

自体施万细胞神经膜管移植修复大鼠脊髓损伤的实验研究

南丰, 李靖年, 董建俐, 王鸿飞, 东海潮, 高延明

[摘要] 目的 探讨自体施万细胞神经膜管(SCNC)移植对脊髓半横断损伤的修复作用。方法 成鼠 30只,随机分 3组:10只造模后行 SCNC移植(A组);10只造模但不移植(B组);10只不造模也不移植作正常对照组(C组)。下段胸髓半切法造模。术后 8周每周行动物行为测试和斜板试验;术后 6周测定皮层体感诱发电位(CSEP);术后 8周行组织学观察及计算机图像分析。结果 A组、C组可测出 CSEP波形, B组未测出。行为测试、斜板试验及图像分析 A组、C组与 B组差异显著, A组与 C组之间斜板试验有显著差异。A组通过脊髓损伤处的再生神经纤维数量明显多于 B组。结论 自体施万细胞神经膜管移植有助于引导再生轴突生长通过,对损伤脊髓再生有较明显的促进作用。

[关键词] 施万细胞神经膜管(SCNC);脊髓损伤;大鼠

Repairing of Spinal Cord Injury with Schwann Cell Neurilemma Channel in Rats NAN Feng, LI Jing-nian, DONG Jian-li, et al.
The Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning, China

Abstract: **Objective** To apply the Schwann cell neurilemma channel (SCNC) in promoting the regeneration of injured spinal cord. **Methods** Spinal cords of rats after laminectomy at T8/T9 were divided in 3 groups randomly: 10 rats were transplanted with SCNC (Group A); 10 rats only made models (Group B); 10 rats were as normal control group (Group C). All rats received behaviour survey and inclined plane test every week 8 weeks after operation. 6 weeks after operation, they were measured with cortical somatosensory evoked potential (CSEP). And 8 weeks after operation, all specimens were studied histologically. **Results** CSEP could be recorded in group A and C, but not in group B. There were marked differences between group A or C and group B in behavior survey, inclined plane test. Amount of nerve fibers regenerated through the injury gap in group A was significantly larger than that in group B. **Conclusion** SCNC could facilitate axonal regeneration and promote the repairing of injured spinal cord.

Key words: Schwann cell neurilemma channel (SCNC); spinal cord injury; rats

[中图分类号] R651.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)11-0954-03

[本文著录格式] 南丰,李靖年,董建俐,等.自体施万细胞神经膜管移植修复大鼠脊髓损伤的实验研究[J].中国康复理论与实践,2006,12(11):954—956.

周围神经损伤后再生能力较强,而中枢神经系统损伤后再生能力却很有限。一般认为,周围神经损伤瓦勒变性后,轴突、髓鞘相继溃变崩解,而施万细胞却大量增殖,引导再生轴突生长通过损伤间隙;增殖的施万细胞除提供管道支架作用外,尚可通过神经膜分泌大量神经营养因子,促进神经纤维再生。中枢神经系统髓鞘结构主要由少突胶质细胞组成,缺乏施万细胞神经膜结构和功能,故再生能力有限^[1]。本实验利用大鼠脊髓半横断损伤模型,探讨自体施万细胞神经膜管(Schwann cell neurilemma channel, SCNC)移植修复脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的可行性。

1 材料与方

1.1 动物与分组 成年 SD大鼠 30只,体重 180~280 g,雌雄不限。由大连医科大学动物实验中心提供,为 SPF级动物。随机分成 3组,每组 10只:造模后行 SC-

NC移植(实验组);B组:造模但不移植(模型组);C组:不造模也不移植(正常对照组)。

1.2 方法

1.2.1 SCNC制备 A组、B组动物用 2%戊巴比妥钠 30 mg/kg腹腔麻醉,沿左上肢屈侧切开约 1.5 cm,切取正中神经节段约 0.5 cm。正中神经断端行显微吻合。A组取材后按下述过程处理:蒸馏水浸泡 5 min,液氮冷冻 2 min,共两次;生理盐水浸润 5 min复温;轻轻挤出胞浆和崩解组织,修整成待移植的 SCNC。B组取材后不作上述处理。

1.2.2 脊髓半横断损伤造模 同步麻醉下 A组、B组动物行背正中切口,切除 T₈、T₉椎板,显露脊髓。手术显微镜下沿脊髓后正中血管左侧纵行切开脊髓约 0.5 cm,于两端仔细切割将脊髓左半横断。造模成功后,鼠尾呈痉挛性扑动,左下肢完全瘫痪。

1.2.3 SCNC移植及术后观察处理 A组造模后将 SCNC后按走行方向显微植入自体脊髓切损处。B组造模后不做移植。术后预防性肌注青霉素 3 d。每天 3次人工按压膀胱排尿,直至自主膀胱反射建立。观察动物存活情况、一般状态、伤口愈合、后肢溃疡情况

基金项目:辽宁省科技厅自然科学基金(619098)。

作者单位:大连医科大学附属第二医院骨科,辽宁大连市 116027。

作者简介:南丰(1974-),男,辽宁大连市人,博士研究生,主治医师,主要从事脊髓损伤治疗方面的研究。通讯作者:李靖年。

及运动功能恢复情况等。

1.3 评定方法

1.3.1 斜板试验 将大鼠置于纹理橡皮覆盖的木制斜板上,斜板倾斜角度由 0°缓慢上升,直到大鼠跌落,读取斜板度数。每例由不同实验者测试 3 次,取均值。术后 8 周每周测试 1 次。

1.3.2 行为学测试 根据 Rivlin 等的方法^[2]进行动物行为学测试。将行为学测试指标 0~7 级分级数字化,即 0 级 0 分,1 级 1 分,2 级 2 分,……,7 级 7 分。记录术后每周的行为评分。

1.3.3 皮层体感诱发电位 (cortical somatosensory evoked potential, CSEP) 术后 6 周用英国产 Medelec 诱发电位记录仪行 CSEP 测定。将记录电极置于右耳后偏上方与皮层感觉区相对应的颅骨处,参考电极置于对侧头皮下。刺激电极放在左后肢坐骨神经处,矩形稳压脉冲电流刺激左后肢坐骨神经,刺激频率 2 Hz,波宽 0.2 ms,刺激强度 50~60 V,以引起左后肢轻微肌肉收缩为度。

1.3.4 组织学观察

1.3.4.1 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 逆行示踪 术后 8 周各组随机取 4 只大鼠,于移植与脊髓远端交界面尾侧约 5 mm 处,将微量注射器针头向头侧倾斜 45°刺入脊髓约 1.0 mm,缓慢注入 30% HRP 5 μ l。48 h 后经主动脉灌注固定,切取移植的 SCNC 及与其相连的近、远端脊髓共约 1.5 cm。按 40 μ m 厚度纵行冰冻切片, TMB 呈色,观察近端脊髓神经元标记情况。1% 中性红复染后观察 SCNC 内神经纤维情况。

1.3.4.2 肉眼及镜下观察 术后 8 周,各组切取 T_{8/9} 为中心的 1.5 cm 标本。肉眼观察后 Epon 定位包埋,半薄横切片,厚 1 μ m。甲苯胺兰染色,光镜下观察 SNMC 内神经纤维再生情况。再用 LKB 切片机切成 6 nm 超薄片,铀、铅双染, JEM-200EX 型透射电镜下观察。取左侧损伤平面以下脊神经节固定包埋后,按 10 μ m 厚度横切片, HE 染色下光镜观察。 LUZWX-F 彩色图像分析仪对半薄切片中轴突数目、轴突直径及石蜡切片中脊神经节细胞数目进行分析。

1.4 统计学方法 所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 10.0 软件包用方差分析法进行统计学分析处理。 $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结果

2.1 一般情况 术后 2 周, A 组 1 只动物因左后肢溃疡继发感染死亡。其余动物术后 8 周均存活,切口 I 期愈合。术后 3 周, A 组左后肢有不同程度的运动功能恢复。术后 6 周, B 组开始有轻微的左后肢活动。 A 组和 B 组动物均发生手术部位的轻度脊柱侧弯畸形。

2.2 斜板试验 术后 2 周内, A、B 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。术后 3~8 周, A、C 组与 B 组间有非常显著性差异 ($P < 0.01$), A 组与 C 组有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 术后斜板试验比较 (°)

时间	A 组	B 组	C 组
1 周	28.61 \pm 3.87	29.42 \pm 2.92	57.14 \pm 2.06
2 周	30.32 \pm 2.45	30.56 \pm 3.10	56.83 \pm 2.81
3 周	45.54 \pm 3.28 ^{a, b}	30.43 \pm 2.74	56.99 \pm 3.25 ^a
8 周	52.93 \pm 1.61 ^{a, b}	40.78 \pm 1.83	57.11 \pm 1.67 ^a

注: a: 与 B 组比较, $P < 0.01$; b: 与 C 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 行为学测试 术后当日, A 组和 B 组左后肢失去负重和行走功能 (0 分)。术后 2 周内, 两组行为评分无明显恢复, 与 C 组有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。术后 3 周, A 组行为评分有恢复, 与 C 组仍有显著性差异 ($P < 0.05$); 术后 8 周时 A、C 两组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。术后 6~8 周, B 组行为评分亦有一定恢复, 但与 A、C 组有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 术后行为学测试评分比较 (分)

时间	A 组	B 组	C 组
1 周	0.50 \pm 0.76 ^a	0.40 \pm 0.63 ^a	7.00 \pm 0.00
2 周	1.20 \pm 0.69 ^a	1.00 \pm 0.98 ^a	7.00 \pm 0.00
3 周	4.80 \pm 0.48 ^{a, c}	1.30 \pm 0.82 ^a	7.00 \pm 0.00
6 周	5.90 \pm 0.84	3.20 \pm 1.13 ^{a, c}	7.00 \pm 0.00
8 周	6.20 \pm 0.91	3.30 \pm 1.25 ^{a, c}	7.00 \pm 0.00

注: 与 C 组比较, a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: 与 B 组比较, $P < 0.01$ 。

2.4 CSEP C 组可记录到潜伏期为 (16.15 \pm 1.23) ms, 波幅为 (30.76 \pm 2.61) mV 的 CSEP 波形。术后当日, A 组和 B 组 CSEP 波形消失; 术后 6 周, A 组可记录到 CSEP 波形, 但潜伏期延长至 (21.48 \pm 2.17) ms, 波幅降低至 (23.74 \pm 2.02) mV。B 组术后 6 周末记录到 CSEP 波形。

2.5 组织学观察 A 组: SCNC 与脊髓融合较好, 交界处无明显瘢痕组织形成; 移植植物中出现较多的再生轴索, 胶质细胞增生较少。大量神经纤维可越过宿主移植植物交界面。脊神经节细胞结构基本完整, 数量较多。HRP 示踪在宿主移植植物交界面头侧的正常脊髓前角内可见较多标记神经元。再生轴突直径较粗, 髓鞘较厚。

B 组: 脊髓切损处连接疏松, 有明显愈合间隙, 瘢痕增生明显, 脊髓有变性、坏死及较大空洞形成。切损处再生轴索少, 胶质细胞增生浸润明显。很少有神经纤维可以跨越脊髓切损处。脊神经节细胞结构基本破坏, 数量明显减少, 见大量炎细胞浸润。HRP 示踪未见标记神经元。再生轴突直径细, 髓鞘薄。

C 组:脊髓结构完整,无瘢痕组织形成。镜下可见大量神经纤维。脊神经节细胞结构完整,数量多。HRP 示踪见大量标记神经元。轴突直径粗,髓鞘厚。

计算机图像分析示:A、C 组与 B 组间在轴突数目、轴突直径和脊神经节细胞数目方面有非常显著性差异 ($P < 0.01$);A 组与 C 组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 轴突数目、直径及脊神经节细胞数目比较

	A 组	B 组	C 组
轴突数	906.50 ± 85.81 ^a	124.00 ± 48.72	1033.30 ± 126.36 ^a
轴突直径 (μm)	1.74 ± 0.26 ^a	0.66 ± 0.23	1.98 ± 0.49 ^a
脊神经细胞数	201.10 ± 18.37 ^a	31.70 ± 8.22	234.50 ± 16.28 ^a

注:a 与 B 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

对脊髓损伤修复及再生的研究涉及药物治疗、物理治疗、组织移植和基因工程等,其中研究最为广泛的就是组织移植。变性肌肉、大网膜、自体静脉、周围神经、肌基膜等都曾作为桥接体用于动物实验。其中以骨骼肌基膜管移植报道较多。它虽然能为神经纤维再生提供良好的通道,其基底膜成份也能引导神经脊细胞的迁移,并促进其分化^[3],但由于缺乏神经纤维再生所必需的施万细胞,其再生的神经纤维在直径、数量、髓鞘厚度及神经传导速度等方面,均不及具有施万细胞成份的移植体桥接^[4]。

施万细胞是周围神经的胶质细胞,包绕轴突,形成或不形成髓鞘。目前研究表明,施万细胞功能非常活跃,可在体内分泌多种神经营养因子 (neurotrophic factors, NTFs),并能够产生细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和细胞粘附分子 (cell adhesion molecules, CAMs) 等。上述物质与神经再生关系密切。施万细胞移植修复 SCI,已屡有成功报道^[5-6]。但亦有报道认为,移植体厚度过大时容易发生脊髓的“中央性坏死”^[7]。

SCNC 是包绕在施万细胞外面的一层富含 ECM 的薄膜。ECM 包括层粘连蛋白 (Laminin, LN)、纤维粘连蛋白 (fibronectin, FN)、nectin 等。ECM 各组分都有不同程度的刺激施万细胞分裂增殖和促进轴突生长的能力,其中起关键作用的是 LN 和 FN。体外研究表明, LN 和 FN 有明显促进神经突起生长的作用^[8]。殷琦等进一步证实,神经膜结构具有稳定性和耐损伤性,其主要成份并不因冷冻和融化而破坏^[9]。

SCNC 的完整性是周围神经轴突再生成功所必不可少的,但 SCNC 桥接脊髓切损尚少见报道。本实验

将 SCNC 移植于大鼠脊髓半横断损伤模型,发现实验组移植体内有较多再生神经纤维通过并跨过移植体-宿主交界面与正常脊髓相联系;组织学观察显示, SCNC 移植后与宿主脊髓融合较好,可见较多的神经纤维通过移植体-宿主交界面进入正常脊髓,未见明显的脊髓中央性坏死发生,且无明显的移植免疫排斥反应;在近端脊髓前角区见到较多的标记神经元,腰部脊神经节细胞结构较完整、数量较多,提示有神经回路的重建;脊髓再生轴突直径较粗、髓鞘较厚;而在移植体外周并未发现再生神经纤维通过。实验组术后 6 周可测出 CSEP 波形;术后 8 周动物肌力、动作协调性明显恢复。这些均表明 SCNC 有望成为桥接脊髓切损较理想的移植体,其引导、促进轴突再生的作用可能与移植体 ECM 的主要成分 LN 和 FN 等有关。另外,我们也观察到,模型组动物术后 6 周开始出现一定程度的运动能力恢复,但并未记录到 CSEP 电位,考虑与低等动物自主代偿性功能恢复有关。这也与以往的研究报道相一致。

但是 SCNC 移植桥接较大的脊髓切损是否有效? 用于更接近人类的灵长类动物效果如何? 不同致伤方式和程度的脊髓损伤模型是否影响疗效? 什么时机移植更好? 许多问题还需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 吕国蔚. 医学神经生物学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 344.

[2] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat [J]. J Neurosurg, 1997, 47: 577 - 581.

[3] 席保平. 基底膜与神经再生 [J]. 中华显微外科杂志, 1990, 13: 43.

[4] 万智勇, 张帆, 赵仲生, 等. 骨骼肌包埋自体神经片段修复周围神经缺损的实验研究 [J]. 中华骨科杂志, 1996, 16: 164.

[5] Martin D, Robe P, Franzen R, et al. Effect of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury [J]. J Neurosci Res, 1996, 45(5): 588 - 597.

[6] Tuszynski MH, Weidner N, McCormack M, et al. Grafts of genetically modified Schwann cells to the spinal cord: survival, axon growth, and myelination [J]. Cell Transplant, 1998, 7(2): 187 - 196.

[7] Wilgis EFS. Nerve Repair and Grafting [M]. // Gree DP. Operative Hand Surgery. Edinburgh: Charchill Livingstone, 1982: 915 - 938.

[8] Mirsky R. Recent Advances in Neuropathology [M]. Edinburgh: Charchill Livingstone, 1986: 1 - 24.

[9] 殷琦, 陆裕朴, 胡蕴玉, 等. 雪旺氏细胞基底膜与晚期神经再生 [J]. 中华骨科杂志, 1996, 16(3): 161 - 163.

(收稿日期: 2006-05-29)