DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.025
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
146 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)02-0146-03

成年大鼠坐骨神经切断后脊髓运动神经元死亡方式的研究

杨 萍,应大君,宋 林,孙建森 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆市生物力学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探索成年大鼠坐骨神经切断损伤后脊髓前角运动神经元的死亡方式。方法 选择大鼠坐骨神经切断损伤模型,术后48 h、7 d、15 d、30 d动物经4%多聚甲醛常规灌注固定,取L_4~L_6脊髓节段,TUNEL染色和电镜观察。结果 坐骨神经切断后TUNEL染色和电镜观察均检测到脊髓前角运动神经元典型的凋亡形态学改变。结论 周围神经切断后脊髓前角运动神经元出现凋亡,表明神经元的凋亡可能为成年大鼠周围神经损伤引发神经元死亡的重要病理过程。

关键词:周围神经;运动神经元;凋亡;大鼠
中图法分类号:R322.8;R338.1;R651.3 文献标识码:A

Pattern of motoneuron death following transection of the sciatic nerve in adult rats

YANG Ping, YING Da-jun, SONG Lin, SUN Jian-Sen (Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the pattern of motoneuron death induced by transection of the sciatic nerve in adult rats. Methods Sciatic nerve transected model was selected. The rats were sacrificed at 48 h, 7, 15, and 30 d after operation, respectively. The L_4—L_6 segments of the spinal cord were harvested after transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde, and were stained by TUNEL method and examined electron microscopically. Results A typical pattern of morphological changes of motoneuron apoptosis in the anterior horn of spinal cord was observed by both TUNEL staining and electron microscopy. Conclusion Motoneuron apoptosis in the spinal cord anterior horn induced by peripheral nerve transection demonstrates that neuron apoptosis may be the main pathological course of rat spinal cord neuron death following peripheral nerve injury in adult rats.

Key words: peripheral nerve; motoneuron; apoptosis; rat

神经细胞作为一个整体,胞体与轴突之间的联系是十分密切的。周围神经损伤虽位于轴突,但不可避免地波及相应的神经元胞体,而神经元的功能状态也必将会影响神经轴突的再生和功能恢复。胚胎期或新生发育期哺乳类动物在高位神经损伤后可以引起大量神经元死亡,近年的研究表明,神经元的这种死亡是凋亡(apoptosis)[1~4]。但上述研究大多是以培养的神经元或胚胎期及发育期的交感与感觉神经元作为研究对象,而对于成年期动物,周围神经损伤对神经元有何影响,尤其是运动神经元是否会出现凋亡,尚有争议。我们应用原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP标记法[terminal deoxy-nucleotidyl transferase (TdT)-mediated digoxingenin-dUTP nick end labeling, TUNEL][5],同时应用电镜检测,观察成年大鼠坐骨神经切断损伤后脊髓运动神经元的形态学改变,探索神经损伤与神经元死亡之间的关系,为周围神经再生的深入研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试剂与材料

细胞原位凋亡检验试剂盒(*in situ* cell death detection kit),Fluorescein荧光凋亡试剂盒购自Roche Molecular Biochemical,余为国产分析纯。

1.2 动物分组及模型制备

雄性SD大鼠16只取自我校实验动物中心,体质量160~200 g,按手术先后随机分成术后48 h、7 d、15 d、30 d 4个时间组,每组4只。用戊巴比妥钠按30 mg/kg腹腔注射麻醉,无菌条件下作左臀部斜切口,钝性分离肌肉,在大鼠左侧臀肌间隙显露坐骨神经,距梨状肌下缘0.5 cm处将坐骨神经切断,用2~3针10-0无创缝线将神经外膜端端对线缝合[6],对侧(右侧)不做手术作为正常对照。术后不同的时间组再次用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,经心行主动脉插管,用生理盐水冲洗,4%多聚甲醛灌注固定。获取脊髓L_4~L_6节段,规定于同样溶液中4 h,放30%蔗糖中(4 ℃)过夜,次日待组织沉入瓶底,冰冻切片,片厚10 μm,制片备用。

作者简介:杨 萍(1967—),女,四川省阆中市人,博士,讲师,主要从事神经再生的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752225

收稿日期:2002-10-30;修回日期:2003-08-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　凋亡的检测

TUNEL 染色操作过程按试剂说明书进行。简述如下: 大鼠 $L_4 \sim L_6$ 脊髓冰冻切片厚约 10 μm, 贴片; 二甲苯脱脂两次, 每次 5 min; 切片经 100%、95%、90%、80%、70% 系列乙醇入水, 均为 2 min; 蛋白酶 K(2 μg/ml 于 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.05 mol/L EDTA 缓冲液中)于 37 ℃消化 15 min; 0.3% H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶, 10 min, 室温; 加酶反应液(10 μl TdT 酶和 90 μl TdT 缓冲液混合而成)孵育 2 h(37 ℃); 加酶底物 POD 50 μl, 2 h(37 ℃); 以上各步间均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显色, 苏木精复染; 脱水, 透明, DPX 封片。对照实验: 在 TdT 缓冲液中不加 TdT 酶, 其余步骤同上。随机挑选 5 个视野, 计数 TUNEL 阳性染色神经元数。

1.4　电镜观察

常规灌注后取术后 7 d 大鼠脊髓 $L_4 \sim L_6$ 节段放 3%戊二醛小瓶中, 置于 4 ℃固定 2 ~ 4 h, 组织块经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中漂洗、1%锇酸后固定、梯度丙酮脱水、饱和醋酸铀块染、环氧树脂包埋、半薄切片定位、超薄切片、电子染色等步骤后, 透射电镜观察。

1.5　统计方法

对所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 ANOVA 分析和 t 检验进行差异显著性检验。

2　结果

2.1　TUNEL 标记凋亡的神经元

术后 48 h 损伤侧脊髓前角出现 TUNEL 阳性染色的神经元, 表现为核固缩, 染色质浓缩, 或形成不规则碎块, 染成棕黄色, 苏木精复染时正常的细胞核被苏木精染为蓝色(图 1)。术后 7 d 凋亡数达到顶峰, 随后又骤减, 30 d 时最少, 统计结果如图 2。对侧脊髓和阴性对照组未检测到 TUNEL 阳性神经元。术后 48 h、15 d 与 7 d, 30 d 与 48 h、7 d、15 d 相比, 均有显著性差异($P < 0.05$)。

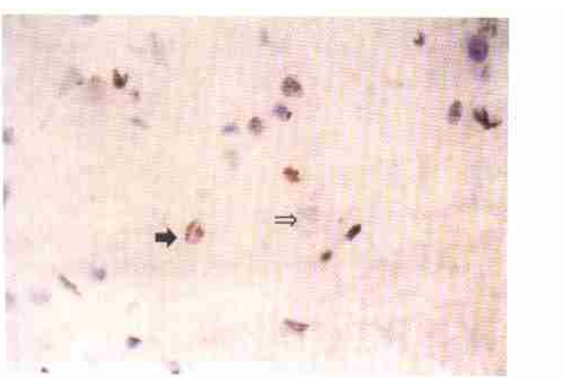


图 1　大鼠坐骨神经损伤后, 脊髓运动神经元 **TUNEL** 染色可见被染成棕黄色细胞核的 **TUNEL** 阳性神经元(➡), 苏木精复染可见正常神经元被苏木精染成蓝色(→)

Fig 1　**TUNEL positive neurons with brownish-yellow nuclei (➡) stained by TUNEL following transection of sciatic nerve in adult rats, and normal neurons stained into blue with hematoxylin (⇒)**

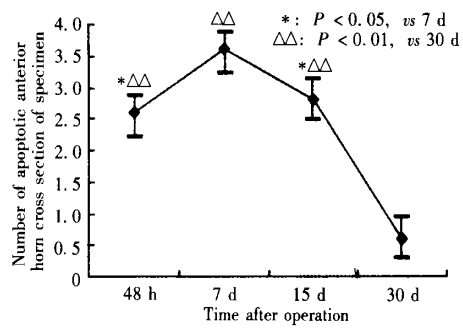


图 2　坐骨神经切断后不同时间段脊髓前角神经元 **TUNEL** 标记数

Fig 2　**Number of TUNEL positive neurons in anterior horn of spinal cord at different time points following sciatic nerve transection**

2.2　电镜观察结果

坐骨神经切断损伤后 7 d, 损伤侧可见凋亡小体, 见图 3。对侧大鼠脊髓前角运动神经元细胞核呈椭圆形, 核膜完整, 核内染色质均匀, 核周粗面内质网和游离核糖体丰富, Golgi 复合体和线粒体形态完整。

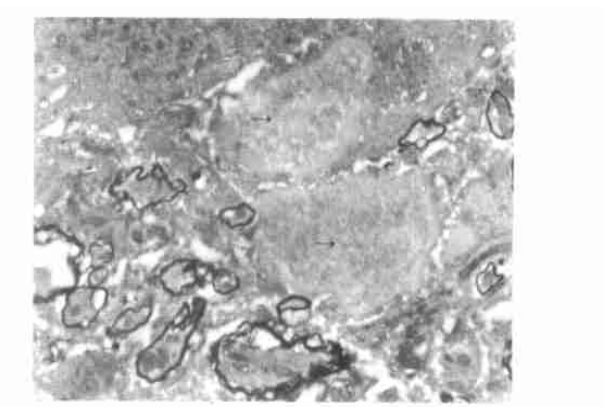


图 3　坐骨神经损伤后 **7 d**, 损伤侧可见凋亡小体(→)　(TEM× 4 200)

Fig 3　**Apoptotic bodies (→) in the anterior horn of spinal cord at 7 d after injury**　(TEM× 4 200)

3　讨论

神经细胞作为一个整体, 胞体与轴突之间的联系是十分密切的, 因此, 周围神经损伤虽位于轴突, 轴突损伤实质上是细胞损伤, 必然影响相应的神经元胞体, 而神经元的功能状态也必将会影响神经轴突的再生和功能恢复。因此, 研究周围神经再生和功能恢复的重点, 以从以往单纯重视损伤局部的影响因素, 拓展到对神经元、轴突和效应器三方面的研究。周围神经损伤后相应神经元溃变死亡, 已被人们所接受, 其死亡方式是坏死还是凋亡, 是人们关注的焦点。针对不同的死亡方式, 将给予不同的治疗, 进而促进周围神经再生。大鼠周围神经轴突断裂损伤实验是研究周围神经再生的有效模型[7,8]。本实验应用大鼠坐骨神经切断损伤

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

模型，来研究周围神经损伤后脊髓运动神经元的死亡方式，结果 TUNEL 标记法和电镜超微结构观察均检测到坐骨神经切断侧脊髓 L_4 ~ L_6 节段前角典型的细胞凋亡的形态学改变，且凋亡主要发生于坐骨神经损伤后 1 ~2 周，这可能是因为 2 周左右已有再生纤维到达效应器，一些靶源性神经营养因子便可被摄取并逆行运输到神经元所致。本实验结果表明，大鼠坐骨神经切断可导致脊髓前角运动神经元发生凋亡，神经元的凋亡可能为成年大鼠周围神经损伤引发神经元死亡的主要病理过程，是引起神经元丢失的主要原因之一，也是影响运动神经元再生和功能恢复的直接原因。神经元的存活是神经再生的前提，因此，神经损伤后，如何保护濒临死亡的神经元也成为目前研究的热点之一，而减少或阻止神经元凋亡的发生无疑对促进神经再生、最大限度地恢复神经功能，具有重要的意义。

参考文献：

[1] Oliveira A L, Risling M, Negro A, *et al*. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor[J]. J Comp Neurol, 2002, 447(4): 381－93.

[2] Bahadori M H, Al-Tiraihi T, Valojerdi M R. Sciatic nerve transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion [J]. J Neurocytol, 2001, 30(2): 125－30.

[3] Oliveira A L. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice[J]. Braz J Med Biol Res, 2001, 34(3): 375－80.

[4] Tong J X, Rich K M. Diphenylpiperazines enhance regeneration after facial nerve injury[J]. J Neurocytol, 1997, 26(5): 339－347.

[5] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death *in situ via* specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119(3): 493－501.

[6] Koka R, Hadlock T A. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection[J]. Exp Neurol, 2001, 168(1): 192－195.

[7] Van Meeteren N L, Brakkee J H, Helders P J, *et al*. Recovery of function after sciatic nerve crush lesion in rats selected for diverging locomotor activity in the open field[J]. Neurosci Lett, 1997, 238(3): 131－134.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)02-0148-02

先兆流产病人血清肿瘤坏死因子、白细胞介素-8 与治疗效果的关系

Relationship of serum TNF and IL-8 levels with curative effect in threatened abortion patients

范江涛，龙凤宜，李建华 （广西医科大学第一附属医院妇科，南宁 530021）

先兆流产（threatened abortion）是妇产科的一种常见病。它的病因是多方面的。根据 WHO 一项研究结果表明[1]，在临床所有可辨认的妊娠中和自然流产的胚胎中各有 15% 和 50% ~ 60% 的染色体异常。对于那些无严重的胚胎缺陷的先兆流产者来说，进行相应的治疗是必要的，而对于那些具有染色体和其它严重异常者来说，保胎治疗则是无价值的。在传统的方法中，多以 B 超、人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin hormone，hCG）等手段来进行判断，但它们仍存在一定的局限性。在最近的文献中，我们发现炎症在先兆流产中起重要的作用。本项研究中，我们观察了先兆流产病人的血清肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor，TNF）、白细胞介素-8（Interleukin-8，IL-8）的水平与病人转归的关系，以研究 TNF、IL-8 等细胞因子在判断先兆流产发展之中的作用。

1 材料和方法

病人的选择：选自 2001－2002 年在我院住院病人共 100 例，入选本研究的条件：①停经 6~ 10 周；②有下腹隐痛或伴有阴道少许流血；③B 超提示宫内妊娠；④既往无习惯性流产史；⑤无全身严重的感染性疾病。

病人的处理与分组：入院后确诊为先兆流产的病人，治疗前即抽取病人静脉血 5 ml 离心后抽取其血清，置于－20 ℃的冰箱中待检。住院病人均给予 hCG、黄体酮及其它对症处理。根据治疗效果可分为治疗失败组和治疗成功组，治疗成功组出院前抽取静脉血做同样处理后待检。其中治疗成功组共 69 例，失败 31 例。

判断标准：①治愈标准：病人症状消失，B 超提示胎儿存活，至孕 12 周。②治疗失败标准：病人达到难免流产的诊断标准或临床检查提示胚胎停育。

标本的检测：所有标本均成批送检，采用免疫发光的方法检测 TNF、IL-8。TNF、IL-8 批间变异、批内变异分别为：2.1% 和 3.2%。

统计学处理：采用 SPSS 统计软件包，进行配对 t 检验及两样本均数的 t 检验。

2 结果

我们比较了成功组（即继续妊娠组）和失败组治疗前的 TNF、

（下转 158 页）

作者简介：范江涛（1969－），男，山东省莱阳市人，硕士，主治医师，主要从事妇科肿瘤和妇科内分泌方面的研究。现在妇产科工作。电话：（0771）5356513，E-mail：fanjiangtao@netease.com

收稿日期：2003-03-01；修回日期：2003-07-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net