

·论著·

新生大鼠脑缺氧缺血后迟发性细胞死亡的研究

周伟¹, 吴圣楣², 陈惠金², 陆良勇³

(1. 广州第一军医大学珠江医院儿科, 广东广州 510282; 2. 上海市儿科医学研究所, 上海 200092; 3. 南京军区上海肝病研究中心, 上海 200032)

[摘要] 目的 探讨新生动物脑缺氧缺血(HI)后迟发性细胞死亡是否存在细胞凋亡;分析不同检测手段的敏感性与特异性。方法 在建立新生大鼠脑 HI 损伤标准动物模型基础上,采用脑组织病理学 HE 染色光镜观察、透射电镜、原位末端标记(ISEL)及 DNA 电泳等分别对 HI 后不同时间点的实验侧脑皮质、海马回中凋亡细胞的形态、特点等进行观察和比较。结果 光镜、电镜下显示实验侧脑皮质及海马神经元皱缩、染色质凝集并出现凋亡小体,ISEL 及 DNA 电泳证实有裂解 DNA 存在。且发现脑皮质及海马回凋亡性细胞死亡通常自 HI 后 6~12 h 开始,24 h 达高峰。结论 缺氧缺血可引起新生动物脑细胞凋亡。在脑 HI 迟发性损伤中不仅存在坏死,而且存在着复杂的细胞凋亡过程。不同的检测手段均具有一定的局限性,只有结合多种方法进行检测,才能正确判定凋亡细胞的存在。

[关键词] 脑;缺氧缺血;迟发性细胞死亡;细胞凋亡;新生大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)04-0256-05

Delayed Cell Death Following Hypoxic - Ischemic Injury in Neonatal Rats

ZHOU Wei, WU Sheng-Mei, CHEN Hui-Jin, et al.

Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To determine whether or not apoptosis occurs in the delayed cell death following hypoxic-ischemic injury, and assess the sensibility and specificity of various techniques. **Methods** Using HE staining and electromicroscopic technique, in situ end labeling (ISEL) and DNA electrophoresis, we observed the histological features of apoptotic cells in the cerebral cortex and hippocampus, and compared the ipsilateral hemisphere at various time points following hypoxic-ischemia (HI) with that of the sham-group. **Results** In the cerebral cortex and hippocampus at the ipsilateral hemisphere in neonatal rat models of HI, light and electronic microscopy exhibited cell shrinkage, chromatin condensation, and apoptotic bodies. ISEL and DNA electrophoresis also provided evidence of DNA fragmentation. It was found that apoptotic cell death generally began 6~12 h after the initiating insult, and reached the peak at 24 h in the cortex and hippocampus. **Conclusions** Cerebral HI can induce neuronal apoptosis in neonatal rats. Apoptosis is mainly involved in the delayed cell death following hypoxic-ischemic injury except for the existence of necrosis. Apoptosis appears to be a major form of delayed cell death during the selective neuronal loss following hypoxic-ischemic injury. Owing to the limitation of different techniques, it is necessary to adopt several ways to determine the existence of apoptosis.

Key words: Cerebra hypoxia-ischemia; Delayed cell death; Apoptosis; Neonatal rat

动物实验研究表明,脑缺氧缺血后的细胞死亡可发生在两个不同的阶段:第一阶段为缺氧缺血期间,急性能量衰竭导致神经元与胶质细胞的变性、坏

死;第二阶段为再灌注后迟发性选择性神经元死亡,并且认为再灌注损伤在脑缺氧缺血损伤中起着更加重要的作用。为进一步探讨脑缺氧缺血后迟发性细

胞死亡的机制,并探索相应的治疗对策,本研究在建立新生动物缺氧缺血脑损伤模型的基础上,应用原位末端标记等方法观察了脑缺氧缺血损伤后迟发性细胞死亡的形式——细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 新生大鼠缺氧缺血脑损伤模型的制作

参照 Rice 方法^[1],生后 7 天的 SD 大鼠(购自中科院上海实验动物中心),取仰卧位,四肢固定于手术板上,颈正中切口,游离右侧颈总动脉,用 6-0 丝线结扎,缝合切口后置于 2 000 ml 密闭容器,该容器置于 37 °C 水浴中。以 1~2 L/min 的速度输入含 8 % 氧气和 92 % 氮气的混合气体,持续 2.5 小时。

1.2 实验动物分组

生长条件相同的 108 只新生大鼠随机分为 2 组,每组 54 只,一组行颈正中切口后即缝合皮肤作为正常对照(N),另一组为缺氧缺血实验组(HI)。于缺氧结束后不同时间点(对照组亦于相应时间点)0,2,6,12,24,48,72 h 及 7,14 d 断颈处死(每个时间点 6 只,3 只用于病理切片,3 只用于抽提 DNA)。取右侧(缺氧缺血侧)大脑半球外固定于 10 % 中性甲醛溶液或 2.5 % 戊二醛溶液(透射电镜标本),或自丘脑中 1/3 水平取约 50 mg 右侧大脑半球组织冻存于 -80 °C 冰箱备用。

1.3 观察方法与指标

1.3.1 DNA 电泳 用组织捣碎棒将组织捣碎,加入 1 ml 裂解液(100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA; 0.5 % SDS) 其中含 0.1 mg/ml 蛋白酶 K (CyberSyn 公司) 及 0.1 mg/ml RNA 酶 A (Promega 公司),于 37 °C 水浴中孵育 24 h。用等量的饱和酚:氯仿:异丙醇(25:24:1)抽提,振摇 15 s,于 4 °C 13 000 g 离心 10 min(低温超速离心机,GS-15R Centrifuge, Beckman),收集上清液,加 1/10 体积 0.3 M 醋酸钠,2.5 倍体积的预冷无水乙醇,振摇至白色絮状物出现。 -20 °C 放置 60 min,4 °C 13 000 g 离心 15 min,弃上清,晾干,重溶于 100 μ l TE 缓冲液, -20 °C 保存。取 20 μ l 上述样品,加 2 μ l 加样缓冲液,混匀,加样,60 V 电压电泳 3 h。紫外灯下观察、拍照。

1.3.2 光镜检查 自丘脑中 1/3 平面行冠状切片,片厚 4 mm,石蜡包埋。石蜡切片(4 μ m 厚) HE 染色,光镜检查。

1.3.3 透射电镜观察 在与上述光镜检查大致相

同的部位取皮质、海马回组织。组织块(截面约 1 mm²)置入戊二醛固定液(0~4 °C)固定数天。然后常规固定、包埋、染色。透射电镜(Leica, Germany)下观察、摄影。

1.3.4 原位末端标记(in situ end labeling, ISEL)

切片做 HE 染色光镜观察后,邻近处的石蜡切片定为标记靶组织,并取对照组相对应组织作为阴性对照。采用原位细胞死亡检测试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司),参照文献^[2]进行改进,实验流程为:①标记切片常规二甲苯脱蜡梯度清洗酒精至自来水;②双蒸水漂洗 3 次,每次 3 min;③ 0.01 % Triton x-100 处理 15 min;④双蒸水漂洗 3 次,每次 3 min;⑤ 3 % H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶;⑥双蒸水漂洗 3 次,每次 3 min;⑦蛋白酶 K 20 μ g/ml 置 37 °C 水浴槽内 30 min;⑧重复步骤 2;⑨ 37 °C 干燥箱内干燥切片;⑩每张切片滴加 40 μ l TUNEL 反应液,置 37 °C 水浴槽内 60 min;⑪滴加甘油(1:9 0.05 M Tris 稀释)封片,荧光显微镜观察 1~3 h;⑫ 0.05 M pH 7.6 TBS 漂洗去盖片,冲洗漂洗各 3 次,每次 3 min;⑬每张切片滴加 Converter POD (3:1 0.05 M Tris 稀释) 40~60 μ l,置 37 °C 水浴槽内 60 min;⑭ 0.05 M pH 7.6 TBS 冲洗漂洗各 3 次,每次 3 min;⑮ DAB 显色 5~15 min 镜下控制;⑯双蒸水终止反应;⑰苏木素复染细胞核 1 min,切片脱水,中性树胶封片。

1.3.5 观察指标及统计学处理 HE 染色、荧光及 ISEL 标记切片在镜下定位(40 $\times$ 目镜),由 DIPAS-200 型细胞图像分析系统的彩色 CCD 摄录系统(定诚科技公司)输入计算机,在显示屏中选取 10 幅(10 个视野,分别为皮质浅层 4 个、深层 4 个以及海马 2 个视野)作阳性率统计。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行批间比较,并对三种方法的结果进行相关性分析。用 Statistica 5.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, U. S. A) 软件进行数据和统计处理。

2 结果

2.1 DNA 电泳

在琼脂糖凝胶电泳图中(图 1,见插页),脑 HI 后 12~48 h,缺氧缺血侧脑组织可见 DNA 断裂的证据——DNA 梯状电泳条带,以 24 h 最为明显。在正常对照组中未见类似改变。

2.2 光镜下凋亡细胞的观察

正常情况下,于皮质和海马部位偶可见到具凋

亡特征细胞,正常对照组在各观察时间点具凋亡特征细胞数目之间的差异无显著性意义($P > 0.05$)。脑 HI 后 2 h,其凋亡细胞开始增多,6 h 渐趋明显,至 24 h 呈凋亡高峰时相(图 2,3,见插页),48 h 后凋亡细胞显著减少,至 7 d 左右已基本与正常对照组无异。在 6,12,24,48,72 h 等观察点,HI 组的凋亡细胞数明显高于对照组,差异有显著性($P < 0.01$) (表 1)。凋亡细胞在脑实质内呈弥散或小灶性分布。光镜下典型的凋亡特征细胞形态有:①细胞皱缩、体积缩小,但细胞完整性好,有细胞外空隙;②核固缩,胞浆内核碎片或单个圆形凋亡小体;③胞浆嗜酸性变。在脑 HI 后早期,可见到液化性梗死灶,为急性损伤所致。24 h 以后以坏死为主,主要表现为结扎血管供血区的缺血性梗死灶,也可见散在性细胞坏死。7 d 时仍可观察到坏死灶而凋亡细胞已很难觅见。

2.3 电镜观察

脑 HI 后 2 h,在缺血侧皮质部即可观察到细胞膜起泡、染色质边聚现象;6 h 至 72 h,在缺氧缺血侧的皮质和海马回内可见到明显的凋亡特征细胞,以 24 h 最为明显:细胞缩小,胞浆空泡明显,内质网

肿胀,染色质致密,核固缩、不规则以及出现凋亡小体等(图 4,5,见插页)。

2.4 原位末端标记

在脑 HI 新生大鼠模型各观察时间点,其缺氧缺血侧细胞核内均可观察到凋亡细胞 DNA 片段末端标记的阳性信号。脑 HI 后 2 h 其阳性信号开始增多,6 h 较为明显,至 24 h 最为显著,呈弥散或小灶性分布(图 6,见插页)。其后阳性信号渐减少,至 7 d 时与对照组的差异已无显著性意义。

本实验观察到荧光标记(图 7,8,见插页)与 ISEL 具有极好的相关性,在 6,12,24,48,72 h 等观察点,HI 组的凋亡细胞数均明显高于对照组,差异有显著性($P < 0.01$),但在各时间点荧光标记与 ISEL 两种方法之间无显著性差异($P > 0.05$)。虽然各时间点 HE 染色观察到的凋亡细胞数明显低于荧光标记或 ISEL 所观察到的凋亡细胞数,差异显著性($P < 0.01$),但荧光、ISEL 标记与 HE 染色在脑 HI 新生大鼠皮质与海马回细胞凋亡出现的时间以及流程上方向一致(表 1)。三种方法两两之间的相关系数均为 $r = 0.999$ 。

表 1 脑 HI 后不同时间(h)点 HE,荧光及 ISEL 观察到的凋亡细胞数(10 个高倍视野)比较
Table 1. The number of apoptotic cells (10 high - power field) at different time point following hypoxic - ischemia
by HE staining , fluorescnce labelling and ISEL (n = 3 , $\bar{x} \pm s$)

时间	HE 染色		荧光染色		ISEL	
	对照组	HI 组	对照组	HI 组	对照组	HI 组
0 h	5.0 $\pm$ 2.8	4.7 $\pm$ 2.5	6.7 $\pm$ 2.1	7.0 $\pm$ 2.6	5.7 $\pm$ 2.1	6.3 $\pm$ 2.5
2 h	4.7 $\pm$ 3.0	5.3 $\pm$ 2.5	7.3 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 3.2	6.3 $\pm$ 2.1	7.3 $\pm$ 2.1
6 h	5.3 $\pm$ 2.5	15.7 $\pm$ 3.5 ^a	7.7 $\pm$ 2.7	22.7 $\pm$ 4.5 ^{a,b}	6.0 $\pm$ 3.2	21.3 $\pm$ 3.5 ^{a,b}
12 h	5.3 $\pm$ 2.0	32.3 $\pm$ 4.5 ^a	7.3 $\pm$ 2.1	43.0 $\pm$ 7.5 ^{a,b}	5.7 $\pm$ 2.5	39.7 $\pm$ 4.5 ^{a,b}
24 h	4.7 $\pm$ 2.1	56.7 $\pm$ 9.1 ^a	7.7 $\pm$ 2.5	69.7 $\pm$ 8.0 ^{a,b}	6.3 $\pm$ 2.1	63.7 $\pm$ 3.2 ^{a,b}
48 h	5.0 $\pm$ 2.5	37.3 $\pm$ 7.5 ^a	7.3 $\pm$ 2.1	47.0 $\pm$ 6.6 ^{a,b}	6.3 $\pm$ 2.0	42.3 $\pm$ 4.5 ^{a,b}
72 h	5.3 $\pm$ 2.5	23.7 $\pm$ 6.0 ^a	7.3 $\pm$ 2.0	34.3 $\pm$ 6.0 ^{a,b}	6.7 $\pm$ 2.0	34.0 $\pm$ 6.9 ^{a,b}
7 d	5.3 $\pm$ 2.1	6.7 $\pm$ 2.9	8.3 $\pm$ 2.5	9.7 $\pm$ 2.1	7.3 $\pm$ 2.5	8.3 $\pm$ 1.5
14 d	4.7 $\pm$ 2.1	4.7 $\pm$ 1.5	7.7 $\pm$ 2.0	8.3 $\pm$ 1.5	6.7 $\pm$ 2.5	7.3 $\pm$ 2.1

注:a:与同时点对照组比较 $P < 0.01$; b:与同时点 HI 组 HE 染色比较 $P < 0.01$

3 讨论

实验发现,脑 HI 后 2 h 在皮质部即可观察到细胞核膜起泡、染色质边集现象;6 h 凋亡细胞明显增多,并逐渐出现细胞浓缩、核固缩以及凋亡小体等中、晚期凋亡的形态特征;24 h 凋亡细胞达高峰;此后凋亡细胞数目逐渐减少,至 7 d 时已与正常对照组无异。结果提示,在脑 HI 损伤中神经细胞死亡

并不是简单的坏死,而是存在着复杂的细胞凋亡过程。细胞凋亡是迟发性脑损伤细胞死亡的一种重要形式。

细胞凋亡的检测手段主要有 DNA 电泳法、电镜法、光镜形态学观察、流式细胞仪、ISEL 等。实验方法的敏感性与特异性决定了是否能正确检测到凋亡细胞。在细胞凋亡中染色质改变是主要的,并认为必需有核酸内切酶介导的 DNA 断裂。这种断裂的 DNA 在琼脂糖凝胶电泳上常产生寡聚核苷酸片

段的梯状电泳条带。然而,并不是在所有程序化细胞死亡(PCD)类型中都有这种生化标志的出现,且在某些情况下,如广泛性缺血性坏死时,其坏死细胞也可产生梯状电泳条带。另外,即使有这种标志出现,却不能提供发生PCD的细胞定位的信息^[3]。本研究中,脑HI后12~48 h在实验侧脑组织可检测到DNA梯状电泳条带,以24 h时间点最为明显,其它时间点则难以观察到,也说明DNA电泳法存在敏感度不够的问题。HE光镜观察对于判断细胞凋亡难以把握,其通常只能识别部分有凋亡特征细胞,而不能识别无凋亡特征细胞及早期凋亡细胞。电镜虽能提供细胞凋亡最直接和最客观的证据,但其观察范围太小,难与病理形态学紧密结合。1992年Gavrieli等^[4]首次报道了经TdT介导的dUTP-生物素缺口末端标记(TUNEL)技术用于凋亡细胞的检测。由于凋亡细胞DNA断端的程度不同,所以其阳性信号分布定位也有差异,我们通过脑HI后神经细胞的ISEL标记并结合光镜观察,认为凋亡细胞可分为有凋亡特征和无凋亡特征两类。ISEL检出阳性信号与光镜下的凋亡特征细胞相对应,但也有一定比例的无凋亡特征细胞。无凋亡形态特征的细胞呈圆形,光镜下难以识别,其ISEL阳性信号一般较弱,核缩小不明显,无核周空晕,核无内切,染色质分布多均匀。有凋亡特征细胞其阳性信号可呈淡黄至棕褐色,信号越强,提示断端越多;其阳性信号在核内分布,核边界清晰,大小不一,有时可见核内切,多有核周空晕,可伴有胞浆嗜酸性变,周围无炎性细胞,较小的阳性信号并具备核周空晕要考虑凋亡小体。位于小胶质细胞内的阳性信号可能与小胶质细胞吞噬了含有阳性信号的凋亡小体有关。TUNEL被广泛用作为细胞凋亡的特异性标志。但是,近来有证据对其特异性提出了质疑^[5,6,7]。因为少数坏死早期的细胞也可出现TUNEL阳性,故单独的染色质改变不能用作细胞死亡形式的可靠标志。核溶解是坏死的标志,但核固缩与核碎裂在坏死与凋亡中都有发现^[8]。因此,TUNEL阳性尚需结合形态学特点进行分析。

在ISEL检测过程中,TdT与dUTP相结合,因dUTP接有荧光素,所以在ISEL标记30分钟后可见到荧光信号,至1.5~2 h达到高峰。在高峰期间也可见到能自发产生荧光的神经细胞、血管内皮细胞以及脉络膜细胞。其荧光多呈淡绿色,分布均匀。在强荧光灯照射下,着色普遍下降,神经细胞核膜处

有壳状外形,着色稍深。有DNA断端的凋亡细胞,其阳性信号可大小不一,但一般比自发荧光细胞强几倍。在荧光灯照射下,呈散在或灶性不均匀分布,其中强荧光信号细胞可呈黄绿色。小胶质细胞内见到的阳性信号多由其吞噬凋亡小体所致,可关闭荧光灯,回复到一般光源下进行组织定位判别。上述细胞形态特征与ISEL标记具有极好的相关性。

光镜下识别凋亡细胞可为ISEL和荧光检测时切片的选择和定位提供参考,不能作为阳性率统计,但凋亡小体可作参考计数,因为在ISEL检测中,其断端信号太少。胞浆嗜酸性变可能与DNA裂解核酸外溢有关。

综上所述,本研究采用光镜、电镜观察,DNA电泳、ISEL等技术证实了脑HI后存在细胞凋亡,细胞凋亡是迟发性脑损伤细胞死亡的一种重要形式。由于各检测方法均存在一定的局限性。因此,只有结合多种检测方法,且相互间具有较高的相关性,才能正确判定凋亡的存在。

[参 考 文 献]

- [1] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic - ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131 - 141.
- [2] 陆良勇,陈成伟,刘燕,等. 细胞凋亡与细胞增殖在人肝细胞癌中的表达和意义[J]. *中华消化杂志*, 1998, 18(6): 334 - 336.
- [3] de Torres C, Munell F, Ferrer I, et al. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic - ischemic neonatal rat brain [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 230(1): 1 - 4.
- [4] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben - Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. *J Cell Biol*, 1992, 119(3): 493 - 501.
- [5] Grasl - Kraupp BM, Ruttkay - Nedecky B, Koudelka H, et al. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note [J]. *Hepatology*, 1995, 21(5): 1465 - 1468.
- [6] Van Lookeren CM, Gll R. Ultrastructural morphological changes are not characteristic of apoptotic cell death following cerebral ischemia in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 213(2): 111 - 114.
- [7] Yasuda M, Umemura S, Osamura R, et al. Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method [J]. *Arch Histol Cytol*, 1995, 58(2): 185 - 190.
- [8] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis, and overview of cell death [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(1): 3 - 15.

(本文编辑:岳少杰)

新生大鼠脑缺氧缺血后迟发性细胞死亡的研究

(正文见 256 页)

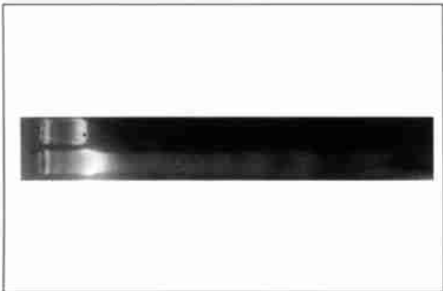


图 1

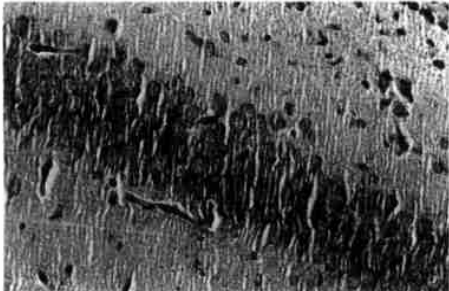


图 2

图 1 从缺氧缺血(HI)侧脑组织中抽提的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳呈现“梯状”电泳条带(泳道 2 为 HI 后 24 h)。正常对照脑组织无 DNA “梯状”电泳条带(泳道 1)

图 2 正常对照组海马中凋亡细胞很少,图中未见典型凋亡细胞 HE × 320

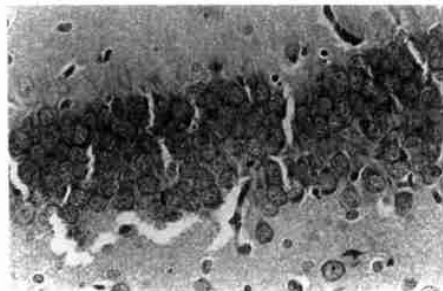


图 3

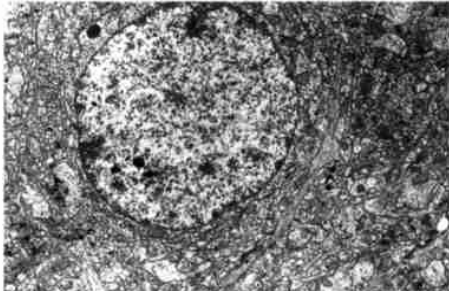


图 4

图 3 缺氧缺血后 24 h 海马回中可见较多凋亡细胞。图示 4 个典型凋亡细胞 HE × 320

图 4 电镜下,正常神经元其细胞核呈规则圆形,核染色质均匀分布,可见较多完整的线粒体和内质网分布在核周围 × 1000

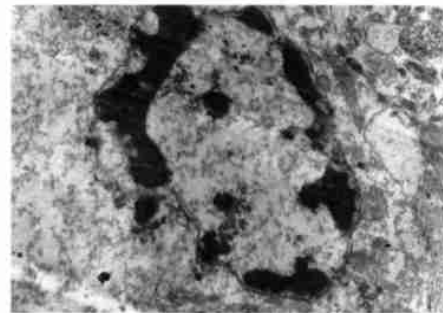


图 5

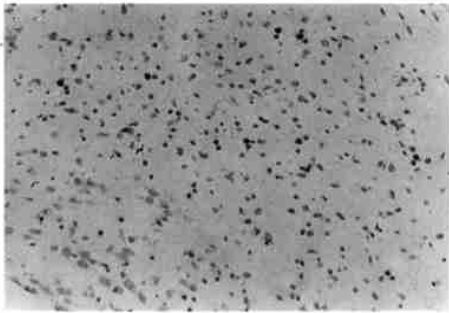


图 6

图 5 HI 后 24 h 脑组织电镜观察,可见核固缩不规则,核染色质聚集块,成环状排列于核膜内缘,似有凋亡小体形成,膜结构空泡化 × 8000

图 6 HI 后 48 h 大脑皮质标本。图中可见 6 个 ISEL 阳性信号,呈散在分布 ISEL × 220



图 7



图 8

图 7 HI 后 24 h 大脑皮质标本。图中见较多散在分布阳性信号,其周围有空隙,又与背景神经细胞有明显差异。并见小的阳性信号,后者可能与凋亡小体有关 荧光 × 320

图 8 正常对照标本。皮质中偶可见散在分布的阳性信号。图中示 1 个阳性信号 荧光 × 320