

三种脊髓损伤类型中巨噬细胞反应情况的观察

陈述祥¹, 靳安民², 姚伟涛²

(1. 江门市五邑中医院暨南大学医学院第六附属医院骨科, 广东 江门 529031; 2. 第一军医大学珠江医院全军骨科中心)

摘要 目的:对巨噬细胞在脊髓撞击伤、半横切缺损及半横切缺损加周围神经移植三种不同脊髓损伤类型中反应的时间性、区域性分布特点进行研究。方法:将 54 只雄性、体重为 200~250 g 的 SD 大鼠采用随机配对的方法分为 3 组,每组大鼠分别采用上述不同致伤方法造成 T₁₀段脊髓损伤,在损伤后 1、4 d 和 1、2、3、4 周收集脊髓标本并沿脊髓长轴冰冻切片、抗体 ED1 染色显示活性巨噬细胞,显微镜下细胞计数。结果:巨噬细胞在三种不同损伤类型中主要分布于损伤部位及其周围区域,但细胞数目和细胞密度在不同损伤类型中存在明显差异。结论:巨噬细胞是反应脊髓损伤程度,并伴随轴突变性和再生的一种主要炎性细胞。

关键词 脊髓损伤; 巨噬细胞; 免疫组化

Reaction of macrophages in three kinds of spinal cord injuries CHEN Shu-xiang, JIN An-min, YAO Wei-tao. Jiangmen Wuyi Hospital of TCM, the 6th Affiliated Hospital Jinan University Medical College, (Guangdong Jiangmen, 529031, China)

Abstract Objective: To study character of activated macrophages at three different types of spinal cord injuries, such as contusion, semi-section and peripheral nerve transplantation in time and location response to trauma. **Methods:** 54 male Sprague-Dawley rats were divided randomly into three groups, every group were respectively made spinal injury at the T₁₀, according to different methods. At the 1, 4 days and 1, 2, 3, 4 weeks after injury, each specimen of spinal cord were collected and were cut into along longitudinal frozen sections and stained with antibody ED1, displaying activated macrophages, then the numbers of them were counted under microscope. **Results:** We found that in different type of injuries, macrophages distributed in zone of crush site and vicinity to the site, but their numbers and densities in different site were significantly correlated with the amount of tissue damage at each tissue. **Conclusion:** Macrophages is a main inflammatory cell, which can reflect spinal injury level following axonal degeneration and regeneration.

Key words Spinal cord injuries; Macrophages; Immunohistochemistry

炎性细胞是导致脊髓继发性损伤的主要原因之一,目前研究较多的是巨噬细胞^[1],本文观察了在大鼠脊髓撞击伤、半横切缺损和半横切缺损加周围神经移植等三种情况下,巨噬细胞反应的时程和分布特点,并从形态学方面探讨了脊髓损伤后巨噬细胞作用的特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验采用第一军医大学动物中心提供的 SD 雄性大鼠 54 只,体重 200~250 g,根据

损伤类型,采用随机配对的方法分为 3 组,每组分为 6 个时间点。每组大鼠分别造成 T₁₀段脊髓撞击伤、半横切缺损及半横切缺损加周围神经移植等三种不同模型,并由动物饲养中心喂养。术后如出现动物死亡,则该组大鼠从实验中删除,并用上述方法重新补充大鼠。

1.2 动物模型的制备

1.2.1 脊髓撞击伤模型的制备 以 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉。麻醉后大鼠俯卧位,固定于立体定向仪上,手术切除 T₉₋₁₁段全椎板。用改良 Allen 装置造成 T₁₀段脊髓撞击伤,即用 20 g 的不

通讯作者:陈述祥 Tel: 0750-3528288-3213 E-mail: Xuhuachen@163.net

锈钢棒从 2.5 cm 高处沿玻璃导管垂直下落,打击在由尼龙材料制成的底端呈凹面、直径为 3 mm 的撞杆上,后者将打击传递给脊髓。造成 50 g/cm² 的致伤力,此致伤量可造成大鼠不完全性截瘫。

1.2.2 脊髓半横切缺损模型的制备 麻醉及固定同上,切除 T₉₋₁₁段左侧半椎板,显微镜下在硬脊膜背部中央血管左侧 1 mm 处用显微手术剪切除 T₁₀段左侧半脊髓及硬脊膜,形成长 3 mm 的脊髓缺损,止血后逐层缝合。

1.2.3 脊髓半横切缺损加周围神经移植模型的制备 在上述脊髓半横切缺损模型基础上,显露左侧第 12 肋间神经并小心游离后切除,制成长约 3~4 mm 神经段后填充于脊髓缺损处,术中应保持神经头尾端与脊髓一致,且移植神经同脊髓断端紧密接触,逐层缝合。术后协助大鼠完成大小便排泄功能。

1.3 术后神经学功能评分 分别于脊髓损伤后 1、2、4 周对大鼠双下肢采用改良 Tarlov 神经学功能评分,即:无自主性运动(0分);仅限于髌膝关节的非反射性运动(1分);髌、膝、踝 3 个主要关节的运动(2分);能主动支持体重和不协调步态,或偶尔出现协调步态(3分);前肢和后肢协调的步态,行走时有趾间关节的运动(4分);正常步态(5分)。

1.4 免疫组化染色 术后第 1、4 天和第 1、2、3、4 周用 4% 多聚甲醛 (pH7.4) 经心脏灌注,分批处死大鼠,切取损伤区脊髓,长约 1~2 cm,放入 30% 蔗糖中下沉后,置 -20℃ 恒温箱切片内沿脊髓纵轴切片,片厚 40 μm。切片采用 ABC 法进行免疫组化染色,应用小鼠抗大鼠 ED1 显示活性巨噬细胞,用正常胎牛血清代替一抗作为阴性对照。

1.5 细胞及损伤区神经纤维计数 在放大 20 (物

镜)倍的光学显微镜下,切片及血球计数板网格照相,图片经扫描仪输入计算机,分别在损伤区利用血球计数板网格(每个网格为 1 μm²)连续计数 10 个相邻区域细胞数目并取平均值。计数细胞的标准:细胞完整、清晰,全部存在于视野区。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 8.0 数据包对数据进行方差分析。

2 结果

2.1 大鼠存活情况及形态学观察结果 54 只大鼠术后死亡 16 只,死亡时间在伤后 1~7 d,死因多为大小便排出困难。其中撞击伤组的死亡数为 10 只,其他两组的各 3 只。脊髓损伤时,大鼠均发生结膜充血、呼吸加速及下肢反射性收缩运动等症状。伤后 4 周内,受撞击伤大鼠均表现为双侧后肢拖地运动,Tarlov 评分 0 分。脊髓半横切缺损及神经移植的大鼠患侧下肢术后 Tarlov 评分 0~1 分,术后 4 周时 Tarlov 评分 1 分,肢体感觉和运动功能无明显改善。

2.2 病理学观察 脊髓撞击伤后 1 d,巨噬细胞主要位于损伤区,细胞数目较少,伤后 4~7 d 为反应高峰期,巨噬细胞在损伤区呈高密度分布,且在损伤区周围呈弥漫性扩散、阶梯状分布(距损伤区越远,细胞密度越低),细胞体积较大(图 1);伤后 3~4 周时巨噬细胞主要位于损伤区、中央灰质区和坏死后形成的空洞壁上,呈局域性分布,细胞体积变小。脊髓半横切缺损模型中,巨噬细胞主要分布在损伤区周围,呈带状分布,细胞数目较少(图 2),反应的高峰期同撞击伤;神经移植后,巨噬细胞数目明显下降,早期位于损伤区及移植神经的轴突之间,3~4 周时参与神经轴突的再生,并主要分布于脊髓的空腔内(图 3)。



图 1 撞击伤模型术后 4 天时见巨噬细胞弥漫性分布 (× 20) 图 2 脊髓半横切缺损损伤模型术后 1 周见巨噬细胞分布于损伤区边缘 (× 20) 图 3 神经移植术后 3 周见巨噬细胞沿再生轴突进行分布,箭头所示 (× 10)

Fig.1 The 4th day after impact injury model, light microscope showed diffuse distribution of macrophages (× 20) Fig.2 Semi-transsections model of spinal cord defect in the 1st week after operation, macrophages were distributed on the border of injury area (× 20) Fig.3 The 3rd week after nerve transplantation, distribution of macrophage was along regenerative axon (× 10)

本研究结果发现以下规律：不同损伤模型中，巨噬细胞在伤后逐步增加，伤后 4~7 d 为高峰期，此后细胞数目逐步下降，这同 Leskovar 等^[2]人实验结果相一致。巨噬细胞在不同损伤模型中分布情况不同。在撞击伤模型早期，巨噬细胞在损伤区和损伤以外较远区呈高密度、较均一的分布；后期则位于损伤后形成的空洞壁和中央灰质等区域。在半横切缺损模型中，巨噬细胞带状分布于切割后形成的洞壁上，细胞密度随远离损伤部位而迅速下降；且在损伤以外区域未见巨噬细胞分布。在神经移植模型中，巨噬细胞早期分布于洞壁和移植的神经区域，但细胞密度明显小于其他两种模型；在损伤后期巨噬细胞主要分散位于洞壁，并随再生轴突而呈束状分

布。细胞数目呈明显差异性。撞击伤模型 > 脊髓半横切缺损模型 > 神经移植模型。研究结果提示：a 巨噬细胞在损伤区分布状况同致伤因素明显相关，并随损伤的加重，细胞数目显著增加；b 巨噬细胞不仅分布于损伤区，并可扩散于损伤以外较远区域，这在中央灰质区表现更为明显；c 巨噬细胞不仅参与脊髓损伤，而且参与轴突的再生。这同巨噬细胞对脊髓损伤有营救作用相吻合。

2.3 三种损伤模型中巨噬细胞的数目 见表 1。

3 讨论

ED1 是特异性结合于活性巨噬细胞溶酶体膜上表达的一种单链糖蛋白，因而可检测出脊髓损伤后有功能活性的巨噬细胞。Dailey 等^[3]的研究认为巨

表 1 巨噬细胞在三种损伤模型中的数目 (个/mm²)

Tab. 1 Number of macrophages in different injury model (piece/mm²)

损伤类型	伤后 1 d	伤后 4 d	伤后 1 周	伤后 2 周	伤后 3 周	伤后 4 周
脊髓撞击伤	684.5 ±42.7	1484.7 ±75.6 **	1678.1 ±88.6 **	1275.5 ±84.3 **	973.4 ±51.7 *	771.1 ±46.3
脊髓半横切	366.9 ±27.4	678.1 ±57.6 **	794.3 ±63.7 ***	642.8 ±72.4 **	488.4 ±58.1 *	427.0 ±37.2 *
脊髓半横切缺损加周围神经移植	427.7 ±43.5 *	494.4 ±52.1 **	521.5 ±43.7 **	384.8 ±27.6 *	336.5 ±41.6	319.7 ±38.5

注：统计方法：One Way ANOVA, F=13.822 P<0.01；两两比较采用最小差异法 - LSD 法检测。*、**、***表示不同时间段组间差异

噬细胞通过以下方式进入损伤局部：由损伤局部破坏的血管壁漏出到血管外；血源性小胶质细胞分泌的活性因子使血脊髓屏障的通透性增加，并激活局部剩余的小胶质细胞，其浓度随距离的增加而逐步稀释，因而使局部的炎细胞增加；神经的损伤导致局部胶质细胞分泌可扩散的因子，如白细胞介素 - 1(IL - 1)、肿瘤坏死因子 - (TNF -) 等各种细胞素，它们激活局部的小胶质细胞转化为巨噬细胞。影响巨噬细胞游出并发挥作用的因素有^[4]：机械性致伤因素所致损伤的严重程度，如横断伤、撞击伤、缺血损伤、感染性损伤等对巨噬细胞的刺激作用均不同。这同本文的研究结果相吻合。残余的存活组织与渗出的炎细胞之间的相互作用程度；血脑屏障的破坏部位同脊髓的损伤部位之间的距离及巨噬细胞的趋化能力；暴露于体液中的非中枢源性组织，如完整的蛋白、周围神经的伴行组织等。

一般而言，组织损伤后，局部炎症细胞聚集，释放炎症介质，同时清除坏死组织，促进组织细胞增生和修复创面。这是机体损伤后修复的基本过程。炎症细胞尤其是巨噬细胞的参与是组织修复的基本特征。Schwartz 等^[1]研究发现，在周围神经系统的变性与修复中，巨噬细胞起着决定性的作用。在轴突损伤后，其远端部分发生 Wallerian 变性—轴突崩解、

雪旺细胞变性坏死，巨噬细胞浸润并吞噬变性坏死的细胞及髓鞘残骸，同时提供轴突生长所需的细胞素及生长因子。但由于哺乳动物的中枢神经属于免疫豁免 (Immune privilege) 器官，为了保护自身稳定的功能，中枢神经系统有防止损伤后大量免疫细胞聚集的自我保护作用，损伤后局部炎症反应明显小于周围神经及其他组织^[5]，这是目前认为脊髓损伤后轴突再生困难的原因之一。

对巨噬细胞在中枢神经系统损伤和修复中的作用，目前有两种不同的观点：一种观点认为巨噬细胞对轴突生长有抑制作用。Shuman 等^[6]认为脊髓继发性损伤所致的细胞凋亡同炎症细胞的反应呈明显的相关性。脊髓损伤后早期灰质和轴突的变性坏死同小胶质细胞的活性有关，它可增加血脊髓屏障 (Blood - spinal cord barrier) 的通透性，释放炎症神经毒素 (Inflammatory neurotoxins)、化学激动剂 (Chemokines) 和细胞素等物质；而相同的变化在脊髓半横断损伤、缺血再灌注损伤、挤压伤等模型中均可表现出来。这些炎症反应可使损伤局部的变性坏死进一步扩大，导致脊髓的继发性损伤。另一种观点认为巨噬细胞对轴突的再生有促进作用^[7]。它可保护、恢复部分损伤的组织；清除损伤局部坏死的细胞及组织残骸，尤其轴突再生抑制物质——鞘磷脂源

性再生抑制因子;刺激和分泌细胞再生所需的营养物质如神经生长因子、白介素 - 1/6、胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor): 巨噬细胞的分泌物可调控轴突再生所需的细胞底物和蛋白酶等。而且这种观点正被越来越多的实验所证实。

本研究证实:巨噬细胞在脊髓的不同损伤模型中有截然不同的表现,它反映了脊髓损伤后不同程度的炎症反应。至于该细胞在不同脊髓损伤模型中的作用机制及效果,尚需进一步研究证实。

参考文献

- 1 Schwartz M, Lazarov Spiegler O, Rapalino O, et al. Potential repair of rat spinal cord injuries using stimulated homologous macrophages. *J Neurosci*, 1999, 44: 1041-1045.
- 2 Leskova A, Moriarty LJ, Turek JJ, et al. The macrophage in acute neural injury: Changes in cell numbers over time and levels of cytokine

- production in mammalian central and peripheral nervous systems. *J Exp Biol*, 2000, 203: 1783-1795.
- 3 Dailey AT, Avellino AM, Bentham L, et al. Complement depletion reduces macrophage infiltration and activation during Wallerian degeneration and axonal regeneration. *J Neurosci*, 1998, 18: 6713-6722.
 - 4 Popovich PG, Guan Z, Wei P, et al. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*, 1999, 158 (2): 351-365.
 - 5 Lazar DA, Ellegala DB, Avellino AM, et al. Modulation of macrophage and microglial responses to axonal injury in the peripheral and central nervous systems. *Neurosurgery*, 1999, 45 (3): 593-600.
 - 6 Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res*, 1997, 50: 798-808.
 - 7 Streit W, Rowland SL, Hurley SD, et al. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol*, 1998, 152 (1): 74-87.
- (收稿日期: 2003 - 07 - 09 本文编辑: 连智华)

新闻关注

中国科协直陈科学道德“七宗罪”

抄袭剽窃他人成果、伪造篡改实验数据、利用职权在自己并无贡献的论文或成果上署名、一稿多投……针对我国科学道德和学风建设方面暴露出的一些新问题, 2003 年下半年, 中国科协以座谈、走访方式先后在一些高等院校、科研院所、全国性学会开展了认真调查。目前, 中国科协科技工作者道德与权益工作委员会提出当前我国科学道德和学风建设中不端行为的 7 种表现形式和主要问题, 并就学术不端行为开出了“五味药方”。科学道德“七宗罪”表现形式和主要问题分别是:

一、抄袭剽窃他人成果。这种现象存在于少数科技人员中, 特别是少数硕士生、博士生和刚参加工作的青年学者中。

二、伪造篡改实验数据。这比抄袭剽窃他人成果造成的影响和后果更恶劣。

三、随意侵占他人科研成果。包括利用职权在自己并无贡献的论文或成果上署名, 把他人科研成果据为己有; 将通过会议、评审等过程获得的特殊信息和思想随意向外传播; 在论文被录用或成果获奖后任意修改作者排序和著作权单位等。

四、重复发表论文。通过一稿两投, 甚至一稿多投的方式把同样内容的一篇文章同时投给多个刊物; 将已在某一刊物发表的论文原封不动或者改头换面后重新投到另一刊物等。

五、学术论文质量降低和育人的不负责任。部分学者为提高自己论文的数量, 将原本可以用一篇完整的论文发表的科研成果, 分为多篇投稿, 降低了论文质量, 破坏了研究工作的系统性、完整性。

六、学术评审和项目申报中突出个人利益。

七、过分追求名利, 助长浮躁之风。部分科技工作者兼任太多的社会和学术职务, 整天忙于参加各种各样的会议, 重复获取各类资源, 真正用于科研的时间很少。

就学术不端行为开出了“五味药方”。包括:

一、积极倡导建立完善、科学的评价机制。在学位论文

答辩、学术论文发表、学术著作出版、科研项目立项及评估、学术职位的评聘与晋升、院士增选、科研成果及科技工作者的表彰奖励等方面, 建立健全公开、公平、公正的科学评价制度和评价机制。建议实行隐去作者姓名及单位的双盲评审制、国外同行专家评审制、一票否决制、回避制等一系列具体措施。

二、加强科学道德制度建设, 规范学术研究。要建立一套为广大科技工作者认识、了解, 并接受、遵守的规章制度, 正确引导和规范科技工作者的科研工作, 清除学术不端行为的温床。

三、加强科学道德和学术规范的普及性教育。充分利用报纸、电视、广播等新闻媒体, 加大宣传力度, 树立典型, 教育和引导广大科技工作者端正治学态度, 树立诚信观念和正确的人生观、价值观。要加强对青年一代, 尤其是高等院校、科研院所所在读研究生的科学道德和学术规范教育, 将科学道德和学术规范教育作为研究生教育的一项重要内容, 与学术培养同步进行。

四、增强科技工作者法律观念, 强化科技工作者法律意识。

五、健全监督约束机制, 大力开展学术批评。

中国科协科技工作者道德与权益工作委员会有关负责人说, 淡泊名利, 不求闻达, 孜孜不倦, 锲而不舍, 把毕生精力贡献给科学技术事业仍是科技人员人生目标的主流。但我国正处于市场经济快速发展、逐步完善的过程中, 科学道德和学风建设方面也出现了一些新情况, 暴露出一些新问题。一些不端行为即便是个别现象和少数人的行为, 也要引起重视。如果任其泛滥, 不仅败坏学风文风, 导致学术道德沦丧, 贻误年轻一代科技工作者的成长, 而且将损害中国学术界的声誉, 影响我国学术水平的提高, 甚至会阻碍我国科学技术的发展, 影响科教兴国战略的实施。

(摘自《北京日报》2004 年 2 月 16 日)