

# 胚胎脊髓移植联合甲基强的松龙治疗脊髓损伤的实验研究

王栋<sup>1</sup> 兰怡<sup>2</sup> 贺西京<sup>1</sup> 李浩鹏<sup>1</sup> 吕惠茹<sup>1</sup> 李韵<sup>1</sup> 李皓<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学第二医院骨三科, 陕西 西安 710004; 2. 陕西省武警总队医院)

**【摘要】** 目的 采用胚胎脊髓移植及大剂量甲基强的松龙联合应用治疗脊髓损伤, 观察两者有无协同作用。方法 雄性 SD 大鼠 50 只, 随机分为 5 组, A、B、C、D 组为 T<sub>12</sub> 急性脊髓右侧半横断损伤后治疗组, A 组给大剂量甲基强的松龙及胚胎脊髓移植联合治疗; B 组行大剂量甲基强的松龙治疗; C 组行胚胎脊髓移植治疗; D 组为单纯损伤; E 组为空白对照。治疗后 24 h 及 8 周后观察大鼠一般行为及运动功能变化, 评分分析。病理观察包括治疗后 8 周神经纤维计数对比及辣根过氧化物酶示踪观察。结果 病理学形态观察示 A 组损伤区横断面神经纤维计数较 B、C、D 组明显增多 ( $P < 0.01$ ); A、C 组在损伤区注入的辣根过氧化物酶可扩散至损伤区远、近端各约 1.0 cm 处。除 A 组左下肢感觉有部分恢复外, 无明显行为学改变。结论 大剂量甲基强的松龙及胚胎脊髓移植可协同修复损伤脊髓。

**【关键词】** 脊髓损伤; 移植, 同种; 病理学

**Laboratory study on spinal cord injury treatment with fetal spinal cord transplantation and methyl-prednisolone therapy** WANG Dong, LAN Yi, HE Xijing, et al. The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University (Shanxi Xi'an, 710004, China)

**【Abstract】** **Objective** The combined treatment of fetal spinal cord transplantation (FST) and methyl-prednisolone (MP) was applied as spinal cord injury therapy, in order to find out whether or not there was any synergistic action existed. **Methods** 50 male SD rats were divided randomly into 5 groups. In group A to D, the acute semi-sectional lesion attacked at the right half of T<sub>12</sub> spinal cord of each rat. Group A was treated with the combination of large dose MP and FST; Group B were treated with large dose MP only; Group C with FST; Group D without any therapy and Group E was a blank control. The fetal spinal cord was achieved from the female rats with pregnancy of 14 days. The changes of general behavior and the motive function of the rats were observed, 24 hours to 8 weeks after treatment, with evaluation and analysis. The pathological observation, including the accounting numbers of nerve fibers at the cross section of injured spinal cord retro tracer of horseradish peroxidase (HRP). **Results** The nerve fibres in group A were much more than that of B, C and D at injured spinal cord cross sections ( $P < 0.05$ ). In the group A and C, the injected HRP could diffuse around 1.0 cm at both sides of injured part. No obvious behavior changes were found except partial sensory recovery in group A. **Conclusion** There was synergistic effects of the treatment on spinal cord injuries with the combination of large dose of MP and FST.

**【Key words】** Spinal cord injuries; Transplantation, homologous; Pathology

大剂量甲基强的松龙 (Methylprednisolone MP) 已成为治疗急性脊髓损伤 (Spine cord injury SCI) 的常规药物, 但疗效欠佳; 其次胚胎脊髓移植 (Fetal spine cord transplantation FST) 治疗 SCI 的动物实验也证明了胚胎脊髓移植到脊髓损伤灶后, 能激发宿主轴突的再生。我们将两者联合应用治疗急性脊髓半横断损伤, 观察有无协同作用。

## 1 材料及方法

**1.1 实验动物分组** 选用健康月龄 4 个月的 SD 雄鼠 2 只, 雌鼠 4 只同笼, 次晨阴道涂片观察, 见鼠精子者定为孕鼠记为 0 d, 孕 14 d 时行 FST。选用健康雄性 SD 大鼠 50 只, 月龄 4 个月, 体重 300~400 g, 用随机数字法分为 5 组, 每组 10 只。前 4 组制作 T<sub>12</sub> 急性脊髓右半横断损伤模型: A 组予 MP 及 FST 治疗; B 组行单纯 MP 治疗; C 组行单纯 FST 治疗; D 组

为单纯损伤组;E 组为空白对照组。

1.2 实验方法

(1) 脊髓半横断损伤模型的制作及 FST: 受体鼠麻醉后暴露 T<sub>12</sub> 脊髓, 手术显微镜下以脊髓后中央静脉为标志, 切除 T<sub>12</sub> 右侧 3 mm×3 mm 一段脊髓 (350 g SD 大鼠 T<sub>12</sub> 脊髓宽度约为 6 mm)。麻醉下从 14 d 孕鼠移取的胚胎鼠, 约 3 cm×1 cm×1 cm 大小。镜下挤取 3 段长约 3 mm 颈胸段胚胎脊髓, 即纵行植入完成的 SCI 半横断损伤处, 使胚胎脊髓头端朝向宿主头端, 未行固定, 缝合硬脊膜 (图 1)。

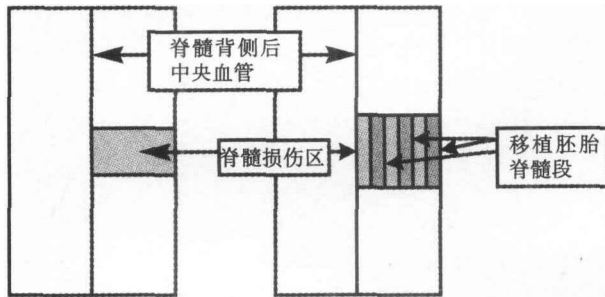


图 1 脊髓半侧切除损伤、胚胎脊髓段移植示意图。以大鼠脊髓背侧中央血管为界半切, 断端回缩后形成 3 mm×3 mm 的空缺损区, 移植的三段胚胎脊髓与宿主脊髓方向一致。

(2) MP 应用的时间及方法: 术后 8 h 内, A、C 两组动物自鼠尾静脉推注 MP (30 mg/kg)。其后按同样方法应用 MP (每小时 5.4 mg/kg) 23 h。

(3) 用 Bielschowsky 法镀染切片病理观察。

(4) 以钨酸钠为稳定剂四甲基联苯胺 (TMB) 法进行辣根过氧化物酶 (HRP) 追踪实验<sup>[1]</sup>, 行光镜观察。

(5) 观察指标及数据处理: 依据任启光在 1988 年实验研究中的分类方法<sup>[2]</sup> 观察治疗中动物一般状态及运动功能改变。将 5 组记数资料行组间秩和检验。病理学主要观察注射于损伤区的 HRP 能否转运至损伤区远、近端脊髓的神经元及神经纤维, 移植脊髓的结构及移植 8 周后的分化情况。损伤区神经纤维数目, 并将计量结果进行组间方差分析。

2 结果

2.1 实验动物一般状态及运动功能改变 SD 大鼠在进行 T<sub>12</sub> 脊髓右半横断损伤后, 1 周内全部 40 只出现大小便失禁, 14 只死亡, A、C 组各剩 7 只, B、D 组各剩 6 只。2 周后 16 只大鼠二便部分恢复, 8 周时 8 只动物大小便已完全恢复正常 (A 组 6 只; C 组 2 只)。A 组 6 只大鼠对痛觉刺激左后肢的逃避反应, 右后肢运动功能未见改善; C 组 2 只动物对左后肢刺激有逃避反应。其余各组动物右后肢常处于拖行状态, 感觉运动均无改善。将各组动物所得“+”数值进行秩和检验分析得出: A、B、C、D 组与 E 组差异有显著性意义,  $P < 0.01$  (定  $\alpha$  为 0.01,  $H_c = 14.864$ ,  $P < 0.01$ )。A 组与 C 组差异也有显著性意义 (定  $\alpha$  为 0.05,  $H_c = 10.653$ ,  $P < 0.05$ , 见表 1)。

表 1 各组大鼠术后形态学分析评定表

编号	A 组		B 组		C 组		D 组		E 组	
	24 h	8 周	24 h	8 周	24 h	8 周	24 h	8 周	24 h	8 周
1	0	++	0	0	0	++	0	0	+++++	+++++
2	0	++	0	+	0	+	0	0	+++++	+++++
3	0	++	0	0	0	+	0	0	+++++	+++++
4	0	++	0	+	0	++	0	0	+++++	+++++
5	0	++	0	+	0	0	0	0	+++++	+++++
6	0	+	0	0	0	+	0	0	+++++	+++++
7	0	++			0	+			+++++	+++++
8									+++++	+++++
9									+++++	+++++
10									+++++	+++++

2.2 病理观察

(1) 脊髓损伤区与椎管外纤维结缔组织粘连明显。A 组可分离粘连暴露脊髓, 见脊髓连续性已恢复, 但较正常脊髓为细。HE 染色见胚胎脊髓由大量的巨核幼稚细胞构成 (图 2)。成熟 SD 大鼠脊髓可明显分辨出灰、白质。移植的胚胎脊髓已失去原来的结构并分化成为大量的神经元及轴突。

(2) Bieschowsky 还原银染色法病理形态观察结

果: A 组在损伤区的神经纤维较 C 组密集且胶质瘢痕较少。并且发现 A 组移植区内网状神经纤维进入对侧灰质神经核团 (图 3)。B、D 组未发现损伤区有神经纤维连接, 而以空泡变性及胶原纤维充填为主要病理变化 (图 4)。横断面各组损伤区神经纤维记数 (以分格计数器 10×10, 放大 400 倍), 目视计数后平均值行多个样本均数多重比较, 得出 A 组与 B、C、D 组差异有显著性意义 (定  $\alpha$  为 0.05,  $t = 4.103$ ,  $P < 0.05$ , 见表 2)。

表 2 各组损伤区横断面神经纤维计数

编号	A	B	C	D	E
1	13.4	2	12.2	-	82.7
2	28.5	-	14.6	-	90.3
3	63.7	1	18.3	-	73.8
4	18.6	-	27.0	-	100.4
5	22.3	-	10.1	-	96.2
6	20.5	-	6.2	-	78.1
7	34.1	4	12.8	-	102.3
合计	201.1	7	101.2	0	630.8

(3) 以钨酸钠为稳定剂的 HRP-TMB 显色观察: 损伤区见广泛出血灶及 HRP 颗粒区域为注射部位, 损伤区远、近端及对侧灰白质内均可见大量 HRP 颗粒。A、C 组 HRP 颗粒可通过损伤区, 且能向近端延伸约 1.0 cm。越靠近损伤区, 颗粒越密集, 最远可达损伤区外 1.0 cm, 并且在损伤区对侧灰质内形成“终末串珠”样结构。在 A、C 组表现较为明显。

### 3 讨论

成年脊髓损伤后再生困难大多数是由于不具有支持及引导神经轴突再生及延长的细胞、基板、髓鞘及细胞外基质成分, 缺乏神经营养因子等, 损伤继发的胶质增生, 瘢痕形成也是阻碍神经再生的机械屏障。以上因素共同作用导致脊髓再生失败。同种异体胚胎脊髓移植于成年脊髓半切损伤灶时, 成活率可达 70%~90%<sup>[3]</sup>, 因含有丰富的神经营养物质, 可减轻损伤神经元及轴突的 Waller 变性<sup>[4]</sup>, 抑制胶质瘢痕的增生, 同时作为连接损伤两断端的桥性或中继结构<sup>[5-7]</sup>而发挥作用。因胚胎脊髓悬液细胞(细胞成分纯净但不能祛除发育成熟后抑制轴突再生的神经胶质细胞)移植后固定困难, 容易被脑脊液循环冲散, 真正作用于损伤区的胚胎脊髓细胞较少, 因而本实验采取段移植。结果证实了以上内容。“终末串

珠”样结构, 往往出现在轴突的终末, 属于逆行转运轴浆的一种方式, 反映了 FST 后再生轴突的一种形态, 并提示宿主灰质对再生轴突的“拒绝”。本实验选择 HRP 注射部位位于移植区, 也是本实验的特点之一。HRP 颗粒的无序性分布, 表明了胚胎脊髓在宿主脊髓缺损处再生的紊乱性, 可能与缺乏靶器官的诱导有关<sup>[8]</sup>。MP 对 SCI 的作用已经证实<sup>[9]</sup>。我们分析还可能与以下的作用机理有关: ①MP 抑制胶质及胶原瘢痕使轴突能更好地再生; ②MP 免疫抑制作用。通过实验数据处理, 我们粗略得出甲基强的松龙及胚胎脊髓移植治疗脊髓损伤的动物实验时, 能起到协同作用。(本文图 2-4 见后插页 1)

### 参考文献

- 1 顾耀铭. 钨酸钠作为稳定剂的新的灵敏度 HRP-TMB 法-1 光谱研究. 神经解剖学杂志, 1990, 6: 121-124.
- 2 任启光. 肌蒂-脊髓移植术治疗胸腰段脊髓外伤性全瘫的动物实验. 骨与关节损伤杂志, 1988, 3: 89-94.
- 3 王振宇. 胚胎脊髓组织移植联合应用神经生长因子对损伤脊髓再生修复的形态学影响. 中华器官移植杂志, 1997, 7: 109-111.
- 4 Das GD. Neural transplantation in the spinal cord under different conditions of lesions and their functional significance in Das GD eds neural transplantation the regeneration. 1st ed. New York: Spring Verlag, 1986. 9-13.
- 5 Reier PJ, Anderson DK. Neural tissue transplantation and CNS trauma anatomical repair of the spinal cord. J Neurotrau, 1992, 223: 192-198.
- 6 Miya D, Giszter S, Mori F, et al. Fetal transplants alter the development of function after spinal cord transection in newborn rats. J Neurosci, 1997, 1517: 4856-4872.
- 7 Babara SB. Recovery of function after spinal cord injury mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. EXP Neurol, 1993, 123: 321-327.
- 8 庞清江. 神经生长因子与脊髓损伤. 中华实验外科杂志, 1996, 13: 63-65.
- 9 Werner PC. New drugs for improving injury outcome in spinal cord injuries. West J Med, 1997, 166: 271-272.

(收稿: 2002-10-22 编辑: 李为农)

## 《中国中西医结合肾病杂志》2004 年征订启事

《中国中西医结合肾病杂志》是中国中西医结合学会主办、中国科学技术协会主管、国内外公开发行的国家级学术期刊。本刊执行“中西医并重、促进中西医结合”方针, 旨在报道我国中西医结合在肾病临床、科研、预防等方面的经验, 介绍国内外有关肾病专业的进展, 为提高中西医结合水平, 继承和发扬我国传统的医药学, 为促进我国医学科学现代化服务。

本刊辟有著名专家论坛、名医经验荟萃、实验论著、临床论著、短篇论著、病例报告、讲座与综述、专病专方、体会与交流、学术动态等栏目。杂志现发行面已覆盖全国各省、市、自治区, 全国各医疗卫生单位内科、肾内科、儿科、妇产科、中医科、泌尿科等医务人员及相关的科研、教学人员均可参阅。

本刊为月刊, 每期订价 8.00 元, 全年 96.00 元, 国标标准刊号: ISSN 1009-587X, 国内统一刊号: CN 14-1277/R, 邮发代号: 22-26, 全国各地邮政局均可预定, 也可直接向编辑部办理邮购。

编辑部地址: 山西省太原市师范街 78 号(武警医院内) 邮编 030006

电话(传真): 0351-7965258

电子信箱: yhkj@Public.ty.sx.cn

# 高渗盐水治疗脊髓急性压迫损伤的实验研究

(正文见 522 页)

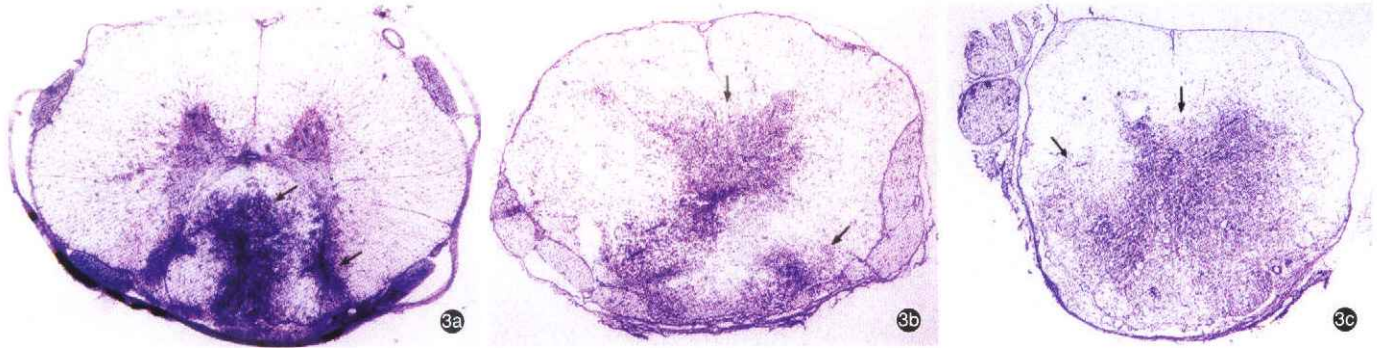


图 3a 为高渗盐水治疗组, 组织炎症水肿较轻微, Vissl  $\times 40$ ; 图 3b、3c 分别为生理盐水治疗组及对照组, 炎症反应较高渗盐水治疗组严重, 脊髓组织水肿明显(↑所示为组织炎症反应区域), Vissl  $\times 40$

图 3 损伤后 1 周各组脊髓组织病理改变

# 胚胎脊髓移植联合甲基强的松龙治疗脊髓损伤的实验研究

(正文见 537 页)

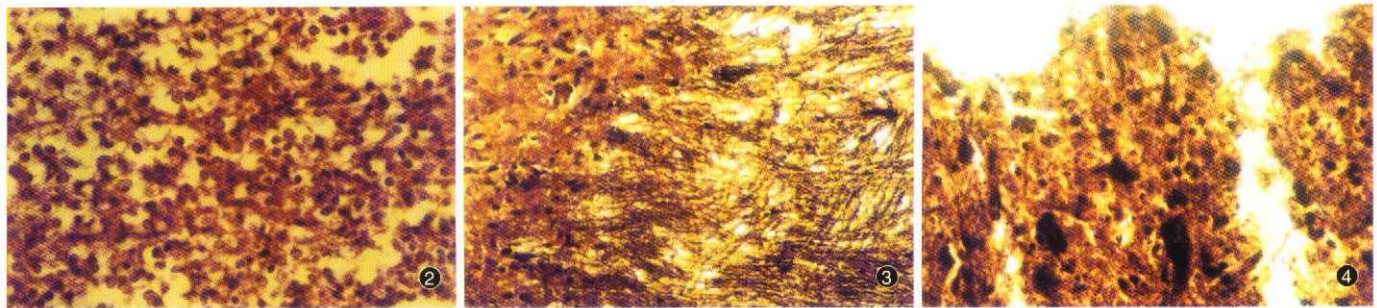


图 2 胚胎脊髓 HE 染色横断面  $\times 200$ , 示大量幼稚神经细胞 图 3 移植 8 周后 A 组损伤区银染色纵切面 200 倍, 示移植成熟的胚胎脊髓组织与周围的脊髓灰质形态学联系, 可见神经纤维进入灰质核团, 图 4 B 组损伤区 8 周后很染色横切面  $\times 200$ , 示空泡变性 & 空洞形成, 损伤区边缘神经纤维坏死、消失。

## 中国中西医结合学会接纳会员通知

本会是依法登记成立的全国性社团法人、学术性群众团体。宗旨是团结广大中西医结合医学科学技术工作者, 促进中西医结合医学科学技术的繁荣和发展, 促进中西医结合医学科学技术的普及和推广, 促进中西医结合医学科学技术人才的成长和提高, 积极开展中西医结合科技咨询工作 为我国人民的健康和社会主义建设服务。

本会的主要任务是开展中西医结合医学学术交流, 编辑出版综合性和专业性中西医结合医学学术期刊, 开展医学继续教育, 普及中西医结合医学知识, 开展国际间的联络与交流, 开发和推广科技成果等。本会设有普通会员、外籍会员、资深会员、团体会员、名誉会员等。欢迎在科研、教学、医疗、预防、药物、编辑出版及组织管理等从事中西医结合工作(大学本科毕业工作三年以上, 专科毕业工作五年以上)的科技工作者和单位、企业、团体等加入本会。具体入会办法请与各省、自治区、直辖市中西医结合学会联系。

北京市中西医结合学会(100005 北京市东单一条甲七号) 联系人 黄毅 (010)65250460, 天津市中西医结合学会(300074 天津市河西区佟楼佟里 19 号) 联系人 郭莉 (022) 23330203, 河北省中西医结合学会(050011 石家庄市福强大街 68 号) 联系人 董淑萍 (0311) 5814762, 内蒙古自治区中西医结合学会(010020 呼和浩特市中山东路 78 号内蒙古卫生厅) 联系人 于连云 (0471) 6939270, 山西省中西医结合学会(030012 太原市青年路 180 号) 联系人 宋明镇 (0351) 2023577-2298, 4039503, 辽宁省中西医结合学会(110031 沈阳市皇姑区黑龙江街 60 号) 联系人 蒋淑媛 (024)86807998, 吉林省中西医结合学会(130012 长春市湖光路 32 号) 联系人 何莉 (0431) 5513379-3888, 黑龙江省中西医结合学会(150001 哈尔滨市南岗区阿什河街 122 号) 联系人 韩志杰 (0451) 3628864, 2528772, 上海市中西医结合学会(200040 上海市北京西路 1623 号 402 室) 联系人 刘文菊 (021) 62581714, 江苏省中西医结合学会(210029 南京市汉中中路 282 号) 联系人 李华 (025) 6617284, 浙江省中西医结合学会(310007 杭州市天目山路 132 号) 联系人 顾佩芳 (0571) 88082211-3410, 安徽省中西医结合学会(230031 合肥市梅山路安徽医学院第一附属医院) 联系人 沈德凯 (0551) 2821006 2013, 福建省中西医结合学会(350003 福州市吉坛路 61 号) 联系人 肖钦朗 (0591) 7824528, 江西省中西医结合学会(330077 南昌市文教路 221 号) 联系人 吴跃进 (0791)8511741, 8511921, 山东省中西医结合学会(250011 济南市青年东路 1 号) 联系人 王广梅 (0531)2626231, 河南省中西医结合学会(450004 郑州市城北路 7 号) 联系人 王凌云, 毛开颖 (0371)6348703, 6331768, 湖北省中西医结合学会(430064 武汉市武昌区千家桥 100 号) 联系人 刘慧康 (027)87893467, 湖南省中西医结合学会(410008 长沙市湘雅路 38 号) 联系人 刘祖贞 (0731)4822167, 广东省中西医结合学会(510095 广州市淘金北路 77 号(麓湖湖南塔) 4 楼 404 室) 联系人 余和明 (020)83600105, 海南省中西医结合学会(570102 海口市龙华路海南医学院附院中医科) 联系人 韩平 (0898)66211844, 广西壮族自治区中西医结合学会(530021 广西南宁市桃源路 35 号) 联系人 李方 (0771)2803986, 四川省中西医结合学会(610041 成都市文庙西街 80 号) 联系人 李成林 (028)86136576, 重庆市中西医结合学会(400001 重庆市渝中区道门口 40 号) 联系人 马力 (023)63800302, 贵州省中西医结合学会(550002 贵州省贵阳市山东路 90 号贵州中医研究所内) 联系人 李志伟 (0851)5928416, 云南省中西医结合学会(650011 昆明市光华街 120 号) 联系人 葛元站 (0871)3613387, 陕西省中西医结合学会(710003 西安市西华门 20 号) 联系人 张德义 (029)7250672, 宁夏回族自治区中西医结合学会(750001 银川市解放西街 101 号) 联系人 王忠和 (0951)5024754, 甘肃省中西医结合学会(730030 甘肃省兰州市嘉峪南路 438 号) 联系人 戴恩来 (0931)8942372, 青海省中西医结合学会(810012 西宁市南川西路 69 号) 联系人 刘佳 (0971)6253443, 新疆维吾尔自治区中西医结合学会(830000 乌鲁木齐市黄河路 53 号新疆自治区中医院) 联系人 尔建民 (0991)5813156。