

基础研究

甲基强的松龙对兔脊髓空洞前状态
神经细胞损伤的作用孙国柱¹, 扈琳², 王荣英², 张庆俊³

(1 河北医科大学第二医院神经外科; 2 急诊科 050000 石家庄市; 3 北京大学人民医院神经外科 100044 北京市)

【摘要】目的:探讨甲基强的松龙(MP)对实验性脊髓空洞前状态神经细胞损伤的作用。**方法:**新西兰兔 112 只, 随机分为对照组和 MP 干预组, 每组 56 只, 枕大池穿刺注入 Kaolin 制作脊髓空洞模型, 其中 MP 干预组术后予以大剂量 MP 干预(第 1~3 天每天 30mg/kg 耳缘静脉缓慢注射, 第 4~7 天改为每天 10mg/kg), 对照组术后不给药。术后 1d、3d、7d、2 周、3 周、6 周、9 周行神经功能评分(Tarlov 评分), 并分别于相应时间点处死 8 只动物取材, 应用光镜、电镜以及原位末端标记法(TUNEL 法)对所取上颈髓标本分别行病理形态学、超微结构及神经细胞凋亡检查。**结果:**与对照组比较, MP 干预组动物 3d 后 Tarlov 评分明显较高($P<0.05$), 上颈髓水肿程度较轻, 高峰延迟, 3d 后脊髓含水量显著降低($P<0.05$), 同时神经细胞凋亡率显著下降($P<0.05$)。空洞形成率 MP 干预组为 37.5%, 对照组为 87.5%, 两组比较存在显著性差异($P<0.05$)。**结论:**应用甲基强的松龙干预对脊髓空洞前状态神经细胞损伤有明显的保护作用, 有助于减少脊髓空洞形成。

【关键词】甲基强的松龙; 脊髓空洞前状态; 凋亡; 组织学

中图分类号: R744.4, R977.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-11-0865-04

The protective effect of methylprednisolone on nerve cells at presyrinx state in rabbits/SUN Guozhu, HU Lin, WANG Rongying, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal, 2007, 17(11):865-868

【Abstract】Objective: To investigate the neuroprotective effect of methylprednisolone (MP) on nerve cells at presyrinx state. **Method:** 112 Newland rabbits were randomly divided into two groups evenly: Control group and MP group. After the experimental models of rabbits were established by intra-cisternal injection of kaolin, high-dose methylprednisolone (30mg/kg) was administered in animals in MP group, while animals in control group received nothing. Tarlov's motor scales were performed on all animals, then eight animals were sacrificed at 1d, 3d, 7d, 2w, 3w, 6w, 9w after operation, and the pathological and ultrastructural changes and apoptosis of upper cervical cord at each timepoint were sequentially studied by light and electronic microscopy and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. **Result:** Compared with animals of Control group, the animals in MP group received higher Tarlov's score after 3 days, the pathological changes and water content of upper cervical cord were significantly improved and spinal cord edemous peak was postponed to the 14th day in those of MP group ($P<0.05$). The number of apoptotic neuron cells in upper cervical cord decreased obviously, among which the apoptotic cells at the 7th day ($14.21\pm3.72\%$) and 14th day ($9.79\pm2.31\%$) were significantly lower, even cut down more than 60%. Especially what was worth mentioning was that the rate of syringomyelia decreased to 37.5% in the MP group compared with 87.5% in control group, with the decreasing width reaching to 50%. Statistics results showed that there was significant deviation between two groups ($P<0.05$). **Conclusion:** There is a neuroprotective effect of methylprednisolone on neuron cells at presyrinx state in rabbits, which is helpful to inhibit the syrinx formation.

【Key words】 Methylprednisolone; Presyrinx state; Apoptosis; Histology

【Author's address】 Department of Neurosurgery, the 2nd Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000, China

第一作者简介: 男(1969-), 副主任医师, 医学博士, 研究方向: 脊髓空洞症发病机制的基础和临床诊治研究

电话: (0311) 66002972 E-mail: sungzh705@sohu.com

通讯作者: 张庆俊

脊髓空洞症是一种常见的脊髓退行性病变, 以髓内有空洞形成及周围胶质增生为特征。由于致病原因复杂, 至今尚未确立有效的防治方法。

1999年 Fischbein 通过对 5 例非外伤性颈髓型脊髓病变患者手术干预前后 MRI 观察发现,上颈髓 T1WI 呈略低信号、T2WI 高信号,病变经减压术后有 4 例异常信号消失且无脊髓空洞形成,只有 1 例晚期才出现脊髓空洞,由此提出了脊髓空洞前状态(presyrinx state)这一概念^[1]。对脊髓空洞前状态的及时干预对预防空洞形成至关重要。文献报道缺血、水肿所致的神经细胞损伤在脊髓空洞前状态形成中起重要作用^[2]。而甲基强的松龙(MP)以其独特的有效减轻水肿、改善微循环和抗脂质过氧化等多方面综合作用,广泛应用于急性脊髓损伤的救治,并得到了美国 FDA 的许可。本研究拟观察大剂量 MP 对兔脊髓空洞前状态神经细胞凋亡及神经功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

将 112 只体重 1.5~2.0kg 的健康新西兰白兔(雌雄不限)随机分为 2 组,对照组和 MP 干预组各 56 只,按术后 1d、3d、7d、2 周、3 周、6 周、9 周不同时间点每组又随机分 7 个亚组,每亚组 8 只。

1.2 动物模型制作

在氯胺酮(30mg/kg)静脉麻醉下,动物取俯卧颌低位,颈后部备皮消毒。按文献方法^[3],用 4^{1/2} 号针头行经皮枕大池穿刺术,缓慢抽取无色透明脑脊液 0.6ml,对照组动物缓慢注入 37℃、25% Kaolin 悬浊液 0.6ml;MP 干预组于枕大池注射 Kaolin 后 1~3d 从兔耳缘静脉缓慢注入 10ml MP (30mg/kg),4~7d 改为 10mg/kg 静脉注射。模型成功标志:枕大池穿刺抽出无色、透明脑脊液,Kaolin 顺利注入枕大池且动物出现一过性四肢瘫。如枕大池穿刺抽出血性脑脊液,则该动物弃去不用,另按随机原则补充新动物。麻醉清醒后 2h,动物分笼饲养,连续 7d 肌肉注射抗菌素预防感染,必要时给予营养支持。

1.3 术后神经功能判定

术后每日按改良 Tarlov 评分法对动物进行行为学检查,标准如下:0 分,四肢无自主活动;1 分,仅限于髌膝关节的非反射性运动;2 分,髌膝踝 3 个主要关节的活动;3 分,能主动支持体重和不协调步态,或偶尔出现协调步态;4 分,前后肢协调的步态,行走时有趾间关节的运动;5 分,正常步态。

1.4 标本的制作和采集

对照组和 MP 干预组各亚组动物于设定时间点、在氯胺酮过量麻醉下,断头处死,经后正中入路,咬除棘突和椎弓根,取出上颈髓长约 30mm,其中 10mm 标本用于测定脊髓含水量,剩余上颈髓组织用于组织学观察和神经细胞凋亡检测。

1.5 脊髓含水量测定

截取的 10mm 颈髓用滤纸吸除表面水分,剔除 Kaolin 沉积,置电子分析天平(分度值 0.0001g)称取湿重(W),经 110℃ 恒温烤箱烘烤 24h 后称取干重(D)。脊髓含水量(%)=(W-D)/W×100%。

1.6 标本制作和组织学观察

经固定的标本常规脱水、透明、石蜡包埋、4μm 连续切片用于 HE 染色观察;再取部分标本制作成 1mm³ 大小的组织块,2%戊二醛、1%四氧钼酸再固定,618 环氧树脂包埋、超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅染色,H-7500 透射电镜下观察(每个标本取 2 张切片分别于灰质和白质各观察 5 个视野)。加速电压 75kV。

1.7 TUNEL 法检测凋亡细胞

石蜡切片常规脱蜡至水;加三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(TBS)1:100 稀释的蛋白酶 K (Protenase K)37℃消化 15min;TUNEL 孵育液 4℃过夜;加封闭液室温 30min;用封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体 37℃ 30min;将用封闭液 1:100 稀释的 SABC 加至切片,37℃反应 30min;三氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染同时设立阳性对照及阴性对照片。细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞,即凋亡细胞。高倍视野(×400)下计算凋亡指数(apoptotic index, AI),即每个时间点每个标本选 3 张切片,每张片选取 5 个阳性细胞数最多的高倍视野,按 AI=(凋亡细胞核数/总细胞核数)×100%计算出平均阳性细胞百分数。

1.8 统计学分析

各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 专用统计学软件对两组间的 Tarlov 评分、上颈髓含水量及神经细胞凋亡指数进行 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 术后动物神经功能改变

两组动物术后均出现一过性四肢瘫。对照组动物于术后第 3 天出现进食减少、精神萎靡,第 7 天出现神经功能障碍,包括反应迟钝、四肢无力、行走不稳,甚至瘫痪,并随着时间的延长而逐渐加重;MP 干预组于术后 7d 出现进食减少、精神萎靡,第 10 天出现神经功能障碍,但程度明显减轻,术后 6 周神经功能评分开始好转。术后 3d 起 MP 干预组与对照组比较均存在显著性差异($P<0.05$,表 1)。

2.2 脊髓含水量变化

MP 干预组动物颈髓含水量与对照组动物相比,除第 1 天无明显差异外,其余各个时间点都有明显降低($P<0.05$,表 1)。

2.3 光镜观察结果

术后第 1 天,两组动物神经细胞轮廓正常,核及核仁清楚。术后第 3 天,对照组动物神经细胞出现轻度肿胀,血管周围间隙增宽。而 MP 干预组则未见上述现象,至术后第 7 天才出现细胞、血管周围间隙增宽的轻度水肿表现(图 1~4,后插页 III),且高峰期于术后第 2 周时出现,即细胞周围空隙较前增大,核膜、核仁稍显模糊,神经元胞体内尼氏体减少或消失,胶质细胞增生,中央管饱满,管周组织疏松,但水肿程度较对照组轻。自第 3 周开始对照组动物尽管上颈髓水肿程度减轻,但 6 周和 9 周时 16 只动物中 14 只脊髓后角、后索部位小空泡融合形成大的单发或多发椭圆或不规则形空洞,呈进行性扩大且有一定的张力,空洞形成率为 87.5%;而 MP 干预组至 9 周时只有 6 只动物形成上颈髓髓内空洞,空洞形成率为 37.5%,两组动物空洞形成率存在显著差异($P<0.05$)。

2.4 电镜观察

对照组动物于术后 1d 出现神经细胞稍有水肿;术后 3d 神经细胞水肿加重,胞浆内线粒体肿

胀,嵴消失,内质网扩张,核糖体减少;7d 出现线粒体肿胀、崩解,尼氏体破坏、表面颗粒减少,血管周围间隙增宽等;2 周及 3 周时可见上述病变加重,并且出现髓鞘板层状结构松解、断裂,呈脱髓鞘改变,甚至轴索破坏;6 周以后,可见脱髓鞘变性加重,有的留下轴索,有的轴索消失,只有变性的髓鞘,甚至出现新髓鞘形成现象。MP 干预组至 7d 时才出现神经细胞水肿,3 周以后线粒体、尼氏体损伤、脱髓鞘改变和轴索破坏均明显轻于对照组(图 5,后插页 IV)。

2.5 细胞凋亡检测

对照组动物术后各时间点,神经元和神经胶质细胞均有凋亡现象。典型的凋亡细胞表现为染色质凝集、边集化,聚集于核膜下(图 6,后插页 IV)。神经细胞凋亡于术后第 1 天出现,7~14d 达高峰,以后逐渐降低,到 9 周时仍可见到凋亡发生。MP 干预组的凋亡也出现上述规律,但各时间点凋亡指数(AI)明显低于对照组($P<0.05$,表 1)。

3 讨论

脊髓空洞前状态涵盖了脊髓空洞形成的初始病理变化,组织学上以脊髓缺血、水肿改变为特征,MRI 也发现上颈髓 T1WI 上呈略低信号、T2WI 上呈高信号,不能为液体衰减反转恢复(fluid attenuated inversion recovery,FLAIR)序列所抑制^[1-3]。Levy 等^[4]予以手术行椎管减压干预后可阻断空洞形成,证明了这种病理变化可以被逆转。近年来,广泛应用于临床救治脊髓损伤的 MP 对这种早期病理变化的作用如何未见报道,我们对其进行了探索。

MP 作为一种人工合成的糖皮质激素,具有半衰期长、穿透血脑屏障和细胞膜的能力高、盐皮质激素作用低的优点,除可以减轻脊髓损伤后继

表 1 两组动物术后不同时间点 Tarlov 评分、上颈髓含水量及凋亡指数测量结果 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

	Tarlov 评分(分)		上颈髓含水量(%)		凋亡指数(%)	
	对照组	MP 干预组	对照组	MP 干预组	对照组	MP 干预组
术后 1d	5.00±0.00	5.00±0.00	68.35±0.70	67.41±0.90	14.86±1.74	3.48±1.06 ^②
术后 3d	4.50±0.54	5.00±0.00 ^①	72.7±0.88	68.66±0.37 ^①	23.58±2.23	7.94±1.84 ^②
术后 7d	3.75±0.71	4.38±0.74 ^①	72.92±0.86	69.00±0.70 ^①	37.75±4.36	14.21±3.72 ^②
术后 2 周	2.25±0.89	3.38±0.52 ^①	70.03±0.77	69.08±0.28 ^①	26.25±2.64	9.79±2.31 ^②
术后 3 周	2.20±0.43	3.41±0.71 ^①	69.93±0.37	68.64±0.48 ^①	22.95±3.72	8.11±0.96 ^②
术后 6 周	2.18±0.45	3.50±0.39 ^①	69.74±0.82	67.89±0.93 ^①	18.31±4.14	6.46±3.08 ^②
术后 9 周	2.00±0.37	4.25±0.67 ^①	69.12±0.76	67.36±0.42 ^①	9.22±5.23	3.20±1.13 ^②

注:与对照组相应时间点比较^① $P<0.05$,^② $P<0.01$

发性水肿外,尚有改善微循环、抑制脂质过氧化反应、减轻钙内流、维持神经元兴奋性等作用。脊髓缺血出现微循环障碍而发生水肿同时,还释放大量的花生四烯酸及其产物前列腺素、白三烯、血栓素等有害因子,对局部组织造成继发性损伤,产生严重的炎症反应^[5]。Hall 等^[6]研究证实脊髓损伤后血流量下降 37.3%,应用 MP 后血流量明显增加。Saunders 等^[7]和 Gabler^[8]的实验发现 MP 进入体内后可和糖皮质激素受体结合,促使调脂蛋白的释放,抑制磷脂酶 A2 的活性,减少花生四烯酸及其产物的生成和释放,从而减轻组织损伤。此外,Saville 等^[9]研究发现 MP 能够抑制中性粒细胞和巨噬细胞在损伤部位聚集,减轻继发性炎症反应。

本研究发现,Kaolin 枕大池注射后发生了明显的脊髓缺血、水肿,并观察到线粒体肿胀崩解、尼氏体破坏及其表面颗粒减少、血管周围间隙增宽、脱髓鞘改变甚至轴索破坏等变化,到晚期形成上颈髓髓内空洞。与之相对应动物出现了越来越显著的神经功能障碍。应用 MP 干预后,组织学观察发现形成脊髓水肿时间延迟,程度也显著减轻;脊髓含水量也较对照组动物明显减轻;动物的神经功能评分也有显著提高,更为重要的是空洞形成率降低,提示 MP 能够缓解、减轻脊髓水肿乃至逆转空洞前状态的病理变化,改善动物神经症状。原因在于,尽管 Kaolin 性肉芽肿广泛分布于上颈髓蛛网膜下腔,形成无菌性蛛网膜炎,对脊髓前后动脉、静脉产生直接压迫,引起颈髓缺血、水肿。由于 MP 的减轻脊髓水肿、改善微循环、抑制脂质过氧化反应、减轻钙内流、维持神经元兴奋性等作用,使得 MP 干预后上颈髓缺血、水肿病理变化减轻,空洞形成率下降。

另一个更为直接的证据是,MP 抑制了脊髓空洞前状态出现的神经细胞凋亡。细胞凋亡是在基因控制下细胞自主的有序的消亡过程,神经元的凋亡对脊髓功能的影响更为直接。我们以前的研究^[10]发现,脊髓空洞前状态出现了神经元凋亡,术后第 1 天出现,7~14d 达高峰,以后逐渐降低,3 周时仍可见到凋亡发生。本研究应用 MP 干预后,凋亡指数显著降低,显示 MP 可阻止或减轻神经细胞凋亡。杨建东^[11]也认为 MP 对急性脊髓损伤

的神经细胞凋亡具有抑制作用。表明 MP 干预可减少神经细胞凋亡的发生,从而改善脊髓空洞前状态神经功能。这可能是 MP 具有神经保护作用的原因之一,但其抑制细胞凋亡的途径和机制有待进一步研究。

4 参考文献

1. Fischbein NJ, Dillon WP, Cobbs C, et al. The "presyrinx" state: a reversible myelopathic that may precede syringomyelia[J]. Am J Neuroradiol, 1999, 20(1): 7-20.
2. 张庆俊, 孙国柱, 张更申. 实验性家兔脊髓空洞症发病机制研究[J]. 中华神经外科杂志, 2000, 16(6): 364-366.
3. 孙国柱, 张庆俊, 张更申. 实验性脊髓空洞症的 MRI 和病理学演变及其意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 12(2): 116-119.
4. Levy EI, Heiss JD, Kent MS. Spinal cord swelling preceding syrinx development: case report [J]. J Neurosurg, 2000, 92 (Suppl 1): 93-97.
5. Hirose K, Okajima K, Uchiba M, et al. Antithrombin reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by attenuating inflammatory responses[J]. Thromb Haemost, 2004, 91 (1): 162-170.
6. Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis[J]. J Neurosurg, 1984, 61(1): 124-130.
7. Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, et al. Effects of methylprednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue[J]. J Neurochem, 1987, 49(1): 24-31.
8. Gabler C. Clinical experiences and result of high dosage methylprednisolone therapy in spinal cord trauma[J]. Spine, 1995, 21(1): 20-29.
9. Saville LR, Pospisil CH, Mawhinney LA, et al. A monoclonal antibody to CD11d reduces the inflammatory infiltrate into the injured spinal cord: a potential neuroprotective treatment[J]. J Neuroimmunol, 2004, 156(1-2): 42-57.
10. 孙国柱, 张庆俊, 张更申, 等. NF- κ B 和 I κ B 对兔脊髓空洞前状态神经元凋亡的影响[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(4): 415-419.
11. 杨建东, 李家顺, 贾连顺, 等. 大剂量甲基强的松龙对大鼠急性脊髓损伤预防保护作用的研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(1): 46-48.

(收稿日期: 2006-10-20 修回日期: 2007-10-09)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)