

大鼠慢性脊髓受压及减压后骨骼肌细胞的凋亡

刘京升, 孙正义, 王栓科, 汪玉良
(兰州医学院第二附属医院骨科, 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的: 研究大鼠慢性脊髓损伤受压及减压后骨骼肌细胞的凋亡。方法: 45 只 SD 大鼠分成 3 组: ①受压组 15 只, 作成慢性脊髓受压损伤模型; ②减压组 25 只, 在压迫模型作成 10 d 后取出压迫装置; ③正常对照组 5 只, 不做任何处理。应用 HE 染色、TUNEL 和原位杂交技术研究慢性脊髓受压及减压后肌细胞的萎缩和凋亡。结果: 正常组鲜见凋亡细胞, 受压组出现骨骼肌细胞凋亡, bcl 2 mRNA 表达减弱, Bax mRNA 表达增强; 减压后肌细胞凋亡数量明显减少, bcl 2mRNA 表达增强而 Bax mRNA 表达减少。结论: 慢性脊髓受压肌细胞凋亡是失神经骨骼肌萎缩的机制之一, bcl 2 和 Bax 基因参与肌细胞的凋亡。

关键词 脊髓损伤; 骨骼肌; 细胞凋亡

Apoptosis of skeletal muscle cells following chronic compression and decompression of rats spinal cord injury

LIU Jing-sheng, SUN Zheng-yi, WANG Shuan-ke, WANG Yu-liang. Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital, Medical School of Lanzhou (Gansu Lanzhou, 730000, China)

Abstract Objective: To study the apoptosis of skeletal musculocytes after chronic compression and decompression of the rat s spinal cord injury. **Methods:** Forty five SD rats were divided into three groups: Group A (chronic degree compressive injury of spinal cord) of fifteen samples and group B (decompression) of twenty-five samples and group C (normal control) of five samples. HE and TUNEL staining and hybridization in situ were used to investigate the apoptosis and atrophy of muscles. **Results:** Apoptosis nucleus of skeletal muscle were rarely seen in group C, but increased in group A and decreased in group B. The expression of bcl 2mRNA was decreased in group A and increased in group B, on the contrary, the expression of Bax mRNA increased in group A and decreased in group B. **Conclusion:** Apoptosis of musculus is an important morphological change after chronic compressive injury of spine cord. Apoptosis is one of the reason for atrophy of skeletal muscle. The expression of bcl 2 and Bax mRNA related with apoptosis of muscle following chronic compressed injury of spinal cord.

Key words Spinal cord injuries; Skeletal muscle; Apoptosis

慢性脊髓受压性损伤的治疗已取得了显著的进步, 但神经功能和运动功能的恢复仍不能令人满意, 研究骨骼肌失神经支配后发生一系列生理、生化和形态上的改变^[1], 防止或延缓周围神经损伤后的肌萎缩有重要临床价值^[2]。因此要进一步提高慢性压迫性脊髓损伤后运动功能恢复的疗效, 必须深入研究骨骼肌。本课题主要通过观察慢性压迫及减压后骨骼肌的凋亡及 bcl 2mRNA 和 Bax mRNA 的变化规律来探讨骨骼肌萎缩的机制。

1 材料与方 法

1.1 动物模型制作 45 只体质量 200~ 250 g SD 大鼠, 雌雄不限。用 1% 异戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉。①受压组 15 只: 取后正中切口, 切除 L₆ 棘突和部分椎板, 暴露硬脊

膜, 置入后路压迫装置。以后每隔 15 d 切开背部约 5 mm, 显露螺钉, 将螺钉旋入 0.25 mm, 分 2, 4, 6 次, 制成轻、中和重度脊髓受压; ②减压组 25 只: 在受压模型制作完成后 10 d 取出压迫装置, 分别于术后 1, 3, 7, 14, 28 d 取材; ③正常对照组 5 只: 不做任何处理。

1.2 病理标本制作 在各取材时间点先腹腔麻醉, 开胸左心室插管后剪开右心耳, 先灌注等渗盐水 200 ml, 再灌注体积分数为 4% 的多聚甲醛 200 ml, 然后取出腓肠肌, 立即在分析天平上称重后于肌肉中段切取一肌条放入多聚甲醛固定 48~ 72 h, 常规石蜡包埋连续切片, 片厚 4 μm, 分别做 HE、TUNEL 和原位杂交。

1.3 TUNEL TUNEL 法检测凋亡, 试剂盒为华美生物工程公司进口分装产品。步骤: ①石蜡切片脱蜡入水; ②20 μg/ml 蛋白酶 K 37 °C 孵育 30 min; ③三蒸水浸洗 5 min; ④体积分数

为 30% 的过氧化氢, 室温孵育 30 min; ⑤三蒸水浸洗 5 min; ⑥滴加标记缓冲液, 1 min 后加入生物素化 dUTP 及终末脱氧核糖核苷酸转移酶(TDT) 37 °C 孵育 60 min; ⑦封闭液终止反应, PBS 液浸洗 5 min; ⑧加 HRP 37 °C 孵育 30 min; ⑨PBS 液浸洗 5 min; ⑩二氨基联苯胺(DAB) 显色; ⑪苏木素复染, 分化, 梯度酒精脱水, 中性树脂封片。阴性对照以蒸馏水代替终末脱氧核糖核苷酸转移酶。阳性对照组先用 DNA 酶作用再行上述操作。每张玻片选取 5 个视野测灰度值。

1.4 原位杂交 切片经 68 °C 烘烤 2 h, 脱蜡, 水化, 蛋白酶 K 消化, 预杂交 2 h。每片滴加 0.02 ml 含地高辛标记 RNA 探针的杂交液, 42 °C 湿箱 36 h 杂交, 滴加抗地高辛 AP 复合物, 37 °C 1 h, 显色, 脱水封固, 常规设立阴性对照。每张玻片选取 5 个视野测灰度值。

1.5 统计学处理 所有数据均用均数±标准差表示, SAS 软件做方差分析。

2 结果

2.1 组织学检查结果 光镜下见对照组及轻度受压组呈正常肌肉形态结构, 重度受压组肌束间结缔组织增生; 减压后肌纤维逐渐增粗, 肌束间结缔组织减少。(见图 1)

2.2 腓肠肌湿重 轻度受压组肌肉湿重与正常组基本相同, 中度受压组腓肠肌湿重减小, 失去正常弹性; 重度受压组肌萎缩进一步加重; 随着减压时间的延长, 腓肠肌逐渐饱满有弹性, 湿重增加; 重度受压组与减压 28 d 组、正常对照组比较, 差异有显著性($P < 0.05$)。(见图 2)

2.3 TUNEL 阳性的细胞核呈棕褐色, 细胞核部位异常, 细胞核比正常小 1/2 或大 1 倍以上, 细胞核外形异常核边缘呈扇形或波浪状。结果正常的骨骼肌细胞鲜见凋亡细胞, 慢性

表 1 慢性脊髓受压及减压后骨骼肌凋亡和 bcl-2、Bax mRNA 的灰度值($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Apoptosis of skeletal muscle and expression of bcl-2 and Bax mRNA after compression and decompression of chronic spinal cord injury($\bar{x} \pm s$)

项目	正常组	受压组			减压组				
		轻	中	重	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
TUNEL	273.48±2.6	256.14±6.5	236.82±3.8	209.49±0.8	217.85±0.6	223.45±5.7	231.11±9.2	235.51±5.7	239.77±1.5
bcl-2	223.63±4.7	249.14±5.1	269.15±7.2	253.25±1.1	256.61±4.8	247.43±7.3	239.67±4.2	233.87±7.7	228.27±7.2
Bax	218.84±2.4	203.67±6.5	186.47±3.7	160.10±1.5	167.96±0.4	173.56±5.7	180.23±9.1	183.62±5.7	190.87±1.6

弱, 随着受压程度的加重其表达进一步下调, 减压后表达开始上升, 28 d 时达到峰值, 减压 28 d 组与对照组之间有显著性差异($P < 0.05$)。Bax mRNA 在对照组中仅能见到少量表达, 受压组中表达增强, 减压后表达减弱(见图 3)。

3 讨论

脊髓减压是治疗急慢性脊髓压迫症的有效方法之一, 结合本研究提供的资料我们认为减压通过以下途径来缓解肌肉萎缩: ①脊髓损伤后神经元有三种情况: 死亡、存活但进入一种相对休眠状态和成活能参与再生^[3]。通过脊髓减压可恢复脊髓的血运或一些条件依赖可恢复神经元复苏而起作用^[4]。②减压后部分骨骼肌功能恢复, 其合成分泌的各种靶源性神经营养因子可促进运动神经元的存活, 而存活的神经元又可支配更多的骨骼肌。但脊髓损伤后处于存活状态的神经元数量是有限的, 减压后运动功能的恢复也是有限的, 因此我们强调即使对于中度慢性脊髓压迫也要积极行有效的脊髓减压

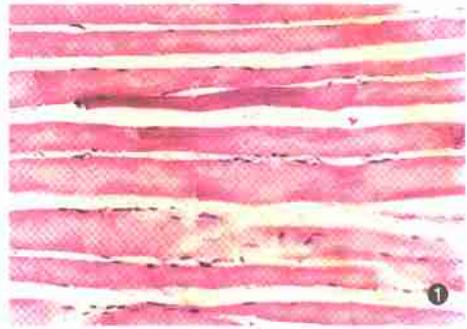


图 1 中度和重度受压组的肌肉纤维萎缩, 直径变细($\times 400$)
Fig. 1 Muscle fiber atrophy and diameter in decompression group($\times 400$)

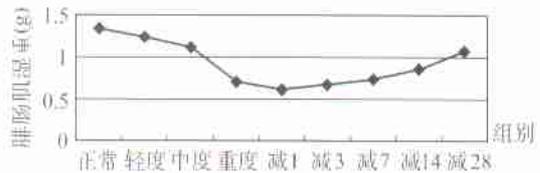


图 2 慢性脊髓受压及减压后骨骼肌湿重

Fig. 2 Wet weight of skeletal muscle after chronic spinal cord injury and decompression

脊髓受压组骨骼肌中发生凋亡的细胞增多, 减压后凋亡细胞逐渐减少。(见表 1)

2.4 bcl-2 和 Bax 基因的表达 bcl-2 mRNA 在正常组表达较

弱, 对于重度慢性脊髓压迫行脊髓减压仍是很必要的。

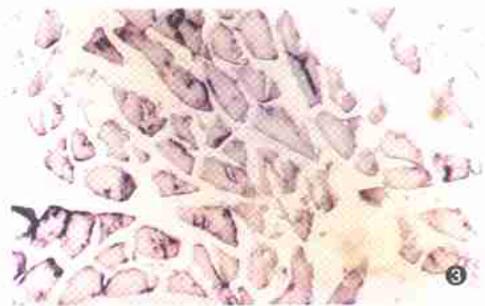


图 3 bcl-2 mRNA 基因的表达在减压后 18 d 时达到峰值($\times 400$)

Fig. 3 Expression of bcl-2 mRNA achieved peak after eighteen days of decompression($\times 400$)

俯卧高垫胸定位旋转法治疗上颈段失稳症

Treatment of instability on upper cervical spine by rotating reduction after localizing cervical vertebrae in prone and blocking up the chest position

莫亚仿
MO Yafang

关键词 颈椎; 手法, 整骨 **Key words** Cervical vertebrae; Manipulation, osteopathic

上颈段失稳症属于颈椎病范围, 多发于中老年, 近年来有年轻化的趋势, 因而日益受到临床的重视。自 2003 年 1 月以来, 采用俯卧高垫胸定位旋转法治疗上颈段失稳症 53 例, 疗效满意, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 本组 53 例, 男 21 例, 女 32 例; 年龄 23~ 74 岁, 平均 42 岁。寰齿间隙不等宽 23 例, C₂ 棘突偏左 11 例, C₂ 棘突偏右 9 例, 混合型 10 例; 病程 2 d~ 11 个月, 平均 45 d。

1.2 临床症状与体征 本组病例均以眩晕为主证。常在头颅后枕部、头颅两侧或整个头颅部, 产生短暂性或持续性压迫感、钝痛或酸痛, 有些患者表现为带状式头痛或者头部呈空虚感; 常伴有恶心欲呕、耳鸣、视物不清、甚至体位性猝倒等; 彩色颈颅多普勒超声检查, 提示椎动脉硬化、狭窄、弹性减退及血流量减少; X 线片提示颈椎均有不同程度退行性改变, 如生理曲度变直、反弓、成角, 椎间孔变小, 钩椎关节增生, 寰齿间隙不等宽, 棘突偏左或偏右等。体征以两侧乳突下 C₁₋₄ 横突处触诊明显不对称及左侧或右侧压痛; 在乳突与风池之间可有明显的压痛和触及条索结节。

2 治疗方法

2.1 颈椎触诊 嘱患者取坐位, 术者用左右手拇指分别轻轻置于患者两侧下颌角后方, 先从乳突尖处触及 C₁ 横突, 然后向下方移至 C₂₋₆ 横突处, 用上下滑动对比方法, 触摸比较两侧横突是否对称, 有无硬结、肌痉挛的条索状物、摩擦感及压痛。

2.2 放松手法 嘱患者俯卧, 胸口垫一软枕, 术者立患者头

顶部, 首先以轻柔手法, 顺枕后颈肌走行方向揉拿颈肩肌肉, 再按肩井穴、风池穴, 力量由轻到重, 以患者能耐受为度。施术约 5~ 8 min, 手法要求持久, 有力均匀、柔和。

2.3 俯卧高垫胸定位旋转法 此法用于寰枕、寰枢及 C₂₋₄ 后关节旋转式错位。患者头颈伸出床头之外并前屈, 胸下垫枕。术者坐于床头之前, 面对患者头部。以 C₂ 棘突左偏为例, 术者左手扶按于患者枕部, 拇指按于偏歪的 C₂ 横突左侧, 右手扶托患者下颌将其头稍拉向前并向左旋转, 至最大限度时, 用“闪动力”, 同时拇指按偏歪棘突向右侧推按, 可闻“咯”声, 说明已达到复位目的, 手法结束, 每日 1 次, 10 次为 1 疗程。

3 治疗结果

疗效评定标准: 治愈, 头痛、头晕等症状消失, 颈部活动正常, 棘突无压痛, 能参加正常劳动和工作; 显效, 症状和体征基本消失, 不影响正常劳动和工作; 好转, 症状减轻, 体征有所改善为; 未愈, 症状、体征无改善。本组治愈 45 例, 显效 4 例, 好转 2 例, 未愈 2 例。

4 讨论

施法前必须按照三步定位。首先神经定位诊断, 其二是触诊、检诊定位诊断; 其三是 X 线片定位诊断。符合三个条件后, 方可施用俯卧高垫胸定位旋转整复手法。对中老年患者, 术者实施手法要轻巧、柔和、特别是作定位旋转整复手法时, 应严格掌握动作要领, 做到轻快而稳准, 旋转的幅度要注意控制在生理许可范围, 不要强求复位的弹响声, 如果复位不完全, 不宜再复位, 应留下次治疗时再施行, 如颈椎退变严重, 有心脑血管疾患者, 不宜应用此法。安全首务, 切忌使用暴力。

(收稿日期: 2004- 06- 15 本文编辑: 王宏)

参考文献

- 王欢, 李继峰, 钟楚声, 等. 感觉神经(元)对失神经骨骼肌超微结构保护作用的实验研究. 中华手外科杂志, 2001, 17(增刊): 51-53.
- 王栓科, 洪光祥, 王同光, 等. 细胞外 ATP 防治失神经肌肉萎缩的实验研究. 中华手外科杂志, 2002, 18(1): 43-45.

- 朱锦宇, 黄耀添, 吕荣, 等. 周围神经损伤晚期修复后脊髓运动神经元形态学及神经电生理学研究. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13(2): 114-118.
- 陈其昕, 陈维善. 脊髓减压术后神经功能恢复机理的实验研究. 中华骨科杂志, 1999, 19(2): 95-97.

(收稿日期: 2003- 11- 19 本文编辑: 王宏)

浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310012