文章编号:1000-5404(2010)03-0269-05

论著

吴茱萸碱刺激的负载脊髓匀浆蛋白DCs促进小鼠脊髓损伤的修复

王 科[1],赵建华[1],梁华平[2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:骨科[1],第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨吴茱萸碱(evodiamine,EVO)刺激的负载脊髓匀浆蛋白(homogenate protein of spinal cord,hp)树突状细胞(hpDCevo)对小鼠脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)的促修复作用及其机制。**方法** SCI后24 h给予治疗,随机分6组:分别腹腔注射PBS、EVO、未成熟DC(DCs)、经EVO刺激的DCs(DCevo)、负载hp的DC(hpDC)、hpDCevo。利用BMS功能评分及组织病理学方法,观察hpDCevo对小鼠脊髓损伤神经功能恢复和局部瘢痕等病理学改变的影响。ELISA法测定SCI损伤局部组织和T细胞培养上清中的脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)、神经营养因子-3(Neurotrophin-3,NT-3)、白介素-12(interleukin-12,IL-12)、粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)的含量。**结果** 注射后第84天,hpDCevo组BMS评分明显高于hpDC组和其余各组($P<0.05$)。组织病理学结果显示,hpDCevo组较其他组空洞和瘢痕缩小。损伤局部组织中的BDNF、NT-3、GM-CSF、IL-12含量为hpDCevo组高于hpDC组和其余各组($P<0.05$);T细胞培养上清中的BDNF、GM-CSF为hpDCevo组高于hpDC组和其余各组($P<0.05$)。**结论** hpDCevo对小鼠SCI修复有促进作用,其机制可能是通过上调损伤局部的BDNF、NT-3、GM-CSF、IL-12来实现的。

[关键词] 脊髓损伤;树突状细胞;吴茱萸碱;脊髓匀浆蛋白
[中图法分类号] R285.5; R681.54; R392.3 **[文献标志码]** A

Evodiamine-stimulated dentritic cells of spinal cord homogenate protein promotes repair of spinal cord injury in mice

Wang Ke[1], Zhao Jianhua[1], Liang Huaping[2]([1]Department of Orthopedics, [2]Sate Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of evodiamine (EVO)-stimulated dendritic cells (DC) of spinal cord homogenate protein (hpDC) on repair of spinal cord injury (SCI) in mice. **Methods** Twenty hours after SCI, mice were randomly divided into 6 groups and injected with PBS, EVO, DC, DC + EVO, hpDC and hpDC + EVO. BMS and histopathology were used to observe the effect of hpDC + EVO on the functional recovery of spinal cord injury and pathological changes such as local scars. Levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), interleukin-12 (IL-12) and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in injured sites and supernatant of cultured T cells were measured by ELISA. **Results** Eighty-four days after treatment, the BMS was significantly higher in hpDC + EVO group than in other groups($P<0.05$). Histopathology showed that the cavities and scars were smaller in hpDC group than in other groups. The levels of BDNF, NT-3, GM-CSF, and IL-12 in the injured sites were significantly higher in hpDC + EVO group than in other groups($P<0.05$). The levels of BDNF and GM-CSF in supernatant of cultured T cells were significantly higher in hpDC + EVO group than in hpDC group($P<0.05$). **Conclusion** hpDC + EVO promotes the repair of SCI possibly by up-regulating the BDNF, NT-3, GM-CSF, IL-12 in injured sites.

[Key words] spinal cord injury; dendritic cell; evodiamine; homogenate protein of spinal cord

Corresponding author: Zhao Jianhua, Tel: 86-23-68757937, E-mail: zhaojianhua1964@yahoo.com

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)分为原发性损伤和继发性损伤两个阶段,近年来有研究证实,细胞介导的免疫反应能够抑制脊髓继发性损伤,促进脊髓损伤的修复[1]。Hauben等[2]实验证实,局部和全身注射负载髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)的DCs(mbpDC)能激发免疫系统的神经保护作用,并明显改善SCI动物的后肢运动功能。本课题组前期研究表明,局部和全身注射负载脊髓匀浆蛋白(homogenate

[通信作者] 赵建华,电话:(023)68757937,E-mail:zhaojianhua1964@yahoo.com

protein of spinal cord,hp)的DCs(hpDC)能明显促进小鼠SCI的修复,但是单独应用DC或hp却无治疗作用[3]。EVO是吴茱萸提取物,具有抗炎、镇痛、抗血小板聚集、抗血栓形成、体温调节和保护心脏等功效。近期有研究表明,EVO可以通过调控DC的基因表达而影响其功能、分化和成熟[4]。那么,EVO对hpDCs的调控能力能否在SCI功能恢复中起到有益作用及其机制,目前尚不清楚,本研究拟通过进一步的体内实验,探讨这一问题。

1 材料与方法

1.1 未成熟DCs的制备、EVO刺激及hp负载

未成熟DCs来源于BALB/c小鼠骨髓,参照Lutz法[5]。简要经过如下:取小鼠股骨和胫骨,无菌条件下分离并计数骨髓细胞,浓度1×10^6/ml,以每孔0.5 ml加入6孔培养板,后每孔补加2 ml含10% FCS的RPMI1640。培养基中含GM-CSF,(Perprotech公司,美国)20 ng/ml。在培养第3天每孔补加2.5 ml含10% FCS的RPMI1640,补充GM-CSF(20 ng/ml),第6、8天每孔吸出2.5 ml上清,并补加2.5 ml新鲜含10% FCS的RPMI1640,再次补充GM-CSF(20 ng/ml)。第10天,收集悬浮细胞并离心(经流式细胞仪鉴定为未成熟DCs)。hpDC的制备参照Hauben等[2]的方法:以1×10^6/ml DCs,加入hp(1 μg/μl,Sigma公司,美国)共同培养4 h得到hpDC。DCevo的制备:将DCs加入含有20 μmol/L EVO(Sigma公司,美国)的DC培养基(不添加细胞因子rmGM-CSF)共同培养24 h以得到DCevo。hpDCevo的制备:将hpDC加入含有20 μmol/L EVO的DC培养基共同培养24 h以得到hpDCevo。后用新鲜DC培养基冲洗,冰上保存备用。注射前,细胞离心400 g 5 min,计数并悬浮于PBS(1×10^6/0.3 ml PBS)中。PBS配制20 μmol/L EVO放入4 ℃备用。

1.2 钳夹SCI动物模型的制作

成年BALB/c小鼠120只,雌雄不限(4~6周龄,23~25 g,第三军医大学实验动物中心),参照Fehlings法[6]钳夹T10 3 s,钳夹压力3 g,造成重度SCI损伤模型。致伤后前2周,日常给予协助排尿2次/d。

1.3 治疗干预

损伤24 h后行BMS后肢评分,评分≤1分者入选;并给予治疗。随机分6组,每组20只。PBS治疗组:腹腔注射PBS 0.3 ml;EVO治疗组:腹腔注射EVO 0.3 ml(20 μmol/L);DCs治疗组:腹腔注射DCs 1×10^6个细胞(0.3 ml PBS);DCevo治疗组:腹腔注射DCevo 1×10^6个细胞(0.3 ml PBS);hpDC治疗组:腹腔注射hpDC1 $\times10^6$个细胞(0.3 ml PBS);hpDCevo治疗组:腹腔注射hpDCevo1 $\times10^6$个细胞(0.3 ml PBS)。

1.4 脊髓神经功能评定

动物在钳夹致伤完全清醒后及术后每周或每2周采用BMS评分法双人盲法评分[7]。

1.5 组织病理学制样和观察

分别在注射细胞后84 d,过量麻醉动物,200 ml PBS左心室灌注冲洗血液后,再以100 ml 4 ℃ 4%多聚甲醛灌注固定,以T_{10}节段为中心取长约15 mm的完整脊髓组织,常规石蜡包埋,连续纵行切片(片厚5 μm),HE染色观察损伤区病理变化及病变结构。每例脊髓切片取第5、25、45张分别代表双侧和正中矢状区。采用半定量法测定空洞面积。脊髓边界界定手工完成,自动图像仪计算空白像素区,得出空洞面积。同时测量损伤区长度,手工计算出损伤区面积。

1.6 T细胞的分离

采用尼龙毛柱法分离T细胞。首先处理尼龙毛:以0.2 mol/L盐酸浸泡尼龙毛过夜,用蒸馏水冲洗,37 ℃烘干。其次为尼龙毛柱的制备:将一般半透明聚乙烯塑料管(直径5~6 mm,长16 cm),用加热法封住塑料管一端成45度斜角,称取尼龙毛柱40~70 mg,细致撕开,使其松散而均匀,置于盛有Hanks溶液的平皿中,完全浸透,以小镊子填塞于上述塑料管中,使尼龙毛柱分布均匀。尼龙毛柱高为6 cm。制备好冰冻保存,用时取出融化,预温至37 ℃。取小鼠脾非黏附细胞:T10 SCI的BALB/c小鼠腹腔注射分别注射PBS、EVO、DCs、DCevo、hpDC、hpDCevo后8 d,无菌条件下取出脾脏,300目筛网研磨得到脾细胞悬液,300目筛网和无菌棉球过滤后放入平皿中37 ℃、5% CO_2培养24 h,待贴壁细胞贴壁后收集非贴壁细胞。将前述所得脾脏非黏附细胞,用37 ℃预温的含10% FCS的RPMI-1640稀释为$(1\sim2)\times10^7$/ml,加在37 ℃预温的尼龙毛柱上,37 ℃,5% CO_2培养30 min,用预温的RPMI1640轻轻洗柱,洗出的非黏附细胞悬液为要收集的T细胞。

1.7 ELISA实验

1.7.1 损伤局部组织匀浆中BDNF、NT-3、GM-CSF、IL-12检测

T10 SCI小鼠治疗后8 d,提取损伤部位的总蛋白,参照Yaguchi等[8]的方法并稍做改进。简要经过如下:将以损伤部位为中心的0.5 cm长的脊髓组织取出,每100毫克组织加入含有1%蛋白酶抑制剂的细胞裂解液1 ml中(含1% PMSF的RIPA,上海博彩生物,中国),玻璃匀浆器匀浆后,超声乳化仪乳化(30 s/次×5次),4 ℃、15 000 r/min,离心20 min。收集上清分光光度仪测定总蛋白浓度。后以每孔100 μg总蛋白加入酶标板,按说明书测定(武汉博士德,中国)。

1.7.2 体外T淋巴细胞培养上清中BDNF、NT-3、GM-CSF、IL-12的检测

T_{10} SCI小鼠治疗后8 d,将BALB/c小鼠脾脏T淋巴细胞取出(方法如1.6所述),悬浮后以2×10^6/孔加入12孔培养板,72 h后取培养基上清,按说明书测定(武汉博士德,中国)。

1.8 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件。BMS评分采用两因素重复检验的方差分析。SCI瘢痕和空洞面积、ELISA实验结果采用单因素方差分析。

2 结果

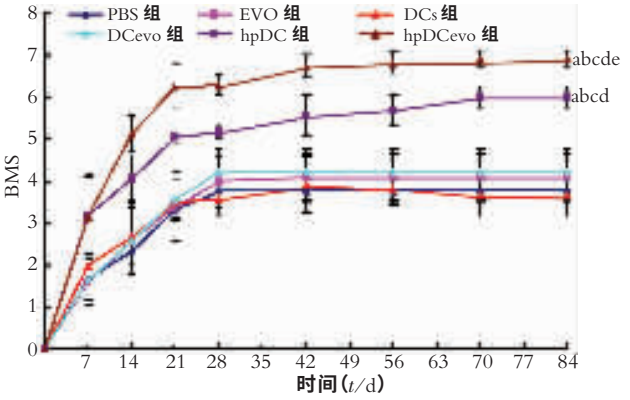
2.1 一般情况

治疗84 d后,PBS、EVO、DCs、DCevo、hpDC、hpDCevo组分别存活16、16、18、17、20、18只。死亡原因主要为手术创伤和SCI导致阴茎嵌顿坏死继发全身感染及其他泌尿系感染。存活小鼠SCI后双下肢呈痉挛性瘫痪,小鼠能以双前肢活动,觅食;背部切口无感染、坏死等并发症。

2.2 hpDCevo明显促进SCI小鼠神经功能恢复

创伤后所有小鼠均出现典型截瘫表现。hpDCevo组和

hpDC 组功能恢复较 PBS、EVO、DCs、DCevo 组改善明显，但 hpDCevo 组优于 hpDC 组。自治疗后 14 d 6 组间出现明显 BMS 评分差异（$P<0.05$），其后逐渐增大。PBS、EVO、DCevo、DCs 组治疗后 28 d 进入平台期，而 hpDCevo 组和 hpDC 组 BMS 评分继续升高，于 42 d 进入平台期，但 hpDCevo 组明显优于 hpDC 组（$P<0.05$）。治疗后 84 d，PBS、EVO、DCs、DCevo、hpDC、hpDCevo 治疗组的 BMS 评分分别为（3.75 ± 0.27）、（4.10 ± 0.55）、（3.70 ± 0.52）、（4.21 ± 0.57）、（6.00 ± 0.27）、（6.92 ± 0.22）。在治疗后 28、56、84 d，hpDCevo 组与其他各组均有明显差异（$P<0.05$），其中 EVO、DCs 、DCevo 治疗组与 PBS 组相比无统计学意义（$P>0.05$）（图 1）。



a：$P<0.05$，与 PBS 组比较；b：$P<0.05$，与 EVO 组比较；c：$P<0.05$，与 DCs 组比较；d：$P<0.05$，与 DCevo 组比较；e：$P<0.05$，与 hpDC 组比较

图 1　不同实验组动物 BMS 评分

2.3　组织学观察结果

注射细胞后 84 d，取脊髓行 HE 染色观察组织结构。hpDCevo 治疗组与其他各组比较，损伤后瘢痕面积较少，瘢痕结构较为松散。形成的空洞较少。瘢痕周围组织排列较为规整。hpDC 组与 PBS、EVO、DCs 、DCevo 组相比较在组织病理上有明显改善（图 2）。hpDCevo 组在损伤区范围、空洞面积等指标与其他组相比均有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。

2.4　细胞因子水平的测定

BDNF、NT-3、IL-12、GM-CSF 在 SCI 局部的表达均以 hpDCevo 组最高，hpDC 组其次。在 PBS、EVO、DCs、DCevo 组，以上各种细胞因子均处于较低水平，各组间无统计学意义（$P>0.05$，表 2）。在 T 细胞上清中 BDNF、GM-CSF 的含量均是 hpDCevo 高于 hpDC 组，hpDC 组高于其余各组（表 3）。但是 NT-3 和 IL-12 未检测出。

表 1　治疗后 84 d 时各组损伤区范围、空洞面积测量结果（mm^2，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

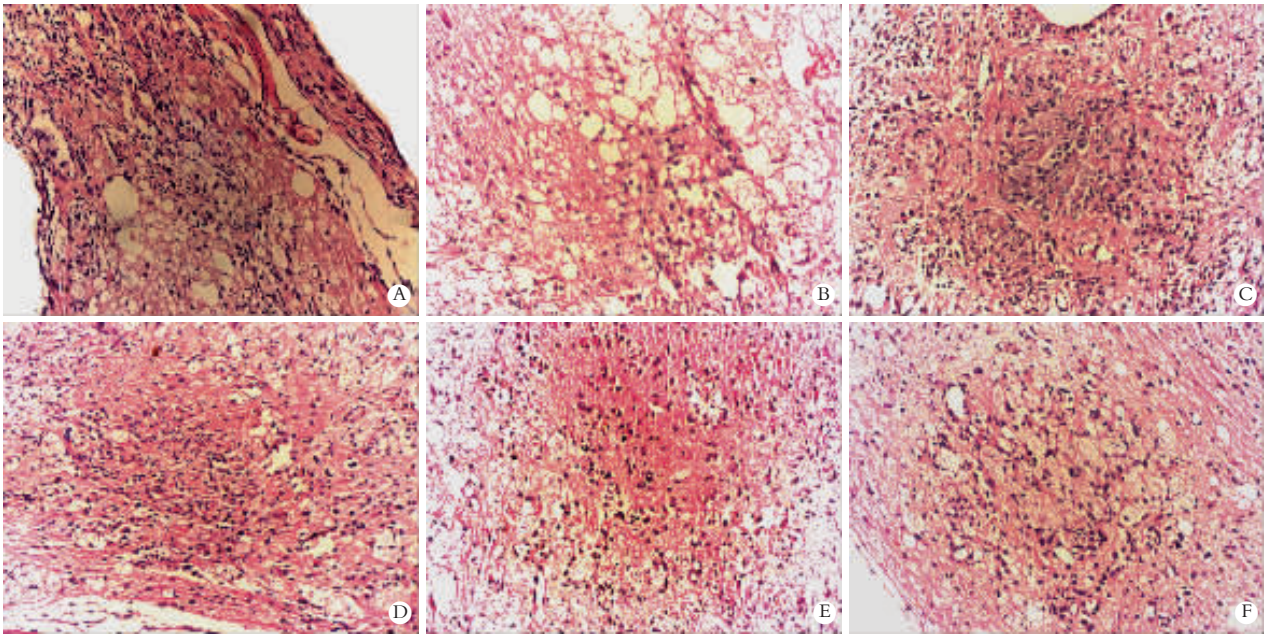
组别	损伤区范围	空洞面积
PBS 组	2.67 ± 0.30	0.31 ± 0.02
EVO 组	2.75 ± 0.26	0.33 ± 0.03
DCs 组	2.55 ± 0.27	0.31 ± 0.02
DCevo 组	2.73 ± 0.35	0.32 ± 0.02
hpDC 组	2.18 ± 0.12^{abcd}	0.25 ± 0.02^{abcd}
hpDCevo 组	1.93 ± 0.16^{abcde}	0.22 ± 0.01^{abcde}

a：$P<0.05$，与 PBS 组比较；b：$P<0.05$，与 EVO 组比较；c：$P<0.05$，与 DCs 组比较；d：$P<0.05$，与 DCevo 组比较；e：$P<0.05$，与 hpDC 组比较

表 2　脊髓损伤局部细胞因子水平的测定（ng/mg，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	IL-12	GM-CSF	BDNF	NT-3
PBS 组	15 264.07 ± 753.89	4.33 ± 0.4	18.69 ± 0.53	0.64 ± 0.04
EVO 组	15 031.09 ± 387.30	4.59 ± 0.22	18.51 ± 0.63	0.63 ± 0.02
DCs 组	14 812.26 ± 950.86	4.41 ± 0.35	18.67 ± 0.54	0.60 ± 0.08
DCevo 组	14 873.03 ± 788.23	4.62 ± 0.23	18.54 ± 0.24	0.65 ± 0.03
hpDC 组	18 598.12 ± 224.24^{abcd}	5.35 ± 0.49^{abcd}	25.39 ± 0.54^{abcd}	0.98 ± 0.11^{abcd}
hpDCevo 组	26 079.88 ± 551.4^{abcde}	6.23 ± 0.56^{abcde}	27.71 ± 0.35^{abcde}	1.46 ± 0.09^{abcde}

a：$P<0.05$，与 PBS 组比较；b：$P<0.05$，与 EVO 组比较；c：$P<0.05$，与 DCs 组比较；d：$P<0.05$，与 DCevo 组比较；e：$P<0.05$，与 hpDC 组比较



A：PBS 组；B：EVO 组；C：DCs 组；D：DCevo 组；E：hpDC 组；F：hpDCevo 组

图 2　光镜观察各组脊髓损伤部位组织病理学变化　（HE ×200）

表3 T细胞体外培养上清中细胞因子水平的测定(pg/ml,$n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	BDNF	GM-CSF
PBS组	312.29±33.58	0
EVO组	314.38±13.05	0
DCs组	324.66±7.66	0
DCevo组	330.76±20.08	0
hpDC组	426.8±9.4[abcd]	284.23±90.41[abcd]
hpDCevo组	648.26±72.07[abcde]	665.20±37.44[abcde]

a:$P<0.05$,与PBS组比较;b:$P<0.05$,与EVO组比较;c:$P<0.05$,与DCs组比较;d:$P<0.05$,与DCevo组比较;e:$P<0.05$,与hpDC组比较

3 讨论

传统观点认为中枢神经系统(central nervous system,CNS)存在"免疫豁免"这一特点,所以任何免疫细胞在CNS的浸润都应是病理性的。然而,Schwartz等认为,既然在机体内免疫系统有保护和修复作用,那么CNS内免疫细胞也有利于创伤的修复。在SCI和视神经损伤的模型中,发现主动或被动免疫CNS的自身抗原也能降低继发性神经损伤[9,10]。Schwartz等[11]进一步提出"保护性自身免疫"这一概念,即针对CNS抗原特异性的T细胞和巨噬细胞有神经保护作用。Hauben等[2]实验证实,局部和全身注射mbpDC能激发免疫系统的神经保护作用,并明显改善SCI动物的后肢运动功能。但是治疗同基因型的无胸腺动物却无效,提示该保护作用可能由MBP抗原特异性T细胞介导。本课题组使用hpDC治疗SCI取得了明显的疗效,其效果优于mbpDC治疗。我们认为,因为hp含有包括MBP在内的多种有益的CNS特异性抗原成分,所以有比mbpDC更好的治疗效果[3]。本课题组以前研究证实,EVO能明显促进hpDC在体外的刺激T细胞增殖的能力。据此我们推测EVO处理的hpDC(hpDCevo)有较好的治疗SCI的效果,并且其机制可能是通过激发T细胞免疫反应。

本研究结果显示,腹腔注射hpDCevo较hpDC更有效的改善钳夹伤SCI小鼠的运动功能,同时组织病理学也表现出较为显著的神经组织保护作用。腹腔注射细胞后14 d出现神经功能恢复的差异,其后逐渐增大。PBS、EVO、DCs、DCevo组治疗后28 d进入平台期,而hpDCevo组和hpDC组BSM评分继续升高,于42 d进入平台期,最终恢复水平hpDCevo组明显优于hpDC组。表明hpDCevo可以促进神经功能更快、更大程度的恢复。组织病理学显示,hpDCevo组较hpDC组损伤局部空洞缩小,瘢痕面积减小,可能能够降低局部由胶质细胞形成的物理屏障,进一步改善神经功能。

本研究结果显示,hpDCevo治疗后损伤部位的BDNF和NT-3较其余各组明显上调,提示hpDCevo通过上调BDNF和NT-3促进SCI的修复。BDNF和NT-3是维持神经组织生长存活的重要因素。神经细胞和免疫细胞均能分泌BDNF和NT-3。CNS组织表达BDNF的特异性受体TrkB和NT-3特异性受体TrkC,以及他们的共同受体P75,而且CNS损伤后这些受体表达上调[12]。BDNF、NT-3分别和TrkB、TrkC的特异性结合后,通过Trk的二聚作用,促进轴突生长。BDNF、NT-3和P75的非特异性结合可下调RhoA的活性,促进肌动蛋白微丝的重组从而促进轴突生长[13]。本研究结果显示,细胞治疗后损伤部位的IL-12在hpDCevo组最高。IL-12是重要的免疫因子能促进T辅助细胞的活化,提示hpDCevo可能上调了损伤局部的针对CNS自身抗原的保护性自身免疫反应,研究证实该反应可能是T辅助细胞介导的[1]。进一步研究证实,SCI后局部注射IL-12能促进神经干细胞/前体细胞的增殖以及上调损伤局部BDNF的表达[8],促进损伤修复。实验亦证实,HpDCevo治疗后损伤部位的GM-CSF较其他组明显上调。GM-CSF能促使小胶质细胞转化为DC,也能促进小胶质细胞的增殖和改变其形态。有研究发现GM-CSF在CNS损伤中有保护性作用,其机制可能是通过增加损伤局部巨噬细胞/小胶质细胞、DCs的数量,加强损伤局部的保护性免疫反应促进功能恢复[14]。这也可能是促进其功能恢复的重要原因之一。

研究证实,CNS抗原特异性T细胞促进CNS损伤后修复的可能机制为分泌神经营养因子[15],本实验结果证实在T细胞上清中BDNF、GM-CSF的含量均以hpDCevo组最高,hpDC组其次。CNS抗原特异性T细胞能够通过血脑屏障并聚集到损伤部位,产生神经保护作用[16-18]。所以,我们推测腹腔注射hpDCevo、hpDC后,将CNS抗原呈递给次级淋巴器官的T细胞,活化初始T细胞为CNS抗原特异性T细胞,后者通过血脑屏障,浸润到损伤局部分泌BDNF、GM-CSF等促进SCI的修复,同时损伤局部的抗原呈递细胞再次将CNS抗原提呈给到此的CNS抗原特异性T细胞进一步强化这一保护性自身免疫反应。由于DCs、DCevo未负载CNS抗原,故不能明显激发同种系动物的CNS抗原特异性T细胞保护性免疫反应,促进功能恢复。同时本实验亦证实单独注射EVO不能促进小鼠SCI功能恢复。NT-3和IL-12在T细胞培养上清中未检测出,可能与T细胞分泌不同细胞因子的时间点不同有关。

总之,腹腔注射hpDCevo能明显改善SCI小鼠后肢运动功能恢复,并且比hpDC有更好的疗效。但是,hpDCevo治疗后BDNF、NT-3、IL-12、GM-CSF在损伤局部的表达增加的具体机制有待于我们进一步的研究。

参考文献:

[1] Schwartz M. Protective autoimmunity as a T-cell response to central nervous system trauma: prospects for therapeutic vaccines[J]. Prog Neurobiol, 2001, 65(5): 489-496.

[2] Hauben E, Gothilf A, Cohen A, *et al*. Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2003, 23(25): 8808-8819.

[3] Liu M, Zhao J, Liang H, *et al*. Vaccination with dendritic cells pulsed with homogenate protein of spinal cord promotes functional recovery from spinal cord injury in mice[J]. Spinal Cord, 2009 , 47(5): 360 - 366.
[4] 祝绚, 梁华平, 鲍依稀. 基因芯片检测吴茱萸碱对小鼠 DC 细胞功能调控相关基因表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(7): 597 - 600.
[5] Lutz M B, Kukutsch N, Ogilvie A L, *et al*. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow[J]. J Immunol Methods, 1999, 223(1): 77 - 92.
[6] Fehlings M G, Nashmi R. Assessment of axonal dysfunction in an *in vitro* model of acute compressive injury to adult rat spinal cord axons [J]. Brain Res, 1995, 677(2): 291 - 299.
[7] Basso D M, Fisher L C, Anderson A J, *et al*. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(5): 635 - 659.
[8] Yaguchi M, Ohta S, Toyama Y, *et al*. Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells after IL-12 administration[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(9): 1972 - 1980.
[9] Hauben E, Butovsky O, Nevo U, *et al*. Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion [J]. J Neurosci, 2000, 20(17): 6421 - 6430.
[10] Moalem G, Yoles E, Leibowitz-Amit R, *et al*. Autoimmune T cells retard the loss of function in injured rat optic nerves[J]. J Neuroimmunol, 2000, 106(1 - 2): 189 - 197.
[11] Schwartz M, Yoles E. Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond[J]. J Neurotrauma, 2006, 23 (3 - 4): 360 - 370.
[12] Fryer R H, Kaplan D R, Kromer L F. Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth *in vitro* [J]. Exp Neurol, 1997, 148(2): 616 - 627.
[13] Lykissas M G, Batistatou A K, Charalabopoulos K A, *et al*. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration[J]. Curr Neurovasc Res, 2007, 4(2): 143 - 151.
[14] Ha Y, Kim Y S, Cho J M, *et al*. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in preventing apoptosis and improving functional outcome in experimental spinal cord contusion injury[J]. J Neurosurg Spine, 2005, 2(1): 55 - 61.
[15] Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, *et al*. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity [J]. J Autoimmun, 2000, 15(3): 331 - 345.
[16] Hauben E, Nevo U, Yoles E, *et al*. Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury[J]. Lancet, 2000, 355 (9200): 286 - 287.
[17] Ransohoff R M, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(7): 569 - 581.
[18] Schwartz M, London A, Shechter R. Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity[J]. Neuroscience, 2009, 158(3): 1133 - 1142.

(**收稿**:2009-09-01;**修回**:2009-11-05)
(编辑 汪勤俭)

(上接 268 页)

离、分碎:紧贴子宫将宫颈至宫体对半切开,使子宫及瘤体处于半游离状态,分碎瘤体。对照组采用传统 TVH 方法:①将 2 个间隙腹膜剪开入腹。②处理各组韧带和子宫动静脉。③将子宫完全从阴道穹窿牵出切除子宫。

2 结果

2 组围手术期一般情况差异均有统计学意义($P<0.01$,表 2)。研究组中无副损伤,无中转开腹,手术成功率 100%,对照组中有 6 例副损伤,7 例中转开腹,手术成功率 92%。

表 2 2 组 TVH 围手术期一般情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	间隙分离时间 (min)	手术时间 (min)	出血量 (ml)	排气时间 (h)
研究组	125	3.25 ± 1.16[a]	53.12 ± 12.32[a]	83.75 ± 34.12[a]	10.56 ± 5.01[a]
对照组	84	37.15 ± 12.63	115.23 ± 25.42	212.71 ± 93.01	36.42 ± 7.06

a:$P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

TVH 具有创伤小,腹腔不受干扰,出血少,术后疼痛轻等优点的微创手术[2,3]。传统的 TVH 尤其是大子宫 TVH,手术难度大,对术者技术要求高,且易造成脏器等副损伤,尽管具有腹腔镜使 TVH 的普及受到阻碍[4]。在英国,55 岁以下的妇女中子宫切除者占 1/5[5]。在我国手术量远高于英、美等国,开创新的 TVH 方法势在必行。近几年,国内外已陆续开展 TVH[3,6,7]。据此,我们改变传统的 TVH 手术方法,建立一种新的 TVH "两快一游离"术式,以降低手术难度、扩大手术指征,提高患者术后生活质量。

大子宫 TVH 的难度主要在于 2 个方面:①子宫下降困难,巨大子宫位置前倾,嵌顿在耻骨联合上方,加之术野小,导致子宫难以下降。②宫旁张力大,极易造成钳夹滑脱、结扎不牢靠,导致出血。本研究表明,"两快一游离"大子宫肌瘤阴式手术新方法可解决大子宫 TVH 中的关键技术难题简化手术步骤,降低手术难度、减少术中出血、缩短手术时间、降低副损伤率、增加手术安全性,利于更多的妇科医师掌握 TVH 技术,促进大子宫 TVH 在我国快速推广、普及,越来越多的患者受益。

参考文献:

[1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999: 801.
[2] Iftikhar R. Vaginal hysterectomy is superior than abdominal hysterectomy[J]. J Surg Pak, 2008, 13(2): 55 - 58.
[3] 王昆松,罗克燕,谢红梅. 大子宫经阴道切除术 84 例临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(23): 2296 - 2297.
[4] Boukerrou M, Lambaudie E, Collinet P. Previous caesarean section is an operative risk factor in vaginal hysterectomy[J]. Gynecol Obstet Fertil, 2004, 32(6): 490 - 495.
[5] Barclay L. Vaginal hysterectomy preferred for benign conditions[J]. Obstet Gynecol, 2009, 114(9): 1156 - 1158.
[6] Matteson K A, Phipps M G, Raker C, *et al*. Laparoscopic versus vaginal hysterectomy for benign pathology: Candiani et al [J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 200(4): 465 - 466, e1 - e6.
[7] 马秀清,高天. 改良阴式全子宫切除手术方法探讨[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2008, 24(5): 390 - 391.

(**收稿**:2009-12-10;**修回**:2009-12-18)
(编辑 王小宴)