

· 基础研究 ·

脑瘫仔兔黑质-纹状体系神经元数量及超微结构研究

李晓捷 杨影 姜志梅 李林 高晶

【摘要】目的 观察高胆红素血症致脑瘫动物模型黑质-纹状体系多巴胺能神经元数量及超微结构的变化,为深入研究手足徐动型脑瘫的神经病理学机制奠定基础,也为临床用药和早期康复提供依据。方法 生后 2~5 日龄仔兔 30 只,随机分为对照组 10 只和模型组 20 只。模型组给予腹腔分次注射胆红素,总量为 300 mg/kg 体重;对照组给予腹腔注射同等剂量的生理盐水。注射后 2 组仔兔均母乳喂养至 45 d。将鉴定为脑瘫模型的仔兔和对照组仔兔均处死,TH 染色进行神经元定量分析及超微结构观察。结果 ①模型组黑质及纹状体神经元超微结构较对照组有明显改变;②模型组黑质及纹状体 TH 阳性神经元数明显少于对照组 ($P < 0.01$)。结论 脑瘫仔兔黑质及纹状体超微结构明显改变,黑质-纹状体系多巴胺能神经元损伤,神经元数量减少。

【关键词】 脑性瘫痪; 黑质-纹状体系; 多巴胺能神经元; 超微结构

Study of quantity of neuron and ultrastructure in nigra-striatum of cerebral palsied newborn rabbits LI Xiao-jie, YANG Ying, JIANG Zhi-mei, LI Lin, GAO Jing. Faculty of Rehabilitation Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154002, China

【Abstract】 Objective To explore the quantity and ultrastructure of dopaminum (DA) neuron in nigra-striatum, pathological basis of the successful animal model of cerebral palsy (CP) by hyperbilirubinemia, to provide the evidence for clinical therapy and rehabilitation. Methods Thirty homozygous newborn rabbits (2~5 d) were randomly divided into 2 groups; a control group ($n=10$) and a model group ($n=20$). The rabbits in the control group were administrated bilirubin intraperitoneally, with a total dose of 300 mg/kg, while those in the model group were administrated with saline at the same dose. All the animals were fed well for 45 days until they were sacrificed for observation of the ultrastructure of brain tissue and quantification of DA neurons. Results The ultrastructure of nigra-striatum of the control group demonstrated significant changes; The quantity of nigra-striatum DA neurons of the control group decreased. Conclusion The ultrastructure of nigra-striatum of the control group has had obviously changes. The nigra-striatum DA neuron of CP rabbits was impaired and the quantity of nigra-striatum DA neuron of CP rabbits was reduced.

【Key words】 Cerebral palsy; Nigra-Striatum; DA neuron; Ultrastructure

脑性瘫痪 (cerebral palsy, CP) 简称脑瘫,是出生前至出生后脑发育阶段由各种原因所致的非进行性脑损伤综合征,主要表现为中枢性运动障碍及姿势异常^[1]。我国临床分为 8 种类型,其中手足徐动型 CP 的主要病因是胆红素脑病。本课题在制备高胆红素血症致 CP 动物模型的基础上,观察黑质-纹状体系多巴胺能神经元数量及超微结构变化,研究胆红素对黑质-纹状体系多巴胺能神经元的毒性作用,探讨高胆红素血症致 CP 动物模型的黑质-纹状体系统特征性变化,为深入研究手足徐动型 CP 的神经病理学机制奠定基础,也为临床用药和早期康复提供理论依据。

材料与方法

一、材料与试剂

基金项目:黑龙江省人事厅留学归国人员择优资助项目(黑人函[2001]336)

作者单位:154002 佳木斯,佳木斯大学康复医学院,黑龙江省小儿脑性瘫痪防治疗育中心

胆红素和酪氨酸羟化酶 (TH) 抗体均购自美国 Sigma 公司;免疫组化染色全套试剂盒购自北京中山生物技术有限公司;实验所用其他试剂均由佳木斯大学相关实验室提供。

二、仪器

上海产电子天平,日产 JEM-2000EX 透射电镜、BH-2 型 Olympus 显微镜,成都产 Bi2000 图像分析系统,美国产 HP1100 高效液相色谱分析仪。

三、方法

(一) 实验动物与分组

2~5 日龄纯系日产大耳白仔兔 30 只,体重约 50 g,雌雄不拘,由白求恩医科大学实验动物中心提供。将实验动物随机分为 2 组:对照组 10 只,模型组 20 只。

(二) 模型制备

采用改良的孙叶强方法^[2]制备模型。

胆红素溶液的制备:避光称取晶体胆红素 20 mg,溶于 1 ml 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中,加入双蒸水 9 ml,用 0.5 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 8.5,在 1 h 内使用。

动物给药:模型组给予腹腔注射胆红素,每次 100 mg/kg 体重,隔日注射 1 次,共 3 次,总量为 300 mg/kg 体重;对照组给予腹腔注射同等剂量的生理盐水,隔日注射 1 次,共 3 次。注射后 2 组仔兔均恒温、恒湿、母乳喂养至 45 d。

(三) CP 模型鉴定标准

1. 神经学行为学检查:脑瘫兔必须同时具备下述前 3 项,伴有或不伴有第 4 项。(1)随意运动障碍(具备下列任何一项表现):①反应迟钝;②自主动作减少;③运动速度减慢;④运动灵活性降低;⑤运动稳定性降低。(2)姿势异常(具备下列任何一项表现):①具有运动模式异常;②静止时姿势异常;③不能站立。(3)肌张力异常(具备下列任何一项表现):①增强;②减低;③游走性增强及减低。(4)有不自主动作(具备下列任何一项表现):①震颤;②舞蹈动作;③抽搐;④手足徐动;⑤痉挛性扭转;⑥痉挛性斜颈。

2. 倾斜板实验:脑瘫兔倾斜板实验必须有一项是阳性。(1)把仔兔放在倾斜 15°的平板上,每秒钟抬高 10°,至 60°以上不下滑者(停留超过 1 min)为阴性。(2)把仔兔放在倾斜 75°的平板上,不下滑者(停留超过 1 min)为阴性。

(四) 标本采集与指标观察

1. 神经元数量观察:将对照组及模型组 CP 仔兔处死,冰盘上迅速取脑,用 10% 中性多聚甲醛固定,置于 4℃ 冰箱中,按抗生物素-生物素法(S-P 法)TH 免疫组化染色,光镜下观察。计算机计数系统进行细胞计数,计数神经元时以能见到清晰核仁为标准。

2. 超微结构观察:分别取模型组与对照组黑质与纹状体组织各 1 mm³,放入含有 2.5% 戊二醛缓冲液中固定,4℃ 冰箱保存。将标本修块后固定于 1% 的锇酸,丙酮脱水,Embed 812 包埋,烘干,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铝染色,电镜下观察摄片。

3. 脑组织胆红素测定:将模型组脑组织称重后,置于醋酸氯仿(1:4)混合液中,打成匀浆后离心,抽提上清液,用高效液相色谱仪测定脑组织中胆红素浓度。

四、统计学分析

实验数据采用 STAT-3 软件进行 *t* 检验及直线回归与相关分析。

结 果

一、模型鉴定结果

每次给药后模型组仔兔均表现尖叫、易激惹、全身震颤,行动迟缓,两后肢屈蹲,前肢向前伸展,进水和饮食困难。随着给药次数的增加症状逐渐加重。45 d 后,与对照组相比,模型组出现不同程度的肌张力与姿势改

变、运动障碍,不自主动作及自主动作的改变。模型组仔兔有 6 只死亡,经神经行为学检查及倾斜板实验鉴定,非 CP 兔 4 只,CP 兔 10 只;对照组无死亡,无 CP 兔。

二、脑组织胆红素浓度

模型组与对照组脑组织胆红素浓度分别为(59.9 ± 17.04) μg/ml 和(42.79 ± 3.57) μg/ml,模型组脑组织胆红素浓度明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

三、黑质与纹状体 TH 阳性神经元数

以每高倍镜视野下 0.15 mm × 0.15 mm 面积计数。模型组黑质 TH 阳性神经元数量明显少于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);模型组纹状体 TH 阳性神经元数量明显少于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),详见表 1。

表 1 2 组黑质和纹状体 TH 阳性神经元数(个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	黑质		纹状体	
		TH 阴性	TH 阳性	TH 阴性	TH 阳性
对照组	10	30.9 ± 9.5	45.2 ± 12.7	38.4 ± 6.2	11.0 ± 2.5
模型组	10	26.0 ± 11.8	30.3 ± 9.6*	32.1 ± 8.1	4.7 ± 2.8*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

四、脑组织胆红素浓度与黑质及纹状体 TH 阳性神经元数间的相关与回归分析

脑组织胆红素浓度与黑质 TH 阳性神经元数呈负相关,相关系数为 $r = -0.69$,回归方程为 $\hat{y} = 70.70 - 0.64\bar{x}$ 。

脑组织胆红素浓度与纹状体 TH 阳性神经元数呈负相关,相关系数为 $r = -0.59$,回归方程为 $\hat{y} = 16.8 - 0.16\bar{x}$ 。

五、黑质与纹状体 TH 阳性神经元数相关与回归分析

黑质与纹状体 TH 阳性神经元数呈正相关,相关系数为 $r = 0.77$,回归方程为 $\hat{y} = 2.86 + 0.13\bar{x}$ 。

六、脑组织结构改变

在光镜下,与对照组比较,模型组 HE 染色可见黑质与纹状体神经元数均减少,细胞体积变小,可见胶质细胞增生,胶质结节形成;TH 染色可见黑质与纹状体 TH 阳性神经元数均明显减少,核染色质稀疏。

在电镜下,脑瘫仔兔黑质及纹状体神经细胞膜断裂、破碎,核膜断裂;细胞核体积缩小,核染色质浓缩,胞核固缩、裂解、碎裂,甚至消失;线粒体基质变淡,嵴脱失、变形,偶可见溶酶体增多,部分线粒体还有空泡变性(图 1)。高尔基氏体肿胀、扩张,有絮状物沉积;内质网扩张、水肿,空泡形成,糖原颗粒消失(图 2);偶见细胞核周附有红细胞,且核周可见有多聚核蛋白体沉积。对照组染色质分布均匀,线粒体结构完整,膜双层结构清晰,线粒体嵴排列规整,嵴间腔清晰可见。

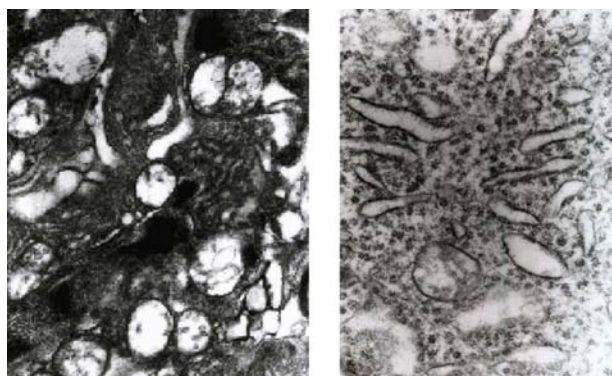


图1 黑质的线粒体肿胀,嵴脱 图2 纹状体的内质网扩张、水肿,空泡变性(HE ×20)

讨 论

胆红素脑病是致小儿手足徐动型 CP 的主要病因。由于新生仔兔肝脏酶系不完善,血脑屏障功能不健全,腹腔注射胆红素通过肠系膜静脉进入血液,可致新生仔兔胆红素脑病,进而形成 CP 动物模型。本实验结果模型组脑组织胆红素浓度明显高于对照组。临床上小儿 CP 的诊断主要依据高危因素、肌张力改变及神经行为学异常^[3]。本实验依据上述原则,采用神经行为学检查及倾斜板实验鉴定的 CP 兔,与临床上手足徐动型 CP 表现相似,与以往实验结果一致^[4,6]。

关于未成熟脑病理及超微结构改变的研究发现,其变化与成熟脑有很多不同之处。CP 脑组织损伤表现^[7]:双侧大脑皮质的边缘有对称性分布的硬化和神经元脱失(脑回瘢痕);脑白质的弥漫性硬化(胶质增生);纹状体和丘脑的神经元脱失,胶质增生和髓鞘过度生长。实验表明^[8]:新生儿胆红素脑病急性期脑组织病理改变主要是丘脑下核、苍白球、海马、动眼神经核等明显黄染,有的病例也累及间脑、脊髓前角及小脑;光镜下神经细胞变性坏死。在急性期过后出现 CP 的病例首先发生丘脑下核及苍白球的病变,这些部位的神经细胞显著减少,脊髓神经纤维显著减少,星状胶质细胞增生肥大、纤维形成等。本实验结果与上述人类改变有相似之处。光镜下可见 CP 兔黑质及纹状体神经细胞减少,TH 阳性细胞显著减少,少量胶质细胞增生,胶质结节形成。电镜下观察黑质及纹状体神经细胞肿胀,核膜消失或断裂,核固缩、裂解或消失,细胞的能源地——线粒体损伤明显,高尔基氏体、内质网改变以及偶见细胞核周附有红细胞,提示有出血倾向等。上述形态学改变表明,胆红素神经毒性致使 CP 兔黑质及纹状体神经细胞严重损伤。

锥体外系的主要生理功能是调节人体的姿势和肌张力,协调肌肉运动及协助随意运动的完成等。纹状体不同部位损伤,可以产生肌张力的变化和一系列不

自主运动,表现为运动减少而肌张力增高,也可以表现为运动过多而肌张力低下,临床上手足徐动型 CP 的表现就是多种多样的。黑质是大脑皮质直接或间接地通过纹状体与网状结构发生联系的中间站,黑质致密带细胞合成的多巴胺(dopamine, DA)是锥体外系黑质-纹状体通路中一种重要递质。TH 是 DA 合成的限速酶,TH 免疫组化法常被用于显示 DA 能神经元胞体及突起。目前大多应用免疫组化方法的 TH 免疫反应阳性细胞观察 DA 能神经元,研究锥体外系疾病。本实验通过对黑质-纹状体体系神经元及 TH 阳性神经元定量观察显示,胆红素作为一种神经毒素,可致 CP 兔黑质及纹状体神经细胞不可逆性损伤^[9]。模型组黑质及纹状体 TH 阳性神经元数量明显少于对照组,说明黑质及纹状体 DA 能神经元受损。但目前对胆红素神经细胞毒性机制仍不清。本实验黑质及纹状体 TH 阳性神经元数量与脑组织胆红素浓度呈负相关,说明胆红素浓度越高,其神经毒性作用越强。黑质与纹状体 TH 阳性神经元数呈正相关,提示黑质与纹状体 DA 能神经元受损程度呈正相关。对新生 Gunn 大鼠脑部电镜观察表明^[10]:线粒体改变是胆红素对神经细胞毒性作用的早期改变之一。Rodrigues 等^[11,12]用未结合胆红素(UCB)诱导神经元和胶质细胞凋亡的同时,发现胆红素诱导细胞膜和线粒体膜通透性增加。线粒体是细胞内的“能量工厂”^[13],线粒体的形态结构损伤,将使产能过程障碍,细胞最终死亡。因此推测 CP 兔黑质及纹状体神经元损伤、死亡与此有关。

黑质 DA 能神经元及其纤维末梢损伤,使黑质的 DA 合成及向纹状体神经元的正常运送受到破坏,从而减弱了 DA 对纹状体神经元的营养功能,致使纹状体神经元数目减少,纹状体萎缩。黑质与纹状体在形态和结构上是密切相关的整体,二者之间有往返纤维联系和局部位关系。黑质 DA 神经元的损伤坏死,导致纹状体内 DA 减少,使新纹状体对苍白球的抑制作用减弱,苍白球作用亢进,间接通过网状脊髓束和红核脊髓束造成肌张力变化。有研究表明^[14],胆红素可以使神经末梢突触膜去极化反应减弱,DA 合成与释放和对酪氨酸摄取减少,进而导致黑质 DA 含量减少,新纹状体内 DA 缺乏。以往研究还发现 CP 兔脑内 5-羟色胺、去甲肾上腺素水平降低。这些改变均可引起脑内神经递质失衡,导致肌张力障碍。CP 兔出现的肌张力变化、姿势异常、运动障碍及各种形式的不自主运动与上述损伤有关。提示多巴胺类药物可缓解手足徐动型 CP 患儿的肌张力异常及运动障碍。

参 考 文 献

- 1 陈秀洁,李晓捷. 小儿脑性瘫痪的神经发育学治疗法. 郑州:河南

- 科学技术出版社, 2004. 1-3.
- 2 孙叶强, 李晓捷, 吴军, 等. 胆红素致新生兔脑瘫动物模型的实验研究. 中国康复, 1999, 14: 65-67.
 - 3 李树春. 小儿脑性瘫痪. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000. 39-54.
 - 4 李晓捷, 唐伟, 李艳秋, 等. 脑瘫兔血清及脑组织中神经元特异性烯醇化酶含量的研究. 中国康复, 2003, 71: 129-131.
 - 5 李晓捷, 唐伟, 姜志梅, 等. 脑瘫兔血清及脑组织中髓鞘碱性蛋白含量的研究. 中国康复, 2003, 72: 201-203.
 - 6 李晓捷, 李艳秋, 姜志梅. 等. 脑性瘫痪兔脑组织单胺类神经递质的实验研究. 实用儿科临床杂志, 2003, 108: 818-820.
 - 7 任绍玲. 小儿脑性瘫痪的研究进展. 中国妇幼保健, 2001, 16: 62-63.
 - 8 森松义雄, 筱原猛, 白木博次. 重症心身障害の病理・特征周产期. 出生后障害. 神经研究の进步, 1997, 19: 291-310.
 - 9 Sliva RFM, Rodrigues CMP, Brites D. Rat cultured neuronal and glial cells respond differently to toxicity of unconjugated bilirubin. Pediatr Res, 2002, 51: 535-541.
 - 10 Rodrigues CMP, Sola S, Brites D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. Hepatology, 2002, 35: 1277-1280.
 - 11 Rodrigues CMP, Susana S, Castro RE, et al. Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis. J Lipid Res, 2002, 43: 885-894.
 - 12 Rodrigues CM, Sola S, Brito MA, et al. Bilirubin directly disrupts membrane lipid polarity and fluidity, protein order, and redox status in rat mitochondria. J Hepatol, 2002, 36: 335-341.
 - 13 韩燕. 帕金森病与线粒体功能异常. 国外医学神经病学外科分册, 1999, 26: 247-250.
 - 14 李晓捷, 朴文花, 李林, 等. 胆红素脑病兔黑质-纹状体系神经元计数及超微结构的研究. 中国康复理论与实践, 2003, 5: 261-262.

(修回日期: 2005-01-27)

(本文编辑: 熊芝兰)

· 短篇论著 ·

微波治疗急性肺炎临床疗效观察

崔月霞

随着技术的发展, 微波在临床中的应用越来越广泛。我科采用微波及头孢唑啉(抗菌素)联合治疗急性肺炎患者, 发现临床疗效满意, 治疗时间缩短。现将治疗过程及结果报道如下。

一、资料与方法

共选取 60 例院外感染的急性肺炎患者(剔除获得性肺炎患者), 其中男 32 例, 女 28 例, 年龄 14 ~ 78 岁, 均符合第五版《内科学》^[1]关于肺炎的诊断要点。患者均有不同程度的发热、咳嗽、咳痰、胸痛等症状, 肺部听诊可发现呼吸音减弱、干湿性啰音, 胸片提示肺叶、肺段有斑片状或实变影, 患者病情均为轻、中度, 未发现有呼吸困难、低氧血症等情况存在。将上述患者随机分为治疗组(30 例)及对照组(30 例), 2 组年龄、性别、病情等差异均无统计学意义, 具有可比性。

上述患者均给予静脉滴注头孢唑啉治疗, 每 12 小时 1 次每次 3.0 g; 治疗组同时给予微波透热治疗, 采用 Go Giken 多功能微波仪, 取直径 18 cm 的圆型辐射器辐射患侧部位(辐射器距胸部 6 ~ 10 cm), 设定频率为 434 MHz, 波长为 1 ~ 10 cm, 强度为 40 W, 每天辐射 2 次, 每次 12 min, 10 d 为 1 个疗程。

疗效判定标准: 治愈——咳嗽、咳痰症状消失, 肺部啰音消失, X 线片提示炎症基本吸收; 未愈——咳嗽、咳痰症状无明显减轻, 肺部啰音无显著改善, X 线片提示肺部渗出影无明显吸收。统计学方法采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

二、结果

2 组患者分别于治疗 20 d 后进行疗效评定, 发现治疗组治愈 30 例, 无未愈病例, 而对照组治愈 21 例, 未愈 9 例, 经统计学分析, 2 组疗效差异有统计学意义($P < 0.01$); 其中治疗组平均治疗天数为(10.8 ± 1.8) d, 对照组为(15.6 ± 2.5) d, 经统计

学分析, 2 组差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

三、讨论

临床上常规采用抗菌素治疗感染类疾病已有多数, 但同时存在抗菌素滥用、过用等现象, 并由此增加了细菌产生耐药的机会以及机体不良反应的发生率^[2]。本研究通过不同方法治疗急性肺炎患者, 发现治疗组治愈率为 100%, 平均治疗天数为(10.8 ± 1.8) d, 均明显优于对照组, 提示微波与头孢唑啉联合治疗急性肺炎的疗效明显优于单纯应用头孢唑啉治疗, 且前者还能显著缩短疗程。相关研究发现, 在低功率微波辐射作用下, 可使机体致炎介质含量降低, 微血管通透性下降, 从而抑制炎症发展; 微波还可以抑制细菌及其它致病微生物的 DNA、RNA 及蛋白质合成^[3,4]; 此外微波的非热效应还可通过电磁场影响机体组织的分子结构, 使局部组织能量瞬间增大, 亦能起到杀灭细菌、病毒的作用。

综上所述, 微波联合抗菌药治疗急性肺炎, 具有疗效显著、安全无创、操作简便、费用低廉等优点^[4], 对解决目前临床上普遍存在的细菌耐药性问题具有一定意义, 同时也节省了药品资源; 治疗组 30 例患者在治疗中及治疗后均未发现明显不良反应, 但该联合疗法禁用于高热急性肺炎患者。

参 考 文 献

- 1 叶任高, 主编. 内科学. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 62-78.
- 2 戴自英. 合理使用抗菌药物. 感染性疾病新动态, 2001, 6: 133.
- 3 雷建平. 呼吸系统疾病的微波治疗. 江西医药, 2004, 39: 221-224.
- 4 胡庆梅, 朱义杰, 马继龙, 等. 微波治疗毛细支气管炎患者 62 例疗效观察. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 471.

(收稿日期: 2004-12-20)

(本文编辑: 易 浩)