

从胶质原纤维酸性蛋白阳性细胞数推断脑干损伤时间^①

邓平^② 徐小虎 祝家镇

(中山医科大学法医学系, 广州, 510089)

摘要 以针刺造成大白鼠脑干损伤后, 用LSAB法检测脑干组织中胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)阳性细胞数目在不同损伤时间的改变。结果发现: ①正常对照组, GFAP阳性细胞的分布在脑干的不同部位是不同的, 但在同一部位较为一致。②生前损伤组, 同一部位的GFAP阳性细胞数目随损伤时间发生改变, 先增多, 到达最高峰后即减少, 其后又有增多趋势; 但不同部位的GFAP阳性细胞数目增减的时间过程不尽相同。③死后损伤组, 各部位的GFAP阳性细胞数目与正常对照组的相应部位相比无明显改变。实验说明GFAP阳性细胞数目的改变可区别脑干的生前、死后损伤, 并可能用于推断脑干损伤时间。由于在损伤后短时间内即有改变, 故可作为脑干损伤早期的诊断指标。

主题词 脑干/损伤; 神经胶质原纤维酸性蛋白质/免疫学; 时间因素

中图分类号 R 89

胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞的特征性蛋白, 自从1971年被分离出后^[1], 已有不少学者用抗GFAP抗体检测了大脑皮质损伤后星形胶质细胞的反应^[2~4], 发现星形胶质细胞增生在损伤后5~7 d达到高峰。但迄今, 尚无学者研究脑干损伤早期脑组织中GFAP阳性细胞数目的改变。本实验用LSAB法检测脑干针刺伤后不同时间、不同部位脑干组织中GFAP阳性细胞数目的改变, 探讨其能否用于推断脑干损伤时间及诊断脑干早期损伤。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

Rabbit Anti-Cow GFAP (DAKO); LSAB kit (K9001 DAKO); H.E染色及免疫组织化学常规试剂。

1.2 实验动物及模型^[5]

Wistar大白鼠54只, 体重160~200 g, 雌雄不限。随机分为正常对照组, 生前损伤组(0.5、1、3、6、15、24 h)以及死后损伤组(0.5、1 h)共9组, 每组6只。

2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg)。沿头正中中线纵形切开头皮, 暴露颅骨。生前损伤组: 用

5号注射针头从枕骨大孔背侧缘中点下刺入3 mm(与冠状面成30度角)造成延髓损伤, 分别观察到0.5、1、3、6、15、24 h即剪破心脏处死, 15 min后取出全脑。死后损伤组: 先按上述方法处死, 15 min后用同样方法造成延髓损伤, 分别在0.5 h和1 h时取出全脑。正常对照组: 不造成脑组织损伤, 处死后15 min取全脑。所有脑组织取出后即放入10%中性福尔马林中固定18 h。

1.3 取材、H.E染色及LSAB法染色

冠状切取中脑、桥脑及延髓共3个组织块。常规脱水、石蜡包埋。切片厚度为5 μm。H.E染色按常规进行; LSAB染色按照试剂盒提供的实验步骤进行。

1.4 GFAP阳性细胞计数及统计学处理

在中脑、桥脑及延髓切片中, 分别选取腹侧及背侧中央区, 在400倍光镜下选4个视野计算GFAP阳性细胞数目。所有数据均用SPSS for Windows软件进行两个独立样本的 t 检验; 并用Excel软件制成曲线。

2 结 果

2.1 H.E染色结果

生前损伤组可见广泛蛛网膜下腔出血, 脑组织

① 国家自然科学基金资助课题; ② 第一作者, 1970年出生, 男, 博士研究生

水肿, 神经细胞及其轴突肿胀; 死后损伤组有少量蛛网膜下腔出血; 正常对照组无明显改变。

2.2 LSAB 免疫组织化学染色结果

GFAP 阳性细胞轮廓清楚, 胞浆及突起呈阳性染色。血管壁及室管膜亦呈阳性染色。在生前损伤组, 除胞体较大、突起较粗的阳性细胞外, 尚可见胞

体较小、突起较细的阳性细胞; 而在死后损伤组和正常对照组, 各 GFAP 阳性细胞间的胞体及突起的大小均较一致(图 1)。

中脑、桥脑及延髓等不同部位脑组织在各损伤时间的 GFAP 阳性细胞数目及其 *t* 检验结果见表 1; GFAP 阳性细胞数目在伤后改变的时间过程见图 2。

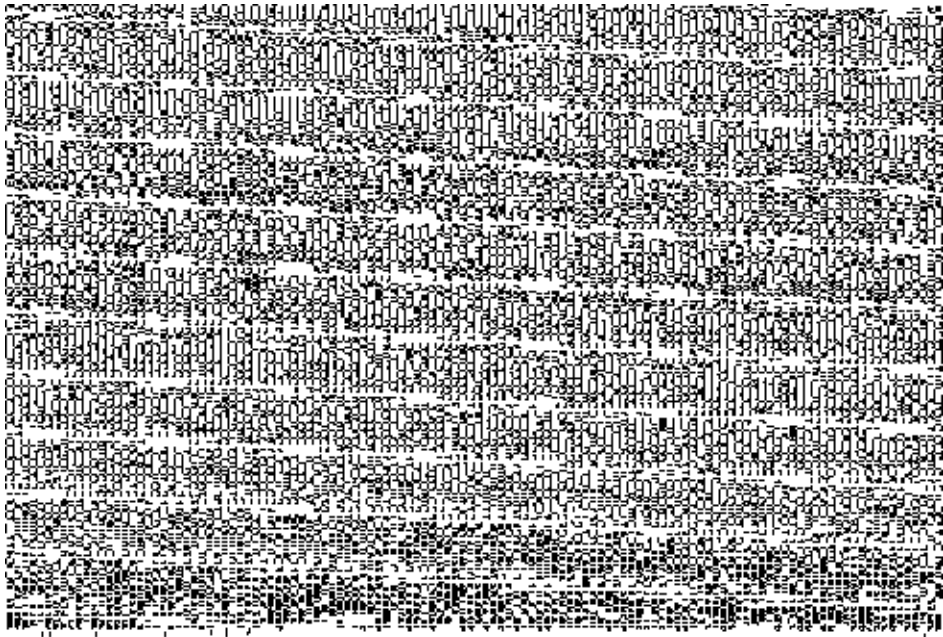


图 1 LSAB 免疫组织化学染色结果

a. 正常桥脑背侧中央部的星形胶质细胞($\times 400$); b. 生前损伤 1 h 延髓腹侧中央部的星形胶质细胞数目增多($\times 400$)
c. 生前损伤 1 h 桥脑背侧中央部的星形胶质细胞数目增多($\times 400$); d. 生前损伤 15 h 桥脑背侧中央部的星形胶质细胞数目减少($\times 400$)

表 1 脑干损伤后 GFAP 阳性细胞数目及其与正常组之间的 *t* 检验(个) ($\bar{x} \pm s$)

分 组 (<i>t</i> /h)	中 脑		桥 脑		延 髓	
	腹侧中央部	背侧中央部	腹侧中央部	背侧中央部	腹侧中央部	背侧中央部
正 常 死后损伤	22.00 \pm 1.41	48.33 \pm 5.39	20.50 \pm 2.43	24.00 \pm 2.69	15.00 \pm 1.27	16.83 \pm 0.75
0.5	24.00 \pm 2.83	45.33 \pm 1.75	18.17 \pm 2.04	22.33 \pm 1.63	16.50 \pm 1.05	17.67 \pm 2.50
1	24.00 \pm 1.79	46.33 \pm 2.16	20.50 \pm 1.87	23.83 \pm 3.06	14.17 \pm 4.71	15.67 \pm 5.28
生前损伤						
0.5	41.17 \pm 1.47 ¹⁾	54.17 \pm 4.79 ²⁾	24.17 \pm 2.48 ²⁾	22.83 \pm 2.32	16.17 \pm 1.63	17.50 \pm 1.05
1	38.83 \pm 2.32 ¹⁾	54.00 \pm 3.69 ²⁾	23.67 \pm 1.51 ²⁾	30.33 \pm 1.21 ¹⁾	22.33 \pm 1.21 ¹⁾	29.83 \pm 2.79 ¹⁾
3	21.83 \pm 1.47	32.67 \pm 1.51 ²⁾	42.50 \pm 2.88 ¹⁾	25.17 \pm 1.47	17.17 \pm 2.64	23.00 \pm 3.79 ¹⁾
6	21.67 \pm 1.21	24.67 \pm 2.58 ¹⁾	31.00 \pm 4.43 ¹⁾	22.33 \pm 2.16	11.83 \pm 1.17 ¹⁾	21.33 \pm 1.51 ²⁾
15	12.17 \pm 1.47 ¹⁾	17.83 \pm 1.17 ¹⁾	18.67 \pm 2.73	17.17 \pm 1.17 ¹⁾	16.00 \pm 1.41	18.17 \pm 2.32
24	18.17 \pm 1.47 ²⁾	32.83 \pm 2.79 ²⁾	26.67 \pm 1.75 ¹⁾	22.50 \pm 2.43	17.83 \pm 1.17	21.83 \pm 1.47 ²⁾

1) $P < 0.01$ 2) $P < 0.05$

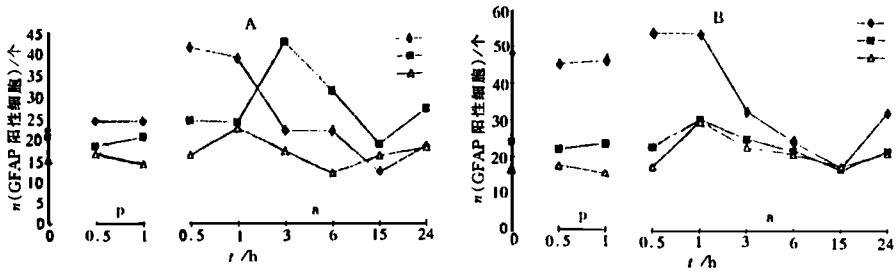


图2 脑干损伤后GFAP阳性细胞数目改变的时间过程

A. 脑干腹侧中央部; B. 脑干背侧中央部。横座标为时间(t/h), 纵座标表示GFAP阳性细胞数目(个)。p表示死后损伤, a表示生前损伤。◆中脑, ■桥脑, △延髓

3 讨论

3.1 GFAP阳性细胞数目在脑组织损伤后的改变

在中枢神经系统中, 神经组织受到损伤后, 星形胶质细胞将发生改变。由于GFAP是星形胶质细胞的特征性蛋白, 因此, 检测GFAP的免疫活性能在一定程度上反映星形胶质细胞在损伤后的改变。

本实验检测了不同部位脑干中GFAP阳性细胞数目在伤后0.5~24h的改变, 发现在同一部位的脑干组织中, GFAP阳性细胞数目先增多, 最早在伤后0.5h, 并在伤后0.5~3h之间达到最高峰, 达到最高峰后即减少, 其后又有增多趋势, 而不同部位的GFAP阳性细胞增多达到最高峰的时间不同, 但减少到最低点的时间多在伤后15h左右。本实验所观察到的GFAP阳性细胞数目在伤后3~24h的改变与文献报道基本一致^[6~8]。目前一般认为, GFAP阳性细胞数目减少可能是由于星形胶质细胞丢失, 或者由于GFAP本身降解而免疫活性下降。损伤区GFAP的量增加或GFAP阳性细胞数目增多的原因可能是: ①邻近的星形胶质细胞向损伤区聚集; ②损伤局部的星形胶质细胞通过有丝分裂而增生; ③星形胶质细胞的GFAP mRNA表达增强^[9], GFAP合成增多。

目前, 尚未见到文献报道GFAP在脑组织损伤后3h内的改变。本实验发现脑干受到损伤后, GFAP阳性细胞数目在伤后1h即增多, 有的部位(如中脑腹侧中央部)甚至在伤后0.5h就有增多。其原因不能用星形胶质细胞的聚集或增生来解释。Landis等^[10]认为, 在脑组织损伤后的早期(数小时内), 星形胶质细胞最显著的改变是GFAP和细胞膜

上主要组织相容性抗原的免疫活性增强, 但其机制尚未阐明。我们认为, 由于在脑组织损伤后的数分钟内, 星形胶质细胞的能量代谢主要为糖原的无氧酵解^[10], 乳酸增多, 引起细胞水肿, 细胞内的离子浓度和pH值发生改变, 这些改变可能会引起GFAP的免疫活性增强, 从而导致脑组织中GFAP阳性细胞数目增多。在生前损伤脑干组织中, 各GFAP阳性细胞间其胞体和突起的大小不一致, 亦可能与此有关。这也说明, GFAP阳性细胞数目增多并非一定有GFAP量的增多。

本实验针刺的位置在延脑, 但除延髓的GFAP阳性细胞数目发生改变外, 其它脑干组织GFAP阳性细胞数目也发生了改变。这可能有两个方面的原因^[5]: ①尽管针刺只直接损伤到脑干延髓部位, 但因蛛网膜下出血及脑内出血等原因, 引起颅内压增高, 也间接损伤到脑干的其它部位, 导致这些部位的GFAP阳性细胞数目也有改变, 并且由于各部位的损伤机理和程度不同, 可导致GFAP阳性细胞数目在伤后改变的时间过程也不同; ②损伤部位的细胞通过细胞间的相互联系影响到邻近细胞, 从而导致这些细胞发生改变。

3.2 根据GFAP阳性细胞数目改变推断脑干损伤时间的可行性

从实验结果可以看出, 在生前损伤24h以内, 脑干中GFAP阳性细胞数目随损伤时间发生改变, 而在死后损伤组, 各部位的GFAP阳性细胞数目与正常对照组的相应部位相比无明显改变。因而, GFAP阳性细胞数目的改变可用于区别脑干的生前损伤和死后损伤。

对某一部位脑干组织来说, 若将生前损伤按伤后时间分成不同阶段, 脑干各部位的GFAP阳性细胞数目均可用于推断脑干损伤时间, 但以中脑腹、背

侧中央部、桥脑腹侧中央部以及延髓背侧中央部为佳,因为这些部位的GFAP阳性细胞数目改变的时间过程相对较简单,并且改变更明显。但必须指出的是:一方面,由于脑干其它部位的GFAP阳性细胞数目也有改变。因此,在推断脑干损伤时间时,需要综合考虑脑干不同部位GFAP阳性细胞数目的改变。另一方面,由于实验的结果是从动物实验中得出的,故与实际人体标本具有一定的差距,这也是需要进一步深入研究的。

3.3 根据GFAP阳性细胞数目改变诊断早期脑干损伤的可行性

本实验中,在损伤后1h,中脑、桥脑及延髓腹侧和背侧中央部的GFAP阳性细胞数目显著增多,其中中脑腹侧中央部在伤后0.5h即有显著增多,并持续到伤后3h左右,其后开始减少,说明GFAP阳性细胞数目的伤后改变可作为脑干损伤早期的诊断指标。值得提出的是,本实验的H.E染色结果不能区分早期的生前伤和死后伤,这表明GFAP诊断脑干早期损伤有明显的实用意义。

参 考 文 献

- 1 Eng L F, Vanderhaegen J J, Bignami A, *et al.* An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 1971, 28:351
- 2 Schiffer D, Giordana M T, Migheli A, *et al.* Glial acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* 1986, 374:110
- 3 Vanezis P, Chan K K, Scholtz C L. White matter damage following acute head injury. *Forensic Sci Int.* 1987, 35:1
- 4 Calvo J L, Carbonell A L, Boya J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* 1991, 566:333
- 5 邓平,徐小虎,祝家镇.大白鼠脑干损伤后脑组织中GFAP免疫组化改变的初步研究. *法医学杂志.* 1996, 12:206
- 6 Miyake T, Hattori T, Fukuda M, *et al.* Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. *Brain Res.* 1988, 451:133
- 7 Miyake T, Okada M, Kitamura T, *et al.* Reactive proliferation of astrocyte studied by immunohistochemistry for proliferating cell antigen. *Brain Res.* 1992, 590:300
- 8 Hozumi I, Chiu F C, Norton W T. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res.* 1990, 524:64
- 9 Condorell D F, Albani P D, Kaczmarek L, *et al.* Glial fibrillary acidic protein messenger RNA and glutamine synthetase activity after nervous system injury. *J Neurosci Res.* 1990, 26:251
- 10 Landis D M D. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Ann Rev Neurosci.* 1994, 17:133
(1997-02-24 收稿 1997-06-10 修回)

STUDY ON CHANGES OF THE NUMBER OF GFAP-POSITIVE CELLS IN INJURED RAT'S BRAIN-STEM FOR TIMING OF INJURY

Deng Ping Xu Xiaohu Zhu Jiazhen

(Department of Forensic Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Following brain-stem injury, the number of GFAP-positive cells in midbrain, pons, medulla oblongata of rats at different times after injury has been calculated. The results showed that the number of GFAP-positive cells differ in different areas of normal brain, but similar in the same area, and changed with time in ante-mortem injured brain. The number of GFAP-positive cells increased significantly then decreased, and then increased again. There is no significant changes in post-mortem injured brain comparing to that of normal brain. It indicated that the changes in number of GFAP-positive cells could be used to estimate the time of injury, and to diagnose early brain-stem injuries.

Subject headings brain stem/injuries; glial fibrillary acidic protein/immunology; times factors