

. 实验研究 .

# 大鼠轻型颅脑损伤后星形胶质细胞与神经元的病理改变

林 靖 张 炜 郑小强 程宏伟 高瑞庭 宋朝理

**【摘要】目的** 探讨轻型颅脑损伤(TBI)后神经元及星形胶质细胞改变的病理生理过程。**方法** 将24只成年SD大鼠随机分为轻型TBI组(n=18)和假手术组(n=6),轻型TBI组又分为伤后3 h(n=6)、伤后24 h(n=6)、伤后72 h(n=6)三亚组。采用液压冲击法制作轻型TBI模型。采用胶质纤维酸性蛋白(GFAP)染色检测星形胶质细胞,采用Fluoro-Jade B(FJ-B)荧光染色检测变性神经元。**结果** 与假手术组相比,轻型TBI后3 h、24 h、72 h邻近顶叶皮质、海马CA2/3区GFAP阳性细胞数量均明显减少( $P<0.05$ );缺失区周围星形胶质细胞肿胀增生明显。FJ-B阳性神经元在损伤后3 h无明显增加( $P>0.05$ ),伤后24 h皮层区FJ-B阳性神经元显著增加( $P<0.05$ ),伤后72 h海马区FJ-B阳性神经元显著增加( $P<0.05$ )。伤后72 h伤侧皮层区与海马区GFAP阳性细胞数和FJ-B阳性细胞数呈显著负相关( $r=-0.8285, P<0.05$ )。**结论** 轻型TBI后星形胶质细胞超急性期(3 h)即出现损害和胶质反应,神经元则在急性期(24 h)至亚急性期(72 h)出现明显损害,星形胶质细胞缺失程度可以反应神经元损伤程度。

**【关键词】** 轻型颅脑损伤;胶质反应;神经元变性;大鼠

**【文章编号】** 1009-153X(2018)04-0246-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1\*5

## Pathological changes in astrocytes and neurons after mild traumatic brain injury in rats

LIN Jing, ZHANG Wei, ZHENG Xiao-qiang, CHENG Hong-wei, GAO Rui-ting, SONG Chao-li. Department of Neurosurgery, The 452nd Hospital, Western Air Force, Chengdu 610021, China

**【Abstract】 Objective** To study the pathological changes in astrocytes and neurons in the rats with mild traumatic brain injury (TBI). **Methods** Twenty four adult SD rats were randomly divided into 4 groups of 6 animals each, i.e. sham operation group and 3, 24 and 72 hours after injury groups. Parasagittal fluid percussion was performed to produce mild TBI in all the groups except the sham operation group. Brain sections were stained with both glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry and Fluoro-Jade B (FJ-B) histofluorescence in order to observe pathological changes in astrocytes and neurons, respectively. **Results** The number of astrocytes was significantly reduced in the parietal cortex and hippocampus CA2 and CA3 3, 24 and 72 hours after mild TBI and around them there were hyperplasia of glial cells compared with the sham operation group ( $P<0.05$ ). FJ-B positive neurons, i.e. degenerative neurons were significantly increased in cortex and hippocampus 24 and 72 hours after the mild TBI compared with the sham operation group ( $P<0.05$ ). The number of GFAP positive astrocytes was significantly negatively correlated with the number of FJ-B positive neurons in the parietal cortex and hippocampus CA2 and CA3 72 hours after injury ( $r=-0.8285; P<0.05$ ). **Conclusions** There are astrocyte loss and astrogliosis at the ultra-acute stage (3 hours) after the mild TBI and neuronal degeneration is significant at later stage (24 hours or later) after mild TBI. Loss of astrocytes can reflect neuronal injury.

**【Key words】** Mild traumatic brain injury; Astrogliosis; Neuronal degeneration; Rat

流行病学调查显示,我国颅脑损伤(traumatic brain injury, TBI)的发病率已超过100/10万人,其中60%~70%属于轻型TBI<sup>[1]</sup>。轻型TBI临床表现轻微,往往不重视,得不到及时治疗,导致远期神经功能障碍<sup>[2]</sup>。星形胶质细胞在中枢神经系统生理和病理过程中均发挥重要作用<sup>[3]</sup>。本文探讨轻型TBI后星形

胶质细胞的病理改变及其与神经元损害的关系。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物和分组 将24只雄性Sprague-Dawley大鼠(体重296~351 g)随机分为轻型TBI组(n=18)和假手术组(n=6),轻型TBI组又分为伤后3 h(n=6)、伤后24 h(n=6)、伤后72 h(n=6)三亚组。

1.2 建立轻型TBI模型 按Zhao等<sup>[4]</sup>描述方法制作轻型TBI模型。大鼠麻醉后固定头位,正中线切开皮肤至颅骨表面,在矢状缝旁开3 mm、前囟后方4.5 mm处,钻开一直径4.8 mm圆孔,暴露硬脑膜,将TBI连接管接于其上。液压冲击装置设置损伤强度

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.04.008

基金项目:四川省医学科研基金(S15005)

作者单位:610021 四川成都,西部空军第452医院神经外科(林 靖、张 炜、郑小强、程宏伟、高瑞庭、宋朝理)

通讯作者:宋朝理, E-mail: songcl1976@126.com

为~1.5 atm,通过摆锤撞击使压力传导至TBI连接管和硬脑膜形成闭合性脑损伤,每只大鼠实际压力由压力传感器记录以保证损伤强度一致。记录大鼠麻醉苏醒后恢复正常体位的翻正反射时间。假手术组只完成颅骨钻孔,不进行液压冲击。

1.3 脑组织切片 以戊巴比妥钠深度麻醉后,用300~400 ml 4%多聚甲醛灌注固定后将大脑完整取出,按4%多聚甲醛、10%蔗糖溶液、30%蔗糖溶液的顺序浸泡脱水。用冰冻切片机制45  $\mu\text{m}$ 厚冠状切片,于含叠氮化钠的24孔板中储存。

1.4 星形胶质细胞和神经元染色 星形胶质细胞采用胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)染色检测。大鼠脑组织切片以0.1 mol/L磷酸盐缓冲液清洗,在含1.5%马血清和0.3% Triton X-100磷酸盐缓冲液中孵育1 h,接着依次用GFAP单抗(鼠源,1:2 000,美国Vector lab)和二抗(马抗鼠IgG,美国Vector lab)室温孵育;最后用连接素-生物素-过氧化氢酶复合液(ABC Kit,美国Vector lab)振荡孵育,Vector SG底物显色液显色,载玻片固定。

急性神经元损伤采用Fluoro-Jade B(FJ-B)荧光染色法测定。首先将大鼠脑组织切片固定于明胶载玻片上干燥过夜,然后将玻片置于100%、75%、50%乙醇、超净水中序贯复水,接着于0.006%高锰酸钾溶液中轻微震荡摇晃15 min。最后将切片置于0.001% FJ-B(美国Histochem)和0.1%醋酸染色液中染色(30 min,避光),二甲苯浸泡后盖片。

1.5 星形胶质细胞和变性神经元定量分析 GFAP和FJ-B阳性细胞定量在倒置光学显微镜(Nikon E600)下进行。计数区域一是以海马一侧CA2-CA1分界处至另一侧CA2-齿状回分界之间的CA2/CA3区;二是包括桶状区(S1BF)、第二体感区(S2)、背侧第二听觉区(AuD)的顶叶皮层区。计数过程采用立体光学分割法,由计数软件Stereo Investigator辅助完成。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0软件分析;定量资料

以 $\bar{x}\pm s$ 表示;使用方差分析;Pearson积差相关系数分析相关性; $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 模型制作参数比较 各组大鼠的损伤强度、肛温无统计学差异( $P>0.05$ ,表1)。而轻型TBI组翻正反射时间较假手术组显著延长( $P<0.05$ ,表1)。

2.2 星形胶质细胞改变 假手术组大鼠及轻型TBI组损伤对侧海马及皮层区均未发现星形胶质细胞数量、形态改变。轻型TBI后3 h,伤侧海马CA2/CA3区以及皮层区GFAP阳性星形胶质细胞较对照明显减少( $P<0.05$ ),同时在光镜下观察到缺损区周围肿胀增生的星形胶质细胞,表现为胞体肥大,细胞突起模糊不清;伤后24、72 h星形胶质细胞数量与伤后3 h无明显差异( $P>0.05$ )。见表1、图1。

2.3 神经元变性改变 假手术组及轻型TBI组损伤对侧皮层和海马区未发现FJ-B染色的变性神经元。伤后3 h,FJ-B染色未发现伤侧皮层区变性神经元。但伤后24 h FJ-B阳性神经元明显增加( $P<0.05$ ),伤后72 h FJ-B阳性神经元进一步增加( $P<0.01$ )。见表1、图2。

2.4 相关性分析 伤后72 h伤侧皮层区与海马区GFAP阳性细胞数和FJ-B阳性细胞数呈显著负相关( $r=-0.8285$ , $P<0.05$ )。

## 3 讨论

TBI后星形胶质细胞在维持脑组织生理外环境的平衡、神经元营养、神经递质传递、毒性物质的清除等过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。在脑组织内环境因损伤发生病理变化时,星形胶质细胞可以通过多种机制发挥对神经元的保护作用<sup>[9]</sup>。因此,TBI后星形胶质细胞损伤可引起神经元二次损害和神经功能障碍。中、重型TBI后早期(24 h内)均可在海马及皮层区检测到星形胶质细胞缺失,星形胶质细胞死亡

表1 各组大鼠模型制作参数和检测指标比较

分析指标	假手术组	轻型TBI组		
		伤后3 h	伤后24 h	伤后72 h
损伤强度(atm)		1.51±0.08	1.42±0.05	1.53±0.06
损伤前肛温(°C)	37.3±0.3	37.2±0.2	37.7±0.4	37.1±0.3
损伤后肛温(°C)	37.4±0.2	37.3±0.4	37.9±0.3	37.5±0.5
翻正反射时间(分)	4.1±0.9	13.4±2.1*	9.1±1.6*	10.3±1.9*
GFAP阳性细胞(个)	100357±3760	79113±2548*	75671±3003*	76214±2389*
FJ-B阳性神经元(个)	0	0	119±13*	451±31*

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;TBI:颅脑损伤;GFAP:胶质纤维酸性蛋白;FJ-B:Fluoro-Jade B

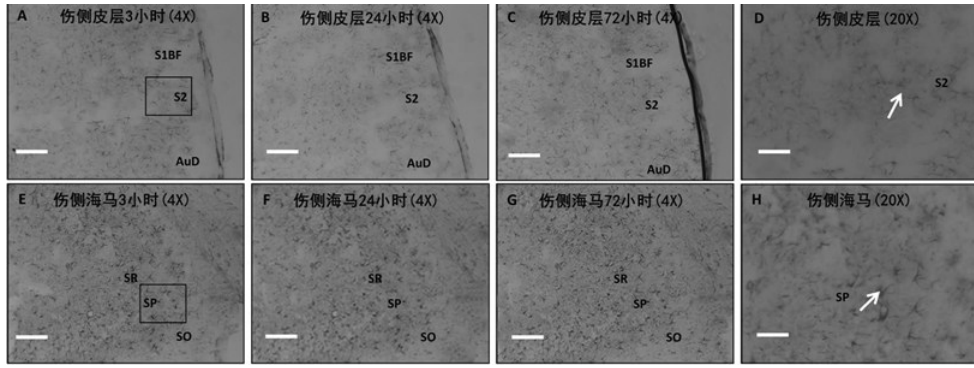


图1 大鼠轻型颅脑损伤后脑组织星形胶质细胞的改变(胶质纤维酸性蛋白染色)  
 A~C、E~G 标尺=200 μm, D、H 标尺=40 μm; 白色箭头示反应性星形胶质细胞; S1BF: 桶状区;  
 AuD: 背侧第二听觉区; S2: 第二体感区; SR: 放射层; SP: 椎体层; SO: 生发层

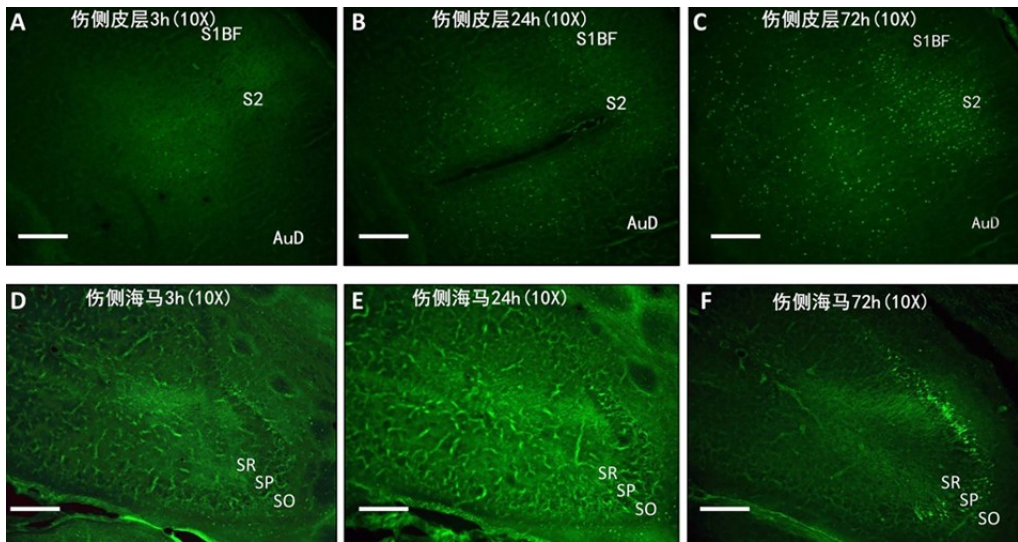


图2 轻型颅脑损伤后大鼠脑组织神经元改变(Fluoro-Jade B 荧光染色)

标尺=80 μm; S1BF: 桶状区; AuD: 背侧第二听觉区; S2: 第二体感区; SR: 生发层; SP: 椎体层; SO: 放射层

后数小时后才在相应区域检测到神经元细胞变性<sup>[4,6,7]</sup>。本研究发现,大鼠轻型TBI后3h损伤同侧皮层和海马CA2/CA3区即出现星形胶质细胞缺失并持续至伤后72h。这与上述报道的病理改变相似,但与之不同的是,轻型TBI后3h相应区域并未发现FJ-B染色的变性神经元,而是在24h后才出现神经元变性改变。我们认为,不论何种强度的TBI,脑组织首先发生星形胶质细胞的损伤,并由此引起神经元钙超载、谷氨酸聚集、星形胶质细胞-神经元间正常信号传递破坏,导致神经元继发变性。我们对损伤72h皮层及海马区星形胶质细胞总数和变性神经元数量进行相关分析发现两者呈负相关,提示星形胶质细胞对神经元存活起关键作用。

胶质反应是TBI后另一特征性病理改变,以星形胶质细胞胞质和突起肿胀及GFAP表达增加为特点<sup>[8]</sup>。在缺血和中、重型TBI模型中,伤后24h可检

测到皮层星形胶质细胞发生反应性肥大增生,这种表型发生在星形胶质细胞损伤之后<sup>[6,9]</sup>,有利于脑组织微环境的稳态维持,但也可能阻碍神经纤维的再生、修复,引起神经元继发性死亡。本研究轻型TBI后3h开始,在伤侧顶叶皮层和海马区GFAP染色缺失区周围均观察到星形胶质细胞的肿胀形态,此现象比Baldwin等<sup>[8]</sup>在中型TBI后24h观察到肿胀星形胶质细胞的时间更早。与此同时,神经元变性在伤后24h皮层以及伤后72h海马才出现。本研究结果支持胶质反应对轻型TBI的保护作用,即损伤首先造成星形胶质细胞的一次损伤,并引起周围星形胶质细胞反应性增生,这种增生伴随对损伤相关毒性产物的吸收并旨在保护神经细胞不受继发损害。

总之,本实验初步证实大鼠轻型TBI后,顶叶皮层区和海马CA2/CA3区星形胶质细胞在伤后超急性期(3h)即出现损伤,同时发生胶质反应,伤后急

性期(24 h)至亚急性期(72 h),相应区域神经元变性开始出现,并与星形胶质细胞数量呈反比。

#### 【参考文献】

- [1] 胡 锦. 华东地区颅脑创伤流行病学调查[J]. 中华神经外科杂志, 2008, 24(2): 88-91.
- [2] Levin HS, Diaz-Arrastia RR. Diagnosis, prognosis, and clinical management of mild traumatic brain injury [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(5): 506-517.
- [3] Cui W, Allen N D, Skynner M, *et al*. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain [J]. *Glia*, 2001, 34(4): 272-282.
- [4] Zhao X, Ahram A, Berman R F, *et al*. Early loss of astrocytes after experimental traumatic brain injury [J]. *Glia*, 2003, 44(2): 140-152.
- [5] Kaminsky N, Bihari O, Kanner S, *et al*. Connecting malfunctioning glial cells and brain degenerative disorders [J].

- Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(3):155-165.
- [6] Liu D, Smith CL, Barone FC, *et al*. Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 68(1-2): 29-41.
- [7] Huang XJ, Glushakova O, Mondello S, *et al*. Acute temporal profiles of serum levels of UCH-L1 and GFAP and relationships to neuronal and astroglial pathology following traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(16): 1179-1189.
- [8] Baldwin SA, Scheff SW. Intermediate filament change in astrocytes following mild cortical contusion [J]. *Glia*, 1996, 16(3): 266-275.
- [9] Dietrich WD, Truettner J, Zhao W, *et al*. Sequential changes in glial fibrillary acidic protein and gene expression following parasagittal fluid-percussion brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1999, 16(7): 567-581.

(2018-01-22 收稿, 2018-02-12 修回)

(上接第 236 页)

“锁孔”技术的软硬件要求高,限制了其广泛使用。Cha 等<sup>[7]</sup>认为 LSO 入路可充分暴露整个 Willis 环前部,对比锁孔入路,LSO 入路可视角度更大,手术难度较低,不需特殊手术器械,大部分熟悉翼点入路的神经外科医生无需特殊培训即可采用。Fisher 分级和 Hunt-Hess 分级是影响预后的危险因素,随着分级的增加,预后愈差<sup>[8]</sup>,去骨瓣减压的可能性更大。鉴于此,我们认为对于 Hunt-Hess 分级 IV、V 者及改良 Fisher 分级 III 级以上者,不宜运用 LSO 入路。

综上所述,我们认为在现阶段,对比其他前循环动脉瘤手术入路,LSO 入路显微手术在保证充分有效手术区域暴露的前提下,兼顾安全及微创,并不明显增加手术难及使用特殊器械,较易为显微技巧熟练的神经外科医生掌握,临床可行性较高。对于合并颅内血肿、严重脑肿胀、大量蛛网膜下腔积血等动脉瘤,LSO 入路显露术区及减压方面等尚有不足,可酌情采用翼点入路等。

#### 【参考文献】

- [1] Hernesniemi J, Ishii K, Niemel M, *et al*. Lateral supraorbital approach as an alternative to the classical pterional approach [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2005, 94(94): 17-21.
- [2] 马翔宇,徐淑军,李新钢. 眶上外侧入路无血快速开关颅

- 技术单中心标准化操作流程[J]. 中华神经外科杂志, 2015, 31(9): 958-960.
- [3] Komotar RJ, Olivi A, Rigamonti D, *et al*. Microsurgical fenestration of the lamina terminalis reduces the incidence of shunt-dependent hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 2002, 51(6): 1403-1412.
- [4] 秦 冰,应广宇,胡 华,等. 经眶上外侧入路夹闭颅内前循环动脉瘤的临床应用[J]. 浙江大学学报医学版, 2015, 44(4): 383-388.
- [5] 孙久君,何朝晖,唐玖宁,等. 血红蛋白浓度与动脉瘤性蛛网膜下腔出血术后症状性脑血管痉挛的相关研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(5): 275-278.
- [6] Salma A, Alkandari A, Sammet S, *et al*. Lateral supraorbital approach vs pterional approach: an anatomic qualitative and quantitative evaluation [J]. *Neurosurgery*, 2011, 68(6): 364-371.
- [7] Cha KC, Hong SC, Kim JS. Comparison between lateral supraorbital approach and pterional approach in the surgical treatment of unruptured intracranial aneurysms [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2012, 51(6): 334-337.
- [8] 黄俊红,赵洪洋,王海均,等. 颅内动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者预后的多因素分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2009, 14(5): 257-259.

(2017-11-03 收稿, 2018-01-16 修回)