

基础研究

脊神经前根吻合重建脊髓损伤大鼠
神经反射通路的形态学研究

钟贵彬, 刘祖德, 李 伟, 王涵韬, 宋 超, 倪鹏文, 乔志光

(上海交通大学医学院附属仁济医院骨科 200127 上海市)

【摘要】目的:观察利用脊神经前根吻合重建脊髓损伤大鼠股四头肌神经反射通路的形态学情况。**方法:**取 4 周龄 SD 大鼠 20 只, 体重 120~150g; 将左侧 L1 神经前根与支配股四头肌的优势脊神经(L3)前根通过尾神经桥接吻合, 右侧不作任何处理。神经吻合术后 6 个月, 手术分离神经吻合段。将能分离神经吻合段的大鼠在 L2 脊髓水平左半侧切断脊髓制备大鼠脊髓半切损伤模型, 饲养 4 周后左侧股神经注射 Trueblue(TB)染色剂进行逆行荧光染色, 观察 L1 脊髓前角是否有 TB 标记的阳性细胞; 同时解剖分离神经吻合段进行 HE 染色及电镜观察。**结果:**饲养过程中大鼠死亡 4 只。成功分离出 10 只大鼠的神经吻合段。吻合段神经肉眼观察光滑圆润, 无萎缩; HE 染色光镜下吻合段神经纤维排列整齐, 走行一致, 为典型的有髓神经纤维结构; 电镜下吻合段神经纤维具有明显神经轴突特征。TB 荧光逆行示踪左侧 L1 脊髓前角可见荧光标记阳性的神经元, 而右侧无标记阳性细胞。**结论:**L1 与 L3 脊神经前根吻合可成功建立 L2 脊髓半切损伤大鼠的股四头肌脊髓旁神经反射通路。

【关键词】脊髓损伤; 神经吻合; 脊神经根; 形态学; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.02.12

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-02-0138-05

Morphological study on reconstruction of nervous reflex pathway with spinal ventral root anastomoses after spinal cord injury/ZHONG Guibin, LIU Zude, LI Wei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(2): 138~141

【Abstract】 Objective: To observe the neural morphology after reconstruction of nervous reflex pathway of quadriceps femoris through spinal ventral root anastomoses after spinal cord injury in rats. **Method:** Twenty 4-week-old SD rats of 120g to 150g were collected. The left L1 ventral root and L3 ventral root, which mainly dominate quadriceps femoris, were anastomosed end-to-end by coccygeal nerve, while the right side was kept intact. 6 months later, neural anastomosis was extracted from experimental rats. The spinal cord at the L2 level was hemitranssected to establish the hemitranssection model in experimental rats, which could be successfully dissected. After 4 weeks of breeding, Trueblue (TB) fluorescence reagent was injected into the left femoral nerve and the TB fluorescence marked neural cells was observed in L1 ventral horn. The nerve anastomosis was stained by Hematoxylin and Eosin (HE) staining kit and observed through electronic microscopic. **Result:** Four rats deceased during breeding, and the neural anastomosis could be successfully extracted from the 10 experimental rats. The neural anastomosis showed round, smooth and non-atrophic under naked eye. Under microscope the new regenerating neural fiber of anastomosis lined in sequence and uniformity by HE staining, which was the classic medullated nerve fibers. The anastomoses fiber presented with the characteristic of common neural axon. The TB fluorescence marked neural cells appeared on the left side of L1 ventral horn and something like somatic motor nerve cell morphologically, while no TB marked cell appeared on the right side. **Conclusion:** New paraspinal pathway of quadriceps femoris can be established by L1-L3 spinal ventral roots anastomosis after spinal cord injury at L2 level hemitranssection in rats.

【Key words】 Spinal cord injury; Nerve anastomosis; Spinal ventral root; Morphology; Rat

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30801157)

第一作者简介: 男(1974-), 博士研究生, 副主任医师, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (021) 58452345-3706 E-mail: zhonggb2004@yahoo.com.cn

【Author's address】 Department of Orthopedic Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200127, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)导致的肢体运动功能障碍对患者的生活质量影响大^[1,2],因此如何治疗和改善 SCI 后肢体运动功能,一直是神经康复学科的研究热点。有学者^[3-5]利用 SCI 平面以上的正常神经根与支配膀胱的骶神经根吻合,重建了膀胱排尿功能。根据这一结论,我们设想利用 SCI 平面以上正常的脊神经前根与支配股四头肌的优势腰神经前根吻合,建立股四头肌脊髓旁神经通路,并通过再生神经的光、电镜观察及荧光逆行示踪方法,进一步证明该反射通路的完整性,为其临床应用提供可靠的形态学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 20 只(由中国科学院上海实验动物中心提供),3~4 周龄,体重 120~150g。

1.2 主要实验仪器和药品

0.2% Trueblue(TB)荧光染色剂(美国 Sigma 公司提供:T5891-1MG 0.28K/618)。戊巴比妥钠粉剂,由复旦大学医学院手外科实验室提供,使用前用生理盐水配制成 1%的戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉用。手术显微镜,Leica DC500 图像分析系统,JEM-1200EX 透射电镜。

1.3 动物模型建立

用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,采用背部正中切口,依次解剖分离 L1~L5 腰神经根。分别电刺激 L1~L5 神经前根,刺激强度为 2.5mA、刺激时间为 0.2ms,频率 1Hz,记录股四头肌肌电图,进一步确定 L3 神经根对股四头肌的优势支配作用,而 L1 脊神经根不支配股四头肌。分别于左侧 L1 脊神经节近端切断 L1 前根,远离左侧 L3 脊神经节切断 L3 前根,分离一段长度约 2cm 的尾神经,移植吻合于 L1 与 L3 前根之间(图 1)。右侧不作任何处理。伤口愈合良好后,送实验动物中心饲养。

1.4 TB 荧光逆行示踪

动物饲养 6 个月后,经原切口入路,解剖分离移植的神经吻合段。将能分离神经吻合段的大鼠切除 L1 至 L3 椎板,显露脊髓,于 L2 脊髓水平节段用锐利尖刀半侧切断左侧脊髓,制成脊髓半切

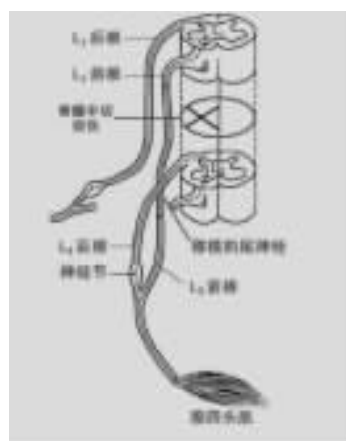


图 1 L1-L3 脊神经前根吻合示意图

损伤模型。饲养 4 周后,解剖分离出左侧股神经,用微量注射器于股神经膜内注入 TB 荧光染色剂 40 μ l,留针 1min,饲养 4d 后同前麻醉,手术打开胸腔,将灌注针头自左心室插入升主动脉,先以 50~300ml 生理盐水快速冲洗血管,5min 后在室温下以含 1%多聚甲醛和 1.25%戊二醛的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液灌注,前半量快,后半量慢,控制在 0.5h 内灌注完。根据解剖定位,小心切除 T11~S1 椎板,切开硬膜囊,暴露脊髓,在手术显微镜($\times 10$)下横行切取 T13~L4 节段脊髓。用上述固定液固定 4~6h 后,浸入 4 $^{\circ}$ C 含 10%蔗糖的 0.2M 磷酸盐缓冲液中过夜,待组织块完全下沉后行冰冻连续切片,片厚 40 μ m。用 Leica DC500 荧光显微镜观察 L1 脊髓前角有无 TB 标记的阳性细胞(阳性细胞被染成高亮的深蓝色)。

1.5 吻合脊神经的组织学观察

每只大鼠在取出脊髓标本后,显露 L1 与 L3 脊神经前根的神经吻合段,切取神经吻合处长约 1cm 神经,置于 10%甲醛溶液中固定、石蜡包埋后,分成两段(各 0.5cm 长),分别沿神经作纵形切片和横切片,片厚 40 μ m,常规 HE 染色,观察神经生长情况。另取长约 0.5cm 的神经吻合段用 2.5%戊二醛和 1%锇酸双重固定处理后,用 JEM-1200EX 透射电镜进行观察。

2 结果

实验动物在饲养过程中因各种原因死亡 4

只。10 只大鼠成功分离出神经吻合段。L2 脊髓半切损伤侧(左侧)股神经注射 TB 荧光染色剂存活 4d 后,大鼠经灌注固定后取脊髓标本进行冰冻切片,LeicaDC500 荧光显微镜低倍镜下可见 L1 左侧脊髓前角 TB 荧光标记阳性的神经元,集中分布在脊髓前角(图 2);在高倍镜下可清楚见到胞浆呈高亮的深蓝色,荧光染色的细胞核,细胞呈多角形,有多个突起,排列成群(图 3)。右侧未见 TB 标记的阳性细胞(图 2)。

肉眼可见脊神经吻合段光滑圆润,无萎缩,色泽新鲜,无膨大的神经瘤及瘢痕形成(图 4)。神经吻合段纵截面切片 HE 染色光镜下显示再生的神经纤维排列整齐,走行一致(图 5);横截面切片 HE 染色光镜下显示再生的神经纤维呈现典型的有髓神经纤维结构,即周围为髓鞘,中间为神经轴突(图 6)。在透射电镜下观察,可见脊神经吻合段神经轴浆内含有线粒体、大量清亮的突触小泡(图 7),其形态与结构类似于正常脊神经超微结构。

3 讨论

解决 SCI 后的中枢神经再生问题以及再生纤

维的功能重建是医学界普遍关注并广泛研究的难题。目前对 SCI 研究主要包括神经组织移植如神经干细胞移植、嗅鞘细胞移植及骨髓间充质干细胞移植;基因治疗如腺病毒介导脑源性神经生长因子(BDNF)、心肌营养素(CMN)基因转移等,但这些方法目前均处于实验研究阶段,难以在临床上得以开展^[6-9]。

许多学者提出并开展了利用周围神经转位移植重建 SCI 后瘫痪肢体功能的研究。1979 年 Beltrán 等^[10]取大鼠一段周围神经,上端吻合于延髓,下端经皮下吻合于下胸脊髓中,半年后在移植神经中段见到有上行和下行神经纤维通过,表明周围神经移植修复 SCI 的可能。1984 年 Wilson^[11]和 1986 年 Wardrop 等^[12]再次证实游离周围神经移植在修复脊髓中的作用,但由于长入移植神经中神经元轴突的数目太少,无法重建肢体功能。有学者利用 SCI 平面以上正常的肋间神经与支配损伤平面以下靶器官的神经吻合,建立脊髓旁神经反射通路,从而可以通过刺激肋间神经,经脊髓低级反射,产生神经冲动到达靶器官,使原已失神经支配的靶器官产生功能^[13-15]。但因肋间神经是混

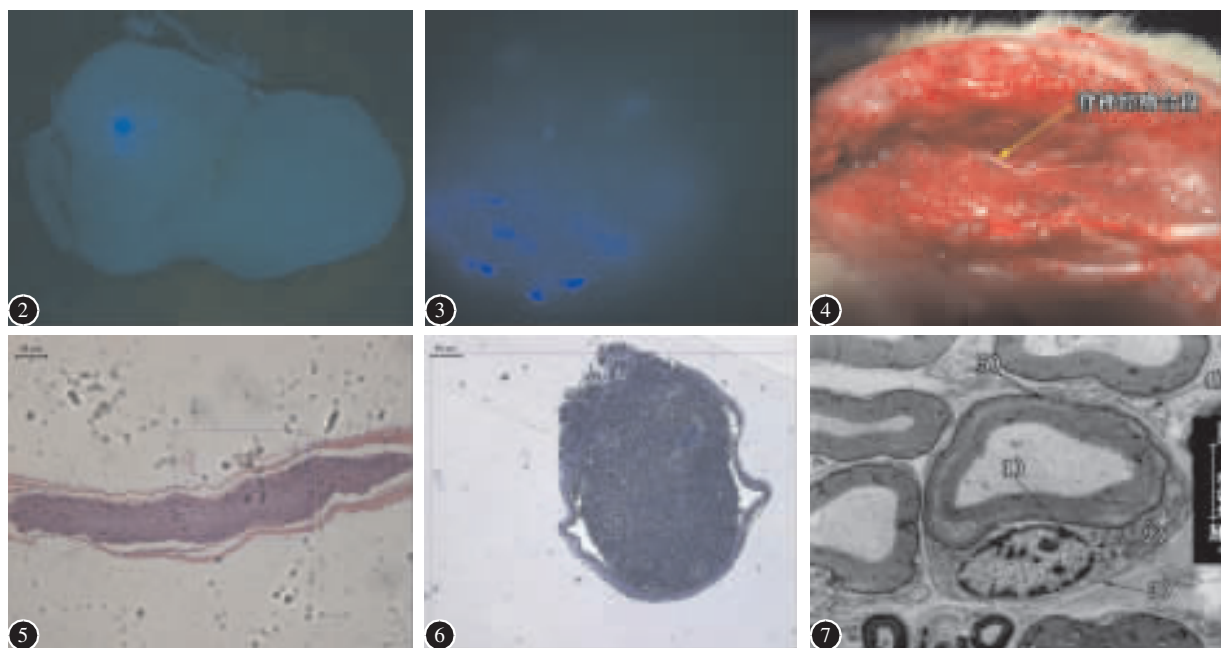


图 2 荧光显微镜下见 L1 左侧脊髓前角 Trueblue(TB)荧光标记阳性(细胞被染成蓝色)的神经元;而右侧未见 TB 标记的阳性细胞($\times 40$) 图 3 L1 左侧脊髓前角见 TB 荧光标记阳性(胞浆呈高亮的深蓝色,细胞核呈蓝色,细胞呈多角型,有多个突起)的神经元($\times 100$) 图 4 大体观察脊神经吻合段光滑圆润,无萎缩,色泽新鲜,无膨大的神经瘤及瘢痕形成 图 5 脊神经吻合段神经纤维纵切面示再生的神经纤维排列整齐,走行一致(HE 染色 $\times 20$) 图 6 脊神经吻合段神经纤维横切面示再生的神经纤维呈现典型的有髓神经纤维结构,即周围为髓鞘,中间为神经轴突(HE 染色 $\times 20$) 图 7 透射电镜下脊神经吻合段神经纤维终末的超微结构正常($\times 65000$):1)线粒体;2)突触小泡;3)神经末梢轴膜;4)胶原;5)髓鞘

合神经,包含运动和感觉神经纤维,且其中的运动神经纤维数和感觉神经纤维数相差悬殊,如肋间神经与腰神经吻合,其运动神经纤维可能与感觉神经纤维交叉生长,即使在神经连续性上获得生长延续,但对功能改善的作用尚不能肯定。有学者^[1-3]提出并开展利用 SCI 平面以上正常的脊神经前根与支配膀胱的骶神经前根吻合,重建膀胱的人工反射弧,从而改善了 SCI 患者的排尿功能。因此根据这一理论,我们提出利用 SCI 平面以上正常脊神经前根,通过神经移植吻合至优势支配股四头肌的脊神经前根,从而重建了股四头肌的脊髓旁神经通路,该神经通路是运动神经纤维之间的吻合,能获得较为单一的运动神经支配,避免了运动和感觉神经交叉吻合的缺点。

本研究根据大鼠股四头肌的神经支配特点,同时在神经电生理检测的基础上,发现股四头肌的支配神经包括 L2~L5 脊神经根,其中优势支配神经为 L3 脊神经根,而 L1 脊神经根不支配股四头肌,因此我们将 L1 脊神经前根与 L3 脊神经前根吻合,建立股四头肌的脊髓旁神经通路。我们对饲养 6 个月后的实验鼠脊神经吻合段进行 HE 染色和光电镜观察,可见该吻合神经段再生的神经纤维排列整齐,走行一致;脊神经吻合段神经轴浆内含有线粒体和大量清亮的突触小泡,其形态与结构类似于正常脊神经超微结构。同时我们通过对成功建立脊髓旁神经通路的实验大鼠制成 L2 水平脊髓半切模型后,在脊髓半切侧的股神经注射 TB 试剂进行荧光逆行示踪研究,由于 TB 染色剂逆行至脊髓的时间约 4d 左右,故注射 TB 染色剂 4d 后再行灌注固定大鼠,以确保 TB 染色剂能逆行至相应的脊髓节段。根据本研究设计,如果 L1 与 L3 脊神经前根吻合后能成功建立股四头肌的脊髓旁神经通路,则 TB 染色剂应该沿股神经逆行经吻合神经口到达 L1 脊髓前角。本研究结果显示,在 L1 脊髓前角可见 TB 标记阳性的神经元。从形态学上进一步证明了该脊髓旁神经通路已成功建立,为重建 SCI 患者下肢运动功能的临床应用提供了形态学方面的理论基础。

4 参考文献

1. Post M, Noreau L. Quality of life after spinal cord injury[J]. *Neurol Phys Ther*, 2005, 29(3):139-146.
2. Ku JH. Health-related quality of life in patients with spinal cord injury: review of the short form 36-health questionnaire survey[J]. *Yonsei Med*, 2007, 48(3):360-370.
3. Lin H, Hou CL, Zhong G, et al. Reconstruction of reflex pathways to the atonic bladder after conus medullaris injury: preliminary clinical results[J]. *Microsurgery*, 2008, 28(6):429-435.
4. 钟贵彬, 侯春林, 王诗波, 等. 人工反射弧重建治疗脊髓损伤后弛缓性膀胱[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2007, 17(10):781-784.
5. 徐瑞生, 侯春林, 张世民, 等. 人工反射弧重建膀胱功能动物模型的建立[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2002, 12(2):102-104.
6. Garbossa D, Fontanella M, Fronda C, et al. New strategies for repairing the injured spinal cord: the role of stem cells [J]. *Neurol Res*, 2006, 28(5):500-504.
7. Ibrahim A, Li Y, Li D, et al. Olfactory ensheathing cells: ripples of an incoming tide[J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5(5):453-457.
8. Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats[J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(1):17-31.
9. Oudega M, Xu XM. Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord[J]. *Neurotrauma*, 2006, 23(3-4):453-467.
10. Beltrán R, Aguayo H, Donayre F. A function: a model[J]. *ALAF*, 1979, 14(1):41-52.
11. Wilson DH. Peripheral nerve implants in the spinal cord in experimental animal[J]. *Paraplegia*, 1984, 22(4):230-237.
12. Wardrop J, Wilson DH. Peripheral nerve grafting in spinal cord, a histological and electrophysiological study[J]. *Paraplegia*, 1986, 24(6):370-378.
13. Dai KR, Yu CT, Wu RS, et al. Intercostal-lumbar-spinal nerve anastomoses for cord transection: a preliminary investigation [J]. *Reconstr Microsurg*, 1985, 1(3):223-226.
14. Liu S, Damhieu P, Devanze P, et al. Efficient reinnervation of hindlimb muscles by thoracic motor neurons after nerve cross-anastomosis in rats[J]. *Neurosurg*, 2003, 99(5):879-885.
15. Vialle R, Harding I, Charosky S, et al. The paraspinous splitting approach: a possible approach to perform multiple intercosto-lumbar neurotizations: an anatomic study [J]. *Spine*, 2007, 32(22):631-634.

(收稿日期: 2010-08-24 修回日期: 2010-12-23)

(英文编审 蒋欣/刘思麒)

(本文编辑 李伟霞)