

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)09-0838-03

脊髓爆震伤后早期脊髓前角运动神经元的形态学变化

于杰¹, 罗卓荆¹, 张雪非³, 徐新智¹, 吕荣¹, 陈良为², 耿丹¹ (第四军医大学¹ 西京医院全军骨科研究所² 基础部神经生物教研室 陕西 西安 710033, ³解放军第359医院骨科 江苏 镇江 212000)

Early morphological changes of anterior horn motor neurons after explosive injury of spinal cord

YU Jie¹, LUO Zhuo-Jing¹, ZHANG Xue-Fei³, XU Xin-Zhi¹, LÜ Rong¹, CHEN Liang-Wei², GENG Dan¹

¹Chinese PLA Institute of Orthopedics, Xijing Hospital, ²Department of Neurobiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ³Department of Orthopedics, Chinese PLA 359 Hospital Zhenjiang 212000, China

【Abstract】 AIM: To establish an animal model with explosive injury of spinal cord, and to explore the early morphological changes of anterior horn motor neurons after explosive injury of spinal cord. **METHODS:** Thirty-six rabbits were randomly divided into control group (Group A, $n=12$), 6 h experimental group (Group B, $n=12$) and 24 h experimental group (Group C, $n=12$). Group B and C were injured with 0.9 g cyclotrimethylene trinitramine, and 6 h and 24 h after trauma, the injured spinal cords were taken for observation of the morphological changes and apoptosis of spinal motor neurons using HE staining, toluidine blue staining and Cajal staining under light microscopes. **RESULTS:** The reversible change of the neurons of the rabbits happened after 6 h, and some neurons was observed dead, the mean of the death being 12.58 ± 2.23 ; 24 h after trauma, a great quantity of neurons were observed dead, the mean of the death being 31.52 ± 2.69 , which differed significantly from that in the control group ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** Most of the damage is reversible within 6 h after trauma, therefore the early discovery and treatment should be emphasized.

【Keywords】 spinal cord injury; blast injuries; spinal cord; neuron; morphology

【摘要】目的 建立脊髓爆震伤动物实验模型,探讨脊髓爆震伤后早期脊髓前角运动神经元形态学变化。方法 将36只家兔随机分为对照组(A组, $n=12$)、6 h实验组(B组, $n=12$)及24 h实验组(C组, $n=12$)。采用0.9 g单质金属炸药黑

索金(RDX)将B、C组家兔炸伤,分别于伤后6 h及24 h两个时间点取材,进行HE染色、甲苯胺蓝染色及银浸染色,观察脊髓神经元形态学改变。结果 脊髓爆震伤后6 h脊髓运动神经元发生可逆性改变,部分神经元坏死,死亡均数为 12.58 ± 2.23 ,而伤后24 h脊髓运动神经元大量坏死,死亡均数达到了 31.52 ± 2.69 ,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 脊髓爆震伤后6 h内脊髓运动神经元以可逆性改变为主,提出早期发现和治疗的必要性。

【关键词】 脊髓损伤; 爆震伤; 脊髓; 神经元; 形态学

【中图分类号】 R361+.2 **【文献标识码】** A

0 引言

在近、现代战争中脊柱、脊髓火器伤的发生率约占到所有战伤的0.3%~4.6%,而其中约有78%是爆炸性武器造成的^[1],爆震伤已经成为战争中脊柱、脊髓损伤的主要原因。脊柱、脊髓爆震伤的致残率高、后遗症多,因此它在战伤的救治中占有重要的地位。由于目前国内、外有关这方面的研究报道较少,沿用多年的救治措施和理论已不能适应现代化战伤的救治工作。脊髓爆震伤的发生机制与日常的急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)不同,我们采用RDX局部爆震的方法研究脊髓爆震伤后早期脊髓神经元的病理生理变化,为临床有针对性的研究治疗方案提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康家兔46只,体质量1.5~2.1 kg,雌雄不拘,由解放军第359医院动物实验中心提供。爆炸物采用单质金属炸药黑索金(cyclotrimethylene trinitramine, RDX),由南京工程兵技术学院提供。丹麦丹迪公司的Keypoint 4C型诱发电位仪及莱卡LA全自动显微镜配美国Pixera 600c数码摄像头彩色病理图文分析系统,由第四军医大学西京医院全军骨科研究所实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 动物制模及分组 随机挑出10只家兔,称重后,肌肉注射安定1 mg/kg,腹腔注射氯胺酮4 mg/kg麻醉,将其俯卧固定于实验台上, RDX制作成铜壳圆

收稿日期 2005-11-23; 接受日期 2006-01-09

通讯作者: 罗卓荆. Tel (029) 84775285 Email zjluo@fmmu.edu.cn

作者简介: 于杰. 硕士生(导师罗卓荆). Tel (029) 84775288

Email hall21@sohu.com

柱状小型爆炸装置,炸药包固定于其背部胸椎正上方约平肩胛骨下角平面,距离其背部皮肤约5.5 cm。电击引爆,爆后检测其呼吸及心率,使用诱发电位仪刺激后肢胫后神经的体感诱发电位(T-SEPs)检查其下肢的运动情况。纳入标准为存活,双下肢T-SEPs消失。家兔背部仅伤及皮肤、皮下组织,无穿透伤。最后确定炸药量为0.9 g,爆炸距离5.5 cm等数据符合标准,且稳定性及重复性好。将36只家兔随机分为对照组(A组),6 h实验组(B组)及24 h实验组(C组),每组12只。

1.2.2 标本取材及处理 采取上述方法对实验组(B、C组)家兔分别进行集中爆震后,符合标准的纳入观察组,伤后给予耳静脉输入生理盐水,速度为5 mL/kg/h, A组仅仅给予静脉输入生理盐水,不爆震。伤后6 h及24 h分别处理A、B、C组家兔,再次给予腹腔麻醉后,打开胸腔,拨开心包膜,显露心脏,剪开右心房放出血液,再剪开左心室将灌注头插入主动脉,先输入生理盐水约750 mL,再注入灌注40 g/L多聚甲醛液约2500 mL,直至其肢体僵硬。翻身,以爆震中心点为标志,解剖出胸段脊髓约2 cm,固定于40 g/L的多聚甲醛溶液中。每份标本分为两份,一份制作为冰冻切片,厚15 μm ,采用银浸染色法染色。另一份制作为石蜡切片,厚度为6 μm 、8 μm ,分别采用苏木素-伊红染色及甲苯胺蓝染色。实验中共有6只家兔被排除出实验组,其中4只(A组1只, B组1只, C组2只)于伤后2 h内死亡,经分析死于爆炸后肺部的空腔脏器损伤。另有2只家兔(B组1只, C组1只)伤后T-SEPs检查出现了M形波,经过分析确定有动作电位出现。

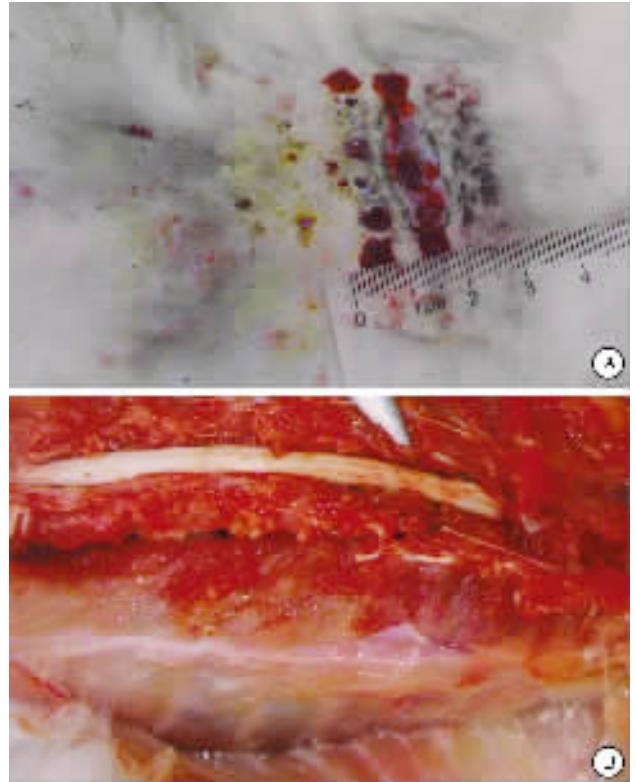
1.2.3 细胞形态观察及计量 每只家兔分别取出3张切片,在光学显微镜下观察,并使用莱卡LA全自动显微镜配美国Pixera 600c数码摄像头彩色病理图文分析系统取靠近前角的视野拍照,观察脊髓前角特定视野下运动神经元的形态变化及数量。由实验人员手工分类计数,计算平均每张切片的神经元数量,对视野周边部“压边”的细胞,计左不计右,计上不计下。

统计学处理:所得实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行统计分析,方差齐同时采用方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验,方差不齐时采用Kruskal-Wallis检验,多重比较采用Nemenyi,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 伤后动物大体形态改变 伤后家兔表面皮毛脱

落的平均范围为7.7 cm^2 ,皮下组织均未外露(图1A)。皮下筋膜层及肌肉层明显淤血,平均范围21.9 cm^2 ,部分肌肉、韧带断裂,棘突或椎板骨折,椎管内及周围组织均可见出血,脊髓有水肿(图1B)。



A 体表损伤情况。体表损伤比较轻微,仅有皮毛的脱落及部分挫伤;
B 脊髓及周围组织损伤情况。可见明显出血、水肿。

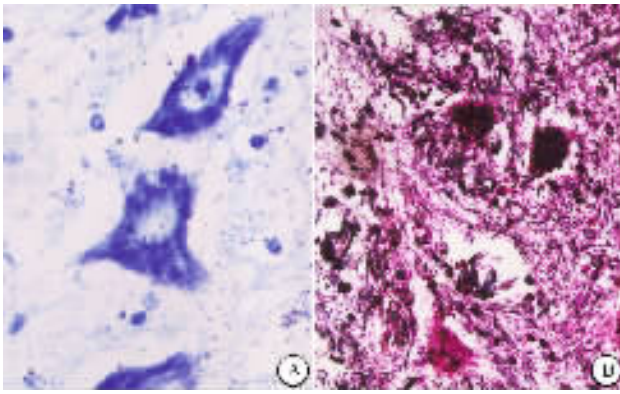
图1 爆震伤后家兔大体形态变化

2.2 爆震对家兔脊髓前角神经细胞形态学变化观察

光镜下观察结果显示,伤后6 h时部分神经元失去极性外观,变为椭圆形或三角形,尼氏小体表现为中央型溶解,细胞核水肿,偏位,个别细胞核破裂,一些树突或轴突淡染、不完整,少部分细胞明显肿胀、破裂甚至坏死(图2A)。伤后24 h镜下改变则比较明显,大量细胞肿胀、破裂,边界不清或萎缩、消失,原位置形成空泡样结构,尼氏小体崩解、消失,胞浆呈均匀嗜伊红着色,胞核固缩、碎裂、溶解,突起消失(图2B)。

2.3 不同染色观察神经元数量变化

2.3.1 存活神经元的计数分析 各组正常神经元的平均值见表1。伤后6 h,各组家兔脊髓的前角正常运动神经元数量相差不大,无统计学意义;伤后24 h, A组的正常神经元极少,在各组中是最少的,与B、C组相比,差异显著($P < 0.001$),而B、C组之间, C组的数量略少于B组,但经分析,无统计学意义($P > 0.05$)。



A. 伤后 6 h 以可逆性改变为主, 尼氏小体表现为中央性溶解(甲苯胺兰染色 $\times 400$) B. 伤后 24 h 绝大部分神经元坏死(银浸染色 $\times 200$).

图 2 伤后神经元光镜下观察

表 1 各组存活神经元数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 苏木素-伊红染色 | 甲苯胺兰染色 | 银浸染色 |
|----|----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A | 11 | 24.62 \pm 2.31 | 24.36 \pm 2.17 | 25.21 \pm 2.73 |
| B | 10 | 20.23 \pm 1.53 ^b | 21.85 \pm 1.87 ^b | 22.77 \pm 1.96 ^a |
| C | 9 | 2.16 \pm 0.13 ^{bc} | 2.21 \pm 0.18 ^{bc} | 3.62 \pm 0.91 ^{bc} |

^a $P < 0.05$ vs A ; ^b $P < 0.01$ vs A ; ^c $P < 0.01$ vs B.

2.3.2 死亡神经元的计数分析 各组死亡神经元的平均值见表 2. 在伤后 6 h, 各组家兔脊髓的前角坏死神经元 A 组的比 B, C 组略多, 但经分析无统计学意义, 伤后 24 h A 组的坏死神经元最多, 与 B, C 组相比, 差异显著 ($P < 0.01$), C 组的坏死神经元多于 B 组, 但无统计学意义.

表 2 各组死亡神经元数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 苏木素-伊红染色 | 甲苯胺兰染色 | 银浸染色 |
|----|----|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| A | 11 | 8.03 \pm 1.78 | 8.21 \pm 1.69 | 9.35 \pm 1.91 |
| B | 10 | 12.58 \pm 2.23 ^b | 12.37 \pm 2.42 ^b | 13.58 \pm 2.71 ^b |
| C | 9 | 31.52 \pm 2.69 ^{bc} | 31.59 \pm 2.69 ^{bc} | 32.5 \pm 2.69 ^{bc} |

^b $P < 0.01$ vs A ; ^c $P < 0.01$ vs B.

3 讨论

为了减少染色方法及操作技术对实验结果的影响, 实验中采用苏木素-伊红染色、甲苯胺兰染色以及银浸染色三种方法对切片进行染色, 分别进行统计. 脊髓爆震伤与日常的 ASCI 相比在发生机制和损伤方面有着很大的不同. 日常 ASCI 是由于脊柱损伤后, 骨折或脱位造成的压迫引起的, 治疗重点是解除压迫和稳定脊柱. 而脊髓爆震伤是由于爆震后冲击

波在体外内产生压力的变化, 压力的改变转化成能量通过传递作用于脊髓, 使得脊髓被剧烈震荡, 从而产生了一系列的病理改变^[2], 它治疗的重点在于防治脊髓的进一步继发性损伤.

据报道, 脊柱脊髓火器伤以胸椎最多^[1], 所以选择胸椎作为致伤节段. 我们在实验中发现伤后 6 h, 运动神经元在光学显微镜下已经可以观察到形态上的变化, 可以借助尼氏小体的改变来间接判断神经细胞的情况^[3], 此时发生改变的神细胞中观察到的是胞浆中央部分尼氏小体消失, 细胞核增大, 占据了原来尼氏小体的位置, 而周边部的尼氏小体未发生明显的变化, 即中央型尼氏小体溶解, 这是一种可逆性的改变, 一旦损伤因素得到及时的纠正, 这种改变是可以通过自身的修复而复原, 因此它表现出来的是功能性改变多于结构性改变. 与之相比较 24 h 后观察发现视野中大部分神经细胞已经坏死, 很难发现正常的神经元, 发展到了这一阶段, 神经细胞已经发生不可逆的改变. 这种改变与普通的 ASCI 脊髓组织的形态改变相比表现的更加明显^[4]. 这也与颅脑爆炸伤的研究结果相似^[5].

关于脊髓爆震伤方面的研究在国内外的文献中报道较少. 本实验的研究结果提示我们: ①在战场上, 爆震伤后早期不能仅仅根据伤员体表的损伤情况来判断伤情, 因为爆震伤后体表的损伤往往比较轻微, 不能体现出脊髓损伤的真实情况; ②如果能早期判断伤情, 并采取一定的急救措施, 及时分类后送, 在尽可能短的时间内积极治疗, 对于伤员后期的功能恢复具有重要的意义; ③在实验中发现伤后仍然有一定数量的细胞发生了凋亡, 在目前还没有更好的方法使神经细胞再生的情况下, 如果能早期采取措施减轻神经细胞的坏死程度, 那么对于保留伤员的脊髓功能将会有重要的意义.

【参考文献】

- [1] 梁朝革, 陈长青, 贾连顺, 等. 脊柱脊髓火器伤[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(5): 313-315.
- [2] Cooper GJ. Protection of the lung from blast overpressure by thoracic stress wave decouplers[J]. Trauma, 1996, 40(3 Suppl): S105.
- [3] 梁晓俐. 病理学基础与实验技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2004: 152.
- [4] 方健, 陈文笔, 严家春, 等. 脊髓损伤大鼠脊髓组织的病理形态学观察[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 10(10): 996-998.
- [5] 侯立军, 张光霁, 朱诚, 等. 犬颅脑爆炸伤后早期脑组织病理改变[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(12): 1105-1107.

编辑 杨湘华