

· 基础研究 ·

脊髓损伤大鼠远端运动神经元继发性损害的变化特点

王瑾 王红星 王彤

【摘要】目的 探讨脊髓损伤大鼠远端运动神经元继发性损害的变化特点。**方法** 成年雌性 SD 大鼠 40 只,采用改良 Allen's 撞击法制作 T₁₀ 不完全性脊髓损伤模型。分别在损伤前、损伤后第 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周时采用斜板试验、改良 Tarlov 评分、BBB 评分进行运动功能评定;在各时间点取 5 只大鼠用 4% 多聚甲醛心脏灌注,取损伤局部 T₁₀ 节段及损伤远端 L₅ 节段脊髓进行形态学检测。损伤前时间点检测结果作为正常对照。**结果** ①损伤远端运动神经元病理变化:损伤后第 1 周时,损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体有所减少,胞核和核仁无明显改变;损伤后第 2 周时,损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体进一步减少,核仁模糊、偏位;损伤后第 3 周时,损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体较前无进一步减少,组织内可见萎缩及凋亡神经元;损伤后第 4 周时,损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体较第 3 周时有所增加,仍可见少数凋亡神经元存留;损伤后第 5 周时,损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体较前明显增多。②损伤局部病理变化:损伤后第 1 周时,损伤局部灰、白质界限不清,可见出血、炎症反应,灰质部分神经纤维及组织坏死、液化,白质空泡化;损伤后第 2 周时,损伤局部出血、水肿及炎症反应减退,可见胶质细胞、神经纤维增生和血管新生;损伤后第 3 周时,损伤局部胶质细胞增生显著,神经纤维增生较多;损伤后第 4 周、第 5 周时,损伤局部胶质细胞、神经纤维较前无明显增生。③运动功能变化:损伤后第 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周时的斜板角度、改良 Tarlov 评分、BBB 评分均较损伤前显著降低 ($P < 0.05$);损伤后第 2 周、3 周、4 周、5 周时各项评分均较第 1 周时显著增加 ($P < 0.05$);损伤后第 3 周、4 周、5 周时呈增加趋势,但与第 2 周时比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 脊髓损伤后早期远端脊髓运动神经元即会发生继发性损害,包括突起和尼氏体减少、细胞萎缩与凋亡,并且与损伤局部病理变化及损伤时程相关。

【关键词】 脊髓损伤; 运动神经元; 继发性损害

Changes in secondary lesions to motor neurons caudal to the injury site of spinal cord in rats WANG Jin*, WANG Hong-xing, WANG Tong. * Department of Rehabilitation Medicine, The 1st Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: WANG Tong, Email: Wangtong60621@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the changes in secondary lesions to motor neurons caudal to a damage site on the spinal cord of rats. **Methods** Forty female adult Sprague-Dawley rats were given incomplete spinal cord injuries (SCIs) at the T10 level using a modification of Allen's method. Locomotor function was evaluated using an inclined plane test, modified Tarlov scores and the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale before the operation and 1, 2, 3, 4 and 5 weeks post surgery. Histomorphological changes at T₁₀ and L₅ were observed under a light microscope. **Results** ①Morphology of the distal spinal cord: 1 week after SCI, neurites and Nissl bodies of the motor neurons had decreased. By the 2nd week the decrease had become more obvious. At the 3rd week after SCI, neurites and Nissl bodies had not decreased further, but neuron atrophy and apoptosis were found. At the 4th to the 5th week after SCI, neurites and Nissl bodies had increased significantly. ②Morphology of the damage site: At the 1st week after SCI, hemorrhage and inflammation as well as nerve fiber necrosis were observed. By the 2nd week astrocytes had increased and a few nerve fibers had grown at the damage site. At the 3rd week, regeneration of nerve fibers and astrocytes were found. At the 4th to the 5th week after SCI astrocytes and nerve fibers had not increased further. ③Locomotion function: The angles of the inclined plane test, Tarlov scores and BBB scores had decreased significantly at the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th week post injury compared with those before the SCI. The values at the 2nd, 3rd, 4th and 5th week were all significantly better than those at the 1st week after SCI. There was an increasing trend in scores

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.10.001

基金项目:江苏省兴卫工程重点人才项目([2007]200)

作者单位:210029 南京,南京医科大学第一附属医院康复医学科

通信作者:王彤,Email:Wangtong60621@yahoo.com.cn

from the 3rd week to the 5th week, but without significant differences compared with the 2nd week after the operation. **Conclusions** Secondary degeneration and damage, including decreases in neurites and Nissl bodies, neuron atrophy and apoptosis may occur in the motor neurons distal to the damage site in the early stage after SCI. This correlates with changes in the pathology of local damage.

【Key words】 Spinal cord injury; Motor neurons; Secondary lesions

损伤远端脊髓运动神经元 (motoneuron distal to the damaged spinal cord, MDDSC) 作为脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后神经传导通路建立的重要环节, 其功能状态是决定 SCI 后功能恢复的关键因素。但目前的研究均致力于损伤局部脊髓功能变化及如何实现神经再生跨过损伤断端, 忽视了损伤远端脊髓功能的变化。有研究提示, SCI 后由于远端脊髓失去上位中枢联系而会发生继发性损害^[1-4]。本研究拟通过观察大鼠 SCI 后不同时间损伤脊髓远端运动神经元继发性损害特点和规律, 为损伤远端继发性损害的预防和治疗提供依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

健康雌性 SD 大鼠 40 只, 体重 (280 ± 20) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [许可证号 SCXK(沪)2003-0003]。饲养环境温度 20 ~ 24℃, 相对湿度 50%, 自由饮食, 分笼喂养。

40 只大鼠在模型制作过程中及术后 (泌尿系统感染、肠胀气等原因) 共死亡 10 只剔除, 余下 30 只纳入实验, 将其分为损伤前 (正常对照组)、损伤后 1 周、2 周、3 周、4 周和 5 周组, 每组 5 只。

二、脊髓损伤模型制作^[5-6]

采用 5% 水合氯醛 (0.4 ml/100 g 体重) 腹腔注射麻醉成功后, 将大鼠俯卧位固定, 暴露 T₉ 椎骨棘突, 用止血钳咬去棘突及椎板, 暴露硬脊膜, 然后将大鼠固定于立体定位器上, 使脊柱处于水平位。采用改良 Allen's 撞击法, 在脊髓背侧面放置一金属垫片作为打击板, 将 10 g 的砝码自 4 cm 高度垂直落下撞击打击板致大鼠不完全脊髓损伤, 以术后鼠尾痉挛性摆动、双下肢瘫痪为制模成功的标志。术后 1 ~ 3 d 每天予青霉素 20 万 u/只, 肌肉注射, 预防感染。并于术后每日上、下午各进行 1 次膀胱按摩以协助其排尿, 直至建立排尿反射。

三、运动功能评定

分别于损伤前、损伤后 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周时对各组大鼠进行运动功能评定。评定时间均统一为上午 8:00 开始。评定均为 2 人合评。具体评定内容包括以下方面:

1. Rivlin 斜板试验^[7]: 将实验大鼠置于光滑的木

板上, 其身体轴线与平板纵轴平行, 平板每次升高 5°, 以大鼠能停留 5 s 不下滑的最大角度为其功能值。

2. 改良 Tarlov 评分^[8]: 0 分——后肢无活动, 不能负重; 1 分——后肢可见活动但不能负重; 2 分——后肢活动频繁或有力, 不能负重; 3 分——后肢可支持体重, 能走 1 ~ 2 步; 4 分——可行走, 仅有轻度障碍; 5 分——行走正常。

3. BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) 评分^[9]: 将大鼠后肢运动分为 22 个等级, 其中后肢全瘫为 0 分, 功能完全正常为 21 分, 其基本观察内容包括关节活动的数目和范围、负重程度及前后肢协调性、前后爪和尾部活动情况。

四、形态学检查

在损伤前、损伤后 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周分别取 5 只大鼠, 5% 水合氯醛麻醉大鼠后, 采用 4% 多聚甲醛经心脏灌注固定, 取大鼠 T₁₀ 和 L₅ 节段脊髓, 常制成石蜡切片, 行 HE 染色, 采用光镜进行形态学观察。

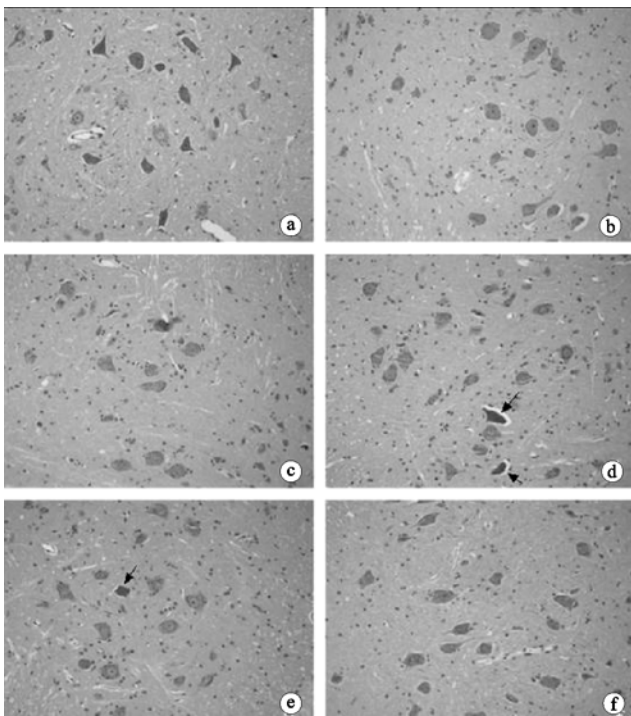
五、统计学分析

采用 SPSS 17.0 版本软件进行数据统计分析, 所得数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数比较用 *t* 检验, 多组均数比较用 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、损伤远端病理变化

损伤后 1 周时, 损伤远端前角运动神经元较正常对照染色变淡, 突起和尼氏体有所减少, 胞核和核仁无明显改变; 损伤后 2 周时, 损伤远端前角运动神经元胞体萎缩, 突起和尼氏体进一步减少, 核仁模糊、偏位; 损伤后 3 周时, 损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体较前无进一步减少, 组织内可见萎缩及凋亡神经元 (箭头所示), 表现为细胞体积缩小, 胞质和胞核固缩深染, 与组织形成间隙; 损伤后 4 周时, 损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体较 3 周时有所增加, 仍可见少数凋亡神经元存留 (箭头所示); 损伤后 5 周时, 损伤远端前角运动神经元突起和尼氏体较前明显增多。正常对照大鼠损伤远端脊髓形态正常, 前角运动神经元未见突起和尼氏体减少, 未见凋亡神经元。详见图 1。



注:图 1a 为正常对照,示脊髓前角运动神经元形态正常,未见突起和尼氏体减少,未见凋亡神经元;图 1b 示损伤后 1 周时,前角运动神经元较对照组染色变淡,突起和尼氏体有所减少,胞核和核仁无明显改变;图 1c 示损伤后 2 周时,可见前角运动神经元萎缩、突起和尼氏体进一步减少,核仁模糊、偏位;图 1d 示损伤后 3 周时,前角运动神经元突起和胞质内尼氏体较前无进一步减少,组织内可见萎缩及凋亡神经元,表现为细胞体积缩小,胞质和胞核固缩深染,与组织形成间隙(箭头所示);图 1e 示损伤后 4 周时,前角运动神经元突起和尼氏体较前有所增加,仍可见少数凋亡神经元存留(箭头所示);图 1f 示损伤后 5 周时,前角运动神经元突起和尼氏体较前明显增多

图 1 大鼠不同时间点损伤远端运动神经元形态学变化(HE 染色, ×200)

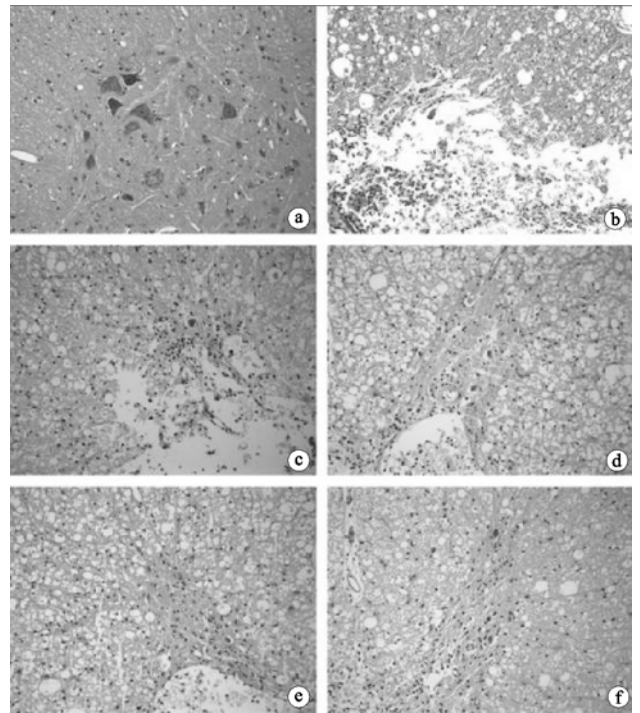
二、损伤局部病理变化

损伤后 1 周时,损伤局部灰、白质界限不清,可见出血、炎症反应,灰质部分神经纤维及组织坏死、液化,白质空泡化;损伤后 2 周时,损伤局部出血、水肿及炎症反应减退,可见胶质细胞、神经纤维增生和血管新生;损伤后 3 周时,损伤局部胶质细胞增生显著,神经纤维增生较多;损伤后 4 周、5 周时,损伤局部胶质细胞、神经纤维继续增生,但较前增生不明显。正常对照大鼠损伤局部脊髓形态正常。详见图 2。

三、运动功能结果分析

损伤后 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周时的斜板角度、改良 Tarlov 评分、BBB 评分均较损伤前降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);损伤后 2 周、3 周、4 周、5 周时各项评分均较 1 周时增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但仍低于损伤前水平($P < 0.05$);损伤后 3 周、4 周、5 周时呈增加趋势,但与 2 周时比较差异无统计

学意义($P > 0.05$)。详见表 1。



注:图 2a 为正常对照,示脊髓前角形态正常,灰、白质界限分明,运动神经元形态正常;图 2b 示损伤后 1 周时,灰、白质界限不清,可见出血、炎症反应,灰质部分神经纤维及组织坏死、液化,白质空泡化;图 2c 示损伤后 2 周时,组织出血、炎症反应较前减退,可见胶质细胞、神经纤维增生和血管新生;图 2d 示损伤后 3 周时,胶质细胞增生显著,呈条索状,神经纤维增生较多;图 2e ~ 图 2f 示损伤后 4、5 周时,胶质细胞、神经纤维继续增生,但较前增生不明显

图 2 大鼠不同时间点损伤局部形态学变化(HE 染色, ×200)

表 1 各组大鼠运动功能比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	斜板试验(°)	Tarlov 评分(分)	BBB 评分(分)
损伤前组	5	38.53 ± 2.16	5.00 ± 0.01	21.00 ± 0.01
损伤后 1 周组	5	28.82 ± 3.53 ^a	1.92 ± 0.63 ^a	8.12 ± 4.57 ^a
损伤后 2 周组	5	32.48 ± 3.76 ^{ab}	2.43 ± 0.72 ^{ab}	14.53 ± 4.62 ^{ab}
损伤后 3 周组	5	32.72 ± 2.56 ^{ab}	2.91 ± 0.97 ^{ab}	15.42 ± 4.01 ^{ab}
损伤后 4 周组	5	32.81 ± 2.58 ^{ab}	2.93 ± 0.98 ^{ab}	15.47 ± 5.96 ^{ab}
损伤后 5 周组	5	32.93 ± 2.57 ^{ab}	2.95 ± 0.93 ^{ab}	15.50 ± 5.82 ^{ab}

注:与损伤前组比较,^a $P < 0.05$;与损伤后 1 周组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

自 20 世纪 80 年代证明中枢神经能够再生以来,SCI 治疗的实验研究聚焦于如何促进神经再生并跨过损伤断端,重建神经传导通路。尽管细胞移植和基因治疗能在一定程度上促进神经生长并跨过损伤断端,但新生神经能否与损伤远端神经重建传导通路,则取决于损伤远端神经元的功能状态。临床观察发现,部分 SCI 患者损伤平面以下相应肌肉表现为肌张力低下、肌肉萎缩的下运动神经元损害特点,而非上运动神

神经元性损伤特征。同时肌电图检查提示损伤平面以下相应肌肉呈现神经源性损害,神经传导示运动神经轴索损害,而感觉神经传导正常^[2-4]。提示 SCI 后 MDDSC 发生了继发性损害。相关研究结果也表明,SCI 后损伤远隔部位存在运动神经元萎缩、凋亡^[10-11]。但这种继发性损害的特点和时间规律尚不清楚。本研究即通过观察大鼠 SCI 后不同时间 MDDSC 继发性损害特点和规律,为 MDDSC 继发性损害的预防和治疗提供依据。

本研究发现,大鼠 SCI 后 1 周,MDDSC 开始出现突起和尼氏体的减少,2 周时突起和尼氏体进一步减少。而损伤局部在 1~2 周时出现出血、炎症反应,灰质部分神经纤维及组织坏死、液化。提示损伤局部的神经纤维断裂使损伤远端脊髓失去上位中枢的营养支持,而出现运动神经元的退变。此外,有研究表明,末端肌肉运动能为运动神经元提供反馈性营养因子^[12]。本研究在 SCI 后 1~2 周内下肢运动功能丧失或减少,导致反馈性分泌神经营养因子营养 MDDSC 的作用减小也是其中机制之一。

自第 3 周开始损伤远端部分运动神经元出现萎缩、凋亡等慢性变化。提示营养中断以后 MDDSC 出现的慢性表现。但同时损伤局部血肿、炎症的减退,并出现神经纤维、胶质细胞增生。而且运动功能的改善促进了肌肉分泌神经营养因子而增强对 MDDSC 的营养作用,使损伤后早期的 MDDSC 突起和尼氏体的减少等变化无进一步加重。

至第 4,5 周时,MDDSC 凋亡已基本完成,未发生凋亡的神经元突起和尼氏体有所增加。而损伤局部神经纤维、胶质细胞继续增生。提示随着损伤局部的修复及未受损神经纤维出芽形成侧支营养支配的神经元而产生代偿作用^[13]。同时 4~5 周时运动功能有了更大程度的改善,使肌肉分泌神经营养因子对 MDDSC 的营养作用进一步加强。

此外,有研究发现,MDDSC 继发性损害具有长期性、广泛性和滞后性的特点^[14]。但由于本实验采用的是不完全性脊髓损伤模型,而且本研究仅观察了 SCI 后 5 周内单一节段脊髓的变化,尚不能明确 MDDSC 继发性损害的长期性、广泛性及滞后性的特点,尚需进一步研究。

临床研究发现,SCI 患者运动训练后远端肌肉神经源性损害程度减轻^[13]。实验研究也提示,运动训练后 MDDSC 萎缩程度减轻、树突无明显减少^[11]。进一

步表明运动训练与 MDDSC 继发性损害的相关性,为远端脊髓继发性损害的干预提供了依据。

综上所述,脊髓损伤后早期 MDDSC 即会发生继发性损害,包括突起及尼氏体减少、细胞萎缩与凋亡,并且与损伤局部病理变化及损伤时程相关。

参 考 文 献

[1] Moon L, Bunge MB. From animal models to humans: strategies for promoting CNS axon regeneration and recovery of limb function after spinal cord injury. *J Neuro Phys Ther*, 2005, 29:55-69.

[2] Dietz V, Müller R. Degradation of neuronal function following a spinal cord injury: mechanisms and countermeasures. *Brain*, 2004, 127: 2221-2231.

[3] Lin CS, Macefield VG, Elam M, et al. Axonal changes in spinal cord injured patients distal to the site of injury. *Brain*, 2007, 130: 985-994.

[4] Nogajski JH, Engel S, Kiernan MC. Focal and generalized nerve dysfunction in spinal cord-injured patients. *J Clin Neurophysiol*, 2006, 23:273-279.

[5] 王红星,徐冬晨,姚莉,等. 脊髓损伤大鼠运动及神经功能自然恢复规律的探讨. *中华物理医学与康复杂志*,2008,30:433-436.

[6] 徐冬晨,王红星,雷晓婷,等. 运动训练对脊髓损伤大鼠运动及神经功能恢复的影响. *中华物理医学与康复杂志*,2010,32:9-12.

[7] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*,1996,273:510-513.

[8] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in rat. *J Neurosurg*,1977,47: 577-581.

[9] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*,1995,12: 1-21.

[10] Wrigley PJ, Gustin SM, Macey PM, et al. Anatomical changes in human motor cortex and motor path ways following complete thoracic spinal cord injury. *Cereb Cortex*, 2009,19:224-232.

[11] Gazula VR, Roberts M, Luzzio C, et al. Effects of limb exercise after spinal cord injury on motor neuron dendrite structure. *J Comp Neurol*, 2004,476:130-145.

[12] Sieck GC, Mantilla CB. Role of neurotrophins in recovery of phrenic motor function following spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009,169:218-225.

[13] Burns AS, Boyce VS, Tessler A, et al. Fibrillation potentials following spinal cord injury: improvement with neurotrophins and exercise. *Muscle Nerve*, 2007,35: 607-613.

[14] Laird AS, Wu A, Lauschke JL. Changes in motoneuron properties following spinal cord transection: does afferent input play a role? *J Physiol*, 2008, 586: 3031-3032.

(修回日期:2010-08-21)
(本文编辑:松 明)