

· 实验研究报道 ·

百日咳菌液致大鼠急性感染性
脑水肿模型时效关系的探讨

黄榕,尹飞,杨于嘉,虞佩兰,毛定安,陶永光

(中南大学湘雅医院儿科,湖南 长沙 410008)

[摘 要] **目的** 目前国内外缺乏对急性感染性脑水肿(感脑)模型的发生过程的研究,该文为了解大鼠注射百日咳菌液后 4 h 内脑水肿的形成情况,为急性感染性脑水肿的研究及治疗提供基础。**方法** 大鼠随机分为空白对照组(C 组),生理盐水组(NS 组)和百日咳菌液脑水肿模型组(PB 组)。分别检测 C 组和各时间点 NS 组、PB 组大鼠脑组织含水量(WC)、钠、钾含量、伊文思蓝(EB)含量及组织病理检查。**结果** C 组、NS 组大鼠 WC、钠、钾和 EB 含量基本稳定。PB 组大鼠注菌液后 30,60,120 和 240 min WC(%)分别为 79.7 ± 0.5 , 81.0 ± 0.9 , 81.1 ± 0.8 , 82.2 ± 0.3 。EB($\mu\text{g/g}$)含量分别为 2.4 ± 0.3 , 2.9 ± 0.4 , 3.1 ± 0.2 , 4.4 ± 0.4 。与 C 组和相应时间 NS 组比较,差异有极显著性($P<0.01$)。同时电镜发现随注菌液后时间增加,PB 组大鼠脑水肿病变逐渐加重。**结论** 大鼠百日咳菌液脑水肿模型系一混合性弥漫性脑水肿,注菌后 240 min 脑水肿病变最明显。

[中国当代儿科杂志,2004, 6(5): 437—440]

[关 键 词] 脑水肿;百日咳菌液;时效关系;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1008—8830(2004)05—0437—04

目前国内外大多采用缺血性、创伤性和冷冻伤模型进行脑水肿的发病机制研究^[1,2],通过感染性脑水肿(感脑)模型对脑水肿的研究较少。而儿科临床所发生的脑水肿绝大多数为感脑。为了探讨感脑的发病机制及防治措施,本科经过数十年的努力,已成功制成了百日咳菌液大鼠脑水肿模型^[3,4],但缺乏对急性感脑模型的发生过程进行系统研究。本实验旨在阐明百日咳菌液诱导大鼠急性感脑模型前 4 h 脑含水量(WC)、伊文思蓝(EB)含量、钠、钾离子含量及形态学改变,了解注菌后各时间点脑水肿的形成情况,为感脑的研究提供模型基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康 SD 大鼠共 88 只,雌雄各半,体重 200 ± 20 g,随机分为空白对照组(C 组, $n=8$),未作任何处理断头处死;生理盐水组(NS 组)和百日咳菌液组(Pertussis bacilli,PB 组)。其中 NS 组和 PB 组按观察时间又分为 5 min 组,30 min 组,60 min 组,120 min 组,240 min 组。每组 8 只大鼠,依次在注

NS 或 PB 后 5,30,60,120,240 min 断头处死。

1.2 模型制作方法

大鼠均采用 25%乌拉坦麻醉。取仰卧位,分离左侧股动脉,将内径 0.56 mm 塑料管插入左股动脉后,连接四导生理仪监测血压及取血样。颈正中切口,分离左颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。夹闭颈外动脉后,用 1 ml 注射器配 4.5 号针头于左颈总动脉穿刺向左颈内动脉注射百日咳菌液 0.2 ml/kg (含菌 $10.8\times10^9/\text{ml}$),5~15 s 内注射完毕。NS 组动物则用同法注射等量的灭菌生理盐水。注菌液或 NS 后经舌下静脉注入 3% EB 液 2 ml/kg 。各组动物观察至相应时间断头处死。

1.3 生理指标及血气分析

温度计测肛温,热灯和取暖器保持大鼠直肠温度为 $37\pm0.5^\circ\text{C}$ 。四导生理记录仪记录动脉血压。注射 NS 或菌液前和处死前用 1 ml 注射器从左股动脉取血样 1 次,每次 $0.3\sim0.4\text{ ml}$ 进行 PaO_2 、 PaCO_2 和 pH 测定。

1.4 含水量、EB 含量和干脑组织钠、钾离子测定

大鼠处死后分别取左右大脑半球后 1/3 全层脑组织标本装入称量杯,称湿重后,干湿法测脑含水

[收稿日期] 2003—09—30; [修回日期] 2004—01—10
[作者简介] 黄榕(1961—),女,博士,副教授。主攻方向:小儿神经系统疾病。

量。分别取左右大脑半球前部一块全层脑组织,甲酰胺浸泡法测 EB 含量。精密称取测完 WC 的干脑组织,原子吸收分光光度法测大鼠左侧脑组织中钠、钾离子含量。

1.5 大鼠海马电镜样本的制备

另取大鼠 6 只,随机分为前述 3 组,进行处理。大鼠观察至规定的时间,用多聚甲醛一戊二醛固定液从腹主动脉注入,根据肝脏软硬程度而定,大约每只大鼠需固定液 150 ml 左右。然后断头取脑,取左侧海马组织置同种固定液 4℃ 冰箱过夜,电镜制样,半薄切片定位后,观察切片并照相。

1.6 统计学处理

数据均用 Excel2000 软件计算,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 F 检验,同阶段比较用 t 检验,相关分析采用直线回归。

2 结果

2.1 BP 监测及血气分析结果

所有动物体温维持在 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。平均动脉压, pH, PaO₂, PaCO₂ 在实验过程中差异均无显著

性($P > 0.05$)。

2.2 含水量和 EB 含量

C 组和 NS 组左右侧大脑半球 WC 和 EB 含量相对稳定,差异无显著性($P > 0.05$)。表明手术方式和向左颈总动脉注射 NS 对含水量和 EB 含量影响不大。PB 组大鼠左侧半球脑组织含水量和 EB 含量明显高于 C 组和 NS 组,并随时间增加,含水量和 EB 含量逐渐增多,注菌后 4 h 最高。除 PB 5 min 组含水量和 EB 含量稍高于 C 组外,其余 PB 各组均比相应时间 NS 组明显增高($P < 0.01$)。除 PB 5 min 组外,PB 组大鼠左侧半球含水量和 EB 含量均较右侧高($P < 0.01$),显示向左颈总动脉注射百日咳菌液主要导致左大脑半球脑水肿,见表 1。同时将 PB 各组脑含水量与 EB 含量进行直线相关分析。发现自注菌后 60 min 开始,即 PB 60 min 组、PB 120 min 组和 PB 240 min 组的含水量与 EB 含水量有高度相关性,其相关系数及 P 值分别为: $r = 0.796$, $P < 0.05$; $r = 0.768$, $P < 0.05$; $r = 0.93$, $P < 0.01$ 。

表 1 大鼠脑组织含水量、EB 含量改变 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

分组	WC (%)		EB 含量(μg/g 脑组织)	
	左侧	右侧	左侧	右侧
C 组	78.4±0.4	78.5±0.6	1.2±0.3	1.2±0.2
NS 组				
5 min	78.8±0.8	78.5±0.6	1.3±0.3	1.3±0.2
30 min	78.8±0.7	78.5±0.7	1.4±0.3	1.4±0.4
60 min	78.6±0.6	78.7±0.7	1.4±0.4	1.4±0.5
120 min	78.7±0.8	78.6±0.4	1.4±0.3	1.4±0.4
240 min	78.6±0.3	78.8±0.5	1.5±0.4	1.5±0.2
PB 组				
5 min	78.9±0.6	78.4±0.2	1.6±0.2	1.3±0.3
30 min	79.7±0.5 ^{a,c}	78.8±0.4 ^a	2.4±0.3 ^{b,c}	1.5±0.2 ^a
60 min	81.0±0.9 ^{b,c}	79.1±0.9 ^d	2.9±0.4 ^{b,c}	1.5±0.3 ^d
120 min	81.1±0.8 ^{b,c}	78.9±0.9 ^d	3.1±0.2 ^{b,c}	1.4±0.4 ^d
240 min	82.2±0.3 ^{b,c}	79.6±0.9 ^{a,c,d}	4.4±0.4 ^{b,c}	1.7±0.5 ^d
PB 组内比较 F 值	21.86 ^e	2.03 ^f	63.23 ^e	1.75

注:与相应时间 NS 组比较 a $P < 0.05$; b $P < 0.01$; c 与 C 组比较 $P < 0.01$; d 与同组左侧半球脑组织比较 $P < 0.01$; PB 组不同时间比较 e $P < 0.01$, f $P < 0.05$

2.3 左侧干脑组织钠、钾离子含量的测定

C 组和 NS 各组干脑组织钠离子和钾离子变化不显著($P > 0.05$)。PB 各组钠离子含量显著增

高,除 PB 5 min 外,其余各 PB 组钠离子含量明显高于 C 组及相应时间的 NS 组($P < 0.01$)。PB 组钾离子含量改变不如钠离子明显,除 PB 240 min 组

钾离子含量明显高于 C 组及相应时间 NS 组外 ($P < 0.01$), 其他各组与 C 组和相应时间 NS 组比较, 差异均无显著性。见表 2。

表 2 各组大鼠左侧脑组织钠、钾离子含量 ($\bar{x} \pm s$)			
		钠离子	钾离子
C 组		191.0 $\pm$ 3.7	453.3 $\pm$ 12
NS 组	5 min	190.6 $\pm$ 3.9	450.9 $\pm$ 32.4
	30 min	194.8 $\pm$ 5.5	451.0 $\pm$ 30.7
	60 min	191.4 $\pm$ 4.5	461.7 $\pm$ 17.8
	120 min	192.7 $\pm$ 5.5	447.2 $\pm$ 16.0
	240 min	194.0 $\pm$ 7.0	446.7 $\pm$ 11.1
PB 组注菌后	5 min	196.2 $\pm$ 13.6	464.9 $\pm$ 30.9
	30 min	208.3 $\pm$ 13.9 ^{a,c}	461.3 $\pm$ 25.2
	60 min	235.0 $\pm$ 24.7 ^{b,c}	440.6 $\pm$ 23.0
	120 min	240.2 $\pm$ 25.0 ^{b,c}	441.8 $\pm$ 30.4
	240 min	277.0 $\pm$ 18.6 ^{b,c}	358.4 $\pm$ 25.1 ^{b,c}
总比较 F 值		25.27 ^d	5.96 ^d

注:与相应时间 NS 组比较 a $P < 0.05$; b $P < 0.01$; c 与 C 组比较 $P < 0.01$; PB 组间 d 阶段间总比较 $P < 0.01$

2.4 脑组织肉眼改变

C 组、NS 组和 PB 5 min 组大鼠两侧大脑半球表面无异常改变。PB 30 min 组大鼠左大脑半球表面轻度水肿,充血和范围较小的蓝染;PB 60 min 和 PB 120

min 组大鼠左半球表面水肿,脑体积增大,血管充血,伊文思蓝的蓝染区呈灶性,分布不均,主要见于大脑半球的后部及中线附近。PB 240 min 组大鼠左半球脑组织明显肿胀,脑回增宽变平,脑沟变浅,脑膜紧张,血管明显充血,脑组织表面几乎全部蓝染。PB 30 min 组、PB 60 min 组、PB 120 min 组和 PB 240 min 组大鼠右半球脑组织表面无明显改变。

2.5 电镜观察

NS 对照组神经细胞和胶质细胞结构正常。PB 5 min 组海马神经元胞体的超微结构形态基本正常,仅少部分胶质细胞线粒体肿胀;PB 30 min 组:神经元胞体粗面内质网轻度扩张,部分线粒体水肿,神经细胞之间间隙增宽,部分胶质细胞肿胀明显,毛细血管周胶质泡肿胀明显。PB 60 min 组:神经胞体粗面内质网扩张,线粒体肿胀,毛细血管周部分胶质细胞出现空泡化改变。PB 120 min 组:神经元胞体电子密度增高,部分细胞呈暗细胞改变,部分细胞呈明细胞改变,神经元胞体周围出现大量空泡结构,胶质细胞核周间隙明显增宽.细胞膜破裂,毛细血管周出现空泡化。PB 240 min 组:胶质细胞肿胀明显的细胞膜破裂,融合成大片水肿区域,神经元细胞皱缩,粗面内质网扩张,线粒体肿胀,细胞内有空泡样改变,毛细血管基底膜有断裂,毛细血管内皮细胞内吞饮小泡大量增加,部分聚集成葡萄状。见图 1~6。

- 图 1 NS 组海马神经元胞体结构正常(电镜,×3 000)
- 图 2 PB 5 min 脑组织:胶质细胞足突轻度水肿(电镜,×3 500)
- 图 3 PB 30 min 脑组织:线粒体水肿,部分胶质细胞肿胀明显(电镜,×5 000)
- 图 4 PB 60 min 脑组织:粗面内质网扩张,胶质细胞出现空泡化(电镜,×3 000)
- 图 5 PB 120 min 脑组织:神经元胞体周围出现大量空泡结构,部分细胞呈暗细胞改变(电镜,×3 000)

图 6 PB 240 min 脑组织:毛细血管周空泡化,毛细血管内皮细胞内吞饮小泡大量增加,部分聚集成葡萄状(电镜,×4 000)

3 讨论

脑水肿是指脑组织细胞外或细胞内水分增多,导致脑体积与重量增加。根据其发病机制与病理改变,可将脑水肿分为血管源性和细胞毒性两大类,前者主要是血脑屏障受损,脑毛细血管通透性增加,血浆蛋白与水分外溢,细胞外间隙组织液增加。后者主要是由于细胞膜改变,造成细胞内钠和水潴留而肿胀。一般认为感脑属混合性脑水肿。

脑组织水分含量是反映脑水肿的主要指标之一,脑含水量的高低直接反映脑水肿的严重程度。同时也可反映脑细胞的损伤程度。本实验 C 组和 NS 各组脑含水量较稳定($P>0.05$)。除 PB 5 min 组外,其余 PB 组脑含水量显著高于 C 组及 NS 组($P<0.01$),并随注菌后观察时间延长,脑含水量逐渐增多,至 240 min 达高峰。说明已成功建立了大鼠感脑模型,且随着注菌后时间延长,脑水肿程度相应加重。钠钾离子含量测定是反应脑水肿的次要指标之一。细胞毒性脑水肿时,钠离子由细胞外涌入细胞内,水分子随着钠离子一起进入细胞内;钾离子则由细胞内漏出到细胞外,随血循环外流。本实验发现注菌后 30 min 脑组织钠离子增多,随注菌后时间增加,钠离子随之增加,与相应时间 NS 组比较,差异有非常显著性,显示本模型有细胞毒性脑水肿存在。但钾离子仅表现为注菌后 240 min 才明显减少,说明钾离子改变不如钠离子灵敏快速,与我科原来报道基本相符^[5,6]。

EB 是血脑屏障受损和血管通透性增高的常用指示剂,正常大鼠静脉注射 EB 后由于血脑屏障的屏障作用使脑组织不被蓝染,当血脑屏障受损后,注入 EB 可使脑组织蓝染,说明有血管源性脑水肿的存在。甲酰胺浸泡法可定量测定脑组织 EB 含量,其含量的多少反映血脑屏障的损伤程度。此法简单,结果稳定^[7]。本实验结果显示,PB 5 min 组 EB 含量开始增高,随注菌后观察时间的延长,EB 含量逐渐增高,240 min 达高峰,与相应时间 NS 组比较,差异有非常显著性,表明在注菌后 240 min 内,血脑屏障的受损程度随时间延长而加重。此外,PB 60 min 组,120 min 组,240 min 组脑含水量和 EB 含量有高度相关性,说明脑水肿与血脑屏障的损伤程度密切相关。本研究还发现 PB 组大鼠右侧大脑半球的脑含水量,EB 含量和钠钾离子改变不明显,显示

向左颈总动脉注射 PB 主要是导致左半球的脑水肿,对右侧影响不大。

形态学改变是判断脑水肿的主要标准之一。本实验发现注菌 5 min 后,电镜可见部分胶质细胞轻微肿胀,以后随注菌后观察时间的延长,毛细血管周出现空泡变性,内皮细胞线粒体肿胀,细胞呈锯齿状改变,胶质细胞空泡化。同时出现神经元胞体线粒体肿胀,空泡化,嵴断裂,细胞核固缩变性。上述改变显示 PB 所致的感脑为混合性脑水肿。电镜还发现 PB 120 min 组,部分神经细胞呈暗细胞改变,其改变类似于细胞凋亡所致的细胞改变。一般认为细胞凋亡与迟发性神经元损伤密切相关。本研究室已证实百日咳菌液脑水肿后 24h 有较多的神经元细胞出现迟发性损伤,可能是凋亡所致。但 Li 等^[8]在大鼠大脑中动脉阻塞 2h 后进行再灌注 30 min 后就可能出现凋亡细胞。因此,PB 120 min 组出现凋亡样的改变,其意义值得进一步探讨。

综合以上指标,说明大鼠百日咳菌液脑水肿模型系一混合性弥漫性脑水肿,其病理性质类似于临床感染性脑水肿改变,在病因学上也与临床较接近,是一适合于感脑研究的动物模型。240 min 以后的脑水肿如何,有待进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Yang GY, Zhao YJ, Davidson BL, Betz AL. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain ischemic brain injury [J]. Brain Res, 1997, 751(2): 181-188.

[2] 王中,周岱. 大鼠蛛网膜下腔出血后脑组织兴奋性氨基酸及 Ca^{2+} 变化 [J]. 中华实验外科杂志,1996, 13(3): 97-98.

[3] 虞佩兰,周佩芳,杨于嘉,沈菊英,聂爱心,许雪娥,等. 伤寒内毒素导致兔脑水肿模型 [J]. 湖南医学院学报,1983, 8(2): 353-355.

[4] 陈翔,杨于嘉,陶永光. 百日咳菌液诱导大鼠急性感染性脑水肿模型 [J]. 湖南医科大学学报,1996, 21(3): 214-216.

[5] 尹飞,虞佩兰. 实验性感染性脑水肿的研究 [A]. 见:虞佩兰,杨于嘉. 小儿脑水肿与颅内高压 [M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版,1999, 353-368.

[6] 尹飞,杨于嘉,虞佩兰,毛定安,陶永光. 大鼠百日咳菌液脑水肿脑组织肿瘤坏死因子- α 变化 [J]. 中国当代儿科杂志,2000, 2(2): 82-85.

[7] 周永刚,杨于嘉,虞佩兰,陈建良,刘运生,罗正曜. 大鼠脑冷冻伤所致脑水肿的时间过程 [J]. 湖南医科大学学报,1992, 17(3): 295-296.

[8] 赵士福,蔡文. 神经缺血性损伤中的细胞程序性死亡 [J]. 国外医学脑血管病分册,1996, 4(3): 169-172.

(本文编辑:吉耕中)