护理干预对大鼠脊髓损伤后运动功能修复的脊髓形态学研究

宋碧英,李 巍 (第三军医大学护理学院野战护理学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究护理干预对大鼠脊髓损伤后脊髓运动功能修复的脊髓形态学变化。**方法** 将 60 只 SD 成年大鼠随机分为 3 组,分别为正常对照组、实验对照组、实验组,每组 20 只,每组分 4 个时相点,即脊髓损伤后 1 d、7 d、30 d、60 d($n=5$)。实验对照组和实验组均采用切割加挤压脊髓 L_4 平面横断制备脊髓损伤大鼠模型。正常对照组为正常大鼠未经处理,实验对照组大鼠脊髓损伤后给予排尿、排便等常规护理,实验组除常规护理之外,还给予关节活动度训练和肌肉按摩训练,每日 2 次,每次 10 min。采用常规 HE 染色、免疫组织化学染色法观察护理干预对脊髓损伤后大鼠脊髓的形态学变化。**结果** HE 染色结果以及 GFAP 和 NF-200 免疫组织化学染色结果显示,实验组和实验对照组未见明显区别,但与正常对照组比较差异非常明显。**结论** 护理干预对损伤区脊髓组织形态学研究未见明显改变。

[关键词] 脊髓损伤;护理干预;大鼠;形态学;运动功能

[中图分类号] R744;Q954.52;S854.8 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)01-0018-05

Spinal cord morphology research of nursing intervention on motor function repair after spinal cord injury in rats

SONG Bi-ying, LI Wei (Department of Military Nursing, Nursing School, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the morphology changes of spinal cord after nursing intervention on motor function repair spinal cord injuried rats. **Methods** 60 adult SD rats were randomly divided into normal control group, experimental control group, and experimental group ($n=20$ for each group). Each group were divided into four time phase points, that is 1 day, 7 days, 30 days and 60 days after spinal cord injury ($n=5$). The model of L_4 plane with full transection of spinal cord were made in the rats in experimental control group and experimental group. Normal control group were of untreated normal rats, experimental control group were given routine nursing such as urination and defecation after spinal cord injury, and experimental group were given passive movement practices and muscle massage training twice a day (10 min each time) besides regular nursing. HE staining and immunohistochemistry method were applied to observe the morphology changes of spinal cord. **Results** In experimental control group and experimental group there was no significant changes in HE staning and NF-200 and GFAP immunohistchemistry staning in spinal cord section of rat at each time phase points, but compared to the normal control group, it was of significant difference. **Conclusion** There is no apparent change in morphology in injured spinal area after nursing intervention.

Keywords: spinal cord injury; nursing intervention; rat; morphology; motor function

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)是因各种原因所致脊髓结构和功能的损伤,导致损伤水平以下脊髓神经功能(运动和感觉)障碍[1]。运动功能障碍是导致患者存活期丧失生活自理能力最主要的原因。临床护理研究显示,早期运动功能护理干预在临床护理中结合常规护理能促进脊髓损伤患者功能康复。本研究前期实验结果[2]也佐证了综合护理干预可改善脊髓损伤后大鼠运动功能行为学的部分修复,具有延缓肌肉萎缩速度、改善运动功能,促进损伤脊髓功能的部分恢复。为了进一步了解护理干预对脊髓损伤后大鼠神经功能恢复的神经生物学基础,探讨护理干预是否能引起脊髓损伤处的形态学结构改变。本实验对各组各时相点的动物进行了脊髓组织取材,采用 HE 染色方法和免疫组织化学染色方法,研究护理干预对脊髓损伤后脊髓组织的形态学变化,寻找临床实践中运动康复训练措施能有效改善脊髓损伤运动功能的脊髓组织修复证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

将 60 只 SD 成年大鼠(约 250 g,雌雄不限)随机分为 3 组,即:正常对照组、实验对照组和实验组(各组均为 $n=20$);每组分为 4 个时相点(各个时相点均取 $n=5$),即脊髓损伤后 1 d、7 d、30 d、60 d。实验动物均由第三军医大学动物实验中心提供。

1.2 主要仪器

手动轮转式石蜡切片机(湖北康龙电子科技有限责任公司)、37 ℃恒温箱(北京医疗设备厂)、光学显微镜(日本 Olympus,显微图像分析系统)、烤箱(广州市旭朗机械设备有限公

doi:10.11659/jjssx.07E014074

[基金项目] 第三军医大学青年基金资助课题(2011xqn14)

[通讯作者] 李 巍,E-mail:weilee2004@yahoo.com

[收稿日期] 2014-08-05 [修回日期] 2014-08-19

司)、病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司 PHY-Ⅲ)、4 ℃冰箱。

1.3 主要试剂

兔抗 NF-200 抗体购自武汉三鹰公司,兔抗 GFAP 抗体购自北京博奥森公司,山羊来源封闭血清购自北京中杉公司,抗兔二抗试剂盒购自中杉公司,二氨基联苯胺(diaminobenzidin, DAB)显色试剂盒购自北京中杉公司。

1.4 动物模型制备

正常对照组为正常大鼠,实验对照组和实验组均采用切割加挤压脊髓 L_4 平面横断制备脊髓损伤大鼠模型,其具体操作见本课题组应用方法[2]。

1.5 护理干预措施

实验对照组大鼠脊髓损伤后给予常规护理,实验组大鼠脊髓损伤后给予护理干预。实验对照组和实验组大鼠采取常规护理,于脊髓损伤后 1 d 开始进行腹腔注射青霉素钠 20 万 U,每日 1 次,连续注射 3 d 以预防感染,协助受伤大鼠每天 2 次排尿、排便;实验组除常规护理之外,还给予按摩膀胱与腹部、关节活动度训练和肌肉按摩训练等被动训练,护理干预均于损伤后立即进行,每日 2 次,每只大鼠每次 10 min。大鼠后肢进行被动关节活动训练,包括膝被动屈伸、膝被动外展内收、髋被动屈伸、髋被动外展内收、踝被动背屈跖屈等训练,以维持和改善其关节活动度;肌肉按压训练主要以向心性和环形交替按摩足部、小腿、大腿各肌肉群,以减少双后肢水肿及增加血液循环。

1.6 脊髓组织取材

将正常对照组、实验对照组和实验组大鼠于存活 1 d、7 d、30 d、60 d 后断头处死,沿脊柱正中切开皮肤并分离肌肉,暴露脊髓 L_4 水平上下各 1 cm 处的棘上韧带并剪去,椎板用咬骨钳咬去,充分暴露脊髓后,用手术刀片在脊髓 L_4 水平上下各 1 cm 处截取损伤的脊髓,入 4 ℃的 4% 多聚甲醛中固定 48 h。

1.7 观察指标

1.7.1 常规 HE 染色 各组脊髓组织进行石蜡包埋、修块,行石蜡切片,各组织块各取 5 张石蜡切片,按常规操作步骤进行 HE 染色,以观察护理干预对脊髓损伤后损伤区大鼠的组织修复情况。

1.7.2 免疫组织化学染色 取脊髓组织石蜡切片各 5 张,按 SABC 免疫组织化学试剂盒说明书进行免疫组织化学染色,GFAP 一抗工作浓度为 1∶400,NF-200 一抗工作浓度为 1∶100,以 0.02 mol/L PBL(pH7.2)代替一抗作为对照。显示各组脊髓损伤大鼠各个时相点的神经丝蛋白-200(neurofilament-200, NF-200)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的变化,光镜下观察脊髓损伤后大鼠经护理干预后在各组各时相点中神经元的 NF-200 免疫反应阳性变化和神经胶质细胞的 GFAP 免疫反应阳性变化。

2 结果

2.1 HE 染色

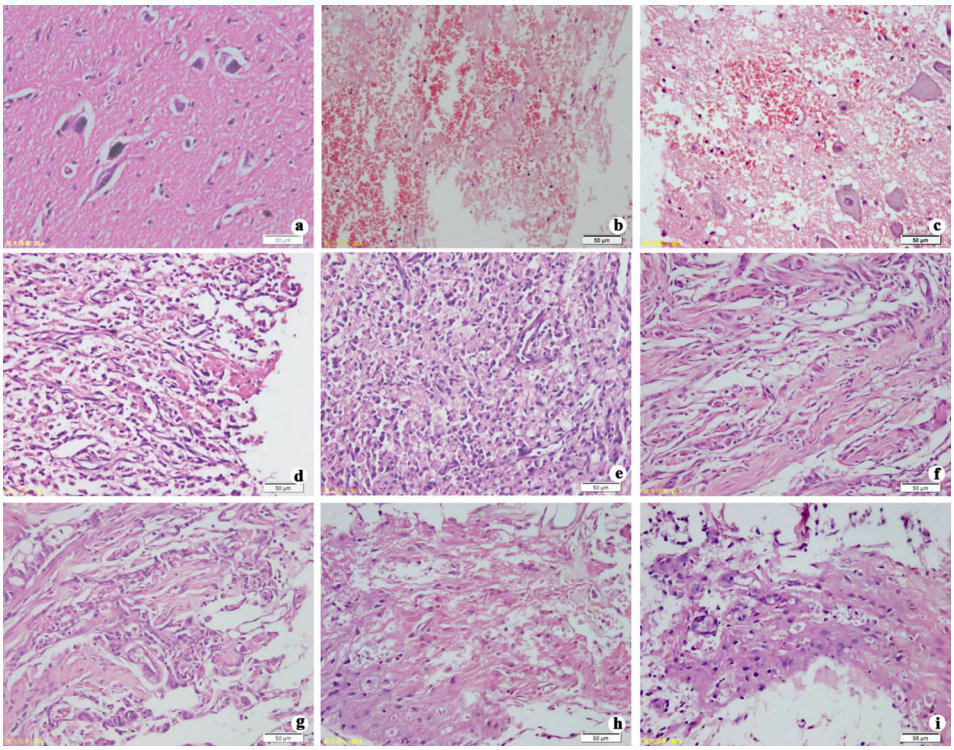
光镜下脊髓组织结构 HE 染色可见,正常对照组脊髓组织结构清晰完整(图 1a)。脊髓损伤后 1 d,实验组(图 1b)和实验对照组(图 1c)HE 染色在脊髓损伤区均可见出血现象和轻度炎性反应。脊髓损伤后 7 d(图 1d、图 1e),损伤区脊髓组织结构紊乱,大量炎性细胞浸润,炎性反应加剧,也可见增生的各种细胞及增生的毛细血管,神经元肿胀、坏死,突起消失。脊髓损伤后 30 d,实验组(图 1f)和实验对照组(图 1g)均可见脊髓损伤区炎性反应减轻或消失,出现囊腔样变化或空腔;组织填充处,细胞增生十分明显,增生细胞有一定方向性,呈簇状排列,增生的组织中见大量增生的毛细血管。脊髓损伤后 60 d,损伤部位脊髓组织结构改善,实验组(图 1h)和实验对照组(图 1i)无明显区别,可见以损伤区域为中心形成的比较致密的组织围绕在空腔周围,组织细胞排列较有规律,走行与脊髓纵轴基本一致。

2.2 GFAP 免疫组织化学染色

光镜下脊髓组织结构 GFAP 免疫组织化学染色结果显示,正常对照组在脊髓灰质中 GFAP 阳性反应细胞和阳性反应纤维清晰可见;在脊髓白质中,GFAP 免疫反应阳性细胞和阳性纤维密集,可见 GFAP 免疫反应阳性细胞星状突起明显,细胞多呈不规则多角形(图 2a)。实验组和实验对照组中的 GFAP 免疫反应阳性细胞表达随时间的推移而逐渐增多,相同时相点 GFAP 免疫反应阳性未见明显差异。脊髓损伤后 1 d,实验组(图 2b)和实验对照组(图 2c)脊髓损伤区组织结构紊乱,可见 GFAP 免疫反应阳性的细胞和纤维,损伤腔隙内的组织碎片中见 GFAP 免疫反应阳性细胞和阳性纤维。脊髓损伤后 7 d,实验组(图 2d)和实验对照组(图 2e)损伤区可见散在 GFAP 免疫反应阳性细胞和阳性纤维,染色较浅,见大量炎性细胞浸润。脊髓损伤后 30 d,实验组(图 2f)和实验对照组(图 2g)损伤区内组织 GFAP 免疫反应阳性表达较 7 d 时增加,GFAP 免疫反应阳性细胞表达和 GFAP 阳性纤维表达增加,且 GFAP 免疫反应阳性纤维交织成网。脊髓损伤后 60 d,实验组(图 2h)和实验对照组(图 2i)脊髓损伤组织结构紊乱得到改善,损伤区内组织填充,增生区内 GFAP 免疫反应阳性细胞和阳性纤维明显增加,染色加深呈棕褐色并形成胶质瘢痕,实验组与实验对照组比较无明显差异。

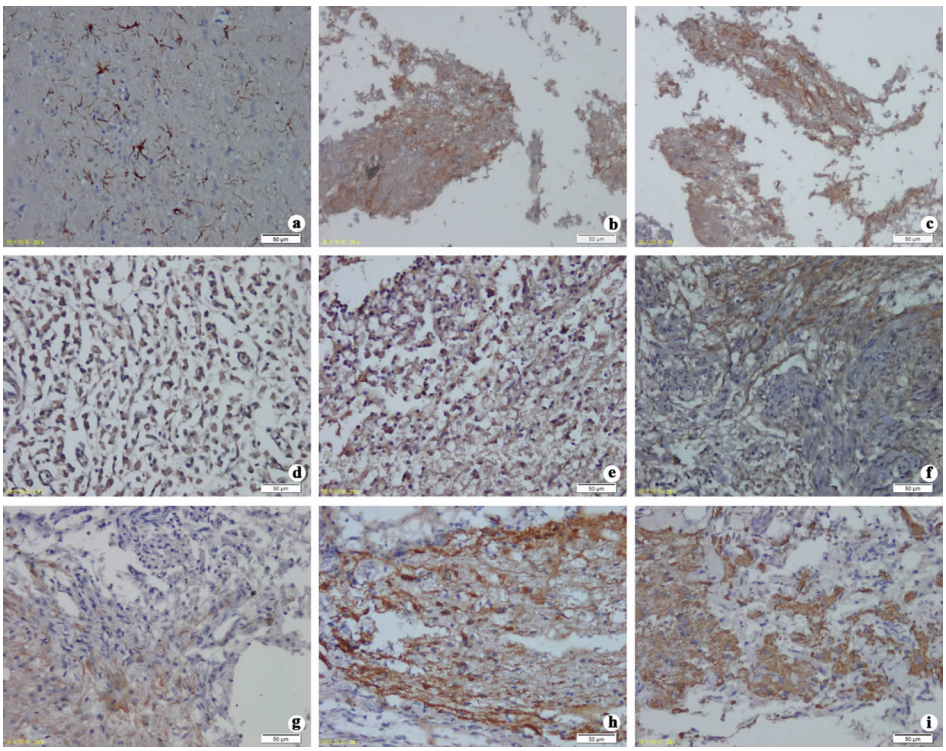
2.3 NF-200 免疫组织化学染色

光镜下脊髓组织结构 NF-200 免疫组织化学染色结果显示,正常对照组(图 3a)NF-200 免疫反应阳性细胞分布在脊髓灰质中。实验组和实验对照组 NF-200 免疫反应阳性纤维均呈先下降,后逐渐增高的趋势。脊髓损伤后 1 d,实验组(图 3b)与实验对照组(图 3c)在脊髓损伤区组织中和损伤间隙内的组织块中见有 NF-200 免疫反应阳性细胞和阳性纤维。脊髓损伤后 7 d,实验组(图 3d)与实验对照组(图 3e)在脊髓损伤组织中 NF-200 免疫反应阳性细胞和纤维表达较脊髓损伤后 1 d 明显下降,见少量 NF-200 免疫反应阳性细胞和纤维分布。脊髓损伤后 30 d,实验组(图 3f)与实验对照组(图 3g)NF-200 免疫反应阳性表达随时间推移逐渐增高。脊髓损伤后 60 d,实验组(图 3h)与实验对照组(图 3i)NF-200 免疫反应阳性纤维数量随时间推移逐渐增加,在靠近正常脊髓侧 NF-200 免疫反应阳性纤维交织成网,在增生组织中可见少量 NF-200 免疫反应阳性纤维。



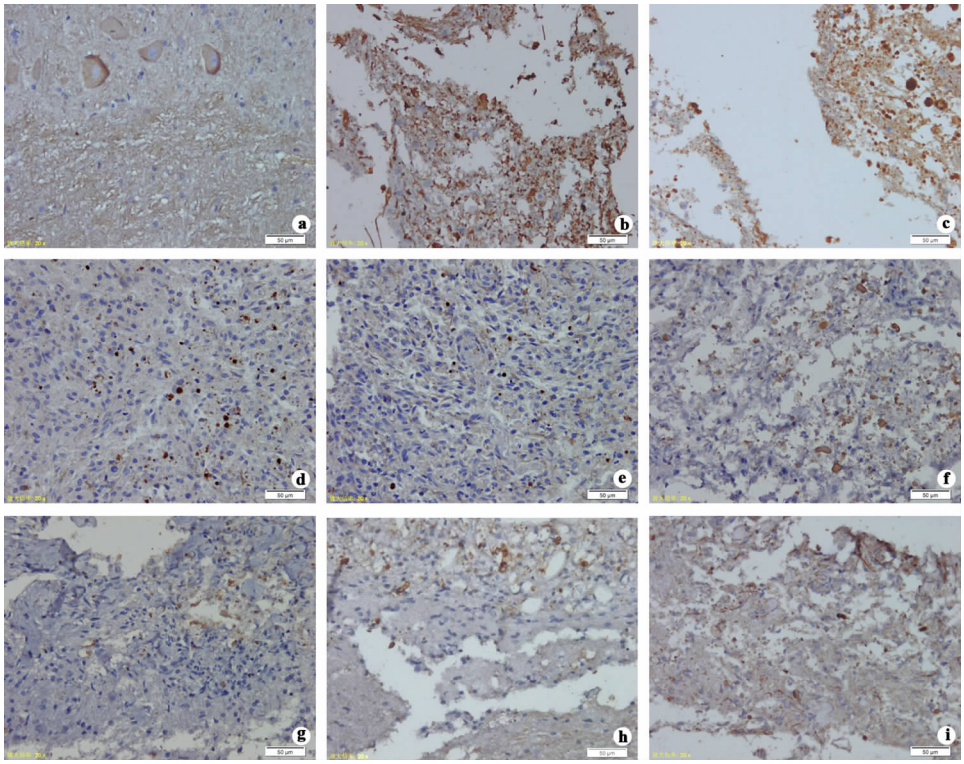
a:正常对照组;b:实验组 1 d;c:实验对照组 1 d;d:实验组 7 d;e:实验对照组 7 d;f:实验组 30 d;g:实验对照组 30 d;h:实验组 60 d;i:实验对照组 60 d

图 1　大鼠脊髓组织纵切面 HE 染色光镜观察(HE ×20)



a:正常对照组;b:实验组 1 d;c:实验对照组 1 d;d:实验组 7 d;e:实验对照组 7 d;f:实验组 30 d;g:实验对照组 30 d;h:实验组 60 d;i:实验对照组 60 d

图 2　大鼠脊髓组织纵切面 GFAP 免疫组织化学染色光镜观察(×20)



a:正常对照组;b:实验组 1 d;c:实验对照组 1 d;d:实验组 7 d;e:实验对照组 7 d;f:实验组 30 d;g:实验对照组 30 d;h:实验组 60 d;i:实验对照组 60 d

图 3 大鼠脊髓组织纵切面 NF-200 免疫组织化学染色光镜观察(×20)

3 讨论

脊髓损伤后患者常有不同程度的运动功能障碍,恢复运动功能是患者最迫切的需求之一。有研究显示,运动功能训练能够增强脊髓的可塑性,并在一定程度上帮助脊髓损伤患者改善症状[3-4],是脊髓损伤患者神经功能恢复的基础[5]。目前脊髓损伤后功能修复的重点和难点是减少继发性损伤,促进中枢神经系统的可塑性变化、应用阻断抑制轴突生长的物质和刺激神经生长促进再生等[6]。中枢神经损伤后的继发性损伤引起的炎性反应是造成进一步损伤的关键原因[7]。本研究 HE 染色结果显示,实验组和实验对照组均于脊髓损伤 1 d 时,脊髓损伤区以出血反应为主;7 d 时炎性反应最重;30 d 时炎性反应明显减轻,毛细血管增生明显。本研究提示运动功能护理干预未能减轻局部炎性反应,尚不能阻止和减轻脊髓损伤后继发性脊髓结构和功能的损害。本研究 HE 染色结果还显示,实验组和实验对照组均于脊髓损伤 60 d 后损伤部位脊髓组织结构改善,损伤部位空腔处有成束神经纤维进入填充,灰质中可见空腔形成和囊腔样变化,空腔形成和囊腔样变化则标志着脊髓损伤进入稳定期[8]。本研究提示尚未寻找到临床实践中运动功能护理干预能有效改善脊髓损伤运动功能的脊髓病理组织修复证据。

脊髓损伤修复是一个复杂、多因素共同参与的病理生理反应过程,脊髓组织病理改变过程中各种病理变化引起神经元大量丢失和星形胶质细胞(astrocyte, AS)的激活与胶质纤维化形成局部胶质瘢痕,导致患者功能缺失及恢复困难。AS 在脊髓损伤修复中起重要作用。AS 是最大的神经胶质细胞,GFAP 是成熟 AS 中主要的中间丝蛋白,是 AS 的一种标志性蛋白。GFAP 在损伤脊髓组织中的表达可反映 AS 增殖、肥大等程度改变,也是衡量胶质瘢痕形成和发展的指标[9]。有研究显示,AS 在脊髓损伤修复的过程中有两面性作用,在损伤早期增生活跃,构成网格框架,并诱导、支持神经纤维的再生,参与到损伤后脊髓的神经修复[10];在脊髓损伤后数天,AS 可能转变为反应性胶质细胞并形成瘢痕组织,机械性或化学性阻挡神经再生[11]。本实验中,实验组和实验对照组在脊髓损伤后 1 d,GFAP 表达非常强烈,在 GFAP 免疫组织化学染色切片中可见大量染成深褐色的 GFAP 免疫反应阳性细胞和纤维;7 d 时降至低谷;随着时间延长,GFAP 阳性表达增加,30 d 时 AS 被激活并呈明显反应性增生促进神经再

生[12];损伤后 60 d,脊髓损伤区 GFAP 阳性细胞表达呈高峰。上述现象表明,实验组和实验对照组在脊髓损伤区不同时相点,GFAP 阳性反应物表达未见明显差异,而且脊髓损伤后脊髓损伤区 AS 明显功能活跃并胶质化,形成胶质瘢痕阻碍神经纤维生长和再通[13],提示护理干预不足以影响损伤脊髓组织中 GFAP 的表达。

正常脊髓组织中的神经元(neuron)主要起支配邻近脊髓节段的运动、感觉和自主神经功能,具有十分重要的作用,神经元和 AS 可作为脊髓损伤后损伤脊髓修复的重要反应[14]。神经元的结构蛋白之一是神经丝蛋白(neurofilament protein, NF),NF 行免疫组化染色检测可提示神经元细胞的生长状态[15]。NF-200 是 NF 的一种,在脊髓损伤后染色能反映伤后神经元的形态并反映其功能状态[16]。本实验中观察到,实验组和实验对照组 NF-200 阳性反应物表达均呈先下降,再上升的趋势;在脊髓损伤后 1d,NF-200 阳性反应物仍存在表达,提示在脊髓损伤后 1 d,神经元和神经纤维尚未完全变性坏死;脊髓损伤后 7 d,NF-200 阳性反应物表达降低;脊髓损伤后 30 d,NF-200 在创伤刺激和多种诱导因子的作用下,积存于胞体,以适应神经再生的需要,其表达随时间推移逐渐增高;脊髓损伤后 60 d,NF-200阳性反应物表达增加,在脊髓灰质中表达增强。本研究中实验组和实验对照组相同时相点 NF-200 免疫反应阳性物表达未见明显差异,因此,我们推测护理干预可能不足以影响 NF-200 阳性反应物在损伤脊髓组织中的表达,或者是我们的研究手段还不够先进,尚不能检测出实验组与实验对照组之间的差别,可再进一步应用免疫电镜或分子生物学等研究手段,以研究大鼠脊髓损伤后超微结构和分子水平的变化。

由此可见,护理干预对损伤区脊髓组织形态学影响尚未见明显改变,这可能与护理干预不足以明显改善脊髓损伤后脊髓组织结构内继发性损伤,如炎性反应、出血、神经胶质细胞大量增生、神经元损伤后再生十分困难等有关。本研究尚未找到护理干预促进行为学改变的神经生物学证据。护理干预对脊髓损伤修复的确切机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Kwon BK, Sekhon LH, Fehlings MG. Emerging repair, regeneration, and translational research advances for spinal cord injury[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35(21 Suppl): S263 – 270.

[2] 宋碧英,李 巍. 护理干预对大鼠脊髓损伤后运动功能修复的影响[J]. 局解手术学杂志, 2014, 23(3): 238 – 241.

[3] Sarah AD. Activity-dependent plasticity: implications for recovery after spinal cord injury[J]. Trends Neurosci, 2008, 31(8): 410 – 418.

[4] Battistuzzo CR, Callister RJ, Callister R, et al. A systematic review of exercise training to promote locomotor recovery in animal models of spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2012, 29(8): 1600 – 1613.

[5] Harkema SJ. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking[J]. Neuroscientist, 2001, 7(5): 455 – 468.

[6] 姚帅辉,钟德君. 诱导多能干细胞移植在脊髓损伤修复中的应用及研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(11): 1015 – 1018.

[7] Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome[J]. Brain Res, 2010, 1343(9): 226 – 235.

[8] Li J, Lepski G. Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review[J]. Biomed Res Int, 2013: 786475.

[9] Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis[J]. Glia, 2005, 50(4): 427 – 434.

[10] Gimenez Ribotta M, Menet V, Privat A, et al. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS[J]. Prog Brain Res, 2001, 132: 587 – 610.

[11] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(2): 146 – 156.

[12] Cheng H, Wu JP, Tzeng SF. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(3): 397.

[13] Toyooka T, Nawashiro H, Shinomiya N, et al. Down-regulation of glial fibrillary acidic protein and vimentin by RNA interference improves acute urinary dysfunction associated with spinal cord injury in rats[J]. J Neurotrauma, 2011, 28(4): 607 – 618.

[14] Nakamura M, Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells[J]. Cell Res, 2013, 23(1): 70 – 80.

[15] Uchida A, Çolakoğlu G, , Wang L, et al. Severing and end-to-end annealing of neurofilaments in neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(29): E2696 – 2705.

[16] Uchida K, Baba H, Maczawa Y, et al. Progressive changes in neurofilament proteins and growth associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyerostotic mice[J]. Spine, 2002, 27(5): 480 – 487.

(编辑:左艳芳)