DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.008

胚胎脊髓移植对损伤脊髓修复作用的病理组织学和超微结构观察*

李兵仓 王正国 朱佩芳 李应玉 胡 建** 廖维宏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第六研究室) 重庆,630042

提 要 目的: 观察胚胎脊髓在缓解损伤脊髓的病理反应及其发生发展中的作用。方法: 将妊娠 14 d大鼠胚胎脊髓植入半切洞损伤的成鼠脊髓后 1、3、5、7、10、15、30、45和 60 d时,取材做光镜和电镜观察。结果: 单纯脊髓损伤后,发生了出血水肿、变性坏死以及囊腔形成胶质细胞增生和神经纤维再生。胚胎脊髓植入后,明显减轻了神经元和神经纤维的坏死变性程度,并能对损伤神经元实施挽救;有效抑制了病理囊腔的形成,也可填补原发损伤造成的大块组织缺损;防止了胶质细胞过度增生形成瘢痕屏障;明显增加了再生神经纤维的数目。结论: 胚胎脊髓对损伤脊髓具有减轻病理反应和促进修复的作用。

关键词 脊髓损伤/病理学;脊髓/移植
中图法分类号 R681.5

哺乳类动物的脊髓损伤后果常致截瘫。手术减压、手术吻合、大网膜移植、外周神经移植、药物治疗、物理康复、以及应用酶等制剂来抑制和消除结缔组织瘢痕形成等治疗脊髓损伤[1],但从病理学角度来看,除手术减压、大网膜移植与局部冷冻等可在一定程度上改善损伤脊髓血循环外,既未遏制住结缔组织瘢痕形成,也没能阻挡住损伤脊髓内巨大囊腔的发生,以致脊髓损伤的病变结果仍以截瘫而告终。为此,本研究观察胚胎脊髓移植在缓解损伤脊髓病理反应及其发生发展中的作用,旨在为治疗脊髓损伤探索新方法。

1 材料与方法

实验共用大鼠 108只,大鼠脊髓损伤、妊娠 14 d胎鼠脊髓移植、灌注固定、光镜和电镜标本的取材包埋等方法步骤同文献[2]。光镜切片尼氏染色参照文献[3]进行。

实验中,将接受移植的脊髓损伤大鼠随机分为术后 1、3、5、7、10、15、30、45和 60 d 9个观察组,每组 7只,5只用于光镜观察,2只用于电镜观察。另在相同的每一时相点上,用 5只未接受移植的,以同样方法造成脊髓损伤的大鼠作为对照。

2 结果

2.1 光镜观察

术后 1 d时,缺损区内散布着组织碎片、残渣以及数量不等的红细胞。在损伤区首尾约一个脊髓节段的脊髓组织内,可见散在的斑片状出血区域,HE染色,组织显得稀疏浅染,其内的神经元,特别是前角运动神经元呈现尼氏体消失、胞浆深染、核偏位、核仁消失等改变。

术后 3 d时,损伤腔洞内见少量的组织碎片,绝大部分组织碎片已降解变性,可见巨噬细胞和少量成纤维细胞。表面开始出现断续的薄层结缔组织。附近脊髓组织内出血水肿,并出现局灶性坏死。神经元的变性不但更为明显,且数目减少。在接受移植组脊髓内,虽然邻近脊髓组织的上述病理改变仍存在,但变化不明显,特别是神经元的变性似乎仍维持在原来的阶段。

术后 7 d,对照组损伤腔洞扩大、成纤维细胞和胶质细胞增多及组织坏死,多数神经元变性或消失;接受移植组脊髓内,随着移植物内神经上皮细胞和神经母细胞向神经元的分化及其体积的增大,部分神经元的染色变浅,尼氏体复出,核复位,核仁重新出现,见图 1。



图 1 移植后 7 d大鼠脊髓。移植物(G)存在的情况下,宿主脊髓(H)内变性神经元重新出现核仁(→),但神经元着色仍然较深 (HE× 100)

Fig 1 Nucleoli (→) of degenerated neuron in host spinal cord (H) reappeared under the condition of the graft (G) surviving, but the neuron was still deeply stained. Rat spinal cord on 7th d after injury (HE × 100)

* 国家自然科学基金资助项目,No. 394707715
** 附属西南医院骨科 重庆,630038

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

术后 7 d~ 15 d,对照组脊髓的原始损伤范围进一步扩大,坏死灶液化融合,损伤同侧、对侧的神经元均逐渐消失。接受移植组脊髓移植物逐步充填整个损伤腔洞,并与宿主脊髓形成完善的组织连接。出血水肿不复存在。神经元从染色特点到形态结构渐渐变为正常。

术后 30 d时,对照组邻近损伤区的脊髓节段内出现由坏死液化灶融合而成的巨大囊腔,见图 2 接受移植组脊髓内,整个脊髓在大体形态和内部的组织结构上恢复得和正常脊髓的基本一样,见图 3



图 2 损伤后 **30 d**大鼠脊髓。损伤区同侧尾端脊髓内出现巨大囊腔(**C**),对侧脊髓(**H**)内的神经元也基本消失殆尽 (HE× 40)

Fig 2 A large cavity (C) appeared in the caudal spinal cord of the injured side. Neurons in the spinal cord of control side (H) disappeared completely. Rat spinal cord on 30th d after injury (HE× 40)

图 3 移植后 **30 d**大鼠脊髓。由于移植物(**G**)几乎占据整个一侧脊髓,使脊髓横断面的轮廓显得基本正常。宿主脊髓(**H**)神经元也显正常 (HE× 40)

Fig 3 Outline of trans-sectined spinal cord was looked normal as the graft (G) almost occupied one side of the spinal cord. The host neurons (H) were also looked normal. Rat spinal cord on 30th d after injury (HE× 40)

术后 30 d~ 60 d,各种反应在对照组和接受移植组的损伤脊髓内都趋于稳定,只是各自的结构特征变得更为明显。

2.2 电镜观察

电镜下脊髓的病理变化主要是神经的变性和再生,以及伴随两者而同时存在的胶质细胞增生。在术后 1 d~ 7 d内,以神经的变性坏死为突出特征。电镜下可见,有髓神经纤维的髓鞘断裂、成层,轴索先是线粒体等细胞器肿胀,继之整个轴索完全消失。神经元胞体及终末结构的变性可分为两种,一种是其内的细胞器逐渐减少,基质越来越稀疏,最后导致胞体和终末的消失;另一种是细胞器逐渐聚集,基质渐渐致密,最后整个结构演变为一团电子密度很高的物质。这种现象在术后 1 d的脊髓内最为明显。随后,吞噬细胞越为常见,在其胞浆内可见发达的溶酶体系统,以及大小不等的吞饮小泡和吞噬的细胞碎片,见图 4 与此同时,具有很多线粒体和发达粗面内质网的成纤维细胞也能在电镜下观察到。

在术后 7 d~ 15 d,最突出的电镜表现为变性初期就已开始的胶质细胞增生和神经再生现象。胶质细胞除了数量增多以外,其细胞器也变得非常发达。少突胶质细胞常常包裹轴突构成不同发育阶段的新生神经纤维,见图 5,不过它们也经常对新生神经纤维进行阻挡。星形胶质细胞常常伸出细长的突起与再生的轴突并行,或包围分割新生的有髓神经纤维,更有甚者,部分星形胶质细胞可以吞噬变性的细胞结构,而对正常的细胞结构却无这种作用,见图 6 轴突除以有髓神经纤维的形式表达再生外,也常以再生终末球的方式出现。这些胶质细胞增生和神经再生现象虽有持续存在的趋势,但在术后 30 d的则明显减少,到术后 60 d时,电镜下所能看到的大多是三、五成团的胶质细胞群以及与其并存的有髓神经纤维,由移植物发育分化而来的、与正常脊髓组织并无差异的成熟神经组织很难再观察到增生和再生现象。

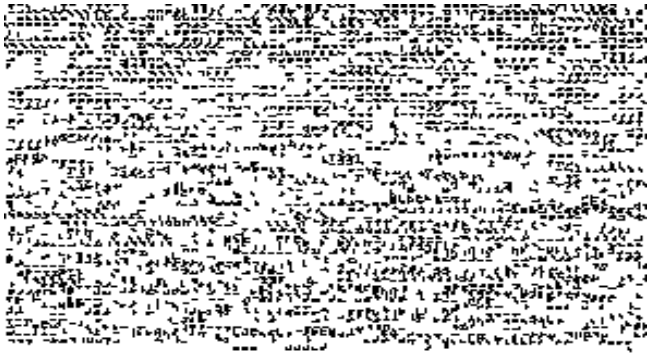


图 4 损伤后 **5 d**大鼠脊髓超微结构。吞噬细胞内含有大量的溶酶体(**L**)和吞饮泡(**V**),也可见尚未消化完毕的吞噬成分(**P**) (TEM× 8 500)

Fig 4 Large amount of lysosomes (L) and vesicles (V) in phagocyte. Undigestive elements (P) could also be found in it. Rat spinal cord on 5th d after injury (TEM× 8500)

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



图 5　移植后 15 d大鼠脊髓超微结构。M为处于不同发育阶段的再生神经纤维。OL为少突胶质细胞　(TEM× 8500)

Fig 5　Many myelinated nerve fibers (M) in different developing stages could be seen. OL indicate oligodendrocyte. Rat spinal cord on 15th d after injury　(TEM× 8500)

图 6　移植后 10 d大鼠脊髓超微结构。星形胶质细胞(AS)内可以见到被吞噬的变性细胞结构(D)　(TEM× 15000)

Fig 6　Phagocytized degenerated elements could be seen in astrocyte (AS) Rat spinal cord on 10th d after injury　(TEM× 15000)

虽然上述大部分变化在接受移植的损伤脊髓内同样能够观察到,但神经变性的程度轻、持续时间短,增生的胶质细胞也没有单纯脊髓损伤的明显。特别是在神经纤维再生方面,接受移植后,再生神经纤维的数目明显增多,与新生神经纤维伴行的胶质细胞显然不如单纯损伤的常见。

3　讨论

哺乳动物脊髓损伤后数分钟,损伤部位即可见斑片状出血;数天内,损伤脊髓可出现广泛坏死,同时伴有大量巨噬细胞浸润;至 3周末,巨大囊腔以及阻碍神经纤维再生的瘢痕组织可形成。对照组中,病理变化几乎完全重复了这一闭合性脊髓损伤的经典病理过程。表明本实验所用的开放性脊髓损伤方法可复制出完全符合标准的病理反应。

对于中枢神经系统来说,危害最大的莫过于神经元和神经纤维的变性坏死。本观察结果显示,在未接受移植的损伤脊髓中,两种病变不可遏制的持续发展,直到不但损伤区的、而且连附近脊髓节段也包括在内的全部神经元消失殆尽为止;植入胚胎脊髓以后,以同样方法损伤的脊髓并没有产生如此严重的病理结局。镜下可见原本变性的神经元,特别是前角运动神经元在移植物存在的条件下逐渐恢复染色特性和核的位置,最终闯过坏死关而得以完整的保留,和 Himes (1994)[4]所得胚胎脊髓对 Clarke核神经元的保护作用相同。为何胚胎脊髓能够遏制变性的发展和保护已经变性的神经元,有人认为[5],胚胎神经组织可能释放某种特异性的酶或者拮抗剂,以清除那些对神经组织有毒的变性坏死产物,从而遏制了病变的进一步发展。也有越来越多的证据表明,胚胎神经组织含有多种神经营养因子[6,7]。我们推测,这可能与神经营养因子对损伤神经元的保护作用有关。当然,其他那些在胚胎发生过程中具有诱导和趋化作用的化学物质,也有可能参与了这一保护过程。

由小的坏死液化灶逐渐融合而成的巨大囊腔不但严重地破坏了脊髓,阻碍了损伤脊髓功能的恢复。在本实验观察中,除在原发损伤部位见到已较初扩大了的损伤腔洞外,巨大的破坏性囊腔在术后 30 d时也完全形成。在接受移植的动物中,不但原发损伤腔洞被移植物充填消失,邻近的脊髓节段也显得非常完整。原发损伤腔洞的消失是由于体积增大了的移植物填补所致,而融合性囊腔的消失则是移植的胚胎脊髓阻断了形成囊腔的病理演变。胚胎脊髓这种阻断作用的机理可能还是和神经营养因子有关[8]。另外,也不能完全排除胚胎脊髓的植入,唤醒了宿主脊髓在发生过程中曾经具有的自我保护和修复机理。

治疗脊髓损伤的关键是促进中枢神经再生。在脊髓损伤研究中已形成的观点是,由星形胶质细胞增生形成的胶质瘢痕是中枢神经再生的最大屏障。实际上,原本对神经元就具有营养、支持和保护作用的星形胶质细胞,损伤后呈现增生反应是中枢神经组织的一种自我修复现象,但过度增生就会产生屏障作用。在本实验中,都能观察到在术后早期就已开始的胶质细胞增

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

生现象。但在脊髓损伤后立即植入胚胎脊髓,胶质细胞增生的程度明显减轻。电镜下可明显观察到,增生的少突胶质细胞常常包裹轴突,形成不同再生阶段的有髓神经纤维,而增生的星形胶质细胞,又常以其细长的突起与再生轴突伴行,似有指导再生方向的作用。电镜下还可观察到增生肥大的星形胶质细胞可以吞噬变性的细胞碎片,而对正常的组织结构却仅仅起到分割包围的作用。据此判断,星形胶质细胞除上述作用外,在脊髓损伤后的病理变化过程中,还具有清除变性结构的功能。综合分析上述结果可以认为,在损伤脊髓内保持合理数量的胶质细胞,无论对病理过程,还是对神经再生,都具有积极的作用。

参考文献

1 Bray G M, Aguayo A J. Exploring the capacity of CNS neurons to survive injury, regrow axons, and form new synapses in adult mammals. In: Seil F J ed. Neural regeneration and transplantation. New York: Alan R Liss, 1989: 67~78

2 李兵仓,伍亚民,刘 枚等.急性脊髓损伤后胎鼠脊髓的脊髓内移植及其影响因素.第三军医大学学报, 1992; 14(4): 347

3 Kiernan J A. Histological and histochemical methods: theory and practice. 2nd ed, Pergaman Press plc. 1990: 101~102, 302~303

4 Himes B T, Goldberger M E, Tessler A. Grafts of fetal central nervous system tissue rescue axotomized Clarke's nucleus neurons in adult and neonatal operates. J Comp Neurol, 1994; 339(1): 117

5 Freed W J. Neural transplantation: a special issue. Exp Neurol, 1993; 122(1): 1

6 Schwartz J P, Nishiyama N. Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury. Brain Res Bull, 1994; 35(5~6): 403

7 Elkabes S, Dreyfus C F, Schaar D G *et al*. Embryonic sensory development: local expression of neurotrophine-3 and target expression of nerve growth factor. J Comp Neurol, 1994; 341(2): 204

8 Acheson A, Conover J C, Fandl J P *et al*. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. Nature, 1995; 374(6521): 405

(收稿: 1996-09-26;修回: 1997-01-07)

(编辑 汪勤俭)

Histopathological and ultrastructural observation of the repairing effects of transplanted embryonic spinal cord on injured spinal cord in rats

Li Bingcang, Wang Zhengguo, Zhu Peifang, Li Yingyu, Hu Jian, Liao Weihong (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract **Objective**: To observe the effects of a transplanted embryonic spinal cord on the pathological changes of an injured spinal cord of adult rats. **Methods**: On the 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th, 15th, 30th, 45th and 60th day after the embryonic spinal cord was transplanted into the hemisected spinal cord, specimens were obtained and observed with optical and electron microscopy. **Results**: After the spinal cord was hemisected and torn, such pathological changes as hemorrhage, edema, degeneration, necrosis and cavitation and such repairing processes as nerve regeneration and gliosis were observed. After the transplantation of the embryonic spinal cord, the followings were found: (1) Degeneration and necrosis of the neurons and nerve fibers were alleviated and some of the injured host neurons exhibited recovery; (2) The cavitation and the tissue defect resulting from original trauma were gradually filled up with the enlarged grafts; (3) Excessive hyperplasia of gliocytes was prevented from forming glial scar; (4) The number of regenerating fibers was prominently increased. **Conclusion**: The transplantation of an embryonic spinal cord can alleviate the pathological responses and promote the repair of an injured spinal cord.

Key words spinal cord injury/PA; spinal cord/TR; rat

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