DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.021
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2115-04

论著

大鼠红核和颈段皮质脊髓背侧束联合损伤模型的建立

宗兆文,廖维宏,伍亚民,龙在云,曾 琳,杨恒文,李应玉 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 为研究脊髓损伤后的可塑性变化,建立大鼠红核和皮质脊髓背侧束(dCST)联合损伤模型。方法 立体定位仪下,致伤颈3 dCST和双侧红核,甲苯胺蓝染色显示损伤范围。示踪剂观测皮质脊髓腹侧束(vCST)的出芽情况;同时,评定大鼠前肢功能的变化情况。结果 精确地致伤红核和dCST后,vCST的出芽数量和大鼠前肢功能评分成显著负相关($P<0.01$)。结论 大鼠红核和dCST联合损伤模型是研究脊髓损伤后可塑性变化的良好模型。

关键词:脊髓损伤;可塑性;模型;功能评定
中图法分类号:R-332;R651.2 文献标识码:A

Establishment of combined injury model of cervical dorsal corticospinal tract and red nuclei in rats

ZONG Zhao-wen, LIAO Wei-hong, WU Ya-min, LONG Zai-yun, ZENG Lin, YANG Heng-wen, LI Ying-yu (Department 3, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To establish a combined injury model of cervical dorsal corticospinal tract (dCST) and red nuclei for the study of plasticity after spinal cord injury. **Methods** Cervical dCST and red nuclei were injured stereotaxically. Toluidine blue staining was employed to assess the extent of the injuries. Biotin Dextran Amine was used to trace the sprouting of ventral CST. The forelimb performance of rats was also evaluated. **Results** After cervical dCST and red nuclei were precisely injured, the number of vCST sprouting was negatively correlated with the scoring of rat forelimb performance ($P<0.01$). **Conclusion** The combined injury model of cervical dorsal corticospinal tract and red nuclei is a good model for the study of plasticity after spinal cord injury.

Key words: spinal cord injury; plasticity; sprouting; model; behavior test

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)后的功能恢复一直是神经科学研究的难点之一。除促进损伤的轴突再生、神经干细胞移植等方法外,SCI后的可塑性变化(Plasticity)是促进功能恢复的重要手段,并受到越来越多的重视[1]。大鼠皮质脊髓束(Corticospinal tract, CST)和红核脊髓束(Rubrospinal tract, RST)在控制运动中有着重要的作用,因而对其研究也最为广泛。为更好地研究SCI后的可塑性变化,本实验建立了联合致伤大鼠红核和皮质脊髓背侧束(Dorsal corticospinal tract, dCST)的模型,以观察皮质脊髓腹侧束(Ventral corticospinal tract, vCST)"出芽"这种形式的可塑性变化,并为进一步研究外加因素对其影响奠定基础。

作者简介:宗兆文(1975-),男,江苏省铜山县人,博士,医师,主要从事脊髓损伤和修复方面的研究。电话:13330261382
收稿日期:2003-03-26;修回日期:2003-09-25

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年Wistar大鼠52只(大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量200~250 g,分为5组:正常组(Normal组,N组);SI(Single injury)组:单纯损伤dCST;DI(Double injury)组:联合损伤dCST和红核;DI-Bu(Double injury+buffer)组:联合损伤dCST和红核,SCI局部施用病毒缓冲液;DI-BDNF组:联合损伤dCST和红核,SCI局部施用脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)重组腺病毒载体。除N组设4只大鼠外,其余各组设2、4、8周3个时相点,每个时相点4只,每组12只。

1.2 主要实验仪器和试剂

冰冻切片机(CM 1990);立体定位及微电极推进器(成茂会社);微量注射器;生物素化葡聚糖胺(Biotin dextran amine, BDA);奎宁酸(Quinolinic acid, QA);含BDNF cDNA表达框的重组腺病毒载体(AxCA-BDNF)。

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

1.3 功能评定方法

参考 Weidner 等[2]的大鼠前肢食物小球抓取实验，并加以改进。禁食 1～2 d 后，将大鼠置于自制的测试盒中。食物小球置于开口前方的平台上供大鼠抓取。每天训练 1 次。一般 2 周后大鼠前肢抓取功能趋于稳定，此时评分后加以致伤。术后 2～3 d 训练 1 次，各时相点评分。

评分标准。将大鼠抓取食物过程摄像并采集入计算机，分解为 6 个分解动作：①伸前肢至食物上方；②足趾打开，手掌转向下，置于食物上；③抓握食物；④前肢回缩；⑤将食物释放至嘴中；⑥大鼠双侧前掌捧握并咀嚼食物。每只大鼠共进行 10 次测试，每个分解动作按其异常程度记分：①0 分：正常；②1 分：小于 50%的动作有异常，能较顺利地完成动作；③2 分：大于 50%的动作异常，但能完成动作；④3 分：无反应。然后将 6 个分解动作的得分相加。同时将连续 10 次抓取所需时间按长短评分：①0 分：≤50 s；②1 分：＞50 s，但≤3 min；③2 分：＞3 min 或无反应。将所得分值计入总分。最高分 20 分，最低分 0 分。分值越高，功能越差。

1.4 致伤过程

1%戊巴比妥钠麻醉(40 mg/kg)后，行以下手术：

致伤颈 3 d CST。将大鼠固定于立体定位仪上，常规显露颈 3 脊髓后，以后中央动脉为中线，将自制不锈钢细丝调整至中线左侧 0.6 mm，深度 1.1 mm，提拉，从而损伤脊髓[2]。同样的方法损伤右侧脊髓。

药物注射。致伤 dCST 后，DI-Bu 组 SCI 局部施用 2 μl 病毒缓冲液；DI-BDNF 组 SCI 局部施用 2 μl AxCA-BDNF，滴度：10^7 pfu/ml。

致伤双侧红核。固定大鼠头部于定位仪上，显露颅骨，辨认前囟，牙科转颅骨开窗，微电极推进器控制玻璃尖端直径 2 um 的微电极，将 2%奎宁酸 2 μl 注入双侧红核。定位：前囟后 5.8 mm，侧方 0.7 mm，深 7.4 mm。

1.5 BDA 示踪及免疫组化

0.1% BDA 在立体定位仪的引导下注入大鼠前肢皮层代表区，前囟前 1.0 mm，侧方 2.0～2.5 mm，深 2.0 mm。左右各 4 点，每点 0.2 μl。2 周后，常规麻醉灌注动物，取损伤节段下脊髓，固定。少量横切面后，行冠状面冰冻切片，厚度 20 μm。常规免疫组化显色。冠状面切片上，计算 vCST 出芽数量，取其均值。横切面切片上观察有无损伤 dCST 再生通过损伤节段。

1.6 组织病理学观察

常规麻醉灌注动物后取损伤处脊髓和红核，甲苯胺蓝染色，观察损伤范围。

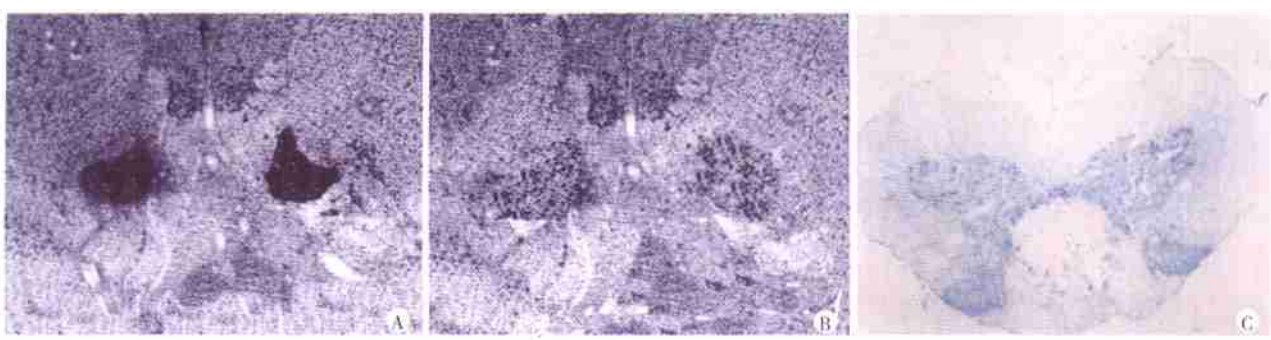
1.7 统计学处理

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析和相关性分析。

2 结果

2.1 精确致伤红核和皮质脊髓背侧束

奎宁酸致伤的优点是，以损伤灰质为主，很少波及白质。见图 1A、B，QA 精确地致伤了双侧红核。大鼠 CST 主要包括 dCST 和 vCST，用自制不锈钢细丝在立体定位仪的引导下精确地损伤了 dCST，当然不可避免的损伤了部分或全部薄束和楔束，见图 1C。



A: Normal magnocellular component of red nuclei (arrow); B: Destruction of red nuclei by injection of 2 μl 2% quinolinic acid (arrow); C: Transected dorsal CST along with some of the dorsal sensory columns (enclosed part)

图 1 臻伤红核和皮质脊髓背侧束 (Toluidine Blue staining× 100)

Fig 1 Injury of red nuclei and dorsal corticospinal tract (Toluidine Blue staining× 100)

2.2 正常大鼠和损伤后各时相点大鼠前肢功能评分情况

致伤后 1 周评定大鼠功能 1 次，加上各时相点的功能评分如表 1 示，可以看出：①伤前各组大鼠功能评分无显著差异($P>0.05$)；②伤后 1 周大鼠前肢功能均明显受损，各组间无显著差异($P>0.05$)。在伤后 1、2、4、8 周内，各组大鼠功能均未能恢复至正常对照和伤前水平($P<0.01$)；③SI 组大鼠伤后 2、4、8 周的功能较伤后 1 周有明显的提高($P<0.01$)；④DI 组和 DI-Bu 组大鼠 8 周内未见前肢功能有明显的恢复，两组之间在各个时相点无显著差异($P>0.05$)；⑤DI-BDNF 组大鼠前肢功能于 2 周后明显恢复($P<0.01$)，且 4、8 周大鼠前肢功能有进一步恢复，但没有统计学意义。

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

表 1　正常大鼠和致伤后各时相点大鼠前肢功能评分($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Forelimb performance score in normal rats and injured rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	Before injury	1 week post-injury	2 week post-injury	4 week post-injury	8 week post-injury
N	1.68±0.64	—	—	—	—
SI	1.67±0.65	16.68±1.22 ▲▲	11.67±1.03 ** ▲▲	10.67±1.21 ** ▲▲ #	9.17±1.72 ** ▲▲
DI	1.57±0.55	15.33±1.75 ▲▲	16.65±1.16 # # ▲▲	15.89±1.02 # # ▲▲	16.02±1.65 # # ▲▲
DI-Bu	1.75±0.54	16.17±2.14 ▲▲	15.98±2.02 # # ▲▲	15.46±1.43 # # ▲▲	14.56±1.45 # # ▲▲
DI-BDNF	1.67±0.82	16.08±1.18 ▲▲	10.67±2.16 ** ▲▲	7.83±1.72 ** ▲▲	8.16±1.47 ** ▲▲

N: Normal; SI: Single injury; DI: Double injury; DI-Bu: Double injury+buffer; DI-BDNF: Double injury+brain-derived neurotrophic factor

**: $P<0.01$ *vs* 1w post-injury; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* DI-BDNF; ▲▲: $P<0.01$ *vs* N

2.3　正常大鼠和损伤后各时相点大鼠 vCST"出芽"情况

由于示踪剂 BDA 从皮层到达颈段脊髓需 2 周时间, 所以无法设 1 周这个时相点。正常大鼠和在致伤后 2 周各组大鼠 vCST"出芽"情况。各时相点大鼠 vCST"出芽"情况见表 2, 可以看出: SI 组, DI 组和 DI-Bu 组与正常大鼠 vCST"出芽"数量之间无显著差异($P>0.05$); DI-BDNF 组 vCST"出芽"数量在伤后 2 周明显增加, 较 N 组, SI 组, DI 组和 DI-Bu 组大鼠 vCST"出芽"数量明显为多($P<0.05$), 4~8 周内未见"出芽"塌陷现象, 即"出芽"数量保持稳定。

表 2　正常大鼠和致伤后各时相点大鼠 **vCST**"出芽"数量($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The number of vCST sprouting in normal rats and injured rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	2w post-injury	4w post-injury	8w post-injury
N	2.67±0.82	—	—
SI	2.67±0.81	2.83±0.75	2.17±0.75
DI	2.35±0.67	2.83±0.36	2.35±0.42
DI-Bu	2.67±0.26	2.17±0.75	2.35±0.56
DI-BDNF	4.67±1.03 *	5.00±1.26 *	4.83±0.75 *

N: Normal; SI: Single injury; DI: Double injury; DI-Bu: Double injury-buffer; DI-BDNF: Double injury-brain-derived neurotrophic factor

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* N

2.4　vCST"出芽"与大鼠功能之间的关系

DI-BDNF 组大鼠 vCST"出芽"数量和大鼠前肢功能评分分值呈负相关($r=-0.67$, $P<0.01$)。即在 DI-BDNF 组, vCST"出芽"越多, 大鼠前肢功能恢复越好。而在 SI 组, DI 组和 DI-Bu 组, vCST"出芽"数量和大鼠前肢功能评分分值无明显相关性, 见表 3。

表 3　**DI-BDNF** 组功能评分与出芽量之间相关性

Tab 3　The correlation between forelimb performance score and the number of vCST sprouting in DI-BDNF group

	2 week post-injury	4 week post-injury	8 week post-injury
Score	10.67±2.1	67.83±1.7	28.16±1.47
Sprouting	4.67±1.03	5.00±1.26	4.83±0.75

$r=-0.67$, $P<0.01$

3　讨论

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)后的功能恢复一直是神经科学研究的难点之一, 目前主要的研究方向有[1]: 促进损伤轴突的再生; 组织移植替代神经缺损以求重建损伤脊髓的解剖连接; 修复损伤髓鞘, 恢复神经轴突的传导功能等。近年来, 人们对 SCI 后可塑性变化(Plasticity)的研究日益增多, 并发现这种可塑性变化对促进功能恢复有着重要的意义[1]。其中, 未受损轴突"侧枝发芽"是最为重要的一种可塑性变化。

目前, 对"侧枝发芽"的研究多集中在 CST 和 RST, 主要因为它们在控制大鼠运动的重要地位。大鼠 CST 起自初级运动皮层Ⅴ层锥体细胞, 经内囊、大脑脚至脑干腹侧, 继而分束投射到脊髓白质[3]。其中, 约 95%纤维交叉至对侧, 沿脊髓背中间下降, 称为 dCST; 少于 5%纤维不交叉, 沿脊髓腹中间侧下降, 称为 vCST。除上述两种主要成分外, 尚有少量纤维(<2%)沿脊髓背外侧和外侧下降。CST 在下降的过程中, 纤维主要投射至脊髓Ⅲ~Ⅵ区中间神经元。RST 起自双侧红核, 其纤维主要投射到脊髓白质的Ⅳ~Ⅵ板层。RST 和 CST 协同, 完成对大鼠运动功能, 特别是前肢精细动作的调控。

实验中, 我们切断成年大鼠含有 95%CST 纤维的 dCST 后, 大鼠丧失了四肢的运动功能。但于损伤后 2 周左右有明显的恢复($P<0.01$)。同 Weidner 等[2] 的观察结果类似, 他们认为这种自发性的功能恢复是源于未受损伤 vCST 的"侧枝发芽"引起的功能代偿。但他们没有排除其它传导束功能代偿的可能, 比如 RST 的作用。大鼠 CST 与 RST 在很多方面有诸多相似之处, 比如: ①二者在脊髓的Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ板层有共同的支配区[4]; ②二者都使用谷氨酸作为兴奋性传导递质[5]; ③二者在伸前肢及抓取动作中, 具有类似的放电特性[6]。二者在功能上相互协调, 共同完成对前肢精细动作的调控[7]。损伤后, 二者在一定的条件下, 功能可相互代偿。切断成年大鼠双侧锥体束, 完全损伤 CST。此时, 大鼠前肢的运动功能丧失。使用 mAb IN-1 中和神经生长抑制因子 NogoA 的作用后, RST 在颈段脊髓可大量"出芽", 并伴有损伤运动功能的恢复[8]。类似的, 将奎宁酸注入大鼠双侧红核, 致伤 RST, 在神经营养因子-3(Neurotrophin-3, NT-3)的作用下, CST 的神经轴突可大量"出芽"至 RST 的失神经支配区[9]。

由此可以看出, RST 与 CST 在功能上相互协调, 共

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

同完成运动的控制，且二者在损伤后，可相互代偿。因而我们不能判断，单纯切断成年大鼠 dCST 后的自发性功能恢复是源于 vCST 的“出芽”[2]，还是源于 RST 的功能代偿，或二者兼而有之。单纯损伤组（I 组）的 vCST “出芽”在伤后无明显增加，因而我们推测单纯致伤 dCST 后，大鼠的功能恢复主要源于 RST 的代偿。而联合致伤红核和 dCST 后，去除 RST 代偿作用，在无外加因素或只使用缓冲液时，大鼠功能无明显恢复。这说明单纯致伤 dCST 后，RST 和 vCST 均可能发生可塑性变化，促进功能恢复。我们之所以选择同时致伤 dCST 和红核这个动物模型，就是想排除 RST 的代偿作用，使影响因素单一化，便于观察外加因素对 vCST“出芽”及功能恢复之间的对应关系。

实验中，致伤 dCST 和红核后，SCI 局部施用 AxCA-BDNF 重组腺病毒，持续表达 BDNF，vCST“出芽”增加，伴有明显的功能恢复，且“出芽”数量与功能恢复成正相关。主要是 SCI 局部 BDNF 可以诱导 vCST “出芽”，其具体机制我们将进行进一步的研究。

需要指出的是，BDNF 引起的功能恢复不是由于损伤的 dCST 再生引起，因为 BDA 顺行示踪显示，损伤节段以下，脊髓背侧束中没有阳性显色。说明，损伤的 dCST 没能通过再生，使损伤的轴突连接恢复。

综上，联合致伤大鼠 dCST 和红核这个动物模型，是研究 SCI 后“侧枝出芽”这种可塑性变化很好的模型。

参考文献：

[1] Schwab M E. Repairing the injured spinal cord[J]. Science, 2002, 295(5557): 1029—1031.
[2] Weidner N, Ner A, Salimi N, *et al*. Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(6): 3513—3518.
[3] Brosamle C, Schwab M E. Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract[J]. J Comp Neurol, 1997, 386(2): 293—303.
[4] Antal M, Sholomenko G N, Moschovakis A k, *et al*. The termination pattern and postsynaptic targets of rubrospinal fibers in the rat spinal cord: a light and electron microscopic study[J]. J Com Neurol, 1992, 325(1): 22—37.
[5] Giuffrida R, Rustioni A. Glutamate and asparate immunoreactivity in corticospinal neurons of rats[J]. J Com Neurol, 1989, 288(1): 154—64.
[6] Jarratt H, Hyland B. Neural activity in rat red nucleus during forelimb reach-to grasp movements[J]. Neurosci, 1999, 88(2): 629—642.
[7] Kuchler M, Fouad K, Weinmann O, *et al*. Red nucleus projections to distinct motor neuron pools in the rat spinal cord[J]. J Comp Neurol, 2002, 448(4): 349—359.
[8] Raineteau O, Fouad K, Noth P, *et al*. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(12): 6929—6934.
[9] Jeffery N D, Fitzgerald M. Effects of red nucleus ablation and exogenous neurotrophin-3 on corticospinal axon terminal distribution in the adult rat[J]. Neurosci, 2001, 104(2): 513—521.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)23-2118-01

脾切除加门奇断流术治疗肝硬变门脉高压伴自发性脾破裂 1 例

Portal cirrhosis with spontaneous lienic rupture treated by splenectomy and portoazygos disconnection: a case report

吴红涛，麻晓林，姚元章 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所创伤中心，重庆 400042）

患者，男性，55 岁，因搬抬重物后感上腹部疼痛 24 h 急诊入院。既往有“肝炎”病史，无便血、呕血史。体检：T36.9 ℃、P 100 次/min、BP 105/60 mmHg。意识清楚、痛苦病容、皮肤巩膜无黄染、无肝掌及蜘蛛痣。腹部平坦，全腹压痛及反跳痛。肝、脾于肋缘下未扪及，移动性浊音（+）。实验室检查：RBC 2.12×10^{12}/L、Hb 74 g/L、PLT 95×10^{9}/L，血浆蛋白 42 g/L（肝功能 B 级）。腹部透视（−）；B 超提示脾破裂；腹穿抽出不凝血。急诊剖腹探查，术中见腹腔内积血 1 500 ml，肝质硬，呈结节状；脾脏明显肿大约 8 cm×10 cm×5 cm，脾中下极膈面可触到多个裂口（8、6、3 cm）。诊断为门脉性肝硬变伴自发性脾破裂。术中病人血液动力学稳定，在保证有良好监护和充足血源的情况下，行脾切除加门奇断流术，手术顺利。术后诊断：①自发性脾破裂；②门脉性肝硬变；③失血性休克代偿期。术后予胃肠减压、止血、抗感染、对症支持治疗后，痊愈出院。病理诊断：门脉性肝硬变，脾大伴脾功能亢进，脾破裂。

讨论

自发性脾破裂是无明确外伤史而发生的脾脏突发性或隐

（下转 2122 页）

作者简介：吴红涛（1976—），男，贵州省贵阳市人，医师，主要从事严重胸腹伤方面的研究。电话：(023)68757242
收稿日期：2002-11-02；修回日期：2003-04-16

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