

环孢素 A 对实验大鼠脑缺血治疗作用的组织化学研究

雷万龙, 袁群芳, 姚志彬

(中山医科大学解剖学教研室脑研究室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】进一步证实免疫因素在脑缺血病理变化中的作用。【方法】将 60 只局部脑缺血模型 SD 大鼠分为缺血 3 d, 1 周和 2 周 3 个缺血时间组, 每组分为生理盐水对照和环孢素 A 治疗两个部分, 进行 TTC 和 HE 组化染色实验, 并对结果进行统计处理(*t* 检验)。【结果】脑缺血 1 周, 环孢素处理组的组织病理学变化较生理盐水对照组明显减轻, 脑梗塞体积和死亡神经元数量在环孢素 A 处理组分别为 3.2% 和 $15.8/0.0625 \text{ mm}^2$, 而生理盐水组则为 5.9% 和 $22.1/0.0625 \text{ mm}^2$, 两组之间有显著差异($P < 0.05$)。但在脑缺血 3 d 和 2 周组, 上述变化两组之间无统计学差异。【结论】环孢素 A 对实验大鼠的缺血性神经元具有一定保护作用, 结果提示免疫因素的介入, 加重了脑缺血性损伤。

关键词: 环孢素/治疗应用; 脑缺血/药物治疗; 神经元; 大鼠

中图分类号: R743.34 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0060-04

A Histochemistry Study for the Effect of Cyclosporin A on Cerebral Ischemia in Rats

LEI Wang-long, YUAN Qun-fang, YAO Zhi-bin

(Department of Anatomy and Brain Research, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089, China)

Abstract: 【Objective】To confirm the effect of immune factors on the pathologic change of cerebral ischemia, 【Methods】60 SD rats with focal cerebral ischemic model were divided into 3 day, 1 week, and 2 week post-ischemia groups, which was further divided into cyclosporin A treatment and saline control groups. The slices of the brain were stained with HE and TTC methods. 【Results】The histopathologic change was less serious at 1 week post-ischemia in cyclosporin A group compared with the saline group, and both infarct volume and dying neurons were 3.2% and $15.8/0.0625 \text{ mm}^2$ respectively in cyclosporin A group, but in saline group, they were 5.9% and $22.1/0.0625 \text{ mm}^2$ respectively, there were apparent differences between the two groups ($P < 0.05$). About the two indexes, at 3 day and 2 week post-ischemia, there were no apparent differences between cyclosporin A group and saline group ($P > 0.05$). 【Conclusion】Cyclosporin A could protect ischemic neurons in rats, and the result suggested that the intervention of immune factors may aggravate the ischemic neuronal injury.

Key words: cyclosporine/therapeutic use; cerebral ischemia/drug therapy; neuron; rat;

免疫因素与脑缺血病理变化之间的联系, 已有研究报道^[1], 本研究室和其他作者的研究结果显示, 多形核白细胞、淋巴细胞和一些细胞因子与脑缺血性损伤密切相关^[2,3], 并认为免疫因素的介入, 可能加重了缺血性神经元的损伤。免疫抑制剂

对脑缺血的治疗作用仍有争议, 认为环孢素 A 的血-脑屏障的通透性低, 对脑梗塞体积的影响不明显, 而 FK506 则有明显的保护作用^[4]。由于环孢素 A 副作用小, 是临床常用的免疫抑制剂。最近的研究结果表明其能逐渐在脑内达到药理学治疗

收稿日期: 2000-03-20

基金项目: 广东省博士后基金资助项目[粤学位办(1997)35号]

作者简介: 雷万龙(1957-)男, 湖北宜昌人, 博士, 副教授

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

浓度, 对脑缺血具有明显的保护作用^[5]。为此进行本实验, 拟通过脑缺血区死亡的神经元数量和脑梗塞体积两项指标, 观察环孢素 A 对其变化的影响, 由此进一步证实环孢素 A 对局部脑缺血的作用和作用时间, 并由此探讨免疫因素对脑缺血病理变化的影响。

1 材料和方法

1.1 实验大鼠及分组

雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 60 只 (中山医科大学实验动物中心提供), 4~5 月龄, 体重 200~250 g。随机分为缺血 3 d、1 周、2 周组。每组 20 只, 分别用于生理盐水对照和环孢素 A 处理 (其中 10 只用于石蜡包埋后 HE 染色, 10 只用于 TTC 染色)。在大鼠进行脑缺血手术之前 30 min, 进行腹腔注射环孢素 A (30 mg/kg)。生理盐水组用等容积生理盐水代替。

1.2 局灶脑缺血模型制作

按照 Tamura 等^[6]方法制作缺血模型。主要步骤为: 大鼠腹腔注射麻醉 (氯胺酮, 60~70 mg/kg), 从其颞区入颅, 暴露大脑中动脉, 在嗅沟上方用电凝器凝闭其主干, 随后, 依次缝合颞肌及皮肤。

1.3 组织化学染色实验

实验大鼠在麻醉下断头取脑, 并将其大脑冠状切成 7 等分, 置入 (20 g/L) 2, 3, 5-三苯基-2 氢-4 唑氯 (2, 3, 5-Triphenyl-2 H-tetrazolium chloride, TTC, 0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.6) 液内, 于 37℃ 避光孵育 30 min。置入 40 g/L 多聚甲醛液于 4℃ 避光保存, 以备拍照和进行图像分析检测脑梗塞体积。相同缺血时间组的另一半大鼠, 按常规方法进行灌注固定, 石蜡包埋和 HE 染色。

1.4 半定量及统计学处理

对 TTC 染色之后的脑片进行拍照, 对图片应用计算机全自动图像分析系统 (德国, Kontron IBAS 2.5) 以及 JUC Ky-F 30B 3CCD 彩色图像摄入仪 (输入系统) 获取梗塞面积, 按照 Swanson 等^[7]方法计算脑梗塞体积百分数。对 HE 染色的切片, 光镜下观察其组织病理学变化, 并用光镜网格测微尺 (40× 物镜下面积为 0.0625 mm²) 计数坏神经元的数量 (每张切片在脑缺血区随机取 6 个视野, 每一样本随机取 6 张切片), 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计处理采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 脑梗塞体积

实验大鼠大脑的冠状切片经 TTC 染色之后, 进行计算机图像分析和统计处理, 结果显示, 脑缺血 3 d, 环孢素 A 处理组和生理盐水组之间脑梗塞体积无明显的差异 (表 1), 但在脑缺血 1 周, 环孢素 A 处理组的脑梗体积 (3.2%) 明显较生理盐水组小 (5.9%), 两者相比较有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 1, 图 1)。到脑缺血 2 周时, 两组相比无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 生理盐水组和环孢素 A 组脑梗塞体积百分数
Table 1 The infarct volume of brains in the groups of cyclosporin A and saline treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$ %)

	Ischemia	Ischemia	Ischemia
	3 days	1 week	2 weeks
Saline group	3.5±1.0	5.9±1.1	5.4±1.3
Cyclosporin A group	3.1±0.5	3.2±0.8	4.7±0.9
<i>P</i>	> 0.05	< 0.05	> 0.05

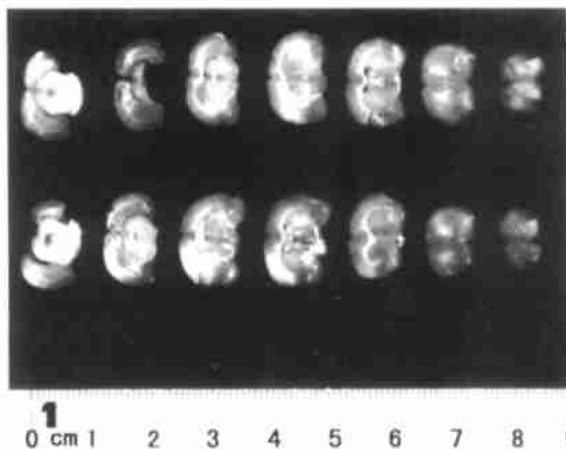


图 1 脑缺血 1 周, 脑切片的 TTC 染色

Fig. 1 At 1 week postischemia TTC staining of brain sections

Upper figures are cyclosporin A group, and down figures, saline group. TTC staining of the ischemic brain (white)

2.2 组织病理学变化

HE 染色结果显示, 脑缺血侧大脑半球皮质明显增厚、脑室扩大、缺血区染色淡、中央出现液化灶。脑缺血 3 d, 神经元呈现坏死性改变, 其变化在缺血 1 周最为显著; 表现为神经元固缩、细胞核和细胞浆界线不清, 其周围出现宽大的透亮区 (图

2)。在梗塞灶的中央区的神经元消失,被一些深染色的细胞核所代替(可能为白细胞和胶质细胞核,本文未做细胞鉴定)。在梗塞灶的周边区,仍有少许残存的神经元,被一些深染色的细胞所包围(图2~4)。在缺血灶周围存在一些被伊红深染色的神经元,称之为“暗”细胞,其呈圆形、三角形或梭形。细胞核及细胞浆均匀着色。在脑缺血3d,其数量少,在脑缺血1周时明显增加(图2)。对环孢素A组和生理盐水组的此类细胞比较结果显示,在脑缺血1周,环孢素A处理组其数量明显少于生理盐水

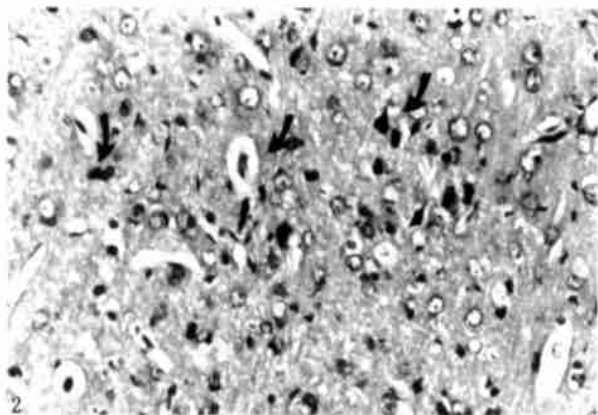


图2 脑缺血1周,生理盐水对照组脑片的HE染色
Fig.2 At 1 week postischemia. HE staining of section in saline group

Left side of the figure is infarct foci that shows lost neurons and inflammatory cells (arrows), and right side is the rim of infarct foci that shows dark cells (arrow). $\times 200$

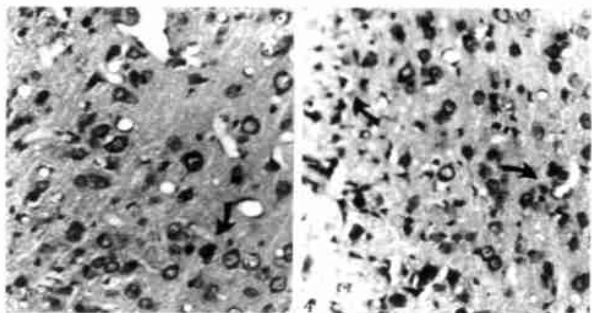


图3 脑缺血1周,环孢素A处理组脑片的HE染色
Fig.3 At 1 week postischemia. HE staining of section in cyclosporin A group (the left)

The figure shows histopathologic alteration and dark cell (arrow) in the rim of infarct foci. $\times 200$

图4 脑缺血2周,生理盐水对照组脑片的HE染色
Fig.4 At 2 weeks postischemia. HE staining of section in saline group (the right)

The figure shows histopathologic alteration and inflammatory cells (arrow) in the rim of infarct foci. $\times 200$

组($P < 0.05$,表2,图2,3)。在其它缺血时间组,两者相比无统计学差异($P > 0.05$,表2,图4)。

表2 生理盐水组和环孢素A组的“暗”细胞计数

A groups	($\bar{x} \pm s, n = 5$)		
	Ischemia 3 days	Ischemia 1 week	Ischemia 2 weeks
Saline group	10.3 \pm 2.5	22.1 \pm 4.7	21.0 \pm 3.8
Cyclosporin A group	8.0 \pm 0.9	15.8 \pm 3.6	19.5 \pm 4.0
P	> 0.05	< 0.05	> 0.05

3 讨论

脑中风严重危害人类健康,由于对其病理机制尚缺乏充分的认识,因而临床对其治疗显得极为困难。炎症和免疫因素与脑缺血的病理联系,近来倍受关注。Jander等^[3]对实验大鼠脑缺血区淋巴细胞的浸润进行了观察,本实验室和其它作者也对脑缺血区的一些与炎症和免疫密切相关的免疫分子的表达,进行了广泛深入的研究^[2]。但有关炎症和免疫因素在脑缺血病理中的作用和作用机制仍存在争议。为此,本实验欲通过神经元死亡的数量和脑梗塞体积两项指标,来证实环孢素A对脑缺血的保护作用,并由此推断免疫因素对神经元的损害作用。

本实验所观察到脑缺血区组织病理学变化如同以往作者的报道,其变化与缺血时间有关;在脑缺血早期(3d),大脑中动脉供应区的大脑皮质和尾壳核的外侧区明显增厚,脑室扩大,神经元肿胀和坏死。此类变化持续到脑缺血1周,此时出现大量神经元死亡,1周之后的病理变化趋于稳定。Garcia等^[8]对此渐进性的病理变化作了详尽的观察,并认为此是由脑缺血发展成脑梗死的病理过程,但对其机制未作解释。为此,本研究室将脑缺血区淋巴细胞浸润、小胶质细胞激活和一些免疫分子表达的时程与脑缺血区组织病理学变化的时程进行了比较,结果发现二者密切相关(另文发表)。本文所述的“暗”细胞也被Garcia等^[8]称之为“红(red)”神经元或“鬼怪(ghost)”神经元,被认为是濒临死亡的神经元。本文对其分布形式和数量变化的观察发现,此类细胞主要存在于缺血灶的周边区,而且其数量与缺血时间密切相关。应用TTC

染色显示脑梗塞体积已被国内外学者广泛采用, 计算机图像分析系统能较为客观地获取梗塞面积。Swanson 等^[7]报道的计算方法能够快捷而准确地计算出脑梗塞体积。因此, 本文应用暗细胞数量和脑梗塞体积两项指标来判断环孢素 A 的治疗作用, 具有客观性和科学性。

既然炎症和免疫因素与脑缺血性损伤有关^[1], 那么抗菌素和免疫抑制剂对脑缺血就可能具有保护作用。最近研究发现, 抗菌素和皮质激素对脑缺血有不同程度的治疗作用^[9]。免疫抑制剂治疗脑缺血的基础研究和临床观察已进行多年, 但对其作用和作用机制, 尚需深入研究。环孢素 A 因其对造血系统和血脑屏障的影响小^[4], 是临床较为常用的免疫抑制剂。但是, 其对脑缺血的治疗作用仍有争议。Sharkey^[4]等研究发现, 环孢素 A 对脑梗塞体积影响不明显, 认为主要是由于该药的血-脑屏障通透性低, 难以在脑内达到药理学治疗浓度。但是, 其它作者的研究证实, 该药在血液达到高浓度情况下能逐渐通过血脑屏障在脑内达到药理学治疗浓度, 对脑缺血具有明显的保护作用^[10]。此表明给药途径和剂量影响环孢素 A 对脑缺血的治疗作用。参照以往作者的研究, 本实验采用一次性腹腔注射环孢素 A 30 mg/kg, 结果在脑缺血 1 周, 环孢素 A 治疗组的暗细胞数量和脑梗塞体积均较生理盐水组小。但是, 在脑缺血 3 d 和 2 周组, 暗细胞数量和脑梗塞体积在药物治疗组和盐水对照组之间无明显差异, 此可能是在脑缺血 3 d 以前, 该药在脑内尚未达到治疗浓度, 而在脑缺血 2 周, 脑缺血区的病理变化已趋于稳定。另一原因, 可能是损害因素(如淋巴细胞、小胶质细胞、免疫分子)对神经元的损伤作用主要是发生在脑缺血 1 周(另文发表)。总之, 本文目前的结果又一次证实环孢素 A 对实验大鼠的局部脑缺血具有保护作用, 同时也证实了该药的有效时间主要在脑缺血 1 周, 此结果也提示免疫因素对神经元的损害主要发生在脑缺血 1 周。环孢素 A 对脑缺血的作用机制可能包括两方面: 一是通过抑制炎性细胞、细胞因子对神经元的损伤作用; 二是环孢素 A 通过影响神经元线粒体膜的通透性, 进而减轻线粒体的钙超载和氧自由基的产生, 直接对神经元起保护作用^[11]。

参考文献:

- [1] Schroeter M, Jander S, Witte O W, *et al* . Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion [J] . *J Neuroimmunol*, 1994, 55(2): 195.
- [2] 雷万龙, 刘 勇, 姚志彬, 等. 大鼠脑缺血区 IL- β 和 TNF- α 表达的实验研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19(5): 368.
- [3] Jander S, kraemer M, Schroeter M, *et al* . Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex [J] . *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995, 15(1): 42.
- [4] Sharkey J, Butcher S P. Immophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischemia [J] . *Nature*, 1994, 371(3): 336.
- [5] Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, *et al* . Cyclosporin A, but not FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death [J] . *J Neurosci*, 1998, 18(14): 5151.
- [6] Tamura A, Graham D I, McCulloch J, *et al* . Focal cerebral ischemia in the rat. 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J] . *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1(1): 53.
- [7] Swanson R A, Morton M T, Wu G T, *et al* . A semi-automated method for measuring brain infarct volume [J] . *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10(2): 290.
- [8] Garcia J H, Liu K F, Ye Z R, *et al* . Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J] . *Stroke*, 1997, 28(15): 2303.
- [9] Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, *et al* . Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 15769.
- [10] Uchino H, Elmer E, Vchino K, *et al* . Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischemia in the rat [J] . *Acta Physiol Scand*, 1995, 155(3): 469.
- [11] Siesjo B K, Siesj P. Mechanisms of secondary brain injury [J] . *Eur J Anaesthesiol*, 1996, 13(3): 247.

(编辑 刘清海)