

·基础研究·

胸髓横断大鼠减重平板步行训练后腰髓前角神经元超微结构的可塑性变化

张 纓¹ 纪树荣¹ 孙异临² 范晓华³ 周红俊¹ 刘根林¹ 郑 樱¹ 郝春霞¹ 王一吉¹

摘要 目的:探索步行训练提高脊髓损伤(SCI)后运动功能的脊髓可塑性机制。**方法:**84只成年雌性 Wistar 大鼠随机分为假手术组(n=18)、胸髓横断模型组(n=33)、SCI 后减重平板步行训练(BWSTT)治疗组(n=33),分别于术后第7天、15天、45天,通过光镜和电镜观察 SCI 大鼠脊髓腰膨大内前角神经元形态结构的变化。**结果:**胸髓横断大鼠 BWSTT 后,腰髓前角神经元超微结构出现代偿性改变。**结论:**BWSTT 后胸髓横断大鼠可通过增强脊髓损伤平面以下腰髓前角神经元的可塑性,促进其后肢运动功能的恢复。

关键词 脊髓损伤;减重平板步行训练;超微结构;脊髓可塑性

中图分类号:R493,R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-04-0306-03

The ultrastructural plasticity character in anterior horn neurons of lumbar cord in rats after transthoracic spinal cord injury by BWSTT/ZHANG Ying, JI Shurong, SUN Yilin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(4): 306—308

Abstract Objective:To investigate the spinal cord plasticity mechanism of locomotor training on improving locomotion after transthoracic spinal cord injury (SCI). **Method:**Eight-four adult female rats were divided into Sham, SCI and post SCI body-weight-support treadmill training (BWSTT) groups. The morphology of intact lumbar enlargement (caudal to the lesion) was observed under light microscope and electron microscope at the 7th d, 15th d and 45th d postoperatively. **Result:** After BWSTT ultrastructure of neurons in lumbar cord anterior horn of transthoracic SCI rats appeared compensative changes. **Conclusion:**BWSTT can improve locomotion of transthoracic SCI rats by promoting the neuronal plasticity of lumbar cord anterior horn.

Author's address China Rehabilitation Research Center, Beijing Boai Hospital, Beijing, 100068

Key words spinal cord injury; body-weight-support treadmill training; ultrastructure; spinal cord plasticity

近年来,减重平板步行训练(body-weight-support treadmill training, BWSTT)作为一种特定任务式训练,被认为是颇具前景的能有效改善脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后步行功能障碍的康复治疗方法,为人们所关注^[1-3]。但目前尚不明了 BWSTT 提高 SCI 患者运动功能的具体作用机制。

神经元是神经系统的结构和功能单位,对其进行研究,能为揭开神经系统功能的“神秘性”提供依据。故而,本研究采用大鼠胸髓完全横断模型,通过光镜和电镜观察,损伤脊髓部位远端未受损区域内神经元的组织形态学结构,来探索 BWSTT 促进胸髓横断大鼠运动功能的脊髓可塑性作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

84只健康成年雌性 Wistar 大鼠(许可证编号 SCXK(京)2000-0012),体重 250—300g。随机分为假手术组(Sham 组)(n=18)、胸髓横断模型组(SCI 组,对照组)(n=33)、SCI 后减重步行训练治疗组(BWSTT 组,实验组)(n=33)。每组动物再随机分为

第7天、15天、45天3个亚组,其中 Sham 组各亚组均为6只,SCI 组和 BWSTT 组各亚组为11只。

1.2 模型制备和术后处理

10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔麻醉,俯卧固定,备皮。自背部正中切开 T7—T9 椎体水平的皮肤、筋膜及皮下组织,钝性剥离竖脊肌,切除 T8 椎板,充分暴露 T8 椎体水平的脊髓。Sham 组不做任何处理,直接逐层缝合肌肉、筋膜及皮肤。SCI 组和 BWSTT 组参照建立脊髓横断模型的方法,在 T8 椎体水平,用尖锐刀片,自背侧至腹侧快速分层完全横断脊髓,以神经剥离子在腹侧硬脊膜与椎管间穿出到背侧,同时造成 2mm 左右的脊髓缺损,并抬起脊髓两断端确认横断的完全性。动物脊髓横断后即刻出现摆尾、双下肢抽搐或尿失禁等现象。压迫止血后,逐层缝合。术后动物单笼饲养,青霉素腹腔注射 3d 预防感染,

1 中国康复研究中心北京博爱医院,首都医科大学康复医学院,北京,100008

2 天坛医院电镜中心

3 山东省立医院

作者简介:张纓,女,主治医师,博士

收稿日期:2008-09-15

每天辅助排尿、排便 2—4 次。

1.3 减重平板步行训练

BWSTT 组于脊髓横断损伤第 5 天开始减重平板步行训练^[9], 1 次/d, 30min/次, 5 次/周。开始减重量为大鼠体重的 50%, 跑台速度设为 7—10.5m/min, 以后减重量和速度依大鼠的能力进行调整。

1.4 行为学观察

分别于术前和术后第 1、7、15、45 天, 采用 BBB 评定方法^[9]对各组动物的大鼠后肢运动功能进行神经行为学评定。

1.5 取材、灌注固定和组织切片

分别于术后第 7、15、45 天进行。取材前, 先行脊髓再离断实验(1%乙醚吸入麻醉大鼠, 用尖锐刀片, 完全横断 T6 椎体水平的脊髓, 止血缝合。2h 后待动物完全清醒后, 观察大鼠后肢运动功能)。取材时, 水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 开胸, 经左心室-升主动脉插管行心脏灌注固定。先快速灌注温生理盐水 100ml, 再灌注 4% 的多聚甲醛 PBS 液 (0.1mol/L, pH7.2, 4℃) 200ml。1h 后, 暴露整个胸段和腰段脊髓。肉眼观察 T6 和 T8 椎体水平的脊髓是否完全横断, 以确认造模手术是否成功。①取 T8 椎体水平的脊髓, 即造模横断损伤部位上下 5mm 的脊髓, 置入 4% 的多聚甲醛 PBS 液内固定。系列脱水, 修整, 石蜡包埋, 矢状位常规连续切片 (厚 5 μ m), 普通玻片贴片, 脱蜡后行 HE 染色。②取 L2 脊髓, 在解剖显微镜下, 修剪成 1mm³ 的组织小块, 置入 2% 多聚甲醛—2.5% 戊二醛固定液中固定, 1% 锇酸后固定 (4℃, 60min), 用于电镜检测。③取 L3—L5 脊髓腰膨大, 置 4% 的多聚甲醛 PBS 液内后固定, 200g/L 蔗糖过夜沉底后, 将组织于 -70℃ 冰冻 2h, 冠状位冰冻切片 (厚 10 μ m)。每块组织的连续切片随机分 6 份, 黏附至防脱片的载玻片上, 5 份用于免疫组化检测, 1 份用于 HE 染色。

1.6 光镜和电镜观察

HE 染色后, 细胞核呈蓝色, 胞浆呈红色, 中性树胶封片。光镜下观察脊髓组织的结构变化。酒精梯度脱水, 丙酮加 Epon812 包埋剂浸透与包埋, 环氧树脂 Epon812 包埋, 超薄切片, 醋酸双氧铀, 柠檬酸铅复染后, 透射电镜下观察前角神经元细胞超微结构。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件包分析 BBB 评分数据, 采用 ANOVA 进行统计分析。

2 结果

2.1 一般情况

Sham 组大鼠全部存活, SCI 组和 BWSTT 组共有 18 只大鼠死亡, 存活率达 78.57%。所有存活的 SCI 组和 BWSTT 组大鼠均经脊髓再次横断实验、取材时肉眼观察以及损伤部位脊髓连续切片 HE 染色, 均证实为脊髓完全横断。

2.2 行为学观察结果

Sham 组大鼠在整个实验中都保持后肢运动活跃。SCI 组和 BWSTT 组大鼠, 在脊髓横断损伤后, 后肢呈弛缓性瘫痪, 爬行运动完全靠前肢带动; 以后随时间延长, 逐渐恢复部分后肢运动功能, 但尚不能达到频繁或持续负重的步行能力。各组 BBB 评分结果见表 1。SCI 组和 BWSTT 组大鼠, 术后第 7 天与第 15 天时, 部分大鼠开始出现后肢单或双关节的运动恢复, 但 SCI 组和 BWSTT 组差异无显著性意义; 第 45 天时, 两组大鼠出现明显的后肢运动功能部分恢复 (BBB 评分均未超过 10 分), BWSTT 组大鼠 BBB 评分明显高于 SCI 组, 差异存在显著性 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 BBB 评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	术前	术后第 1 天	术后第 7 天	术后第 15 天	术后第 45 天
Sham 组	21±0	21±0	21±0	21±0	21±0
SCI 组	21±0	0±0 ^①	0.25±0.25 ^①	1.125±0.479 ^①	2.125±0.875 ^①
BWSTT 组	21±0	0±0 ^①	0.375±0.183 ^①	1.375±0.461 ^①	6.5±1.282 ^{①②}

与 Sham 组相比: ① $P < 0.05$; 与 SCI 组相比: ② $P < 0.05$

2.3 组织形态学观察结果

2.3.1 损伤部位脊髓: 肉眼见: 脊髓横断部位的脊髓, 切口较整齐, 断端间隙较大 (1—2mm)。术后第 7 天组, 断端轻微肿胀; 术后第 15 天和第 45 天组, 断端无明显肿胀, 局部瘢痕形成明显, 损伤上下 5—10mm 内脊髓萎缩变细。

光镜下见: 损伤区正常结构破坏, 形成形态各异的瘢痕组织, 脊髓实质内散布空洞。横行的瘢痕组织将脊髓组织完全隔断, 未见神经纤维残留。

2.3.2 损伤部位以下腰髓组织: 肉眼见脊髓横断部位以下的腰髓组织, 外观基本正常。术后第 45 天时 BWSTT 组的腰膨大脊髓周径较 SCI 组有增大趋势。

光镜下见: 脊髓结构基本正常, 仅于术后第 7 天时见少量核固缩的前角神经元, BWSTT 组和 SCI 组间无明显差异。

2.3.3 腰髓前角神经元的超微结构 如图 1 所示 (见彩色插页); Sham 组术后第 7、15、45 天, 腰髓前角神经元的超微结构基本相同。胞质内富含粗面内质网及线粒体等细胞器, 粗面内质网含发达的核糖体, 线粒体结构完整; 细胞核常染色质丰富、分布均匀, 核膜完整, 核仁清晰居中。胞体表面见神经元轴突终末与之形成的轴体突触, 在轴突末梢内见中等量的突触小泡, 其中以较小、清亮、呈圆形、内含兴奋性神经递质的突触小泡居多。

SCI 第 7 天组,胞质内细胞器崩解,粗面内质网核糖体脱落,线粒体肿胀、嵴消失,呈空泡样改变;细胞核常染色质淡、分布不均匀,核膜消失,核仁浓缩居中。胞体表面见肿胀的神经元轴突终末挤压胞体,轴突末梢内几乎见不到突触小泡。

BWSTT 第 7 天组,胞质内粗面内质网扩张,核糖体部分脱落,线粒体肿胀、嵴断裂;细胞核异染色质边聚,核膜皱褶明显内陷,核仁浓缩居中。胞体表面见肿胀的神经元轴突终末包绕胞体,轴突末梢内见少量的兴奋性突触小泡。

SCI 第 15 天组,胞质内粗面内质网与线粒体含量减少,溶酶体与滑面内质网含量增多,核糖体部分脱落,线粒体轻度肿胀、嵴部分断裂;细胞核常染色质淡、分布不均匀,核膜皱褶轻度内陷,核仁浓缩偏向一侧。胞体表面见神经元轴突终末无明显肿胀,轴突末梢内见少量的突触小泡。

BWSTT 第 15 天组,胞质内粗面内质网和核糖体结构基本正常,溶酶体含量增多,线粒体轻度肿胀、嵴部分紊乱;细胞核常染色质淡、分布不均匀,核膜皱褶不明显,核仁浓缩偏向一侧。胞体表面见突触明显增多,轴突末梢内兴奋性突触小泡明显增多。

SCI 第 45 天组,胞质内富含粗面内质网和核糖体,结构基本正常,溶酶体含量增多,部分线粒体轻度肿胀、嵴部分模糊;细胞核常染色质淡、分布不均匀,核膜皱褶轻度内陷,核仁浓缩偏向一侧。胞体表面见突触不多,轴突末梢内兴奋性突触小泡不多。

BWSTT 第 45 天组,胞质内粗面内质网和核糖体丰富,结构基本正常,溶酶体增多不明显,线粒体增多;细胞核常染色质淡、分布均匀,核膜完整,核仁浓缩居中。胞体表面见突触明显增多,轴突末梢内兴奋性突触小泡明显增多。

3 讨论

3.1 细胞器的变化

神经元是神经系统的结构和功能单位,通过逐级严谨有序的方式形成复杂的神经网络,具有接受、整合和传递信息的功能。电镜结果显示,SCI 组早期胞质内粗面内质网及线粒体等细胞器含量减少,粗面内质网核糖体脱落,线粒体肿胀、呈空泡样改变;晚期胞质内溶酶体与滑面内质网含量增多,线粒体肿胀、嵴消失。上述超微结构的变化说明,胸髓横断后,虽然光镜下腰髓组织的改变不明显,但由于影响局部神经肽的合成、输送和释放,可发生神经源性神经肽介导的炎症损伤作用。研究发现,BWSTT 组损伤反应的程度较轻、范围较小,可能与早期运动有利

于增加脊髓血流量,加快局部血液循环,促进神经元线粒体正常的呼吸链酶活性和氧化磷酸化,以及加速损伤修复有关。

3.2 突触的变化

突触是神经元发挥功能的关键部位。突触通过神经递质来进行细胞间的信号传递,是神经系统行使功能的基础。神经递质以囊泡的形式储存于神经末梢。研究发现,第 15 天和第 45 天时,BWSTT 组不仅可以增加神经元细胞膜表面兴奋性神经递质的囊泡数量,而且也大大增加突触的形成数量。这种突触结构形态的高度可变性,被认为是神经可塑性的具体表现^[9]。上述兴奋性突触传入增加可能是 BWSTT 促进 SCI 后步行功能恢复的机制之一。

3.3 脊髓可塑性

神经可塑性指中枢神经系统损伤后,具有从解剖和功能上修改自身,以适应变化了的环境和客观现实的能力。包括潜伏通路的激活和突触重组等多种形式。脊髓可塑性是 SCI 康复治疗的重要基础之一。由于位于腰髓的步行模式中中枢各神经元之间的突触连接具有高度可塑性,若 SCI 后此神经网络仍然保留的话,就有可能通过电刺激、药物、物理治疗训练等刺激脊髓步行模式中中枢神经元环路启动和重组,改善运动功能、促进步行能力^[7-10]。本实验证实,大鼠胸髓完全横断后,进行特定的 BWSTT 步行训练,可以通过腰髓前角神经元在结构及功能上的修饰,有效改变脊髓节段内的突触活性,促进步行模式中中枢神经环路发生各种适应性调节反应。

参考文献

- [1] Bouyer LJD, Rossignol S. Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion. II. Spinal cats [J]. *J Neurophysiol*, 2003,90(6):3640—3653.
- [2] Protas EJ, Holmes SA, Qureshy H, et al. Supported treadmill ambulation training after spinal cord injury: a pilot study [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2001,82(6):825—831.
- [3] Kawashima N, Nozaki D, Abe MO, et al. Alternate leg movement amplifies locomotor-like muscle activity in spinal cord [J]. *J Neurophysiol*, 2005,93(2):777—785.
- [4] Roy RR, Talmadge RJ, Hodgson JA, et al. Training effects on soleus of cats spinal cord transected (T12-13) as adults [J]. *Muscle Nerve*, 1998,21(1):63—71.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995,12(1):1—21.
- [6] 张霞. 突触及突触传递的研究概况 [J]. *动物医学进展*, 2004,25(6):35—37.
- [7] Grillner S. The spinal locomotor CPG: a target after spinal cord injury [J]. *Prog Brain Res*, 2002,137:97—108.
- [8] Harkema SJ. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking [J]. *Neuroscientist*, 2001,7(5):455—468.
- [9] Fouad K, Pearson K. Restoring walking after spinal cord injury [J]. *Progress in Neurobiol*, 2004,73(2):107—126.
- [10] Hooper SL. Behavioral plasticity: modulation occurs across time [J]. *Curr Biol*, 2004,14(5):190—191.