大鼠脑缺血-再灌流后脑内MPO活性变化及组织损伤病理进观察

吴立克 王晓娟 生学明

摘 要 目的: 通过测定大鼠局灶性脑缺血-再灌流后不同时点脑组织中MPO活性变化, 探讨炎症反应与脑缺血-再灌流损伤的关系。**方法**: 用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血-再灌流模型, 检测缺血3小时后再灌流不同时点脑组织中MPO活性、脑梗死体积及光镜病理学变化。**结果**: 缺血组脑组织有MPO活性升高、中性粒细胞浸润, 以再灌流后48、72小时最为明显, 脑梗死体积、神经元变性程度随再灌流时间延长而加重。**结论**: 局灶性缺血脑组织中MPO活性与缺血-再灌流损伤间具有一定的关系, 炎症反应是加重脑组织损伤的重要因素。

关键词 缺血-再灌流 髓过氧化物酶 炎症反应 大鼠

脑缺血持续一段时间后再恢复灌流时会发生严重的组织损伤现象称为脑缺血-再灌流损伤(ischemia reperfusion injury, IR), 其发病机制尚未完全阐明。有研究发现, 白细胞特别是中性粒细胞(Neutrolphil cell, NC)在缺血侧脑组织中浸润、聚集, 对IR损伤具有重要作用。本文采用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌流模型, 通过观察脑组织中髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)活性、脑梗死体积百分比、光镜病理学变化, 探讨大鼠脑缺血再灌流后NC浸润规律及其对再灌流损伤的影响。

材料与方法

1. 实验分组 健康、雌性Wistar大鼠, 体重220～250g。随机分为假手术组和缺血组, 每组又分为IR 6h(缺血组为缺血3小时再灌流6小时, 假手术组为术后6小时)、IR 12h、IR 24h、IR 48h、IR 7d六个时点, 分别检测脑匀浆MPO活性、脑梗死体积, 各时点的大鼠均为5只。随机选取9只大鼠不做手术处理, 测定其脑组织MPO活性作为正常对照。各时点选取2只大鼠做光镜病理学检查。

2. 动物模型的建立 参考Longa等建立的方法[1], 采用线栓法可逆性闭塞大鼠左侧大脑中动脉, 分离颈部各动脉后, 将一顶端加热后呈膨圆、直径0.165mm的渔线插入左侧颈外动脉(ECA), 轻柔送入渔线至颈内动脉内, 缓慢向前推进15～18mm至遇阻力为止, 制成大脑中动脉闭塞模型(MCAO)。缺血3小时后于麻醉状态下拔出栓子至ECA内, 造成再灌流。

3. MPO活性测定 取缺血侧脑组织100mg加0.5%HTAB 2ml, 超声粉碎亚细胞成分(30s, 3次), 0～4℃10000g离心15min, 取上清液0.1ml加2.9ml反应液(0.167mg/ml)邻联茴香胺的PBS和0.0005%过氧化氢), 保持温度25℃, 于分光光度计460um波长下立即进行2min的时间扫描, 以第30s到第90s的1min内吸光度的变化代表酶活力的改变。1单位MPO活力以25℃时分解1umol H_2O_2来表示。

4. 脑梗死体积测定 大鼠麻醉后迅速断头取脑, 弃去嗅结节、小脑和脑干, 自额极向后每2mm切片, 共切6～7张。将脑片悬置于2%TTC生理盐水中, 37℃避光孵育30分钟。存活组织呈深红色, 坏死组织呈苍白色。染色后脑片放入10%甲醛溶液中固定。测定梗死体积时, 先通过图象分析仪直接测出各脑片梗死面积和该层总面积, 再乘以脑片厚度即得各自体积[2]。各层面体积相加即得全脑梗死体积和总体积。各样本以梗死体积/全脑体积比作统计参数。

5. 光镜观察 各时点随机取鼠2只, 取脑后用10%甲醛固定, 在冠状切面下丘脑腹内侧核和背外侧核排成X形, 丘脑与纹状体即将断开层面时留取切片, 片厚5um, 连续切片, 做尼氏染色和HE染色。由大脑正中裂旁开1cm开始, 用目镜网格测试系统在40×10放大倍数下进行半定量分析, 连续记数3个视野顶叶皮层第三层神经元总数及变性、坏死神经元所占百分数及40倍下扩张的微血管数。

6. 统计学分析 采用SPSS统计软件在微机上进行, 各项检测结果以均数±标准差(MeanSD)记录。两组间比较用t-检验, 多组间用单因素方差分析, 当方差分析有显著性差异时, 进一步用q检验作两两比较, 率的比较用X^2检验。检验水准取$\alpha = 0.05$, 当$P < 0.05$时有显著性差异。

作者单位: 065000 河北省廊坊市天津医科大学附属石油中心医院(吴立克);
河北医科大学(王晓娟、生学明)

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

结　果

1. MPO 活性　各组各时点MPO 活性变化如表 1 所示。假手术组各时点MPO 活性与正常对照组比无明显差异。缺血组各时点MPO 活性较假手术组均有升高，IR 12h 以后各时点对比有显著性差异($P < 0.05$)。缺血组在 IR 后MPO 活性表现出先逐渐升高再逐渐下降的趋势，尤其在 IR 48、72h 两时点，MPO 活性显著性升高，与其他几个时点相比有显著差异($P < 0.05$)。

表 1　假手术组和缺血组不同时点MPO 活性

时点	IR 6h	IR 12h	IR 24h	IR 48h	IR 72h	IR 7d
假手术组	1.32±0.10	1.33±0.09	1.35±0.08	1.33±0.07	1.36±0.11	1.36±0.10
缺血组	1.49±0.11	2.00±0.22*	3.48±0.22*	4.49±0.22*	5.96±0.19*	3.07±0.21*

注：正常组大鼠 9 只，MPO 活性为 1.30±0.12，方差分析缺血组与假手术组比较* $P < 0.05$，缺血组 IR 48h、IR 72h 与其余各时点比较 $P < 0.05$

2. 脑梗死体积　假手术组各时点脑梗死体积为 0。缺血组在 IR 6h 即可看到明显梗死灶，累及左侧大脑半球基底节区、额顶叶皮层及颞叶海马区，随再灌流时间的延长梗死体积百分比逐渐增大，至 IR 7d 梗死体积百分比已达 39.18±0.62%。

表 2　假手术组和缺血组不同时点脑梗死体积(%)

时点	IR 6h	IR 12h	IR 24h	IR 48h	IR 72h	IR 7d
假手术组	0	0	0	0	0	0
缺血组	20.33±0.74	22.00±0.40	29.12±0.47	29.64±0.41	37.48±0.75	39.18±0.62

3. 光镜病理学结果　我们在镜下将神经元变性程度分为 0～5 级，级别越高变性程度越严重。0 级：神经元胞体及胞核形态正常，核周尼氏小体丰富，此为正常锥体细胞。1 级：神经元形态基本正常，尼氏小体略减少，胞核无明显变化。2 级：细胞肿胀，原来稍凹陷的细胞边缘变成稍凸出，神经元内尼氏小体明显减少，胞浆均匀染成兰色，细胞核常偏居一侧，核仁无变化。3 级：神经元胞体缩小，尼氏小体消失，胞核内染色质深染浓缩，核仁与染色质分不清。4 级：神经元胞体及核均浓缩，常为三角形，尼氏小体消失，核裂解，核仁消失，胞膜与周围分界清楚，细胞周围间隙明显增宽。5 级：最严重者，除上述变化外，胞浆中出现空泡，核膜溶解，有的坏死神经元细胞已液化，被吞噬细胞吞噬。神经细胞的卫星细胞增多，有的侵入胞体使细胞残缺不全。

假手术组各时点顶叶皮层神经元基本正常。缺血组在 IR 6h 时顶叶皮层神经元变性不明显，多为 0～1 级；12 小时出现 1～2 级神经元变性，24 小时多为 2～3 级变性，48 小时多为 3～4 级变性，72 小时及 7 天神经元多为 4～5 级变性。随再灌流时间延长，顶叶皮层神经元变性程度逐渐加重，变性神经元的数目也逐渐增多，见表 3。

表 3　顶叶皮层神经元变性(%)

时点	IR 6h	IR 12h	IR 24h	IR 48h	IR 72h	IR 7d
假手术组	0	0	0	0	0	0
缺血组	30.20	37.50	56.40	70.70	76.70	74.40

HE 染色法观察微血管形态及炎性细胞组织浸润。假手术组顶叶皮层微血管形态正常，未见NC 浸润。再灌流 12 小时，缺血组即出现顶叶皮层内微血管肿胀变形，微血栓形成，毛细血管数目增多，随再灌流时间的延长，以上现象逐渐加重。以再灌流 72 小时及 7 天两时点最为严重。中性粒细胞于再灌流 24～48 小时大量浸润，72 小时最为显著。微血管数目增加于再灌流后 72 小时达到高峰(见表 4)，管腔受压变形，血管外间隙增宽，管周水肿严重。

表 4　微血管数目

时点	IR 6h	IR 12h	IR 24h	IR 48h	IR 72h	IR 7d
假手术组	16	18	17	15	18	19
缺血组	20	22	31	37	45	44

注：t 检验 $P < 0.05$

讨　论

1. 脑缺血-再灌流后MPO 活性变化

MPO 主要存在于中性粒细胞嗜天青颗粒中，单核细胞中也有少量MPO。在心脏、肾和皮肤等疾病研究中证实MPO 活性是评价中性粒细胞在组织中浸润程度的可靠指标。本文采用生化方法测定能够反映组织白细胞数量的MPO 活性，并通过病理检查观察组织中NC 浸润程度，结果显示缺血-再灌流后 6 小时脑组织中MPO 活性开始升高，72 小时达高峰，7 天时MPO 活性仍高于假手术组，提示在缺血-再灌流后 6 小时缺血侧脑组织已经有了明显的炎症反应，中性粒细胞粘附、聚集，炎症反应在再灌流后 2～3 天达高峰，持续到 7 天左右。这与国外的报道基本一致。Barone[3]研究脑缺血-再灌流损伤时发现再灌流损伤与中性粒细胞的作用密切相关，再灌流时中性粒细胞在缺血区血管内聚集，同时伴有血管内皮肿胀、血小板淤积阻塞微血管形成无复流现象(no reflow phenomenon)，且中性粒细胞被激活产生炎症介质、细胞因子，激活 iNOS mRNA 产生大量NO 参与神经损伤，并激活黄嘌呤氧化酶系统产生大量O^{2-} 自由

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

基。同时白细胞与血管内皮粘附后，启动粘附因子表达，促进炎症细胞进一步粘附并透过内皮细胞膜进入脑组织，引起细胞骨架重新排列，使细胞间隙增大，血脑屏障破坏[4]。Akopow 等[5]研究发现白细胞浸润程度与脑缺血的预后密切相关，轻度白细胞浸润者脑梗死体积小、神经功能恢复好，而重度白细胞浸润者脑梗死体积大、预后差。因而白细胞在缺血侧脑组织的浸润是参与 IR 损伤的重要机制。

2 脑缺血- 再灌流后梗死体积的变化

我们的实验发现缺血组在 IR 6h 即出现明显梗死灶，累及左侧大脑半球基底节区、额顶叶皮层及颞叶海马区，随再灌流时间的延长梗死体积百分比逐渐增大。脑组织缺血后得到血液的再灌流本是治疗的目的所在，但在一定条件下，再灌流反而引起更加严重的后果，虽然再灌流损伤发生的机制尚未彻底阐明，但已有大量研究证明它与炎症反应有关[6]。在脑缺血后期及再灌流期，血管源性中性粒细胞通过血脑屏障与脑内巨噬细胞、小胶质细胞一起激活 iNOS 合成大量 NO，形成NO 由缺血中心区向半暗带及正常区递减的梯度[7]，同时再灌流期黄嘌呤氧化酶系统启动，产生大量氧自由基，加重细胞毒性，不断扩梗死体积。大鼠大脑中动脉闭塞后，缺血中心区位于缺血侧基底节区并向外扩大展至皮质区，而尾状核及顶叶皮层被证明为缺血半暗带[8]，在缺血后 3 小时梗死中心区已有了明显的神经损害，而半暗带神经元在缺血- 再灌流后 24～ 72 小时仍有许多是可逆性损害[9]。故再灌流后的炎性反应主要影响半暗带，使半暗带脑组织逐渐发生不可逆性损伤，不断扩大梗死体积。

3 脑缺血- 再灌流后半暗带病理变化

我们在实验中观察到缺血- 再灌流后 6 小时，缺血组顶叶皮层(半暗带)即已有了神经元的变性、细胞肿胀、尼氏小体减少，至再灌流 72 小时变性神经元已达 76.7%，多数神经元胞体缩小、尼氏小体消失、胞浆均匀不等，核内染色质深染、浓缩，核仁分界不清，部分神经元胞体及核均固缩为三角形，核裂解、核仁消失，细胞周围间隙明显增宽，有些神经元坏死后小胶质细胞的胞浆突起深入神经细胞中，出现“噬神经现象”。HE 染色观察顶叶微血管的变化，显示缺血- 再灌流后 6 小时缺血侧有微血管肿胀，随时间的延长有些血管变形、栓塞、红细胞淤积、管周水肿，并有白细胞粘附、渗 出，代表炎症反应的中性粒细胞于再灌流 24～ 48 小时大量浸润，微血管数目增加于再灌流后 72 小时达到高峰，这一方面说明炎症反应性微血管增生，另一方面又表示微血管肿胀变形、管腔扩张，使得原来不易识别的微血管体积扩大能在镜下识别。从而进一步证实再灌流期炎症反应是加速半暗带损伤的重要因素。有研究表明应用强力霉素、甲烯土霉素等可通过抑制NC 浸润改善脑缺血及再灌流损伤[10]。我们的实验为白细胞参与脑缺血- 再灌流损伤提供了基础依据。

综上所述，大脑中动脉较长时间缺血后再灌流可以明显加重组织损伤，缺血区的炎症反应是再灌流损伤的重要机制之一，选择性地应用抑制炎症反应的药物可能有利于改善缺血性卒中的预后。

参 考 文 献

1 Longa Ez et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, 20: 84～ 91

2 Swanson RA, Morton MT, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. J Cereb Blood Flow Metab, 1990, 10: 290

3 Barone FC, Schmidt DB, Hillegass LM. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 recrptor binding in rat focal ischemia-a. Stroke, 1992, 20(9): 1337

4 Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. Stroke, 1996, 27: 1739～ 1743

5 Yoshiyuki M, Hiroshi O, Yusei S, et al. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. Bra Res, 1994, 656: 344～ 352

6 Garcia JH, Liu K F, Yoshida Y, et al. Inflammation of leukocytes and platelets in an evolving brain infarction. An J Pathol, 1994, 144: 188～ 199

7 Stephen Ashwal MD, Beatriz Tone BA et al. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion. Stroke, 1998, 29: 1037～ 1047

8 Heiss W D, Graf. The ischemic penumbra. Curr. Opin. Neurol, 1994, 7: 11～ 19

9 Zhang J, Benveniste H, Klitzman B, et al. Nitric oxide synthase inhibition and extraxellular glutamate concentration atfer cerebral ischemia/reperfusion. Stroke, 1995, 26: 298～ 304

10 何秋 李忠 王幕一. 甲烯土霉素在脑缺血动物实验中的治疗作用. 中风与神经疾病杂志, 1998, 15(2): 78～ 80

(2001- 11- 26 收稿)

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.