DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.043
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
94 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0094-03

带血运的组织并胚胎脊髓移植对损伤脊髓的修复作用

张 强,廖维宏,王正国,伍亚民,陈恒胜,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 探讨带蒂的大网膜、椎旁肌并胚胎脊髓移植对损伤脊髓的修复作用。方法 采用大鼠脊髓半切洞损伤模型,将动物分为胚胎脊髓移植+大网膜组、胚胎脊髓移植+椎旁肌组、胚胎脊髓移植组、损伤对照组。移植后1、2、4、8、12周,进行HE、Nissl、嗜银染色、电镜检查和免疫细胞化学检查,观察移植物存活、分化及其与宿主之间的关系。结果 提供血运的胚胎脊髓移植到损伤的脊髓后,移植物逐渐增大,充满损伤的洞腔,并可在宿主脊髓内继续分化发育,与宿主脊髓形成部分纤维和血管联系。结论 带蒂的大网膜和胚胎脊髓组织联合移植能较好地修复损伤的脊髓。

关键词:脊髓损伤;胚胎脊髓;脊髓移植;大网膜;椎旁肌
中图法分类号:R651.2;R826.64 文献标识码:A

Effect of fetal spinal cord transplantation with vascular tissue on the recovery of neural function of adult rats with spinal cord injury

ZHANG Qiang, LIAO Wei-hong, WANG Zheng-guo, WU Ya-ming, CHEN Heng-sheng, LI Ying-yu (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the recovery of neural function of adult rats with spinal cord injury (SCI) through fetal spinal cord (FSC) transplantation with vascular tissues. Methods Adult Wistar rats were received spinal cord hemisection and then divided into 4 groups: SCI, SCI+FSC, SCI+FSC+pedicled omentum majus, and SCI+FSC+pedicled paraspinal muscle group. The experimental rats were killed at week 1, 2, 4, 8, 12 after transplantation and sample tissues were taken and studied with HE, Nissl, Argentophil stain and immunohistochemical assay. Light and electron microscopy were used to evaluate the graft survival, differentiation and integration with host. Results In SCI+FSC+pedicled omentum majus graft group, the grafted cell grew gradually and the graft blended with host tissue within the sectioned cavity. FSC survived and differentiated in the host spinal cord. The interlacing fibers were observed at or near the interface between the host and the graft. The blood vessels of pedicled omentum majus grew into the host spinal cord and formed vascular connection. Conclusion The FSC transplantation with vascular tissue may repair injured spinal cord much better than other transplantations.

Key words: spinal cord injury; fetal spinal cord; spinal cord transplantation; omentum; paraspinal muscle

胚胎脊髓移植治疗脊髓损伤的实验研究已开展多年,但如何进一步促进胚胎脊髓在宿主脊髓中发育成熟,移植后能对大鼠脊髓进行功能性修复尚无重大进展。本实验应用单纯胚胎脊髓移植,胚胎脊髓移植+大网膜,胚胎脊髓移植+椎旁肌的移植方法,观察带血运的组织+胚胎脊髓移植对损伤脊髓的修复作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组

Wistar成年大鼠,体重180~250 g,雌雄不拘,每个时相点每组6只动物,共120只大鼠。采用大鼠脊髓半切洞损伤,随机将动物分为:单纯脊髓损伤组,损伤+胚胎脊髓组,损伤+胚胎脊髓+椎旁肌组和损伤+胚胎脊髓+大网膜组。手术后1、2、4、8、12周,应用光、电镜检查观察移植物在大鼠损伤脊髓中的形态学变化。

1.2 手术方法

用戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔内注射麻醉,腰背部脱毛,无菌条件下暴露脊髓腰膨大,用负压吸引的方法损毁并吸除腰膨大左侧半脊髓造成一约2 mm×2 mm×2 mm大小的洞腔,胚胎脊髓供体为同种异体妊娠14 d的大鼠,在麻醉和无菌条件下取出胎鼠。显微镜下仔细切取颈胸段胎鼠脊髓约2 mm^3,尽可能将胚胎脊髓表面的软脊膜等结缔组织切除干净,然后用玻璃针头吸取移植物,注入预制的脊髓洞腔内,然后用9-0线缝合硬脊膜。大网膜+胚胎脊髓移植组,取左上腹部纵切口,游离大网膜保留胃网膜左动脉,选择血管丰富脂肪较少的大网膜,将带蒂大网膜自左腰三角经皮下隧道转移到腰背部切口内,将大网膜末端覆盖在移植的胚胎脊髓上。用9-0线缝合硬脊膜,并将蒂与硬脊膜缝合固定,注意尽量保持大网膜血运。椎旁肌+胚胎脊髓移植,顺椎旁肌方向切取带蒂的椎旁肌,同样将椎旁肌末端覆盖在移植的胚胎脊髓上,用9-0线缝合硬脊膜,并将肌蒂与硬脊膜缝合固定。

1.3 标本和组织切片的制作

手术后1、2、4、8、12周,每组麻醉5只受体大鼠,开胸暴露心脏,经左心室-主动脉插管,灌注生理盐水200 ml,然后灌注

基金项目:全军医学重点实验室资助项目(97015)
作者简介:张 强(1963-),男,山东省济宁市人,博士研究生,主治医师,主要从事脊柱脊髓伤病方面的研究,发表论文21篇。电话:(023)68757433
收稿日期:2000-03-18;修回日期:2000-07-11

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

4%多聚甲醛 200 ml。灌注固定 2 h 后, 取出移植部位及其头尾侧各 3 个节段的脊髓, 投入相同固定液中再继续固定 24 h, 修剪后石蜡包埋切片, HE, Nissl, 嗜银染色, 每个标本损伤区头尾侧各取一张切片, 光镜下观察。常规电镜标本制作用 3%戊二醛后固定, 镜下修出移植物, 常规电镜制片, JEM-100SX 电镜观察。应用抗 5-hydroxytry ptamine(5-HT), glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament(NF)抗体(北京中山公司)参照 SP 免疫细胞化学试剂盒说明书进行操作。镜下观察阳性细胞的标计数。

2　结果

2.1　光镜检查

胚胎脊髓移植采用妊娠 2 周时胎鼠脊髓, 这时的胚胎脊髓主要有梭形或矮柱状神经上皮细胞构成, 在腹侧套层内, 也可见到核大而浅染的神经母细胞。胚胎脊髓植入损伤的成体脊髓后 1 周, 见移植组织存活良好, 移植组织结构较松散, 内有大量的成神经细胞, 其体积普遍小于成鼠神经元, 成神经细胞胞质少, 着色深。移植后 12 周移植物体积增大, 有个别成神经细胞形态接近正常脊髓前角神经元。大网膜+胚胎脊髓移植组, 脊髓内有胶质细胞增生, 术后 2 周大网膜血管可长入宿主脊髓, 术后 4 周移植物部分神经元体积增大, 在移植物和宿主脊髓交界处可见新生神经纤维交错, 见图 1。移植后 12 周移植物体积增大, 有部分成神经细胞形态接近正常脊髓前角神经元, 大网膜与脊髓已形成较好的血管联系。椎旁肌+胚胎脊髓移植组, 移植后 2 周肌肉组织存活良好, 肌组织结构清楚。术后 2 周移植的胚胎脊髓组织结构与 1 周时基本相似, 但成神经细胞开始分化增多, 出现核分裂相。但移植后 12 周移植物体积未见继续增大, 部分肌肉组织纤维化变性, 未见成熟的神经元。单纯脊髓损伤组, 损伤后 1 周即出现胶质纤维瘢痕和形成坏死空洞, 未见神经再生。

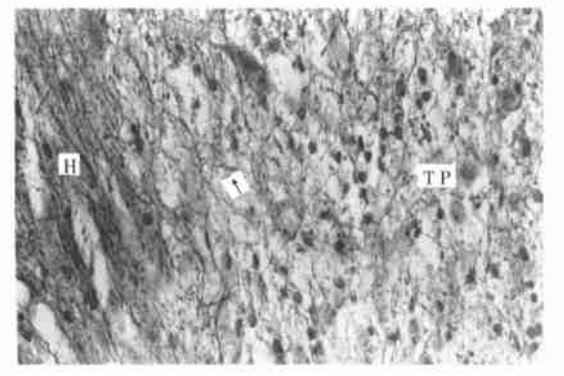


图 **1**　大网膜+胚胎脊髓移植 **4** 周, 移植物和宿主脊髓有大量纤维交错　(嗜银染色× 200)

Fig 1　Large amount of interlacing fibers were observed at the interface between the recipient and FSC 4 weeks after transplantation in FSC+ pedicled omentum majus group

H: Host; TP: Transplantation(←)(Argentophil stain× 200)

2.2　电镜检查

损伤+大网膜组移植后 2 周电镜下见胚胎脊髓神经上皮细胞紧密相连, 核仁不明显, 异染色质丰富, 胞浆内细胞器较少, 有大量新生的血管, 见图 2。4~12 周电镜下见胚胎脊髓神经细胞突起延长。部分神经细胞已发育成熟, 并与其他神经细胞形成突触联系, 移植物长入脊髓的血管数量增多, 直径变大。损伤+椎旁肌组 2 周电镜下见移植的肌肉组织形态正常, 有清楚的明暗带结构。4~12 周后肌肉结构紊乱, 肌原纤维明暗带结构消失纤维变性。

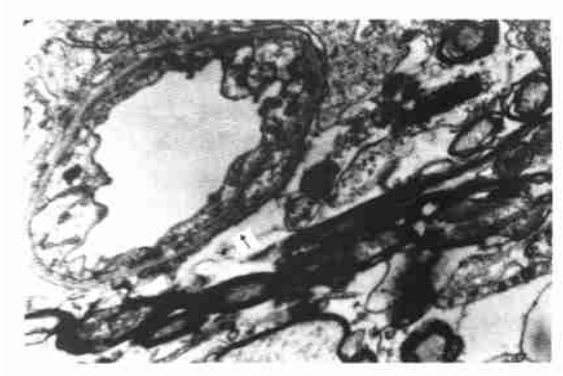


图 **2**　大网膜+胚胎脊髓移植 **2** 周, 电镜下见新生的血管　(TEM× 12 000)

Fig 2　Regenerating blood vessels were observed 2 weeks after transplantation in FSC+ pedicled omentum majus group　(TEM× 12 000)

2.3　免疫细胞化学检查

(1)NF 染色: 1 周 NF 阳性细胞散在于移植物内, 见图 3。12 周可见浓密的 NF 阳性纤维穿行于宿主和移植物交界处。(2)GFAP 染色: 1~4 周在损伤和移植区周围 GFAP 阳性细胞明显增多, 高峰在移植后 2 周, 在宿主脊髓与移植物交界区以及移植物内 GFAP 免疫阳性细胞较少, 见图 4。12 周 GFAP 免疫反应已恢复至正常。(3)5-HT 染色: 1~2 周移植物内未见到 5-HT 阳性细胞, 4~12 周移植物内 5-HT 阳性细胞逐渐增多。移植各组宿主和胚胎脊髓都可出现上述抗体染色阳性, 其中损伤+大网膜组最多, 单纯脊髓损伤组次之, 损伤+椎旁肌组最少。

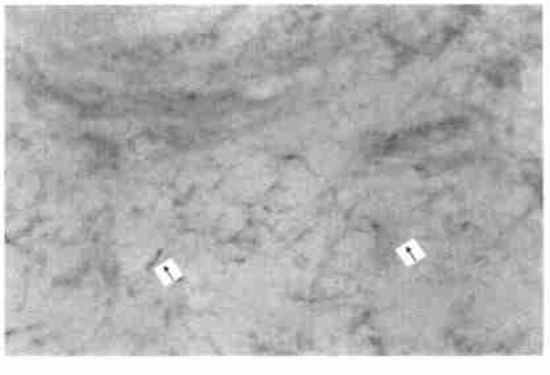


图 **3**　大网膜+胚胎脊髓移植 **4** 周, 移植物内可见 **NF** 阳性纤维　(S-P× 200)

Fig 3　NF positive nerve fibers were observed 4 weeks after transplantation in FSC+ pedicled omentum majus group　(S-P× 200)

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

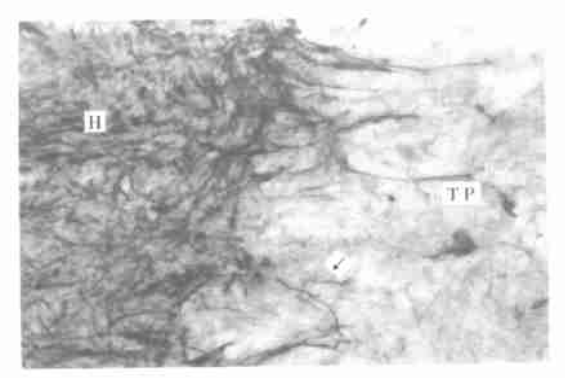


图 4 大网膜＋胚胎脊髓移植 4 周，移植物和宿主交界处 GFAP 阳性细胞较少 (S-P× 200)

Fig 4 Few GFAP positive nerve fibers were observed at the interface between the recipient and FSC 4 weeks after transplantation in FSC＋ pedicled omentum majus group H: Host; TP: Transplantation(←)(S-P × 200)

3 讨论

自 80 年代中期以来，国内外对胚胎脊髓移植治疗脊髓损伤进行了大量的实验研究，证明了胚胎脊髓可以在宿主脊髓中存活、发育、生长、分化并形成神经连接促进功能恢复。其可能的机制有[1~3]：①胚胎脊髓能作为一个细胞桥的作用填充损伤区，提供化学或机械的引导，刺激脊髓神经生长，引导损伤神经再生通过损伤区。②胚胎脊髓能够提供神经元，补偿由于损伤破坏丢失的细胞结构。③胚胎脊髓能产生有益于宿主脊髓的各种因子，其中营养因子能够挽救脊髓损伤后濒死的神经元，促进神经再生。但移植的胚胎脊髓尚不能发育成成熟的神经细胞。通过我们的研究发现中枢神经移植到脊髓能否发育成熟，并形成功能连接最重要的决定因素是移植部位血液循环的情况。本实验应用带蒂的大网膜、椎旁肌并胚胎脊髓联合移植修复损伤的脊髓。带蒂的大网膜移植，可以与宿主脊髓形成血管联系，胚胎脊髓和大网膜联合移植后，在移植物中可以见到发育成熟的神经元，电镜下可见一些突触形成，表明提供血运的胚胎脊髓移植能维持胚胎脊髓的正常发育。5-HT 纤维代表脊髓部分下行的长传导纤维[1]，移植物本身不含有 5－HT 细胞或纤维，在移植物内发现 5-HT 纤维，说明宿主脊髓 5-HT 纤维长入了移植物。研究中还发现移植物内有 NF 阳性纤维，说明白质侧长传导束也长入了移植物。在移植物内和移植物宿主交界区 GFAP 阳性免疫细胞明显减少，表明胚胎脊髓移植可能抑制移植物宿主交界区胶质瘢痕的形成。带蒂的椎旁肌移植后，2 周后与宿主脊髓可以形成少量的血管联系，但随着时间的延长，可能是由于缺少血运，肌肉组织萎缩变性，血管挛缩，对宿主脊髓修复无益。因此我们认为带蒂的大网膜与胚胎脊髓联合移植，能增加胚胎脊髓组织的血运[4]，更有益于损伤脊髓的修复。

参考文献：

[1] Tessler A. Intraspinal transplants[J]. Ann Neurol, 1991, 29(1): 115－117.
[2] Cheng H, Yihai D. Spinal cord repair in adult paraplegic rat: Partial restoration of hind limb function[J]. Science, 1996, 273(7): 510－513.
[3] Zompa E A, Cain L D, Everhart A W, *et al*. Transplant therapy: Recovery of function after spinal cord injury[J]. J Nerotrauma, 1997, 14(6): 479－512.
[4] 张 强，廖维宏，王正国 等. 大鼠胚胎脊髓不同移植方法对成鼠损伤脊髓血流量的影响[J]. 中国矫形外科杂志，1999, 6(9): 674－676.

(编辑 陈聪连)

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)01-0096-01

局部封闭法减轻口腔溃疡疼痛的临床效果

Clinical effect of relieving pain of oral ulcer with local block

游古莲，王建华，周正贵 (第三军医大学附属新桥医院口腔科，重庆 400037)

为减轻口腔溃疡患者疼痛，缩短其病程，于 1997 年 4 月至 1998 年 12 月采用奴夫卡因加地塞米松行溃疡基底部封闭，减轻口腔溃疡患者的疼痛并与对照组比较，疗效满意，现报告如下。

1 临床资料

一般资料：60 例患者，男 28 例，女 32 例，年龄 21～66 岁。将病员分成封闭组和对照组各 30 例。其中复发性口腔溃疡 32 例，外伤性口腔溃疡 21 例，灼伤性溃疡 7 例。

病例选择：溃疡面直径> 0.3 cm，数目 2 个以上。一周内未使用激素、抗菌素及其它治疗方法者。

方法：封闭组在常规消毒下用 2%奴夫卡因 2 ml＋地米 5 mg 行溃疡基底部注射；对照组用 2%碘甘油涂擦溃疡部，每日 4 次，连续 5 d。两组均口服伊斯美胶囊(内含甲硝唑和无味红霉素)2 粒，3 次/d，连服 3 d。

疗效判断标准：用药后按溃疡面愈合、充血带减退、疼痛减轻 3 项指标进行观察。

(下转 98 页)

作者简介：游古莲(1963－)，女，四川省垫江市人，主管技师，主要从事口腔内科方面的研究，发表论文 15 篇。电话：(023) 54000－74645

收稿日期：2000-01-15；修回日期：2000-07-19

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