

文章编号: 1674-8085(2016)06-0092-04

# 治疗干预对大鼠结核性脑膜炎蛛网膜 颗粒结构的影响

\*张齐龙<sup>1,2</sup>, 况卫丰<sup>1,2</sup>, 袁小兰<sup>1,2</sup>, 叶琳<sup>1,2</sup>, 肖绍武<sup>1,2</sup>, 刘翼军<sup>1,2</sup>

(1. 江西省胸科医院神经内科, 江西, 南昌 330006; 2. 江西省第三人民医院神经内科, 江西, 南昌 330006)

**摘要:**目的 观察药物治疗干预措施对结核性脑膜炎大鼠蛛网膜颗粒结构的影响, 为研究结核性脑膜炎继发脑积水形成机制和药物干预治疗提供理论依据。方法 建立大鼠结核性脑膜炎模型, 分为 A、B、C、D 组(实验组), 实验 A、B、C 组均给予异烟肼及利福平抗结核治疗, 其中 B、C 组分别另外经小脑延髓池注射尿激酶(B)、乌司他丁(C), D 组为非治疗干预组, E 组为健康空白对照组。第 3 周, 处死大鼠, 之前经小脑延髓池注入亚甲蓝定位蛛网膜颗粒, 使用 TUNEL 法观察 5 组大鼠蛛网膜颗粒细胞凋亡情况差异。结果 A、B、C 组蛛网膜颗粒中偶见细胞凋亡, 非治疗干预 D 组蛛网膜颗粒中凋亡细胞增多, 对照组未见凋亡。结论 大鼠结核性脑膜炎后存在广泛的蛛网膜下腔炎症反应过程, 使蛛网膜颗粒出现过度的细胞凋亡, 治疗干预可能减少蛛网膜颗粒细胞凋亡。

**关键词:** 大鼠; 结核性脑膜炎; 蛛网膜颗粒; 脑积水

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2016.06.019

## EFFECTS OF INTERVENTION TREATMENT ON THE GRANULATIONS STRUCTURE OF RAT TUBERCULOUS MENINGITIS ARACHNOID

\* ZHANG Qi-long<sup>1,2</sup>, KUANG Wei-feng<sup>1,2</sup>, YUAN Xiao-lan<sup>1,2</sup>, YE Lin<sup>1,2</sup>, XIAO Shao-wu<sup>1,2</sup>, LIU Yi-jun<sup>1,2</sup>

(1. Department of Neurology, Chest Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. Department of Neurology, The Third People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract objective:** To observe the effects of drug treatment interventions on the granulations structure of rat tuberculous meningitis arachnoid, to provide theoretical basis for investigating the formation mechanism of tuberculous meningitis secondary hydrocephalus and drug intervention treatment. **Methods:** The rat model of tuberculous meningitis was established, all rats were divided into group A, B, C, D as the experimental group, the experimental group A, B, C were treated with isoniazid and rifampicin for anti-tuberculosis treatment, in addition, group B and C respectively were injected with urokinase (B) and ulinastatin (C) through the transcerebellar medulla oblongata pool. Group D was set as a therapeutic intervention group, and group E as health blank control group. After 3 weeks, the rats were killed after being injected with methylene blue for positioning arachnoid granulations through the transcerebellar medulla oblongata pool, the differences of arachnoid granulations apoptosis of rats in 5 groups were observed by using TUNEL method. **Results:** Arachnoid granulations apoptosis in group A, B were occasionally observed, apoptosis cells in group D

收稿日期: 2016-09-18; 修改日期: 2016-10-21

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20114BAB205060)

作者简介: \*张齐龙(1968-), 男, 江西南昌人, 主任医师, 硕士, 硕士生导师, 主要从事中枢神经感染诊治及临床研究(E-mail: qilong681015@126.com);

况卫丰(1983-), 男, 江西高安人, 主治医师, 硕士, 主要从事中枢神经感染临床诊断与治疗(E-mail: kwf83@163.com);

袁小兰(1965-), 女, 江西南昌人, 副主任医师, 主要从事临床科教及护理(E-mail: jxxkyy@163.com);

叶琳(1974-), 女, 江西新建人, 副主任医师, 硕士, 主要从事中枢神经感染诊治及临床研究(E-mail: luola7410@sina.com);

肖绍武(1973-), 男, 江西南昌人, 副主任医师, 硕士, 主要从事中枢神经感染诊治及临床研究(E-mail: xsw200088@163.com);

刘翼军(1964-), 女, 江西新建人, 主任医师, 主要从事病理临床研究(E-mail: liuyj1964@126.com).

increased, and wasn't found in the control group. **Conclusions:** Tuberculous meningitis in rats widely results in subarachnoid inflammation process, make the arachnoid granulations appear excessive apoptosis, treatment interventions could reduce the apoptosis of arachnoid granulations.

**Key words:** rats; tuberculous meningitis; arachnoid granulations; hydrocephalus

近年来,国内外结核病发病率及病死率仍然是高度关注的公共健康问题,在我国约6%的结核病可侵犯神经系统,结核性脑膜炎最常见,各年龄均可发病。结核性脑膜炎常继发脑积水,临床治疗困难,直接影响患者的预后。脑积水的形成原因主要为脑池、蛛网膜下腔、蛛网膜颗粒等部位的炎性渗出、粘连和纤维化。蛛网膜颗粒是颅内重要的组织结构,起着回吸收脑脊液和清除脑脊液内大分子物质和微粒子的重要作用,因此,蛛网膜颗粒的功能状态与脑积水的发生密切相关<sup>[1]</sup>。目前对于结核性脑膜炎时蛛网膜颗粒的病理损伤机制相关研究较少。本研究通过动物实验观察药物治疗干预措施对结核性脑膜炎大鼠蛛网膜颗粒结构的影响,为研究结核性脑膜炎继发脑积水形成机制和药物干预治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1) 无特定病原体(SPF级)SD大鼠50只,3~4月龄,体重220~250 g。大鼠分A、B、C、D、E五组,各组10只分笼饲养,自由取食饮水。喂养动物房间通风良好,按昼夜节律采光12h,保持室温18~26℃、湿度45%~65%,并定期用紫外线空气消毒。(2) H37RV标准毒力结核菌株;(3) 异烟肼注射液、利福平注射液、注射用尿激酶、乌司他丁注射液;(4) TUNEL试剂盒;(5) 10%水合氯醛,美蓝,多聚甲醛。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 结核菌悬液的制备

H37RV标准毒力株接种于罗氏鸡蛋培养基上,37℃斜面常规培养,3~4周后长出菌落。用接种环挑取生长良好、干湿适当的菌落,称重70 mg,加生理盐水10 mL,充分研磨后,混匀,制成结核菌悬液,浓度为0.35 mg/0.05 mL。

#### 1.2.2 大鼠的药物处理

随机抽取大鼠40只(结核性脑膜炎感染组),分A、B、C、D四组。用10%水合氯醛麻醉完全后,经小脑延髓池分别缓慢注入上述结核菌悬液共0.015 mL;其中感染组A、B、C组于注射结核菌第2日起每日喂服异烟肼5 mg和利福平5 mg,B、C于第7、14日经小脑延髓池分别注射注射尿激酶(B组)10万单位×250/50000(成人体重50 kg一般鞘内注射尿激酶10万单位),乌司他丁(C组)10万单位×250/50000,D组为非干预组;E组为健康空白对照组,用同样方法注入等量的生理盐水。

#### 1.2.3 大鼠结核性脑膜炎模型的建立

第3周,处死大鼠前经小脑延髓池注入1%亚甲蓝0.15 mL定位蛛网膜颗粒,保持头低位30 min,术后1.5 h处死。将大鼠用10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后,经左心室向升主动脉插管,剪开下腔静脉,同时快速灌注生理盐水200~300 mL以清除血管内血液,再用4℃多聚甲醛先快后慢进行内固定,至全身僵硬后断头取脑。取横窦,可见蛛网膜颗粒呈深蓝色,固定于4%的多聚甲醛溶液中,制备石蜡切片,TUNEL法在光学显微镜下观察蛛网膜颗粒。

#### 1.2.4 观察指标

各组大鼠脑有无结核病变:(1)肉眼观察脑病变程度。(2)大鼠感染3周处死后,无菌条件下,感染组和对照组随机挑取一部分新鲜脑组织,分别称重为0.2 g,加入4倍新鲜脑组织重量的无菌生理盐水后置入匀浆器中研磨成匀浆,取匀浆悬液0.5 mL接种于改良罗氏培养基斜面上并均匀涂抹,置于37℃培养箱中,常规培养4周后观察菌落的生长情况,并进行菌落计数;同时取匀浆液涂片进行抗酸染色镜检。蛛网膜颗粒细胞凋亡观察:细胞凋亡检测采用TUNEL法。凋亡细胞以细胞核呈棕黄色着色为阳性细胞,观察高倍镜下相临视野500个细胞中的凋亡细胞,计算百分比,即凋亡指数(AI)<sup>[2]</sup>。

#### 1.2.5 统计分析

采用PSS16.0软件进行数据分析,各组数据以

( $\bar{X} \pm s$ )表示, 凋亡指数间采用方差分析。

2 结果

感染组脑组织匀浆涂片进行抗酸染色镜检阳性(见图1), 或均浆培养生长结核分支杆菌, 证明大鼠结核性脑膜炎造模成功。大鼠蛛网膜颗粒细胞凋亡情况(见表1), A、B、C组蛛网膜颗粒中

偶见细胞凋亡, 非治疗干预D组蛛网膜颗粒中凋亡细胞增多, 对照组未见明显凋亡(见图2)。感染组细胞凋亡均显著超过正常对照组, 而通过A、B、C与D组比较可见治疗干预均可显著降低细胞凋亡指数, 而通过A、B、D组间及A、C、D组间比较, 发现B组(抗结核+鞘注尿激酶)和C组(抗结核+乌司他丁)降低细胞凋亡指数均优于A组(单纯抗结核)。

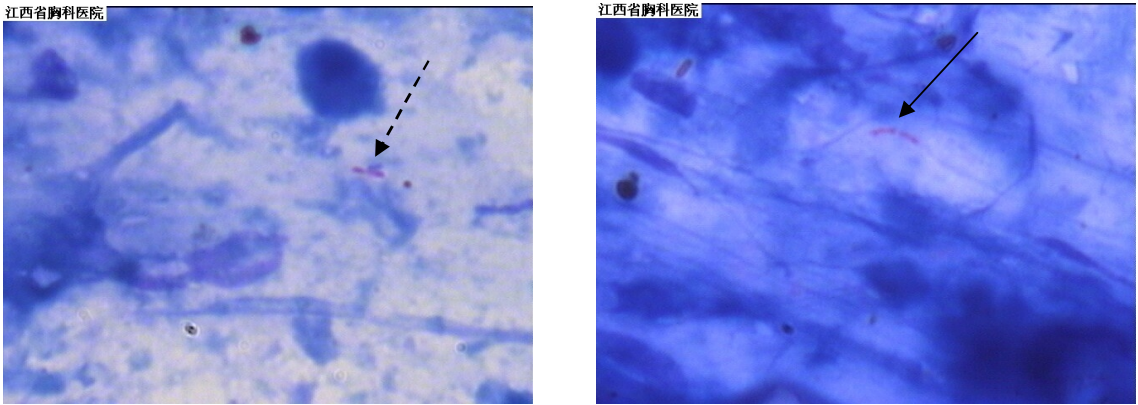


图1 抗酸染色镜检阳性  
Fig.1 Acid-fast staining positive

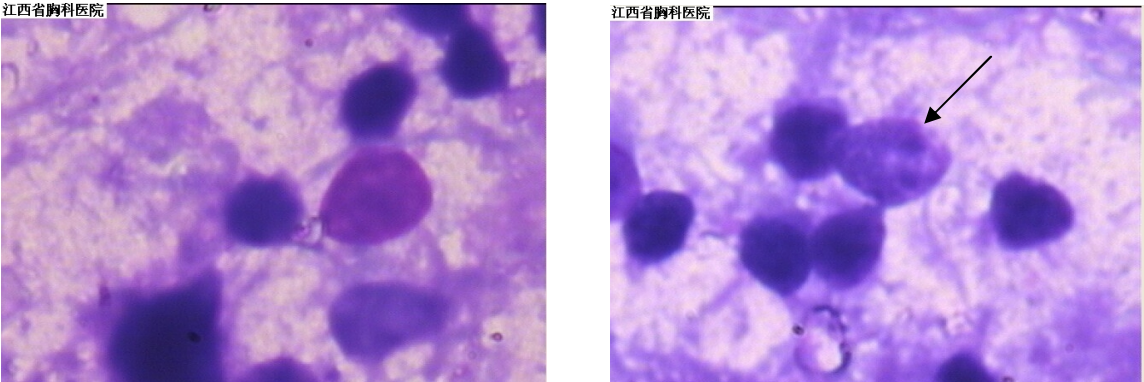


图2 蛛网膜颗粒细胞凋亡  
Fig.2 arachnoid granulosa cell apoptosis

表1 蛛网膜颗粒细胞凋亡的比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Comparison of granulosa cell apoptosis of arachnoid

| 分组 | 数量 | 细胞凋亡指数 (AI)      |
|----|----|------------------|
| A  | 10 | 3.2672 ± 0.3571  |
| B  | 10 | 1.7982 ± 0.2932  |
| C  | 10 | 1.8537 ± 0.2896  |
| D  | 10 | 31.2549 ± 0.5062 |
| E  | 10 | 1.0331 ± 0.0212  |

A、B、C、D组分别与E组比较,  $t = 19.7492$ 、

8.2304、8.9366、188.6330( $P < 0.05$ ); A、B、C与D组比较,  $t = 9.6353$ 、16.2973、15.9623( $P < 0.05$ ); A、B、D组间及A、C、D组间比较,  $F = 5.791$ 、5.462( $P < 0.05$ )。

3 讨论

大鼠颅内存在蛛网膜颗粒, 主要分布横窦内<sup>[3]</sup>, 与人类蛛网膜颗粒的功能相同, 有着强大的功能, 起着回吸收脑脊液和清除脑脊液内大分子物质和微粒子的重要作用。将亚甲蓝注入大鼠小脑延髓

池,可均匀、广泛的分布于蛛网膜下腔,并很快地被蛛网膜颗粒摄取;本实验中观察到大鼠蛛网膜下腔广泛蓝染,与硬膜的颜色有明显差异,蛛网膜与硬膜之间也没有染料积聚,从而可以判定横窦内的染料浓集区即为蛛网颗粒的确切位置,利用显微镜观察可见到兰色绒毛样结构。

多细胞机体均存在细胞的增殖与死亡,以维持机体的平衡;细胞凋亡(apoptosis)是由体内外因素触发细胞内存的死亡程序而导致的细胞死亡过程;调制凋亡过程是人类防治疾病的重要途径<sup>[4]</sup>。大鼠结核性膜炎后存在广泛的蛛网膜下腔炎症反应过程,本实验采用原位缺口末端标记法(TUNEL)在光学显微镜下利用其形态学特征进行检测,结果显示感染组蛛网膜颗粒出现过度的细胞凋亡,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );治疗干预可减少蛛网膜颗粒细胞凋亡,且各实验组组间比较差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ ),间断经小脑延髓池注入尿激酶和乌司他丁联合抗结核治疗对减少蛛网膜颗粒细胞凋亡的效果明显优于单纯抗结核治疗。其机制可能与乌司他丁可以抑制溶酶体酶的释放、清除氧自由基及抑制炎症介质释放的作用有关。

尿激酶作为纤溶酶原激活剂,临床上广泛用于胸腔内及鞘内注药治疗结核性胸膜炎或结核性脑膜炎<sup>[5-6]</sup>;其保护蛛网膜颗粒凋亡可能的机制是尿激酶进入脑脊液后,可以非特异地激活纤溶酶原为纤溶酶,后者可以降解纤维蛋白,分解脑脊液蛋白,减少蛛网膜粘连,进而保护蛛网膜颗粒细胞。因此,

我们认为,采用阻断蛛网膜颗粒的过度凋亡的方法,有助于保存蛛网膜颗粒的功能,为临床治疗和预防结核性脑膜炎后脑积水提供新的措施<sup>[7]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Holman D W, Grzybowski D M, Mahta B C, et al. Characterization of cytoskeletal and junctional proteins expressed by cells cultured from human arachnoid granulation tissue [J]. Cerebrospinal Fluid Res, 2005, 2(1): 9.
- [2] 孟雷,李哲,李修彬. 大鼠蛛网膜颗粒在颅内的分布及蛛网膜下腔出血后的改变[J]. 中国医师杂志, 2006,8(7): 865-867.
- [3] Kralick F, Oh J, Medina T, et al. Micro-fabricated shunt to mimic arachnoid granulations for the treatment of communicating hydrocephalus[J]. Acta Neurochir Suppl, 2012,114: 239-242.
- [4] Camara B, Ly B A, Faye P M, et al. Tuberculosis meningitis in a Senegalese pediatric hospital: report of 14 cases[J]. Arch Pediatr, 2008,15(3):322.
- [5] Cochran J B, Tecklenburg F W, Turner R B. Intrapleural instillation of fibrinolytic agents for treatment of pleural empyema[J]. Pediatr Crit Care Med, 2003,4(1):39-43.
- [6] 杜卫华. 椎管内注药辅助治疗结核性脑膜炎68例临床分析[J]. 中国防痨杂志, 2007,29(2):178-179.
- [7] Johnson M D, Reeder J E, et al. CIP<sub>2</sub>A and PP<sub>2</sub>A in human leptomeninges, arachnoid granulations and meningiomas[J]. J Clin Neurosci, 2014,21(12): 2228-32.