DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.010
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0635-04

论著

胚胎脊髓移植兼用神经营养因子对大鼠损伤脊髓神经元的影响

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 探讨胚胎脊髓移植并神经营养因子防止成年大鼠脊髓轴突损伤后引起神经元萎缩的作用。方法 采用大鼠腰脊髓半切洞损伤模型,将实验动物分为6组:A组:单纯脊髓损伤组;B组:单纯胚胎脊髓移植组;C组:损伤+移植+NGF组;D组:损伤+移植+CNTF组;E组:损伤+移植+NT-3组;F组:损伤+移植+BDNF组。手术后应用行为学和电生理检查观察大鼠后肢功能恢复情况,应用Nissl染色方法观察脊髓神经元的大小,采用计算机图像分析技术,进行定量分析。结果 神经营养因子都可以防止成年大鼠脊髓轴突损伤后引起的神经元萎缩,图像分析发现其作用为F>E>D>C>B>A,F组效果最好,可以较好地恢复损伤神经元的形态。大鼠神经功能的恢复也出现了相同的变化趋势。结论 胚胎脊髓移植兼用神经营养因子能维持神经元的细胞形态,对成年大鼠损伤脊髓功能恢复有很好的促进作用。

关键词:脊髓损伤;移植;神经营养因子;神经元;萎缩
中图法分类号:R651.2;R826.64 文献标识码:A

Effects of transplantation of fetal spinal cord and neurotrophic factors on neurons of injured spinal cord in adult rats

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

Abstract: Objective To study the effects of the transplantation of fetal spinal cord and neurotrophic factors on the reversion of axonotomy-induced atrophy of the neurons in the injured spinal cord of adult rats. Methods Hemisection of the lumbar segment of the spinal cord was performed for all the experimental rats. The effects of neurotrophic factors NGF, CNTF, NT-3 and BDNF were studied. The rats were divided into 6 groups as follows: Group A with hemisection of the cord only; Group B with cord hemisection and fetal cord grafting; Group C with cord hemisection, fetal cord grafting and NGF; Group D with cord hemisection, fetal cord grafting and CNTF; Group E with cord hemisection, fetal cord grafting and NT-3; and Group F with cord hemisection, fetal cord grafting and BDNF. Combined behavioral scores (CBS), somatosensory evoked potentials (SEP) and motor evoked potentials (MEP) were measured. The slides with Nissl staining were used to measure the size of the neurons. The positive cells were quantitatively analyzed with a computer image analysis system. Results The size of the neurons of the 6 groups was arranged in the order from large to small as F> E> D> C> B> A ($P<0.05$). The recovery of the injured neurons was best in Group F as evidenced by morphological observation. The increase of the size of neurons was correlated to their functional recovery. Conclusion The combination of the transplsntation of fetal spinal cord and neurotrophic factors can promote the structural and functional recovery of the injured neurons.

Key words: spinal cord injury; transplantation; neurotrophic factor; neuron; atrophy

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20篇。电话:(023)68757433
收稿日期:1999-09-23;修回日期:1999-12-22
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

实验性胚胎脊髓移植治疗脊髓损伤取得了较好的效果，证实胚胎脊髓可以在宿主脊髓中存活、发育和分化并形成部分纤维连接，促进神经功能的恢复[1,2]。但胚胎脊髓移植后对损伤脊髓神经元的影响以及如何提高胚胎脊髓移植的效果研究较少。本实验的目的是在胚胎脊髓移植的同时，应用神经生长因子（Nervous growth factor，NGF），睫状神经生长因子（Ciliary neurotrophic factor，CNTF），神经营养因子-3（NT-3）脑源性神经生长因子（Brain-derived neurotrophic factor，BDNF）。观察是否能够挽救脊髓损伤引起的神经元萎缩并促进大鼠脊髓损伤后后肢功能的恢复。

1 材料与方法

1.1 动物分组

150只成年Wistar大鼠，体重180～250 g，雌雄不拘，随机将动物分为：A组：单纯脊髓损伤组；B组：单纯胚胎脊髓移植组；C组：损伤＋移植＋NGF；D组：损伤＋移植＋CNTF；E组：损伤＋移植＋NT-3；F组：损伤＋移植＋BDNF。手术后1、2、4、12周应用行为学的电生理检查观察大鼠功能恢复情况，应用尼氏染色方法观察神经元的大小。每个时相点每组6只动物，正常对照组6只动物。

1.2 手术方法

戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔内注射麻醉，腰背部脱毛，将大鼠固定在立体定位仪上，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，尽可能将胚胎脊髓表面的软脊膜等结缔组织切除干净，用玻璃针头吸取移植物，注入预制的脊髓洞腔内，将含有神经营养因子（1 mg/ml）的明胶海绵覆盖在移植的胚胎脊髓上。单纯脊髓损伤组取同样大小的明胶海绵填充脊髓洞腔。最后用9-0线缝合硬脊膜，逐层缝合切口。

1.3 联合行为评分（CBS）

应用Gale[3]综合评定大鼠脊髓损伤后功能评分方法，包括运动、感觉、反射以及肢体动作协调等方面。最大值是100分表示神经功能100%的丧失，最小值0分，表示神经功能完全正常。

1.4 诱发电位检查

应用第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所研制的SYD-4228型多功能神经诱发电位仪检查。动物麻醉后，选择右侧坐骨神经和对侧大脑皮层运动区分别进行电刺激，记录SEP和MEP波形曲线，计算波峰和潜峰时。刺激频率4 Hz，波宽0.2 ms。强度40～60 mV，信号经前置放大器放大10万倍，计算机叠加300次。

1.5 图像分析

手术后1、2、4、12周每组麻醉6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4%多聚甲醛200 ml。灌注固定2 h后，取出移植部分及其头尾侧各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，每个标本损伤区及头尾侧各取1张切片，每组6个标本共18张切片，随机计数600个神经元，切片经计算机图像分析系统处理，测定上述Nissl染色标记神经元的平均面积。并经 t 检验。

2 结果

正常对照组平均脊髓神经元面积是（388.34±10.18）μm^2，手术后1、2、4、12周胚胎脊髓移植和应用神经营养因子各组平均脊髓神经元面积，见表1。大鼠脊髓损伤后1 d，神经元出现明显的核固缩，尼氏体溶解。神经元数量明显减少，神经元萎缩变小。手术后1周神经元继续萎缩数量减少，4周时残存一些萎缩的神经元，仅有少数神经元形态有恢复。大鼠脊髓损伤后胚胎脊髓移植并应用神经营养因子后，神经元萎缩减少，神经元形态有不同程度的恢复，见图1～4。

联合行为评分（CBS）：正常组CBS为0分，损伤即刻评分为92.56±6.26，手术后1、2周A、B、C、D、E、F组CBS评分分别为71.56±5.50、58.78±4.03、40.65±3.53、35.68±4.17、29.46±3.83、26.38±3.62。其中D、E、F组与B组比较差异显著（$P<0.05$），术后12周各组与B组比较差异不显著。

正常对照组SEP和MEP分别是1.48±0.46和2.31±0.26，手术后2周A、B、C、D、E、F组MED检测值分别为4.26±0.62、3.18±0.46、2.75±0.61、2.31±0.48、1.24±0.35、1.17±0.32，其中D、E、F组与B组比较差异显著（$P<0.05$），术后4、12周各组与B组比较差异不显著。术后1、2、4、12周各组SEP检测值与B组比较差异都不显著，可能与本术式损伤感觉传导束较轻有关。

表1 各组平均脊髓神经元面积（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，$A/\mu m^2$）

Tab 1 Auerage size of the neurons of different groups（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，$A/\mu m^2$）

Group	Time after operation（week）			
	1	2	4	12
A	194.34±8.18	171.56±7.90	185.53±8.25	182.78±8.68
B	298.48±6.59	312.74±7.16	337.58±7.64	329.86±8.85
C	306.58±7.34	329.67±7.63	312.54±8.45	332.96±8.36
D	330.87±7.12	341.38±7.67	335.67±8.37	346.49±8.26
E	341.65±8.44	370.85±7.83△	369.47±8.26	376.52±9.49△
F	345.65±8.56	380.64±8.47☆	379.64±8.53△	381.74±10.20△

☆：$P<0.01$，△：$P<0.05$ *vs* group B.

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

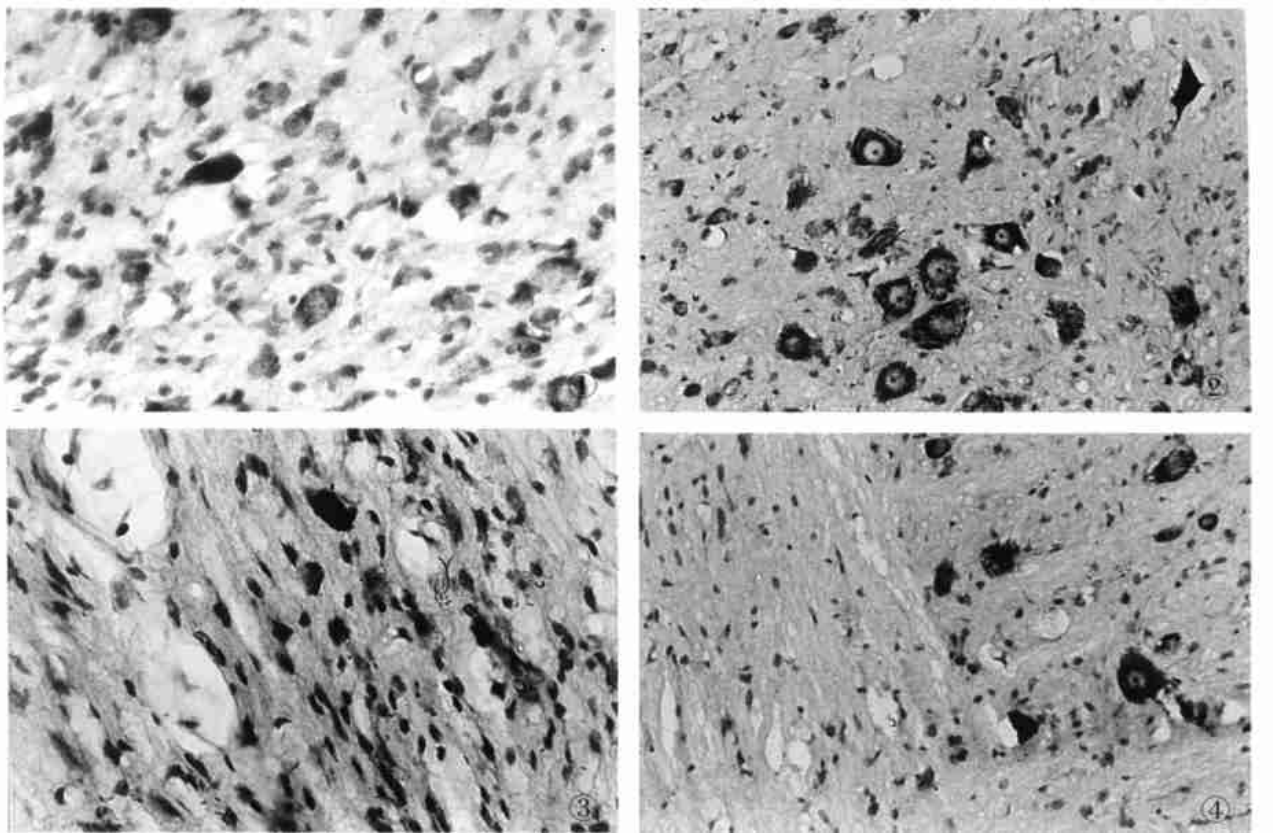


图 1　单纯胚胎脊髓移植组伤后 4 周脊髓灰质部分神经元尼氏体溶解, 核固缩　(Nissl 染色× 200)

Fig 1　Dissolution of Nissl's substance, degeneration and necrosis in parts of neurons of grey matter, 4 weeks after hemisection + grafting　(Nissl stain× 200)

图 2　损伤+ 移植+ **BDNF** 组伤后 4 周脊髓灰质神经元已恢复正常　(Nissl 染色× 200)

Fig 2　Neurons of grey matter with normal appearence, 4 weeks after hemisection+ grafting+ BDNF　(Nissl stain× 200)

图 3　单纯脊髓损伤对照组伤后 4 周脊髓灰质神经元数量明显减少, 尼氏体溶解, 核固缩　(Nissl 染色× 200)

Fig 3　Number of neurons markedly decreased, dissolution of Nissl's substance and pyknosis of the neuclei, 4 weeks after simple hemisection　(Nissl stain× 200)

图 4　损伤+ 移植+ **NGF** 组伤后 4 周脊髓灰质神经元大部分恢复正常　(Nissl 染色× 200)

Fig 4　Neurons of grey matter with normal appearence, 4 weeks after hemisection+ grafting+ NGF　(Nissl stain× 200)

3　讨论

尼氏染色的结果能较好地反映脊髓神经元病理改变情况。应用神经营养因子后各组神经元形态都有不同程度的恢复, 其中应用移植+ BDNF 和移植+ NT-3 组效果较好, 大鼠脊髓损伤后 4 周, 萎缩神经元有 80%恢复了正常的形态。应用 CNTF 和 NGF 组效果稍差, 也有大约 70%萎缩神经元恢复了正常形态, 总体趋势为 F> E> D> C> B> A。大鼠后肢运动功能恢复也出现了相同的变化趋势。我们的实验结果表明, 大鼠脊髓损伤后胚胎脊髓移植并应用神经营养因子对神经元有保护作用, 不仅有利于神经元的存活, 而且能够促进大鼠动物功能的恢复。

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, 2, 4]: 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, 这些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。

神经营养因子作为一类小分子肽类物质, 主要包括神经生长因子家族(NGF, BDNF, NF-3, NT4/ 5, NT-6)以及 CNTF, GDNF, IGF, bFGF, 白介素类等。经过 20 多年的研究, 对其生物学作用逐渐加深了认识。在成年动物, 神经营养因子维持靶神经元及其相连神经元的

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

存活及正常的生理功能，损伤后神经营养因子在一定的条件下，可促进未损伤的神经元生芽而重建被破坏的神经回路，神经营养因子在体内和离体的情况下，都具有维持损伤脊髓神经元的存活，促使轴突延伸等功能[5]。NGF是神经系统最重要的生物活性因子之一，有促进和维持神经细胞生长、生存、分化和执行功能的作用。NGF主要对脊髓中感觉、交感神经元起作用，对前角部分运动神经元也有一定作用。BDNF和NGF有50%的同源性，对多种感觉神经元，胆碱能神经元，多巴胺能神经元以及GABA能神经元的发育分化与生长再生具有维持和促进作用，在阻止损伤后运动神经元死亡的作用上，NT-3与BDNF有相同效应。在发育中及成熟后的大鼠中，NT-3能促进脊髓损伤后皮质脊髓束的生长，且能阻止大鼠发育中损伤红核神经元的退行性死亡。NGF，BDNF，NT-3可以挽救轴突切除的前脑神经元并能促进神经元的再生[6]。CNTF与运动神经元关系密切。对培养的鸡胚运动神经元，CNTF是最有效的神经营养因子。CNTF能减少新生鼠面神经切断后运动神经元在终板区发芽，与运动神经元的功能维持有关[7]。另外的研究表明神经营养因子能维持Ca^{2+}稳态，NGF，BDNF，NT-3均可减少由于缺少葡萄糖所引起的培养鼠海马隔区或皮质神经元中Ca^{2+}的升高，还可以减少自由基的损伤[8,9]。我们的实验结果表明胚胎脊髓移植兼用神经营养因子有协同作用，能维持神经元的细胞形态，促进成年大鼠脊髓损伤后后肢功能的恢复。

参考文献：

[1] Tessler A. Intraspinal transplants[J]. Ann Neurol, 1991, 29(2): 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] Gale K, kerasidis H, Wrathall J R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurological impairment[J]. Exp Neurol, 1985, 88(2): 123—131.

[4] Zompa E A, Cain L D, Everhart A W, *et al*. Transplant therapy: Recovery of function after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 1997, 14(6): 479—512.

[5] Levi-Montalcini R, Shaper S D, Toso R D, *et al*. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine[J]. TINS, 1996, 19(6): 514—517.

[6] Kramer L F. Nerve growth factor treatment after brain injury prevent neuronal death[J]. Science, 1996, 235(4): 214—218.

[7] Thoenen H, Hughes R A, Sendtner M. Trophic support of motoneurons: physiological, pathphysiological, and therapeutic implication[J]. Exp Neurol, 1993, 124(1): 47—61.

[8] Cheng B, Mattson M P. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homestasis[J]. Neuron, 1991, 7(12): 1 031—1 039.

[9] Pan Z, Perez-Polo R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: Glutathione metabolism[J]. J Neurochem, 1993, 61(12): 1 713—1 725.

（编辑 冯崇英）

（上接634页）

2.3 图像分析结果

图像分析结果显示，在各个时相点两组动物的SP、SOM和NF-200染色差异非常显著（$P<0.01$），GFAP染色差异显著（$P<0.05$）。

3 讨论

本实验表明，植入成年大鼠损伤脊髓内的胚胎脊髓，不仅可存活，还可在宿主脊髓内继续生长及分化发育。随着移植物的体积增大，可在大体上恢复损伤脊髓的解剖连续性。此外，镀银染色结果还显示，胚胎脊髓移植后，移植物与宿主脊髓间的纤维联系逐渐增多。

处于未分化阶段的胚胎期神经元缺乏神经肽或递质等标记物，通过检测这些特异性标记物，即可了解神经元的发育情况。SP、SOM染色结果表明，植入的胚胎脊髓可在宿主脊髓内逐渐发育成熟，并具有正常成熟神经元的特征。GFAP染色的强弱反映了胶质增生的活跃程度，GFAP染色结果提示，胚胎脊髓移植物对胶质增生有一定的抑制作用。NF-200染色可特异性地显示神经元的轴突，本实验的结果提示，移植的胚胎脊髓可诱导脊髓损伤后的轴突再生，并且显示胚胎脊髓神经元在发育成熟过程中细胞功能活跃。

由于脊髓结构和功能的复杂性，目前离脊髓再生修复的最终目标——恢复感觉和控制运动，还有很大有距离。因此，进一步探索脊髓再生的本质，对提高脊髓损伤的修复水平及改善外伤性截瘫的预后，具有重要的意义。

关键词：脊髓损伤；脊髓移植；移植，同种
中图法分类号：R651.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Bahr M, Bonhoeffer F. Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS[J]. Trends Neurosci, 1994, 17(11): 473—479.

[2] Bernstein J J, Goldberg A. Experimental spinal cord transplantation as a mechanism of spinal cord regeneration[J]. Paraplegia, 1995, 33(5): 250—253.

[3] Tatagiba M, Brosamle C, Schwab M E. Rengeneration of injured axons in the adult mammalian central nervous system[J]. Neurosurgery, 1996, 273(11): 451—458.

（编辑 陈聪连）

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