

基础研究

脊髓爆震伤后神经细胞的形态学变化
及凋亡细胞的时空分布特点

王宇清, 叶正旭, 胡学昱, 黄景辉, 罗卓荆

(第四军医大学西京医院全军骨科研究所 710033 陕西省西安市)

【摘要】目的:研究脊髓爆震伤后神经细胞的形态学变化及凋亡细胞的时空分布特点。**方法:**90 只家兔随机分为正常组(A 组, $n=6$)、Allen's 撞击组(B 组, $n=42$)和爆震损伤组(C 组, $n=42$)。用改良 Allen's 法造成 B 组不完全性急性脊髓损伤模型;而用 0.7g 单质金属炸药黑索金(cyclotrimethylene trinitramine)在垂直距离动物 T9~T10 节段 4cm 处引爆造成 C 组脊髓爆震伤模型,5h 后 B、C 组动物均用诱发电位仪刺激下肢的 MEP 以筛选造模成功的动物。B、C 两组分别于损伤后 8h、1d、3d、7d、14d 和 30d 取材(损伤段脊髓 2cm),每组每个时间点取材 7 只,而 A 组动物不作任何处理,统一于 30d 取材。通过 HE 染色、透射电镜检测、DNA 电泳分析和凋亡细胞原位末端标记法(TUNEL),观察各组脊髓中神经细胞的形态学变化及凋亡细胞的时空分布。**结果:**HE 染色显示, A 组为正常组织学表现;B 组损伤后 8h 即出现大片的出血坏死灶,白质呈严重的脱髓鞘样改变,1、3d 时前角运动神经元大量减少,7d 时白质中空洞形成,而且空洞逐渐融合,到 14、30d 时,可见部分巨大空洞;而 C 组爆震后 8h 仅出现散在的小型出血点,但病变进展迅速,1d 时前角运动神经元即明显减少并伴有大量微型空洞形成,3、7d 时整个白质结构松散,可见液化坏死灶及广泛的脱髓鞘样改变,而且透射电镜证实这种髓鞘损伤还具有方向性特征,到 14、30d 时,脊髓可见巨大空洞及散在的小空洞,但面积明显小于 B 组。B 组的前角运动神经元数目在 8h 时的降低幅度比 C 组要大($P<0.05$),而到损伤 7d 后,两组却无明显差异。DNA 电泳显示 B、C 两组损伤后 3d 均出现明显的 DNA 梯形条带和 Smearing 现象,而且这种现象逐渐向邻近节段扩散。TUNEL 检测显示,B、C 两组于损伤后的灰质和白质中均能检测到阳性细胞,而且分布于灰质内的阳性细胞数均于 1d 时达到高峰($P<0.001$),但是在白质内的阳性细胞数量,B 组于 3d 时达到高峰($P<0.001$),C 组却于 7d 时才达到高峰($P<0.001$)。**结论:**与脊髓 Allen's 撞击模型相比,脊髓爆震伤后同样存在神经细胞的凋亡现象,而且有其时间和空间分布特点。

【关键词】脊髓爆震伤;细胞凋亡;TUNEL

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.10.11

中图分类号:R683.2,Q421 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-10-0758-07

Morphological changes and spatial and temporal distribution of apoptotic neural cells after blast injury to spinal cord/WANG Yuqing, YE Zhengxu, HU Xueyu, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(10): 758~764

【Abstract】 Objective:To investigate morphological changes and spatial and temporal distribution of apoptotic neural cells after blast injury to spinal cord.**Method:**Ninety rabbits were randomly assigned into normal group (group A, $n=6$), Allen's group (group B, $n=42$) and spinal cord blast injury group (group C, $n=42$). Incomplete ASCI model was made based on the modified method of Allen's in group B. 0.7g cyclotrimethylene trinitramine was placed at the site 4cm vertically to the dorsal of T9-T10 level and detonated in group C to make the blast injury model to spinal cord. 5h later, MEP of all rabbits were examined to confirm whether the model was successful. After that, all rabbits in group B and C were sacrificed to harvested the injured spinal cord (2cm) at 8 hours and 1, 3, 7, 14, 30 days ($n=7$) respectively. While in control group, animals were left intact. All injured spinal cords were taken for morphological studies, including hematoxylin and eosin staining, TEM

基金项目:军队“十一五”科技攻关资助计划项目(06G097)

第一作者简介:男(1983-),硕士研究生,研究方向:脊髓爆震伤

电话:(029)84775290 E-mail:starwyq@163.com

通讯作者:罗卓荆 E-mail:zjluo@fmmu.edu.cn

(transmission electron microscope) examination, electrophoretic analysis of DNA and the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) methods. **Result:** Under HE stain, the specimens in group A displayed normal histology, however in group B, severe hemorrhage, necrosis and demyelination were observed at 8h, the amount of motor neurons decreased significantly at 1 or 3d, invanity were observed until 7d and inosculated gradually, and some huge cavities were evidenced at 14d or 30d. Compared with group B, there were only some hemorrhage spots in group C at 8h, which deteriorated rapidly with time processing. A significant reduction of motor neurons and a large number of micro-cavities were observed in group C at 1d, necrosis and extensive demyelination were evidenced at 3d or 7d after blast injury. However, the transmission electron microscopy confirmed that the myelin sheath also had orientation from injury. Huge cavities and scattered small cavities were observed in group C at 14d or 30d, but areas of these cavities was significantly smaller than those in group B. For quantitative analysis, the extent of neuron reduction in group B were greater than those in group C at 8h ($P < 0.05$), and there was no significant difference between this two groups 7d after the injury. DNA gel electrophoresis revealed DNA laddering and apparent with smearing phenomenon at 72h after injury in both group B and C. Moreover, the gross lesion area expanded over time. After TUNEL assay, the TUNEL-positive cells were found in the gray matter and white matter in group B and C, with a maximum presence at 1d in the grey matter of injured segment ($P < 0.001$), however the labeled cells in white matter reached peak at 3d in group B ($P < 0.001$) and 7d in group C ($P < 0.001$). **Conclusion:** Compared with Allen's model, neuronal apoptosis are also presented in the blast injury to spinal cord, and have characteristics of spatial and temporal distribution.

[Key words] Spinal cord blast injury; Apoptosis; TUNEL

[Author's address] Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China

急性脊髓损伤 (ASCI) 包括原发性和继发性损伤, 而神经细胞死亡是 ASCI 继发性病理变化的主要内容, 它在形态学上包括坏死和凋亡两种途径。目前, 国内外许多学者发现在中枢神经系统缺血和机械损伤模型中, 广泛存在细胞凋亡现象, 表现为 DNA 的片段化或转录水平修复相关基因表达等^[1,2]。但对脊髓爆震伤后神经细胞形态学变化和损伤机制的研究则相对较少。在本实验中我们采用黑索金炸药 (RDX) 局部爆震的方法建模, 通过 HE 染色、透射电镜、DNA 电泳、TUNEL 技术等方法研究脊髓爆震伤的病理学变化及凋亡细胞的时空分布, 并且与 Allen's 撞击模型进行对比, 分析脊髓爆震伤与脊髓机械撞击伤在病理变化上的异同。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康雄性家兔 90 只 (第四军医大学实验动物中心提供), 重量 2.0~2.5kg。随机分为正常组 (A 组, $n=6$)、Allen's 撞击组 (B 组, $n=42$) 和爆震损伤组 (C 组, $n=42$)。其中 B、C 两组又分损伤后 8h、1d、3d、7d、14d 和 30d 取材组 ($n=7$), 而 A 组动物不作任何处理, 统一于 30d 取材。

1.2 动物模型制作及取材

B 组按改良 Allen's 撞击法制作 ASCI 模型^[3]: 将家兔用“速眠新 II” (0.2ml/kg) 肌肉注射麻醉后置于俯卧位。定位 T9 棘突后, 以 T9 棘突为中心作纵形切口, 咬除 T9~T10 棘突、椎板, 暴露脊髓 8×6mm, 用改良 Allen's 法 12g×10cm 打击脊髓, 然后关闭切口。C 组按本课题组发明的方法制作脊髓爆震伤模型^[4]: 将动物用同样方法麻醉后俯卧位固定于致伤板上, 定位 T9 棘突, 并在 T9~T10 平面备皮约 5×5cm, 以 1cm 厚橡胶板覆盖保护颅脑及胸腹腔脏器, 致伤部位中央保留直径 4cm 圆孔。将 RDX (装药量为 0.7g, 由中国兵器工业部 204 研究所提供) 水平悬于致伤部位圆孔正上方, 调节爆源与致伤部位的垂直距离为 4cm 后, 电击引爆。爆炸 5h 后, 采用 Keypoint 4C 型诱发电位仪记录下肢的运动诱发电位 (MEP), 并与损伤前比较以检测运动情况。动物纳入 C 组的标准为: ①动物存活; ②与自体损伤前相比, 双下肢 MEP 潜伏期延长 1.0ms 或波幅下降 50%; ③家兔背部仅伤及皮肤、皮下组织, 无穿透伤。B、C 两组伤后每日给予青霉素 40 万 U 肌注, 每天两次人工排尿, 直至建立反射性膀胱。

B、C 组分别于损伤后各时间点随机选取 6 只

动物, A 组于 30d 时取 6 只动物, 麻醉后用 4% 多聚甲醛行心脏灌注固定, 解剖椎管, 取 T9~T10 节段脊髓 2cm, 再放入 4% 多聚甲醛液中后固定 2 周, 石蜡包埋, 4 μ m 连续横断面切片两套, 分别用于 HE 染色和 TUNEL 检测。B、C 组各时间点剩余的动物, 空气栓塞法处死后, 在冰上迅速取出损伤段脊髓 2cm, 切取小部分脊髓组织固定于 2.5% 戊二醛中, 其余组织立即放入液氮中保存, 分别用于透射电镜检测和 DNA 凝胶电泳分析。

1.3 组织形态学观察

从 B、C 组各时间点及 A 组每只动物的标本切片中随机选取 3 张, 经 HE 染色, 观察各组脊髓组织的形态学变化和前角运动神经元的存活情况。

400 倍光镜下, 每张切片随机选取 1 个靠近前角的视野拍照, 由与本实验不相关的工作人员观察前角神经元的形态变化, 并手工计数, 计算出平均每张切片一侧前角正常神经元的数量即为每个标本平均前角存活神经元的数量, 并对各组各时间点 6 只动物进行统计 (以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=6$)。

1.4 透射电镜检测

取 A 组的正常脊髓及 B、C 组损伤后 8h、24h 和 3d 时的损伤段脊髓各一份, 先在 2.5% 戊二醛固定 6h, 用 PBS (PH 7.4) 充分清洗后, 再用 1% 锇酸固定, 脱水、包埋, 超薄切片 1 张 (厚约 50~60nm), 透射电镜下观察各组脊髓的超微结构变化。

1.5 DNA 凝胶电泳

B、C 组分别于损伤后 8h、1d、3d、7d 时各取 1 只动物, 空气栓塞法处死。在冰上迅速取出爆震中心段脊髓 2cm 以及邻近节段脊髓组织 1cm, 放入 -80℃ 保存。之后将不同节段的脊髓组织分别放入消化缓冲液中匀浆, 再在液体加入 100 μ g/ml 的蛋白酶 K, 50℃ 孵育 3h。用苯酚/氯仿/戊醇 (25:24:1) 提取 DNA, 70% 的酒精沉淀, 再在 TE 缓冲液中重悬 DNA, 然后将样品用 0.5mg/ml RNA 酶 37℃ 条件下消化 30min, 上样到含 0.5 μ g/ml 溴化乙啶的 1.8% 琼脂糖凝胶, 在室温、100V 条件下电泳 1.5h, 紫外投影仪下摄像, 以观察各组各节段脊髓组织中的 DNA 损伤情况。

1.6 TUNEL 检测

B、C 组动物分别于 8h、1d、3d、7d、14d 时各随机选取 1 张切片, 采用原位细胞凋亡检测试剂盒

(购自 ROCHE 公司), 参照说明书进行染色。观察前, 再用 PI (2mg/ml) 在室温下复染 5min, 以显示所有细胞核。请两名非本课题组并且熟悉凋亡细胞形态的实验人员, 对 TUNEL 标记的所有切片进行计量分析: 首先分别在白质和灰质区域内, 各随机选取 5 个 200 倍的视野观察 TUNEL 阳性细胞 (在波长为 515~565nm 的激光激发下, TUNEL 阳性细胞核发绿色荧光); 然后在同一视野下, 观察被 PI 标记的所有细胞核 (在红色激光激发下, PI 标记的细胞核发红色荧光), 用软件将两者叠加后, 鉴别凋亡细胞并手工计数 (叠加后阳性细胞核为黄色荧光), 分别计算出每个标本中白质和灰质中 200 倍视野下的平均 TUNEL 阳性细胞核的数量, 并对各组各时间点 6 只动物进行统计 (以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=6$)。

1.7 统计学处理

所有数据应用 SPSS 12.0 软件处理, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。方差齐时采用方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验; 方差不齐时采用 Kruskal-Wallis 检验, 多重比较采用 Nemenyi 法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验中有 5 只家兔被排除出实验组 (后向 B 组 7d 取材组中补充入 1 只), 3 只家兔于伤后 5h 内死亡, 其中 B 组 1 只, C 组 2 只; 2 只家兔分别于伤后 10d 和 12d 死亡, 均为 B 组。死亡后经解剖发现 C 组的两只家兔肺部明显淤血, 经分析确定死亡原因系严重的肺爆震伤; B 组的 1 只系麻醉过量致死, 另外 2 只在胸腔内发现大量脓液, 可能为术中或术后无菌操作不严格所致。

2.2 HE 染色结果

光镜下 A 组脊髓组织中未见明显细胞肿胀、核固缩、破裂等, 白质中亦未见出血和脱髓鞘等病理改变 (图 1a)。而 C 组爆震后 8h 即在白质和灰质内出现散在的出血点, 而且部分神经元的细胞核开始破裂、溶解 (图 1b); 爆震后 1d 时脊髓前角正常运动神经元数目明显减少, 白质水肿严重呈脱髓鞘样改变, 并伴大量微型空洞形成 (图 1c); 3d 时灰质和白质内均可见部分液化坏死灶, 周围有大量炎性细胞浸润; 7d 时脊髓灰质内仅可见 1~3 个典型的运动神经元, 白质结构松散 (图 1d);

14d 时见大量胶质细胞增生, 部分微型空洞开始融合; 30d 后脊髓内可见巨大空洞并伴散在的小空洞, 前角内未发现典型的运动神经元胞体 (图 1e)。

B 组与 C 组比较则有明显的不同: 8h 即出现大片的出血坏死灶, 主要分布在灰质内 (图 1f); 1、3d 时除了同样可见前角运动神经元大量减少、白质中脱髓鞘和液化坏死等现象外, 未见到有微型空洞的形成 (图 1g); 至 7d 时才可见有大小不一的空洞及胶质细胞大量增生 (图 1h); 随后脊髓内空洞的面积进一步扩大, 到 14、30d 时可见数个巨大空洞的形成, 而且空洞的面积明显大于 C 组 (图 1i)。显微镜下观察脊髓前角存活神经元的数

量的变化 (表 1), 发现 B、C 两组的前角运动神经元数目在损伤后与 A 组比较均明显降低 ($P <$

表 1 各组不同时间点前角存活神经元数量

(个/一侧前角, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间	正常组 (A 组)	Allen's 打击组 (B 组)	爆震损伤组 (C 组)
8h	/	16.56 $\pm$ 1.81 ^{①②}	20.39 $\pm$ 3.79 ^{①③}
1d	/	10.67 $\pm$ 1.12 ^①	9.00 $\pm$ 1.91 ^①
3d	/	8.95 $\pm$ 1.51 ^{①②}	6.28 $\pm$ 2.52 ^①
7d	/	3.44 $\pm$ 1.57 ^①	3.61 $\pm$ 1.14 ^①
14d	/	2.67 $\pm$ 1.35 ^①	3.56 $\pm$ 1.25 ^①
30d	25.11 $\pm$ 4.91	1.28 $\pm$ 0.88 ^①	2.33 $\pm$ 1.19 ^①

注: ①与 A 组比较 $P < 0.01$; ②与 C 组同时间点比较 $P < 0.05$; 与 C 组内各时间点比较 ③ $P < 0.01$

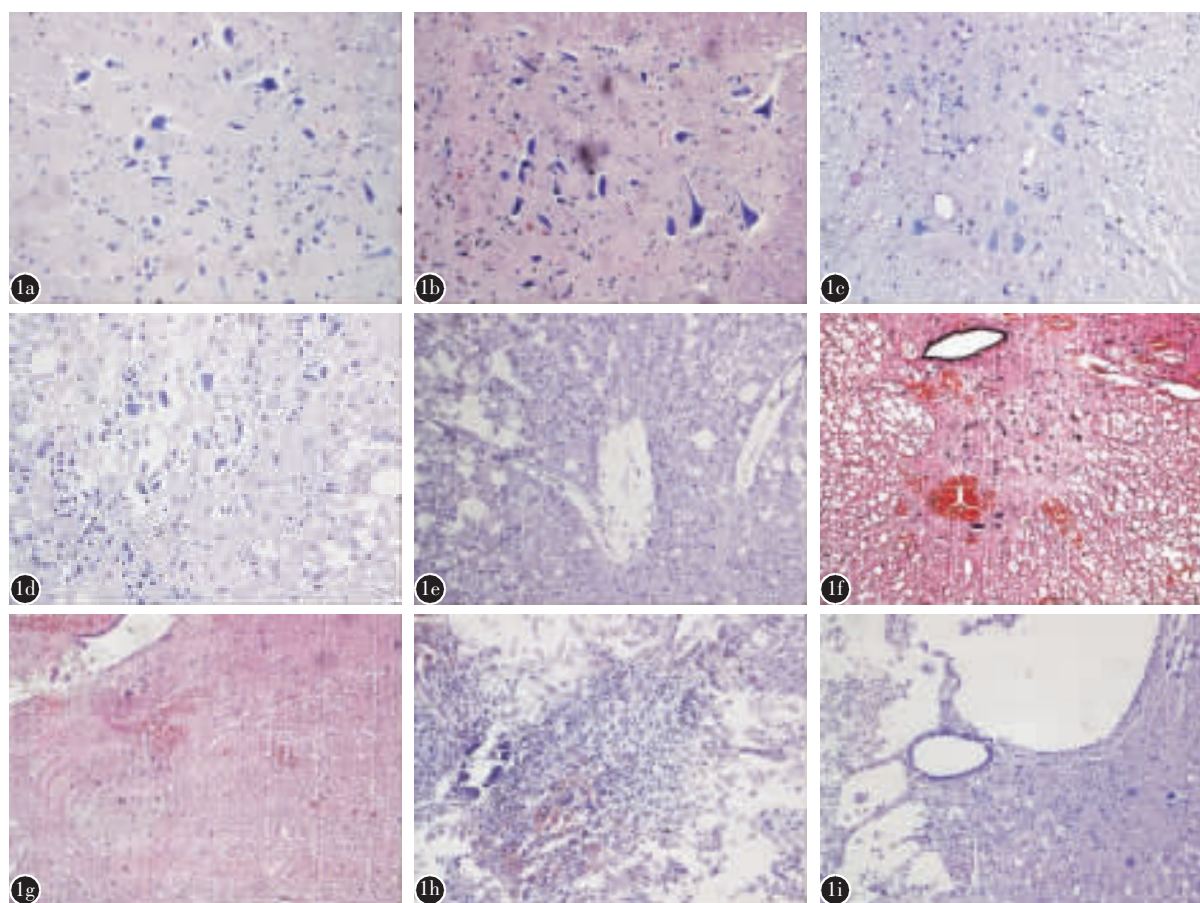


图 1 a A 组为正常脊髓组织, 神经元胞核清楚, 胞膜完整, 未见坏死细胞, 白质结构正常 (HE $\times 400$) b C 组损伤后 8h 损伤脊髓前角内可见散在的出血点, 部分神经元的细胞核开始破裂、溶解 (HE $\times 400$) c C 组损伤后 1d 示前角内正常运动神经元数目明显减少, 白质呈脱髓鞘样改变, 并伴有大量微型空洞形成 (HE $\times 400$) d C 组损伤后 7d 可见前角内的运动神经元细胞大量减少, 仅见 1~3 个, 白质结构松散, 微型空洞逐渐扩大 (HE $\times 400$) e C 组损伤后 30d 灰质内可见巨大空洞并伴散在的小空洞, 前角内未发现典型的运动神经元胞体 (HE $\times 400$) f B 组损伤后 8h 损伤脊髓可见灰质内出现大片出血坏死灶, 部分神经元细胞膜破裂、细胞核溶解, 白质水肿严重 (HE $\times 400$) g B 组损伤后 1d 示前角运动神经元大量减少, 灰质和白质仍可见出血坏死灶, 但未见微型空洞形成 (HE $\times 400$) h B 组损伤后 7d 可见脊髓内的液化坏死灶逐步扩大, 并伴有大量炎性细胞浸润以及胶质细胞的大量增生 (HE $\times 400$) i B 组损伤后 30d 可见在中央管旁边分布的数个巨大空洞形成, 而且面积明显大于 C 组 (HE $\times 400$)

0.01), 但是 B 组在 8h 时的降低幅度比 C 组要大 ($P<0.05$), 而到损伤 7d 后, 两组均较低而且没有明显的差异。

2.3 透射电镜检测

A 组的超微结构未见明显的病理学改变 (图 2a)。而 C 组于损伤后 8h 即可见细胞轻度水肿; 24h 即可见神经元细胞核明显肿胀, 伴“核切迹”现象 (图 2b), 线粒体水肿、内质网板层结构破坏, 高尔基复合体崩解 (图 2d), 白质中的髓鞘也出现明显的断裂和破溃崩解, 而且病变范围与冲击波传播方向一致, 符合一定的方向性 (图 2e); 72h 时可见液化坏死区。而 B 组与 C 组相比: 损伤后 8h 可见细胞明显水肿; 24h 时神经细胞肿胀的更加明显, 线粒体等细胞器几乎溶解殆尽, 可见周围的液化坏死区 (图 2c), 髓鞘板层的破溃溶解也更加严重, 但是未见方向性特征 (图 2f); 72h 时可见液化坏死区逐步扩大。

2.4 DNA 电泳

A 组脊髓 DNA 经电泳后仅出现了一条高分子量条带, 说明脊髓无明显损伤。B、C 两组在损伤后 8h 时与 A 组无明显区别, 但在损伤后 1d 和 3d 时均出现部分 180~200bp 的 DNA 梯形条带和 Smearing 现象, 而且于 3d 时最为明显 (图 3a、b)。

另外, 在提取 B 组和 C 组 7d 的脊髓组织作 DNA 电泳后, 发现中心段脊髓组织均表现为 Smearing 现象和大量小片段 DNA, 说明这时中心段脊髓组织的损伤以坏死为主; 而邻近节段脊髓组织则均表现为部分 180~200bp 的梯形条带并伴有 Smearing 现象, 说明这时邻近节段脊髓组织的损伤以凋亡为主 (图 3a、c)。

2.5 TUNEL 检测

A 组未发现有 TUNEL 阳性细胞的表达 (图 4a)。而 B、C 两组于损伤后各时间点均出现 TUNEL 阳性细胞, 并呈现各自的数量变化特点 (表 2)。C 组损伤段灰质内的 TUNEL 阳性细胞在 24h 时达到高峰, 主要分布在脊髓的前后角, 其中多数为胶质细胞, 少数为神经元细胞 (图 4b); 白质中的阳性细胞数则于损伤后 24h 开始明显增多 (图 4c), 7d 时达到高峰 ($P<0.001$), 多数为分布在白质周围的胶质细胞 (图 4d)。B 组损伤段灰质内的 TUNEL 阳性细胞同样在 24h 时达到高峰 (图 4e); 但白质内的阳性细胞数却于 3d 时就达到高峰 (图 4f)。此后两组的损伤段阳性细胞数量均明显下降, 但是凋亡范围却逐渐向周围扩大, 在 14d 时邻近节段 TUNEL 染色仍可见阳性细胞。

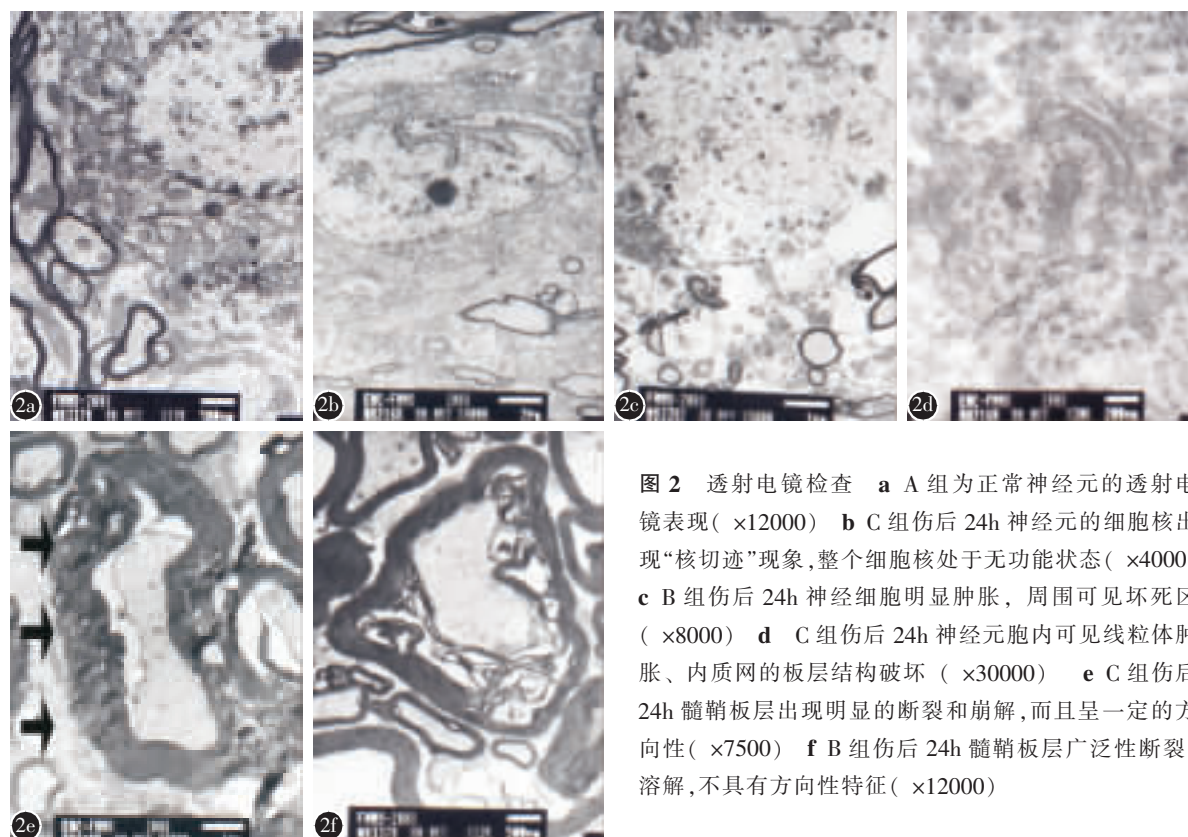


图 2 透射电镜检查 a A 组为正常神经元的透射电镜表现 ($\times 12000$) b C 组伤后 24h 神经元的细胞核出现“核切迹”现象, 整个细胞核处于无功能状态 ($\times 4000$) c B 组伤后 24h 神经细胞明显肿胀, 周围可见坏死区 ($\times 8000$) d C 组伤后 24h 神经元胞内可见线粒体肿胀、内质网的板层结构破坏 ($\times 30000$) e C 组伤后 24h 髓鞘板层出现明显的断裂和崩解, 而且呈一定的方向性 ($\times 7500$) f B 组伤后 24h 髓鞘板层广泛性断裂、溶解, 不具有方向性特征 ($\times 12000$)

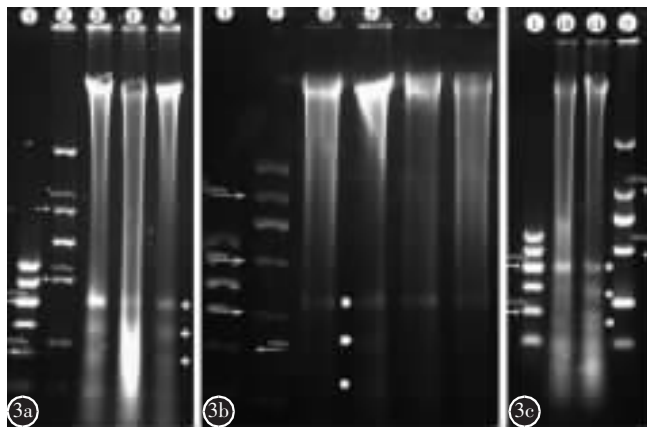


图 3 DNA 电泳分析 a B 组损伤后 3d、7d 的 DNA 电泳,其中 3 道代表 3d 中心段脊髓,可见明显的 180~200bp 的梯形条带和 Smearing 现象,4 道代表 7d 中心段脊髓,可见 Smearing 现象和大量的小片段 DNA,5 道代表 7d 邻近节段脊髓,可见部分 180~200bp 的梯形条带 b C 组损伤后 8h、1d、3d 的 DNA 电泳 (其中 6 道为正常组,7、8、9 道分别为 C 组伤后 3d、1d、8h 取材组)可见到 3d 时才出现了较为明显的 180~200bp 的梯形条带和 Smearing 现象 c C 组损伤后 7d 的 DNA 电泳 (其中 10 道代表 C 组伤后 7d 中心段脊髓,11 道代表 C 组伤后 7d 邻近节段脊髓)可见中心段脊髓组织表现为 Smearing 现象和大量小片段 DNA,而邻近节段脊髓组织则表现为部分 180~200bp 的梯形条带并伴有 Smearing 现象(注:1 道为 DNA maker I,2 道为 DL2000)

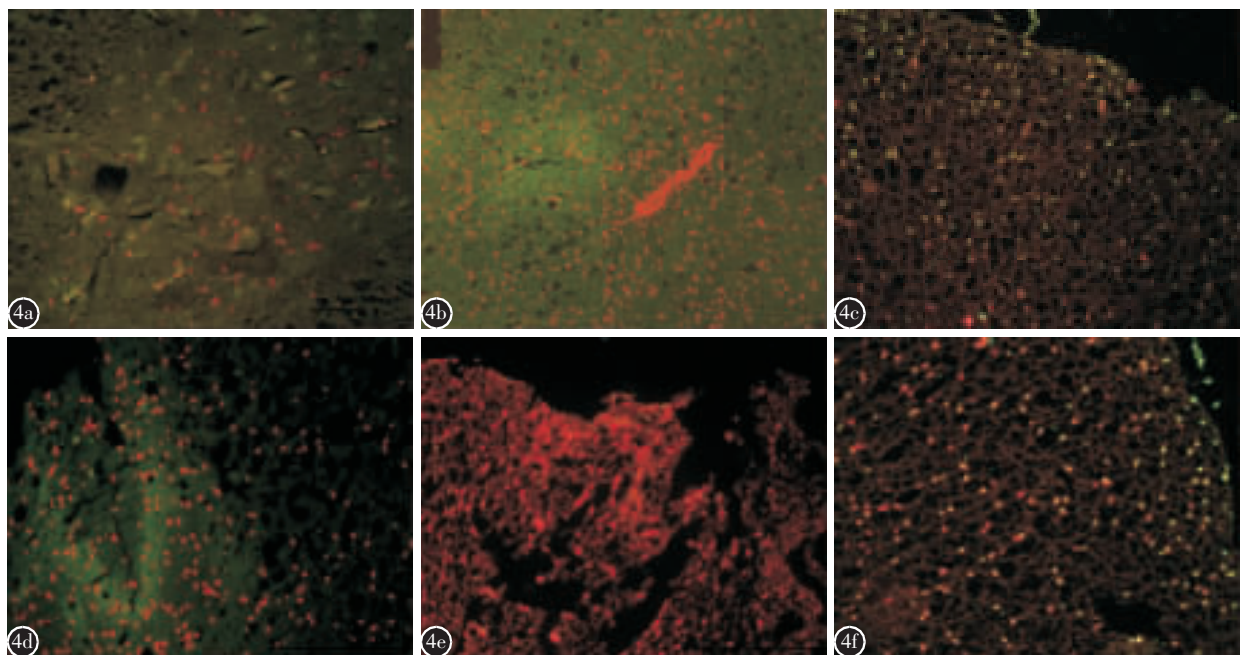


图 4 a A 组为正常脊髓组织,未见黄色的阳性细胞核(TUNEL 染色和 PI 染色的合成图,阳性细胞核为黄色荧光 $\times 400$,下同) b B 组损伤后 24h 灰质中可见黄色的阳性细胞核在前角和后角内散在分布 c B 组损伤后 24h 白质中可见阳性细胞核的数量明显比灰质内多,而且主要分布在白质周边 d C 组损伤后 24h 灰质中可见标记的黄色细胞核在后角内散在分布,周边白质也可见阳性细胞的表达 e C 组损伤后 24h 白质中见阳性的标记细胞核数目较多,而且明显多于灰质 f C 组损伤后 7d 见白质中的阳性细胞数达到高峰,而且多数为分布在白质周围的胶质细胞

表 2 两组伤后不同时间、不同部位凋亡细胞数目

(个/200 倍视野, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

伤后 时间	Allen's 打击组		爆震损伤组	
	灰质	白质	灰质	白质
8h	7.8 $\pm$ 1.4	12.17 $\pm$ 4.45	0.7 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 2.0
1d	13.8 $\pm$ 2.2 ^①	47.5 $\pm$ 12.3 ^②	11.7 $\pm$ 2.6 ^①	48.3 $\pm$ 41.0 ^②
3d	8.1 $\pm$ 0.5	208.2 $\pm$ 20.9 ^①	5.7 $\pm$ 2.8	69.4 $\pm$ 16.1 ^②
7d	5.3 $\pm$ 0.4 ^②	24.8 $\pm$ 5.9	2.1 $\pm$ 1.3	156.4 $\pm$ 37.1 ^①
14d	3.8 $\pm$ 0.4 ^①	18.5 $\pm$ 3.1	1.6 $\pm$ 1.1	13.2 $\pm$ 2.9

注:与同组同部位伤后 8h 比较^① $P<0.001$,^② $P<0.01$

3 讨论

在 ASCI 中,神经细胞的死亡包括凋亡和坏死两种形式。其中凋亡是一种细胞内源性核酸内切酶被激活而导致的程序性死亡,已被证实广泛存在于各种机械损伤模型的继发性损伤当中^[9]。但是脊髓爆震伤和日常的 ASCI 在发生机制上确有很大的不同。日常的 ASCI 主要是由脊柱损伤后,骨折或者脱位造成的局部压迫所导致。而脊髓爆震伤的损伤机制则包括有:①爆炸后冲击波导致

的原发性损伤,由脊髓在冲击波产生的动压(the dynamic pressure)和剪应力等作用下发生剧烈震荡所致^[9];②爆炸后各种高速破片导致的继发性损伤;③冲击波产生的抛掷与位移;④爆炸后局部高温、电磁波和产生的有毒气体对机体的损伤。因此这两种 ASCI 后的病理变化也不一定相同,那么脊髓爆震伤后神经细胞的形态学变化以及凋亡是否存在、时空分布特点如何,需要我们进一步验证。

本课题组用纸壳雷管成功建立了兔的脊髓爆震伤模型,并对脊髓组织采用 HE 染色和 TUNEL 技术等方法观察细胞的凋亡状况,证实脊髓爆震伤后广泛存在神经细胞凋亡,并且通过与 Allen's 撞击组相比,发现爆震伤后神经细胞的形态学变化和凋亡时空分布具有以下特征:①HE 染色显示:爆震后 8h 即在脊髓内出现散在的出血点,白质内也逐渐形成大量微型空洞;②与正常运动神经元数量相比,Allen's 撞击组在 8h 时的降低幅度比爆震组要大,而到损伤 7d 后,两组却没有明显的差异,因此推测爆震组的继发性损伤明显强于 Allen's 撞击组。③髓鞘损伤的超微结构显示爆震组的髓鞘损伤在初期具有一定的方向性(即仅一侧和对侧的板层损伤),而 Allen's 撞击组则无,损伤呈弥漫性分布;④DNA 电泳显示:与 Allen's 撞击组相同,爆震组于损伤后存在凋亡和坏死现象,而且凋亡随着损伤时间的延长逐渐向邻近节段扩散,而损伤中心会变成坏死区;⑤TUNEL 检测显示 Allen's 撞击组、爆震组损伤后在灰质和白质中均检测到阳性细胞,而且灰质中的阳性细胞均于 1d 时达到高峰,多数为胶质细胞,神经元细胞很少见,但是爆震组白质中的阳性细胞数目于 7d 时达高峰,主要分布在白质的周边,以胶质细胞为主,而 Allen's 撞击组白质内的阳性细胞数则于 3d 时就达到高峰。可见脊髓爆震伤后病理变化确实与撞击伤有明显不同,而且主要体现在脊髓的继发性损伤上。

目前国外的一些研究已经发现神经细胞凋亡在冲击波引起的创伤性脑损伤(bTBI)中广泛存在,主要为皮质层中的神经元和星形胶质细胞^[7,8],而且星形胶质细胞本身已被证明具有分泌神经营养因子、清除氧自由基、支持神经元存活等作用^[8],它的大量死亡将严重阻碍神经轴突的再生,而通过药物治疗,减少胶质细胞的凋亡,将会提高认知

和运动功能的恢复^[9,10]。但在脊髓爆震伤中,白质中凋亡的胶质细胞种类如何、通过何种方式发生凋亡、如何影响轴突再生以及灰质内神经元通过何种方式死亡还需要进一步研究。同时脊髓爆震伤作为一种复合伤,冲击波的远达效应势必会使伤员同时存在肺、胃、肝等空腔脏器的损伤^[11]。那么这些脏器的损伤对机体整个微环境的改变,是否会参与到脊髓的继发性损伤机制当中去,也是需要我们重视的问题。

4 参考文献

1. 傅强,侯铁胜,鲁凯伍,等.大鼠脊髓急性损伤后神经细胞凋亡及相关基因表达[J].中国脊柱脊髓杂志,2001,11(2):92-94.
2. Charriant C, Margail L, Represa A, et al. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(2):186-191.
3. 刘辉,尹庆水,夏虹,等.甲强龙对兔急性脊髓损伤后血、组织髓鞘碱性蛋白表达的影响[J].中国骨与关节损伤杂志,2006,21(3):191-193.
4. 马云青,罗卓荆,王建灵,等.一种可控性脊髓爆震伤模型的建立[J].中华实验外科杂志,2007,24(1):104-105.
5. Liu X, Xu XM, Hu R, et al. Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury [J]. J Neurosci, 1997, 17(14):5395-5406.
6. Bauman RA, Ling GS, Tong L, et al. An introductory characterization of a combat-casualty-care relevant swine model of closed head injury resulting from exposure to explosive blast [J]. J Neurotrauma, 2009, 26(6):841-860.
7. Kato K, Fujimura M, Nakagawa A, et al. Pressure-dependent effect of shock waves on rat brain: induction of neuronal apoptosis mediated by a caspase-dependent pathway [J]. J Neurosurg, 2007, 106(4):667-676.
8. Wang GY, Hiraik, Sjimada H, et al. Behavior of axons Schwann cells and perineurial cells in nerve regeneration with in implanted nerve grafts[J]. Brain Res, 1992, 583:215-223.
9. Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, et al. Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2008, 28(14):3814-3823.
10. Ling G, Bandak F, Armonda R, et al. Explosive blast neurotrauma[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(6):815-825.
11. 雷鹏,朱诚,张光雾,等.7.62MM 弹颅脑伤时冲击波远达效应对内脏损伤的研究[J].中华神经外科杂志,1990,6(4):290-293.

(收稿日期:2009-06-02 修回日期:2009-08-04)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)