DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.04.011

急性脊髓损伤后胎鼠脊髓的脊髓内移植及其影响因素*

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

提 要 本文利用显微外科技术建立了大鼠急性脊髓损伤后胎鼠脊髓的移植方法,并用形态学技术研究了胎龄及其他因素对移植物的影响。结果表明,在 E_{14}～E_{20}胎龄中,以取自 E_{14}的移植物存活率最高,为 70.83%。E_{16}以后,无一例移植物存活。附于移植物的结缔组织严重阻碍移植物的存活与生长。脊髓损伤及继发的病理反应也对移植物的存活与生长带来不良影响。我们认为,胚胎神经组织移植时,除注意技术操作和改善脊髓损伤外,事先确定移植物的分化程度至关重要。

关键词 脊髓损伤;脊髓/移植

由于胚胎性神经组织在中枢神经系统的损伤修复中具有独特作用[1],[2],胚胎神经组织移植已经引起了不少学者的极大兴趣[3~5]。既往虽有不少成功移植的实例[6~8],但对损伤条件下神经移植的成功率及其影响因素,却缺乏系统的研究报道。为此,本文试图在探讨这些问题的同时,建立一种胎鼠脊髓的移植方法,以为进一步利用胎鼠脊髓修复成体脊髓损伤奠定方法学基础。

1 材料与方法

1.1 供体制备

将经过选择的 Wistar 大鼠按雌雄 2:1 同笼过夜,次日晨阴道涂片确定妊娠。检出精子日为妊娠 0 d。妊娠 14、15、16、17、18、20 d 时,对孕鼠麻醉(乌拉坦 1.25 g/kg),无菌开腹暴露子宫后,由子宫角逐个取出胎鼠,把有活力者留做提供移植脊髓。

1.2 受体脊髓损伤

以同种体重约 200 g 的大鼠脊髓为受体,雌雄不拘。同上麻醉后,无菌操作下逐层切开分离组织至 T_{13}-L_1 椎体,咬除椎板,显示腰膨大。手术显微镜下纵向切开硬脊膜约 0.5cm,借助脑膜镊用虹膜刀沿脊髓后动脉左侧切入,并适度旋转以搅毁局部脊髓,然后用吸引器吸出损坏的脊髓组织,从而在半切脊髓的基础上,又造成直径约 2mm,深达脊髓腹侧硬脊膜的盲洞。

1.3 脊髓移植

将前述确定日期的胎鼠迅速移置显微镜下,纵向切开背部组织,取出颈胸段脊髓。置入装有林格氏液的培养皿中,仔细剔除与其相连的结缔组织,得一段长约 3mm 的纯净胎鼠脊髓,然后用玻璃针头谨慎吸取,再小心注入脊髓腔洞,确认植入后,用 8/0～0.3mm 的无创缝合线间断缝合硬脊膜。如此共获受体鼠 216 只(附表)。

附表 受体鼠及其移植物的存活率

	受体鼠	受体鼠		移植物	
	总 数	存活数	存活率(%)	存活数	存活率(%)
E14	95	48	50.53	34	70.83
E15	26	12	46.15	2	16.67
E16	27	13	48.15	0	0
E17	25	10	40.00	0	0
E18	23	11	47.83	0	0
E20	20	10	50.00	0	0
	216	104	48.15	36	34.62

* 全军医药卫生青年科研基金项目

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

1.4 对照

切开受体脊髓硬脊膜后，不做进一步损伤，随即将同量移植物置于脊髓表面；损伤后不做移植；或将胎鼠脊髓连同附带的组织一起植入。上述 3 种对照均各用 10 只大鼠。

1.5 组织学检查

术后 7、15、30、60、120、240 d 时，再次麻醉受体鼠，开胸后经左心室分别灌注 4%多聚甲醛和 3%戊二醛各 150ml。取出全部腰段脊髓做常规 HE 切片，光镜观察。作电镜观察者，先在解剖显微镜下修出移植物，再将其切成约 1mm³ 的小块，常规电镜包理切片后，用 JEM-100SX 电镜观察。

2 结果

2.1 脊髓损伤

采用上述脊髓损伤方法，所有受体鼠在术后 3d 内均出现了典型而严重的截瘫综合征。由此而耗竭死亡的动物约为 50%，且大多于手术后两周内。损伤后受体脊髓的光镜病理改变见图 1。

2.2 胎鼠脊髓发育

妊娠 14d(E_{14})时，胎鼠脊髓的发育尚处于神经管阶段。其管壁由里向外可分为明显的 3 层，即由高柱状或梭形神经上皮细胞构成的室管膜层，以圆形、核大而浅染的神经母细胞为主的套层，以及由纤维成份构成的缘层(图 2)。E_{15}时，室管膜层的神经上皮细胞向套层增殖，形成更多的神经母细胞。E_{16}时，随着室管膜层的神经上皮细胞进一步向套层增殖，腹侧套层内的神经母细胞已分化为与前角运动神经元基本相同的多极神经母细胞。E_{17}时，神经管由前后两端缩向脊髓中央，演变为成体脊髓的中央管。灰质前角的多极神经母细胞分化为运动神经元。此后，随着神经元的不断出现，脊髓各部的组织结构更趋完善。

2.3 移植物的存活与生长

2.3.1 植于脊髓表面的移植物

术后 7 d 时，成块状附于受体脊髓表面。至术后 240 d 时，形成连于脊索后索的蘑菇状赘生物(见图 3)。

2.3.2 带结缔组织的移植物

随同胎鼠脊髓一起植入的结缔组织，术后 15 d 就严重阻碍了移植物的存活与生长(见图 4)。

2.3.3 纯净移植物

术后 7d 时与受体脊髓间存有间隙，其内以较为幼稚的神经元为主。至术后 240 d 时，移植物已与受体组织紧密联接，内部以中小型神经元为主(图 5)。电镜下，术后 7d 时可见幼稚神经元发出粗大的神经生长锥(图 6)。至术后 240 d 时，则演变为成熟神经元。

2.3.4 不同胎龄的移植物

在本文规定的胎龄中，以取自 E_{14}的移植物存活率最高(附表)。E_{15}的存活率很低。其余胎龄的移植物无一例存活，全部变性坏死。

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



图 1 脊髓损伤后 7d 大鼠脊髓 ×40

图 2 E_{14} 大鼠胚胎脊髓腹侧部。神经上皮细胞向套层迁移形成神经母细胞。
NT 神经管 ×200

图 3 受体脊髓(H)背侧面的移植物(Gr)。移植后 240d。 ×40

图 4 附于移植物的结缔组织严重阻碍了神经组织的存活与生长。移植后 15d。
B 骨组织,C 结缔组织,H 受体脊髓。 ×40

图 5 移植后 240d 的移植物
H 受体脊髓,Gr 移植物 ×40

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

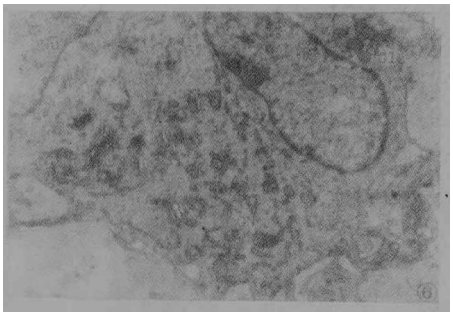


图 6 移植后 7d 幼稚神经元的神经生长锥(GN)。Nu 细胞核,GL 胶质细胞。 × 12 000

3 讨论

脊髓是中枢神经系统最难移植的部位之一。移植过程中任何环节的粗心大意,都可能导致移植的失败。我们在移植过程中,采用显微外科技术局部造洞和缝合硬脊膜,即解决了脊髓容积小、张力大,易将移植物排出的困难,缝合的硬脊膜又为恢复损伤脊髓和移植物的血供提供了条件。同时,用玻璃针头吸取与注入移植物,不但保持了块移植的优点,也保证了移植物的准确植入,从而为移植物的存活创造了条件。本文的结果也表明,制备纯净的移植物尤为重要。由于结缔组织较神经组织更易存活,植入后无论其他环节怎样仔细,都将造成神经移植的失败。

采用本文的脊髓损伤方法,受体动物的死亡率高达 50%左右。Das 等[9,10]采用类似的脊髓损伤方法,大鼠的死亡率在 50～70%之间,并认为严重的脊髓损伤及继发的病理反应影响移植物的存活。从我们的结果来看,植于脊髓表面的移植物,其生长状况优于植入损伤区内的移植物,说明脊髓损伤区继发的病理反应的确影响了移植物的存活与生长。

除上述因素外,本文也着重观察了胎龄对移植物存活的影响。结果表明,E_{14}时,胎鼠脊髓主要由生长分化能力很强的神经上皮细胞组成,此时获取的移植物存活率最高。此后,随着神经上皮细胞的迁移分化,生长分化能力较弱的神经母细胞逐渐增多,并不断分化为神经元,移植物的存活率也逐步降至为零。说明在所有因素中,植入时移植物本身的分化程度是决定移植物能否存活的最根本因素,其中以神经上皮细胞为主的分化阶段是较为理想的移植时机。

参考文献

1. 李兵仓。中枢神经损伤的现代修复方法——神经移植。大自然探索 ,1990;4:71～78
2. Das GD. Neural transplantation:an historical perspective. Neurosci Biobehavi Rev, 1990;14:389～401
3. Tessler A. Intraspinal transplants. Ann Neurol, 1991;29:112～123
4. Fine A. Transplantation in the central nervous system. Sci Am, 1986;2:52～58
5. Reier PJ. Neural tissue grafts and repair of the injured spinal cord. Neuropatho App Neurobio, 1985;11:81～104
6. Kunkel-Bagen E, Bregman BS . Spinal cord transplants enhance the recovery of locomotor function after spinal cord injury at birth. Exp Brain Res, 1990;81:25～34
7. Yasunobu Itoh , Tessler A. Ultrastructural organization of regenerated adult dorsal root axons within transplants of fetal spinal cord. J Comp Neuro, 1990;292:396～411
8. Reier PJ , Bregman BS, Wujek JR. Intraspinal transplantation of embryonic spinal cord tissue in neonatal and adult rats. J Comp Neuro, 1986;247:275～296
9. Das GD, Das KG, Bracko J,et al. Spinal traumas:some postoperative complications in experimental animals. Brain Res Bulletin, 1989;22:33～37
10. Das GD. Neural transplantation in spinal cord under different conditions of lesions and their func-

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

tions significance. In Neural Transplantation and Regeneration edited by Das GD and Wallace RB. New York:Springer, 1986:1～61

(收稿:1991-10-28;修回:1992-02-10)

A sduty on transplantation of embryonic spinal cord and favorable factors for its acceptance after acute spinal cord injury in rats

Li Bingcang, Wu Yamin, Liu Mei, et al (Research Institute of Field surgery, Third Melitary Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract Transplantation of embryonic spinal cord was performed with microsurgical technique in rats after they were inflicted with acute spinal cord injury. Then the favorable factors affecting the acceptance of the transplanted cord were investigated with morphological technique. It was found that among the gestation ages from E_{14} to E_{20}, the spinal cord taken from the rats with the gestation age of E_{14} showed the highest survival rate of 70.83%. None of the transplants taken from the rats with the gestation age older than E_{14} survived. The connective tissue attached to transplants severely interfered with their acceptance and growth. The severity of the pathological manifestations of the injured spinal cord exerted unfavorable influence on the survival and growth of the transplants too.

It is believed that in order to assure the success of the transplantation, besides the attention on the technical performance of the surgery, it is essential to determine the differentiation state of the embryonic spinal cord to be transplanted.

Key words spinal cord injuries; spinal cord/TR

(上接 346 页)

多。有蒂,亦可无蒂。粘膜下层及浆膜层均可发病。而以粘膜下层者多见(93%)[3]。结合国内报道,我们认为如高龄患者,有上腹部疼痛,黑便,尤其胃镜下息肉体积大,表面有糜烂及溃疡形成,活检钳触之有海棉样感要考虑本病的可能。胃镜活检组织尚难诊断,用圈套电凝切除息肉样组织,既达到治疗与确诊目的,又可避免剖腹手术。

关键词 胃肿瘤;电凝法;脂肪瘤

参考文献

1. 汤功华。胃粘膜下脂肪瘤伴溃疡 1 例。中华肿瘤杂志,1982;4(4):321
2. 程慧敏 王春华 王鹏程,等。胃多发性腺瘤样息肉癌变伴胃粘膜下脂肪瘤 1 例。中华肿瘤杂志,1986;8:252
3. 佐野量造。胃疾患の臨床病理。東京:医学書院,1974:297

(收稿:1992-03-09;修回:1992-05-04)

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