

·论著·

## 正常新生大鼠及缺血缺氧性损伤后 脑组织铁的组织化学改变

黑明燕, 旷寿金, 殷萍

(中南大学湘雅三医院儿科, 湖南长沙 410013)

**[摘要]** 目的 应用大鼠 HIE 模型了解正常情况下及缺血缺氧损伤后脑组织铁的组织化学改变。方法 实验分正常对照组和 HIE 组。正常对照组分别于 8 d, 10 d, 14 d, 21 d 龄处死(每时间点 3 只), HIE 组分别于 7 d 龄大鼠(HIE)模型制成后观察 12 h, 24 h, 3 d, 7 d, 14 d 处死(每时间点 3 只)。各组脑组织切片, 进行铁 Perl's 染色和光镜观察。结果 正常大鼠脑组织铁染色阳性细胞较少且主要见于扣带及胼胝体、脑室周围、内囊及外囊的尖部。形态学上铁染色阳性细胞主要与少突神经胶质细胞和小神经胶质细胞相似。HIE 组缺血缺氧损伤后 12 h 脑组织铁染色情况与正常对照组无明显差异。缺血缺氧损伤后随时间推移铁染色逐渐增强, 1 周时为甚, 以皮质、内囊及海马回处最明显, 铁染色阳性神经胶质的增多程度大于铁染色阳性细胞的增多程度, 有明显的傍血管现象。结论 铁染色可作为判断脑组织缺血缺氧中晚期损伤程度的指标之一。

**[关键词]** 缺血缺氧; 铁; 新生大鼠

**[中图分类号]** R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2002)06-0443-03

## Histochemical Expression of Iron in the Brain of Normal and Hypoxic-Ischemic-Insulted Neonatal Rats

HEI Ming-Yan, KUANG ShouJin, YIN Ping

Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China

**Abstract:** **Objective** To study the iron histochemical expression in the brain of normal and hypoxic-ischemic-insulted neonatal rats. **Methods** The iron histochemical changes in the brain were observed under the light microscope at 12 h, 24 h, 3 d, 7 d and 14 d after the hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) model was established (HIE group, n = 15). Brain sections were stained by the perl's method. Twelve normal age-matched neonatal rats were used as the controls. **Results** In the controls, there were small patches of iron positive cells located mainly in the corpus callosum and cingulum, periventricular zone, internal capsule, and tip of the external capsule. Morphologically, iron positive cells resembled oligodendrocytes and microglia. There was no significant difference in the positive staining between the HIE group and controls at 12 h after HI. At 24 h after HI, the number of iron positive cells started to increase in the ipsilateral hemisphere in the HIE group. There was apparently positive staining of glia and paravascular positive staining foci. The positive staining further increased time-dependently and peaked at 7 d after HI in the cortex, internal capsule and hippocampus. At 14 d after HI, the number of iron positive cells decreased yet did not return to normal. **Conclusions** Brain iron histochemistry is upregulated after HI insult and it could be used to assess the degree of cerebral damage in the moderate or late stage.

**Key words:** Hypoxic-ischemia; Iron; Neonatal rat

铁是脑组织中含量最多的一种转运金属元素, 在神经髓鞘形成过程中起着关键的作用<sup>[1,2]</sup>。铁在脑组织中的过量聚集可引发脂质过氧化反应, 使氧

自由基增多引起神经系统损伤<sup>[3]</sup>。动物实验已经发现脑组织铁的增加与阿尔茨海默病<sup>[4]</sup>及帕金森氏病<sup>[5]</sup>的发病有关。缺血缺氧性脑病 (hypoxic-is-

chemic encephalopathy, HIE) 是引起新生儿死亡及神经系统后遗症的主要疾病之一。临床研究发现, 缺血缺氧性脑病患者头部磁共振显示在基底节和脑室周围白质区有明显的铁蓄积现象<sup>[6]</sup>。我们推测缺血缺氧性损伤后脑中组织的组织化学特性可能发生一系列改变。然而目前对正常脑组织中铁分布情况的认识仍较局限, 对缺血缺氧后铁的组织化学变化的了解更加缺乏。我们利用 SD 大鼠及其 HIE 模型进行了相关实验, 目的是要了解正常情况下及缺血缺氧性损伤后脑组织中铁的组织化学特性及其与损伤后恢复期的时间相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验分组

7 d SD 大鼠共 27 只(平均体重 12~15 g), 其中 15 只制成 HIE 模型(分离结扎单侧颈总动脉, 2 h 后, 再置含 8% O<sub>2</sub>/92% N<sub>2</sub> 气体的 34 恒温箱中 2.5 h), HIE 模型制成后分别观察 12 h, 24 h, 3 d, 7 d 及 14 d(鼠龄分别为 8 d, 10 d, 14 d, 21 d, 各组 n=3)。另 12 只为正常对照, 分别于 8 d, 10 d, 14 d 及 21 d 龄处死(各组 n=3)。在不同时间点将动物以约 30 ml PBS 接 30 ml 4% 多聚甲醛进行经左心室灌注固定, 置恒温切片机中切成 45 μm 厚脑组织冠状切片。

### 1.2 铁组织化学染色

采用漂浮染色法, 将脑组织切片进行 Perl's 反应(2% potassium ferricyanide 和 2% 盐酸沉淀组织中铁), DAB 显色。染色完成后将脑组织片贴于明矾铬包膜的玻片上, 置室温干燥后部分以苏木紫复染以便确定脑组织平面结构, 并了解铁阳性反应细胞的大致比例。

## 2 结果

### 2.1 正常对照组的铁化学染色

正常对照组铁染色阳性细胞很少且主要分布在扣带及胼胝体、脑室周围、内囊、及外囊的尖部(图 1-A, B, C, D)。该结果与其它研究结果类似<sup>[7]</sup>。各时间段铁染色阳性细胞数目无明显差异。光镜下观察铁染色阳性物质主要分布于细胞质。铁染色阳性细胞形态有两类: 一类细胞体较大呈圆形或椭圆形, 无突触或有 1~2 条极短的突触, 形态上与少突神经胶质细胞相似(图 1E); 另一类细胞体较小无定型, 有多条弯曲的长突触向各方向延伸, 多见于侧脑室

下, 有时散在于皮质及丘脑区, 形态上与少突神经胶质细胞相似(图 1F)。在皮质区及丘脑区偶可见铁阳性细胞傍血管现象(图 2C)。

### 2.2 HIE 组的铁化学染色

缺血缺氧损伤后 12 h 脑组织铁染色情况与同龄正常大鼠无明显差异。损伤后 24 h, 在损伤侧扣带回及内囊处观察到铁阳性染色开始增强(图 2A, 图 3A); 3 d 时明显增强, 并可见脑室扩大及脑组织坏死和空洞形成(图 2B, 图 3B), 与普通 HE 染色所见的缺血缺氧后的病理改变相符; 7 d 时达高峰, 可见脑组织空洞形成及脑室进一步扩大, 以海马回(图 2C)、皮质区(损伤皮质区可见明显的与大脑皮层呈垂直方向指向大脑皮层的辐射状铁染色阳性病灶)(图 2E)及内囊处(图 3C)病变最严重, 有明显的脑组织萎缩, 萎缩明显处铁染色亦明显增强; 14 d 时铁阳性染色已明显减少但仍未恢复正常。对侧脑组织除偶可见局部脑出血外, 铁染色情况与正常同龄动物相类似。

光镜下观察病变区以无细胞形态的铁染色阳性网状胶质增多为主, 铁染色阳性细胞亦有增多(图 3D)。在皮质及丘脑区, 24 h 开始已可见较多的铁染色强阳性细胞群傍血管现象, 并夹有散在的红细胞, 提示有局部的脑出血现象(图 2D)。

## 3 讨论

新生儿 HIE 牵涉到复杂的发病机制及病理生理改变。国内对 HIE 的研究很少将 HIE 与脑组织的铁代谢联系在一起。因为神经髓鞘的发育必需有胆固醇和脂质的合成, 后两者又必需有铁参与才能完成<sup>[3]</sup>, 因此在脑组织发育迅速的新生儿阶段, 脑组织对铁的需求以及铁的含量都处于高峰期<sup>[1]</sup>。有研究证实脑组织中胆固醇和脂质的合成在少突神经胶质细胞中明显高于其它细胞<sup>[8]</sup>, 因此推断脑组织中铁在少突神经胶质细胞中的含量亦高于其它细胞, 这亦与本实验发现的铁染色阳性细胞形态上与少突神经胶质细胞相似的结果相吻合。阳性铁染色局限于细胞质可能与参与铁代谢的转铁蛋白、转铁蛋白受体及铁蛋白均局限于细胞核外有关。

临床上发现, 窒息的新生儿其血浆游离铁水平升高<sup>[9]</sup>, 中、重度 HIE 患儿常有颅内出血, 因此血浆中的游离铁可以通过破损的血脑屏障到达脑组织并不通过转铁蛋白的介入而直接被脑细胞摄取。缺血缺氧时, 酸中毒可促使铁与铁蛋白分离, 使细胞外游离铁进一步增高, 引起过度的氧化损伤。本实验亦

发现铁染色阳性增强现象主要见于脑组织受损区,且其傍血管现象明显,有局部的脑出血。由于病灶对侧亦同时受到缺氧损伤,因此不完全排除该侧脑组织中出现类似局部脑出血现象。

实验中我们发现铁染色阳性神经胶质增多的程度超过铁染色阳性细胞增多的程度,可能与损伤后局部细胞已坏死裂解有关。本实验于缺血缺氧后24 h可见铁染色增强现象,一周后最明显,提示铁染色增强可能发生于缺血缺氧后中晚期,而不适于作为考察缺血缺氧损伤的早期指标。

众所周知,缺血缺氧损伤后因NMDA受体激活及钙离子内流增加使得细胞内钙超负荷导致细胞损伤,铁染色的增强是否与钙内流有关值得进一步研究。

(图见彩色插页)

#### [参 考 文 献]

- [1] Taylor EM, Morgan EH. Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1990, 55(1): 35 - 42.
- [2] Roskams JA, Connor JR. Iron, transferrin and ferritin in the rat brain during development and aging[J]. J Neurochem, 1994, 63(2): 709 - 716.
- [3] Lesnefsky EJ. Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury[J]. Adv Exp Med Biol, 1994, 366: 129 - 146.
- [4] Connor JR, Menzies SL, St. Martin SM. A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains[J]. J Neurosci Res, 1992, 31(1): 75 - 83.
- [5] Kienzl E, Puchinger L, Jellinger K. The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. J Neurol Sci, 1995, 134(Suppl): 69 - 78.
- [6] Dietrich RB, Bradley WG Jr. Iron accumulation in the basal ganglia following severe ischemic-anoxic insults in children[J]. Radiology, 1988, 168(1): 203 - 206.
- [7] Connor JR, Pavlick G, Karli D. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain[J]. J Comp Neurol, 1995, 355(1): 111 - 123.
- [8] Pleasure D, Kim SU, Silberberg D. In vitro studies of oligodendroglial lipid metabolism [A]. In: Norton WH. Oligodendroglia [M]. New York: Plenum Press, 1984, 175 - 197.
- [9] Dorrepaal CA, Berger HM, Benders MJNL. Nonprotein-bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn[J]. Pediatrics, 1996, 98(5): 883 - 889.

(本文编辑:俞燕)

(上接第444页)

同的实验条件下,经DXM作用后,细胞的增生水平明显降低,说明体外培养的GMCs增生水平降低是由DXM所引起的。刺激24 h和48 h后,GMCs的增生水平均在DXM浓度为4 000 ng/孔时抑制最为明显,且以48 h的抑制作用表现最强,这可能是DXM治疗肾脏病的机制之一。我们之所以选择24 h和48 h作为两个观测点,是因为此期大鼠GMCs自身增生水平稳定,超过72 h后GMCs的增生水平随培养时间的延长而降低。

通过观察DXM在不同浓度和时间对大鼠GMCs的增生抑制作用,证实DXM浓度达一定值后对大鼠GMCs增生有明显抑制作用,该作用大小与DXM剂量有关。

#### [参 考 文 献]

- [1] 易著文. 小儿临床肾脏病学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1998, 273 - 287.
- [2] 潘晓勤,王晓燕,姜新猷. 肾小球系膜细胞培养及鉴定 [J]. 南京医科大学学报, 1995, 15(6): 222 - 224.
- [3] 张平,章崇杰,刘杰. 改良MTT法检测自然杀伤细胞的活性 [J]. 华西医科大学报, 1996, 27(2): 213 - 215.
- [4] Shanand SI. Cell-cycle control and renal disease [J]. Kidney Int, 1997, 52(8): 294 - 308.
- [5] Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity [J]. Science, 1995, 270(12): 232 - 241.
- [6] Ray A. Glucocorticoids (letter) [J]. Science, 1995, 270(9): 1103 - 1111.
- [7] John RS. Cytokines [J]. Kidney Int, 1993, 43(8): 565 - 569.

(本文编辑:尹飞,俞燕)

# 正常新生大鼠及缺血缺氧性损伤后脑组织铁的组织化学改变

(正文见第 445 页)

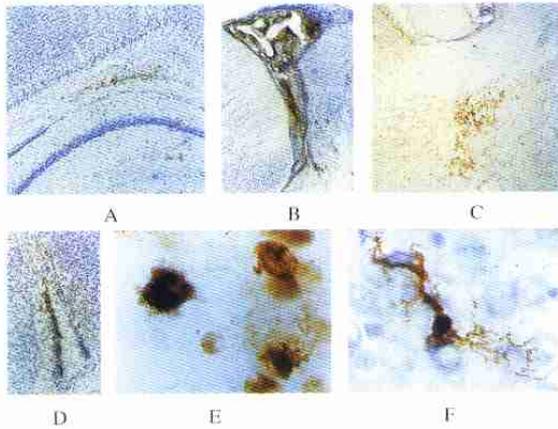


图 1 正常新生大鼠脑组织染色

Figure 1 Iron staining of brain in normal neonatal rats.

铁染色阳性细胞少, 主要分布于扣带回及胼胝体 (a), 脑室周围 (b), 内囊 (c), 及外囊的尖部 (d) ( $\times 50$  倍), 铁阳性细胞形态有两类, 一类细胞较大, 椭圆形, 无突触 (e); 另一类细胞体小, 有多条长突触 (f) ( $\times 1000$  倍)

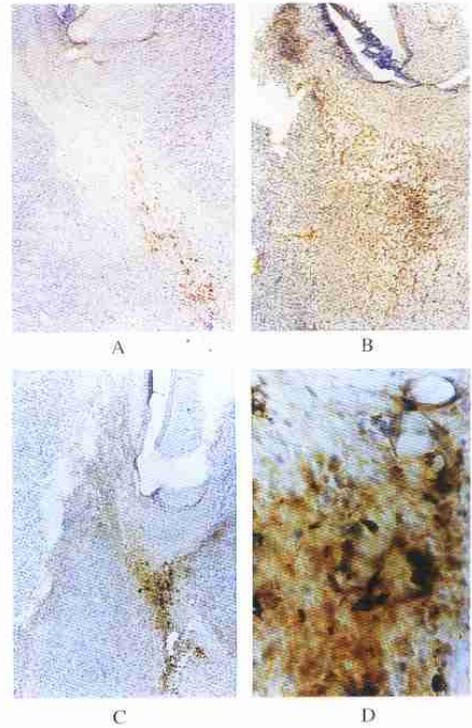


图 3 缺血缺氧后脑组织铁染色——脑室下区及内囊

缺血缺氧后 24 h 损伤侧铁染色开始增强 (a), 3 d 时铁染色明显增强, 可见脑组织坏死及空洞形成 (b), 7 d 时仍有明显的铁染色强阳性病灶 (c,  $\times 50$ ), 高倍镜下可见病灶区以无细胞形态的铁染色阳性网状胶质增多为主 (d,  $\times 400$ )

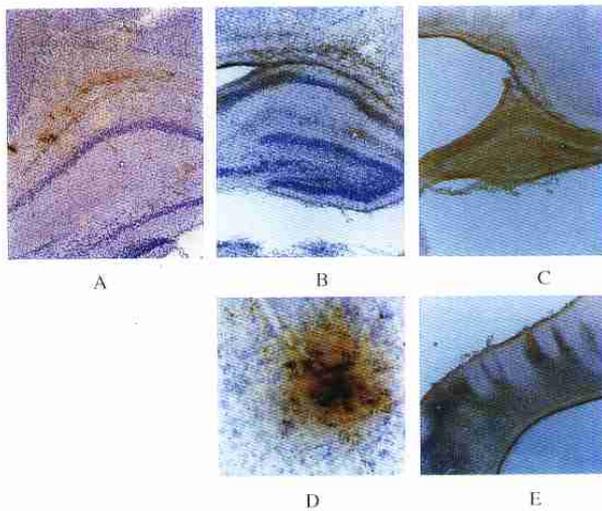


图 2 缺血缺氧后脑组织铁染色——扣带回、海马回及皮质区

缺血缺氧后 24 h 损伤侧铁染色开始增强 (a,  $\times 50$ ), 皮质区可见较多的铁染色强阳性细胞群傍血管现象并夹有散在红细胞 (d,  $\times 400$ ), 3 d 时铁染色明显增强 (b,  $\times 50$ ), 7 d 时达高峰, 损伤侧明显萎缩, 有空洞形成及脑室扩大, 皮质区有与大脑皮层垂直的辐射状病灶 (c, e,  $\times 50$ )