

大鼠液压脑损伤导致皮质神经细胞的早期凋亡

曾 军^{1,4}, 卢亦成^{1*}, 骆 纯¹, 叶煦亭², 仲人前³

(1. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003; 2. 第二军医大学基础部数理教研室, 上海 200433; 3. 长征医院检验科; 4. 厦门大学附属中山医院神经外科, 厦门 361004)

[摘要] **目的:**观察大鼠脑损伤后神经细胞的早期凋亡及其动态变化。**方法:**利用液压脑损伤致伤仪制作 SD 大鼠左顶叶中度脑损伤模型, 对照组埋打击管但不致伤。动物致伤后分别于伤后 6 h、24 h 和 48 h, 采用流式细胞仪和电子显微镜, 对大鼠液压脑损伤后神经细胞凋亡的动态过程进行观察。**结果:**流式细胞术检测结果显示大鼠液压脑损伤后 6 h 左侧顶叶皮质神经细胞即可出现早期凋亡现象。伤后 6 h 神经细胞的早期凋亡率为 21.97% ($P < 0.01$), 伤后 24 h 达高峰, 为 65.90% ($P < 0.01$), 伤后 48 h 与伤后 24 h 比较无显著性差异。电镜观察发现伤后 24 h 可出现早期凋亡。**结论:**大鼠液压脑损伤后 6 h 即可出现神经细胞的早期凋亡, 较以往报道的伤后神经细胞凋亡出现的时间更早。

[关键词] 细胞凋亡; 脑损伤; 神经元

[中图分类号] R 651.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1343-04

Early apoptosis of cortical neurons after fluid-percussion brain injury in rats

ZENG Jun^{1,4}, LU Yi-cheng^{1*}, LUO Chun¹, YE Xu-ting², ZHONG Ren-qian³ (1. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Electron Microscope, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Clinical Diagnosis, Changzheng Hospital; 4. Department of Neurosurgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the early apoptosis and its dynamic changes after traumatic brain injury (TBI) in Sprague-Dawley rats. **Methods:** The moderate brain injury model was established by a fluid-percussion brain injury device; animals in control group were only cannulated but not injured. Then the injured animals were sacrificed 6, 24 and 48 hours after injury. Flow cytometer and electron microscope were used to observe the apoptosis of nerve cells. **Results:** Flow cytometer showed that the early apoptosis of nerve cells occurred in left parietal cortex 6 hours after TBI, with an apoptotic ratio being 21.97%, significantly higher than that in the control group at the same time point ($P < 0.01$). The apoptosis reached its peak 24 hours after TBI, with an apoptotic ratio being 65.90%, significantly higher than that in the control group at the same time point ($P < 0.01$); there was no significant difference between those of 24 hours and 48 hours after TBI ($P > 0.05$). Electron microscope showed apoptosis of nerve cells in the left parietal cortex 24 hours after TBI. **Conclusion:** Early apoptosis of nerve cells may occur 6 hours after TBI, which is earlier than previously reported.

[KEY WORDS] apoptosis; brain injury; neurons

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1343-1346]

严重颅脑创伤由于其高病死率和高病残率一直是神经外科研究最为关注的课题之一。迄今为止在严重颅脑创伤的治疗上尚没有取得突破性进展, 主要在于对创伤性脑损伤的机制尚不清楚。细胞凋亡 (apoptosis) 概念的提出在生命科学领域的研究中已引起人们极大的兴趣, 有关细胞凋亡在颅脑损伤机制中的研究也日益增多^[1-4]。

1995 年 Rink 等^[1]证实了在创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 后存在神经细胞凋亡, 引起广泛的重视。以往确定细胞凋亡的存在多采用 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 方法和电子显微镜观察进行评定^[1-2,5], 近年来采用带

有绿色荧光探针异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (Annexin V-FITC) 染色, 结合流式细胞仪或荧光显微镜可以检测到细胞的早期凋亡, 被认为是最敏感的指标之一^[6-8]。

本实验以大鼠液压脑损伤为模型, 利用流式细胞仪和电子显微镜检测细胞凋亡, 进一步探讨大鼠脑损伤后神经细胞的早期凋亡及凋亡的时程变化。

[作者简介] 曾 军, 硕士生, 副主任医师。

E-mail: zengjun68@sina.com

* Corresponding author. E-mail: lyc305@126.com

1 材料和方法

1.1 动物、主要仪器和试剂 雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体质量(280±20)g,月龄 2~3 个月,上海交通大学医学院实验动物房提供。液压致伤装置(美国弗吉尼亚大学医学工程部);P23 压力传感器(美国 Gould 公司);江湾 II 型立体定向仪(第二军医大学);H-800 型透射电子显微镜(日本日立公司);超薄切片机(瑞士 LKB 公司);微量移液器(美国 HLT 公司);CYTOMICS FC 500 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);Annexin V-FITC 试剂盒(晶美生物工程有限公司)。

1.2 动物模型的建立和处理 采用液压脑损伤致伤仪制作中度脑损伤模型^[9-11],打击强度(1.5±0.2) atm(1 atm=101.325 kPa),致伤部位为左顶叶。伤后动物昏迷、反射消失、出现去脑强直等神经功能障碍,持续约 10 min 左右,但自主呼吸存在。对照组埋管但不致伤。动物致伤后分别于伤后 6、24 和 48 h 各处死 9 只动物,以伤灶为中心,旁开 2~3 mm,60°脑域内获取脑皮质组织^[12]。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡 用去离子水按 1:4 稀释结合缓冲液(4 ml 结合缓冲液+12 ml 去离子水);用 4℃ 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,用 250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞,并使其密度为 1×10⁶/ml;取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl 20 μg/ml 的碘化丙啶溶液;混匀后于室温避光孵育 15 min;在反应管中加 400 μl PBS,上流式细胞仪行 FACS 分析。

流式细胞术检测结果的 B4 区代表早期凋亡,

B1 区代表坏死细胞,B2 区为丧失细胞膜完整性的凋亡晚期细胞,B3 区为正常细胞。

1.4 电子显微镜观察细胞凋亡 取组织块约 1.0 mm×1.0 mm×2.0 mm 大小,4%多聚甲醛固定 4 h 以上;用 PBS、磷酸缓冲液漂洗,1%锇酸固定 2 h;PBS 漂洗 3 次,丙酮梯度脱水;EPON 812(环氧树脂)包埋;聚合:45℃ 12 h、60℃ 36 h;超薄切片,铀、铅染色,H800 透射电镜下观察。

1.5 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析和作图使用 SPSS 11.0 软件,因为参数方差不齐,参数分析采用 NPar Tests:Kruskal-Wallis Test 和 Mann-Whitney Test 进行统计分析,显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 流式细胞术检测结果 流式细胞术检测结果如图 1 所示。左侧顶叶皮质神经细胞早期凋亡的发生率(B4 区细胞数/总细胞数,%)于伤后 6、24、48 h 分别为 21.97±1.94、65.90±1.29、56.48±14.03;凋亡发生率(B2 区细胞数/总细胞数,%)在 TBI 伤后各时间点分别为 4.55±2.25、2.75±0.24、5.17±1.94;与正常组(1.88±3.88、0.10±0.13)比较存在显著性差异($P < 0.01$)。早期凋亡的发生率在伤后 24 h 与伤后 48 h 之间无显著性差异($P = 0.132 > 0.05$),两者与伤后 6 h 组比较差异显著($P = 0.002 < 0.01$)。凋亡发生率在伤后 6 h 与伤后 48 h 之间无显著性差异($P = 0.589 > 0.05$),前者与伤后 24 h 组比较相差显著($P = 0.002 < 0.01$),后者与伤后 24 h 组比较相差显著($P = 0.026 < 0.05$)。见图 2。

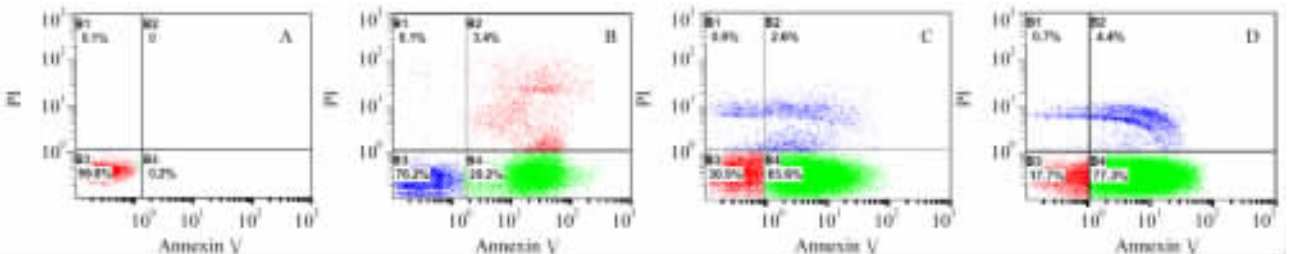


图 1 左侧顶叶皮质神经细胞早期凋亡发生的流式细胞术检测结果

Fig 1 FACS results of cortical neurons of left parietal lobe

A:Normal; B:6 h post TBI; C:24 h post TBI; D:48 h post TBI

2.2 电子显微镜观察 电子显微镜下左顶叶皮质大部分神经细胞膜完整,线粒体结构完好,胞质内细

胞器如粗面内质网及高尔基体存在,树突结构无改变(图 3A)。其中有些细胞可见下述特征:细胞染色

质浓聚,呈环状或新月状,核膜完整,这是细胞凋亡发生的早期改变;染色质浓缩成块状,有胞质浓缩,胞体皱缩,细胞体积减小,细胞膜内陷呈泡状改变,扩张的内质网与胞质膜形成泡状突起,有凋亡小体 (apoptosis body) 形成等,电镜下的超微结构改变显示这些神经细胞损害符合 Dikranian 等^[13]经典的早期凋亡、凋亡特征(图 3B~3D)。左侧顶叶皮质神经细胞伤后 24 h 可见细胞核固缩,线粒体嵴部分消失,余细胞器形态尚可,示早期凋亡(图 3B);伤后 48 h,细胞萎缩,细胞内出现髓样结构,示早期凋亡(图 3C);伤后 48 h,细胞器消失,细胞核、细胞质萎缩,呈现凋亡小体,凋亡期(图 3D)。

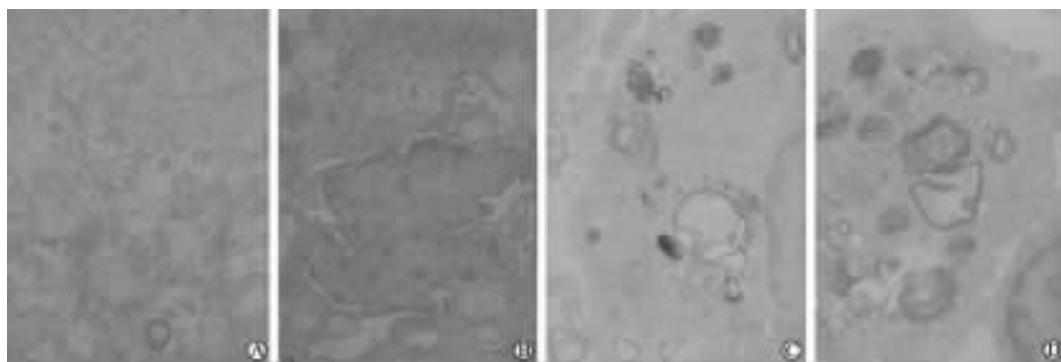


图 3 左侧顶叶皮质神经细胞早期凋亡发生的电镜观察结果

Fig 3 Electron microscopic observations of early neuron apoptosis in left parietal lobe after injury

A: Normal neurons ($\times 10\ 000$); B: 24 h post TBI, early apoptosis ($\times 8\ 000$); C: 48 h post TBI, early apoptosis ($\times 7\ 000$); D: 48 h post TBI, apoptotic phase ($\times 10\ 000$)

3 讨论

细胞凋亡的概念最早由 Kerr 和 Wyllie 等^[14]于 1972 年提出,1995 年 Rink 等^[1]证实在创伤性脑损伤后存在神经细胞的凋亡,此后有关细胞凋亡在颅脑损伤中的作用与意义日益受到重视。对颅脑损伤后凋亡的启动与调控的研究为抗凋亡治疗提供了理论依据,而凋亡启动的时程变化与抗凋亡治疗的时间窗密切相关。

本研究采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒与流式细胞仪结合检测大鼠液压脑损伤后细胞早期凋亡(B4 区)和凋亡(B2 区)的发生及其时程变化,发现大鼠皮质脑损伤区组织于伤后 6 h 即可出现细胞的早期凋亡,早期凋亡率为 21.97%,并于伤后 24 h 达高峰,为 65.90%,48 h 较 24 h 略有下降,但与伤后 24 h 比较无统计学差异。处于 B2 区的凋亡率也可出现于伤后 6 h,至 24 h 有所下降,而 48 h 又有升高。按照电镜检测细胞凋亡的标准,伤后 24 h 可出现凋亡的早期表现,48 h 才出现典型凋亡小

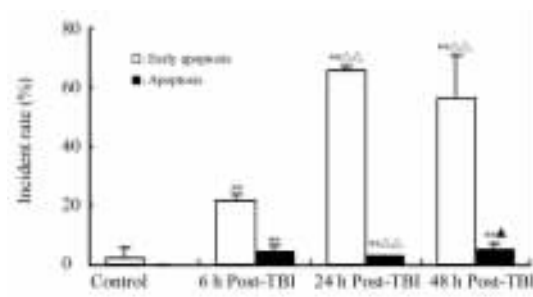


图 2 左侧顶叶皮质神经细胞早期凋亡、凋亡发生率
Fig 2 Rates of early apoptosis and apoptosis of cortical neurons in left parietal lobe after brain injury

Kruskal-Wallis Test. $** P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 6 h post TBI; $\blacktriangle P < 0.05$ vs 24 h post TBI. $n = 9, \bar{x} \pm s$

体,显然 Annexin V-FITC 结合流式细胞仪检测的凋亡和早期凋亡均先于电子显微镜观察的结果,也比以往文献报道^[5,12]中采用 TUNEL 标记法的凋亡出现时间明显提早。

以往确定细胞凋亡多采用 TUNEL 方法和电子显微镜对细胞形态的观察进行评定,Conti 等^[12]采用 TUNEL 标记法对液压致伤的 SD 大鼠皮质脑组织进行了凋亡细胞的检测,发现伤后 24 h 和 1 周出现 2 次细胞凋亡的高峰,海马 CA1~CA3 区和齿状回的细胞凋亡高峰则出现在 12 h 和 48 h。尽管他们还发现伤侧颞顶区、海马 DNA 电泳分别于伤后 30 min、2 h 出现 DNA 梯状电泳,15 h 和 24 h 最明显,但不能证明这是早期凋亡的改变。Rink 等^[1]采用同样的创伤模型,电镜下将 TUNEL 标记阳性细胞分为两型, I 型胞质内有较强的 TUNEL 染色,由损伤断裂的 DNA 脱落至胞质所至,核内只有少量染色,为坏死的神经细胞; II 型核内有较强的 TUNEL 染色,为凋亡的神经细胞,提示 TUNEL 阳性细胞内可能还包含了一部分坏死细胞。

近年来随着分子生物学和细胞生物学的发展,对细胞凋亡的检测也出现了许多新的方法,它们与传统的方法相结合,为细胞凋亡的研究提供了理想的方法学。Rasola 等^[15]采用四甲基若丹明甲脂和 FITC 标记的 Annexin V 和 PI 实现了多参数同时检测凋亡的变化;Huigsloot 等^[16]采用罗丹明 123 和别藻蓝蛋白标记的 Annexin V 和 PI 也实现了多参数同时检测凋亡的变化。

本研究所采用的 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒与流式细胞仪结合的方法为检测液压脑损伤后皮质脑组织细胞的早期凋亡提供良好的工具。Annexin 是一类广泛分布于真核细胞胞质内钙离子依赖的磷脂结合蛋白,参与细胞内的信号转导。Annexin V 选择性结合磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)。PS 主要分布在细胞膜内侧,即与细胞质相邻的一侧,在细胞发生凋亡的早期,不同类型的细胞都会把 PS 外翻到细胞膜外侧的细胞表面。用带有绿色荧光的荧光探针 FITC 标记的 Annexin V,即 Annexin V-FITC,就可以用流式细胞仪或荧光显微镜直接检测到磷脂酰丝氨酸外翻这一细胞早期凋亡的重要特征。这一方法被认为是检测细胞早期凋亡的最敏感的指标之一^[7]。最近有研究表明,annexin A5 在凋亡细胞介导的免疫反应中起着重要的调节作用^[17]。

至于凋亡率在 48 h 再升高,与 6 h 相比无显著性差异,我们认为主要是由于 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒在染色中无法鉴别凋亡细胞与死亡细胞的差别,碘化丙啶可以染色坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性的细胞,呈现红色荧光。坏死细胞由于细胞膜的完整性已经丧失,Annexin V-FITC 可以进入到细胞质内,与位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸结合,从而也使坏死细胞呈现红色荧光。

本研究发现的大鼠液压脑损伤后早期凋亡和凋亡在伤后 6 h 即可出现的现象提示脑损伤后凋亡的启动远较电子显微镜下判断凋亡出现的时间要早,提示对脑损伤后抗凋亡的干预应越早越好。而且我们有理由认为:脑损伤后 6 h 内是抗凋亡治疗的“黄金 6 小时”。

[参考文献]

- [1] Rink A, Fung K M, Trojanowski J Q, et al. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147: 1575-1583.
- [2] Colicos M A, Dash P K. Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible role in spatial memory deficits[J]. *Brain Res*, 1996, 739(1-2): 120-131.
- [3] 骆 纯, 朱 诚, 卢亦成, 等. 大鼠液压脑损伤后 Bcl-2、Bcl-x 和 Bax 蛋白表达的改变[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22: 54-56.
- [4] Kovcsdi E, Czeiter E, Tamas A, et al. Rescuing neurons and glia: is inhibition of apoptosis useful[J]? *Prog Brain Res*, 2007, 161: 81-95.
- [5] 骆 纯, 朱 诚, 卢亦成, 等. 大鼠脑创伤后细胞凋亡的变化规律研究[J]. *上海医学*, 2002, 25: 77-79.
- [6] Van Heerde W L, Robert-Offerman S, Dumont E, et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues; focus on Annexin V [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45: 549-559.
- [7] Kietselaer B L, Hofstra L, Dumont E A, et al. The role of labeled Annexin A5 in imaging of programmed cell death. From animal to clinical imaging[J]. *Q J Nucl Med*, 2003, 47: 349-361.
- [8] Behbahani H, Rickle A, Concha H, et al. Flow cytometry as a method for studying effects of stressors on primary rat neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 82: 432-441.
- [9] Honkaniemi J, Massa S M, Breckinridge M, et al. Global ischemia induces apoptosis-associated genes in hippocampus [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 42: 79-88.
- [10] Gillardon F, Klimaschewski L, Wickert H, et al. Expression pattern of candidate cell death effector proteins Bax, Bcl-2, Bcl-X, and c-Jun in sensory and motor neurons following sciatic nerve transection in the rat [J]. *Brain Res*, 1996, 739: 244-250.
- [11] Gazzaniga P, Gradilone A, Silvestri I, et al. Variable levels of bcl-2, bcl-x and bax mRNA in bladder cancer progression [J]. *Oncol Rep*, 1998, 5: 901-914.
- [12] Conti A C, Raghupathi R, Trojanowski J Q, et al. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period [J]. *J Neurosci*, 1998, 18: 5663-5672.
- [13] Dikranian K, Ishimaru M J, Tenkova T, et al. Apoptosis in the *in vivo* mammalian forebrain [J]. *Neurobiol Dis*, 2001, 8: 359-379.
- [14] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239-257.
- [15] Rasola A, Geuna M. A flow cytometry assay simultaneously detects independent apoptotic parameters [J]. *Cytometry*, 2001, 45: 151.
- [16] Huigsloot M, Tijdens I B, Mulder, et al. Differential regulation of doxorubicin induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by Bcl-2 in mammary adenocarcinoma (MTLn3) cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 35869-35879.
- [17] Munoz L E, Frey B, Pausch F, et al. The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 271-277.

[收稿日期] 2007-03-11

[修回日期] 2007-11-12

[本文编辑] 曹 静