DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.03.004

大鼠胚胎脊髓植入对成年鼠急性脊髓损伤的功能修复作用*

李兵仓 李应玉 伍亚民 刘 枚 赵 刚 刘连生 廖维宏
(第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 把 E_{14} 胎鼠脊髓移植到成鼠损伤脊髓后 7、15、30、60、120 和 240 d 后,作者测定了宿主鼠脊髓 SSEP 和 SMEP。并观察了其后肢的临床运动机能。同时用单纯脊髓损伤和髓内肌肉移植鼠作为实验对照。结果表明,移植后 30 d 时,宿主鼠的运动机能基本恢复正常。但诱发电位测定显示,无论是 SSEP 还是 SMEP,其潜伏期直至术后 240 d 时才恢复正常。与此同时,对照组大鼠的两种诱发电位也在术后呈逐步恢复的趋势。作者认为,胚胎脊髓在成鼠脊髓的机能修复中可能具有一定的促进作用,但如何证实两者间的机能联系,仍需借助诱发电位测定以外的更高技术手段。

关键词 脊髓损伤;脊髓/移植;胚胎脊髓

我们以前曾报道[1],把妊娠 14 d(E_{14})胎鼠脊髓植入成鼠急性损伤的脊髓后,大部份移植物不但能够继续生长分化,也可和宿主脊髓形成较为完善的组织联接。在此基础上,本文进一步研究了胎鼠脊髓对成鼠急性脊髓损伤后的功能修复作用。

1 材料与方法

1.1 脊髓损伤及脊髓移植

按文献[1]所述进行,除仍设空白对照外,另设肌肉移植对照组。即在切口附近分离一小块新鲜腰大肌,将其在林格氏液中清洗后,再修整为 2mm × 1mm 小块,然后于手术显微镜下将其植入成鼠脊髓。

1.2 脊髓诱发电位测定

分别于术后 7、15、30、60、120 和 240 d 时,再次依序暴露颅顶骨、T_9、L_4 脊髓(骨性标志)与两侧坐骨神经。另选 20 只正常同种大鼠,同实验鼠一样分别测定脊髓感觉和运动诱发电位。本实验共用 110 只大鼠。

1.2.1 脊髓感觉诱发电位(Spinal Sensory Evoked Potential SSEP)的测定:用钩状银丝作刺激电极,以间距 2mm 置于坐骨神经干分枝点上方。用 SEN-3201 型刺激器,经隔离器输出波宽 0.1ms、强度 10～20V、间隔每秒 4 次的正方波脉冲刺激(刺激强度以引起后肢轻微抽动为准)。记录电极采用顶端直径为 0.6mm 的双极银球电极,以 4mm 间隔置于 T_9 脊髓中线硬脊膜表面。记录信号经滤波 0.01s－1KHz 的前置放大器增益 10 万倍,并通过 Apple Ⅱ 微机诱发电位检测系统进行 50 次平均处理。分析时间为 20ms。记录时地极置于椎旁皮下。

1.2.2 脊髓运动诱发电位(Spinal Motor Eovked Potential SMEP)的测定:在颅顶冠状线下 4mm、矢状线旁 1mm 处,用牙科钻打一盲孔定位作为刺激点,负极置于头皮下。用与 SSEP 同型的刺激器,经隔离器输出波宽 0.2ms、强度 40～60V、间隔每秒 4 次的正方波脉冲刺激(刺激强度以引起前肢微抽动为度)。电位记录方式同 SSEP 测定,但记录电极置于 L_4 脊髓中线硬脊膜表面(骨性标志)。

1.3 大鼠运动功能的临床测定

自术后第二天大鼠完全清醒时起,将其后肢运动功能情况分为 0～Ⅵ共 8 级。0 级:后肢无任何运动能力;Ⅰ级:后肢有微弱的自主运动;Ⅱ级:后肢有明显的自主运动,但不能持重;Ⅲ级:后肢能够持重,但不能行走;Ⅳ级:后肢能够行走,伴有严重痉挛和不协调;Ⅴ级:后肢能够行走,伴有中度痉挛和不协调;Ⅵ级:后肢能够行走,伴有轻度痉挛和不协调;Ⅶ级:后肢运动能力如常。术后 10 d 以内,每天检查记录大鼠运动功能一次。以后,每 3 d 检查记录一次。

* 全军中青年医学基金资助项目

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

所有诱发电位测定数据均用医用统计程序包 SPMR 中的 PDA-2 程序处理。

2 结果

2.1 大鼠运动功能及一般状况的临床检查

术后第 2 天于动物完全清醒时所见，各组大鼠的双后肢功能均呈 0 级，除精神萎靡、懒于摄食饮水外，还伴有腹胀、体温降低、尿潴留、血尿、结膜出血等症状。术后第 3 天，动物的一般状况虽有改善，甚至部份动物已恢复自主排尿功能，但它们的双后肢仍不能运动。术后 4 d 时，右后肢运动能力达Ⅱ级水平的大鼠约 50%，而左后肢(术侧)具有Ⅰ级功能的大鼠仅约 10%。术后第 5 至 7 天，随着大鼠主动的饮水进食，其一般状况有明显的改善。此时，全部大鼠的右后肢由参与持重(Ⅱ级)到能够行走(Ⅳ级)，但左后肢能够持重的动物仅占 30%左右。术后第 10 天时，大部份动物右后肢的运动功能已达到Ⅵ级水平，但左后肢运动功能的恢复仍然落后，能够达到Ⅳ级水平的尚不足 50%。至术后 15 d，左后肢的运动能力有所提高，但行走时仍伴有明显的痉挛和不协调(Ⅴ级)。

术后 15 d 以后，除空白对照组外，其他两组大部份动物左后肢的运动功能恢复较为明显，由行走时的痉挛和不协调，逐步恢复到行走自如(Ⅵ级)。由于双后肢均参与了运动，术后 30 d 的大鼠更显机警灵敏，跑跳灵活而迅速。在空白对照组大鼠中，虽有少数动物(约 15%)左后肢的运动能力达到Ⅵ级水平，但多数动物行走时仍伴有左后肢的痉挛和不协调(Ⅴ～Ⅵ级)。更有甚者，原来已见运动有明显恢复的左后肢反而其运动能力下降。

2.2 SSEP 的改变

从图 1 可以看出，对照组大鼠 SSEP 的基本波形由三个向下的正电位(P 波)和二个向上的负电位(N 波)组成，可依次记为 $P_1N_1P_2N_2$ 和 P_3 波。这些波的波峰比较尖锐，反应时程也较短。伤后即刻，P_2N_2 消失，其余波波宽增大，潜伏期明显延长。术后 7 d，波形成份进一步减少，仅存 P_1 和 N_1 波。这种情况持续到术后 15 d。术后 30 d 时，P_3 波复现。此后随着波形成份的逐渐增加，各电位潜伏期也逐步缩短。至术后 240 d 时，SSEP 的基本电位情况与伤后即刻的相比，有明显不同，其波形成份、电位形状及电位时程均大体类似于正常 SSEP。SSEP 的这种变化在脊髓移植组大鼠中最为明显，肌肉移植组的次之，空白对照组的则不甚明显。

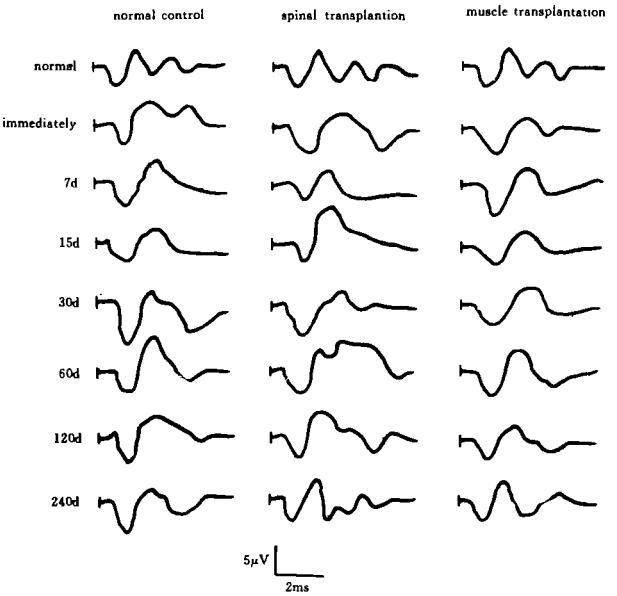


图 1 移植前后不同时间大鼠脊髓感觉诱发电位图

Fig 1 The potential diagram of SSEP at different times before/after transplantation

表 1 列出了各组大鼠 SSEP 潜伏期的平均值。该值变化的组内纵向统计学比较结果已在表 1 中注明。将三组大鼠 SSEP 各波潜伏期做组间横向统计学比较可见，术后 7～60 d 间，各潜伏期的组间差异并不明显($P>0.05$)。术后 120 d 时，空白对照组大鼠 P_1 波的潜伏期较其他两组的明显延长($P<0.05$)。术后 240 d 时，除脊髓移植组大鼠 P_1 波的潜伏期明显($P<0.05$)短于对照组的外，其余的相差均不明显($P>0.05$)。

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

表 1 移植前后不同时间大鼠脊髓感觉诱发电位潜伏期的变化($\bar{x} \pm s$,ms)

Tab 1 The changes of lalent period of SSEP at different times before/after transplantation

	normal control		spinal transplantation		muscle transplantation	
	P_1	N_1	P_1	N_1	P_1	N_1
normal	1.53±0.18	3.40±0.36	———	———	———	———
immediately	2.53±0.44**	4.33±0.72*	———	———	———	———
7 d	2.57±0.19**	4.44±0.95**	2.30±0.48**	4.24±0.32*	2.59±0.25**	4.34±0.60*
15 d	2.46±0.45**	4.25±0.36*	2.37±0.53**	4.50±0.56**	2.41±0.79**	4.54±1.12**
30 d	2.55±0.29**	4.10±0.51*	2.60±0.51**	4.30±0.78*	2.80±0.51**	4.24±0.42*
60 d	2.85±0.41**	4.15±0.49*	2.55±0.70**	4.30±0.54*	2.65±0.49**	4.35±0.54*
120 d	2.50±0.57**	4.02±0.81*	1.95±0.48*	3.90±0.60	2.01±0.34*△	4.05±0.62*
240 d	2.00±0.22*△	3.55±0.33△	1.65±0.20△△	3.45±0.37△	1.75±0.15△△	3.65±0.48△

compared with normal control $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;

compared with immediately $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

2.3 SMEP 的改变

正常大鼠 SMEP 的波形近似于"M"型(图 2),其波峰与 SSEP 的相同。伤后即刻,电位潜伏期明显延长,"M"型的波型反应消失,取而代之的是两个宽大而显平滑的向下正波和一个呈平台状的向上负波。由此至术后 30 d,电位潜伏期无明显变化,但平台状负波中央开始出现切迹。此后随着电位潜伏期的逐步缩短,SMEP 最终在术后 240 d 时呈现与正常 SMEP 相同的波形。

各组大鼠 SMEP 主要波形的潜伏期列于表 2。

将脊髓移植组大鼠的潜伏期与其余两组的做组间横向比较可见,自术后 60 d 起,脊髓移植组大鼠 P_1 波的潜伏期明显($P<0.05$)短于空白对照组。但与肌肉移植组的 P_1 波潜伏期相比,除术后 60 d 时相差显著外($P<0.05$),在另外两个时相点上的比较(120、240 d)则差别不明显($P>0.05$)。

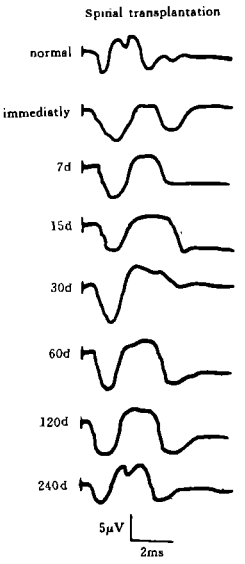


图 2 移植前后不同时间大鼠脊髓运动诱发电位图

Fig 2 The potential diagram of SMEP at different times before/after transplantation

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

表 2 移植前后不同时间大鼠脊髓运动诱发电位潜伏期的变化($\bar{x} \pm s$, ms)

Tab 2 The changes of latent period of SMEP at different times before/after transplantation

	normal control		spinal transplantation		muscle transplantation	
	P_1	N_1	P_1	N_1	P_1	N_1
normal	1.53±0.10	3.80±0.40	———	———	———	———
immediately	2.70±0.65**	4.43±1.33**	———	———	———	———
7 d	2.41±0.50**	4.54±0.74**	2.67±0.89**	4.65±0.34**	2.62±0.68**	4.51±0.23**
15 d	2.56±0.25**	4.60±0.67**	2.67±0.70**	4.56±0.52**	2.59±0.25**	4.34±0.60*
30 d	2.75±0.44**	4.44±0.54**	2.70±0.78**	4.65±0.87**	2.99±0.34**	4.50±0.89**
60 d	2.80±0.33**	4.30±0.84*	2.35±0.72**	4.50±0.82**	2.80±0.37**	4.35±0.37*
120 d	2.65±0.72**	4.10±1.03*	2.20±0.28**	4.35±0.41*	2.60±0.34**	4.55±0.48**
240 d	1.95±0.19*△	3.85±0.25△	1.50±0.22△	3.60±0.44△	1.70±0.19△△	3.80±0.43△

compared with normal control $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;

compared with immediately $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

3 讨论

既往的研究者们在进行脊髓内胚胎神经组织移植时，大多侧重观察组织的可移植性及其与宿主组织的结构关系[2~4]。我们在术后 240 d 以内，首先从临床角度观察了大鼠的运动功能。结果显示，术后 30 d 时，大鼠的运动功能就基本恢复到正常鼠的水平。这与 Kunnkel-Bagden 等根据步态分析所得结果非常相似。他们的实验表明，宿主鼠不但能够恢复正常运动功能，其恢复程度也明显优于对照组大鼠[5]。由此似乎可以得出结论，胎鼠脊髓已与宿主脊髓建立了机能联系，进而修复了丧失的神经功能。

众所周知，成体中枢神经的再生速度极为缓慢，移植后的胚胎神经元也有一个存活和继续生长分化的成熟过程。由此可以推想移植后的较短时间内，胚胎神经组织不大可能和宿主神经组织间形成功能性突触联接。另外，本文诱发电位测定也表明，无论是 SSEP 还是 SMEP，术后 30 d 时的潜伏期与正常鼠的相比，相差仍然非常明显（$P<0.01$）。那么，如何解释移植后宿主动物确实恢复的运动机能。作者推测，作为低等哺乳动物的大鼠，其残存脊髓的代偿作用可能是原因之一，而移植的胚胎神经组织也许从结构亦或功能上加强了残存脊髓的代偿功能。

从本文诱发电位测定结果来看，随着移植后动物存活时间的延长，SSEP 和 SMEP 的电位图形逐步接近正常。潜伏期也在术后 240 d 时渐渐恢复到正常鼠的水平。横向比较三组大鼠的潜伏期，以脊髓移植组大鼠的最短。该组大鼠的潜伏期与空白对照组相比差别显著（$P<0.05$），与肌肉移植组的差别则不明显（$P>0.05$）。这种组间差异在 SMEP 的变化过程中表现的稍为突出。诱发电位的上述改变与 Pallini 等的测定结果不一致。他们在移植后 56 d 和 84 d 测定大鼠脊髓的诱发电位时，没有记录到任何电位活动[6]。

我们不但在各组大鼠中均记录到了诱发电位信号，即使损伤脊髓后即刻，除潜伏期明显延长外，诱发电位信号仍未消失。此外，作者也注意到，在脊髓移植组大鼠诱发电位逐步恢复正常的同时，另外两个对照组大鼠的诱发电位也呈现了同样的变化趋势。肌肉作

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

为脊髓神经元的一种靶组织，可理解为其对脊髓损伤的组织修复或许具有某种促进作用。但单纯损伤脊髓以后，诱发电位也在逐步恢复的现象就颇为费解。这是否与诱发电位的容积传导特性有关，作者目前尚难断定。我们认为胎鼠脊髓可能在成体脊髓的机能修复中具有某种促进作用。但两者间的机能联系及移植物在机能修复中的作用与地位，仍需采用更高研究手段去进一步阐明。

参考文献

1. 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)：347～351
2. Tessler A, Hims BT, Houle J, et al. Regeneration of adult dorsal root axons into transplants of embryonic spinal cord. J Comp Neurol, 1988; 270: 537～548
3. Houle JD, Reier PJ. Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult rat spinal cord. J Comp Neurol, 1988; 269: 535～547
4. Itoh Y, Tessler A. Ultrastructural organization of regenerated adult dorsal root axons within transplants of fetal spinal cord. J Comp Neurol, 1990; 292: 396～411
5. Kunnkel-Bagden, Bregman BS. Spinal cord transplants enhance the recovery of locomotor function after spinal cord injury at birth. Exp Brain Res, 1990; 81: 25～34
6. Pallini R, Fernandez E, Gangitano C, et al. Studies on embryonic transplants to the transected spinal cord of adult rats. J Neurosurg, 1989; 70: 454～462

(收稿：1992-10-19；修回：1993-03-24)

The function-restorative effects of implanted embryonic spinal cord on acutely injured cord of adult rats

Li Bingcang, Li Yingyu, Wu Yamin, et al (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract Spinal sensory evoked potential (SSEP) and spinal motor evoked potential (SMEP) of the injured spinal cord of the host rats were determined on the 7th, 15th, 30th, 60th, 120th and 240th day after they received implantation of the embryonic spinal cord from the fetus of E14 rats. The motor function of the hind limbs of the host rats were also observed. The rats with simple cord injury and those with cord injury and implantation of a piece of skeletal muscle served as the controls. It was found that the locomotor function of the host rats could be recovered on the 30th day after implantation, but the latent period of both SSEP and SMEP became normal on the 240th day. At that time, the latent period of evoked potentials of the 2 control groups also recovered gradually.

It is believed that embryonic spinal cord may have effects on the recovery of the locomotor function of the host rats but more sophisticated methods are imperative to clarify the interelationship between the host tissue and the graft.

Key words spinal cord injuries; spinal cord/TR; embryonic spinal cord

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