

# 大鼠外伤性脑干损伤脑干的双重 免疫组化及超微病理研究<sup>①</sup>

周伟<sup>②</sup> 徐小虎 祝家镇

(中山医科大学法医病理教研室; 广州, 510089)

**摘要** 报告建立大鼠外伤性脑干损伤模型,并以死后脑干伤作对照,用神经微丝(neurofilament, NF)及胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)双重免疫组化染色观察了脑干神经轴索及星形胶质细胞的变化,且对轴索的直径和星形胶质细胞数进行了图像分析及统计处理。用透射电镜观察了延脑网状结构的超微结构变化。结果发现:轴索直径在脑干伤0.5~1h组与死后伤组间无显著性差异,而3h组与死后伤组间差异有显著性。GFAP阳性细胞数在脑干伤0.5h时无明显变化,而伤后1~3h显著性增加。电镜观察到延脑网状结构内的神经髓鞘层分离, NF排列紊乱,疏密不一等病变。本研究明确了颅脑损伤早期死亡与脑干损伤的关系,并发现NF-GFAP双重免疫组化染色可诊断伤后存活1h或更长时间的大鼠外伤性脑干损伤。

**主题词** 脑干 损伤; 脑干 超微结构; 中间丝 病理学

**中图分类号** D919.1

颅脑损伤是暴力死亡的主要原因之一。有时伤后迅速死亡,常规病理和组织学检查找不到或仅见轻微病变,给判定死因带来困难<sup>[1]</sup>。从理论分析,颅脑损伤致死应是损伤脑干生命中枢的结果。但迄今仍无实验证据。为此,我们建立大鼠外伤性脑干损伤模型,进行脑干免疫组化及超微病理研究,试图明确颅脑损伤早期死亡大鼠脑干的损伤情况,以期对颅脑损伤早期死亡案例的死因鉴定提供客观形态学指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 模型的制作<sup>[2]</sup>

Wistar大鼠22只,体重300~350g,用自制的簧片打击器弹击大鼠枕骨结节。弹击力为1.6~2.0牛顿。大鼠遭弹击后立即昏迷,伤后0.5(9只)、1(7只)、3h(6只)死亡。另5只取心处死10min后再行上述打击。还有6只正常大鼠取心处死作为对照。取脑干伤后0.5~1~3h死亡组及正常对照组大鼠各1只作超微病理研究。

### 1.2 取材

用4%的中性福尔马林作心脏灌注固定后开颅取出全脑,沿矢状面将大脑、小脑和脑干等分为二。

一半沿矢状切面作石蜡包埋。另一半沿水平面横切分离中脑、桥脑及延脑后分别沿水平切面包埋。切片厚7 $\mu$ m,作HE染色及NF和GFAP的双重免疫组化染色。

### 1.3 免疫组化染色

鼠抗人NF兔抗人GFAP及LSAB试剂盒均为美国ZYMED公司产品。染色过程按笔者建立的方法<sup>[3]</sup>进行。改进之处是2次免疫组化染色均用LSAB法。

### 1.4 图像分析与统计处理

用TIPAS-98型通用医学彩色图像分析处理系统,于每张切片10 $\times$ 40放大倍数下,按切片上、下、左、右及中央5个位点随机选5个视野,每个视野随机选10条神经纤维,测量其最粗处的直径。另外,每张切片按上述方法于10 $\times$ 20放大倍数下随机选5个视野,进行GFAP阳性细胞计数。应用SPSS软件对测量结果进行统计处理。

### 1.5 透射电镜标本的制作与观察

脑组织经4%中性福尔马林灌注固定,沿水平面横切取下延脑,用振荡切片机切成50 $\mu$ m的厚切片后,用锇酸作后固定,按常规进行脱水、平板包埋。在体视显微镜下选取延脑网状结构部位作超薄切片,于日立H-600透射电镜下观察。

① 国家自然科学基金资助课题; ② 第一作者, 1968年出生, 男, 硕士, 博士研究生

## 2 结果

### 2.1 病理学观察

大体观察: 22只外伤性脑干损伤大鼠均无颅骨骨折、颅内血肿、明显脑挫伤。16只有少量蛛网膜下腔出血,此16只中又有5只脑干切面可见实质内小灶性出血。HE染色组织学观察: 见脑干水肿、小脑背面及脑干周围少量蛛网膜下腔出血,8只可见脑干实质内围管性出血。

### 2.2 脑干的免疫组化染色

2.2.1 正常对照组 神经轴索呈蓝黑色,排列规则,染色均匀,粗细一致。可见少量GFAP阳性星形胶质细胞。

2.2.2 死后伤组 轴索排列紊乱,粗细不一。GFAP染色情况与正常对照相似(图1)。



图1 死后脑干伤之延髓

见畸形弯曲、增粗的神经轴索(→) LSAB法 $\times 400$

2.2.3 脑干伤0.5h组 NF与GFAP染色情况与死后组相似。

2.2.4 脑干伤1h组 轴索粗细及着色不一,排列紊乱。星形胶质细胞增多,以桥脑背侧、延髓腹侧明显(图2,3)。



图2 脑干伤1h之延髓

见神经轴索扭曲、增粗 LSAB法 $\times 400$



图3 脑干伤1h之延髓

见血管旁GFAP阳性细胞增多 LSAB法 $\times 400$

2.2.5 脑干伤3h组 轴索畸形弯曲、粗细不均、着色不一等病变更明显。轴索的病变以延髓网状结构处最重。星形胶质细胞增多也更为明显。

### 2.3 图像分析与统计处理

图象分析处理与免疫组化染色结果见表1、2

表1 免疫组化染色之神经轴索直径( $\mu\text{m}$ )

	正常对照组	死后伤组	脑干伤组(h)		
			0.5	1	3
例数	5	5	8	6	5
均值	1.0865	1.2321	1.2507	1.3175	1.6814
标准差	0.0783	0.1369	0.1584	0.1409	0.1356

$F=13.8702, P<0.01$  说明5组间轴突的直径存在极显著性差异。经多均数两两比较,证明脑干伤0.5h、1h组与正常对照组的差异有显著性,而与死后伤组无显著性差异。脑干伤3h组与正常对照及死后伤组均有显著性差异。

表2 免疫组化染色之星形胶质细胞数

	正常对照组	死后伤组	脑干伤组(h)		
			0.5	1	3
例数	5	5	8	6	5
均值	10.4400	9.8800	11.0750	14.2333	19.2800
标准差	0.8725	1.0492	1.5649	1.4838	1.6738

$F=17.3280, P>0.01$  说明5组星形胶质细胞数量存在极显著性差异。经多均数两两比较,证明脑干伤0.5h组与正常对照及死后伤组间的差异无显

著性;脑干伤 1, 3 h 组与正常对照组及死后伤组有显著性差异。

#### 2.4 电镜观察

正常对照大鼠脑干网状结构部位的轴索内 NF 排列规则,疏密均匀;髓鞘呈同心圆样紧密排列。脑干伤 0.5 h 大鼠脑干网状结构的神经髓鞘即出现层面分离(→),NF 疏密不均,排列紊乱,髓鞘与 NF 之间出现空泡(---) 毛细血管周围细胞基质密度下降,呈水肿样改变(图 4)。脑干伤 1 h 时还可见毛细血管壁出现空泡,胶质细胞核内异染色质减少,核仁明显。脑干伤 3 h 时可见部分神经元的细胞膜破裂。



图 4 脑干伤 0.5 h 之延髓  
显示髓鞘(→)及 NF(\*) 的病变 TEM× 6,000

### 3 讨论

#### 3.1 外伤性脑干损伤模型建立的意义

一些交通事故、坠落及斗殴拳击头面部的案例,有时死亡极为迅速;系统尸检,常规病理组织学检查及毒物化验排除了颅脑损伤以外暴力死的可能。临床上认为是脑干损伤致死。但因缺乏足够的形态学证据,给法医死因鉴定带来困难。这类案例有些可见脑干实质水肿和小灶性出血等病变<sup>[1]</sup>。但这些病变是否足以致死尚缺乏有力证据。从上述实际情况出发,我们建立了本文的实验模型<sup>[2]</sup>。并对其脑干进行免疫组化及超微病理研究。NF 与 GFAP 的免疫组化染色观察到神经轴索排列紊乱,畸形弯曲,粗细不一,染色不均以及星形胶质细胞的增多。透射电镜观察到延髓网状结构内神经纤维髓鞘层面分离,NF 排列紊乱,疏密不一等超微结构改变。轴索及髓鞘是将神经冲动由神经元的接受极(胞体、树突)传递到突触前末梢的通路,它们的损伤可导致神经冲动的传

递障碍。这些病变见于脑干生命中枢及其上下行传导束,故可导致迅速死亡。本文外伤性脑干损伤模型的建立成功,明确了颅脑损伤早期死亡与脑干损伤的关系,并为进一步研究脑干损伤的病理形态指标提供了材料。

#### 3.2 外伤性脑干损伤的病理形态学指标

从法医检案实践出发,作为外伤性脑干损伤死因鉴定的病理形态指标应符合下列 3 点要求:① 该指标的变化可迅速致死;② 在伤后迅速出现;③ 应用现有技术能够检出,并且死后又不会迅速消失。根据以上设想,我们考虑到 NF 与 GFAP 均是中间丝,分别为神经元和星形胶质细胞的特异性骨架成分之一,自身结构稳定,抗腐败能力强。NF 是神经轴索的构成成分,而轴索是神经冲动传导的通道,与生命直接相关。有文献报道头部外伤引起的脑白质损伤在伤后 2 h 时,轴索即可发生扭曲,粗细不均等病变<sup>[4]</sup>,可见它对损伤较为敏感。但有时死后伤也能引起轴索相似的病变,为此需用灵敏的生活反应指标将生前伤与死后伤加以鉴别。Miyake 报道小鼠大脑皮质刺创 0.5 时 GFAP 阳性的星形胶质细胞即增多<sup>[5]</sup>。Dennis 等在总括脑损伤后星形胶质细胞反应时指出,在伤后数小时内最显著的改变是 GFAP 免疫反应增强<sup>[6]</sup>。可见 GFAP 是脑损伤的一个较灵敏的生活反应指标。

本文用 NF-GFAP 双重免疫组化染色法在同一张切片上观察神经轴索及星形胶质细胞的变化情况,并对观察结果进行图像分析与统计学处理。结果发现:脑干伤 0.5 及 1 h 组轴索的直径与正常对照组相比显著性增粗,但与死后伤组间差异均无显著性。脑干伤 3 h 组轴索直径与正常对照组及死后伤组相比均有显著性增粗。GFAP 阳性的星形胶质细胞数量在脑干伤 0.5 h 组、正常对照组及死后伤组间均无显著性差异;而脑干伤 1, 3 h 组与正常对照组及死后伤组相比均有显著性增多。结果表明:脑干伤后存活 0.5 h 时,GFAP 变化不明显,因而难以断定轴索的改变是由生前脑干损伤所致,还是死后人为现象。在脑干伤存活达 1 h 时,轴索的变化提示脑干曾遭受暴力作用,GFAP 阳性星形胶质细胞的增多则说明是生前损伤。两者结合可诊断生前脑干损伤,从而为其死因鉴定提供了客观形态学证据。脑干伤后存活 3 h 时,轴索增粗及星形胶质细胞增多均更为明显。由此可见,NF-GFAP 双重免疫组化染色法可诊断存活 1 h 或更长时间的大鼠外伤性脑干损伤。至于伤后存活时间少于 1 h 的大鼠脑干伤的诊

断还有待于进一步研究。

### 3.3 神经轴索损伤与星形胶质细胞增多的机理

关于神经轴索损伤机理有两种不同观点: Strich 等认为轴索损伤是机械性暴力直接过度时牵拉所致<sup>[7]</sup>。Yaghamai 等则认为外力导致 NF 亚基的排列紊乱与分解, 于是轴浆运输中断, 进而于轴浆运输中断处轴索肿胀, 发展到一定程度时轴索可裂解乃至断裂<sup>[8]</sup>。从研究结果分析, 笔者认为轴索的损伤是一个由机械性暴力直接引起, 并随着存活时间的延长而进行性加重的病理生理过程。

脑损伤后星形胶质细胞数量增多的机理目前认为有 3 个方面: ① 通过无丝分裂迅速增生; ② 通过有丝分裂增生; ③ GFAP-mRNA 表达增强, GFAP 合成增多<sup>[9]</sup>。对此确切机制尚不清楚, 有待进一步研究。

总之, 本研究明确了颅脑损伤早期死亡与脑干损伤的关系。并且发现 NF-GFAP 双重免疫组化染色可诊断伤后存活 1 h 或更长时间的大鼠脑干损伤。这就为颅脑损伤早期死亡案例的死因鉴定提供了一项新方法, 并可望得到法医实践的验证。

### 参 考 文 献

- 1 周 伟, 祝家镇, 徐小虎. 8 例原发性脑损伤尸检分析. 法医学杂志, 1996, 12(3): 149
- 2 周 伟, 祝家镇, 徐小虎. 外伤性脑干损伤模型的建立. 中山医科大学学报, 1997, 17(1): 62
- 3 周 伟, 祝家镇, 徐小虎. 双重免疫酶标染色法在

法医病理学中应用. 第 5 次全国法医学学术交流会议论文集. 北京: 中国法医学学会, 1996. 38~ 40

- 4 Vanezis P, Chan KK, Scholztz CL. White matter damage following acute head injury. *Forensic Sci Inter*, 1987, 35: 1
- 5 Miyake T. Reactive proliferation for astrocytes studied by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res*, 1992, 590(1-2): 300
- 6 Dennis MD, Landis. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Ann. Rev. Neurosci*, 1994, 17: 133
- 7 Strich SJ. Shearing of nerve fibres as a cause of brain damage due to head injury. *Lancet*, 1961, 2: 443
- 8 Yaghamai A, Povlishoch J. Traumatically induced reactive changes as visualized through the use of monoclonal antibodies targeted to neurofilament subunits. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 1992, 51(2): 158
- 9 Cancilla PA. Expression of mRNA for glial fibrillary acidic protein after experimental cerebral injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 1992, 51(5): 560

(1996-09-03 收稿 1996-11-13 修回)

## DOUBLE IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL PATHOLOGIC STUDY OF TRAUMATIC BRAIN-STEM INJURY IN RATS

Zhou Wei Xu Xiaohu Zhu Jiazhen

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

The model of traumatic brain-stem injury was produced in rats and postmortem brain injury was used as control group in this paper. Axons and astrocytes in brain stem were observed by double immunohistochemical staining of neurofilament(NF) and glial fibrillary acidic protein(GFAP). Axonal diameter and the number of astrocytes were measured through computerized image analysis and the results

(下转第 32 页)

- 6 Jaffe N. Intraarterialisplation in the management of stage II B osteosarcoma in the pediatric and adolescent age group. Clin Orthop, 1991, 270 (9): 15
- 7 Enneking WF, Spanier SS, Goodman AA, *et al.* A system for surgical staging of musculoskeletal sarcoma. Clin Orthop, 1980, 153(11): 106
- 8 叶天星主编. 医学免疫学基础. 上海: 上海医科大学出版社, 1992. 58- 61
- 9 Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, *et al.* Identification of human cancer deficient in antigen processing. J Exp Med, 1993, 177(2): 265

(1996-09-09收稿 1996-11-04修回)

## THE ROLES OF MACROPHAGES AND T-CELLS IN THE FORMATION OF PSEUDOCAPSULE OF OSTEOSARCOMA

Zhu Quansheng<sup>1</sup> Qiu Jushi<sup>1</sup> Liao Weiming<sup>2</sup> Liang Hui zheng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Pathology <sup>2</sup> Department of Orthopedics of First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou)

Morphologic and immunohistochemical methods were used in studying 6 cases of osteosarcoma without pseudocapsule, 12 osteosarcoma with pseudocapsule and 16 osteosarcoma after chemotherapy with pseudocapsule formation. The structure of pseudocapsule was observed. The type and number of inflammatory cells surrounding the tumor were investigated. The results showed that the numbers of macrophages and T-cells in the compression zone and reactive zone of the two groups with pseudocapsule were significantly higher than that of the group without pseudocapsule ( $P < 0.01$ ). This result strongly supported that macrophages and T-cells play very important roles in the formation of pseudocapsule. It was also observed that the pseudocapsule could be converted to a true capsule by preoperative chemotherapy.

**Subject headings** bone neoplasm /pathology; leukocytes; antineoplastic agents

(上接第 24页)

were analyzed with SPSS system. Ultrastructural changes in medulla oblongata reticular formation were studied by transmission electron microscope (TEM). Results show that Axonal diameter has no significant difference among 0.5h, 1h antemortem injuries and postmortem injuries, but has significant difference between 3h injuries and postmortem injury. There wasn't significant increase in the number of astrocytes in 0.5h antemortem injury. However, the number of astrocytes increased remarkably in 1h, 3h injury groups. Myelin disruption and NF disarrangement were seen through TEM. The results demonstrated that early death induced by craniocerebral injury was the result of brain-stem injury. NF-GFAP double staining may diagnose 1h brain-stem injury in rats. These results were expected to be testified in forensic practise.

**Subject headings** brain stem/injury; brain stem /ultrastructure; intermediate filaments /pathology