

· 实验研究 ·

3 日龄未成熟大鼠缺血性脑损伤后少突胶质细胞超微结构变化

胡兰, 陈超

(复旦大学儿科医院新生儿科, 上海 200032)

[摘要] 目的 少突胶质细胞是脑白质的主要细胞成分, 了解少突胶质细胞损伤的病理过程有助于研究早产儿脑损伤的发生机制。该实验目的在于了解3日龄未成熟大鼠双侧颈总动脉结扎造成脑白质损伤后少突胶质细胞超微结构的变化。方法 将3日龄未成熟SD新生大鼠随机分为对照组和实验组。对照组仅切开颈部皮肤, 而实验组结扎双侧颈总动脉。术后6, 12, 24 h分别取实验组和对照组存活大鼠8只, 将脑组织的超微切片进行透射电镜检查。结果 对照组存活率为100%, 实验组存活率为51%。透射扫描电镜发现实验组大鼠术后6 h脑白质少突胶质细胞普遍水肿, 细胞器(线粒体、内质网、高尔基体)水肿明显, 数量减少, 线粒体数目减少及水肿尤为多见, 有的线粒体出现空泡现象, 粗面内质网脱颗粒。术后12 h少突胶质细胞水肿更加明显, 细胞器进一步减少, 可见细胞核染色质分布不均, 少数细胞已经出现核固缩。术后24 h实验组少突胶质细胞广泛核固缩、核溶解, 细胞器广泛缺失。结论 3日龄未成熟大鼠双侧颈总动脉结扎后, 大鼠脑白质少突胶质细胞损伤。损伤数小时内少突胶质细胞的细胞器受损, 随时间延长进行性加重, 直至出现少突胶质细胞核固缩。该研究显示了脑缺血性损伤时, 脑白质内少突胶质细胞的超微结构病理变化的全过程。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(3): 225-228]

[关键词] 脑缺血; 凋亡; 少突胶质细胞; 电镜; 早产鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)03-0225-04

Pathological changes of ultrastructures of oligodendrocytes following ischemic brain injury in 3-day-old premature rats

HU Lan, CHEN Chao. Department of Neonatology, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China (Chen C, Email: chen6010@163.com)

Abstract: Objective The oligodendrocyte is a key cell component of brain white matter. It is important to understand the pathology of oligodendrocyte injury to better understand the mechanisms leading to white matter injury in the premature brain. This study investigated the ultrastructural changes of oligodendrocytes following ischemic brain injury in 3-day-old premature rats. **Methods** One hundred and eight 3-day-old Sprague-Dawley (SD) premature rats were randomly divided into experimental and control groups. Ischemic brain injury was induced by ligation of bilateral carotid arteries. The control group underwent a sham operation without carotid ligation. At 6, 12 and 24 hrs after operation, 8 rats were randomly selected from surviving rats of both groups. The brain tissues were sampled for transmission electron microscopy. **Results** The survival rate of the control and the experimental groups was 100% and 51%, respectively. At 6 hrs of ischemia, swollen oligodendrocytes were observed in all 8 experimental rats. Organelles, including mitochondria, endoplasmic reticulum, and the Golgi apparatus, were swollen and the number of organelles in all 8 rats decreased noticeably compared with control animals. The swollen and decreased mitochondria were the most frequent change. Vacuolated mitochondria were seen in one rat and degranulated rough endoplasmic reticulum was seen in another rat from the experimental group. At 12 hrs of ischemia, oligodendrocyte swelling and decreased number of organelles became more severe in the experimental group. The oligodendrocyte nuclear chromatin was unevenly distributed and karyopycnosis began to appear in experimental animals. At 24 hrs of ischemia, oligodendrocytes generally displayed karyopycnosis and karyolysis, and organelles disappeared in experimental animals. **Conclusions** Progressive oligodendrocyte damage occurred in 3-day-old premature rats subjected to permanent cerebral ischemia. The organelles injury was observed at 6 hrs of ischemia and evolved to oligodendrocyte apoptosis at 24 hrs of ischemia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(3): 225-228]

Key words: Cerebral ischemia; Apoptosis; Oligodendrocyte; Electron microscope; Premature rats

随着新生儿医疗技术的发展, 早产儿, 尤其是极低出生体重儿(VLBW)的生存率有了很大的提高。

[收稿日期] 2007-02-01; [修回日期] 2007-03-06

[作者简介] 胡兰, 女, 博士在读, 医师。主攻方向: 新生儿学。

[通讯作者] 陈超, 男, 教授, 上海复旦大学附属儿科医院新生儿科, 邮编: 200032。

应用MRI作为检测手段,这些患儿中脑白质损伤的发病率为20%^[1],且早产儿脑损伤多伴有严重的后遗症^[2],脑瘫(CP)发生率高达20%^[3,4]。

近年,有关早产儿脑损伤机制的研究进展迅速,脑白质少突胶质细胞的前体细胞的选择易损伤性已被普遍认同。对脑白质内少突胶质细胞损伤进行深入研究,阐明其损伤机制对早产儿脑白质损伤及时干预有重要意义。本实验应用3日龄未成熟大鼠结扎双侧颈总动脉制作早产儿脑白质损伤模型,观察实验组未成熟大鼠脑白质少突胶质细胞透射电镜下细胞超微结构的变化。

1 对象和方法

1.1 对象

从复旦大学上海医学院实验动物中心购得清洁级3日龄(P3)SD大鼠共6窝,共71只,体重6.5~12 g,性别不拘。取同窝P3大鼠应用随机数字表随机分为两组:正常对照组(假手术组,简称对照组)和双侧颈动脉结扎组(简称实验组)。

1.2 方法

1.2.1 手术 将P3 SD大鼠用无水乙醚麻醉后,取仰卧位,安而碘皮肤消毒剂消毒颈部皮肤,无菌条件下作颈腹侧正中切口,无菌手术刀切开约0.5 cm长的切口。逐层分离皮下组织,找到血管神经束,分离出双侧颈总动脉。对照组缝合皮肤,实验组用9-0丝线完全结扎双侧颈总动脉后缝合皮肤。术后在37℃水浴箱内至体温和活动恢复正常,返笼饲养。

1.2.2 体重、脑重测量 术后24 h测实验组及对照组大鼠体重、脑重,比较两者差异。

1.2.3 透射电镜组织学检查 于术后6,12,24 h取实验组、对照组存活大鼠各8只进行透射电镜检查。

透射电镜标本制备:大鼠乙醚麻醉后,先以生理盐水继以4%多聚甲醛通过左心室插管灌注,光镜下剥取脑白质组织,切割成1 mm³的脑组织标本若干,迅速用4%戊二醛进行前固定,再应用1%锇酸进行后固定。使用0.22 M二甲胂缓冲液进行一昼夜的洗净,然后常规系列酒精梯度脱水,Luweak 812树脂包埋,最后进行超薄切片,切片进行二重染色后准备透射电镜观察。使用复旦大学上海医学院电镜室透射电镜进行标本观察,分低倍和高倍分别进行拍照。

1.3 统计学方法

所有数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用

组间 t 检验, $P < 0.05$ 为显著性水准,应用SPSS11.0软件分析。

2 结果

2.1 术后情况

对照组存活率为100%(24只/24只),实验组存活率为51%(24只/47只)。术后实验组大鼠出现皮肤紫绀、活动减少、进食减少。

2.2 生长发育

2.2.1 体重 取存活大鼠48只,随机分为对照组、实验组,术前实验组(24只)体重为 7.1 ± 0.2 g;对照组(24只)为 7.3 ± 0.3 g,术前两组体重无显著差异。术后实验组存活大鼠全部出现体重减轻。术后24 h实验组(8只)为 6.9 ± 0.2 g,对照组(8只)为 8.7 ± 0.2 g,两组体重比较差异有显著性。

2.2.2 脑重 术后24 h实验组(8只)平均脑重为 0.45 ± 0 g,对照组(8只)为 0.48 ± 0 g,两组比较,差异无显著性。

2.3 超微结构变化

2.3.1 术后6 h组 通过扫描电镜观察到实验组大鼠脑白质缺氧缺血早期就出现变化。低倍镜观察,术后6 h实验组8只/8只可见少突胶质细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞水肿,白质中广泛可见的是水肿的少突胶质细胞。高倍镜观察少突胶质细胞内部结构,实验组8只/8只可见细胞器数量减少,最明显的表现为线粒体数日较对照组减少;8只/8只存在细胞器(高尔基体、粗面内质网、线粒体)水肿,最多见线粒体水肿;4只/8只见线粒体嵴的缺失;1只/8只见线粒体空泡;1只/8只存在粗面内质网脱颗粒现象。实验组术后6 h未见明显细胞核及核内染色质的变化。对照组少突胶质细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞形态基本正常(图1)。

2.3.2 术后12 h组 低倍镜下,对照组少突胶质细胞形态基本正常,细胞核为椭圆形。高倍镜下,实验组少突胶质细胞水肿更加明显,细胞器更加减少甚至消失,出现细胞核及核内染色质的改变,细胞核肿胀呈球形细胞核;实验组8只/8只少突胶质细胞线粒体嵴的缺失;1只/8只存在少突胶质细胞核内染色质聚集现象,1只/8只观察到少突胶质细胞核固缩(图2)。

2.3.3 术后24 h组 低倍镜下,实验组7只/8只可见广泛的细胞核固缩现象,细胞器广泛缺失。高倍镜下,实验组7只/8只见细胞核固缩,1只/8只存在少突胶质细胞核染色质外露(图3)。细胞出

现典型的凋亡表现。对照组少突胶质细胞及其细胞器形态未见异常。

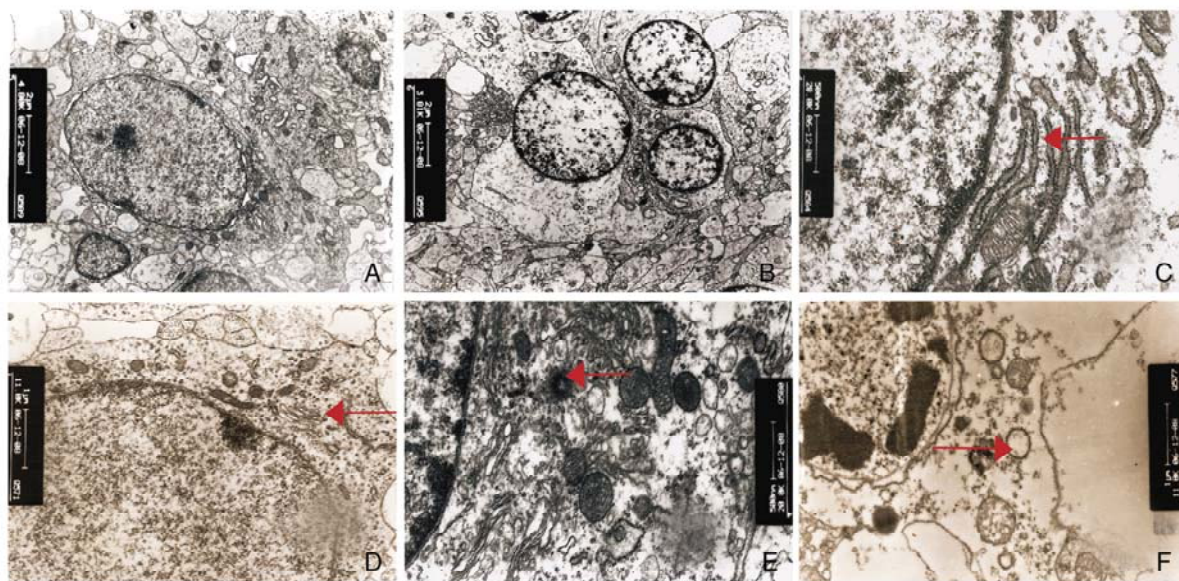


图1 术后6 h电镜观察结果 A:对照组少突胶质细胞形态正常;B:实验组呈现水肿的少突胶质细胞;C:对照组正常粗面内质网;D:实验组粗面内质网脱颗粒;E:对照组少突胶质细胞线粒体形态正常;F:实验组线粒体空泡。

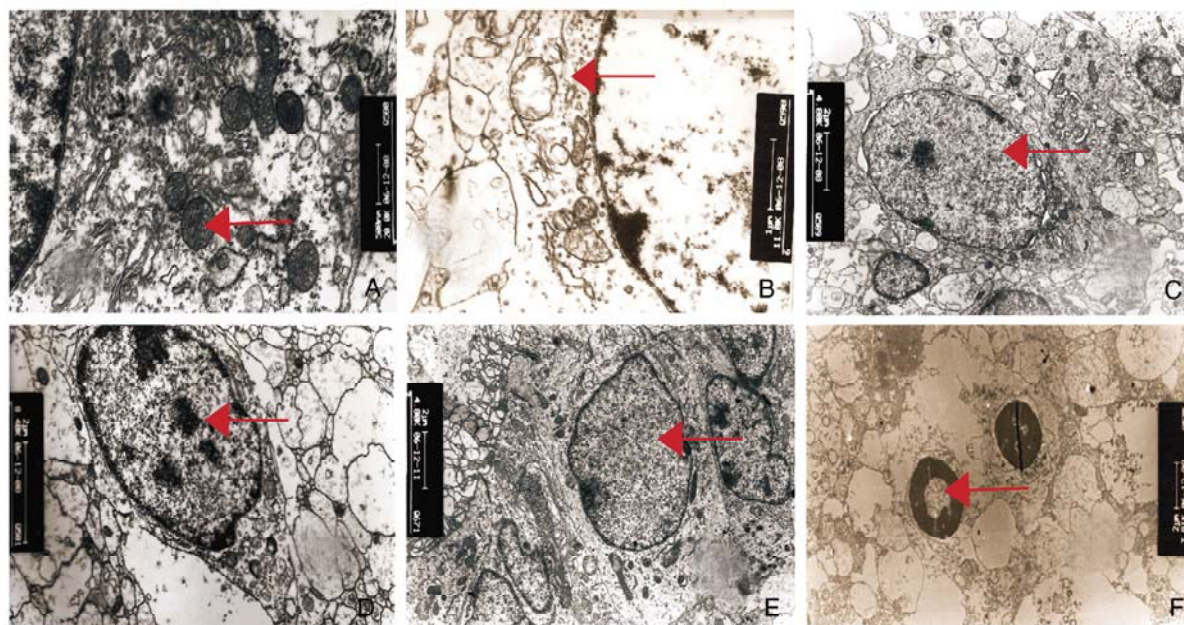


图2 术后12 h电镜观察结果 A:对照组线粒体嵴完整;B:实验组线粒体嵴缺失;C:对照组细胞染色质均匀分布;D:实验组细胞内染色质聚集;E:对照组少突胶质细胞大小正常;F:实验组少突胶质细胞固缩。

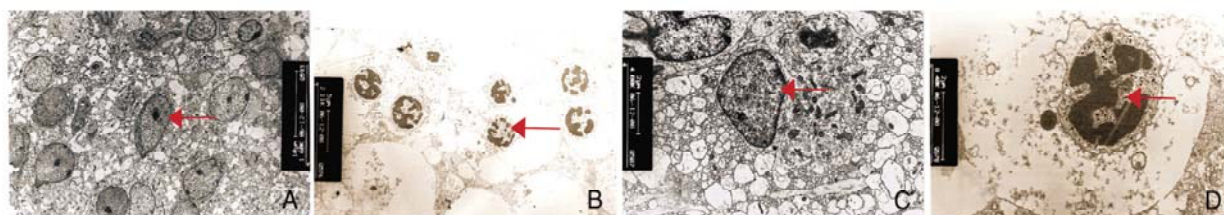


图3 术后24 h电镜观察结果 A:对照组正常少突胶质细胞;B:实验组广泛少突胶质细胞凋亡;C:对照组少突胶质细胞内染色质均匀分布;D:实验组少突胶质细胞染色质外露。

3 讨论

近年来,早产儿脑白质损伤的机制及防治成为研究热点,神经胶质细胞是脑白质的主要组成细胞,在早产儿脑白质损伤发生时,神经胶质细胞损伤占有重要地位,尤其对早产儿脑损伤的发生发展及儿童期脑功能恢复起着重要作用。少突胶质细胞在胎龄24周时才逐渐由其前体细胞转化为成熟少突胶质细胞。早产儿的胎龄越小,其脑白质中少突胶质细胞的前体细胞含量越多。与其他细胞相比,少突胶质细胞对缺血缺氧损伤更为敏感,体外实验证实,早产儿少突胶质细胞由于含有丰富的铁与铁结合蛋白,谷胱甘肽含量却较低,且细胞显著依赖于氧化磷酸化,因此易受到氧化应激损伤^[5]。Back等^[6]证实少突胶质细胞谱系中处于不同成熟阶段的少突胶质细胞易感性不同,少突胶质细胞前体细胞对缺氧缺血损伤最敏感,最容易发生凋亡,而发育成熟的少突胶质细胞抵抗力较强。早产儿脑白质少突胶质细胞前体细胞含量较多,因此易发生脑白质损伤。

合适的动物模型是研究早产儿脑白质损伤的关键。目前临床实验中应用的动物模型如:鼠、兔等诱导脑缺氧缺血或颅内注射微生物、细菌产物、兴奋性毒素。Lin等^[7]通过结扎P4大鼠双侧颈总动脉并吸入8%氧20 min造模,通过免疫组化技术得出P6及P9实验组大鼠相比对照组脑白质O⁴⁺O¹⁻标记阳性的少突胶质细胞前体细胞(pre-oligodendrocyte, preOL)减少,MBP染色降低及APP免疫反应增强,证实实验组大鼠发生了脑白质损伤。Uehara^[8]的实验证实结扎新生大鼠双侧颈总动脉后,皮质下大脑血流降至脑基本血流的25%左右,明显高于单侧颈总动脉结扎加吸入低氧的模型(15%~17%),可造成选择性的脑白质损伤,减少灰质损伤。

在选择新生大鼠日龄时Back等^[9]证实人类脑白质易损的时期是孕24~32周,此时脑内免疫标记O⁴⁺O¹⁻的占优势,而大鼠脑白质的易损时间是生后2~4 d,此时脑白质内以preOL为主^[10],因此进行早产儿脑白质损伤研究宜选用生后2~4 d的未成熟大鼠。

脑损伤后电镜观察白质内少突胶质细胞,在术后6 h即出现少突胶质细胞水肿,线粒体、高尔基体水肿,可见线粒体嵴的缺失和线粒体空泡。术后12 h实验组少突胶质细胞细胞器进一步减少,线粒体嵴缺失增加,出现细胞核内染色质聚集,偶见核固缩显现,这是细胞凋亡的早期改变。术后24 h实验

组观察到广泛的、典型的少突胶质细胞核固缩、染色质外露,提示发生了细胞凋亡。因此证实脑白质缺氧缺血性损伤以细胞凋亡形式为主,凋亡在缺血数小时后即可发生,而线粒体能量障碍是可能的细胞内始发因素^[11]。

既往实验证实早产儿脑白质损伤时光镜病理表现在生后3周左右,大部分表现为脑白质萎缩及脑室扩大,另一些表现为局灶脑白质损伤、再吸收及胶质细胞增生。而通过透射电镜观察缺氧缺血损伤的脑白质,其主要细胞成分少突胶质细胞的超微结构出现变化的时间远远早于光镜结果。

总之,本实验证实应用3日龄未成熟SD大鼠,通过结扎双侧颈总动脉的方法造模,电镜观察脑白质内少突胶质细胞的超微结构变化,证实脑白质损伤早期即存在少突胶质细胞的凋亡,而细胞器,尤其是线粒体水肿、嵴缺失造成的细胞能量衰竭是可能的细胞凋亡的始发机制。

[参 考 文 献]

- [1] Blumenthal I. Periventricular leukomalacia: a review [J]. *Eur J Pediatr*, 2004, 163(8):435-442.
- [2] Back SA, Riddle A, McClure MM. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth [J]. *Stroke*, 2007, 38(2):724-730.
- [3] Inage YW, Itoh M. Correlation between cerebrovascular maturity and periventricular leukomalacia [J]. *Pediatr Neurol*, 2000, 22(3):204-208.
- [4] Koterazawa K, Nakano K, Nabetani M, Miyata H, Kodama S, Takada S, et al. Incidence of cerebral palsy in Himeji City in 1983-1997 [J]. *No To Hattatsu*, 2007, 39(1):32-36.
- [5] Kinney HC, Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia [J]. *Semin Pediatr Neurol*, 1998, 5(3):180-189.
- [6] Back SA, Han BH, Luo NL, Chrichton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(2):455-463.
- [7] Lin S, Rhodes PC, Lei M, Zhang F, Cai Z. alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitron attenuates hypoxic-ischemic white matter injury in the neonatal rat brain [J]. *Brain Res*, 2004, 1007(1-2):132-141.
- [8] Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, Naqai H, Ohmae T, Hasegawa K, et al. A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion [J]. *Brain Res*, 1999, 837(1-2):213-220.
- [9] Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(4):1302-1312.
- [10] Back SA, Han BH, Luo NL, Chrichton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(2):455-463.
- [11] 李书娟,毛健. 缺氧缺血性脑损伤时新生大鼠脑皮质神经细胞能量代谢的改变 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(2):101-104.

(本文编辑:吉耕中)