

实验性脊髓损伤的观察评定方法

姜树东 洪毅 王彦辉 唐和虎

[关键词] 脊髓损伤; 评定; 康复; 综述

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2005)12-0991-03

[本文著录格式] 姜树东, 洪毅, 王彦辉, 等. 实验性脊髓损伤的观察评定方法[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(12): 991—

993.

目前, 实验性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的主要观察评定方法包括神经功能观察、组织形态学观察和神经电生理检查等, 各种方法各具特点, 具有互补性, 综合应用几种方法可以比较客观地反映脊髓的损伤程度和恢复程度。笔者就几种观察评定方法作一综述。

1 神经功能观察

1954 年, Tarlov 在 SCI 的实验研究中首先提出一种脊髓运动功能分级评定方法, 其后被众多学者采纳和应用^[1]。但 Tator 认为, Tarlov 的这种分级评定方法对灵长类动物较准确, 对种属低一些的动物如啮齿动物缺乏准确性, 故对猴后肢运动功能进行评定时采用了改良 Tarlov 法, 即: 0 分, 肢体完全瘫痪; 1 分, 肢体可划动; 2 分, 所有关节能良好运动, 但不能行走和负重; 3 分, 能行走及负重; 4 分, 正常^[2]。此后, 又出现了许多改良 Tarlov 法, 如 Faden 等将猫的后肢运动功能分为 0~5 分^[3]; Gale 等将大鼠的后肢运动功能分为 0~5 分^[4]。总体上看, Tarlov 及改良法评分跨度较大, 过于笼统, 不利于细致地观察后肢运动功能的恢复过程。

1977 年, Rivlin 和 Tator 首次报道利用斜板法检测 SCI 大鼠后肢运动功能恢复程度^[5]。该法的原理是将动物放在带有橡皮垫的斜板上, 倾斜角度每次增加 5°, 动物能够坚持 5 s 的最大角度即为该动物的功能值。正常大鼠功能值为 80°, SCI 大鼠的功能值取决于后肢肌力恢复的程度。Michael 等认为, 该法比较简单, 无论可靠性还是重复性均优于 Tarlov 评分法^[6]。

1985 年, Gale 等提出了一套包括运动、感觉、反射功能在内的综合评定方法, 即联合行为评分法(combined behavioral score, CBS)^[4], 能较为准确、客观地综合评定大鼠脊髓运动、感觉、反射等多方面的功能, 弥补了 Tarlov 法单一运动功能评价的不足, 敏感性也大幅度提高, 但观察项目较多, 主观因素大^[7]。此后, Suresh 等将 CBS 法进行了改良, 设计了一系列专门用于检测猕猴反射、复合运动功能的实验方法, 不但敏感而且可以定量检测^[8]。

1995 年, Basso 等提出一种新的更加敏感的脊髓运动功能评定法—BBB(Basso, Beattie and Bresnahan)评分法, 专门用于评价大鼠胸髓损伤后后肢运动功能的恢复情况^[9]。该评分标准包括许多动物行为细节和特征说明, 分级较细致(0~21 分), 且分值越高, SCI 程度越轻, 体现了 SCI 的自然恢复过程。总

之, BBB 评分法是目前比较优秀的评分方法。但 BBB 分值并不一定反应运动神经元的损伤或恢复程度。Bassam 等在实验中发现, 大鼠腰髓注射红藻氨酸破坏中间神经元后, 引起后肢瘫痪, 而磁诱发电位潜伏期却无任何变化, 因此认为 BBB 分值与运动神经元丢失无相关性, 而与中间神经元破坏后导致中枢模式发生器(central pattern generator, CPG)破坏有关^[10]。在实际应用中, 本法可因主观评分导致结果失真, 故最好采用双盲、双人独立观察记录, 最后取较低值或均值。此外, 尚有许多其他评定方法, 如发音/感觉评分法^[11], 通过有伤害性的刺激(如钳夹), 观察动物发声和后肢的反应以此判断脊髓的功能。

在 SCI 研究中, 各种功能评定方法常常联合应用, 如发音/感觉评分与改良 Tarlov 评分法^[11]; 斜板实验法与改良 Tarlov 评分法^[6]。总之, 运动功能评定是确定 SCI 的损伤和恢复程度及评价疗效的基本方法。Michael 等认为, 运动功能评定适合对 SCI 后后肢大体运动功能进行比较客观的评定, 而且与损伤部位轴突数量和非锥体系如红核脊髓束、前庭脊髓束和中缝脊髓束的完整性有较高的相关性, 但与皮质脊髓束的完整性无相关性^[6]。

2 组织形态学观察

2.1 显微镜观察 电子显微镜(electron microscope)可以细致地观察神经元尼氏体、轴突、髓鞘等超微结构在 SCI 前后的变化, 因而在 SCI 研究中被广泛应用。扫描电镜样品制备简单, 适应性好, 图像立体感强; 而透射电镜的分辨率高于扫描电镜, 但样品制备复杂。Hermelinda 等用透射电镜观察挫伤后的大鼠脊髓, 发现 SCI 后髓鞘再生并不是半途而废, 而是一个缓慢的过程, 与其他组织一样具有可塑性^[12]。激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)是 20 世纪 80 年代发展起来的具有划时代意义的高科技新产品, 是当今最先进的分子细胞生物学分析仪器之一。CLSM 在荧光显微镜基础上加装了激光扫描装置, 利用计算机进行图像处理, 既可获得三维立体图像, 又可进行动态观察。Jorge 等用 CLSM 观察免疫组化检测结果, 发现 Eph B3 抗体所在位置与原位杂交结果一致, 因而认为 Eph B3 可能抑制 SCI 后的轴突再生^[13]。

2.2 组织化学观察 用于 SCI 研究的组织化学方法有免疫组织化学法、酶组织化学法、原位杂交组织化学技术等。免疫组织化学法将组织的结构、功能和代谢结合起来, 具有定性可靠、定位准确、定量可能的特点。常用于 SCI 研究的免疫组化观察指标有: ①神经丝蛋白(neurofilament, NF): 是参与构成神经元胞体和轴突的细胞骨骼框架, 由于 200 KD 的 NF 只存在于轴突和恢复期的神经元胞体, 故可反映 SCI 后神经组织的恢复情

作者单位: 1. 100068 北京市, 北京博爱医院; 2. 100068 北京市, 首都医科大学康复医学院。作者简介: 姜树东(1975-), 男, 辽宁大连市人, 硕士, 主要研究方向: 脊柱脊髓损伤的早期外科及康复治疗。

况^[14]; ②胶质纤维酸性蛋白:是星形胶质细胞的标记物,可反映 SCI 后神经胶质细胞的活动^[14,15]; ③髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP):是雪旺细胞(Schwann cell, SCs)和有髓神经髓鞘的特异性标记物,细胞质染色阳性说明为 SCs,神经纤维 MBP 阳性提示有髓鞘形成^[16]; ④降钙素相关基因肽:可反映感觉纤维生长情况^[16,17]; ⑤5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT):脊髓内 5-HT 阳性纤维的轴突起源于脑中缝背侧核,能调节躯体运动和内脏运动,可反映下行传导纤维的生长情况^[18]; ⑥多巴胺 β-羟化酶:可反映去甲肾上腺素能神经纤维的生长状况^[16,18]; ⑦酪氨酸羟化酶:可反映多巴胺能和去甲肾上腺素能神经纤维的生长状况^[17]。免疫组化技术可以检测各类神经元、胶质细胞、轴突和髓鞘等结构在 SCI 前后的生长和分布情况,是观察研究 SCI 的重要手段,近年来在 SCI 的研究中得到普遍应用。

常用于 SCI 研究的酶组织化学指标有乙酰胆碱酯酶(acetylcholine esterase, Ache)和酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)。在没有找到一种能显示乙酰胆碱(acetylcholine, ACH)的组织化学方法之前,人们只能借助显示 ACH 的水解酶——Ache 的组织化学方法间接了解 ACH 的分布^[19]。现在人们多利用 ACH 的合成酶——胆碱乙酰基转移酶(cholineacetyltransferase, ChAT)直接检测组织中的 ACH,观察运动神经元胞体和轴突的生长状况^[17]。ACP 是溶酶体的标志酶,其活性变化可反映细胞的损伤和恢复程度^[19]。

原位杂交组织化学技术(in situ hybridization histochemistry, ISHH)是通过探针与组织内特定的 mRNA 在切片上进行杂交,从而将传递基因信息的 mRNA 变为可视化,进而将遗传信息在细胞内准确定位的手段。Huber 等联合应用原位杂交和免疫组化技术将 Nogo-A 定位于中枢神经系统内少突胶质细胞^[20],这与其角色(髓鞘相关抑制因子)完全相符。由于探针比抗体易于制备且敏感性高,故理论上 ISHH 要优于免疫组织化学法,但是 ISHH 法实验复杂,要求条件较高。

2.3 神经束路示踪法 神经束路示踪法可以直观看到神经纤维的生长和走行,逐渐成为 SCI 研究不可或缺的手段。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)使用方便,应用最为广泛。HRP 肌肉内注射后,可逆行标记运动神经元胞体及其轴突^[6];经神经核区注射,可顺行标记神经元胞体及其轴突^[15]。菜豆凝集素(PHA)主要用于顺行追踪^[21],其显示的纤维末梢形态非常细致,且基本上没有过路纤维标记问题,但需要离子电泳导入,而且结果欠可靠^[22]。麦芽凝集素(WGA)既可单独使用作顺、逆向传送,也可与 HRP 共价偶联形成 WGA-HRP^[15],灵敏度可提高 10 倍。生物胞素(biotin)注射范围明确且吸收充分,但降解和消散快,注射后大鼠存活期不超过 36 h。Seitz 等用生物胞素逆行标记,发现成年小鼠脊髓横切后,如果横切端移位和成纤维细胞浸润控制在最低程度,在没有任何外加干涉下,脊髓功能也能部分恢复^[23]。近年来广泛应用的是生物素化葡聚糖胺(biotinylated dextran amine, BDA),只需一道 ABC(抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶)反应程序既可离子电泳导入,又可压力注射;既可顺行标记,也可逆行标记,还可以与其他标记物联合应用,而且标记的动物存活时间也较长(6~11 d)^[24]。Novikov 等将 PHA、神经生物素和 BDA 做综合比较发现,BDA 标记效果更细致、更出色,而且还

能有效标记长距离初级传入投射纤维^[25],不过即使在最佳条件下,BDA 也只能标记 1/3 起源于背根神经节的纤维。

3 神经电生理检查

体感诱发电位(somatosensory evoked potentials, SEP)是目前用于评定中枢神经系统感觉传导通路功能的一种无损伤检查手段,其波峰及潜伏期能反映并定位周围神经和中枢神经体感传导通路的损伤或病变。其中皮层诱发电位(somatosensory cortical evoked potentials, SCEP)操作简单,应用广泛,但受许多麻醉药物影响;脊髓诱发电位(somatosensory spinal evoked potentials, SSEP)则稳定性强,准确可靠,而且几乎不受其他因素影响,也容易获得,但有一定创伤性。Arunkumar 等发现,在猕猴部分 SCI 后,SSEP 的预测价值是 66.67%,在严重损伤时其预测价值是 100%^[26]。由于 SEP 的反应速度慢于动作诱发电位(motor evoked potentials, MEP),加之不能提供前角运动神经元的信息,因此最好与 MEP 联合应用,互为补充。

MEP 是继 SEP 后为检查运动神经系统而设计的一种神经电生理学检查方法,是运用电或磁刺激皮质运动区产生兴奋,通过下行传导通路使前角细胞去极化,在相应肌肉或神经表面记录到的电位。磁刺激 MEP 具有无痛、无损伤、穿透力强和定位准确的特点,是一种先进的电生理检查方法,优于电刺激 MEP^[27]。MEP 为判断脊髓运动功能状态提供了客观、定量的依据。Arunkumar 等在同一实验中还发现,脊髓部分损伤后 MEP 的预测价值是 80%,严重损伤时的预测价值是 100%^[26]。但 Richard 等认为,在 SCI 急性期磁刺激 MEP 并不能提供神经运动功能恢复的有用信息,肌肉中的神经支配信号并不比运动功能更早恢复^[28],故 MEP 尚不能判断 SCI 休克期神经损害的程度。

肌电图(electromyogram, EMG)是将针形电极刺入肌肉,通过观察肌肉的电活动间接了解脊髓运动系统的兴奋性。EMG 是评价 SCI 的有效工具。Merkler 等用 IN-1 治疗 SCI 后的大鼠,经 EMG 证实,治疗组的后肢运动功能与对照组有显著性差异^[29]。磁刺激 EMG 在反映脊髓下行传导通路的完整性方面同样具有无痛、非侵入性和非接触性的优点,是一种非常有潜力和实用价值的评价手段,正在取代电刺激 EMG^[30]。在反映运动神经元的功能方面,EMG 与 MEP 有相似之处,而且有很好的相关性。

4 其他观察评定方法

除上述观察评定方法外,SCI 研究有时还会测定脊髓血流量(spinal cord blood flow, SCBF)和生化指标等。由于脊髓缺血模型发生的病理改变与其他 SCI 模型类似,都存在早期水肿、轴突肿胀及后期坏死,故 SCBF 测定有其重要意义^[31]。测定 SCBF 的方法较多,如氢清除法(hydrogen clearance, HC)是在脊髓组织中吸入或注入 H₂,以其被清除的速率判断脊髓血流情况;放射性自显影法可用于测量局部或整个脊髓血流,但动物必须处死,而且只能做一次检查;激光多普勒血流仪(laser Doppler flowmetry, LDF)检测无创性,能多次重复测定,但只能获得 SCBF 相对的变化值而非绝对值;微球法(microspheres, MS)是将一定量大于毛细血管管径的放射性微球悬液注入左心房或左心室,使其随血流分布到全身(包括脊髓),并全部堵塞在毛细血管床前,通过测定各脏器、组织分布的微球放射性,计算出血流量。MS 是检测动物 SCBF 较理想手段,简单可靠,

但受标本大小、记录时间等因素影响。

与原发性 SCI 只引起神经元和血管破坏相比,继发性 SCI 破坏的范围更广,持续时间更长,因为 SCI 后将引起一系列的生化指标改变。如 SCI 后很快发生水肿和乳酸盐含量升高,严重时还会产生酸中毒。Chesler 等发现,细胞外 K^+ 浓度随着打击能量的增加呈阶梯状升高,从而引起附近的神经元和胶质细胞发生去极化,造成神经传导阻滞^[32]。另外,去甲肾上腺素(noradrenalin, NE)和 5-HT 在 SCI 前后也会发生变化,如 5-HT 在轻度 SCI 时升高,在中、重度时降低;而 NE 的含量与正常相同,或者减少^[33]。由于两者均是血管收缩剂,后者还可导致自由基形成,故应用 NE 受体阻滞剂可能对 SCI 有保护作用。

综上所述,SCI 的观察评定方法多种多样,每一种都有自己的适用范围,在 SCI 的研究中可以根据研究的侧重点不同,选择不同的方法。各方法之间也可以相互组合应用,如神经功能观察和神经电生理检查、免疫组化技术联合应用,可以有效地显示脊髓组织的形态学和电生理改变与动物后肢功能恢复有关。SCI 的疗效观察除上述方法外,还有影像学(MRI、超声)评定方法等,但目前仍处于探索阶段。在科学发展史上,每一次技术的创新都会导致科学的飞速发展,医学领域也是如此,我们希望更先进的实验仪器、实验方法不断出现,早日攻克 SCI 这个医学难题。

[参考文献]

- [1] Tarlov IM, Kinger H. Spinal cord compression studies[J]. Ann Arch Neurol Psychiatry, 1954, 71: 275—290.
- [2] Tator CH. Acute spinal cord injury in primates produced by an inflatable extradural cuff[J]. Can J Surg, 1973, 43: 647.
- [3] Faden AI, Jacobs TP, Smith MT, et al. Comparison of thyrotropin-releasing hormone (TRH), naloxone, and dexamethasone treatments in experimental spinal cord injury[J]. Neurology, 1983, 33: 673—682.
- [4] Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment[J]. Exp Neurol, 1985, 88(1): 123—134.
- [5] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat[J]. J Neurosurg, 1977, 47: 577—581.
- [6] Fehlings MG, Tator CH. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 1995, 132: 220—228.
- [7] Kerasidis H, Wrathall JR, Gale K. Behavioral assessment of functional deficit in rats with contusive spinal cord injury[J]. J Neurosci Methods, 1987, 20(2): 167—179.
- [8] Suresh BR, Muthusamy R, Namasivayam A. Behavioral assessment of functional recovery after spinal cord hemisection in the bonnet monkey (Macaca radiata) [J]. J Neurol Sci, 2000, 178(2): 136—152.
- [9] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using NYU weight drop device versus transection[J]. Exp Neurol, 1996, 139: 244—256.
- [10] Bassam H, Zhang YP, Darlene A, et al. Lasting paraplegia caused by loss of lumbar spinal cord interneurons in rats: no direct correlation with motor neuron loss[J]. J Neurosurg, 2000, 93: 266—275.
- [11] Khalaf AL, Saleh AL. Effect of aluminum on neurological recovery in rats following spinal cord injury[J]. J Neurosurg, 2000, 93: 276—282.
- [12] Hermelinda S, Gabriel G, Alfredo F, et al. Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats[J]. Brain Research, 1998, 782: 126—135.
- [13] Jorge D, Linda A, Alexander E, et al. Brief communication: induc-

tion of Eph after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 1999, 156: 218—222.

- [14] Bas B, Paul A, Gerard J, et al. Intercostal nerve implants transduced with an adenoviral vector encoding neurotrophin-3 promote regrowth of injured rat corticospinal tract fibers and improve hindlimb function[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1): 25—37.
- [15] Toshiki M, Sakae T. Partial functional of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active mek-1[J]. Exp Neurol, 2000, 166: 115—126.
- [16] Mark H, Katie G. Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 1996, 137: 157—173.
- [17] Grill RJ, Blesch A, Tuszynski M. Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells[J]. Exp Neurol, 1997, 148: 442—452.
- [18] Leanza G, Cataudella T, Dimauro R, et al. Release properties and functional integration of noradrenergic-rich tissue grafted to the denervated spinal cord of the adult rat[J]. J Neurosci, 1999, 11(5): 1789—1799.
- [19] 朱悦, 包峰, 王星铎. 大鼠脊髓不完全损伤后前角运动神经元的酶细胞化学改变[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1999, 8: 173—176.
- [20] Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3553—3567.
- [21] Bamber NI, Li H, Lu X, et al. Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded mini-channels[J]. Eur J Neurosci, 2001, 13(2): 257—268.
- [22] Veenman CL, Wild JM, Reiner A. Organization of the avian “Corticostriatal” projection system: A retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons[J]. J Comp Neurol, 1995, 354: 87—126.
- [23] Seitz A, Aglow E, Heber Katz E. Recovery from spinal cord injury: a new transection model in the C57Bl/6 mouse[J]. J Neurosci Res, 2002, 67(3): 337—345.
- [24] Reiner A, Veenman CL, Medina L, et al. Pathway tracing using biotinylated dextran amines[J]. J Neurosci Methods, 2000, 103(1): 23—37.
- [25] Novikov LN. Labeling of central projections of primary afferents in adult rats: a comparison between biotinylated dextran amine, neurobiotin and Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin[J]. J Neurosci Methods, 2001, 112(2): 145—154.
- [26] Arunkumar MJ, Srinivasa Babu K, Chandy MJ. Motor and somatosensory evoked potentials in a primate model of experimental spinal cord injury[J]. Neurol India, 2001, 49(3): 219—224.
- [27] McKay WB, Stokic DS, Dimitrijevic MR. Assessment of corticospinal function in spinal cord injury using transcranial motor cortex stimulation[J]. J Neurotrauma, 1997, 14(8): 539—548.
- [28] Richard A, Macdonell L, Geoffrey A. Magnetic cortical stimulation in acute spinal cord injury[J]. Neurology, 1995, 45: 303—306.
- [29] Merkler D, Metz GA, Raineteau O, et al. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A[J]. J Neurosci, 2001, 21(10): 3665—3673.
- [30] Atsushi C, Shingo H, Shigeo H, et al. Relationship between the states of spinal impact injuries and magnetically evoked EMGs in rats[J]. Neurological Research, 2000, 22: 727—732.
- [31] Mia von E, Ake S, Erik S. Clip compression in the spinal cord: A correlative study of neurological and morphological alterations[J]. Exp Neurol, 1997, 145: 502—510.
- [32] Chesler M, Young W, Hassan AT, et al. Elevation and clearance of extracellular K following graded contusion of the rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 1994, 125: 193.
- [33] 胥少汀, 郭世绂. 脊髓损伤基础与临床[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 250—257.

(收稿日期: 2005-07-08)