

腰、骶脊神经前根撕脱伤对大鼠盆底肌运动神经元的影响

韦培湧, 吴建中, 涂良携, 姜苏明, 李维坚

(汕头大学医学院 515041 广东省汕头市)

【摘要】目的:观测大鼠脊神经前根撕脱伤对盆底肌运动神经元的存活及神经元中一氧化氮合酶(NOS)和 N-甲基-D-天冬氨酸型受体(NMDAR)表达的影响。**方法:**取雄性 SD 大鼠 25 只,背部切口显露脊髓,拔断一侧 L6~S2 脊神经前根。动物分为 5 组,分别于术后第 3、7、14、21、28 天,取腰骶段脊髓进行还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH-d)组织化学、中性红复染和 NMDA 受体免疫组织化学染色观察及定量分析。**结果:**术后第 3、7、14、21、28 天,与对侧比较术侧前角运动神经元存活率分别为 96%、85%、50%、35%和 20%;术后第 7d 开始出现 NOS 阳性神经元,其标记率分别为 6%、40%、62%和 41%。与对侧比较,术侧前角运动神经元 NMDA 受体亚单位表达改变,其中 NMDAR₁ 受体亚单位表达明显减少,NMDAR_{2B} 表达显著增高,NMDAR_{2A} 表达无明显变化。**结论:**前根撕脱伤可导致盆底肌运动神经元进行性死亡,NOS 持续表达和 NMDA 受体亚单位的表达变化可能是导致神经元死亡的重要原因。

【关键词】前根撕脱;运动神经元;N-甲基-D-天冬氨酸型受体;大鼠

中图分类号:Q593 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-11-0687-03

Observation of pelvic motoneurons in adult rats following lumbosacral ventral root avulsion/WEI Peiyong, WU Jianzhong, TU Liangxie, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15 (11): 687~689

【Abstract】 Objective: To investigate the survival and NMDA expression of pelvic motoneurons in adult rats following lumbosacral ventral root avulsion. **Method:** 25 adult male Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups, the lumbar laminectomy was performed in adult rats. Under a surgical microscope, the dura mater was opened and L6-S2 ventral roots on the right side were avulsed individually. The animals were allowed to survive for 3, 7, 14, 21, or 28 days postoperatively. The positive neurons were counted after NADPH-diaphorase histochemistry, neutral red counterstaining and NMDA receptor immunohistochemistry. **Result:** After different living periods, the survival rate of motoneurons were 96%, 85%, 50%, 35% and 20% respectively, about 0%, 6%, 40%, 62% and 41% of motoneurons expressed NOS. A decrease in NMDAR₁ immunolabeling and a increase in NMDAR_{2B} immunolabeling ipsilateral to the lesion were observed, but no change was detectable in NMDAR_{2A} immunolabeling. **Conclusion:** Lumbosacral ventral root avulsion progressively deplete pelvic motoneurons. The different expressions of NOS and NMDA receptor subunits may be an important mechanism contributing toward the death of the injured neurons.

【Key words】 Ventral root avulsion; Motoneurons; NMDA receptors; Rat

【Author's address】 Medical College of Shantou University, Shantou, 515041, China

近年来,随着交通事故的频发,由高速冲击所造成的腰骶神经根撕脱伤增多^[1,2],但有关根性撕脱后腰骶部前角运动神经元病理变化的报道尚缺乏。我们通过建立大鼠 L6~S2 前根撕脱伤动物模型,观察脊髓前角运动神经元的存活、一氧化氮合

酶(NOS)表达及N-甲基-D-天冬氨酸型受体(NMDA)亚型的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制作

成年雄性 SD 大鼠 25 只,体重 200~250g,随机分成 5 组,每组 5 只。均行单侧 L6~S2 脊神经

第一作者简介:男(1963-),讲师,研究方向:神经损伤与再生
电话:(0754)8575859 E-mail:wjz_st@sohu.com

前根撕脱术,对侧作为对照。将大鼠用 2%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉,背部切口暴露 L1~L2 右侧椎板,将椎板切除显露硬脊膜,在解剖显微镜下切开硬脊膜。以 L6 的粗大背根作为标志,确定腹侧的 L6、S1 和 S2 前根。用眼科镊沿前根走行方向将其拨断并切去 1cm 以防止纤维再生,用 0/10 号线缝合硬脊膜后,逐层缝合切口,注射长效青霉素 300 万单位。

1.2 观察指标

动物分别于术后第 3、7、14、21 和 28 天,在戊巴比妥钠深麻醉下,经左心室-升主动脉穿心灌注,先用生理盐水(200ml/只)快速灌流,继之以 4%多聚甲醛(500ml/只)灌流固定。取 L6~S2 脊髓节段(取材时伤侧与对照侧划痕标记),30%蔗糖固定过夜(4℃)。恒冷箱切片连续切片,片厚 40μm。每只动物取相邻切片分成 4 组,每组取 5 张切片,分别进行染色观察。

1.2.1 NADPH-d 组织化学染色与中性红复染 切片经 0.1M 磷酸缓冲液漂洗后,放入 37℃孵育液(0.1%NADPH-d+0.025% NBT)孵育 1h。贴片干燥后,用 1%中性红复染,封片。

1.2.2 NMDA 免疫组织化学染色 切片行 NMDAR₁、NMDAR_{2A} 和 NMDAR_{2B} 免疫组织化学反应。一抗稀释度均为 1:100,4℃孵育过夜后,依次进入生物素化羊抗小鼠 IgG 和 SABC 程序,室温下分别孵育 20min,以上各步骤间均以 PBS 冲洗 3 次,DAB 显色。阴性对照用 PBS 替代一抗进行孵育。

1.3 细胞计数与统计学分析

光镜下计数前角运动神经元,以细胞轮廓完整,胞核清晰为标准,计数损伤侧 NADPH-d 阳性神经元与中性红复染神经元。以正常侧神经元的数目为 100%,计算损伤侧神经元存活率。应用 CMAS8 型彩色图像分析仪测定前角 NMDA 免疫反应阳性神经元光密度值,测量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以未损伤侧为自身对照,根据其均值和标准差行 t 检验分析。

2 结果

2.1 中性红复染

中性红复染切片可见,与未损伤侧比较,损伤侧早期前角运动神经元胞体肿胀、胞核偏位(图 1、2,后插页 III),随之出现细胞崩解并伴有活跃的

胶质细胞反应。随着存活时间的延长,术侧前角运动神经元呈现进行性死亡。于术后 3、7、14、21、28 天等不同时间点,术侧前角运动神经元存活率分别为对侧细胞总数的 96%、85%、50%、35%和 20%。

2.2 NADPH-d 染色

未损伤侧脊髓前角无 NADPH-d 染色神经元。术侧前角于伤后 7d 开始出现 NADPH-d 阳性神经元(图 3,后插页 III),随损伤时间的延长,着色细胞数量增加,至伤后 28d 阳性细胞数量回落。于 7、14、21、28d 等不同时间点,NADPH-d 阳性细胞分别占术侧存活细胞总数的 6%、40%、62%和 41%。神经元着色密度随损伤时间不同而变化,早期着色淡,见于胞体;术后 21d 着色重,并可见神经突起明显着色(图 4,后插页 III)。

2.3 NMDA 受体亚单位表达

未损伤侧前角可见 NMDAR₁、NMDAR_{2A} 和 NMDAR_{2B} 免疫反应阳性神经元,其中 NMDAR₁ 和 NMDAR_{2A} 染色密度低,而 NMDAR_{2B} 染色密度较高,着色颗粒均匀分布于胞浆中。前根撕脱导致术侧前角运动神经元 NMDAR₁ 和 NMDAR_{2B} 受体亚单位染色密度改变,其中 NMDAR₁ 染色密度显著下降(图 5、6,后插页 III),NMDAR_{2B} 染色密度明显增高(图 7、8,后插页 III),而 NMDAR_{2A} 染色密度在损伤前后无明显变化。各 NMDA 受体亚单位免疫阳性神经元平均光密度测量结果见表 1。

表 1 对照侧及伤侧不同时间点前角运动神经元 NMDAR 亚单位免疫阳性神经元平均光密度测量结果 ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	NMDAR ₁	NMDAR _{2A}	NMDAR _{2B}
对照侧		0.063±0.009	0.043±0.007	0.079±0.008
伤侧				
3d	5	0.061±0.006	0.040±0.004	0.076±0.007
7d	5	0.044±0.004 ^①	0.044±0.008	0.110±0.010 ^①
14d	5	0.021±0.003 ^②	0.041±0.006	0.133±0.006 ^②
21d	5	0.036±0.004 ^①	0.039±0.005	0.085±0.009 ^①
28d	5	0.060±0.008	0.042±0.009	0.072±0.011

注:与对照侧比较^① $P<0.05$;^② $P<0.01$

3 讨论

脊神经前根撕脱是一种严重的周围神经损伤形式,这种根性撕脱使轴索与神经元胞体近距离断开,导致前角运动神经元较早出现溃变与死亡。支配大鼠盆底肌的运动神经元位于 L6~S2 脊髓前角背外侧核和腹内侧核,与人类 Onuf 核为同

源核群^[1]。有报道指出, Onuf 核运动神经元与支配上、下肢的运动神经元之间存在较大区别, 如其兼有躯体运动和内脏运动双重性质; 在肌萎缩侧索硬化症病变过程中保持相对不易感性; 正常表达 P75 和 GAP-43 等^[2,3]。有研究显示, 大鼠脊神经前根撕脱伤后盆底肌运动神经元的存活率与上、下肢运动神经元的存活率无明显区别^[4-7]。

本研究采用 NADPH-d 组织化学染色证实, 前根撕脱伤可诱导 NOS 在盆底肌运动神经元的表达, 术后 7d 出现 NOS 阳性神经元, 21d 阳性神经元数量及着色密度达最高值, 至术后 28d 阳性细胞数量及着色密度值减低。这种 NOS 阳性神经元的表达变化与前角运动神经元进行性死亡的过程基本一致。提示 NO 在受损前角运动神经元的溃变过程中扮演重要角色。NO 介导谷氨酸兴奋毒性作用, 谷氨酸与 NMDA 受体结合, 触发了阳离子通道的开放, Ca^{2+} 通过 NMDA 通道进入细胞内, 与钙调蛋白结合刺激 NOS 的活性, 产生 NO。如果谷氨酸刺激过度, 则释放的 NO 能导致神经元的死亡^[8]。

NMDA 受体属配体门控的离子通道, 是由不同亚单位 NMDAR_1 和 NMDAR_2 组成的异聚体, 对 Ca^{2+} 有高通透性。 NMDAR_1 为功能亚单位, NMDAR_2 是调节亚单位, 又分为 NMDAR_{2A} 、 NMDAR_{2B} 、 NMDAR_{2C} 和 NMDAR_{2D} 四种, 不同 NMDAR_2 亚单位的参与使 NMDA 受体具有不同的电生理学和药理学特性^[9]。本研究采用免疫组织化学技术证实, 盆底肌运动神经元存在 NMDAR_1 、 NMDAR_{2A} 和 NMDAR_{2B} 三种亚单位的表达, 其中 NMDAR_{2B} 亚单位密度最高。L6~S2 脊神经前根撕脱伤导致盆底肌运动神经元 NMDA 受体亚单位的表达变化, NMDAR_1 亚单位明显减少, NMDAR_{2B} 亚单位显著增高, 而 NMDAR_{2A} 亚单位保持不变。这种改变使得 NMDAR_1 和 NMDAR_{2B} 在 NMDA 受体异聚体中所占比例发生变动, 从而使整个 NMDA 受体的活性发生改变, 形成一个新的特性不

同的受体, 至于新受体的功能意义尚待进一步证实。

综上所述, 前根撕脱伤导致盆底肌运动神经元在较短的时间内发生死亡, NOS 的持续表达和 NMDA 受体亚单位的表达变化, 可能是导致运动神经元死亡的重要原因。提示临床较早采用神经元保护措施, 将有利于马尾神经综合征患者受损功能的修复。

4 参考文献

1. Schroder HD. Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat [J]. J Comp Neurol, 1980, 192(3): 567-587.
2. Okamoto K, Hirai S, Ishiguro K, et al. Light and electro-microscopic and immunohistochemical observations of the Onuf's nucleus of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Acta Neuropathol, 1991, 81(6): 610-614.
3. Hoang TX, Nieto JH, Tillakaratne NJ, et al. Autonomic and motor neuron death is progressive and parallel in a lumbosacral ventral root avulsion model of cauda equina injury [J]. J Comp Neurol, 2003, 467(4): 477-486.
4. 史建刚, 贾连顺, 李家顺, 等. 实验性马尾神经综合征家兔骶髓前角细胞凋亡的观察 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(1): 83-86.
5. 张建一, 柴红, 吴武田. 大鼠臂丛前根撕脱延期再植回对运动神经元存活的作用 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2003, 21(4): 362-364.
6. Wu W. Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry [J]. Exp Neurol, 1993, 120(2): 153-159.
7. Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, et al. Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons [J]. J Comp Neurol, 1994, 342(1): 35-44.
8. Niebroj DI, Janik P. Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [J]. Acta Neurol Scand, 1999, 100(1): 6-11.
9. Dingledine R, Borges K, Bowie D, et al. The glutamate receptor ion channels [J]. Pharmacol Rev, 1999, 51(1): 7-61.

(收稿日期: 2005-04-20 修回日期: 2005-07-25)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 彭向峰)

《中国脊柱脊髓杂志》2006 年正文增加至 80 页。

载文更多, 信息量更大, 刊出周期更短。

欢迎投稿, 欢迎订阅!

《中国脊柱脊髓杂志》编辑部