

## 小胶质细胞在大鼠气压性中枢神经损伤中的作用

陈锐勇<sup>1,2</sup>, 刘景昌<sup>1</sup>, 方以群<sup>1\*</sup>, 殷明<sup>1</sup>, 赵敏<sup>1,2</sup>, 张军<sup>3</sup>, 姚健<sup>1</sup>, 姜平<sup>4</sup>, 张民<sup>1</sup>, 陈海庭<sup>1</sup>, 蔺世龙<sup>1</sup>

(1. 海军医学研究所, 上海 200433; 2. 第二军医大学研究生队, 上海 200433; 3. 第二军医大学长海医院中心实验室; 4. 长海医院医教部)

**[摘要]** **目的:** 观察减压性中枢神经系统损伤及高压氧(HBO)处理后小胶质细胞活性的变化, 探讨小胶质细胞在减压性中枢神经损伤中的作用及其可能的机制与 HBO 效用的机制。 **方法:** 动物分为正常对照组、安全减压对照组、致伤组、HBO 治疗组。以不安全快速减压大鼠中枢神经损伤模型为实验对象, 致伤后 6 h 给予 HBO 处理。观察活化小胶质细胞、TNF- $\alpha$ /TACE 免疫阳性细胞、神经细胞凋亡, 组织内 TNF- $\alpha$  含量和脑脊液(CSF)内 TNF- $\alpha$  的生物活性。 **结果:** 损伤后 6 h 就可见脑和脊髓组织内 IB4 阳性活化小胶质细胞, 数量的高峰出现在 24 h, 活化的小胶质细胞出现形态改变。神经元凋亡在损伤后 48 h 达到高峰。小胶质细胞出现的区域与神经细胞凋亡出现的区域相同。损伤后 6 h 就可在 CNS 组织中检测到 TNF- $\alpha$ , 48 h 达到高峰, 与 IB4 阳性细胞及神经细胞凋亡指数呈正相关( $P < 0.05$ )。CSF 中 TNF- $\alpha$  的生物活性也出现相同的变化趋势。TNF- $\alpha$  和 TACE 免疫阳性细胞形态和分布与 IB4 阳性细胞类似。HBO 治疗可显著减少中枢神经组织中活化小胶质细胞的数量, 降低组织和 CSF 中 TNF- $\alpha$  的含量, 减少神经细胞凋亡。 **结论:** 减压性损伤中枢神经组织内小胶质细胞迅速激活, 后者增加毒性物质的表达和分泌, 介导继发损伤。HBO 能够抑制小胶质细胞反应, 降低其活性, 减少毒性物质的分泌, 起到神经元保护作用。

**[关键词]** 气压性损伤; 中枢神经系统; 小胶质细胞; 高压氧; 神经元; 肿瘤坏死因子  $\alpha$

**[中图分类号]** R 845.21

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0127-07

### Dysbaric injury of rats' central nervous system: the role of microglia

CHEN Rui-yong<sup>1,2</sup>, LIU Jing-chang<sup>1</sup>, FANG Yi-qun<sup>1\*</sup>, YIN Ming<sup>1</sup>, ZHAO Min<sup>1,2</sup>, ZHANG Jun<sup>3</sup>, YAO Jian<sup>1</sup>, JIANG Ping<sup>4</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, CHEN Hai-ting<sup>1</sup>, LIN Shi-long<sup>1</sup> (1. Navy Medical Research Institute, Shanghai 200433, China; 2. Graduate Student Department, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Central Laboratory, Changhai Hospital, Second Military Medical University; 4. Medical Education Division, Changhai Hospital, Second Military Medical University)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the change of microglia activity after fast decompressing and/or hyperbaric oxygenation (HBO)-induced central nervous system (CNS) damage, so as to study the role of microglia in CNS dysbaric injury and the effects of HBO on microglia. **Methods:** Rats were randomly divided into the following groups: normal control, safe decompressing, fast decompressing (FD) injured, and HBO treated groups. Rat models of dysbaric injury were established by FD; 6 h later the rat models were subjected to HBO treatment. The activated microglia were detected by FITC-linked Isolectin B4; TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) positive cells were detected immunohistochemically; and neural apoptosis was detected by TUNEL assay. TNF- $\alpha$  contents in CNS tissue were determined by ELISA and the bioactivity of sTNF- $\alpha$  in cerebrospinal fluid (CSF) were determined by L929 cell cytotoxicity bioassay. **Results:** IB4 positive microglia appeared in rats' CNS 6 h after FD treatment, peaked after 24 h, and declined thereafter. The activated microglia had morphological changes. Cell apoptosis indices of CNS reached its peak 48 h after FD treatment. Activated microglia and apoptotic neurons had similar distribution. TNF- $\alpha$  was detected in the brain and spinal cord 6 h after FD, significantly increased after 24 h, and peaked after 48 h. The content of TNF- $\alpha$  was positively correlated with IB4 positive cells and apoptosis index ( $P < 0.05$ ). TNF- $\alpha$  bioactivity in CSF of FD group had a similar change to TNF- $\alpha$  content in CNS tissue. The IHC results showed that, TNF- $\alpha$  and TACE positive cells had the same morphology and distribution to those of IB4 positive cells. HBO treatment significantly decreased IB4 positive cells after 24 h, 48 h, and 72 h; reduced TNF- $\alpha$  content in CNS tissues and TNF- $\alpha$  cytotoxicity in CSF; and decreased the apoptosis index after 48 h and 72 h. **Conclusion:** Microglial cells are quickly activated after dysbaric-induced injury of CNS. The activated microglia play a role in secondary injury through increasing TNF- $\alpha$  and TACE expression. HBO therapy can protect the neurons through depressing the activation and proliferation of microglia and reducing secretion of neurotoxin.

**[KEY WORDS]** dysbaric injury; central nerve system; microglial cell; hyperbaric oxygen; neuron; tumor necrosis factor- $\alpha$

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 127-133]

气压性损伤(dysbaric injury)可以分为减压病(decompression sickness, DCS)和气压伤(barotraumas), 是不安全的高气压暴露对机体损伤的统称。其中, 对中

**[基金项目]** 海军后勤科研基金(03-3303)。Supported by Science Research Foundation of Naval Logistics (03-3303)。

**[作者简介]** 陈锐勇, 博士生, E-mail: chenruiyong@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: yqfang@public8.sta.net.cn

枢神经系统(central nerve system, CNS)损伤严重时,除可造成中枢神经功能障碍外,甚至危及生命。高压暴露后不安全的快速减压(fast decompressing, FD),可以影响动物脑血液流变学,损伤脑组织内的微血管及周围组织,此时可观察到小胶质细胞集聚的特征性病理变化<sup>[1]</sup>。小胶质细胞是 CNS 中特有的巨噬细胞样免疫活性细胞,在 CNS 损伤时普遍激活,它也是 CNS 中 TNF- $\alpha$  等神经毒性因子的重要来源<sup>[2]</sup>。激活的小胶质细胞合成和分泌 TNF- $\alpha$  还有一种特殊的基质金属蛋白酶参与, TNF- $\alpha$  转换酶(tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme, TACE)具有特异性裂解跨膜型 TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ )的作用,是释放可溶型 TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ )的重要环节<sup>[3]</sup>。TNF- $\alpha$  是诱发神经元凋亡的重要物质之一,而在中枢损伤和疾病中普遍观察到小胶质细胞激活和神经元凋亡共存的现象。高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)和再加压治疗是治疗中枢神经气压性损伤的主要手段。但对于特殊异常减压形式,如大深度快速减压导致的减压病,以及在军事潜水或高压暴露后未能得到及时治疗的患者,仅靠现有的治疗方案尚显得十分不足。在应用理论方面,目前国内外尚未见快速减压致中枢神经损伤后小胶质细胞活性变化与神经损伤程度的关系的研究报道。本研究以 FD 形成大鼠中枢神经损伤模型为实验对象,探讨小胶质细胞在气压性中枢神经损伤中的作用及机制,并观察了 HBO 对其的治疗作用。

## 1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 OPTON 光学显微镜(德国 ZEISS 公司);动物加压舱(海军医学研究所);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。医用纯氧、压缩空气(海军医学研究所);免疫组织化学染色试剂盒(美国 Dako 公司);辣根过氧化物酶交联的 GSA-IB4(美国 Sigma 公司);兔抗大鼠 TNF- $\alpha$ 、羊抗大鼠 TACE 多克隆抗体(美国 Sante Cruz 公司);生物素标记二抗(北京鼎国生物公司),原位末端标记 TUNEL 染色试剂盒(美国 Roch 公司),大鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(美国 Biosource 公司)。

1.2 动物及分组 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 80 只,购自第二军医大学实验动物中心,体质量 250~280 g。随机分为 10 组:(1)正常对照组;(2)安全减压组;(3)FD 致伤不同时间组,根据致伤后的取材时间不同分 FD 6 h、FD 24 h、FD 48 h、FD 72 h 组;(4)HBO 治疗不同时间组,根据与 FD 处理组相同的取材时间分 HBO 6 h、HBO 24 h、HBO 48 h、HBO 72 h 组。每组 8 只,4 只用作形态学观察,4

只用于 ELISA 定量分析。

1.3 模型制备及 HBO 处理 大鼠模型的制备在室温条件下进行,相对湿度 65%~80%,快速减压的高压暴露采用空气 30 s 匀速加压到 1.0 MPa,停留 5 min,用最快的速度(55 $\pm$ 5)s 减压出舱。安全高压暴露时舱内预置钠石灰,用空气加压到 1.0 MPa,停留 5 min,用 88 min 阶段减压出舱,15 min 空气通风 1 次,其他条件与快速减压致伤组相同。HBO 治疗组动物快速减压处理后 6 h,将大鼠置于预置新鲜钠石灰的动物加压舱内,用纯氧(纯度 >99.2%)洗舱 10 min,使舱内氧浓度 >98%,以 0.1 MPa/min 的速率加压至 0.25 MPa,高压下停留 60 min,期间每 15 min 用纯氧通风 10 min,使舱内氧浓度维持在 96.3%以上(测氧仪),停留结束后,以 20 min 匀速减压出舱。

1.4 样品收集及处理 (1)动物用 3 ml 的 1%戊巴比妥钠麻醉后取俯卧位,用一次性 1 ml 注射器针头经寰枕膜穿入,调整针头位置,让脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)在内压的作用下自然流出,收集置 -20 $^{\circ}$ C 冰冻保存,用作测定 TNF- $\alpha$  生物活性。(2)采用灌流固定方法收集大鼠的大脑和脊髓。按普通石蜡切片法处理,经组织连续冠状切片,片厚 51  $\mu$ m,隔 100 张连续取 5 张(H-E、TUNEL、TNF- $\alpha$  IHC、TACE IHC、IB4 各 1 张),共取 20 张,转移到载玻片上,处理后备用。(3)动物用 3 ml 的 1%戊巴比妥钠麻醉后,取大脑和脊髓,擦拭去表面的血迹后分别称量,脑组织加 3 ml PBS,脊髓加 1 ml PBS,电动匀浆器匀浆 10 min,1 500 $\times$ g 离心 10 min,收集上清,-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.5 常规病理和免疫组织化学染色及观察 切片分别进行常规 H-E 染色和 EnVision 法 IHC 染色<sup>[4]</sup>;原位末端 TUNEL 标记凋亡细胞染色步骤按照试剂盒说明书进行操作;HRP 交联凝集素 GSA-IB4 标记小胶质细胞参照文献<sup>[5]</sup>进行。病理图片采用半定量图像分析,在 20 倍物镜下每张切片随机取相互不重叠的 10 个视野,分别计数其中 IB4、TNF- $\alpha$  和 TACE 阳性细胞,每只大鼠所有切片阳性细胞数量的平均值作为该只动物的 IB4 免疫阳性细胞密度代表值,以阳性细胞数/(10 $\times$ 20)视野表示。凋亡细胞计算平均阳性细胞百分数,即凋亡指数。

1.6 TNF- $\alpha$  活性测定 脑和脊髓组织内 TNF- $\alpha$  浓度的 ELISA 测定按试剂盒说明书进行操作;参照文献<sup>[4]</sup>采用 L929 细胞的细胞毒性试验检测 CSF 内 sTNF- $\alpha$  生物活性,以细胞杀伤率表示。

1.7 统计学处理 实验数据均用  $\bar{x}\pm s$  表示,实验

组间、实验组与对照组间分析采用方差分析和独立样本 *t* 检验, 不同指标间进行 Pearson 相关分析。

## 2 结果

**2.1 FD 致伤后动物行为状态和中枢神经组织的常规病理变化** 动物 FD 致伤后, 出现明显肢体活动迟缓, 搔抓, 共济失调, 不安等症状; 部分动物出现后肢拖行的截瘫症状; 部分出现全身瘫痪, 随后可见呼吸急促, 心跳加速, 直至死亡。常规 H-E 染色显示, 对照组和安全减压组大鼠脑组织结构完整, 神经细胞形态正常; FD 组可见脑和脊髓组织中散在分布小气泡, 以脊髓为主, 组织结构疏松, 周围有炎细胞的浸润; 快速减压致伤 24 h 组发现 1 只动物大脑中有典型的梗死灶, 可见明显的蛛网膜下腔出血(图 1)。

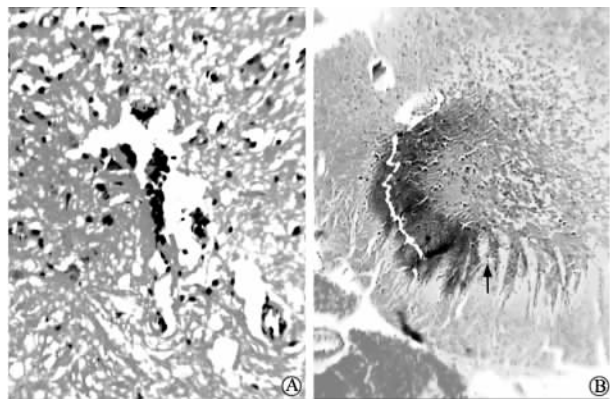


图 1 快速减压处理的动物中枢神经组织常规 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining in brain tissue of rats in fast decompressing treated group

A: Loose structure, unclear morphology, and exudation of erythrocyte ( $\times 20$ ); B: Typical infarcted focus in pallium (arrow,  $\times 10$ )

**2.2 中枢神经组织内小胶质细胞的变化** IB4 阳性小胶质细胞主要分布于脊髓灰质、大脑皮质和海马, 脊髓中尤其在灰质与白质的交界处多见; 形态有圆形、椭圆形、分支状, 以阿米巴样为主, 核仁增大淡染(图 2)。正常对照组和安全减压组动物中枢组织切片未标记出阳性细胞。FD 6 h 组动物脑组织可见 IB4 阳性小胶质细胞, 24 h 组明显增加, 达到最高峰, 48 h 和 72 h 组有所下降。FD 6 h 组脊髓组织出现 IB4 阳性小胶质细胞, 24 h 组明显增加, 达到高峰, 48 h 和 72 h 组虽有所下降, 但与 24 h 组比较没有显著差异, 仍然高于 6 h 组( $P < 0.01$ )。HBO 24、48、72 h 组 IB4 阳性细胞数量较 FD 组显著减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 3)。

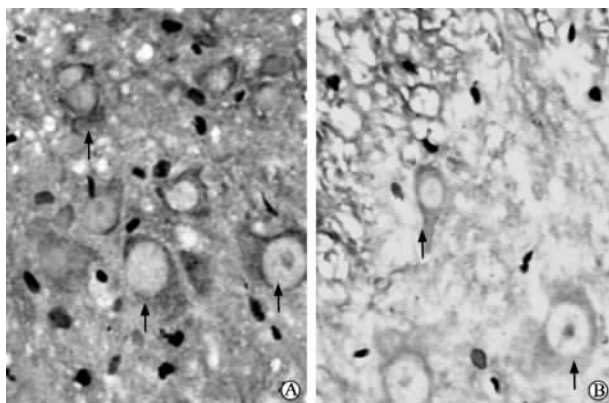


图 2 快速减压 24 h 组大脑和脊髓组织 IB4-IHC 染色结果

Fig 2 IB4-IHC staining of brain and spinal cord tissues of rats in fast decompressing 24 h group ( $\times 40$ )

A: Brain tissue, abundant IB4 immunopositive microglia (arrows); B: IB4 immunopositive microglia located at the edge of grey matter to white matter (arrows)

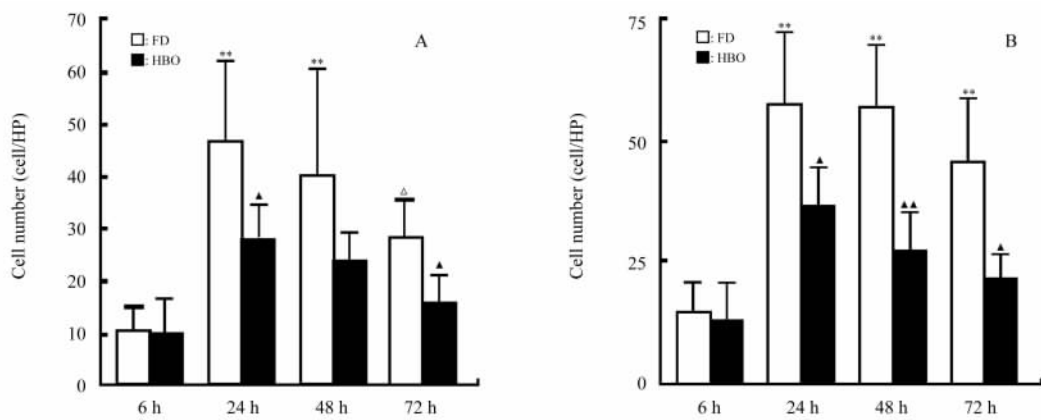


图 3 快速减压 (FD) 处理及高压氧 (HBO) 治疗后动物中枢神经组织 IB4 阳性小胶质细胞数量的变化

Fig 3 Changes of apoptosis index of central nervous system tissues in fast decompressing (FD) group and hyperbaric oxygenation (HBO) group

A: Brain; B: Spinal cord; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs FD 6 h;  $\Delta P < 0.05$  vs FD 24 h;  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs FD group with same time course;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.3 中枢神经损伤后神经元的凋亡情况 从形态学上看,TUNEL 阳性凋亡细胞主要为神经元细胞,分布比较广泛,在脑的梗死灶周围和脊髓的灰质比较密集(图 4)。正常对照组和安全减压组动物中枢组织切片未标记出 TUNEL 阳性细胞。FD 6 h 组脑组织仅见个别 TUNEL 阳性细胞,24 h 组虽有增加但无显著差异,48 h 组达到最高峰( $P < 0.01$  vs FD 6 h),72 h 组有所下降。脊髓组织神经细胞凋亡的变化趋势与脑组织基本一致,但 FD 24 h 和 48 h 组脊髓的凋亡指数比同时间组脑组织凋亡指数显著升高( $P < 0.05$ )。HBO 治疗后 6 h 组动物大脑和脊髓组织的凋亡指数与 FD 6 h 组无明显改变;24 h 组开始减少但无统计学意义;48 h 组和 72 h 组显著减少( $P < 0.05$ 或  $P < 0.01$ ,图 5)。

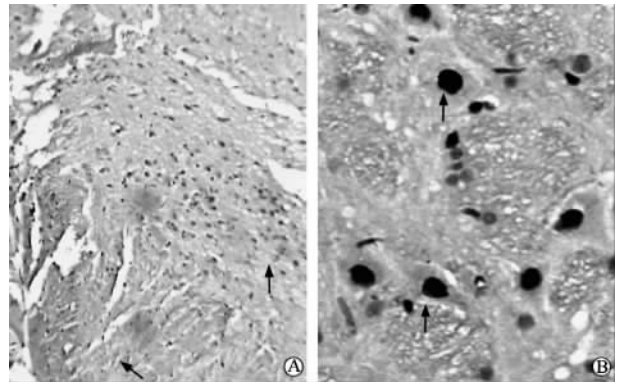


图 4 快速减压 24 h 组中枢神经组织的 TUNEL 染色结果  
Fig 4 TUNEL staining of central nervous system tissues of rats in fast decompressing 24 h group (×40)

A: Many apoptosis cells(the lower arrow) scattered around infarcted focus(the upper arrow); B: TUNEL positive cells had many long protuberances as neurons(arrow)

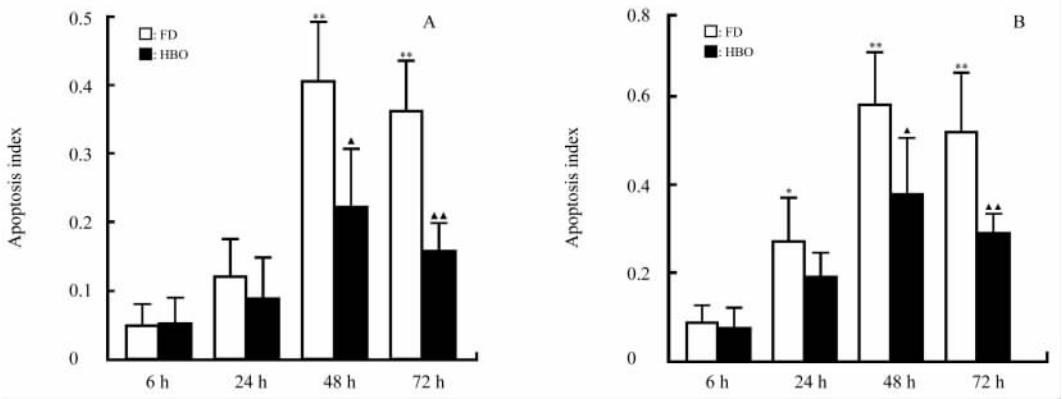


图 5 快速减压(FD)处理及高压氧(HBO)治疗后动物中枢神经组织凋亡指数的变化

Fig 5 Changes of apoptosis index of central nervous system tissues in fast decompressing(FD) group and hyperbaric oxygenation(HBO) group

A: Brain; B: Spinal cord; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs FD 6 h; ▲  $P < 0.05$ , ▲▲  $P < 0.01$  vs FD group with same time course;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.4 TNF- $\alpha$ 、TACE 的免疫组织化学观察 TNF- $\alpha$  免疫阳性细胞主要分布于脊髓灰质、脑皮质和海马。形态上有典型的阿米巴样等改变,与活化小胶质细胞的形态一致(图 6A)。早期 TACE 阳性细胞形态上类似活化的小胶质细胞,48 h 后细胞的形态较多样,以胶质细胞为主,并且间质内出现明显的 TACE 免疫阳性反应(图 6B)。正常对照组和安全减压组动物中枢神经组织中未标记出 TNF- $\alpha$  和 TACE 免疫阳性细胞。FD 致伤组动物大脑和脊髓组织中 TNF- $\alpha$  和 TACE 免疫阳性细胞的变化趋势基本相同,高峰出现在 24~48 h。HBO 6 h 组脑组织 TNF- $\alpha$ 、TACE 免疫阳性细胞数量与 FD 6 h 组无显著差异,24、48 h 比 FD 组显著减少( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),72 h 较 FD 少,但无显著差异。HBO 治疗后,脊髓组织中 TNF- $\alpha$  及 TACE 免疫阳性细胞数量变化趋势与脑组织基本相同,仅 TACE 免疫阳性细

胞开始减少的时间晚一些(图 7、8)。

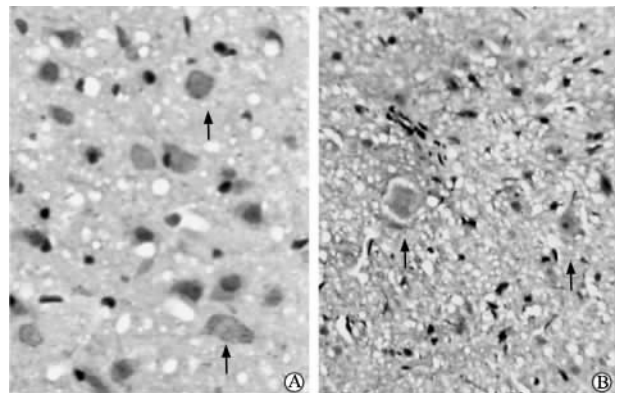


图 6 快速减压 24 h 组 CNS 组织内 TNF- $\alpha$  和 TACE 免疫组化染色结果

Fig 6 TNF- $\alpha$  and TACE IHC staining of CNS tissues in fast decompressing 24 h group (×40)

TNF- $\alpha$ (A) and TACE(B) positive cells were amoeboid, the same as microglia showed in Fig 4

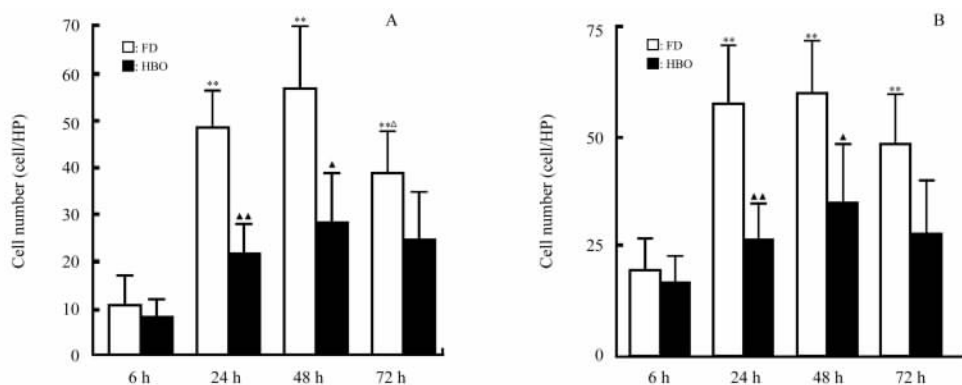


图 7 快速减压(FD)处理及高压氧(HBO)治疗后动物中枢神经组织 TNF- $\alpha$  免疫阳性细胞数量的变化

Fig 7 Changes of TACE immunopositive cells of central nervous system tissues in fast decompressing(FD) group and hyperbaric oxygenation(HBO) group

A: Brain; B: Spinal cord; \*  $P < 0.01$  vs FD 6 h;  $\Delta P < 0.05$  vs FD 24 h;  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs FD group with same time course;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

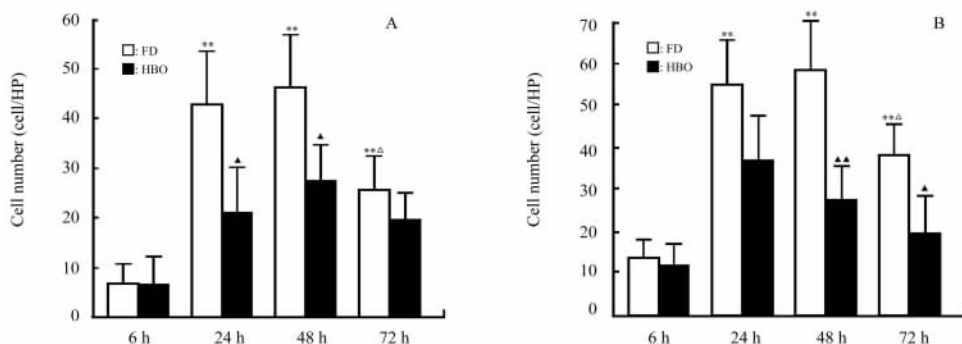


图 8 快速减压(FD)处理及高压氧(HBO)治疗后动物中枢神经组织 TACE 免疫阳性细胞数量的变化

Fig 8 Changes of TACE immuno-positive cells of central nervous system tissues in fast decompressing(FD) group and hyperbaric oxygenation(HBO) group

A: Brain; B: Spinal cord; \*  $P < 0.01$  vs FD 6 h;  $\Delta P < 0.05$  vs FD 24 h;  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs FD group with same time course;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.5 CNS 内 TNF- $\alpha$  含量的变化 安全减压处理组 TNF- $\alpha$  的含量与正常对照组比较没有显著差异。FD 致伤组大脑组织内 TNF- $\alpha$  的含量明显增加 ( $P < 0.05$ ), 48 h 组 TNF- $\alpha$  含量达到高峰。脊髓组织内 TNF- $\alpha$  含量随 FD 处理后的时间增加而增加, 24 h 组较 6 h 组有显著升高 ( $P < 0.05$ ), 在 48~72 h 达到高

峰。FD 处理后的各个时间组的脊髓组织内 TNF- $\alpha$  浓度均显著高于大脑组织 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。HBO 治疗组动物脑组织中 TNF- $\alpha$  含量 24、48 和 72 h 组与 FD 致伤相应时间组均有显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 脊髓组织中各时间组均有显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 9)。

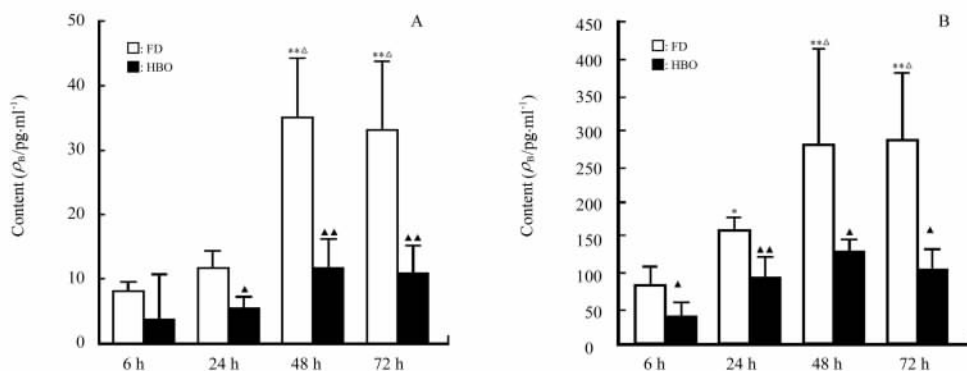


图 9 快速减压(FD)处理及高压氧(HBO)治疗后动物中枢神经组织 TNF- $\alpha$  含量的变化

Fig 9 Changes of TNF- $\alpha$  concentration of central nervous system tissues in fast decompressing(FD) group and hyperbaric oxygenation(HBO) group

A: Brain; B: Spinal cord; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs FD 6 h;  $\Delta P < 0.05$  vs FD 24 h;  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs FD group with same time course;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

FD致伤24 h组动物CSF内TNF- $\alpha$ 的生物活性较6 h组显著升高( $P < 0.01$ ),48 h组达到高峰( $P < 0.01$ ),72 h组虽有降低的趋势,但与48 h组没有显著差异。HBO治疗组动物CSF中TNF- $\alpha$ 生物学活性在24、48和72 h组与FD致伤相应时间组均有显著降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ,图10)。

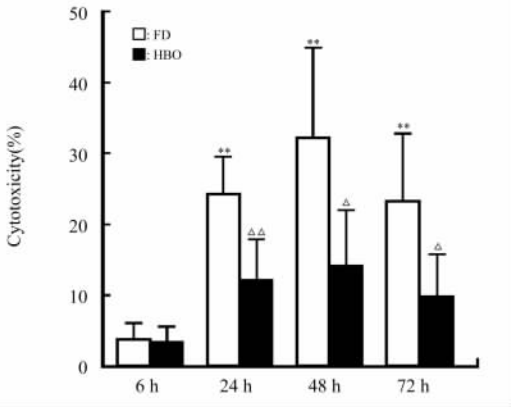


图10 快速减压(FD)处理及高压氧(HBO)治疗后动物脑脊液内TNF- $\alpha$ 生物学活性的变化  
 Fig 10 Changes of TNF- $\alpha$  bio-activity in CSF in fast decompressing(FD) group and hyperbaric oxygenation(HBO) group

\*\*  $P < 0.01$  vs FD 6 h;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs FD group with same time course;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.6 FD致伤后IB4阳性小胶质细胞、神经细胞凋亡、TNF- $\alpha$ 含量变化的时程关系 FD致伤后6 h就可以看到活化小胶质细胞的存在,24 h达到高峰,而在6 h组仅非常少的TUNEL阳性细胞,多出现于FD致伤后24 h,密度的高峰在48~72 h。IB4阳性数量变化与神经细胞凋亡指数呈正相关( $r = 0.645, P < 0.01$ )。FD致伤后大脑和脊髓组织内凋亡指数和TNF- $\alpha$ 含量变化趋势相同,均于48 h达到高峰。呈显著的正相关( $r = 0.822, P < 0.05$ )。FD致伤后大脑和脊髓组织内活化小胶质细胞数量变化趋势和TNF- $\alpha$ 、TACE免疫阳性细胞的变化趋势相同,并且到达高峰的时间(24 h)早于组织TNF- $\alpha$ 含量(48~72 h),两者有显著的相关性( $r = 0.453, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

在气压性损伤发生中枢型DCS时,中枢神经组织内存在大量的气泡。这些气泡的产生主要是过饱和的惰性气体在快速减压的过程中来不及经血液循环和呼吸系统安全排出体外,而在原地析出释放形成的。但同时也有研究认为,动脉气泡可能不易从溶解的气体中直接析出而形成,组织内的气泡可能是

病理标本制作中组织处理造成的“假象”,但严重的DCS时静脉系统内形成的大量气泡超过肺的气泡滤过能力时可通过多种途径进入动脉<sup>[6]</sup>,并且在严重的DCS中通常可以检测到动脉气泡的存在<sup>[7]</sup>。本研究观察到FD致伤动物中枢神经组织内弥漫性的组织结构疏松、破坏和散在的软化灶,这种弥漫性的病理变化更可能是由组织内过饱和惰性气体原地释放形成广泛的组织内气泡诱发的损伤。组织内气泡主要多见于脊髓的胸腰段,尤其是脊髓的白质。但除了散在的气泡外,同时还观察到典型的梗死灶和血管的充血。因此,我们认为FD引起的中枢神经损伤既有组织内气泡的原因,也存在动脉气体栓塞。

神经元凋亡在许多CNS疾病中可见。本研究观察到神经元凋亡也参与了快速减压致中枢神经损伤过程。脑损伤后神经元的死亡方式中凋亡和坏死并存的观点已经得到大量的实验证实。认识到凋亡方式的存在不仅提高了对脑损伤复杂的病理生理的认识,而且对于相应疾病的预防和治疗的研究赋予了新的内涵。近年来提出的“神经元凋亡治疗机会窗”的概念为分层次综合治疗脑神经损伤提供了新的思路。我们的研究发现快速减压致伤诱导的神经元凋亡高峰期是在损伤后48 h左右,这为快速减压致中枢神经损伤的救治时程提供了理论见解。在本研究中还观察到,脊髓的凋亡细胞主要存在于灰质中,这与气泡多发于白质的定位不同。我们认为,灰质中较富含神经元胞体,而白质中主要以较能耐缺氧缺血缺氧损伤的结缔组织和神经长突起为主,因此几乎没有TUNEL阳性细胞。有研究表明,传入和传出神经纤维的破坏和断裂可以诱发神经元胞体的程序性死亡<sup>[8]</sup>。快速减压诱导的脊髓白质的破坏可损伤白质中的神经纤维,可以推测这也是在此病理形态中诱发灰质神经元凋亡的原因之一。因此除加压治疗外,阻断受损神经元的程序性死亡过程对治疗气压性中枢神经损伤可能是有意义的。

小胶质细胞被认为是CNS中巨噬细胞样的固有的免疫活性细胞,正常情况下处于静息状态。已经在几乎所有的中枢神经病理形态中观察到它的功能状态的改变,包括形态学、免疫显形和增殖活性的变化。它在中枢组织受到损伤时可以迅速激活,并且快速增殖。激活的小胶质细胞能够攻击入侵的微生物、清除细胞残骸、分泌生长因子促进组织的修复。此外,小胶质细胞产生和分泌大量的细胞因子、自由基和其他可能的细胞毒性物质,并且通过这些物质起着继发性神经毒作用。本研究观察到,快速减压造成中枢神经损伤时,小胶质细胞的反应是以

高度增殖和活化、阿米巴样细胞密度增加为特征。损伤后 6 h 就可见活化的小胶质细胞,其数量的高峰出现在损伤后的 24~48 h,主要位于大脑的皮质、海马和脊髓的灰质。小胶质细胞的形态上也明显肥大,呈阿米巴样改变。有研究证实,小胶质细胞的活化和增殖是脑损伤后首先出现的胶质反应<sup>[9]</sup>。我们认为,快速减压引起中枢神经损伤时小胶质细胞从静息状态迅速激活并增殖,也可能是损伤后炎症反应的启动因素。在没有外源性病原体的气体损伤条件下,这些激活的小胶质细胞除了发挥吞噬损伤坏死细胞残骸的功能外,还可能通过合成和分泌细胞因子、自由基、谷氨酸等神经毒性因子,起到继发损伤的作用。本研究还观察到另一种现象,在快速减压致中枢神经损伤动物中,虽然气泡多见于脊髓的白质,但激活的小胶质细胞却主要出现在脊髓的灰质内。这可能与突触传递机制有关,即启动了远程小胶质细胞的激活作用,同时邻近受损神经元对小胶质细胞直接联系也是其活化的可能机制<sup>[10]</sup>。提示快速减压除了灰质的直接损伤外,白质中神经纤维的损伤可能通过突触和其他机制参与了灰质中的小胶质细胞激活。

小胶质细胞合成和分泌的 TNF- $\alpha$  是 CNS 组织内 TNF- $\alpha$  的主要来源。本研究中观察到快速减压致伤 6 h 后 TNF- $\alpha$  在 CNS 中的含量就显著增加, TNF- $\alpha$  免疫阳性细胞从形态上看主要为小胶质细胞。其变化趋势与 IB4 阳性小胶质细胞相同。提示在快速减压致中枢神经损伤时,活化的小胶质细胞可能是中枢神经组织中 TNF- $\alpha$  合成和分泌增多的主要来源。有研究证实 TACE 参与了小胶质细胞分泌 TNF- $\alpha$  的过程,胶质细胞 TACE 的表达导致了 TNF- $\alpha$  的升高<sup>[11]</sup>。本研究发现,快速减压致伤后 6 h 就可以观察到 CNS 组织中有 TACE 阳性细胞的出现,变化趋势与 TNF- $\alpha$  阳性细胞和 TNF- $\alpha$  含量相同,说明 TACE 在快速减压致伤导致的 TNF- $\alpha$  分泌增加中起作用。TNF- $\alpha$  可通过多种途径诱导神经元的凋亡。本研究观察到,在快速减压致中枢神经损伤后小胶质细胞迅速激活,而凋亡神经元出现和达到高峰时间要滞后于小胶质细胞的激活,并与 CNS 组织中 TNF- $\alpha$  的含量变化趋势相同。提示快速减压致伤作用可以通过活化小胶质细胞,增加后者毒性因子的合成和分泌,从而诱导神经元凋亡。说明小胶质细胞产生的 TNF- $\alpha$  是这些部位形成延迟性细胞死亡的一个协同因子。

HBO 是目前治疗神经型气压性损伤的主要手段之一。随着 HBO 对 CNS 作用的深入研究,已知

HBO 能够通过增加血中氧的溶解量,改善缺血缺氧组织的血供,增强微循环血液流变功能,加大脑组织氧的有效弥散半径和椎动脉供血量等途径而起到神经元保护作用<sup>[12]</sup>。我们发现大鼠快速减压致伤处理后 6 h 给予 HBO 治疗,在 24 h 后就可见活化小胶质细胞 (IB4 阳性) 数量比快速减压致伤组显著减少,48 h 和 72 h 进一步降低。提示 HBO 治疗可以降低快速减压损伤诱发的小胶质细胞增殖反应。同时, HBO 治疗后, CNS 中的 TNF- $\alpha$  和 TACE 的免疫阳性细胞也显著减少,组织内 TNF- $\alpha$  含量减少, CSF 中 TNF- $\alpha$  生物学活性降低。此外,还观察到 HBO 治疗后神经细胞凋亡指数显著下降。由此可见, HBO 治疗还可降低小胶质细胞的活化程度,减少毒性因子的分泌,起到对神经元的保护作用。

### [参考文献]

- [1] 蒯世龙,刘景昌,辛佩珠,等. 高压氧对快速减压豚鼠微循环血流动力作用的影响[J]. 微循环学杂志,1999,9:16-18.
- [2] Banati R B, Gehrman J, Schubert P, et al. Cytotoxicity of microglia[J]. *Glia*, 1993,7:111-118.
- [3] 孙卫民,王惠琴 主编. 细胞因子研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:401-422.
- [4] Hemmer K, Franssen L, Vanderstichele H, et al. An *in vitro* model for the study of microglia-induced neurodegeneration: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha[J]. *Neurochem Int*, 2001,38: 557-565.
- [5] Gerriets T, Tetzlaff K, Hutzelmann A, et al. Association between right-to-left shunts and brain lesions in sport divers[J]. *Aviat Space Environ Med*,2003,74: 1058-1060.
- [6] Plattner T, Thali M J, Yen K, et al. Virtopsy-postmortem multislice computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI) in a fatal scuba diving incident[J]. *J Forensic Sci*,2003,48: 1347-1355.
- [7] McPhail L T, Vanderluit J L, McBride C B, et al. Endogenous expression of inhibitor of apoptosis proteins in facial motoneurons of neonatal and adult rats following axotomy[J]. *Neuroscience*, 2003,117:567-575.
- [8] Hermann D M, Mies G, Hata R, et al. Microglial and astrocytic reactions prior to onset of thalamic cell death after traumatic lesion of the rat sensorimotor cortex[J]. *Acta Neuropathol*, 2000, 99: 147-153.
- [9] Hains B C, Black J A, Waxman S G, et al. Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury[J]. *J Comp Neurol*, 2003,462:328-341.
- [10] 李长春,孙学军,杭荣椿,等. 高压氧预处理对离体大鼠脑小胶质细胞产生细胞因子的影响[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24:58-60.
- [11] 刘景昌. 高压氧对机体的影响和高压氧治疗的基本原理[M]//刘景昌 主编. 高压氧的新理论与新技术. 北京:军事医学科学出版社,1998:1-10.

[收稿日期] 2006-10-20

[修回日期] 2007-01-10

[本文编辑] 孙岩