DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.015
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
36 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0036-04

神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后腓肠肌的影响

李成仁,陈德英,李 巍,蔡文琴,苏炳银 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨神经干细胞(NSCs)移植对脊髓损伤后腓肠肌的影响。方法 30只Wistar大鼠随机分为正常组(A组)、损伤组(B组)和NSCs移植组(C组),每组10只;将培养的大鼠神经干细胞悬液注入C组切断脊髓处,B组注射等量的生理盐水。术后2个月,进行腓肠肌肌电位、肌湿重测定,观察腓肠肌运动终板的变化。结果 ①与A组比较,B组和C组腓肠肌肌电位的峰值下降,时限延长($P<0.01$),C组电位有所恢复。②与A组比较,B组的腓肠肌肉湿重下降近70%,C组肌肉湿重有所恢复,但仍未达到正常水平($P<0.01$)。③B组和C组的运动终板形状变得单一,运动终板的总数量减少,其中C组比B组减少数目为少。结论 神经干细胞移植入脊髓损伤的横断处,能延缓肌肉的萎缩,有助于其功能的恢复。

关键词:神经干细胞;脊髓损伤;腓肠肌;大鼠
中图法分类号:R322.74;R329.25;R651.2 文献标识码:A

Effects of neural stem cell transplantation on gastrocnemius muscle in rats with spinal cord injury

LI Cheng-ren, CHEN De-ying, LI Wei, CAI Wen-qin, SU Bing-yin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of neural stem cell (NSC) transplantation on gastrocnemius muscle in rats with spinal cord injury. Methods Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups: control group (A), injury group (B) and NSC transplantation group (C). Two months after operation, the muscle potential and wet weight of gastrocnemius muscle were determined and the changes of motor end-plate were observed. Results ①The peak values of contraction potential of gastrocnemius muscle in groups B and C decreased and the time limit elongated but the potential of group C was superior to that of group B; ② Compared with that in group A, the wet weight of gastrocnemius muscle in group B decreased by 70%. The wet weight in group C increased but did not reach the normal level ($P<0.01$); ③ Single forms of motor end-plate of gastrocnemius muscle were found in groups B and C with decreased number of motor end-plate of gastrocnemius muscle (fewer in group C than that in group B). Conclusion NSC transplantation can postpone atrophy and improve recovery of function of gastrocnemius muscle of rats with spinal cord injury.

Key words: neural stem cell; spinal cord injury; gastrocnemius muscle; rat

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)后的再生修复问题一直是困扰神经科学工作者的一大难题。SCI后,受脊髓支配的骨骼肌因失去脊髓的神经支配而废用及没有神经营养作用而发生萎缩,影响骨骼肌功能的恢复。尽管采用了多种措施如神经营养因子、胎脑移植等用于治疗SCI取得了一些进展[1],但仍未取得确切的疗效。许多学者探讨了神经营养因子、肢体制动、活动电刺激和失重等对失神经支配骨骼肌萎缩的影响[2,3],但如何防治SCI后失神经支配骨骼肌的萎缩仍是一大难题。实验已证实神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)移植于SCI处,可分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,填补因损伤造成的空洞,分化出来的运动神经元能发出纤维再支配失神经的肌肉,而促进功能的恢复[4,5]。本实验我们将大鼠神经干细胞移植于SCI的横断处,探讨对SCI致失神经肌肉萎缩的影响,为寻找延缓失神经肌肉萎缩的方法和促进SCI恢复的途径。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900078);全军医学科研"十五"计划青年基金资助项目(01Q097);重庆市科委应用基础研究项目(2001)
作者简介:李成仁(1970-),男,浙江省东阳市人,博士,讲师,主要从事神经干细胞与神经损伤方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752460,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-12

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

1　材料与方法

1.1　大鼠神经干细胞的获取[6]

孕 12 d Wistar 大鼠 2 只(由第三军医大学实验动物中心提供), 麻醉后取出胎鼠, 于 75% 酒精中浸泡 5 s 消毒, 剪开头皮和软骨, 分离胎鼠端脑, D-Hanks 液漂洗后在解剖显微镜下剥离脑膜和血管组织, 用手术刀片将组织反复切割制成细胞悬液, 200 目铜网过滤, 收集细胞悬液, 吹打成单细胞悬液, 台盼蓝染色后进行活细胞计数, 种植于 50 ml 培养瓶中, 每瓶细胞数约为 1×10^6 个, 在无血清 DMEM/F12 培养液中培养, 每 ml 培养液加入 20 μl 50× B27 和 20 ng bFGF。待原代克隆形成后, 每 6~7 d 收集克隆, 机械吹打分离传代 1 次。

1.2　脊髓损伤模型的制备与分组

30 只成年 Wistar 大鼠, 体重(250±50) g, 雌雄不拘, 用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg) 麻醉后, 背部剪毛消毒后沿脊柱正中切开皮肤, 分离肌肉, 暴露椎骨, 用咬骨钳仔细咬去椎板, 在 T12 与 L1 椎骨平面打开椎管, 充分暴露 L4 节段脊髓背面及两侧, 用弯头眼科镊将脊髓轻轻挑起, 用眼科剪将脊髓完全剪断, 将分离的肌肉缝合封闭椎管缺损, 缝合皮肤, 制成脊髓损伤模型。模型动物随机分为 4 组, 每组 10 只大鼠: ① 正常组(A 组): 动物只施行切皮、打开椎管, 不施行 SCI; ②损伤组(B 组): L4 节段脊髓全横断损伤; ③移植组(C 组): L4 节段脊髓全横断损伤, 移植 NSCs 悬液。

1.3　NSCs 的脊髓内移植

C 组在脊髓全横断后立即应用细胞悬液定向注射法用微型注射器注射 10 μl NSCs 至大鼠 SCI 区(细胞密度约为 5×10^4/μl), B 组注射等量的生理盐水。分层缝合切口。伤口局部滴加青霉素防止感染。术后 20 d 内每天给动物腹腔注射青霉素(1 万 U/100 g)。每天将动物的膀胱人工排空两次, 直到动物自身排尿反射恢复。

1.4　取材及检测

1.4.1　动物双侧腓肠肌肌电位的测定　　所有模型动物在术前及术后 2 个月行腓肠肌肌电位测定, 用 Nicolet Viking Ⅳ 肌电位记录仪记录肌电位。轻微麻醉动物, 使其能感受痛的刺激。将同心圆电极刺入动物一侧下肢腓肠肌内, 电脑记录静息时的肌电位, 用针刺动物的下肢, 使其感觉疼痛使腓肠肌呈收缩状态, 采集收缩时的肌电位并贮存信号。每只动物均测双下肢。

1.4.2　双侧腓肠肌湿重测定　　自股骨内外髁起点至跟骨结节止点完整取下腓肠肌, 用德国产的 Sartorius 电子天平准确称量肌肉湿重(精度 1/100 g)。

1.4.3　腓肠肌运动终板的显示　　取称重后腓肠肌, 一侧腓肠肌立即入— 70℃低温冰箱速冻, 进行恒冷箱切片机切片, 片厚 20 μm, 贴片, 入 10% Formalin-Ca^{2+} 液中固定 30 min, 行 Ache 酶组化染色; 另一侧腓肠肌甲酸固定后进行氯化金染色。

1.4.3.1　氯化金法[7]　　将组织剪成细块或切成薄片, 经生理盐水稍洗, 入 1% 氯化金液中染 1~2 h, 20% 甲酸溶液中还原 12~24 h, 蒸馏水充分冲洗后用甘油软化, 压片观察腓肠肌运动终板的形态结构。

1.4.3.2　Ache 酶组织化学染色[8]　　冰冻切片经蒸馏水略洗, 入作用液, 37 ℃温箱, 15~30 min。蒸馏水换洗 3 次, 常规脱水, 透明, 封固。用光学显微镜观察, 计数整块腓肠肌运动终板的数量。

1.5　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　腓肠肌肌电位的变化

A 组大鼠的腓肠肌的静息电位呈直线, 未见有纤颤; B 组和 C 组大鼠的静息电位均有纤颤, 其中 C 组纤颤较少; 腓肠肌收缩时记录到的肌电位, 与 A 组相比, B 组和 C 组均呈失神经变化, 电位峰值下降, 时限增长($P<0.01$), C 组与 B 组相比, 电位有所恢复($P<0.05$), 并且可出现连续收缩的肌电位, 但还未达到正常水平。具体结果见表 1, 图 1、2。

表 1　各组动物的腓肠肌肌电位峰值和时限($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Peak value and time limit of muscle potential of gastrocnemius muscle in each group($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Peak Value(μV)	Time Limit(ms)
A	10	118±11	2.6±0.24
B	10	61±9 **	4.0±0.26 **
C	10	75±15 **##	3.7±0.27 **##

*: $P<0.05$ *vs* A; **: $P<0.01$ *vs* A; ##: $P<0.01$ *vs* B

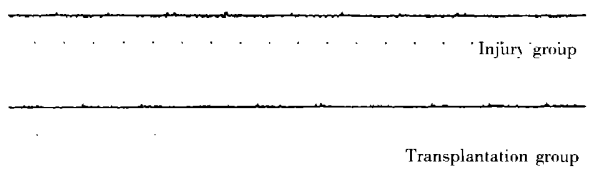


图 1　各组大鼠腓肠肌的静息电位

Fig 1　Resting potential of gastrocnemius muscle in each group

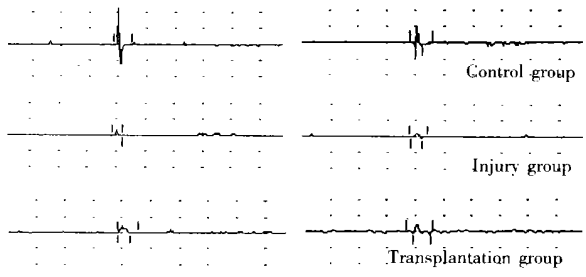


图 2　各组大鼠腓肠肌的收缩电位

Fig 2　Contraction potential of gastrocnemius muscle in each group

2.2　腓肠肌湿重的变化

B 组在 SCI 后 2 个月, 肌肉湿重下降近 70%, 与 A 组相比相差非常显著。C 组肌肉湿重虽有所下降, 但较 B 组下降幅度小($P<0.01$), 具体结果见表 2。

2.3　腓肠肌运动终板的变化

2.3.1　氯化金染色结果　　A 组的腓肠肌运动终板被染成黑色, 一般呈圆盘状; B 组和 C 组的运动终板与 A 组相比较, 形状单一, 体积减小, 爪样结构变浅。见图 3, 4。

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

表 2 各组动物的腓肠肌湿重(g, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Wet weight of gastrocnemius muscle in each group(g, $\bar{x}\pm s$)

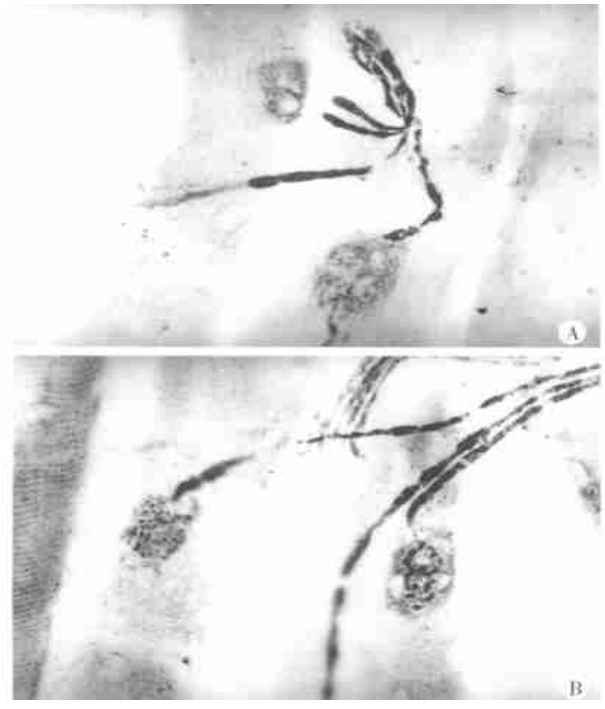
Group	n	Wet Weight(g)
A	10	1.38±0.24
B	10	0.41±0.06**
C	10	1.14±0.27**##

**: $P<0.01$ vs A; ##: $P<0.01$ vs B



图 3 正常组腓肠肌运动终板 压片 (氯化金染色×100)

Fig 3 Motor end-plates of gastrocnemius muscle in control group- Stretched preparation (Auri chloridum staining× 100)



A: Injury group; B: Transplantation group

图 4 术后 2 月腓肠肌运动终板 压片 (氯化金染色×400)

Fig 4 Motor end-plates of gastrocnemius muscle 2 months after operation-Stretched preparation (Auri chloridum staining× 400)

2.3.2 AchE 染色结果 A 组的腓肠肌运动终板被染成棕色,呈圆形或椭圆形,一般位于肌腹的中央;B 组和 C 组在术后 2 月,运动终板着色变浅,形态变小,由于肌纤维萎缩明显,显示运动终板的密度增大,但整块腓肠肌运动终板的总数量减少,其中 C 组比 B 组减少数目为少。具体结果见表 3,图 5,6。

表 3 各组动物的左侧腓肠肌运动终板数量的变化(U, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Changes of the number of motor end-plate of the left gastrocnemius muscle in each group(U, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Number of Motor End-plate
A	10	3 965±198
B	10	3 073±213**
C	10	3 495±275*#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs A; #: $P<0.05$ vs B



图 5 正常组腓肠肌运动终板 冰冻切片 (AchE 染色×200)

Fig 5 Motor end-plates of gastrocnemius muscle in control group- Frozen section (AchE acid staining×200)



图 6 损伤组术后 2 月腓肠肌运动终板 冰冻切片 (AchE 染色×200)

Fig 6 Motor end-plates of gastrocnemius muscle in injury group 2 months after operation-Frozen section (AchE acid staining× 200)

3 讨论

运动神经元与其效应器—骨骼肌之间存在着一种相互依存的营养联系,运动神经元如与靶组织失去联系,则可能发生营养障碍甚至蜕变死亡;骨骼肌组织如失去神经支配后,则因失去神经营养而发生退化、萎缩、变性和纤维化[9]。SCI 导致了脊髓内一定数量神经元包括运动神经元的死亡,远端的效应器—骨骼肌发生退化和萎缩,功能减退。许多治疗措施可能具有部分恢复脊髓功能的作用,但由于骨骼肌的萎缩和功能减退而影响脊髓运动功能的恢复。因此,在积极治

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

疗脊髓随损伤恢复脊髓功能的同时，不能忘记如何防止远端骨骼肌因失神经而发生的萎缩。NSCs 的移植被认为是修复 CNS 疾病包括退行性疾病和损伤最有希望的治疗方案，尤其是对于 SCI[10]。科学家希望通过移植的 NSCs 来替代损伤、死亡的神经元，重建神经元回路，并在损伤部位的近端和远端间起连接中断作用。研究发现，NSCs 移植入损伤的脊髓后不仅可以存活，并能分化出神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞，填充因损伤造成的空洞[4]，同时分化出来的神经元可以和损伤脊髓形成广泛的神经纤维联系和突触连接[5,11]。

NSCs 移植入脊髓内后，可以分化出运动神经元，并能够发育成熟，然后与宿主建立神经通路，部分恢复宿主丧失的功能，神经元可以再支配失神经肌肉，并抑制肌肉的萎缩和纤维化。我们以前的研究表明，将大鼠 NSCs 移植到损伤的大鼠脊髓内，NSCs 能存活、发育和分化，本研究表明 NSCs 脊髓内移植能显著维持失神经腓肠肌的湿重和运动终板的数量，并可记录到腓肠肌肌电位有一些恢复。移植成活的 NSCs 和分化出来的神经元及胶质细胞可能能持续分泌一些营养因子，如睫状神经营养因子和神经营养素-4 等，这不仅可长期、持续为失神经的肌肉提供营养，从而减轻失神经骨骼肌的萎缩，然后能再支配失神经腓肠肌并引起肌纤维的重新分化。本实验的结果表明损伤脊髓所支配的骨骼肌因失去神经营养而发生萎缩，移植 NSCs 可长期、持续提供营养物质和再支配肌肉，延缓失神经肌肉的萎缩，从而可提高其功能的恢复。

参考文献：

[1] Miya D, Giszter S, Mori F, *et al*. Fetal transplants alter the development of function after spinal cord transection in newborn rats[J]. J Neurosci, 1997, 17(12): 4856-4872.
[2] Sunderland S. Factors influencing the development and severity of the changes in denervated muscle[A]. Nerve injuries and their repair[M]. London: Churchill Livingstone, 1991. 247-315.
[3] Kondo H, Miura M, Nakagaki I, *et al*. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization[J]. Am J Physiol, 1992, 262(5): 583-590.
[4] Lundberg C, Martínez-Serrano A, Cattaneo E, *et al*. Survival, integration and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum[J]. Exp Neurol, 1997, 145(2): 342-360.
[5] Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, *et al*. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(13): 4268-4274.
[6] 李 巍, 蔡文琴, 姚忠祥. 大鼠神经干细胞分离培养及基因转染研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12): 1 425-1 427.
[7] 张赛霞, 罗灼玲. 氯化金压片显示运动终板方法的探索[J]. 解剖学研究, 2000, 22(2): 153-155.
[8] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 327.
[9] Card D J. Denervation: sequence of neuromuscular degenerative changes in rats and the effects of stimulation[J]. Exp Neurol, 1997, 54(3): 251-259.
[10] Ray J, Palmer T D, Shihabuddin L S, *et al*. The use of neural progenitor cells for therapy in the CNS disorders[A]. In: Tuszynski M H, Kordower J H, eds. CNS Regeneration[M]. Academic Press, 1999. 183-197.
[11] Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, *et al*. Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses *in vitro*[J]. Exp Neurol, 2000, 165(1): 66-76.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2003)01-0039-01

个案与短篇

运用电磁铁取颌下间隙金属异物 1 例

A case report of metal foreign body removed from submandibular space with electric magnet

肖 林[1]，刘 韬[2]，杨 军[1]（[1] 第三军医大学附属西南医院口腔科，重庆 400038；[2] 重庆市涪陵中心医院口腔科，涪陵 400080）

我们用眼科电磁铁顺利取出一患者颌下区金属异物，效果满意，现报告如下。

1 临床资料

患者，男，28 岁，1995 年 5 月 17 日因右面部火器伤后 14 h 入院，入院前 14 h，患者用自制火药枪射击猎物时，枪筒发生爆炸，枪管碎片从右面部飞入，经当地医院行伤口填塞止血、输平衡液后转入我院。查体：生命体征平稳，神情倦怠，心、肺(－)，右面部、颌下区肿胀，右下颌角区见一创面约 2 cm×3 cm，渗血明显；张口受限Ⅱ度，口内咬合关系正常。X 线片显示右颌下金属异物，右侧下颌角下缘粉碎性骨折。

治疗经过：在局麻下行右面部清创缝合及右颌下区金属异物取出术，鉴于金属异物在颌下区动度大，不易钳取，故用电磁铁吸引定位，异物在下颌角下缘隆起，依次切开皮肤、皮下组织、颈阔肌，避开颌下腺，取出异物约 2 cm×2.5 cm×2 cm。用等渗盐水冲洗伤口，分层缝合，加压包扎。经抗炎、对症治疗，7 d 后折线，伤口痊愈出院。1 年后随访，无涎瘘、无张口受限，切口瘢痕小。

（下转 42 页）

作者简介：肖 林(1972－)，男，重庆市涪陵区人，硕士研究生，医师，主要从事口腔颌面损伤与修复方面的研究。电话：(023)65398056

收稿日期：2001-09-11；修回日期：2002-01-17

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