

基础研究

X线照射对脊髓神经组织效应的实验研究

金冶华¹, 白希壮², 吕刚², 张世斌¹, 王星铎², 于频³

(1 辽宁省人民医院骨科 110015 沈阳市; 2 中国医科大学附属第一临床医院骨科 110001;

3 中国医科大学脑研究所 110001)

【摘要】目的:探讨 X 线照射对脊髓神经元及少突胶质细胞的效应。**方法:**将出生 3d 的 Wistar 大鼠分为实验组、对照组, 实验组分别给予一次剂量 25、35、45 和 55Gy 的 X 线照射腰段脊髓, 观察照射后动物一般状态及运动功能情况。取已照射大鼠脊髓标本进行组织学评价, 用图像分析仪行定量分析; 用透射电镜观察超微结构的变化。**结果:**25、35Gy 照射组动物未出现神经症状, 且生长发育正常; 45 和 55Gy 照射组新生鼠的被照射区皮肤毛发稀少, 食欲差, 身体发育不良, 比对照组瘦小, 双侧后肢完全瘫痪, 并出现尿潴留。对照组与实验组以及各实验组间少突胶质细胞数量均有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。X 线照射区与相邻正常区相比少突胶质细胞明显减少, 以脊髓白质区减少最为明显; X 线照射剂量与少突胶质细胞数目减少程度有极显著正相关; X 线照射剂量超过 35Gy 可以造成脊髓神经元的损伤。**结论:**X 线照射可抑制大鼠脊髓少突胶质细胞生长, 为促进脊髓损伤后神经再生机理的研究提供一定的实验基础。

【关键词】运动神经元; 少突神经胶质; 脊髓; X 线

中图分类号: R683.2, R814.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-05-0308-03

An experimental study of the effect of X-ray radiation on spinal neuron and oligodendrocytes/JIN Yehua, BAI Xizhuang LÜ Gang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(5):308-310

【Abstract】Objective: To study the effect of X-ray radiation on spinal neuron and oligodendrocytes. **Method:** Wistar rats at the third day after birth were divided into experimental and control groups, with X-ray dosage of 25, 35, 45 and 55Gy once for each on the lumbar segments of the experimental group. The general condition and motion function after radiation were observed. The specimens of spinal cords were obtained for histological examination, quantitative analysis with image analyzer, as well as qualitatively observed with transmission electron microscope. **Result:** The rats with dosage of 25Gy and 35Gy did not present neural symptom, and developed normally. In 45 and 55Gy groups hair became less in the radiated areas. They also showed bad appetite, dysplasia, thin and small than the control group, and also with uroschisis. There were significant differences on numbers of oligodendrocytes between experimental and control group, as well as among experimental groups. There were significant decreases of oligodendrocytes in radiated areas compared with normal areas in the vicinity, most prominent in the white matter. There was extremely significant positive relativity between dosage of radiation and the amount of decrease of oligodendrocytes. The dosage of X-ray over 35Gy might lead to the impairment of spinal neurons. The dosage of 25Gy and 35Gy could lessen the number of oligodendrocytes without injury to the spinal neuron. **Conclusion:** The inhibition effect of X-ray to oligodendrocytes provided an experimental basis for the research on mechanisms of neuron and spinal cord re-generation following injury.

【Key words】 Motor neurons; Oligodendroglia; Spinal cord; X-ray

【Author's address】 Department of Orthopaedic Surgery, the People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang, 110015, China

脊髓神经组织中的主要成份有神经元和胶质细胞, 各种细胞在脊髓的分化、发育过程中相互促进、相互依赖及制约。中枢神经再生之所以比周围

神经困难, 主要是由于中枢神经系统(CNS)内存在抑制性机制^[1]。Schwab 等^[2]通过体内和体外实验证明, 少突胶质细胞的成熟及髓鞘形成对轴突再生起抑制作用; 用有丝分裂抑制剂或 X 线照射能有效抑制新生大鼠脊髓的少突胶质细胞的发生和髓鞘形成, 使中枢的抑制解除, 受阻的轴突便可以

第一作者简介: 男(1964-), 副主任医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱及关节外科(现在沈阳市骨科医院 9 病房 110044)
电话: (024)24128846 E-mail: BBWGKYY@126.com

再生^[3-5]。因此,研究解除这种抑制因素的条件是脊髓再生的前提和关键。本研究旨在筛选出在我国现有放射条件下,既能有效地抑制少突胶质细胞的成熟及形成髓鞘,又不损伤神经元的合适的 X 线照射剂量,为脊髓损伤后再生的研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

新生 3d Wistar 大鼠 30 只,体重 13~20g,雌雄不限,以窝为单位,即每窝只用一种 X 线照射剂量,随机分为实验组和对照组。实验组按一次性 X 线照射剂量分为 25、35、45、55Gy 4 组,每组 6 只;正常对照组 6 只。在同等条件下饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 X 线照射条件和方法 动物经低温冰冻麻醉后,胶带固定于俯卧位,覆盖厚 0.8mm 保护铅屏,并在腰段脊髓处暴露出 5×12mm 狭缝作为照射区。在 100kV,源皮距 30cm 条件下行 X 线照射。实验组一次性 X 线照射剂量分别为 25、35、45 和 55Gy。

1.2.2 一般状态及运动功能检测 观察 X 线照射后动物一般状态及运动功能改变,包括食欲、大小便、营养、皮肤表面、运动及对刺激的反应;观察神经异常发生时间,出现瘫痪时间等情况。

1.2.3 组织学检查 实验各组的动物于 X 线照射后 14d,深麻醉下经 4%多聚甲醛和 2%戊二醛液灌注固定后,取照射区脊髓标本分成两份,一份放于上述固定液再固定 24h,常规脱水、透明、包埋,制成 7μm 切片。随机选取切片按常规进行 HE 染色、尼氏以及少突胶质细胞特异的 Grono 镀银染色。应用日产 Luzex-F 型彩色图像分析仪对少突胶质细胞数量进行定量分析。另一份标本经 1%锇酸液固定,酒精、丙酮脱水, Epon812 包埋,半薄切片定位脊髓前角, LKB 超薄切片机切片,厚 600nm,经醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,在 H-600 透射电镜下观察并摄片。观察神经元形态结构的改变,并将各组脊髓后索少突胶质细胞数量进行组间比较。

1.3 统计学方法

组间比较采用方差分析及 q 检验,并对 X 线照射剂量与少突胶质细胞数量变化进行相关性检验,判定其相关程度。

2 结果

2.1 实验动物一般状态及运动功能改变

连续观察 2 周,发现 25、35Gy 实验组大鼠未出现神经症状,且发育生长正常。45 和 55Gy 照射组大鼠的被照射区皮肤毛发稀少,食欲差,身体发育不良,比对照组瘦小,并出现尿潴留;于照射后 6~7d 出现双侧后肢完全瘫痪,8~10d 后更为明显。

2.2 组织学及超微结构检查所见

HE 染色方法显示对照组动物脊髓神经元发育正常,神经胶质细胞丰富(图 1,后插页 IV)。经不同剂量 X 线照射的动物脊髓被照射区的白质胶质细胞数与非照射区及对照组的脊髓胶质细胞数相比明显减少(图 2,后插页 IV),而且随着 X 线照射剂量的增大,胶质细胞减少越明显。

Grono 镀银染色标本可特异地显示胶质细胞中的少突胶质细胞及其突起。镜下观察发现对照组脊髓后索少突胶质细胞数量多,分布均匀、广泛,其均值为 528.3 ± 19.1 个/视野;实验组脊髓后索少突胶质细胞数量少,分布不均匀,25Gy 组为 367.2 ± 32.4 个/视野;35Gy 组为 274.7 ± 26.7 个/视野;45Gy 组为 125.5 ± 25.1 个/视野;55Gy 组因对神经元损伤已较重且少突胶质细胞较少,未再计数。随着照射剂量增加,少突胶质细胞减少的越明显(图 3、4,后插页 IV),各组间比较差异均有显著性 ($P < 0.01$)。

尼氏染色标本显示 25、35Gy X 线照射组脊髓前角为发育成熟的多极运动神经元,轮廓清楚,大多数细胞核位于胞体中央,核仁清晰可见,尼氏体丰富呈网状或斑块状排列于核周,胞浆均匀,深染,与对照组无明显差别(图 5、6,后插页 IV)。45、55Gy 实验组脊髓前角神经元出现萎缩变性,有的细胞核偏位,肿胀;有的尼氏体呈中心性溶解,或凝结成斑块状而偏于一隅,有的胞质内出现空泡(图 7、8,后插页 IV)。

透射电镜观察 25、35Gy 照射组照射区脊髓前角运动神经元的超微结构无明显改变(图 9,后插页 IV)。45、55Gy 实验组髓鞘扭曲变形,板层松散,轴浆萎缩,其内出现髓样体,线粒体肿胀,嵴断裂,有的呈空泡状(图 10,后插页 V);脊髓前角神经元的粗面内质网出现脱颗粒,肿胀,核糖体凝集成斑块状;高尔基体的泡管状结构肿胀,有的呈空泡状。

3 讨论

中枢神经再生是神经科学研究中的一项重要课题。在诸多的中枢神经再生研究中,除了研究促进其再生的条件外,更重要的是探索抑制其再生的因素。少突胶质细胞虽然是 CNS 轴突髓鞘的形成细胞,但细胞膜及髓鞘本身存在两种抑制蛋白,命名为 NI-35 和 NI-250,明显阻碍轴突的再生^[6]。早在 1963 年 Gilmore 发现 X 线照射对脊髓神经系统的影响很大,新生鼠接受 X 线照射发生神经系统改变的占 70%,并随着鼠龄的增加其改变越来越少^[7]。本实验结果表明,X 线照射对脊髓神经元和少突胶质细胞均有明显影响,但不同剂量对脊髓细胞的效应不同。由于神经细胞是体内高度分化的有丝分裂后细胞,即在其发生过程中一旦形成就失去了分裂能力,而成年动物的神经胶质细胞却依然保持生长、分裂的能力。因此,神经元对 X 线的照射与胶质细胞相比具有相对不敏感性。神经胶质细胞中的少突胶质细胞又是 X 线照射的主要靶细胞。因此,探索在什么条件下能有效地抑制少突胶质细胞成熟及形成髓鞘又不损伤神经元即成为可能。本实验表明,适量的 X 线照射不仅不会造成脊髓神经细胞的损伤,并能有效地抑制少突胶质细胞生长及形成髓鞘,从而将促进神经元轴突的再生。Savio 和 Schwab 对新生两周大鼠在胸腰段切断皮质脊髓束,2~3d 后 X 线照射损伤段,2~3 周后观察到在损伤断端有 10mm 左右的细轴突和轴束再生,对照组也有再生轴突芽,但其再生长度很少超过 1mm^[8]。这充分说明只要抑制少突胶质细胞生长,脊髓损伤的再生就有可能实现。本实验证实一次 X 线照射超过 35Gy,则超过了神经元的最大耐受剂量,可造成脊髓神经元损伤,而且照射剂量越大,脊髓神经元的损伤越严重,出现神经元性瘫痪越早。

尼氏体是神经元合成蛋白质的重要场所。尼氏体的形态结构是判定神经元机能状态的一种标志。本实验结果表明,适量 X 线照射剂量不会引起神经元改变。然而,当 X 线照射剂量达 45Gy 时,可引起新生鼠脊髓前角运动神经元尼氏体减少、溶解、固缩边集乃至消失。表明一次大剂量照射可以造成脊髓前角运动神经元损伤,最终造成脊髓的继发性血栓形成,缺血,缺氧^[9]。

本实验发现在不同 X 线剂量照射后,少突胶质细胞数目均减少。虽然不同的 X 线照射剂量使得少突胶质细胞减少的程度不同,但同未经照射的动物比,少突胶质细胞的改变明显 ($P<0.01$)。25、35Gy X 线照射剂量尽管都可使少突胶质细胞减少,但其减少程度的差异具有显著性 ($P<0.01$)。45Gy X 线照射剂量已使神经元严重损伤,故无可比性。本实验采用 Grono 特殊染色方法,对 X 线照射后少突胶质细胞数量变化进行比较,并通过图像分析仪进行定量分析,筛选出既能抑制少突胶质细胞生长又不损伤脊髓神经元的适宜的 X 线照射剂量,为脊髓损伤后促进其再生修复提供了一定的实验基础,对临床脊髓创伤与疾患的修复和治疗有重要参考价值。

4 参考文献

1. 姚志彬,陈以慈.脑研究前沿[M].广州:广东科技出版社,1995. 132-142.
2. Schwab ME, Caroni P. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro[J]. J Neurosci, 1988, 8(2):2381-2393.
3. Gilmore SA. The effects of X-irradiation on the spinal cords of neonatal rats: neurological observations [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1963, 22(6):285-293.
4. Black JA, Waxman SG, Ransom BR, et al. A quantitative study of developing axons and glia following altered gliogenesis in rat optic nerve[J]. Brain Res, 1986, 380(4):122-135.
5. Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin associated neurite growth inhibitors[J]. Nature, 1990, 343(9):269-272.
6. Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading[J]. J Cell Biol, 1988, 106 (12):1281-1288.
7. Gilmore SA. The effect of X-irradiation on the spinal cords of neonatal rats (II): histological observations [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1963, 22(10):294-301.
8. Savio T, Schwab ME. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(1):4130-4133.
9. Schultheiss TE, Kun LE, Ang KK, et al. Radiation response of the central nervous system [J]. Int J Radiat Oncol Phys, 1995, 31(5):1093-1112.

(收稿日期:2004-07-15 修回日期:2004-11-08)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 彭向峰)