

脑死亡后神经细胞溶酶体酸性磷酸酶变化的研究

河北省人民检察院技术处(石家庄 050051) 韩业兴

河北省公安厅技术处(石家庄 050051) 王京斌

河北医科大学法医学教研室(石家庄 050017) 谷振勇

摘 要 在颅内高压致脑死亡动物模型基础上采用酶细胞化学技术对脑死后不同水平神经细胞溶酶体酸性磷酸酶(Acid Phosphatase, ACP)活性变化和定位分布作了同步观察。结果显示,脑死亡后神经细胞 ACP 活性先增高,继而逐渐降低乃至消失,以大脑和小脑神经细胞为著;脑干神经细胞 ACP 一直保持较高活性;脑死亡 9h 内 ACP 定位无改变。表明神经元 ACP 活性改变可能是脑死亡神经病理学变化的发病机制之一。

关键词 脑死亡 酸性磷酸酶 酶细胞化学

脑死亡是指枕骨大孔以上水平包括大脑、小脑和脑干在内的全脑功能的永远消失。脑死亡神经病理学呈炎性反应相对轻微甚至缺如的自溶性改变^[1,2],神经细胞富含酸性水解酶的溶酶体可能起重要作用。本实验在成功建立的脑死亡动物模型^[3]基础上,应用酶细胞化学技术首次同步观察了脑不同水平神经细胞溶酶体标志酶酸性磷酸酶(ACP)在显微和超微结构上的活性变化和定位分布规律,以探讨溶酶体 ACP 在脑死亡神经病理变化中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Bright 恒冷箱切片机, LKB-NOVA 超薄切片机, JEX-12000EX 电镜, PHS-301 酸度计; β -甘油磷酸钠(GR Merk), 钨酸(Fluka)。

1.2 脑死亡模型制作

实验动物选用杂种健康家猫, 体重 2kg~3kg, 共 37 只。采用颅内高压致脑死亡方法复制动物模型^[3]。

1.3 实验分组

实验分为 3 组, 脑死亡组家猫 20 只, 猫达到脑死亡标准后, 分别观察 1、3、5、7、9h, 每时间点动物 4 只; 对照组家猫 17 只, 其中 1h 3 只, 3、5、7h 各 4 只, 9h 2 只, 对照动物不给予颅内高压处理, 余均与脑死亡组相同; 正常组家猫 2 只, 断头处死。

1.4 ACP 酶细胞化学染色

从大脑皮质薛氏回, 延髓、小脑皮质分别取小块组织。按 Gomori 法^[4]作光、电镜酶细胞化学染色; 其中, 用作光镜 ACP 酶细胞化学的, 小块组织用液氮速冻, 制片孵育。用作电镜酶细胞化学的, 小块组织孵育后经乙醇梯度脱水, Epon 包埋, 制片后不作电子染色直

接电镜下观察。光、电镜酶细胞化学染色均做去底物特异性试验^[4]。

2 结 果

2.1 脑宏观病理变化

脑死亡组均可见, 枕骨大孔背侧缘下 1cm~2cm 处有小脑组织, 呈舌状突入脊髓腔, 腹侧缘下延髓下段已坠入脊髓腔。组织苍白质软, 猫骨性天幕下左右侧均有海马钩回疝, 整个脑不同程度向下移位扭曲, 大脑回平沟浅, 脑质变软。正常组和对照组动物脑未见异常。

2.2 神经细胞 ACP 酶细胞化学变化

2.2.1 脑死亡组 脑死 1h 光镜下大脑锥体细胞酶反应产物有处浓集, 活性增强; 电镜下溶酶体数量增多。ACP 酶反应颗粒电子密度增强, 而定位无改变。低位神经细胞酶活性无明显变化。3h 后不同水平神经细胞酶反应产物凝集成点状、索条状、片块状, 酶活性明显增强, 电镜下溶酶体肿大, 酶反应颗粒变多呈大块状, 定位无弥散。5h~7h, 大脑锥体细胞及小脑浦氏细胞酶反应产物变少淡染, 酶活性下降, 以大脑锥体细胞酶活性下降为著, 浦氏细胞呈溶解状, 电镜下大小脑神经细胞溶酶体偶见, 酶反应产物稀少。脑干神经细胞酶活性仍较强, 酶反应产物分布均匀, 有的突起清晰。脑死亡 9h, 大脑锥体细胞活性基本消失, 未见酶反应产物, 浦氏细胞反应产物淡染, 活性几乎消失; 脑干神经细胞酶活性与 7h 组相比无著变, 电镜观察酶反应颗粒无弥散。

2.2.2 正常组 光镜下大脑皮质大锥体细胞、脑干神经细胞和小脑浦氏细胞胞浆有酶反应产物, 棕黑色, 分布均匀; 电镜下初次级溶酶体有微细酶反应颗粒。

2.2.3 对照组 酶活性及定位与正常组无异。

2.2.4 特异性试验 实验组及对照组去底物切片特异性试验均无酶反应产物。

3 讨论

溶酶体可消化衰老细胞器,利于保持细胞新陈代谢活力,在某些情况下也可吞噬破坏健康亚细胞结构,甚至其酸性水解酶弥散导致组织细胞溶解,成为神经病理学变化的重要机制。本实验结果显示,在脑死早期大、小脑神经细胞 ACP 活性明显增强,酶反应产物浓集,溶酶体数量增多、体积增大和电子密度增强,其原因可能是脑死后脑血流中断,神经细胞无氧酵解加强,细胞浆酸度增加,引起 ACP 酶原活化。而脑死 5h~9h 大小脑酶活性降低甚至消失,脑干保持较高活性,说明脑不同水平对缺血缺氧耐受性和敏感度不同。Sparato^[5]利用 Levine 脑缺血缺氧模型研究了大脑皮质神经细胞 ACP 变化,发现脑缺血 2.5h ACP 活性开始降低,5h 明显,40h 几乎消失。Becker^[6]也发现脑缺血后溶酶体肿大,ACP 活性增强。Little^[7]尝试说明溶酶体 ACP 在缺血时释放、导致细胞结构改变,结果发现神经细胞先发生不可逆变化(3h),而后(12h)出现酶的弥散,且酶活性无明显增加。本实验结果与前人观察不尽一致,其原因可能是实验条件不同,溶酶体生物性状有差异,观察方式不一。如 Levine 模型中脑缺血缺氧的程度难以控制,且一侧脑半球仍有血液供应,显然与本实验的全脑缺血性脑死不同, Little^[6]所作的 ACP 细胞化学中作了铀铅双染,这使细胞超微结构比差变大,利于观察其它细胞器的变化,但铀铅双染也可增加溶酶体电子密度,导致铅染颗粒与酶反应颗粒难以分辨,增加了主观臆测性。本实验超微切片均未作铀铅染,客观地显示了 ACP 活性变化和定位。

Frederiks^[8]发现鼠肝单纯缺血 1h ACP 定位无改

变,而缺血 1h 再灌注时出现酶反应产物弥散,认为缺血对溶酶体膜稳定性影响不大。Hoffstein^[9]发现。心肌缺血性心梗区,心肌纤维变性与内源性 ACP 释放有关。本实验电镜细胞化学观察到,脑死亡 9h 内 ACP 酶反应颗粒无弥散,表明神经细胞溶酶体膜对缺血也有较强的耐受能力。结果提示,缺血性脑死亡的神经病理学呈自溶性改变的机制可能是早期由溶酶体吞噬消化其它细胞器,迁延日久溶酶体膜才出现破裂致使脑组织发生酶解性自溶,为脑死亡的神经病理学变化的重要发病机制之一。

参考文献

1. Walker AE. Pathology of brain death. Ann NY Acad Sci, 1998, 315: 272
2. Li Dexiang. Pathology of brain death. Japan: The first ISALM, Kanazawa, 1990. 43
3. 谷振勇,等.应用颅内高压复制脑死亡动物模型.河北医科大学学报,1999,20(6):341
4. 小川和朗,中根一穗(钟声慈主译).酶组织细胞化学技术.上海:上海医科大学出版社,1989.88~90
5. Sparato J. Anoxic-ischemic encephalopathy of the rat. Exp Neurol, 1966, 16: 16
6. Becker NA, Barron KD. The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats. Am J Path, 1961, 38: 161
7. Little JR, et al. The role of lysosome in production of ischemic nerve cell changes. Arch Neurol, 1994, 30: 448
8. Feederiks WM, Marx F. Changes in acid phosphatase activity in rat liver after ischemia. Histochem, 1989, 93: 161
9. Hoffstein S, et al. Cytochemical localization of lysosome enzyme activity in normal and ischemic dog myocardium. Am J Path, 1995, 79: 193

收稿日期 2000-03-06

A STUDY ON ALTERATION AND LOCALIZATION OF ACID PHOSPHATASE(ACP)IN BRAIN AFTER BRAIN DEATH

Han Yexing, Wang Jingbin, Gu Zhenyou, et al.

Department of Technology, Hebei Supreme People's Procuratorate, Shijiazhuang 050051

Abstract: This study, using cytochemical technique, investigated alterations of activity and localization of acid phosphatase(ACP) in different part neurons of brain after brain death. The results showed that ACP activity began to increase, then reduce and disappear, in cerebral and cerebellar neurons. After the brain death, however, it was maintained higher activity in brain stem neurons. In contrast, the localization of ACP did not change 9 hours after brain death. These results indicated that the changes of ACP in neurons contributed to neuropathologic process of brain death.

Key words: brain death, acid phosphatase, cytochemistry