DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.003

胚胎脊髓移植对宿主脊髓神经毡结构重筑的电镜定量观察*

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**:从超微结构角度对胚胎脊髓移植后宿主脊髓神经毡(Neuropil)重建、突触形成、突触分类等问题进行研究。**方法**:采用电镜观察拍片作图像分析。**结果**:在移植术后60 d内,移植组突触密度增加迅速,显著快于损伤组;但胚胎脊髓移植对再生突触的结构比例无明显作用,再生的突触中,先以Ⅱ型突触为主,此后Ⅰ型突触数量逐渐增加;从突触接触和囊泡类型来看,新生突触主要为轴-树型突触和含清亮囊泡的胆碱能型突触。**结论**:胚胎脊髓移植对损伤脊髓神经毡内再生突触的数量及成熟度有较大影响。

关键词 胚胎脊髓移植;神经毡;电子图像分析
中图法分类号 R651.2

近年来,胚胎脊髓移植治疗脊髓损伤的研究已逐渐受到各国学者的重视。然而,目前有关胚胎脊髓移植的研究主要集中于寻找适合的移植组织,探讨移植方法及其影响因素和如何提高移植物的成活率等方面[1~4]。而从超微结构角度对脊髓神经毡(Neuropil)重建、突触分类等问题的研究尚未见报道。本研究拟通过电镜定量分析对这些问题进行研究,将有助于从超微结构水平探明移植物植入后的宿主脊髓形态变化与功能成熟的相互关系,进而为生理学上对损伤脊髓功能恢复的研究提供形态学依据。

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125只,体重(200±30)g,雌雄不拘。随机分为单纯损伤与胚胎脊髓移植2组,观察时相点为术后4、7、15、30、45、60 d,每个时相点10只动物。正常对照5只。乌拉坦腹腔麻醉(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。供体为同种异体妊娠14 d胎鼠,麻醉与无菌条件下自母体取出胎鼠,选择颈胸段脊髓,仔细剔除硬脊膜及其它组织,得长约3 mm的纯净胎鼠脊髓。用玻璃针头谨慎吸取,小心注入预制的脊髓腔洞内,8/0无创线缝合硬脊膜。术后肌注青霉素4×10^5 U/kg,2次/d,连续3 d;次日为其灌胃、按摩排尿直到自主功能恢复。

1.2 电镜制片

所有动物用3%戊二醛灌注固定后,常规制作电镜标本。光镜下定位,取移植物与宿主脊髓交界区,超薄切片,铀铅双染,JEM-100 SX透射电镜观察。每张超薄切片任意观察3个网眼,每眼随机摄取不同视野放大倍数8 000的神经毡照片3张,共得电镜照片675张。

1.3 图像分析

采用GATEWAY2000奔腾586计算机图像分析系统。将照片扫描入计算机后,统计突触总数,各型突触数,神经毡内线粒体数和突触囊泡数。按放大倍数分别计算出各形态结构的面密度、均值和构成比。

1.4 数据处理

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,并用MSOFFICE中的EXCEL软件和SPSS统计程序包进行t检验分析和相关显著性检验。

2 结果

2.1 宿主脊髓内重建神经毡超微结构的一般观察

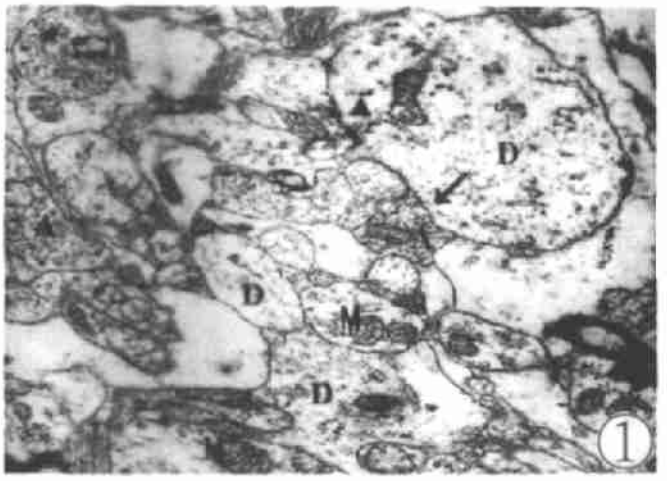
移植后第4~7天,神经毡内有较多的新生轴突新芽,神经毡结构不明显,其内偶见有突触结构,线粒体与突触前轴突终末内囊泡少。第15~30天,神经毡内突触增多接近正常,突触前后分界线清楚,轮廓完整。但线粒体数与突触前轴突终末内囊泡数仍然较少;突触以Ⅱ型和轴-树型突触为主,Ⅰ型和轴-轴型仅占较小比例,见图1。第45~60天,神经毡内突触数继续增加,线粒体与突触前轴突终末内囊泡数显著增加;突触仍以Ⅱ型和轴-树型为主,Ⅰ型和轴-轴型比例有所增加,见图2;大部分突触前轴突终末内含圆形清亮囊泡,少数为大颗粒囊泡。

2.2 各组神经毡内突触的定量分析

2.2.1 突触密度 实验结果显示,随着愈合时间的延长,移植组和单纯损伤组的突触密度均逐渐增加。在移植术后第7天移植组的突触密度就明显高于单纯损伤组($P<0.05$)。术后30 d时,胚胎移植组突触密度已接近正常水平。而此时单纯损伤组的突触密度仍显著低于正常($P<0.01$),见表1。

* 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第四研究室,重庆,400042

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



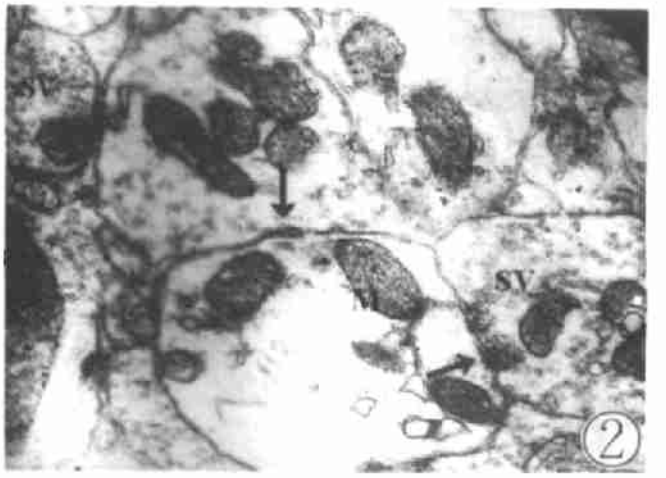


图1 术后30 d.再生突触结构清楚.密度增加

突触以Ⅰ型和轴-树型为主(↑).神经毡内线粒体(M)少 (TEM×8 000)

Fig 1 The density of synapses increased and the structure of synapses is clear 30 d after operation

The constitute of synapses is composed of type Ⅰ and axonal-dendritic(↑).

There are a few mitochodria in neuropil (TEM×8 000)

图2 术后60 d.Ⅰ型和轴-轴型(↑)突触数量增加.神经毡内线粒体(M)含量增多 (TEM×10 000)

Fig 2 The synapses number of type Ⅰ and axonal-axonal (↑) increased 60 d after operation. The number of mitochodria in neuropil also increased (TEM×10 000)

表1 各组神经毡内突触密度(个/100 μm²)

Tab 1 The density of synapses in neuropil in each group (No./100 μm²)

Group	Days after operation (t/d)					
	4	7	15	30	45	60
Injured group	6.64±20.57##	13.99±2.32##	13.99±1.58##	22.76±4.59##	30.21±3.17##	35.86±1.25##
Transplanted group	9.96±1.91##	20.94±3.73##**	30.34±4.81##**	39.70±2.17**	58.26±6.49##**	77.41±7.13##**

The density of synapses in normal control group is 44.90±4.93; #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$ *vs* normal control group; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ *vs* normal injured group

2.2.2 神经毡内线粒体密度 各实验组神经毡内线粒体密度.术后开始逐渐增加。术后第7天.胚胎移植组(26.31±6.18)神经毡内.线粒体密度增加幅度明显大于对照组(1.68±5.56.$P<0.01$)，术后30 d.移植组神经毡内线粒体密度(43.76±4.23)显著高于单纯损伤组(38.00±6.24，$P<0.01$).至术后45 d.移植组神经毡内线粒体密度(66.17±8.01)恢复正常水平.而此时单纯损伤组的线粒体密度(47.87±8.50)仍然显著低于正常($P<0.05$)。

2.2.3 突触前轴突终末内的囊泡密度 移植术后第4天，移植与非移植组突触前轴突终末内的囊泡密度均显著低于正常($P<0.01$)。自术后第7天.移植组的突触前轴突终末内的囊泡密度即明显高于非移植组(15.11±6.02，$P<0.05$).至术后15 d～45 d时.移植组的突触前轴突终末内的囊泡密度与正常对照差异不显著(27.24±5.50，$P>0.05$)。

2.2.4 Ⅰ、Ⅱ型突触构成比 从Ⅰ、Ⅱ型突触的构成比来看.整个移植恢复过程中.Ⅰ型突触明显多于Ⅱ型突触.但随着愈合时间的延长.Ⅰ型突触所占比例逐渐增加.而Ⅱ型突触则逐渐降低.见表2。

表2 各组Ⅰ、Ⅱ型突触构成比(%)

Tab 2 The rate of type Ⅰ and type Ⅱ synapses(%)

Group		Days after operation (t/d)					
		4	7	15	30	45	60
Injured group	Type Ⅰ	25.73±3.43##	39.37±9.52##	35.61±3.25##	41.23±6.08#	45.69±3.37#	46.43±5.45
	Type Ⅱ	75.48±6.82##	60.63±9.52##	64.39±3.25##	58.77±6.08#	54.31±3.37	53.57±5.45
Transplanted group	Type Ⅰ	38.95±7.45##*	40.42±6.60##	44.89±1.27##*	41.42±7.05#	45.85±6.25	46.08±6.80
	Type Ⅱ	61.05±7.45##*	59.58±6.60##	55.11±1.27#*	58.58±7.05#	54.15±6.25	53.92±6.80

The rate of type Ⅰ and type Ⅱ synapses of normal control group is 51.02±1.77 and 48.98±1.77 respectively. #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$ *vs* normal control; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ *vs* injured group

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

2.2.5　轴-树及轴-轴型突触构成比　　正常脊髓内分别含有61%的轴-树型突触和39%的轴-轴型突触。移植再生中，各实验组仍以轴-树突触为主，约占80%左右，显著高于正常（$P<0.01$）。随修复过程的发展，轴-树突触比例逐渐降低，至术后45 d，胚胎脊髓移植组的轴-树突触比例已与正常组差异不显著（$P<0.05$），而对照组轴-树型突触比例仍显著高于正常（$P<0.05$）。与之相反，轴-轴型突触比例的改变，呈逐渐增加趋势。在60 d，移植组的轴-轴型突触比例已接近正常，见表3。

表3　各组轴-树、轴-轴型突触构成比（%）

Tab 3　The rate of axonal-dendritic（AD）and axonal-axonal（AA）synapses in each group（%）

Group		Days after operation（t/d）					
		4	7	15	30	45	60
Injured group	Type AD	86.47±8.56##	80.92±4.91##	79.92±15.06##	80.07±6.42##	80.83±4.23#	79.07±15.61##
	Type AA	13.53±8.56##	19.08±4.91##	20.08±2.72##	19.93±6.42##	19.17±4.23#	20.93±4.32##
Transplanted group	Type AD	84.17±5.73##	83.29±4.17##	76.23±5.57##	71.18±4.49##	69.91±14.99	66.06±7.42
	Type AA	15.83±5.73##	16.71±4.17##	23.77±5.57##	28.82±4.49##	30.09±3.87#*	33.94±3.26**

The rate of axonal-dendritic（AD）and axonal-axonal（AA）synapses in normal control group is 60.79±4.14 and 39.21±4.14 respectively. #：$P<0.05$；##：$P<0.01$ *vs* normal control；*：$P<0.05$；**：$P<0.01$ *vs* injured group

2.2.6　含圆形清亮囊泡或大颗囊泡突触构成比　　正常脊髓灰质神经毡内，约有66%含圆形清亮囊泡的突触和34%含大颗粒囊泡的突触。移植后再生的神经毡中，以含圆形清亮囊泡突触为主，约占80%左右，显著高于正常对照（$P<0.01$）。随着时间的延长，含圆形清亮囊泡的突触比便降低，而含大颗囊泡突触比例增加，在术后60 d时，大部分接近正常对照组水平。

3　讨论

神经毡（Neuropil）是指中枢神经系统灰质内神经元的树突、轴突和胶质细胞的突起相互交织连接所形成复杂网络的区域。一般来讲，神经元长的突起形成神经纤维，短的突起参与组成中枢的神经毡。电镜观察证明，神经毡内突起的交织连接是十分特异和精密的。因大部分突触连接发生在神经毡内，故认为神经毡在神经组织的联系功能（Communication function）上很重要，它为神经细胞突起之间的突触接触和功能上的相互作用提供一个巨大的区域。

较早研究脊髓灰质内突触结构的是 Wyckoff 等[5]人。虽然随后不少学者对此进行了研究，但对脊髓灰质内的突触结构、类型和接触关系并无一致的认识[6,7]。突触数量和类型的变化是脊髓内突触发育成熟的重要表现。但胚胎脊髓移植后，受体脊髓内突触的变化过程至今尚无人报道。本研究观察到：胚胎脊髓植入后，受体脊髓与移植物交界区内的突触密度持续增加，其增加速度明显快于非移植组。统计分析证实，在移植术后30 d，胚胎脊髓移植组的突触密度已与正常对照之间差异不显著（$P>0.05$）；而非移植组在移植术后60 d，其突触密度仍显著低于对照组（$P<0.01$）。因此，可以认为胚胎脊髓移植对损伤脊髓神经毡内的再生突触水平和再生速度有较大影响，移植组突触再生情况明显好于非移植组。

在观察大鼠中枢突触类型的研究中，Adams[8]和 Blue[9]发现大鼠顶叶皮质和视皮质内的Ⅰ型突触占大多数（96%）。而本研究中我们观察到，正常成年大鼠脊髓内，Ⅰ型与Ⅱ型突触的比例基本相等，Ⅰ型突触略多于Ⅱ型突触。但经胚胎脊髓植入后，在脊髓突触再生过程中，尽管Ⅰ、Ⅱ型突触密度均成逐渐增加并恢复正常的趋势，但Ⅱ型突触却占主要的比例。术后第4天，移植和单纯损伤组的Ⅱ型突触分别占突触总数75%和61%。随着时间的延长，Ⅱ型突触的比例逐渐降低，Ⅰ型突触的比例相应增高，至术后60 d已分别接近正常比例，另一方面，我们还观察到与 Itoh 等[10]的研究相似的结果。即术后早期，不同实验组的再生突触中，绝大部分为轴-树型突触，其比例分别为86%和84%，均显著高于正常对照组，但各组之间差异不明显。此后，轴-轴型突触比例增加逐渐接近正常。由此可见，尽管不同实验组的突触再生数量存在较大的差异，但无论是否采用移植治疗，损伤脊髓神经毡内，再生突触的构成变化基本相似，说明移植对神经毡内各型突触的比例结构无明显影响。

除了突触密度外，突触前轴突终末内细胞器数量的变化也是反映突触成熟程度的重要表现。本研究结果表明，单纯损伤与移植组，其神经毡内线粒体密度和

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

突触前轴突终末内囊泡密度均随愈合时间的延长呈持续的增长。不同实验组之间，神经毡内线粒体密度的变化不尽相同，胚胎脊髓移植组的线粒体含量增加最为迅速，移植术后第 7 天，胚胎脊髓移植组的线粒体密度已明显高于其它各组，至术后 45 d 时已与正常对照差异不显著。但此时单纯损伤组的线粒体密度仍显著低于正常。各实验组之间，突触前轴突终末内的囊泡密度变化与线粒体密度的变化过程大致相似，术后 15 d～30 d，移植组的囊泡密度逐渐接近和恢复正常。而单纯损伤组的囊泡密度至术后 60 d 时尚未恢复正常。从囊泡形态观察可见，主要以圆形清亮囊泡为主。尽管随时间的延长，含大颗粒囊泡的突触数量略有增加，但可以认为，胚胎脊髓移植对损伤脊髓再生突触的发育有较大的影响，胚胎脊髓移植对再生突触的成熟有促进作用。脊髓损伤的早期修复中，主要以含圆形清亮囊泡的胆碱能突触为主。

参考文献

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

2 Iwashita Y, Kawagochi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segments 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 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

5 Wyckoff R W G, Young J Z. Motor neuron surface. Proc Roy Soc, London Ser B, 1956;144(4):440

6 Peters A. The fine structure of the nervous system. The nervous and supporting cells. 2 ed. Philade phia Saunders, 1976:31～37

7 Shephered G M. The synaptic organization of the brain. 2 ed. New York: Oxford Univ Press, 1979:87～89

8 Adams I, Jones D G. Quantitative ultrastructural changes in rat cortical synapses during early-mid and late-adulthood. Brain Res, 1982;239(2):349

9 Blue M E. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of rat qualitative analysis. J Neurocytol, 1988;12(6):599

10 Itoh Y, Tessler A. Ultrastructural organization of regenerated adult dorsal root axons within transplants of fetal spinal cord. J Comp Neurol, 1990;292(4):396

(收稿：1998-02-17；修回：1998-06-18)

(编辑 王 红)

Quantitative observation on reconstruction of host spinal cord neuropil after embryonic spinal cord transplantation with electron microscopy*

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

Abstract Objective: To study the reconstruction of neuropil and the formation and differentiation of synapses in host spinal cord after embryonic spinal cord transplantation. Methods: Image analysis of electron microscopy was used. Results: The density of synapses was increased more rapidly in the transplanted group. Embryonic spinal cord transplantation could not exert effects on the composition of the regenerative synapses in neuropil. Most of the regenerative synapses were type Ⅱ. However, the number of the type Ⅰ synapses was gradually increased during the recovering process. In terms of types of vesicles and contact, the regenerative synapses were mainly axonal-dendritic and acetylcholinergic. Conclusion: Embryonic spinal cord transplantation exerts great effects on the number and maturity of synapses in neuropil of injured host spinal cord.

Key words embryonic spinal cord transplantation; neuropil; electron microscopy; image analysis

* 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