

脑缺血性半影区胶质细胞和神经元重组的形态学观察

雷万龙, 袁群芳, 张怀波, 姚志彬

(中山医科大学人体解剖学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 【目的】观察大脑皮质缺血性半影区星形胶质细胞和小胶质细胞以及神经元的反应模式和时程以及相关蛋白表达概况, 以探讨半影区胶质细胞之间以及与神经元之间及其与梗死灶修复之间的联系。【方法】采用大脑中动脉缺血模型和组化及免疫组化染色方法探查 24 只成年雄性 SD 大鼠(分成假手术对照、缺血 3 d 和 2 周组, 每组 8 只)脑梗死灶半影区的星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元的形态学变化及其相关蛋白的表达。【结果】大脑皮质半影区的星形胶质细胞发生显著的形态学变化: 表现为胞体肥大、染色加深、突起增粗、变长, 细胞的变化显示为明显的时间依赖性, 脑缺血 3 d 时尤为显著。反应型星形胶质细胞的 GFAP、巢蛋白(nestin)和 S100 蛋白的反应性增强, 在脑缺血 3 d 时尤为显著(+++ ~ +++++)。半影区小胶质细胞也显示肥大和增生, 在脑缺血 2 周时更为显著, 其补体 3 型受体抗原和 MHC II 类抗原呈渐进性高表达, 脑缺血 2 周时最显著(+++ ~ +++++)。半影区神经元随缺血时间延长, 由急性期损伤逐渐趋于稳定。脑缺血 3 d 时, 半影区出现大量神经元死亡, 神经纤维断裂, 排列紊乱, 密度下降(+). 半影区神经元 GAP43 呈高表达(++++)。脑缺血 2 周时, 半影区神经元的死亡减轻, 神经纤维密度增加(++), 染色加深, GAP43 表达减弱(++). 【结论】慢性脑梗死灶半影区星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元发生了形态结构和生物化学重组, 提示大脑皮质缺血性半影区正积极进行着自我修复。

关键词: 胶质细胞; 神经元; 缺血性半影区; 结构重组

中图分类号: R322.81

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)01-0029-04

Morphological Observation of Glial and Neuronal Reorganization in the Ischemic Penumbra of Rat Brains

LEI Wan-long, YUAN Qun-fang, ZHANG Huai-bo, YAO Zhi-bin. (Department of Anatomy, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To explore the astrocytic, microglial and neuronal reactive model, time-course, and the profiles of associated-protein expression in the ischemic penumbra, in order to inquire into the relationships between the astrocytes and microglia and between the glial cells and neurons, and their relationships to recovery of ischemic foci. 【Methods】24 adult male SD rats with middle cerebral artery occlusion were divided into sham operation control group, 3 d ischemic group and 2-week ischemic group. Astrocytic, microglial and neuronal morphological changes and the profiles of associated-protein expression in the ischemic penumbra were observed by histo- and immunohisto-chemical methods. 【Results】(1) The morphological alterations occurred in astrocytes of penumbra with hypertrophic bodies and sturdy processes. The changes were most remarkable on day 3 post ischemia. Meanwhile, overexpression of GFAP, nestin and S100 proteins on astrocytes was found(+++ ~ +++++). (2) Microglial hypertrophy and proliferation in ischemic penumbra were observed, with most remarkable changes at 2-week postischemia. Meanwhile, gradual overexpressions of CR3 and MHC class II antigens were found(+++ ~ +++++). (3) On 3 d postischemia, numerous neurons in the penumbra died and some of their fibers were broken, and disordered, and the density of fibers decreased(+). Overexpression of GAP-43(++++) on the neurons of penumbra was found. At 2-week postischemia, the died neurons became less, and the density of nervous fibers increased progressively, while GAP-43 expression on neurons in the penumbra decreased(++). 【Conclusion】The astrocytes, microglia and neurons in the penumbra exhibit morphological and biochemical reorganization, which indicates that the process of active cerebral self-recovery occurs in the ischemic penumbra.

Key words: glial cell; neuron; ischemic penumbra; reorganization

尽管中枢神经损伤之后的再生能力不如周围神经, 但目前仍有大量资料显示中枢神经在各种不同性质损伤之后的形态结构和生理机能的可塑性变化^[1]。局灶性脑缺血由于病变区较恒定和局限, 是研究中枢神经损伤之后形态和机能重组的理想

模型。结构重组是中枢神经系统形态学恢复的关键, 以胶质细胞和神经元的形态学变化为主流。缺血性半影区是位于梗死灶周围的可以逆转的缺血组织, 此处是决定脑梗死继续发展还是恢复的关键部位, 也是决定神经元是生存还是死亡命运的重要

收稿日期: 2001-06-01

基金项目: 广东省博士后基金资助项目(1997-35)

作者简介: 雷万龙(1957-), 男, 湖北宜昌人, 博士, 副教授。

场所。因此,神经元和胶质细胞在此处发生极其复杂的形态学变化。虽然已有研究证实了星形胶质细胞和小胶质细胞与脑缺血性损害和修复之间的联系^[2],以及本研究室以前对脑缺血区星形胶质细胞形态学变化的观察^[3],但胶质细胞在缺血性半影区发生形态结构和生物化学重组,尚需深入研究。损伤区神经元的变化主要为轴突出芽和突触重组,以及一些结构蛋白的降解和促生长蛋白质的高表达^[4]。本研究室为此曾经对脑缺血性神经元轴突NF200(neurofilament 200)和GAP43(growth associated protein-43)的表达作了报道^[5]。本实验旨在观察缺血性半影区星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元的形态学变化和一些相关蛋白的表达,以探讨胶质细胞与神经元以及二者与脑梗死灶修复之间的病理联系。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

运用Ⅱ级雄性SD大鼠24只(中山医科大学实验动物中心提供),4~5月龄、体质量200~250g,分为假手术对照、缺血3d和2周组,每组8只。

1.2 大鼠脑缺血模型及组织制备

采用经典的局灶性脑缺血模型^[3],即用氯胺酮(60~70mg/kg)腹腔注射麻醉,在其右侧眼与耳之间切开皮肤及颞肌,钻开颞骨,暴露大脑中动脉主干,在嗅沟上方用电凝钳凝闭其主干。随后依次缝合颞肌及皮肤。假手术大鼠组同样暴露大脑中动脉,但不凝闭其主干。缺血模型的可靠性已经过反复的TTC和Evans Blue组化染色所验证。

缺血3d和2周之后,在麻醉下开胸,用9g/L盐水200mL经左心室快速冲洗之后,用40g/L多聚甲醛(0.1mol/L PBS配制,pH7.4)400mL灌流固定。取脑后置入40g/L多聚甲醛内后固定6h,之后移入300g/L蔗糖液内,4℃过夜。在脑缺血区进行半导体冰冻冠状切片,片厚30μm,每隔5片取1片贴于载玻片上,进行酶组化和免疫组化染色。

1.3 组化染色

按照Hedreen等^[6]方法进行AchE纤维染色:将切片用0.1mol/L醋酸缓冲液(pH6.0)洗3次;于孵育液(碘化乙酰硫代胆碱25mg,0.1mol/L醋酸缓冲液(pH6.0)32.5mL,0.1mol/L柠檬酸钠2mL,0.3mol/L硫酸铜5mL,双蒸水9.5mL,

0.005mol/L铁氰化钾1mL)内室温孵育20min;0.1mol/L醋酸缓冲液洗5次,每次1min;1mL/L硫化铵1min;0.1mol/L醋酸缓冲液洗5次,每次1min;1g/L硝酸银1min;0.1mol/L硝酸钠洗5次,每次1min;常规脱水、透明和封片。阴性对照片在孵育液内免去碘化乙酰硫代胆碱,其余相同,阴性对照片不显色。阳性切片上的神经纤维呈黑色,细胞体小。

浸银染色法:切片经水洗之后入200g/L硝酸银溶液于37℃避光孵育30min;100mL/L甲醛溶液3~8s,氨银溶液(200g/L硝酸银溶液30mL加无水乙醇20mL,二者混合后滴加浓氨水直到沉淀溶解,过滤后使用)30s;10mL/L甲醛溶液1~2min并更换2次;50g/L硫代硫酸钠3~5min,每步之间单蒸水洗3~5min;常规方法脱水、透明和封片。阳性染色的神经纤维呈黑色。阴性对照实验免去硝酸银,其余步骤相同,阴性对照片不显色。

1.4 免疫组化染色(ABC法)

切片于室温晾干之后,用0.01mol/L PBS洗3次,入3mL/L H₂O₂,室温30min,随后滴加Triton X-100-BSA液(3mL/L Triton X-100,10g/L BSA),室温30min,之后分别滴加小鼠抗大鼠单克隆抗体GFAP(1:5000, Sigma)和S100(1:4000, Sigma),nestin(1:4000, Pharmingen公司)、OX42(1:800,香港大学解剖学系吴武田教授赠送)、OX6(1:1000, Holland Biotechnology, BV)和GAP43(1:3000,澳大利亚弗林德斯大学生理学和神经科学中心周新富教授提供),然后置于湿盒内4℃48h。滴加二抗(1:200, Sigma公司)于37℃,2h。滴加三抗(1:200, Sigma公司)于37℃,2h。DAB-H₂O₂显色2~8min。各步之间用0.01mol/L PBS(pH7.4)洗3次,每次5min。阴性对照实验用PBS代替一抗,其余步骤相同。显色之后,常规脱水、透明和封片。

1.5 阳性反应半定量

根据阳性细胞和纤维的形态、密度、染色深浅进行半定量,其判断标准: -/+微弱; ++~+++中等; ++++高度。

2 结果

2.1 星形胶质细胞形态学变化和蛋白质表达

大脑皮质缺血性半影区的星形胶质细胞在脑缺血3d已发生显著的形态学变化,显示肥大的胞

体和粗大的突起,免疫染色明显加深。其变化逐渐加强,脑缺血2周时,其胞体逐渐变小和消失,在梗死灶边缘形成密集的胶质纤维网。不仅如此,星形胶质细胞的GFAP、巢蛋白(nestin)和S100蛋白质表达上调,在脑缺血3d尤为显著(+++~++++;图1a,b,c;表1)。其反应在脑缺血2周时,有所减弱(++~+++;表1)。

2.2 小胶质细胞形态学变化和免疫分子表达

半影区小胶质细胞也发生显著的肥大和增生性形态学变化,其变化在脑缺血3d已经发生,并持续性增加,脑缺血2周时更加强烈。在脑缺血3d,小胶质细胞高表达免疫分子补体3型受体抗原和MHC II类抗原(++~+++;表1),并逐渐加强到脑缺血2周(+++;图2a,b;表1)。

2.3 神经元组织病理学变化和蛋白质表达

组织病理学显示,大脑皮质缺血性半影区在脑缺血3d时,有大量神经元死亡,组织结构紊乱,脑水肿明显。脑缺血2周时,半影区病变稳定,梗死灶已形成(图3a)。脑缺血3d,半影区神经纤维排列紊乱、断裂和减少(+,表1),到脑缺血2周时,其变化趋于稳定,纤维密度有所增加,纤维末端伸向梗死灶中央(++;图3b,c;表1)。半影区神经元GAP43呈阳性反应,阳性染色主要位于胞体和一些轴突。在脑缺血3d时反应强烈(++++);图3c;表1),到2周时,其反应逐渐减弱(++;表1)。

表1 缺血性半影区星形胶质细胞,小胶质细胞和神经元的反应

Table 1 The reactivity of astrocytes and microglia as well as neurons and the nervous fiber density in the ischemic penumbra (n=8)

	Control	Ischemia 3 d	Ischemia 2-week
GFAP	++	+++	+++
Nestin	-/+	+++	++
S100	+	+++	++
OX42	++	+++	++++
OX6	-/+	++	+++
GAP43	-/+	++++	++
AchE	++++	+	++
Silver staining	++++	+	++

-/+; mild; ++~+++; moderate; ++++: intense

3 讨论

3.1 缺血性半影区的意义

缺血性半影区是位于梗死灶外周的缺血组织,此外脑血流和电活动受损,但细胞的完整性、代谢和机能仍然保存。在脑缺血病理中,半影区组织内损害因素和保护因素之间进行着激烈的斗争,其结果决定梗死灶是发展还是恢复的命运。半影区神经元由可逆性损伤到不可逆性损伤的转变,除取决于缺血时间和严重性之外,在脑缺血后期,主要取决于损害和保护因素之间的作用。因此,目前临床所采用恢复灌流和药物治疗的措施,其目的在于拯救半影区的细胞。在脑缺血急性期,半影区的胶质细胞和神经元发生显著的形态结构、生物化学和生理机能变化。随着病变区的稳定,半影区内进行着积极的修复过程。尽管中枢神经元在损伤之后的再生能力较周围神经弱,但目前不断涌现的资料证实了损伤之后神经元出芽、突触重组不仅发生在脑损伤区,在脑的远离区域也发生了明显的可塑性变化,此乃脑损伤和中风之后行为学恢复的基础^[1]。本文为此对脑缺血性半影区内胶质细胞和神经元的形态学变化以及相关蛋白质的表达进行观察,以探讨其相互之间和与梗死灶恢复之间的病理联系。

3.2 半影区胶质细胞的反应特征

本文结果如同其他作者的报道^[7],脑缺血性半影区的星形胶质细胞发生了显著的形态学变化。尽管本研究室以前曾详尽观察了星形胶质细胞在脑梗死灶周围由肥大和增生性变化到胶质纤维网络形成的过程^[3]。本文目前证实其在缺血性半影区的肥大和增生的同时高表达GFAP、S100蛋白、nestin。星形胶质细胞微丝的结构蛋白和钙调蛋白对脑缺血反应的敏感性,曾被临床用于判断脑中风患者的梗死体积和预后状况^[8]。而nestin为中间微丝蛋白,存在胚胎早期的中枢神经系统内具有多分化潜能的神经上皮干细胞,成体的中枢神经系统内nestin表达为明显的区域特征。在损伤和缺血时,星形胶质细胞重表达nestin意味着损伤后星形胶质细胞的分子表型的改变和微丝的重组,同时提示其可能对调节胶质细胞之间和胶质细胞与神经元之间可塑性变化具有重要意义。本实验显示星形胶质细胞与小胶质细胞在缺血性半影区的变化形式和反应时程密切相关。小胶质细胞的激活被认为是中枢神经系统内微环境变化的敏感标志,因为中枢神经系统内微小的病理变化,就能引起小胶质细胞明显的肥大和增生性反应以及表达一些重要的免疫分子^[9]。本文结果显示小胶质细胞的形

态学可塑性变化有明显的时间依赖性,并持续到脑缺血后2周仍然表现为强烈反应,同时高表达免疫分子补体3型受体抗原和MHC II (major histocompatibility complex class II antigens)类抗原,对调节细胞免疫和细胞之间的粘附有重要意义^[10]。在缺血性半影区小胶质细胞的这些变化也可能与半影区结构重组有关。

3.3 半影区神经元的可塑性变化和与胶质细胞之间的联系

本实验结果显示,在缺血性半影区,胶质细胞发生可塑性变化的区域,神经元也发生了显著的形态学变化。在脑缺血3d时,半影区组织结构和神经元显示急性期的损伤性变化以及高表达GAP43。随缺血时间延长,其趋于稳定;轴突的密度逐渐增加,其末端朝向梗死灶中央。此表明缺血后期半影区神经元可能发生了形态位置和突触连接的重组,因为GAP43的高表达被认为是神经轴突出芽和突触重组的重要标志^[4],可能也表明神经元正进行积极的自我拯救。

在局灶性脑缺血急性期,半影区的胶质细胞之间以及与神经元之间的正常形态结构、位置和连接遭受破坏。在急性期之后,一个积极的自我修复将在半影区甚至远离区域进行。邻近死亡神经元周围的存活神经元将发生轴突出芽,取代死亡神经元空缺的位置和机能。在此过程中,神经元将向胶质细胞发出某种特定的信号,从而导致其可塑性变化,称为神经元依赖性的形态和免疫特性转变,胶质细胞的变化又促进神经元轴突出芽和突触重组^[1]。反应型星形胶质细胞和激活型小胶质细胞通过:①释放IL-1(interleukin-1)、bFGF(brain-derived neurotrophic factor)、GFAP(glial cell line-derived neurotrophic factor)以及NGF(nerve growth factor)促使损伤后胆碱能神经元和多巴胺能神经元轴突出芽和突触重组^[11];②胶质细胞本身形成物理性支架以填充神经元死亡之后留下的空缺区,为再生轴突的伸延提供物质基础;③隔离损害因素与神经元接触,使神经元免受损伤;④清除变性和坏死的组织及细胞碎片,为轴突的再生清理场所;尽管曾经认为胶质瘢痕阻碍再生轴突向病变区延伸和胶质细胞产生一些细胞因子和毒性分子影响神经元的生存,但最近的研究证实,局部促生长因

子缺乏和生长抑制因子高表达才是阻碍神经元轴突生长的主要因素^[12]。

总之,本文目前结果从形态学证实缺血性半影区胶质细胞和神经元结构重组,其变化形式和时程提示二者密切相关。同时证实一些相关蛋白的表达,可能在胶质细胞和神经元重组过程中具有重要意义。

(本文图1~3见插页2, Fig. 1~3 shown in back non-coloured page 2)

参考文献:

- [1] Nudo R J, Wise B M, SiFuentes F, *et al.* Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct[J]. *Science*, 1996, 272(5269): 1791.
- [2] Lehmann E, Christensen T, Zimmer J, *et al.* Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion[J]. *J Comp Neurol*, 1997, 386(3): 461.
- [3] 雷万龙, 袁群芳, 姚志彬. 局灶脑缺血区星形胶质细胞可塑性变化的实验研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2000, 16(2): 123.
- [4] Tagaya M, Matsuyama T, Nakamura H, *et al.* Increased F1/GAP-43 mRNA accumulation in gerbil hippocampus after brain ischemia[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 1995, 15(6): 1132.
- [5] 雷万龙, 袁群芳, 姚志彬. 大鼠脑缺血灶周围区GAP-43免疫组织化学的观察[J]. *解剖学研究*, 1999, 21(1): 22.
- [6] Hedreen J C, Bacon S, Price D L. A modified histochemical technique to visualize acetylcholinesterase-containing axons[J]. *Histochem Cytochem*, 1985, 33(2): 134.
- [7] Petit C K, Morgelb S, Felix J C, *et al.* The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10(6): 850.
- [8] Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, *et al.* S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarct volume and prognosis in acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 1997, 28(10): 1956.
- [9] Zhang Z G, Chopp M, Powers C. Temporal profile of microglial response following transient (2h) middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Res*, 1997, 744(2): 189.
- [10] Doyle C, Strominger J L. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion[J]. *Nature*, 1987, 330(6145): 256.
- [11] Ishimaru H, Tatabashi A, Ikarashi Y, *et al.* NGF delays rather than prevents the cholinergic terminal damage and delayed neuronal death in the hippocampus after ischemia[J]. *Brain Res*, 1998, 789(2): 194.
- [12] Stichel C C, Niemann H, D'urso D, *et al.* Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationship with regeneration axons[J]. *Neurosci*, 1999, 93(1): 321.

(编辑 刘清海)

脑缺血性半影区胶质细胞和神经元重组的形态学观察 (正文见第 29 页)

Morphological Observation of Glial and Neuronal Reorganization in the Ischemic Penumbra of Rat Brains (Text in page 29)

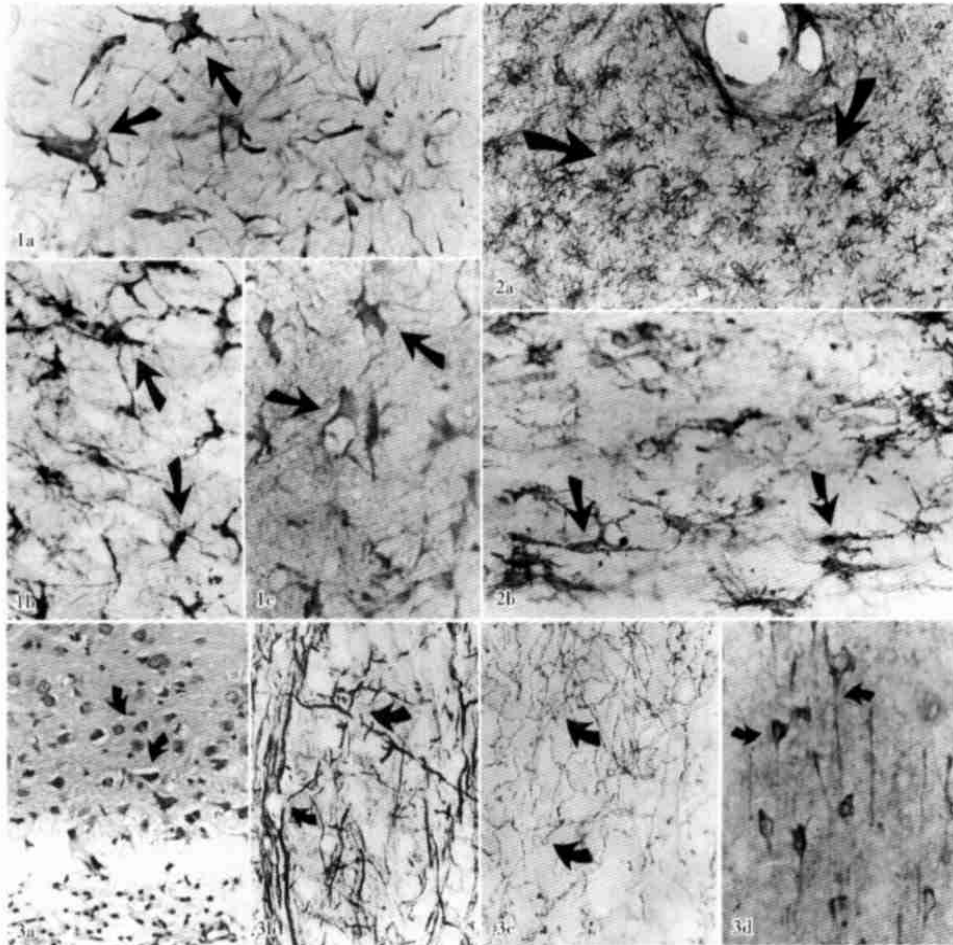


图 1 缺血性半影区星形胶质细胞的反应

图 2 缺血性半影区小胶质细胞的反应

图 3 缺血性半影区神经元及其纤维的变化

Fig.1 The astrocytic reactions in the ischemic penumbra

Arrows exhibit the GFAP(a) and nestin (b) as well as S100(c) positive reactive astrocytes at d 3 postischemia (immunohistochemical staining, ABC, $\times 400$)

Fig.2 The microglial reactions in the ischemic penumbra

Arrows exhibit the OX42 (a, $\times 200$) and OX6 (b, $\times 400$) positive reactive microglia at 2 weeks postischemia [immunohistochemical staining, ABC $\times 200$ (a), $\times 400$ (b)]

Fig.3 The neuronal and their fiber changes in the ischemic penumbra

Arrows exhibit the penumbral died neurons (a, HE staining, $\times 200$) and neuronal axons(b, silver staining; c, AchE positive fibers, $\times 400$) as well as GAP 43 positive neurons and axons (d, immunohistochemical staining, $\times 400$)