

糖尿病大鼠脊髓损伤后神经行为学和组织病理学研究

叶添文¹ 贾连顺¹ 严望军¹ 周许辉¹ 叶晓健¹ 倪斌¹ 袁文¹

摘要

目的:了解糖尿病大鼠脊髓损伤(SCI)后神经功能恢复的情况。

方法:将SD大鼠随机分成假手术对照组、假手术糖尿病组、SCI对照组和SCI糖尿病组。一次性腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型,Allen法制作SCI模型。在伤后10d内每天对各实验组大鼠进行斜板试验评价神经功能,并于伤后第1天和第10天观察大鼠脊髓组织形态学变化。

结果:SCI糖尿病组大鼠伤后斜板试验临界角度明显低于SCI对照组,差异有显著性意义。组织病理学显示SCI糖尿病组大鼠脊髓组织灰质和白质严重受损,神经细胞稀少、尼氏体消失。

结论:糖尿病大鼠脊髓容易遭受自由基损害,导致SCI后神经功能恢复不佳。

关键词 糖尿病;脊髓损伤;神经行为学;组织病理学

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-06-0497-04

The experimental study of neurobehavior and histopathology in diabetic rats following spinal cord injury/YE Tianwen, JIA Lianshun, YAN Wangjun, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(6): 497-500

Abstract

Objective: To study the neurological recovery in diabetic rats following spinal cord injury(SCI).

Method: Experimental diabetes was produced by once intraperitoneal injection of streptozotocin in adult male SD rats. SCI animal model was made by Allen's method. The rats were divided into sham-control group, sham-diabetic group, SCI-control group, SCI-diabetic group randomly. Postinjury neurological function in every experimental rat was assessed using inclined plane test daily for 10 d. Pathological changes in spinal cord were studied at the 1st d and 10th d post trauma.

Result: The critical angle of inclined plane test in diabetic rats was significantly lower as compared to that in control rats following SCI. Histopathological changes were more significant in diabetic rats than that in control rats following SCI.

Conclusion: It was suggested that diabetic animals were more susceptible to free radicals and resulted in poor recovery of neurological function following SCI.

Author's address Dept. of Orthopaedics Surgery, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200003

Key words diabetes; spinal cord injury; neurobehavior; histopathology

颈椎后纵韧带骨化症占颈椎疾患的0.2%—4%,约有10%的患者伴有糖尿病或糖代谢异常^[1-2]。糖尿病是否影响颈椎后纵韧带骨化术后的神经功能恢复,目前存在一定争议。王松刚等^[3]报道颈脊髓压

迫症糖尿病组患者和非糖尿病组患者颈椎板成形术后日本矫形外科协会(Japanese orthopaedics association, JOA)评分差异无显著性。也有学者认为伴有糖尿病的颈后纵韧带骨化症患者的术后神经功

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.06.002

1 上海第二军医大学附属长征医院骨科,200003

作者简介:叶添文,男,主治医师,博士;收稿日期:2009-07-31

能恢复较差^[4]。因此,笔者拟采用神经行为学和组织形态学综合评价糖尿病大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后的神经功能恢复情况,为伴有糖尿病的脊髓压迫症患者的临床治疗效果提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠,体重(250±50)g,上海海军医学研究所动物中心提供。

1.2 试剂和设备

链脲佐菌素(瑞典 ALEXIS 生物化学公司), OneTouch[®] Ultra[™] 型微型血糖仪和试纸(美国强生公司),显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 糖尿病大鼠模型

参照 Faiyaz 介绍的方法^[5],将 2%链脲佐菌素溶液按 2.5ml/kg 体重一次性注射于 SD 大鼠腹腔。10d 后 OneTouch[®] Ultra[™] 型微型血糖仪检测大鼠空腹血糖值,浓度超过 16.7mmol/L 者为糖尿病大鼠。

1.4 动物分组

随机抽取糖尿病 SD 大鼠和正常 SD 大鼠各 16 只,行神经行为学观察。SCI 糖尿病组 8 只、假手术糖尿病组 8 只、SCI 对照组 8 只、假手术对照组 8 只。随机抽取糖尿病 SD 大鼠和正常 SD 大鼠各 8 只,行伤段脊髓组织病理检查。假手术对照组 2 只,假手术糖尿病组 2 只,SCI 对照组 6 只,脊髓损伤糖尿病组 6 只。

1.5 SCI 模型

采用改良 Allen's 打击法制作 SCI 动物模型^[6]。称重后用 3%戊巴比妥钠(25mg/kg)腹腔内麻醉,背部剃毛消毒。以 T4 棘突为中心,后正中纵切开皮肤,暴露并咬除 T3—T5 棘突及全椎板,暴露约 1cm 长脊髓,以中度打击力(10g×5cm)制作 SCI。对照组咬掉大鼠椎板,但不损伤脊髓。术后肌注青霉素针预防医源性感染。室温 18—28℃下,每笼 4 只饲养,每日挤压膀胱 3 次协助排尿。

1.6 神经功能行为学评价

采用改良 Rivlin-Tator 斜板试验^[7]。操作方法是:将大鼠身体轴线与覆盖有 1mm 厚纹理的橡胶皮的斜板纵轴垂直位放置,斜板从 0°开始,每次升高 5°,以大鼠能够停留 5s 的最大倾斜角度为其临界角

度。观察各组大鼠伤前、伤后第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天、第 7 天、第 8 天、第 9 天、第 10 天的临界角度。

1.7 脊髓组织形态学观察

观察假手术对照组和假手术糖尿病组大鼠脊髓组织病理变化。SCI 对照组和 SCI 糖尿病组大鼠伤后第 1 天、第 10 天随机抽取 3 只行脊髓组织病理检查。取 2cm 的伤段脊髓组织行 HE 染色和 Nissl 染色,在显微镜下观察脊髓组织的形态、出血、水肿和坏死等情况。

1.8 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计学软件包进行方差分析。实验数据以平均值±标准差表示, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 大鼠神经行为学评分

假手术对照组和假手术糖尿病组大鼠椎板减压后 24h 点的斜板临界角度较各组术前的斜板临界角度有轻微的减少,但这种减少无显著性意义。SCI 对照组和 SCI 糖尿病组大鼠 SCI 后第 1—10 天的斜板临界角度均明显小于伤前的斜板临界角度,其中在伤后第 1 天点的角度最小,以后缓慢升高。SCI 对照组和 SCI 糖尿病组大鼠伤后各观测时间点的斜板临界角度分别小于假手术对照组和假手术糖尿病组。SCI 糖尿病组大鼠伤后第 1—10 天斜板临界角度明显小于脊髓损伤对照组大鼠,两者差异有显著性意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 对照组和糖尿病组大鼠脊髓损伤后斜板试验的临界角度

	$(\bar{x}\pm s, ^\circ)$			
	假手术 对照组	假手术 糖尿病组	SCI 对照组	SCI 糖尿病组
伤前	65.0±0.0	64.4±1.8	65.0±0.0	64.4±1.8
伤后第 1 天	63.1±2.6	61.9±3.7	35.0±3.8 ^{①②}	28.1±2.6 ^{③④⑤}
伤后第 2 天	64.4±1.8	64.4 ±1.8	39.3±4.3 ^{①②}	33.8±2.3 ^{③④⑤}
伤后第 3 天	63.8±2.3	63.8 ±2.3	43.1±4.6 ^{①②}	34.4±3.2 ^{③④⑤}
伤后第 4 天	65.0±0.0	64.4 ±1.8	44.4±3.2 ^{①②}	38.8±3.5 ^{③④⑤}
伤后第 5 天	64.4±1.8	63.8 ±2.3	48.1±2.6 ^{①②}	40.6±5.0 ^{③④⑤}
伤后第 6 天	64.4±1.8	65.0 ±0.0	49.4±3.2 ^{①②}	43.8±4.4 ^{③④⑤}
伤后第 7 天	65.0±0.0	64.4 ±1.8	53.8±3.5 ^{①②}	46.3±4.4 ^{③④⑤}
伤后第 8 天	64.4±1.8	64.4±1.8	55.6±3.2 ^{①②}	47.5±3.8 ^{③④⑤}
伤后第 9 天	65.0±0.0	64.4±1.8	57.5±2.7 ^{①②}	48.8±6.9 ^{③④⑤}
伤后第 10 天	65.0±0.0	64.4±1.8	60.6±3.2 ^{①②}	50.6±4.2 ^{③④⑤}

与伤前比较^① $P<0.05$,^③ $P<0.05$,与假手术对照组比较^② $P<0.05$,与假手术糖尿病组比较^④ $P<0.05$,与脊髓损伤对照组比较^⑤ $P<0.05$

2.2 脊髓组织形态学观察

2.2.1 HE 染色结果: 糖尿病组和对照组大鼠正常脊髓组织灰白质界限清楚,形态完整正常,排列整齐(图1)。在伤后第1天,对照组大鼠脊髓组织灰白质界限欠清楚,但结构较完整,组织水肿、出血,轻度脱髓鞘改变,糖尿病组大鼠脊髓组织灰白质界限消失,结构紊乱,组织广泛出血水肿,灰质出现囊性坏死灶,白质大量脱髓鞘样变(图2)。在伤后第10天,对照组大鼠脊髓灰质及周边白质有大量液化空腔,明显脱髓鞘改变,糖尿病组大鼠脊髓灰质及周边白质除有大量的液化空腔外,尚有大片坏死区,白质严重脱髓鞘改变(图3)。

2.2.2 Nissl 染色结果: 糖尿病组和对照组大鼠正常脊髓神经细胞排列整齐,尼氏体呈网状排列于核周,细胞核及核仁清晰(图4)。在伤后第1天,对照组大鼠脊髓神经细胞排列紊乱,层次不清,多数神经细胞肿胀,轴突变短,尼氏体减少,部分神经细胞空泡化,细胞核固缩,糖尿病组大鼠脊髓神经细胞严重肿胀,轴突基本消失,细胞核破碎,尼氏体散在(图5)。在伤后第10天,对照组大鼠脊髓神经细胞少见,轴突短且不清晰,尼氏体稀少,高血糖组大鼠脊髓神经细胞基本消失,未见尼氏体,大量散在的胶质细胞群(图6)。

图1 大鼠正常脊髓组织 (HE染色,×40)

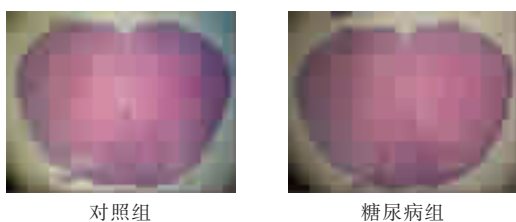


图2 损伤后第1天大鼠脊髓组织 (HE染色,×40)

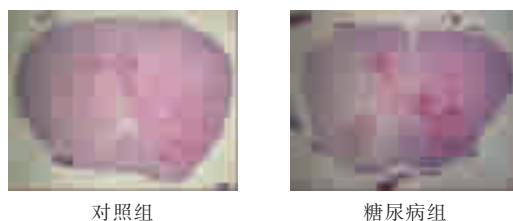


图3 损伤后第10天大鼠脊髓组织 (HE染色,×40)

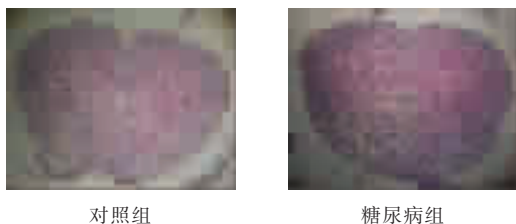


图4 大鼠正常脊髓组织 (Nissl染色,×400)

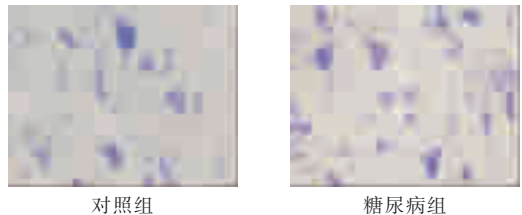


图5 损伤后第1天大鼠脊髓组织 (Nissl染色,×400)

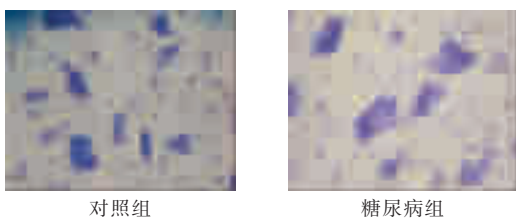
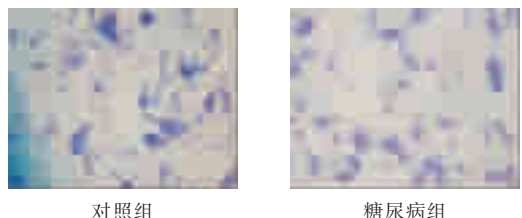


图6 损伤后第10天大鼠脊髓组织 (Nissl染色,×400)



3 讨论

颈椎病老年患者和颈椎后纵韧带骨化症的患者常伴有糖尿病。糖尿病是否影响退行性脊柱疾病患者术后神经功能的变化,目前仍存在争议^[3-4,8]。王松

刚等^[3]报道颈脊髓压迫症糖尿病组患者和非糖尿病组患者颈椎板成形术后 JOA 评分无显著性差异,但糖尿病组患者术后下肢感觉功能较对照组差。因此,该作者认为糖尿病病程越长,患者术后神经功能越

差。Choi 等^[4]采用多因子回归法分析了影响颈椎后纵韧带骨化症患者神经功能预后的因素,发现糖尿病是影响的颈后纵韧带骨化症患者前路手术后神经功能唯一因素。Tariq 等^[9]通过实验研究证实糖尿病大鼠 SCI 后神经功能恢复差。目前国内未见这方面研究的报道。为此,我们通过研究糖尿病大鼠和非糖尿病大鼠 SCI 后不同时间点的神经行为学改变和脊髓组织病理学改变,了解糖尿病对 SCI 后神经功能恢复的影响及病理学基础。

笔者前期的研究发现,正常大鼠 SCI 后 4h 组织总抗氧化能力出现短时间升高,随后才下降;糖尿病组大鼠 SCI 后组织总抗氧化能力表现为即刻大幅度下降,且一直低于正常大鼠^[10]。糖尿病组大鼠 SCI 后组织抗氧化能力下降,组织容易遭受自由基的损害,加重脊髓的继发性损害,影响神经功能的恢复。我们通过病理学研究发现,伤后第 1 天和第 10 天的脊髓组织病理学显示糖尿病大鼠脊髓组织形态学的改变明显严重于对照组大鼠。斜板试验进一步证实了糖尿病大鼠 SCI 后神经功能恢复较差。

笔者推测,糖尿病大鼠脊髓组织由于长时间处于高血糖环境,神经细胞受到一定的损害。在遭受外伤后,脊髓组织的抗氧化能力急剧下降,更容易遭到自由基损害。这可能是糖尿病患者 SCI 后恢复能力较差的原因。

参考文献

[1] Shingyouchi Y, Nagahama A, Niida M. Ligamentous ossification

of the cervical spine in the late middle aged Japanese men. Its relation to body mass index and glucose metabolism [J]. Spine, 1996, 21(21):2474—2478.

[2] Kawaguchi H, Kurokawa T, Kodama Y, et al. Metabolic background of ossification of the posterior longitudinal ligament [A]. In : Yonenobu K, Sakou T, Ono K, eds. OPLL: ossification of the posterior longitudinal ligament [M]. Tokyo: Springer-Verlag, 1997: 73—77.

[3] 王松刚, 袁泽农, 张佐伦. 糖尿病患者颈椎椎板成形术治疗的随访结果[J]. 颈腰痛杂志, 2006, 26(4): 254—257.

[4] Choi S, Lee SH, Lee JY, et al. Factors affecting prognosis of patients who underwent corpectomy and fusion for treatment of cervical ossification of the posterior longitudinal ligament: analysis of 47 patients [J]. J Spinal Disord Tech, 2005, 18(4): 309—314.

[5] Ahmad F, Goldstein BJ. Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozocin diabetes [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 1995, 268(5): E932—E940.

[6] Garlson GD, Warden KF, Barbeau B, et al. Viscoelastic relaxation and regional blood flow response to spinal cord compression and decompression [J]. Spine, 1997, 22(17): 1285—1291.

[7] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury [J]. J Neurosurg, 1977, 47(4): 577—581.

[8] Arinon Z, Adunsky A, Fidelman Z, et al. Outcomes of decompression surgery for lumbar spinal stenosis in elderly diabetic patients [J]. Eur Spine J, 2004, 13(1): 32—37.

[9] Tariq M, Morais C, Kishore PN, et al. Neurological recovery in diabetic rats following spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 1998, 15(4): 239—251.

[10] 叶添文, 贾连顺, 周许辉, 等. 糖尿病大鼠脊髓损伤后组织总抗氧化能力变化的实验研究[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(9): 1144.