

- China J Orthop Trauma, 2013, 26(1):54-58. Chinese with abstract in English.
- [7] 王淑颖. 杨兆钢用针刺秩边透水道治愈前列腺增生 1 例[J]. 世界中医药, 2011, 6(3): 206.
- Wang SY. One case of prostatic hyperplasia cured by Yang Zhao-gang used Zhibian through Shuidao points acupuncture treatment [J]. Shi Jie Zhong Yi Yao, 2011, 6(3): 206. Chinese.
- [8] Hwang L, Choi IY, Kim SE, et al. Dexmedetomidine ameliorates intracerebral hemorrhage-induced memory impairment by inhibiting apoptosis and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1047-1056.
- [9] Sung YH, Kim SC, Hong HP, et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice [J]. Life Sci, 2012, 91(25-26): 1309-1316.
- [10] Kim DH, Ko IG, Kim BK, et al. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury induced hippocampal apoptosis [J]. Physiol Behav, 2010, 101: 660-665.
- [11] 唐祎周, 孙忠人, 张翀. 夹脊电针对脊髓损伤大鼠内质网应激相关因子 IRE1 影响的实验研究 [J]. 针灸临床杂志, 2013, 29(8): 55-58.
- Tang YZ, Sun ZR, Zhang C. Experimental study on the apoptosis and IRE1 protein expression in spinal cord injury (SCI) rats by electroacupuncture (EA) [J]. Zhen Jiu Lin Chuang Za Zhi, 2013, 29(8): 55-58. Chinese.
- [12] 刘智斌, 牛文民, 杨晓航, 等. “嗅三针”对阿尔茨海默病大鼠海马 Bcl-2 和 Bax 表达的干预效应 [J]. 针刺研究, 2011, 36(1): 7-11.
- Liu ZB, Niu WM, Yang XH, et al. Effect of "Xiusanzhen" on expression of hippocampal Bcl-2 and Bax proteins in Alzheimer disease rats [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2011, 36(1): 7-11. Chinese.
- (收稿日期: 2014-12-24 本文编辑: 李宜)

## 油红 O 染色在大鼠脊髓损伤中的应用

张舵, 寨旭, 贺西京

(西安交通大学第二附属医院骨二科, 陕西 西安 710004)

**【摘要】** 目的: 探讨油红 O 染色在评价大鼠脊髓损伤中的应用价值。方法: 选取体重 220~260 g 的 SD 雄鼠 24 只, 编号后简单随机抽样分为正常对照组与脊髓横断组, 正常对照组 6 只, 脊髓横断组 18 只。脊髓横断组于 T<sub>10</sub> 节段横断脊髓。于术后 1、2、4 周在脊髓横断组分别随机各抽取 6 只处死, 以横断部位为中心取脊髓组织标本。正常组取相同部位脊髓组织标本, 行冰冻切片, 进行油红 O 染色观察。结果: 正常对照组大鼠脊髓白质均匀着色, 与灰质有较明显的区分。脊髓横断组在术后 1、2、4 周时白质着色不均匀, 断端液化坏死灶呈进行性扩大, 油红 O 染色逐渐明显。结论: 油红 O 染色能够较明显的区分白质及灰质, 在一定程度上反映了白质的完整程度。断端坏死灶内油红 O 染色随脊髓损伤时间的延长逐渐明显反映了脂质在脊髓损伤过程中起着重要作用。

**【关键词】** 油红 O; 脊髓损伤; 大鼠; 动物实验

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.08.014

**Application of oil red O staining in spinal cord injury of rats** ZHANG Duo, ZHAI Xu, and HE Xi-jing. The Second Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004 Shaanxi, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the value of the application of oil red O staining in spinal cord injury (SCI) of rats. **Methods:** With simple randomization, 24 Spargue-Dawley male rats were divided into normal control group including 6, and SCI group including 18. Spinal cord was transected at spinal lever T<sub>10</sub> to build SCI model. Six rats of SCI group were sacrificed randomly at 1, 2, 4 weeks after surgery. After the spinal cord tissue sections were made, oil red O staining methods were used to observe the changes at the end of transected spinal cord. Images were analyzed by Image-Pro Plus 6.0 and SPSS 20.0 software. **Results:** The oil red O staining of normal control group showed that white matter surrounded by myelin sheath was clear and obviously distinctive from grey matter. Uneven and strengthened staining in oil O was observed in grey matter of SCI group at 1, 2, 4 weeks post-SCI. **Conclusion:** It is a good method to label the myelin sheath in spinal cord and distinct white matter from grey matter by oil red O staining. Analysis of the images showed that lipid may become another target for drugs, which needs more researches.

**KEYWORDS** Oil red O; Spinal cord injury; Rats; Animal experimentation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(8): 738-742 www.zggszz.com

通讯作者: 贺西京 E-mail: xijing\_h@vip.tom.com

Corresponding author: HE Xi-jing E-mail: xi-jing\_h@vip.tom.com

随着社会、经济的不断发展,因工伤、交通事故、运动等意外导致的脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)逐年增加。近年来,医疗技术有了长足的进步,但对于脊髓损伤仍缺乏切实、有效的治疗方法。脊髓损伤已然成为高致残率的疾病,给患者、家庭造成了巨大的心理和经济负担,同时带来了许多社会问题。了解脊髓损伤后的病理变化特点及演变过程是治疗脊髓损伤的前提条件。脊髓损伤后的病理改变是相当复杂的,其涉及脊髓的各种组织,包括灰质、白质、神经细胞、神经纤维、神经胶质细胞、脊髓内血管等等。目前,对脊髓损伤治疗的评价标准主要是运动功能评分及神经纤维再生。而评价神经纤维再生的主要方法是对神经丝蛋白(neurofilament, NF)行免疫组化或荧光<sup>[1-2]</sup>染色或轴突示踪。这些方法操作复杂,不利于推广。同时,神经丝蛋白免疫组化染色或轴突示踪仅能部分反映神经轴突的恢复,并不能反映髓鞘(myelin sheath)的情况。而神经纤维的功能是与髓鞘密不可分的。髓鞘包裹在神经元的轴突外,其主要成分为鞘磷脂,脂质成分占髓鞘干重的 70%~85%<sup>[3]</sup>。脊髓损伤后轴突断裂,髓鞘同时遭到破坏,能够在一定程度上反映损伤的程度。而其在损伤后的代谢也可能对脊髓损伤的恢复产生影响。因此,本研究采用油红 O 染色,比较正常及横断损伤后脊髓的改变,分析油红 O 染色在脊髓损伤中的应用价值。

1 材料与方

1.1 材料

成年 SD 雄性大鼠 24 只,体重 220~260 g。由西安交通大学实验动物中心提供。油红 O、戊巴比妥

钠、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、盐酸、多聚甲醛、蔗糖等均购自 Sigma 公司。冰冻切片(Thermo 公司,美国),倒置显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将 24 只 SD 大鼠随机分为两组,分别为正常对照组和脊髓横断组,正常对照组 6 只,脊髓横断组 18 只。正常对照组不做任何处理,脊髓横断组进行脊髓横断模型制备。

1.2.2 脊髓横断模型制备 大鼠称重后使用 2% 戊巴比妥钠以 25 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉。麻醉成功后将大鼠俯卧位固定于无菌手术台上,背部手术区域备皮、消毒、铺巾。以 T<sub>10</sub> 为中心作长约 2 cm 的纵行皮肤切口,逐层剪开皮肤、筋膜,钝性分离椎旁肌肉及软组织,无菌纱布止血,切除 T<sub>9</sub>、T<sub>10</sub> 棘突,咬去 T<sub>10</sub> 全部椎板,充分暴露 T<sub>10</sub> 节段脊髓。小圆针穿手术缝线,以针眼端自脊髓一侧绕过脊髓腹侧,自另一侧出来。轻轻提起缝线,以薄刀片滑断脊髓后,将手术缝线自横断后中拉出。横断后大鼠迅速出现摆尾反射,双后肢和躯体回缩扑动,最终呈现软瘫。压迫止血,用生理盐水和庆大霉素反复冲洗伤口后逐层缝合切口(图 1)。

1.2.3 术后动物饲养 动物室温分笼饲养,自由饮食。脊髓横断组术后每 8 h 膀胱区按摩排尿。术后 3 d,每天应用青霉素 20 U/只腹腔注射预防感染。

1.2.4 取材、切片<sup>[4]</sup> 脊髓横断组分别于术后 1、2、4 周随机抽取 6 只大鼠麻醉,以横断部位为中心,取长约 1 cm 的脊髓组织。术前将正常对照组 6 只大鼠麻醉,取与横断组对应部位的脊髓组织。4%多聚甲

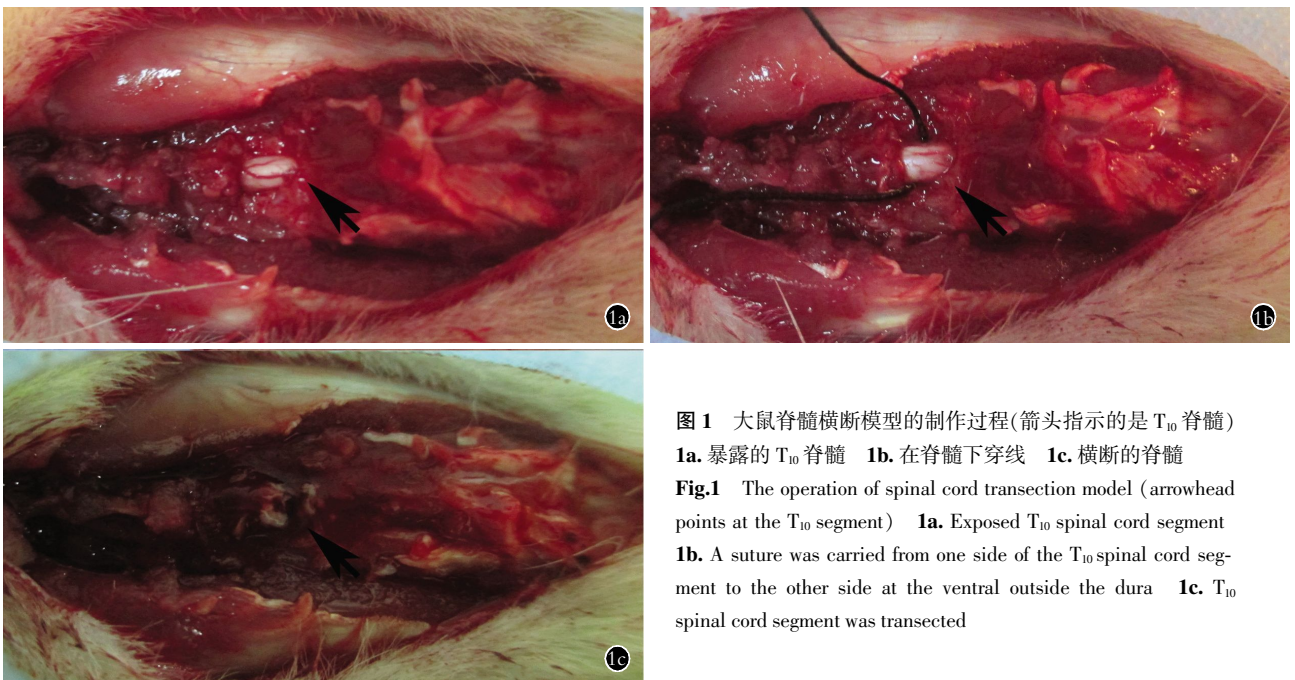


图 1 大鼠脊髓横断模型的制作过程(箭头指示的是 T<sub>10</sub> 脊髓)

1a. 暴露的 T<sub>10</sub> 脊髓 1b. 在脊髓下穿线 1c. 横断的脊髓

Fig.1 The operation of spinal cord transection model (arrowhead points at the T<sub>10</sub> segment) 1a. Exposed T<sub>10</sub> spinal cord segment

1b. A suture was carried from one side of the T<sub>10</sub> spinal cord segment to the other side at the ventral outside the dura 1c. T<sub>10</sub> spinal cord segment was transected

醛固定 12 h 后依次放入 10%、20%、30%蔗糖溶液中梯度脱水。脊髓标本行冰冻纵切片,厚度 10 μm,见图 2。

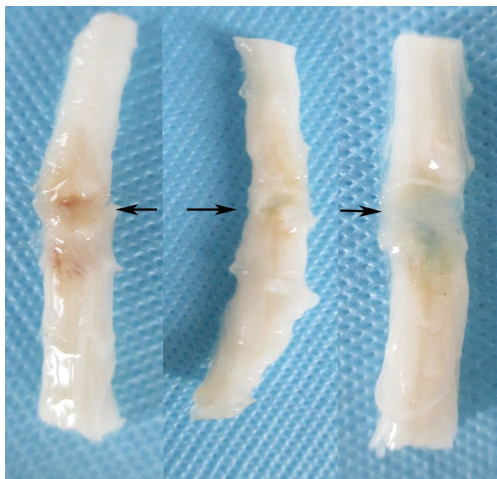


图 2 脊髓横断组动物术后的脊髓大体标本,从前至后依次为术后 1,2,4 周,箭头所示为脊髓横断处

Fig.2 Spinal cord tissue samples of SCI group, 1, 2, 4 weeks postoperatively in turn (arrowhead points at the transected site)

**1.2.5 染色** 油红 O 染色<sup>[5]</sup>:取 0.5%油红 O/异丙醇储存液与蒸馏水按 3:2 比例混匀,静置 10 min 后过滤获得油红 O 染液。切片用甲醛-钙固定 10 min,蒸馏水冲洗后 60%异丙醇浸洗。将组织切片置于预先配置好的油红 O 染液中浸染 10~15 min,60%异丙

醇漂洗至背景无色后蒸馏水清洗。在 Harris 苏木精染液中复染 30 s 后,盐酸、乙醇适度分色。室温中放置稍干后甘油明胶封片。苏木精-伊红染色(HE):常规 HE 染色。

**1.3 观察项目与方法**

**1.3.1 术后行为观察** 观察记录大鼠双后肢肌张力、反射、大小便及一般状态。

**1.3.2 HE 染色组织切片观察** 分别于 4、20、40 倍镜下观察脊髓 HE 染色组织切片。

**1.3.3 油红 O 染色组织切片观察** 分别于 4、20、40 倍镜下观察脊髓油红 O 染色组织切片。于 20 倍镜下对距断端 1 mm 处脊髓灰质拍照,选取正中 500×500 像素图,以 Image Pro Plus 6 软件进行图像分析,计算油红 O 染色面积及面积比。染色面积由 2 位实验无关的调查者计算后平均得出。染色面积与照片面积 250 000 相比即得面积占比。

**1.4 统计学处理**

所有实验数据采用 SPSS 19.0 软件包处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异采用单因素方差分析(One Way ANOVA)比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 行为观察**

脊髓横断组伤后第 1 周,大鼠双后肢软瘫,肌张力消失,损伤平面以下反射消失,对冷热及疼痛刺激无反应。尿潴留,排尿需人工按压。术后第 2 天可恢

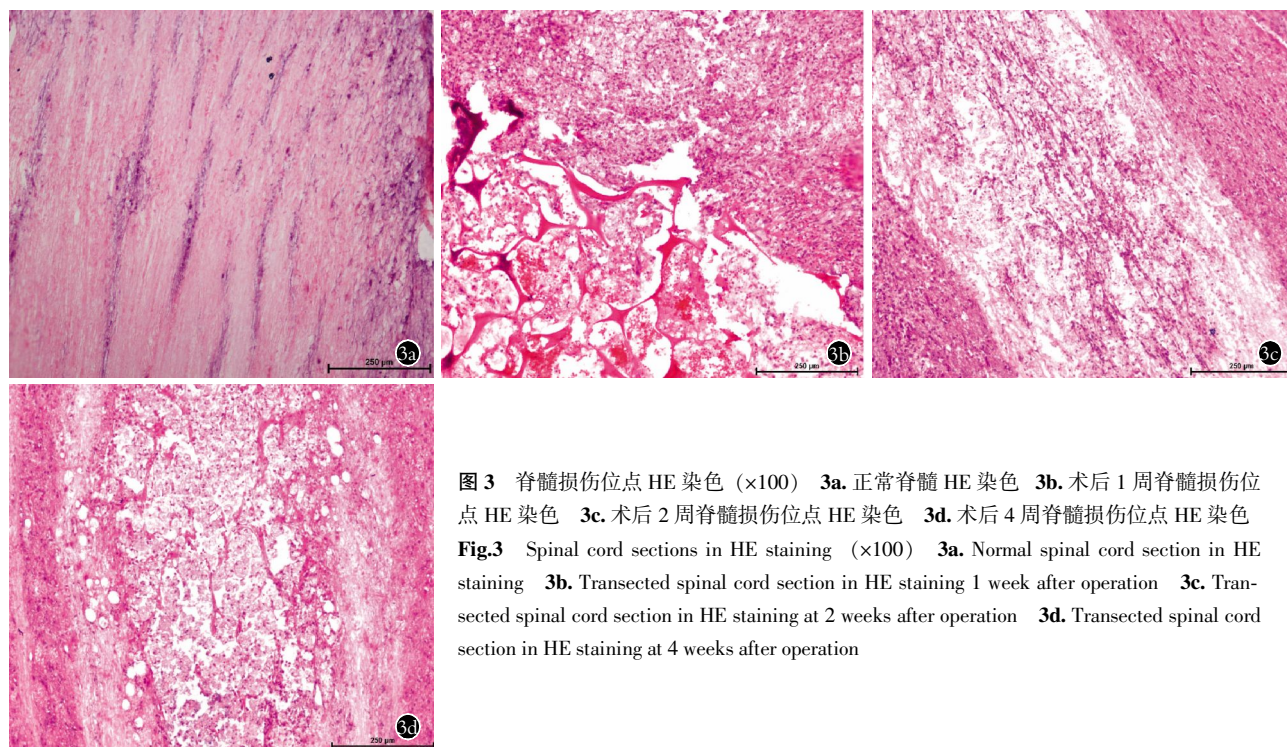
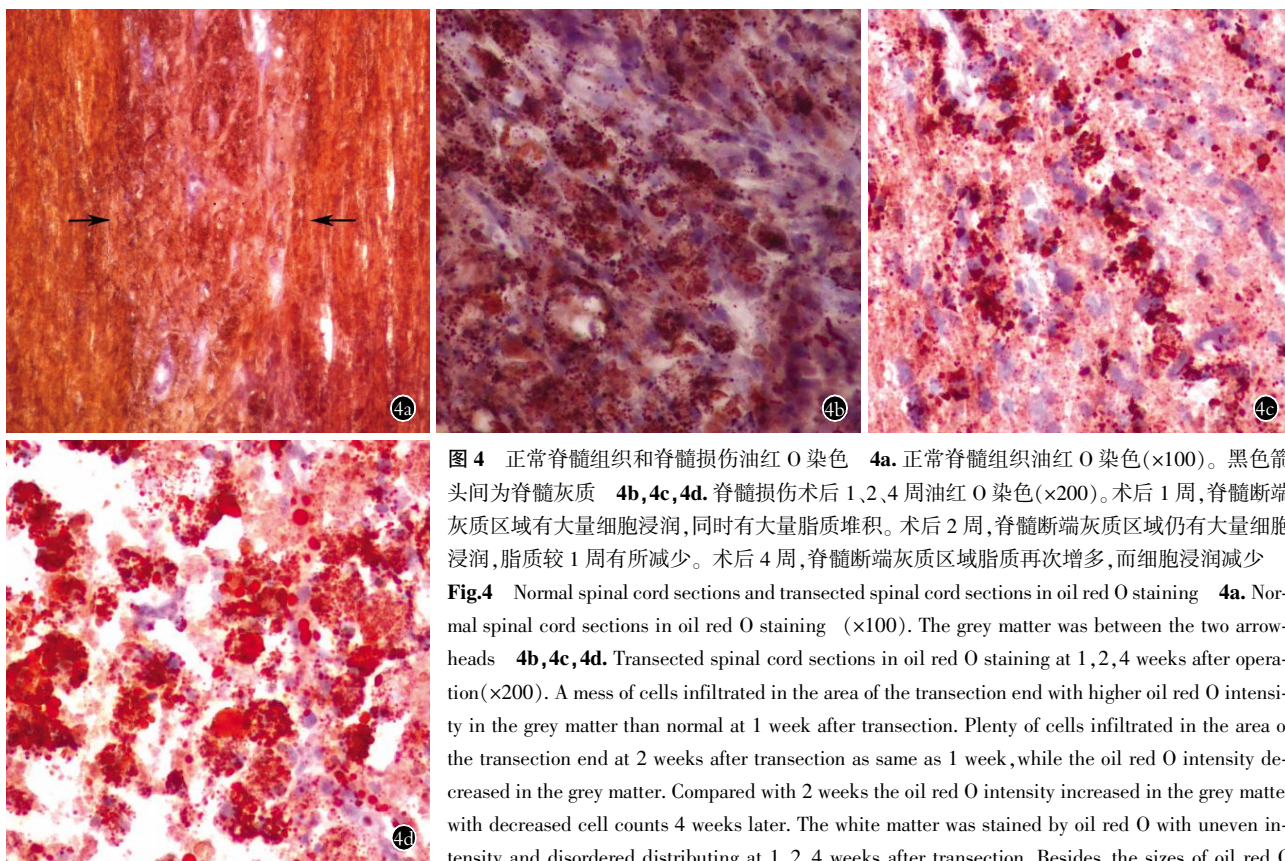


图 3 脊髓损伤位点 HE 染色 (×100) 3a. 正常脊髓 HE 染色 3b. 术后 1 周脊髓损伤位点 HE 染色 3c. 术后 2 周脊髓损伤位点 HE 染色 3d. 术后 4 周脊髓损伤位点 HE 染色

Fig.3 Spinal cord sections in HE staining (×100) 3a. Normal spinal cord section in HE staining 3b. Transected spinal cord section in HE staining 1 week after operation 3c. Transected spinal cord section in HE staining at 2 weeks after operation 3d. Transected spinal cord section in HE staining at 4 weeks after operation



**图 4** 正常脊髓组织和脊髓损伤油红 O 染色 **4a.** 正常脊髓组织油红 O 染色( $\times 100$ )。黑色箭头间为脊髓灰质 **4b, 4c, 4d.** 脊髓损伤术后 1、2、4 周油红 O 染色( $\times 200$ )。术后 1 周, 脊髓断端灰质区域有大量细胞浸润, 同时有大量脂质堆积。术后 2 周, 脊髓断端灰质区域仍有大量细胞浸润, 脂质较 1 周有所减少。术后 4 周, 脊髓断端灰质区域脂质再次增多, 而细胞浸润减少  
**Fig.4** Normal spinal cord sections and transected spinal cord sections in oil red O staining **4a.** Normal spinal cord sections in oil red O staining ( $\times 100$ ). The grey matter was between the two arrowheads **4b, 4c, 4d.** Transected spinal cord sections in oil red O staining at 1, 2, 4 weeks after operation ( $\times 200$ ). A mess of cells infiltrated in the area of the transection end with higher oil red O intensity in the grey matter than normal at 1 week after transection. Plenty of cells infiltrated in the area of the transection end at 2 weeks after transection as same as 1 week, while the oil red O intensity decreased in the grey matter. Compared with 2 weeks the oil red O intensity increased in the grey matter with decreased cell counts 4 weeks later. The white matter was stained by oil red O with uneven intensity and disordered distributing at 1, 2, 4 weeks after transection. Besides, the sizes of oil red O staining spots were increased along with time

复自动排便。第 2 周开始双后肢肌张力逐渐增高, 牵张反射亢进。饮食正常。饲养期无意外死亡(以上动物处死后解剖证实脊髓均完全离断)。正常对照组大鼠双后肢肌张力、反射、大小便均正常, 一般状况良好。

### 2.2 HE 染色组织切片观察

脊髓横断后, 断端自切使第 2 切断面形成, 自切的一段与脊髓脱离, 反复进行直至两断端内各形成一囊腔。伤后 1 周损伤区有大量神经胶质浸润, 有较多的结缔组织细胞及少量胶原纤维。伤后 2 周神经胶质细胞进一步增多, 至 4 周时仍有明显的神经胶质细胞浸润, 损伤平面头尾两侧区内无明显结缔组织形成(图 3)。

### 2.3 油红 O 染色组织切片观察

正常脊髓组织, 白质被均匀染成橘红色, 呈连续线状。灰质部分着色较浅, 可见被苏木素染成蓝色的神经元细胞核(图 4a)。术后 1 周, 脊髓断端灰质区域有大量细胞浸润, 同时有大量脂质堆积。术后 2 周, 脊髓断端灰质区域仍有大量细胞浸润, 脂质较 1 周有所减少。术后 4 周, 脊髓断端灰质区域脂质再次增多, 而细胞浸润减少。术后 1、2、4 周白质部分仍被油红 O 染成橘红色, 但排列杂乱, 不规则(图 4a,

4b, 4c)。经过 Image-Pro Plus 软件计算油红 O 染色面积并用 SPSS 20.0 软件分析, 术后 1 周染色面积为  $(9\ 605.00 \pm 327.87)$  像素<sup>2</sup>, 占比为  $(3.84 \pm 0.03)\%$ ; 术后 2 周染色面积为  $(6\ 115.50 \pm 322.20)$  像素<sup>2</sup>, 占比为  $(2.45 \pm 0.13)\%$ , 与第 1 周和第 4 周比较差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ), 术后 4 周染色面积为  $(16\ 785.33 \pm 332.21)$  像素<sup>2</sup>, 占比为  $(6.72 \pm 0.13)\%$ , 与第 1 周比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。见表 1。

**表 1** 脊髓横断术后不同时间油红 O 染色面积和面积占比情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

<b>Tab.1 Data of oil red O staining area and area proportion in SCI group (<math>\bar{x} \pm s</math>)</b>			
手术时间	鼠数	染色面积(像素 <sup>2</sup> )	面积占比(%)
术后 1 周	6	9605.00 $\pm$ 327.87	3.84 $\pm$ 0.13
术后 2 周	6	6115.50 $\pm$ 322.20	2.45 $\pm$ 0.13
术后 4 周	6	16785.33 $\pm$ 332.21	6.72 $\pm$ 0.13

注: 术后 1 周与 2 周相比,  $P < 0.001$ ; 术后 2 周与 4 周相比,  $P < 0.001$ ; 术后 1 周与 4 周相比,  $P < 0.001$

Note: Comparison between 1 week and 2 weeks after operation,  $P < 0.001$ ; comparison between 2 weeks and 4 weeks after operation,  $P < 0.001$ ; comparison between 1 week and 4 weeks after operation,  $P < 0.001$

### 3 讨论

脊髓损伤实验研究的观察方法, 主要包括脊髓功能观察、神经电生理检查、组织学观察和分子生物学研究等。而对损伤脊髓的组织学观察是评价脊髓损伤及恢复的核心。对损伤的脊髓损伤的组织学观察方法包括早期的镀银染色及 70 年代后期发展的辣根过氧化物酶<sup>[6]</sup>(horseradish peroxidase, HRP) 技术, 以及现在广泛使用的免疫组织化学方法。

#### 3.1 油红 O 染色能够区分灰质与白质

脊髓主要由神经元(neuron, 即神经细胞)和神经胶质细胞(neuroglia cell)两部分组成。其中少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs)最主要的一个功能就是产生包绕轴突的髓鞘。在脊髓中, 每条神经纤维均有髓鞘包绕, 形成郎飞结(node of Ranvier), 促进神经冲动的传导。髓鞘的主要成分为鞘磷脂。显示髓鞘常用的染色方法有 Loyez 碳酸锂苏木精法、Marchi 钼酸染色法等。但以上方法操作繁琐, 染色步骤多, 试剂昂贵, 限制了其应用。油红 O 是一种偶氮染料, 是很强的脂溶剂和染脂剂, 能溶于组织和细胞中的脂质中, 溶解度较溶剂中大。因此, 当组织切片置入油红 O 染液时, 染料从染液进入组织内的脂质中, 使组织内的脂质呈橘红色。本实验中, 经油红 O 染色后可将脊髓白质与灰质结构清晰区分, 红色亮丽, 与组织背景对比明显。

#### 3.2 油红 O 染色能够反映神经纤维再生

神经纤维受到外伤断裂后, 远端神经纤维会发生一系列变化。断端远侧的轴突很快发生变性、解体, 髓鞘随之破坏, 即华勒变性<sup>[7]</sup>。在脊髓损伤早期(2~48 h), 损伤处微环境的改变使得 OLs 等细胞大量死亡<sup>[8]</sup>。随着血脑屏障的破坏、中性粒细胞及血源性巨噬细胞的渗入、小胶质细胞及星形胶质细胞的激活<sup>[9-10]</sup>, 破坏的髓鞘可以逐渐被吞噬、降解。继而神经胶质抗-2 阳性和血小板源性生长因子受体阳性的少突胶质细胞前体细胞(oligodendrocytes progenitor cell, OPC)可以分化为新生的 OLs。即表现为脊髓横断后油红 O 染色面积在 1 周时较明显, 2 周时减少, 至 4 周时增加的变化过程。而与正常脊髓油红 O 染色相比, 1、2、4 周着色点不均匀、连续, 侧面反映了神经纤维的再生并不理想。

综上所述, 在脊髓横断损伤大鼠模型中, 通过油红 O 染色能够特异性地将脊髓灰质及白质清晰区分, 界限明显, 对神经髓鞘有良好的标记作用。断端灰质处染色的增加也说明脂质肯能在脊髓损伤过程中扮演重要的角色。总之, 油红 O 染色具有操作简单、易于掌握的特点, 可作为评价脊髓损伤及恢复的可靠的实验方法。

#### 参考文献

- [1] Wang LJ, Zhang RP, Li JD. Transplantation of neurotrophin-3-expressing bone mesenchymal stem cells improves recovery in a rat model of spinal cord injury[J]. Acta Neurochirurgica, 2014, 156(7): 1409-1418.
- [2] Jia YJ, Wu D, Zhang RP, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing the Shh transgene promotes functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. Neuroscience Letters, 2014, 573: 46-51.
- [3] Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, et al. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth[J]. Nature Neuroscience, 2005, 8(4): 468-475.
- [4] Lan WB, Lin JH, Chen XW, et al. Overexpressing neuroglobin improves functional recovery by inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury[J]. Brain Research, 2014, 1562, 100-108.
- [5] Steelman AJ, Thompson JP, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication[J]. Neuroscience Research, 2012, 72(1): 32-42.
- [6] Grant K, Guéritaud JP, Horcholle-Bossavit G, et al. Anatomical and electrophysiological identification of motoneurons supplying the cat retractor bulbi muscle[J]. Experimental Brain Research, 1979, 34(3): 541-550.
- [7] Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1850, 140: 423-429.
- [8] Matis GK, Birbilis TA. Erythropoietin in spinal cord injury[J]. European Spine J, 2009, 18(3): 314-323.
- [9] Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, et al. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment[J]. Brain, 2010, 133(2): 433-447.
- [10] Wang L, Hu B, Wong WM, et al. Glial and axonal responses in areas of Wallerian degeneration of the corticospinal and dorsal ascending tracts after spinal cord dorsal funiculotomy[J]. Neuropathology, 2009, 29(3): 230-241.

(收稿日期: 2014-10-20 本文编辑: 王宏)