DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.003

不同移植物在宿主脊髓内形态发育过程的组织学观察*

胡 建** 王正国*** 朱佩芳*** 李兵仓*** 李应玉*** (第三军医大学附属西南医院骨科)重庆,400038

提 要 目的:观察不同组织脊髓内移植后,移植组织在宿主体内的形态发育过程及其与宿主脊髓间纤维连接情况。方法:采用形态学研究方法。结果:胚胎脊髓植入损伤脊髓后,可在宿主脊髓内继续分化发育,直至成为成熟的神经组织;在此实验条件下,其分化发育的过程不受宿主病理环境的影响;坐骨神经移植后,最终可能通过存活的雪旺氏细胞与宿主建立一定的结构联系;移植的肌肉组织难以在宿主脊髓中长期存活。结论:移植的胚胎脊髓可与成体宿主脊髓建立良好的结构联系。

关键词 组织移植;脊髓损伤;神经发育

中图法分类号 R651.2

组织移植治疗脊髓损伤的研究已开展了多年,但既往的研究主要集中在选择适合的移植物,改进移植方法,提高移植物存活率等方面[1~3]。有关不同移植物在宿主体内的形态发育过程及其与宿主脊髓间纤维连接情况,尚未见有较系统的研究。本实验中我们选用了目前常见报道的胚胎脊髓、坐骨神经和自体肌肉组织作为移植对象,旨在针对上述问题进行观察。

1 材料与方法

1.1 胚胎脊髓移植模型的制备

采用大鼠脊髓半切洞式损伤模型。受体为成年 Wistar大鼠 200只,体重(200±30)g,雌雄不拘。随机分为单纯损伤、胚胎脊髓移植、坐骨神经移植、肌肉移植 4组,观察时相点为术后 7 d、15 d、30 d、45 d、60 d,每个时相点 10只动物。正常对照 5只。乌拉坦做腹腔麻醉(1.25 g/kg),背部脱毛,无菌条件下,暴露脊髓腰膨大,半侧脊髓造洞。胚胎脊髓供体为同种异体妊娠 14 d胎鼠,麻醉与无菌条件下取出胎鼠,仔细切取颈胸段胎鼠脊髓约 3 mm。坐骨神经选自同种异体正常大鼠,长约 3 mm,去除神经外膜。肌肉组织取自自体骶脊肌。用玻璃针头吸取移植物,注入预制的脊髓腔洞内,无创缝合硬脊膜。术后抗感染 3 d;次日为其灌胃、按摩排尿直至自主功能恢复。

1.2 组织切片标本的制作

1.2.1 常规光镜切片制作 术后不同时间,受体鼠经 4%多聚甲醛灌注固定。取出移植部位及其头尾侧各 3个阶段的脊髓,继续固定 24 h,修整、石蜡包埋后,8 mm连续切片,HE、尼氏[4,5]、银染[5,6]染色,Olympus显微镜下观察。

1.2.2 常规电镜标本制作 用 3%戊二醛灌注固定。镜下修出移植物,常规电镜制片。JEM-100SX电镜观察。

2 结果

2.1 脊髓损伤

脊髓损伤后即日,所有受体鼠均出现了极为典型的截瘫综合征,并伴有体温降低、肠麻痹、尿潴留、血尿、结膜出血等症状。至术后 60 d时,有 93只受体鼠因各种原因死亡,占移植总数的 47%。

2.2 移植物的存活

经光镜下检查证实,在幸存的 107只受体动物中,不同移植物的存活情况在 65%~74%之间。

2.3 不同移植物在宿主脊髓内的形态发育过程

2.3.1 单纯脊髓半切洞损伤 术后 7 d,光镜下见损伤节段的左侧脊髓组织全部坏死脱落,致使横切面上仅残留右半侧脊髓,残腔内有部分积血。在损伤的邻近节段,可见大量白细胞浸润。术后 15 d的改变与第 7天基本相似。从 30 d~60 d,残腔内逐渐为胶质瘢痕所充填。此时,电镜下见为大量不定型纤维,并有较多的胶质细胞。

2.3.2 胚胎脊髓移植 妊娠 14 d时,胎鼠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。把此时的胎鼠脊髓植入损伤的成体脊髓后 7 d,光镜下见移植组织存活良好,移植组织与宿主脊髓组织存在较大的差异,移植组织较致密,内有大量的神经上皮细胞,其体积普遍小于成体脊髓的神经元,神经上皮细胞胞质少,着色深。电镜下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。术后 15 d,光镜下移植组织结构与第 7天基本相似,但神经上皮细胞数量有所减少。神经母细胞开始分化,可见核分裂相。尼氏染色所见结果与第 7天基本相似。电镜下见神经母细胞胞质增多,胞质内有丰富的粗面内质网和线粒体等细胞器。术后 30 d时,移植物的组织结构和受体脊髓的基本相同,移植物内神经细胞数明显减少。此时,部分神经元体

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39470715

** 胡建,男,35岁,副主任医师,副教授,博士 *** 附属大坪医院野战外科研究所 重庆,400042

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

积增大,其形态类似于灰质前角的运动神经元。电镜下见神经细胞向周围伸出长的细胞突起,胞质内细胞器减少,并与其它神经细胞开始形成突触联系。移植术后 60 d,光镜下见移植物体积增大,完全修复损伤侧脊髓,移植组织内神经细胞数目显著减少,神经细胞形态接近正常脊髓前角神经元,见图 1 电镜下,神经细胞胞质少,胞核内主要为常染色质,见图 2,已发育为成熟的神经细胞。



图 1 术后 60 d,胚胎脊髓内神经母细胞已分化接近正常的脊髓神经元(↑) (HE× 100)

Fig 1 The neuroblast in embryonic spinal cord differentiated into the normal structure of neuron in host spinal cord (HE× 100)

图 2 电镜下见,神经细胞(**Neu**)内,细胞器少,常染色质丰富,已成为成熟的神经元 (TEM× 4000)

Fig 2 The neuroblast has becomes maturity with abundance chromatin and few organella (TEM× 4000)

2.3.3 坐骨神经移植 术后 7 d,光镜下见移植的坐骨神经在损伤脊髓内存活良好,移植组织完全充填于移植腔内,移植组织和宿主脊髓内有较多的神经胶质细胞,移植物内还可见少量的红细胞。电镜观察见移植的坐骨神经存活,但出现明显的轴突变形。术后 15 d,光、电镜观察结果与第 7天基本相似,但移植物内红细胞消失,胶质细胞也有所减少。术后 30 d时,光镜下改变同术后 15 d,电镜下可见存活的雪旺氏细胞,其间变形的轴突已消失。移植术后 60 d,移植组织形态与正常脊髓基本接近,但结构较疏松,其内无神经细胞成分,周围可见小片坏死区。电镜见,存活的雪旺氏细胞包裹的轴突有髓鞘形成。

2.3.4 肌肉移植 术后 7 d,光镜观察见移植的肌肉组织存活,肌组织结构清楚,周围脊髓内有较多的胶质细胞增生。尼氏染色见移植肌肉内无神经细胞成分。电镜下见移植存活的肌肉形态正常,有清楚的明暗带结构。术后 30 d,光镜下观察肌组织结构不完整,部分肌细胞坏死。电镜下见部分移植肌肉结构紊乱,肌原纤维断裂,明暗带不清,周围有胶质细胞出现。移植术后 60 d,光镜下改变同术后 30 d 电镜见肌原纤维明暗带结构丧失,部分纤维变形以至消失。

2.4 不同移植物与宿主脊髓的纤维联系

移植术后 15 d,光镜观察见胚胎脊髓移植脊髓内,移植物与宿主脊髓间已有神经纤维联系,但纤维较少且细小;坐骨神经移植组,移植物与宿主脊髓间仍有明显的界限,无神经纤维通过;肌肉移植组也未见神经纤维通过。移植术后 30 d~ 60 d,胚胎脊髓移植组,见移植物与宿主脊髓间出现大量粗大的神经纤维联系,联系区有胶质细胞增生,见图 3;坐骨神经移植组,移植物部分区域与宿主脊髓出现纤维联系,联系区内有较多的胶质细胞增生;肌肉移植组仍无神经纤维长入。

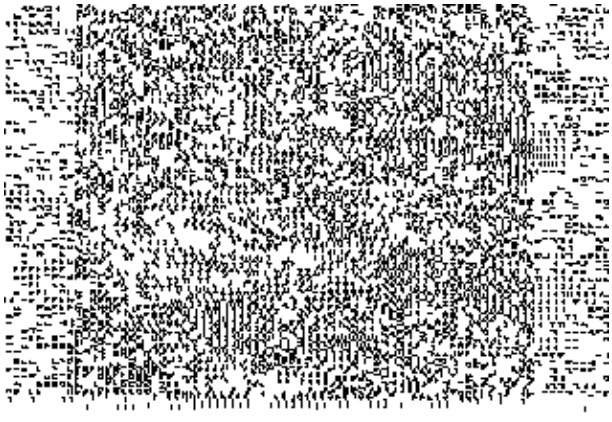


图 3 移植术后 60 d,胚胎脊髓(**FSC**)与宿主脊髓(**H**)间出现大量的神经纤维联系(↑) (镀银× 200)

Fig 3 Lots of neurofibrous connection between host and the transplanted embryonic spinal cord 60 days after implantation (Silvered stain× 200)

3 讨论

不同组织植入损伤脊髓后,能在其中继续存活已为许多作者所证实[1~ 3,7~ 10]。但从本研究结果来看,存活的不同移植物在宿主脊髓内的发育过程却截然不同。胚胎脊髓植入后,其内的神经上皮细胞形态结构几乎保持正常,并逐渐分化成神经母细胞,神经母细胞胞

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

质增生,细胞器丰富,功能活跃。植入后 30 d左右,部分神经母细胞体积增大,形态类似于灰质前角的运动神经元,向周围伸出突起,以联系靶组织。而大部分神经母细胞由于寻不到适合的靶细胞,开始逐渐退变。术后 60 d,神经母细胞的细胞器和胞核内异染色质减少,逐渐演变为成熟的神经元。整个移植物完全修复损伤区,形态结构基本接近正常。坐骨神经移植后,移植组织完全充填于移植腔内,移植组织和宿主脊髓内有较多的神经胶质细胞增生,电镜下见移植的坐骨神经虽然存活,但出现明显的轴突变形。至移植后 30 d,电镜下仅见存活的雪旺氏细胞。第 60天时,移植组织结构较疏松,有小片坏死区出现。电镜见,存活的雪旺氏细胞包裹的轴突有髓鞘形成。肌肉植入的早期,移植物存活较好,肌组织结构清楚。电镜下见其形态正常,有清楚的明暗带。植入中期,肌组织结构开始紊乱,肌原纤维断裂,明暗带不清,周围出现胶质细胞。至后期,肌原纤维明暗带结构丧失,部分纤维变形消退。由此可见,低分化胚胎脊髓组织在损伤宿主脊髓内的存活发充情况不仅明显优于成熟的外周神经和非神经组织,在形态上也更为接近原宿主脊髓组织。在本实验条件下,移植存活的胚胎脊髓在宿主体内的分化发育过程似乎不受损伤脊髓病理环境的干扰,仍然依其自身发育的规律持续分化为成熟的脊髓神经组织。坐骨神经移植后的发育则主要表现为雪旺氏细胞的存活和进一步对再生轴突的诱导。肌肉由于与脊髓组织间存在较大的结构差异,因而尽管短期内能够存活,但最终都将变性消失。

从组织结构联系上,来看不同移植物与宿主脊髓间的联系情况可以发现,胚胎脊髓和宿主之间可以达到良好的整合,两者互相投射神经纤维,以至建立广泛的神经通路联系。而坐骨神经与宿主间也能建立一定的神经联系,其结果较非神经移植组织为好,后者显然不能与宿主建立形态上的结构联系。

参考文献

1 Aguayo A J, David S, Bray G M *et al*. Axon schwann cell interactions in peripheral and central nerve tissue transplant. Soc Neurosci Symp, 1979; 4: 361

2 Iwashita Y, Kawagochi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segmengts in the rat. Nature, 1994; 367(13): 167

3 Li Bingcang, Li Yingyu, Wu Yamin *et al*. Studies on the effects of embryonic spinal cord implantation into acutely injured spinal cord on the recovery of motor functions and evoked potentials in rats. J Med Coll PLA, 1994; 9(2): 141

4 Kiernan J A. Histological and histochemical methods: theory and practice. 2nd ed. New York: Pergaman Pres Plc, 1990: 101~102, 302~303

5 鞠　躬,万选才,董新文(编著).神经解剖学方法.北京:人民卫生出版社, 1985: 25

6 Culling C F A;孔庆雷(译).组织病理学与组织化学技术手册.北京:科学出版社, 1982: 167~168, 446~447

7 Bernstein J J, Goldberg W J. Experimental spinal cord transplantation as a mechanism of spinal cord regeneration. Paraplegia, 1995; 33(5): 250

8 Itoh Y, Tessler A. Ultrastructural organization of regenerated adult dorsal root axons within transplants of fetal spinal cord. J Comp Neurol, 1990; 292: 396

9 Olby N J, Blakemore W F. Reconstruction of the glial environment of a photochemically induced lesion in the rat spinal cord by transplantation of mixed glial cells. J Neurocytol, 1996; 25(8): 481

10 Pallini R, Fernandez E, Gangitano C *et al*. Studies on embryonic transplants to the transected spinal cord of adult rats. J Neurosurg, 1989; 70: 454

(收稿: 1997-12-16;修回: 1998-05-25)

(编辑　王　红)

Histological observation on development of different transplanted tissues in the host spinal cord*

Hu Jian, Wang Zhengguo, Zhu Peifang, Li Bingcang, Li Yingyu (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the developmental process of different transplanted tissues in the host spinal cord and the connection of nerve fibers between host and transplanted tissues after implantation. Methods: Morphological techniques were used. Results: After implantation into the adult spinal cord, the embryonic spinal cord developed continuously and its development was not influenced by pathological environment induced by the injury. With the aid of surviving Schwann cells, the transplanted sciatic nerve might form structural connection with host, while the muscle did not appear to live in the host for a long time. Conclusion: The embryonic spinal cord can establish structural connection with host spinal cord after implantation.

Key words tissue transplantation; spinal cord injury; neurodevelopment

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39470715

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