羊抗小鼠), DAB 显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司), 磷酸盐缓冲液, 柠檬酸盐抗原修复液, Triton X-100 (华美生物工程公司).

1.2 模型复制及分组

1.2.1 实验动物 成年健康 SD 大鼠 30 只, 体重 (60 ± 20) g. 大鼠模型复制前 1 周运至实验室, 在安静环境下 (明/暗周期为 12 h) 分笼饲养, 自由摄食饮水. 饲养环境温度 15℃ ~ 22℃, 湿度 50% ~ 60%.

1.2.2 模型复制及分组 本模型复制采用于建云等研制的金属单摆闭合性脑损伤打击装置构建大鼠模型及其标准判别 CC 模型^[4,5]. 打击前先记录大

鼠的呼吸频率, 测试其角膜反射、疼痛反射、外耳道反应、翻正反射, 记录大鼠的精神运动、有无竖尾、大小便失禁等情况. 将完全清醒的大鼠固定在自制的铁质单摆式脑损伤复制仪实验台上, 头上昂 45°, 上举摆锤使打击达 50 ~ 80°, 使之自由下落并撞击在大鼠额顶正中部位. 打击后, 立即解除大鼠束缚, 观察并记录大鼠恢复自主呼吸及上述各种反射的时间, 同时观察打击后 30 min 内大鼠呼吸及运动能力的变化. 将复制成功的 12 只 PCC 模型随机分为 1 d 组、4 d 组, 同样 MCC 模型组随机分为 1 d、4 d 组 ($n = 6$).

1.3 免疫组织化学染色实验

各组大鼠用 10%水合氯醛 (0.25 mL/100 g) 腹腔注射麻醉, 将麻醉的大鼠仰卧固定在冰袋上灌注取脑. 取出全脑用 4%多聚甲醛缓冲液继续后固定 48 h (中间换液 1 次). 然后, 依次入梯度蔗糖脱水, 脑组织沉底后取出. 以嗅沟后缘为界切开大脑, 嗅沟前组织块, 以嗅沟切面为包埋面用 OTC 包埋. 冰冻切片机连续冠状切片, 切片厚 16 μm, 每只动物 1 张切片. 进行抗 CD11b 免疫组织化学染色 (S-P 法), 阴性对照空白用 0.01MPBS - 0.1%trion 代替一抗.

1.4 染色结果观测

每只大鼠自中隔冠状切面 1 张切片. 在中隔区断面对以下结构或核团进行固定采图取样: 额顶叶皮质 (frontoparietal cortex, FrPa); 胼胝体 (corpus callosum, CC); 侧脑室旁中央间隔区 (middle septal area-LV, MS-LV); 侧脑室旁尾壳核 (caudate putamen-LV, CPu-LV). 脑区恒定部位用 Leica DFC280 显微照相系统进行观察, 并用 Image-Pro Plus 6.0 高清晰图文分析系统对恒定部位 400 × 视野分析测量 CD11b 阳性细胞个数.

1.5 统计学处理

应用 SPSS 统计软件包处理, 各组数据资料均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 对 CD11b 阳性细胞计数结果, 进行单因素方差分析及两两比较的 q 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

PCC、MCC 模型组大鼠中隔冠状面 FrPa, cc, MS-LV, CPu-LV 在 1 d、4 d 时间点上 CD11b 阳性细胞增加趋势一致, 以上各个部位损伤后各个时间

点 CD11b 阳性细胞计数与正常对照组相比均有增多, 且均有统计学意义 ($P < 0.05$); 以上各部位, 在 1 d、4 d 两个相同时间点上 MCC 组 CD11b 阳性细胞数较 PCC 组均有显著增加, 且均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1 及图 1~5.

表 1 中隔断面不同部位各损伤类型 CD11b 阳性细胞计数的数据 $[(\bar{x} \pm s), n = 6]$

Tab. 1 The number of CD11b positive cells in different parts with different types of injury $[(\bar{x} \pm s), n = 6]$

组别	FrPa	cc	CPu-LV	MS-LV
正常组	18.61 ± 3.93	23.93 ± 4.15	23.24 ± 5.52	30.12 ± 4.76
PCC 1 d	66.27 ± 4.28 [△]	74.92 ± 6.65 [△]	70.14 ± 6.44 [△]	83.08 ± 7.80 [△]
PCC 4 d	86.20 ± 4.76 ^{△△}	96.65 ± 7.81 ^{△△}	93.33 ± 6.85 ^{△△}	108.48 ± 8.08 ^{△△}
MCC 1 d	97.96 ± 5.33 ^{△*}	109.13 ± 8.04 ^{△*}	115.43 ± 7.24 ^{△*}	121.13 ± 7.53 ^{△*}
MCC 4 d	127.40 ± 6.31 ^{△**}	142.75 ± 9.14 ^{△**}	149.86 ± 7.33 ^{△**}	154.44 ± 8.15 ^{△**}

与正常组比较, [△] $P < 0.05$; 与 PCC1 d 组比较, ^{△△} $P < 0.05$; 与 PCC 1 d 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 MCC 1 d 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 PCC 4 d 组比较, ^{*} $P < 0.05$.

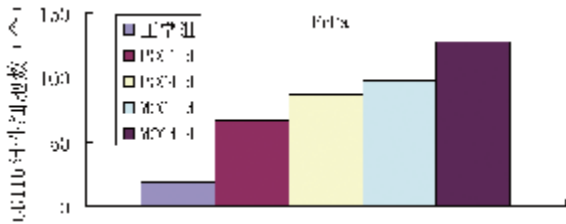


图 1 FrPa 部位 CD11b 阳性细胞计数变化

Fig. 1 The number of CD11b positive cells in FrPa district

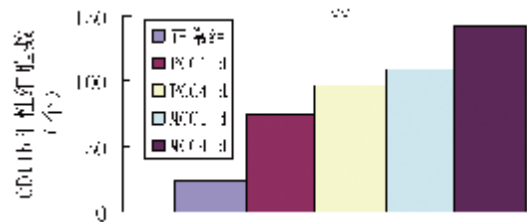


图 3 CPu-LV 部位 CD11b 阳性细胞计数变化

Fig. 3 The number of CD11b positive cells in CPu-LV district

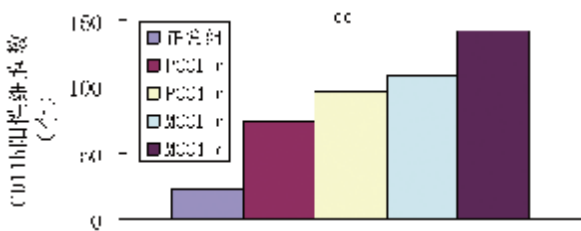


图 2 cc 部位 CD11b 阳性细胞计数变化

Fig. 2 The number of CD11b positive cells in cc district

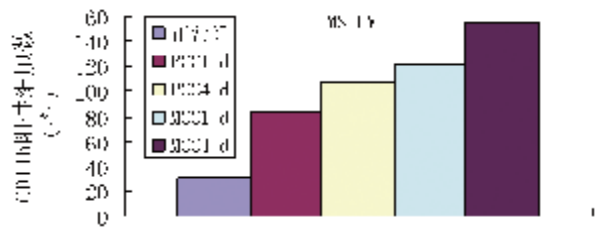


图 4 MS-LV 部位 CD11b 阳性细胞计数变化

Fig. 4 The number of CD11b positive cells in MS-LV district

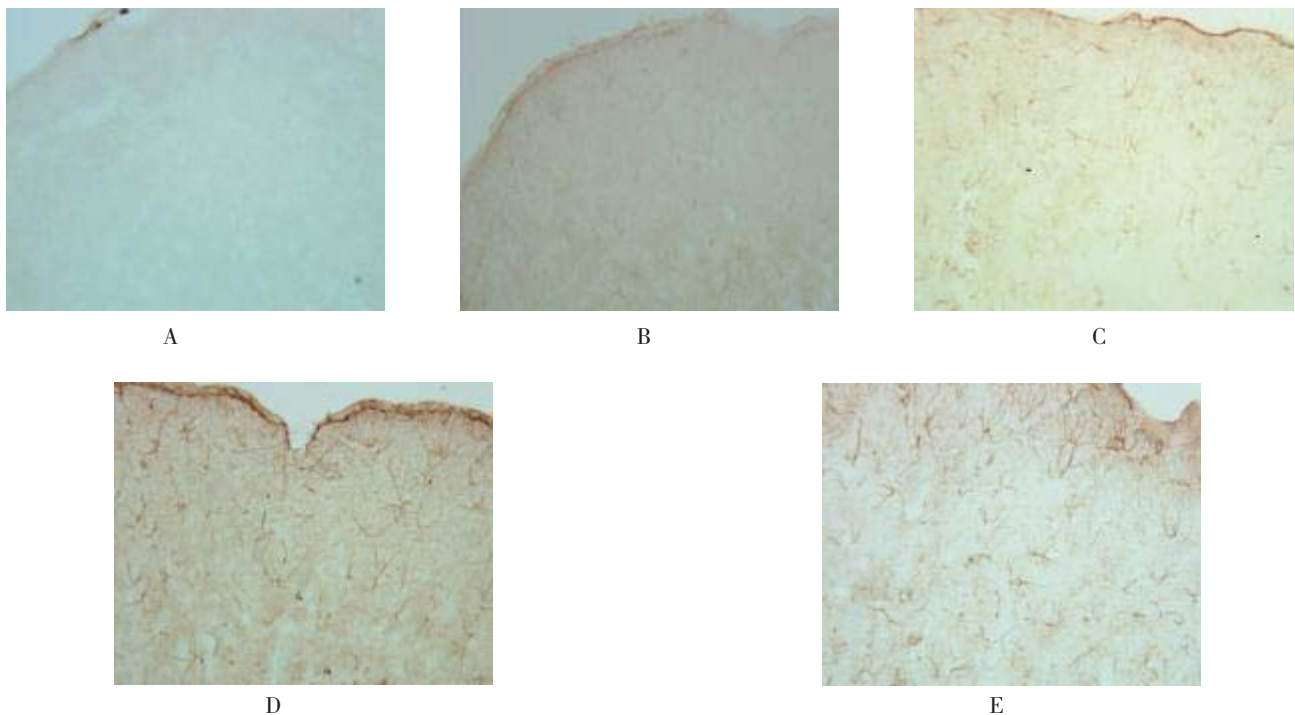


图 5 中隔断面 FrPa 脑区各模型组不同时间点 CD11b 阳性细胞图片

Fig. 5 The pictures of CD11b positive cells in FrPa district in different models groups at different time points

A:FrPa 区正常组 CD11b 阳性细胞 ($\times 400$); B:FrPa 区 PCC1d 组 CD11b 阳性细胞 ($\times 400$); C:FrPa 区 PCC4d 组 CD11b 阳性细胞 ($\times 400$); D:FrPa 区 MCC1d 组 CD11b 阳性细胞 ($\times 400$); E:FrPa 区 MCC4d 组 CD11b 阳性细胞 ($\times 400$).

3 讨论

脑震荡 (CC) 属于轻中度颅脑损伤, 引起皮质、海马、脑干、间脑、小脑等广泛区域存在不同程度的神经元变性与不完全性坏死, 相关研究表明脑震荡后全脑有一定程度的弥漫性轴索损伤, 较广泛的神经细胞和微小血管的损害. 创伤性脑损伤 (TBI) 可以引起中枢神经系统的炎症反应, MG 是目前公认的中枢神经效应细胞, 广泛分布于中枢神经系统, 约占胶质细胞总数的 5%~20%. 正常情况下, MG 处于静息状态, 但 MG 对于刺激反映灵敏, 病理情况下可迅速被激活成为活化的 MG, 伴有增殖、迁移及形态功能的变化, MG 是 TBI 的重要的标志性产物. 抗 CD11b 抗体用于标记脑组织 MG, 阳性反应定位于细胞质, 呈棕黄色“爪样”形态, 主要分布在皮质缺血区、嗅皮层以及海马区, 缺血对侧区少见阳性细胞. 本实验研究发现, 正常对照组大鼠脑中隔断面 MG 处于静息状态, CD11b 阳性细胞染色很浅、胞体小、突起细小、分枝少, 细胞轮廓不清晰, 难以辨认. 损伤组大鼠中隔断面 MG 被激活, PCC 损伤后 1 d, CD11b 阳性细胞染色变深, 突起变成、分支增多, 细胞形态轮廓清晰. PCC4 d 及 MCC 观察组, CD11b 阳性细胞

染色深, 呈深棕色、高分枝状、胞体深染呈杆状或扁椭圆形, 突起可出现多分枝交叉呈现蜘蛛状. 时程变化数据显示, 相同损伤模型下, 4 d 组较 1 d 组 CD11b 阳性细胞数明显增加; MCC 损伤组 CD11b 阳性细胞数明显高于相同天数的 PCC 损伤组; MCC 1 d 组 CD11b 阳性细胞数高于 PCC4 d 损伤组. PCC 1 d 组、PCC4 d 组、MCC 1 d 组、MCC4 d 组, CD11b 阳性细胞数分别为正常组的 2.8~3.6、3.6~4.6、4.1~5.3、5.1~6.8 倍. 可见 PCC 及 MCC 损伤后 MG 被高度激活, 且 MG 的激活与损伤程度及伤后时间有一定的相关性. 周杰^[9]等采用改良的 Feeney 法自由落体复制大鼠颅脑损伤模型, 应用抗 OX-42 免疫组化 SABC 法染色观察大鼠海马区 MG 变化发现, MG 在伤后 1 h 出现轻度反应、染色较浅、细胞形态不规则, 6 h 出现早期反应状态, 染色深、胞体较小, 12 h MG 数量及形态表现达到高峰, 染色深、体积大、轮廓清晰. Kato^[7]等在大鼠脑缺血研究中发现, 脑缺血后第 2 天海马 CA1 区增至细胞核抗原阳性 MG 达 83%, 第 7 天大量活化增殖, 数量增加 7.6 倍. Venkatesan 等在小鼠弥漫性轴索损伤研究中发现, 损伤的胼胝体部位表达凝集素 Galectin-3/Mac-2 的 MG 长期内上调^[10]. 液压冲击脑损伤大鼠初级运动皮层^[8]以及在恒

河猴动物模型前运动皮质损伤中^[9],小胶质细胞保持其激活状态至少 1 a. 分析认为,观察结果不同原因可能是动物年龄、模型差异及观察部位不同所致.

TBI 后最初的炎症反应造成了神经元的损伤以及血-脑屏障的破坏^[8]. MG 在神经系统病变中可能发挥着损伤与修复的双重作用^[11]. 在几分钟之内 MG 被激活,并释放炎症细胞因子和趋化因子. 损伤后激活的 MG 也会产生其他的神经毒性的产品,如一氧化氮(NO)和超氧阴离子自由基^[12]. MG 不仅表达炎症细胞因子(IL-1, IL-6, TNF- α),而且还分泌无数的抗炎细胞因子(IL-1 受体拮抗剂)和神经营养因素、脑源性神经营养因子(BDNF, NGF, TGF- β)^[13].

本实验研究表明,单摆打击形成 PCC 及 MCC 损伤后, MG 被激活,形态、数量发生改变,激活程度与损伤的严重程度及时程具有一定的相关性,且改变维持较长时间. 本实验仅仅是对脑震荡损伤前期研究,要清楚本模型损伤后 MG 激活的完整时程变化,需要进一步的研究. MG 活化对神经系统的修复及损伤作用,机制网络复杂. 因此研究 MG 与 TBI 的关系,从而充分发挥其对脑组织的保护作用、降低脑组织的损伤,具有重要的意义.

[参考文献]

- [1] RAVDIN L D. Assessment of cognitive recovery following sports related head trauma in boxers[J]. Clin J sport Med, 2003, 13(1):21-27.
- [1] DANIEL J C. Repeated measure of cognitive processing efficiency in adolescent athletes: implications for morning recovery from [J]. Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol, 1999, 12(3):167-169.
- [3] FEGUSON R J. Postconcussion syndrome following sports-related head injury: expectation as etiology [J]. Neuropsychology, 1999, 13(4):582-589.
- [4] 于建云. 实验大鼠轻中型闭合性脑损伤分级的昏迷指数与量化标准研究[J]. 法医学杂志, 2008, 1:8-11.
- [5] 于建云. 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, 9:337-340.
- [6] 周杰, 章翔. 大鼠创伤后小胶质细胞激活的时程及形态变化研究[J]. 中国神经外科杂志, 2006, 11:226-229.
- [7] KATO H, TAKAHASHI A. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat Brain Res Bull, 2003, 60:215-221.
- [8] SMITH D H, CHEN X H. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat [J]. Neurotrauma, 1997, 14:715-727.
- [9] NAGAMOTO-COMBS K, MCNEAL D W, et al. Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central nervous system after traumatic brain injury [J]. Neurotrauma, 2007, 24: 1719-1742.
- [10] CHARU VENKATESAN. Chronic upregulation of activated microglia immunoreactive for galectin-3/Mac-2 and nerve growth factor following diffuse axonal injury [J]. Journal of neuroinflammation, 2012, 7:32
- [11] 李小媚. 小胶质细胞的发育和功能 [J]. 解剖学研究, 2012, 32, 3(3):213-217.
- [12] TERRENCE TOWN. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses [J]. Journal of Neuroinflammation, 2005, 10(13):2-24.
- [13] DIANA G, HERNANDEZ-ONTIVEROS, NAOKI TAJIRI, et al. Microglia Activation as a Biomarker for Traumatic Brain Injury [J]. Front Neurol, 2013, 3(26):4-30.

(2014-05-20 收稿)