

## • 论著 •

## 颅脑外伤后细胞凋亡与 Fas 抗原的表达

马延斌 朱志安 张红 邱建华 肖波 冯东福

**【摘要】** 目的 探讨颅脑外伤后细胞凋亡与 Fas 抗原表达的变化,为阐明损伤后神经元丢失的多种途径提供实验依据。方法 建立大鼠自由落体脑创伤模型,采用免疫组化技术及细胞透射电镜观察形态学的方法,对伤后挫伤灶旁局部脑组织细胞凋亡和 Fas 抗原表达进行观察。结果 在挫伤灶旁观察到细胞凋亡的发生,神经细胞呈现较为典型的凋亡超微结构变化,Fas 蛋白表达在 24 h 达到高峰,随后呈下降趋势。结论 颅脑外伤后在局部组织可见细胞凋亡的发生,Fas 蛋白表达参与了外伤后神经细胞凋亡的过程。

**【关键词】** 脑损伤; 凋亡; Fas 抗原; 免疫组化法

**Experimental study of apoptosis and Fas antigen expression in craniocerebral trauma** MA Yan-bin, ZHU Zhi-an, ZHANG Hong, QIU Jian-hua, XIAO Bo, FENG Dong-fu. Department of Neurosurgery, Baogang Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 201900, China

**【Abstract】 Objective** To evaluate the change in Fas antigen expression and apoptosis of neurons, to provide an experimental evidence of loss of neurons in craniocerebral injury, and to provide experimental evidence for clarifying multi-approach of the lost neuron after damage. **Methods** Brain impact injury was reproduced in SD rat with a free falling impacting device. Using immunohistochemistry method the Fas protein expression was assessed and apoptotic cells were detected with electron microscopy. **Results** Apoptotic cells were found near the contused area, and Fas-positive cells appeared around the injured and hippocampus areas at about 4 hours, peaked at 24 hours after injury and then reduced in number. **Conclusion** Apoptosis and necrosis are two forms of cell death in brain tissue following experimental brain contusion. Moreover, the results imply that the Fas-FasL pathway plays a pivotal role in the pathophysiology of post-traumatic neuronal apoptosis.

**【Key words】** brain injury; apoptosis; Fas antigen; immunohistochemistry

细胞的肿胀、坏死是颅脑外伤,特别是脑挫伤急性期神经元死亡的主要方式。但是近几年的研究表明,损伤后迟发性神经元死亡(DND)可能与神经元的凋亡(apoptosis)有关,这一过程涉及到一系列基因的激活、表达和调控。Fas(CD95)是位于细胞膜表面上的一种蛋白质,可与其配体 FasL 结合后向胞内传递凋亡信号,目前认为其是启动细胞凋亡的重要因素。通过检测挫伤灶旁细胞凋亡与 Fas 抗原表达,探讨二者在颅脑外伤后神经元死亡中的作用。

### 1 材料与方

**1.1 实验动物分组:**普通级 SD 大鼠 40 只,由上海第二医科大学实验动物部提供,雌雄不拘,体重 240~270 g。随机分为假手术对照组(右侧顶骨钻孔,不致伤)以及损伤后 4、24 和 48 h 共 4 个组,每组 10 只动物。其中 2 只用于电镜观察,8 只用于 Fas 抗原免疫组化染色。

**1.2 大鼠局灶性脑挫伤模型制备:**按照文献[1]介

绍的大鼠自由落体脑创伤模型制备方法并对打击装置略加改进,造成右顶叶较为一致的局限性脑挫裂伤(打击力为 50 g×20 cm)。

**1.3 透射电镜观察:**挫伤灶旁 1 mm 处取材,常规固定,超薄切片,观察凋亡细胞的形态学变化。

**1.4 脑组织取材及固定:**开胸并经左心室插管至主动脉,灌注 4℃ 肝素化生理盐水(50 kU/L)200 ml,然后灌注 4℃、体积分数为 4%的多聚甲醛磷酸缓冲液 500 ml,可见大鼠肢体抽搐,并逐渐变僵硬,断头取脑,4%多聚甲醛磷酸缓冲液后固定 6~12 h,然后浸入质量分数为 20%的蔗糖磷酸缓冲液中 4℃ 保存,充分脱水,直至组织块下沉(约 48 h)。

**1.5 免疫组化染色:**采用抗生物素蛋白链菌素耦联过氧化物酶法免疫组化方法染色。兔抗鼠 Fas 蛋白多克隆抗体(sc-716)为美国 Santa Cruz 公司产品,链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化染色超敏试剂盒为福州迈新生物技术开发公司生产。

**1.6 Fas 抗原阳性细胞数测定:**显微镜 400 倍放大条件,在免疫组化染色切片上沿挫伤灶旁皮质及同侧海马区随机选取 5 个视野,依次计数每一个视野内阳性细胞,计算其均值作为该切片层面的阳性细

基金项目:上海市属高校自然科学基金资助项目(01B01)

作者单位:201900 上海第二医科大学附属宝钢医院神经外科

作者简介:马延斌(1970-),男(汉族),医学硕士,主治医师,

2001 年在日本横滨市立大学医学院短期进修。

胞数。6 个切片层面均数作为该动物的阳性细胞数, 各组动物再分别计算其组内阳性细胞均数。

1.7 统计学处理: 数据均以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间免疫组化染色阳性细胞数差异比较采用 SPSS 软件包中 SNK 方差分析法。

## 2 结果

2.1 透射电镜观察(彩色插页图 1): 透射电镜下可见到凋亡样改变的细胞超微结构, 其细胞核染色质聚集成块, 电子密度增强; 细胞体积变小, 胞浆浓缩, 其内细胞器保存尚好, 线粒体数目轻度增加并伴轻度肿胀, 细胞膜保存完整。

2.2 免疫组化染色光镜观察: 空白组皮质及海马区仅见偶染细胞。在损伤灶附近的皮质和海马结构中可见 Fas 蛋白阳性染色细胞, 其胞浆及胞膜呈棕黄色着色(彩色插页图 2~4)。在损伤后不同时间里 Fas 蛋白的表达也有所不同, 24 h 时达高峰(表 1)。

表 1 损伤后脑组织 Fas 蛋白表达的变化( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Expression of Fas antigen in brain tissue

after injury( $\bar{x}\pm s, n=8$ ) 个/高倍视野

组别	Fas 阳性细胞计数	组别	Fas 阳性细胞计数
假手术对照组	0.31±0.13	伤后 24 h 组	23.37±1.93*
伤后 4 h 组	9.71±1.58*	伤后 48 h 组	13.85±2.14*

注: 与假手术对照组比较; \* $P<0.01$

## 3 讨论

细胞凋亡或称程序化细胞死亡(PCD)是一种受基因控制的细胞死亡过程。以往人们观察到细胞凋亡是维持神经系统生长发育动态平衡的必要手段, 随着近几年分子生物学技术的突飞猛进, 不断有研究显示肿瘤、缺血、创伤、癫痫, 以及包括阿尔茨海默病、帕金森病等神经变性疾病发病过程都存在着细胞凋亡。1995 年国外学者首次在液压伤模型中找到细胞凋亡的形态学证据, 并且发现凋亡细胞主要出现在伤后 24~48 h<sup>[2]</sup>。本实验中, 通过电镜对各个不同时间点形态学观察也证实了在挫伤灶附近细胞凋亡是伴随着细胞坏死的病理过程, 这两种不同的死亡过程共同参与了神经元的丢失。结果显示, 在损伤灶中心部位的细胞死亡以肿胀坏死为主; 而在边缘部位细胞坏死减少, 并同时伴随细胞凋亡。我们认为这主要是由于在损伤中心致死性的化学物质浓度相对较高, 对细胞结构的破坏也较剧烈; 而在损伤边缘毒性物质浓度较低, 对细胞损伤是一个缓慢的过程, 不足以引起细胞坏死, 而是通过激活基因表达和蛋白质合成, 促进细胞凋亡来加重继发性脑损害。

细胞凋亡的发生与一系列基因的激活、调控以

及蛋白质的表达有关。Fas(CD95)是一种具有重要功能的细胞表面受体, Fas 的蛋白结构表明它属于肿瘤坏死因子(TNF)受体(TNFR)家族成员。近几年许多研究表明, Fas 蛋白在神经缺血-再灌注损伤中发挥着重要的作用, 是缺血后神经元凋亡发生机制中的关键性因素<sup>[3,4]</sup>。最近 Ertel 等<sup>[5]</sup>在重度颅脑损伤患者的脑脊液中检测到高水平的可溶性 FasL, 并且发现 FasL 水平与颅脑损伤程度、脑灌注压(CCP)和颅内压(ICP)相关, 因此作者认为 Fas 和 FasL 在脑外伤和继发性脑损害中发挥关键作用。但作者不能确定可溶性 FasL 的高水平表达是中枢神经系统细胞死亡的标志, 还是对抗外伤后侵入中枢神经系统 Fas 阳性 T 细胞的自身防御。因此 Fas 蛋白在颅脑外伤后原位组织学的研究显得尤为重要。

本实验结果显示, Fas 蛋白在正常大鼠脑组织中未见表达, 与其他研究一致<sup>[6]</sup>, 从一个侧面反映了中枢神经系统内成熟神经细胞的相对稳定性。但在挫伤灶旁的大脑皮质包括对缺血较敏感的海马大锥体细胞发现 Fas 阳性细胞的表达, 说明 Fas 主要介导了脑损伤后局部细胞凋亡的发生, 并可能参与了海马 DND, 这为我们理解颅脑外伤后情绪、学习与记忆的变化提供了一条新的思路<sup>[7]</sup>。这种表达在时间上存在着先后关系, 研究显示在损伤后 4 h 即出现阳性细胞, 在 24 h 达到高峰, 随后呈下降趋势。这说明 Fas 抗原对神经细胞迟发性凋亡的作用尤为明显, 同时也说明 Fas-FasL 途径的启动不是一个孤立的过程, 需要其他因素的触发。有人发现, 由超氧阴离子增多所诱发的氧化应激可使细胞发生 Fas 介导的细胞凋亡, 并且这一过程可能触发胶质细胞 FasL 表达<sup>[8,9]</sup>。从本实验中可见, Fas 阳性细胞表达在达到一定高峰后下降, 其原因可能与抑制凋亡因素如 Bcl-2 表达有关, 这一点尚待进一步证实。

### 参考文献:

- 1 袁绍纪, 朱诚. 大鼠急性创伤性脑水肿模型的建立[J]. 上海医学, 1989, 12: 276-278.
- 2 Rink A, Fung K M, Trojanowski J Q. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat[J]. Am J Pathol, 1995, 147: 1575-1583.
- 3 Matsuyama T, Hata R, Tagaya M, et al. Fas antigen mRNA induction in postischemic murine brain[J]. Brain Research, 1994, 657: 342-346.
- 4 Sakurai M, Hayashi T, Abe K, et al. Delayed selective motor neuron death and fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits[J]. Brain Res, 1998, 22: 797.
- 5 Ertel W, Keel M, Stocker R, et al. Detectable concentration of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury[J]. J Neuroimmunol, 1997, 80: 93-96.

- 6 Watanabe - Fukunaga R, Brannan C I, Itoh N, et al. The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen[J]. J Immunol, 1992, 148: 1274 - 1279.
- 7 廖维宏, 王国强, 沈岳, 等. 腺病毒介导源性神经营养因子基因转移对大鼠创伤性脑损伤后诱导型一氧化氮合酶表达及细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 3 - 8.
- 8 Kohno T, Yamada Y, Hata T, et al. Relation of oxidative stress and glutathione synthesis to CD95 mediated apoptosis of adult T cell leukemia cells[J]. J Immunol, 1996, 15: 4722.
- 9 Vogt M, Bauer M K, Ferrari D, et al. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 ligand expression in microglial cells[J]. FEBS Lett, 1998, 429: 67 - 72.

(收稿日期: 2004 - 09 - 28 修回日期: 2005 - 02 - 24)

(本文编辑: 李银平)

## • 经验交流 •

# 小剂量胰岛素联合抗病毒药物抢救儿童糖尿病酮症酸中毒

杨晨 许斌 崔晓红

【关键词】 1 型糖尿病; 酮症酸中毒; 儿童; 抗病毒药物

采用小剂量胰岛素持续静脉滴注(静滴)联合抗病毒药物的方法治疗 1 型糖尿病(DM)并发酮症酸中毒(DKA)患儿 13 例。报告如下。

### 1 临床资料

1.1 病例: 13 例 DKA 患者中男 7 例, 女 6 例; 年龄 20 个月~13 岁; 11 例有较明显的诱因, 其中 4 例为呼吸系统感染, 3 例为胃肠道感染, 2 例因食甜食过多, 2 例因骤停胰岛素。入院时表现为呕吐、腹泻 7 例, 嗜睡、倦怠 6 例, 气喘 2 例, 昏迷、抽搐 4 例; 呼吸深快且可闻及酮体味 8 例, 有明显脱水征 5 例, 血压下降 4 例; 入院时血糖 9.9~29.5 mmol/L, CO<sub>2</sub>CP 均有不同程度下降, 最低为 5.5 mmol/L; 尿糖定性在(+++)~(++++) , 尿酮体(++)~(+++) , 血清钾与心电图均无明显改变。

### 1.2 治疗方法

1.2.1 胰岛素治疗: 13 例均为小剂量胰岛素(按 0.1 U · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> 计算出 3~4 h 所需总量)持续静注, 同时皮下注射 0.5 U/kg 胰岛素, 再依所测血糖计算所需胰岛素剂量, 每 4~6 h 皮下注射 1 次, 患儿能进食后改为餐前皮下注射。

1.2.2 抗病毒治疗: 2001 年以前用穿琥宁注射液 10~15 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 静注; 近年则选用阿昔洛韦或丽可伟 5~10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, 疗程 1 周左右。并合理选用抗生素控制细菌感染。

1.2.3 纠正酸中毒、脱水、电解质紊乱。

1.3 结果: 经上述治疗后, 12 例血糖、

血酮体平稳下降; 有 2 例在酸中毒纠正后由于补钾不及时, 血清钾略有下降, 经纠正后恢复正常; 无一例出现低血糖昏迷。1 例 2 岁幼儿死于 DKA 所致多器官功能衰竭(MOF)。

### 2 讨论

近年来人们普遍认为, DKA 的发生是一种激素异常和代谢紊乱结合所致, 对于正处于生长发育期的 DM 患儿, 前者尤为重要。目前认为, 对儿童生长发育起重要作用的生长激素是一种生酮激素, 可促进脂肪分解, 导致大量生酮氨基酸生成<sup>[1]</sup>。同时 1 型 DM 患儿绝对缺乏胰岛素, 其 DKA 发病率远远高于成人, 且发病年龄越小越易发生, 越小越重, 故补充胰岛素是治疗关键。然而, 既往治疗 DKA 常用较大剂量胰岛素, 会致血糖快速下降, 易造成低血糖症和低血糖昏迷甚至脑水肿。我们采用小剂量持续胰岛素静注, 并在血糖达一定程度后改用皮下注射, 防止了这些并发症的发生。

感染常为 DKA 的诱发因素, 本组为 7/13(占 53.8%), 除了儿童抵抗力差以外, 还在于 DKA 时机体防御机制的改变, 如 DKA 时, 粒细胞功能受抑制, 吞噬功能降低, 随着 DKA 纠正, 粒细胞功能将获得改善<sup>[2]</sup>。严重的 DKA 可使感染加重, 反之, 感染可诱发和加重 DKA, 本组死亡病例即为严重感染伴有 DKA 所致多脏器损害, 而感染, 特别是病毒感染又是诱导自身免疫的主要因素。研究发现, 初步诊断为 1 型糖尿病的患者中, 不少病例血清中可查到某些病毒的特异性抗体 IgM, 这些导致糖尿病的病毒有柯萨奇病毒、风疹病毒、腮腺炎病毒、巨细胞病毒等, 而肠道病毒, 特别是柯萨奇

病毒在 1 型糖尿病发病中起到了更重要的作用<sup>[3]</sup>。从宿主易感基因的遗传学、细胞动力学分析和新的血清学评价, 都表明感染是 β 细胞损伤的开始点, 一方面病毒可以直接感染胰岛 β 细胞, 另一方面病毒感染可触发胰岛组织的自身免疫, 从而导致胰岛 β 细胞功能受损, 而后者多见<sup>[4]</sup>。有报道, 新发现的 1 型糖尿病患儿中约 70%~80% 胰岛细胞自身抗体(ICA)为阳性, 32%~37% 胰岛素自身抗体(IAA)阳性<sup>[5]</sup>。故本组病例除给予适量胰岛素外, 均加入有效的抗病毒药物, 一方面减轻病毒对胰岛细胞的损害, 更重要的是减轻其引发的免疫反应对胰岛细胞损害。

### 参考文献:

- 1 胡绍文, 郭瑞林. 实用糖尿病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1998. 150 - 151, 346.
- 2 孙黎明. 糖尿病患者中性粒细胞的抗感染功能[J]. 国外医学内分泌分册, 1989, 9: 199.
- 3 Frisk G, Tuvemo T. Enterovirus infections with beta - cell tropic strains are frequent in siblings of children diagnosed with type 1 diabetes children and in association with elevated levels of GAD65 antibodies [J]. J Med Virol, 2004, 73: 450 - 459.
- 4 刘希江, 沈水仙, 苏翠云. 肠道病毒感染与儿童 1 型糖尿病关系的研究[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38: 92.
- 5 Bao M Z, Wang J X, Dorman T S, et al. HLA - DQ13 mon - Asp57 allele and incidence of diabetes in China and USA [J]. Lancet, 1998, 2: 497.

(收稿日期: 2005 - 01 - 27)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 150036 哈尔滨, 黑龙江省医院

作者简介: 杨晨(1965 -), 男(汉族), 黑龙江省哈尔滨市人, 医学硕士, 副主任医师。

## 颅脑外伤后细胞凋亡与Fas 抗原的表达

(正文见286页)

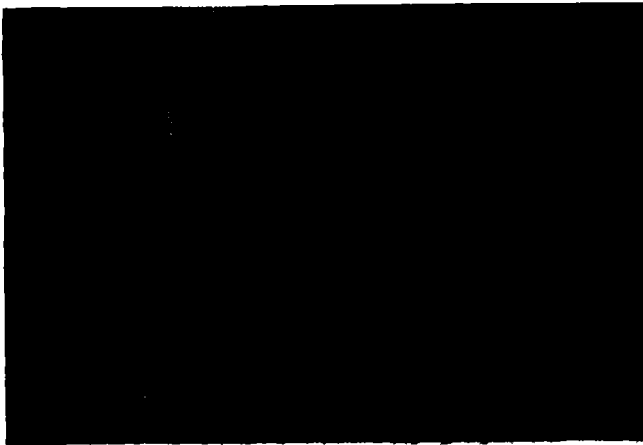


图1 凋亡样改变的细胞超微结构(醋酸铀和枸橼酸铅, ×6 000)  
Figure 1 Ultrastructure of apoptotic cells by electron microscopy (uranyl acetate and lead citrate, ×6 000)

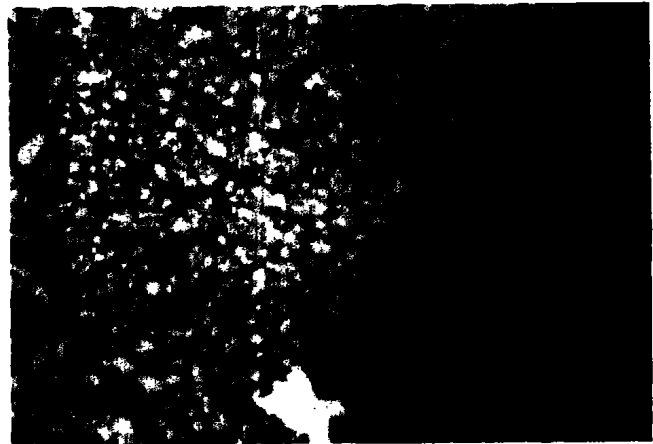


图2 损伤组海马区Fas抗原表达(SP, ×50)  
Figure 2 Expression Fas antigen of hippocampus cells in injury group (SP, ×50)

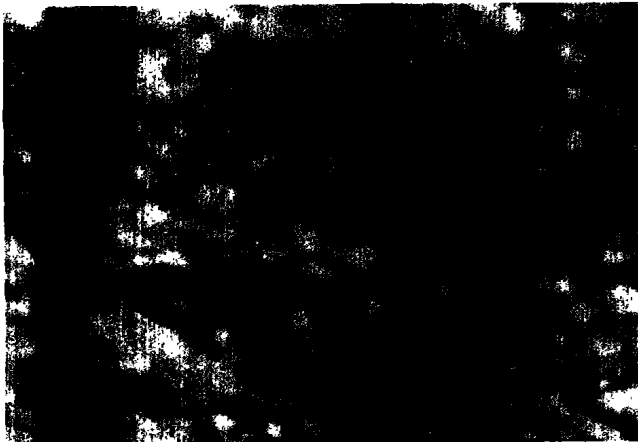


图3 损伤组皮质Fas抗原表达 (SP, ×300)  
Figure 3 Expression Fas antigen of cortical cells in injury group (SP, ×300)



图4 损伤组海马区Fas抗原表达(SP, ×300)  
Figure 4 Expression Fas antigen of hippocampus cells in injury group (SP, ×300)

## 黄皮酰胺对高血压局灶性脑缺血-再灌注大鼠Bcl-2蛋白表达和细胞凋亡的影响

(正文见289页)



图1 Bcl-2阳性细胞, 胞膜呈棕黄色 (SP, ×400)  
Figure 1 Positive cells of Bcl-2, its membrane showed yellow (SP, ×400)

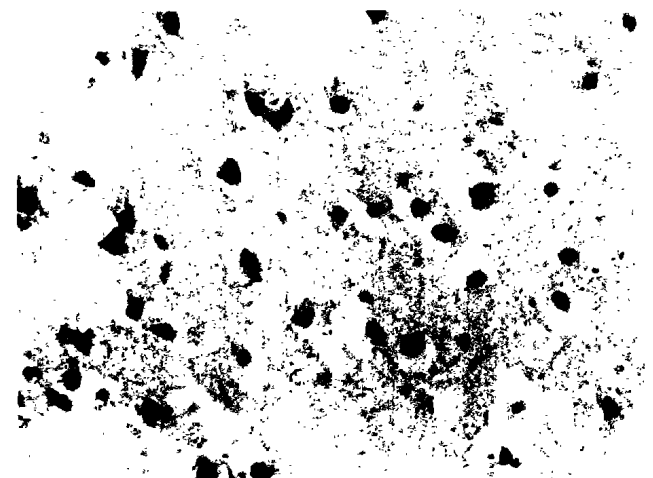


图2 凋亡细胞, 呈深褐色散在分布 (TUNEL, ×400)  
Figure 2 Apoptotic cells, it showed deep brown dispersed distribution (TUNEL, ×400)