

· 基础研究 ·

局部应用 GDNF 对脊髓前角运动神经元的保护作用研究

潘世鹏¹, 刘强², 吴斗²

(1. 中铁十七局中心医院骨科, 山西 太原 030032; 2. 山西医科大学第一附属医院骨科)

【摘要】 目的: 研究周围神经损伤后经蛛网膜下腔置管局部应用外源性胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)对脊髓前角运动神经元的保护作用。方法: 成年 SD 大鼠随机分为 2 组, GDNF 组和生理盐水(NS)组各 24 只。切断大鼠坐骨神经致相应脊髓前角运动神经元损伤, 于 L_{5,6} 椎间隙行蛛网膜下腔置管, GDNF 组注入外源性 GDNF 6 μl(10 μg/ml), NS 组同法注 6 μl 生理盐水。不同时间处死动物并取材, 对 L₄-L₆ 节段脊髓标本冰冻切片, 行 HE 染色, 尼氏体染色、胆碱酯酶染色。结果: GDNF 组脊髓前角运动神经元的存活率、胆碱酯酶阳性颗粒面积均比 NS 组有明显提高, 两组差异有统计学意义(P<0.05)。结论: 周围神经损伤后通过蛛网膜下腔注入外源性 GDNF 对相应的脊髓运动神经元有保护作用。

【关键词】 周围神经; 运动神经元; 胶质细胞源性神经营养因子

Protective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor infused into the tube setted into cavitas subarachnoidealis on spinal front corner motor neurons PAN Shi-peng*, LIU Qiang, WU Dou. *Department of Orthopaedics, the Center Hospital of Zhongtie 17 Ju, Taiyuan 030032, Shanxi, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of exogenous glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) infused into the cavitas subarachnoidealis on cornu anterius medullae spinalis motor neurons after sciatic nerve axotomy. **Methods:** Forty-eight healthy SD rats were divided into 2 groups randomly: GDNF group and NS group. The left sciatic nerve in rats were cut off. And then 0.9% saline (6 μl) and GDNF solution (6 μl) were injected into cavitas subarachnoidealis at L₄-L₆ in NS group and GDNF group, respectively. The rats were sacrificed on postoperative 1, 2, 4 and 8 weeks respectively. Their specimen of L₄-L₆ spinal cord were taken at different time and sectioned. The HE staining, Nissl staining and cholinesterase (ChE) staining in motor neurons were used for counting of motor neurons. **Results:** In GDNF group the number of motor neurons in cornu anterius medullae spinalis and the ChE activity were higher than that of NS group. **Conclusion:** The exogenous GDNF infused into the cavitas subarachnoidealis are supposed to protect the degenerated spinal motor neuron from death after sciatic nerve injury.

Key words Peripheral nerve; Motor neurons; Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(2): 122-124 www.zggszz.com

周围神经损伤可引起神经近端发生“轴突反应”, 造成相应脊髓神经元胞体出现一系列形态、生化功能和代谢上的变化, 严重时引起胞体的凋亡。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 是近年发现的神经营养因子(neurotrophic factor, NTF), 是目前特异性最强的多巴胺能 NTF, 对运动神经元和感觉神经元均有强大的神经营养作用^[1]。国内外研究已证实, 通过神经断端给予神经营养因子可以有效的保护神经元。本实验旨在通过切断并显微吻合坐骨神经造成动物脊髓前角运动神经元损伤, 经蛛网膜下腔置管局部应用 GDNF, 达到保护神经元的目的。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 SD 雄性健康大鼠 48 只(山西医科大学动物实验中心提供), 体重 250~300 g。随机分组: GDNF 组 24 只, 5%水合氯醛腹腔麻醉后, 左侧坐骨神经于梨状肌下缘 1 cm 处切断, 之后用 9-0 无创线缝合神经外膜, 再于 L_{5,6} 椎间隙行蛛网膜下腔置管, 于手术当日起通过留置管注入 GDNF 6 μl (10 μg/ml)(购于美国 Peprotech Asia 公司), 连续注射 10 d; 生理盐水(NS)组 24 只, 同法给予生理盐水 6 μl。

1.2 实验标本制备 术后 1、2、4、8 周分别处死动物并取材。具体方法: 麻醉后, 由心尖部插管至升主动脉, 并于右心耳处剪一小口, 先用 250 ml 生理盐水快速冲洗, 再用 4%多聚甲醛 PBS 溶液 400 ml 灌注固定, 最后 20%蔗糖溶液灌注, 取腰膨

大(中心为 L₄₋₆ 节段)之脊髓,于 4%多聚甲醛溶液中后固定 4 h,高渗蔗糖溶液(4 ℃)脱水过夜,-20 ℃连续冰冻切片,切片厚 5 μm,间隔 5 张取 1 张。

1.3 观测项目与方法 标本切片进行常规 HE 染色;尼氏体染色(Thionine 硫堇染色法);胆碱酯酶染色(Karnovsky-Roots 铁氰化铜法)。光镜检查照相及显微图像分析系统分析,计数脊髓前角大、中型运动神经元数目,计算实验侧与对照侧的神经元数目之比,即神经元的存活率,使用 MIAS-2000 图像分析系统计数胆碱酯酶染色阳性颗粒面积,计算实验侧与对照侧的染色阳性颗粒面积之比,得出胆碱酯酶染色阳性面积的变化率。

1.4 统计学处理方法 检测数据以均数±标准差表示,采用 SPSS 11.0 软件分析,两组同时间点两样本均数比较进行 *t* 检验,组内不同时间点比较用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 HE 染色 术后 1 周,即可观察到手术侧脊髓前角广泛水肿,神经元数量减少,染色淡。偶而可见个别典型凋亡细胞孤立存在,细胞核染色质边聚、致密深染;胞浆呈橘红色明显深染;胞体体积收缩变形;细胞周围有空晕存在。GDNF 组术后病理改变与 NS 组相似,但神经元肿胀程度和数量减少程度均较 NS 组轻。

2.2 尼氏体染色 尼氏体是神经元胞体内含有的特异性嗜色质,是合成蛋白质的主要场所,该染色可直接反映脊髓前角运动神经元的数量和体积变化。本实验计数位于脊髓前角外侧核大、中型神经元数目。脊髓前角运动神经元的存活率以手术侧与非手术侧同类神经元的数量相对比表示,坐骨神经切断后 NS 组手术侧的脊髓前角神经元存活率减少,部分神经元染色明显变淡,有的轮廓不清楚,1 周以后,两组神经元的存活率有显著性差异(见表 1)。

2.3 ChE 活性的变化 正常大鼠脊髓腰段前角外侧 IX 板层运动神经元 ChE 活性反应强烈,细胞轮廓清晰,阳性反应颗粒呈红褐色,位于胞质,核不着色。本实验神经损伤后脊髓前角胆碱酯酶含量的变化情况,术后 1 周观察有降低,2 周达最低,以后略有恢复,第 4 周以后基本稳定。除 1 周外各时间点两组染色阳性颗粒面积的百分率相比具有显著性差异(见表

2),说明 GDNF 能够缓解外周神经损伤后造成的脊髓前角神经元胆碱酯酶活性的降低。

3 讨论

3.1 周围神经损伤后脊髓前角运动神经元的保护策略 周围神经损伤后轴索逆向运输的神经营养因子缺乏是造成神经元病变和死亡的原因之一,提供外源性神经营养因子则可以延长神经元的存活^[2],所以神经功能重建的有效治疗方法就是实施神经吻合的同时,对神经元采取保护性措施,使神经元为再生轴突提供基本的物质条件。宋海涛等^[3]研究发现 GDNF 在肌内产生,在神经末梢吸收,并在特定时期(如神经元损伤)由轴突逆向转运至脊髓神经元胞体,作为靶源性神经营养因子促进神经元存活。宋海涛等^[4]采用 Allen 脊髓损伤模型研究表明,脊髓挫伤后 GDNF mRNA 表达急剧增加,损伤局部给予外源性 GDNF 能避免和减少脊髓神经元凋亡。

本实验中 SD 鼠的坐骨神经损伤后先通过显微外科技术对神经进行外膜缝合,经椎间隙置管并使其位置固定,再通过留置管向腰膨大神经元的部位给予 GDNF,结果表明实验组 GDNF 的应用有效的保护了脊髓前角运动神经元,且明显提高神经元的存活率和胆碱酯酶含量。经蛛网膜下腔给药不仅避免局部给药对神经吻合口再生的影响,还起到了保护中枢神经元的目的,又向临床的实际情况迈进了一步。近年来人们已经从研究改进神经修复的显微外科技术转向探索神经再生过程中细胞、分子和基因水平的改变。应用组织学分析发现,GDNF 在缺血损伤后能减轻该部位的炎症细胞的聚集,减少了损伤引起的后角 IV-VIII 板层神经元丢失和提高了突触素的表达^[5-6]。但这些基因疗法,目前还不成熟,从实验研究过渡到临床应用,尚有许多工作要做。

3.2 蛛网膜下腔给药的优缺点 经蛛网膜下腔置管局部应用 GDNF 的优点具体表现在:通过蛛网膜下腔给药可以将留置管固定在靠近腰膨大损伤神经元周围,可以提高损伤局部的神经营养因子浓度;经留置管可反复多次给药;干预措施远离神经损伤部位,给损伤神经一个相对稳定的恢复环境。蛛网膜下腔内注射药物的吸收机制:蛛网膜下腔脑脊液大部分经蛛网膜绒毛回到静脉窦,另一部分可直接经中枢神经系统表面毛细血管吸收。脑脊液可看作是广义的细胞外液,作为媒

表 1 坐骨神经切断后脊髓前角运动神经元存活率的变化(%)

Tab.1 Change of survival rate of spinal cord anterior horn neuron after operation(%)

组别	病例数	1 周(n=6)	2 周(n=6)	4 周(n=6)	8 周(n=6)
NS 组	24	66.03±3.20	61.74±2.45	57.26±2.57	56.66±2.08
GDNF 组	24	69.81±2.52*	73.41±3.39***	76.18±3.23***	75.02±2.60***

注:与 NS 组同时间点比较,**P*<0.05;***P*<0.01;与同组内第 1 周比较,#*P*<0.05

Note: Compared with the NS group in same time, **P*<0.05; ***P*<0.01; Compared with first week in the same group, #*P*<0.05

表 2 坐骨神经切断后脊髓前角 ChE 染色阳性面积的百分率变化(%)

Tab.2 Change of percentage of ChE positive area in spinal cord anterior horn neuron(%)

组别	病例数	1 周(n=6)	2 周(n=6)	4 周(n=6)	8 周(n=6)
NS 组	24	62.27±6.50	60.90±3.58	61.86±6.70	61.86±6.12
GDNF 组	24	64.31±5.83	71.98±5.95**	77.93±5.62***	78.29±5.71***

注:与 NS 组同时间点比较,**P*<0.05;***P*<0.01;与同组内第 1 周比较,#*P*<0.05

Note: Compared with the NS group in same time, **P*<0.05; ***P*<0.01; Compared with first week in the same group, #*P*<0.05

介,神经细胞可以通过脑脊液直接进行物质交换,吸收营养,排泄代谢产物。本实验缺点目前看来可能在于:①因留置管的存在,使得蛛网膜下腔于外界相通,存在逆行感染的可能,但本实验中并未出现此种感染情况。②同样是因为留置管的存在,不可避免的形成了无效腔,真正经过留置管作用至脊髓腰膨大神经元的神经营养因子的有效量无法准确计算。③细胞因子还存在制备困难,造价高,活性不稳定等缺点。

3.3 神经营养因子的应用前景 神经系统损伤后的再生机制相当复杂,虽然外源性 GDNF 的疗效已得到许多实验证实,但临床疗效仍有待确认。另外,GDNF 具有抗原性,作为药物,其安全性尚需进一步评价;联合用药能提高其疗效,但尚不知有无药物配伍禁忌,需进行积极而慎重的药理学研究。随着对周围神经损伤所致相关神经细胞变性机制的研究及从分子水平研究的日趋深入,研究神经营养因子对神经元的作用,应用基因工程向损伤局部移植能产生神经营养因子的遗传修饰细胞,以改善神经生长的微环境,减少神经元的凋亡,促使其结构和功能的恢复,更好地提高疗效,尚需进一步的深

入研究。

参考文献

[1] 袁源,杨志敏,王廷华,等. GDNF 的研究进展. 神经解剖学杂志,2003,19(1):103-108.

[2] 王贵波,李兵仓,王建民. 周围神经损伤后运动神经元的保护. 医学综述,2001,7(11):675-676.

[3] 宋海涛,贾连顺,陈坚,等. 大鼠脊髓损伤后腓肠肌 GDNF 基因表达及意义. 中国骨伤,2001,14(8):465-467.

[4] 宋海涛,贾连顺,陈哲宇,等. 大鼠脊髓损伤前、后 GDNF mRNA 表达变化及意义. 颈腰痛杂志,2001,22(2):107-109.

[5] van Adel BA, Kostic C, Déglon N, et al. Delivery of ciliary neurotrophic factor via lentiviral-mediated transfer protects axotomized retinal ganglion cells for an extended period of time. Hum Gene Ther, 2003, 14(2):103-115.

[6] Lacroix S, Tuszynski MH. Neurotrophic factors and gene therapy in spinal cord injury. Neurorehabil Neural Repair, 2000, 14 (4):265-275.

(收稿日期:2008-09-24 本文编辑:王玉蔓)

· 经验交流 ·

CT 三维重建在骨不连早期诊断中的应用

黄洪斌, 鲍丰, 季向荣, 王向明, 金其材
(义乌市中心医院骨科, 浙江 义乌 322000)

关键词 骨折, 不愈合; 体层摄影术, 螺旋计算机; 早期诊断

Clinical application of spiral CT three-dimensional (3D) reconstruction in early diagnosis of fracture nonunion HUANG Hong-bin, BAO Feng, Ji Xiang-rong, WANG Xiang-ming, JIN Qi-cai. Department of Orthopedics, Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, Zhejiang, China

Key words Fractures, ununited; Tomography, spiral computed; Early diagnosis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(2): 124-125 www.zggszz.com

骨不连是骨折手术后常见的严重并发症之一,治疗上较为棘手,其早期诊断困难,X线片和二维CT扫描很难全面客观地显示骨折愈合情况。目前,CT三维重建在骨不连早期诊断中的价值尚缺少系统和全面的评价。我院自2006年起应用CT三维重建早期诊断骨不连,取得了满意的效果。

1 资料和方法

1.1 一般资料 2006年3月至2008年4月,对25例怀疑骨不连的患者行螺旋CT扫描及三维重建。男16例,女9例;年龄19~70岁,平均42岁。骨折部位:胫骨8例,股骨6例,锁骨4例,肱骨4例,尺骨3例。骨折固定方法:钢板螺钉固定15例,髓内钉内固定10例。受伤到CT检查时间3~24个月,平均9.3个月。

1.2 螺旋CT扫描与三维重建技术 采用TOSHIBA Aquilion 16超高档16层SCT扫描机,以骨折断端为扫描中心,扫

描范围包括整个内固定物所覆盖的骨段,选用HQ扫描模式,层厚0.75mm,螺距1.0,影像滤过方式为E2,电压120KV,电流160mA,重建矩阵512×512,一次扫描时间为10s;轴位影像的重建层厚为1.0mm、层距为1.0mm。在影像工作站上利用重建后的轴位影像数据进行整个内固定物所覆盖骨段的3D及MPR成像,首先选择MPR窗口对轴位影像作多层重组,包括冠状位、矢状位及横断面成像;另外再开3D窗口作三维重建,3D以表面遮盖法及表面透视法进行成像,并对3D图像进行多方位的旋转观察。

1.3 CT三维重建结果评价 由三位高年资医师共同完成,其中放射科医师2名,骨科医师1名,评价者预先不知道临床结果。从三维图像及矢状面和冠状面序列观察骨折端骨痂生成情况。以任意角度观察三维图像中骨折断端不连续,连续矢状面和冠状面序列骨折端无连续性骨痂通过,并且3位医师