

腹腔注射氢生理盐水对急性马尾综合征大鼠神经功能的影响及相关机制初探

官正茂, 孙学军, 史建刚, 贾连顺

(第二军医大学附属长征医院骨科医院脊柱外科 200003 上海市)

【摘要】目的:初步探讨腹腔注射氢生理盐水对急性马尾综合征大鼠神经功能的影响及相关机制。**方法:**选取 200~250g 的 SD 大鼠 168 只,随机均分为 3 组:假手术组、对照组、实验组。假手术组仅行 L5 棘突和 L5/6 间隙黄韧带切除,对照组和实验组建立急性马尾综合征大鼠硅胶条压迫模型;实验组建模术后立刻行 5ml/kg 氢生理盐水腹腔注射,以后 1 次/8h 腹腔注射,假手术组和对照组均行等量生理盐水腹腔注射。术后 3h、6h、12h、24h、48h 和 72h 分别于每组各取 8 只大鼠进行热板试验,评价行为学表现,而后麻醉下取 T13~L1 段脊髓、L4~L6 段马尾神经及 L5、L6 双侧背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)行丙二醛(MDA)含量检测,分析各时间点的变化。另于术后 48h 每组各取 8 只行多聚甲醛灌注后取 T13~L1 段脊髓、L4~L6 段马尾神经及 L5、L6 双侧 DRG,行 HE 染色观察组织形态,取马尾神经行神经纤维蛋白(NF)染色并计算阳性率,取脊髓及 DRG 行 Caspases 3 染色后计算阳性指数,行 Tunel 染色后计算凋亡指数。**结果:**由于麻醉苏醒时间不一致术后 3h 各组的缩足潜伏期数据不采用,6h~72h 的缩足潜伏期实验组均低于对照组,对照组和实验组均高于假手术组($P<0.05$)。术后对照组和实验组 MDA 水平在 3h~48h 均较同组前一时间点有明显增加($P<0.05$),在 48h 和 72h 无明显增加($P>0.05$),对照组在 3h 时增幅最大,实验组在 24h 增幅最大($P<0.05$);术后 3h~72h 各时间点马尾、脊髓及背根神经节的 MDA 水平实验组均比对照组低,对照组和实验组均比假手术组低($P<0.01$)。假手术组的 NF 染色阳性纤维率为 100%,实验组为(59.08±6.25)%,对照组为(21.35±2.38)%,三组间两两比较有显著性差异($P<0.01$)。对照组和实验组脊髓和 DRG 的 Caspases 3 阳性指数均明显大于假手术组($P<0.01$);实验组的阳性指数均明显小于对照组($P<0.05$)。对照组和实验组脊髓和 DRG 的 Tunel 凋亡指数均明显大于假手术组,实验组脊髓和 DRG 的凋亡指数均小于对照组($P<0.01$)。**结论:**氢生理盐水可改善急性马尾综合征大鼠的行为学表现,减少神经纤维变性及神经元凋亡,其机制可能与氢对氧化应激反应具有抑制和延缓作用有关。

【关键词】马尾综合征;氢生理盐水;氧化应激;凋亡;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.06.11

中图分类号:R681.5,R965 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-06-0537-09

Preliminary study of mechanism and neuroprotective effects of hydrogen-rich saline intraperitoneal injection in rats with acute cauda equina syndrome/GUAN Zhengmao, SUN Xuejun, SHI Jiangang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(6): 537-545

【Abstract】Objectives: To study the mechanism and neuroprotective effects of hydrogen-rich saline intraperitoneal injection in rats with acute cauda equina syndrome. **Methods:** 168 SD rats weighing 200~250g were randomly allocated into three groups: sham-operation group, control group and experimental group. The L5 spinous process and ligamentum flavum between L5 and L6 vertebra was removed in sham-operation group, the rat models of acute cauda equina syndrome were made in control group and experimental group. Hydrogen-rich saline was injected intraperitoneally in a 5ml/kg dose after operation immediately and then once every 8 hours in experimental group; normal saline was injected in sham-operation group and control group. 3h, 6h, 12h, 24h, 48h and 72h after operation, 8 rats from each group were respectively examined by the hot plate test, then their samples of L4-L6 cauda equine, T13-L1 spinal cord and dorsal root ganglia of L5 and L6 were harvested to analyze tissue concentrations of MDA. At 48h, the samples experienced HE, NF, Cas-

第一作者简介:男(1977-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(021)81867120 E-mail:guanmao@163.com

通讯作者:史建刚 E-mail:shijiangang616@163.com

pases 3 and Tunel staining. By the above methods, animal ethology, oxidative stress, histomorphology and cell apoptosis were evaluated statistically. **Results:** The paw-withdrawal latency in 3h groups was unavailable due to different recovery time from anesthesia. From 6h to 72h, the paw-withdrawal latency in experimental group was lower than control group, and both control group and experimental group had higher latency than sham-operation group ($P<0.05$). The MDA level of cauda equine, spinal cord and dorsal root ganglia in control group and experimental group increased significantly at the time from 3h to 48h ($P<0.05$) and showed no significant difference between the 48h and 72h ($P>0.05$). The MDA level increased at 3h in control group and at 24h in experimental group ($P<0.05$). The experimental group from 3h to 72h had lower MDA level, than control group, while control group or experimental group had higher MDA level than sham-operation groups ($P<0.01$). The positive rate of NF staining was 100% in sham-operation group, $(59.08\pm6.25)\%$ in the experimental group, $(21.35\pm2.38)\%$ in the control group, pairwise comparisons among the three groups showed significant differences ($P<0.01$). The positive index of Caspases 3 staining of spinal cord and dorsal root ganglia in control group or experimental group was higher than that in sham-operation group ($P<0.01$), while experimental group was lower than control group ($P<0.05$). Tunel apoptotic index of spinal cord and dorsal root ganglia in control group or experimental group was higher than that in sham-operation group, while experimental group was lower than control group ($P<0.01$). **Conclusions:** In acute cauda equina syndrome, Hydrogen-rich saline may improve ethology performance and reduce neurons apoptosis and degeneration of nerve fibers through restrained and deferred oxidative stress.

[Key words] Cauda equina syndrome; Hydrogen; Oxidative stress; Apoptosis; Rat

[Author's address] Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Shanghai, 200003, China

马尾综合征(cauda equina syndrome, CES)是马尾神经损伤导致的以下肢疼痛、运动感觉障碍、大小便、性功能及鞍区感觉功能障碍为典型症状、体征的一组症候群^[1-2],其病理生理机制目前还不明确,但继发性氧化应激损伤而导致的神经元凋亡越来越引起学者的重视^[3]。氢气选择性抗氧化效应的发现使人们意识到氢气对氧应激损伤具有潜在的应用价值,在脑、心肌、肝脏、肾、小肠的缺血再灌注损伤、化疗药物肾损伤、尿毒症血液透析等研究中,发现呼吸氢气或注射氢生理盐水都具有抗氧化应激损伤作用而抑制了其对这些重要脏器的严重损伤^[4]。氢生理盐水是否对马尾受压急性损伤后发生的氧化应激反应具有抑制作用,从而有效抑制急性马尾综合征的继发性损害,目前尚无报道。本研究建立急性马尾综合征大鼠模型,通过行为学、组织形态学、免疫组化和细胞凋亡指标评价,观察氢生理盐水对急性马尾综合征神经功能的影响,并初步探讨其相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 168 只,由第二军医大学动物实验中心提供,体重 200~250g。动物饲养于鼠笼中,自由饮食,光/暗周期为 12h/12h,背景噪

音小于 (40 ± 10) db,饲养温度为 $(22\pm4)^{\circ}\text{C}$ 。予 1 周时间适应环境,手术前 12h 禁食水。

1.2 动物分组及模型建立

动物随机分为假手术组、对照组和实验组。假手术组仅行 L5 棘突和 L5/6 间隙黄韧带的切除后关闭伤口;对照组和实验组按照 Takenobu 等^[5]马尾神经压迫模型经典方法稍加改良(用单根长硅胶条压迫 L5、L6 节段,在预实验中已验证其效果与两根短硅胶条分别压迫 L5、L6 节段的经典方法无统计学差异)建立马尾神经压迫模型:大鼠予 10%水合氯醛 $(0.3\text{ml}/100\text{g})$ 腹腔注射麻醉,显露 L5、L6 的棘突和椎板,切除 L5 棘突,尖嘴钳扩大 L5/6 椎间隙,并切除 L5/6 间隙的黄韧带,向头端塞入 $10.0\times1.0\times1.3\text{mm}$ 硅胶条 1 根,使 L5、L6 节段的马尾受到压迫,手术过程不损伤硬膜囊,麻醉苏醒后大鼠出现跛行、尿失禁或触摸到膀胱胀满即为建模成功。实验组术后立即以 $5\text{ml}/\text{kg}$ 氢生理盐水腹腔注射,之后 1 次/8h(预实验确定了氢生理盐水的剂量和频次)。假手术组和对照组均以等同实验组给药剂量的生理盐水腹腔注射。大鼠均每隔 6h 行膀胱按摩一次。术后每日青霉素 4 万单位腹腔内注射预防感染。氢生理盐水由第二军医大学海军临床医学系制备。

1.3 行为学观察

术后 3h、6h、12h、24h、48h 和 72h 每组各抽取 8 只大鼠行热板试验评价后肢功能。热板试验根据 Eddy 和 Leimbach 确立的方法进行^[6]:将热板仪温度调节于 $(55.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,记录自大鼠放在热板仪至其舔咬后爪的时间,即缩足潜伏期(paw-withdrawal latency, PWL),以此时间为痛阈指标。术前测量 3 次,取均值作为基础痛阈,选取基础痛阈 5~20s 的大鼠,剔除反应异常大鼠。每只大鼠均检测 3 次,每次至少相隔 5min 以上。为防止大鼠后爪被烫伤,确定 30s 为中断时间(Cut-off 值),超过 30s 按 30s 计算。测试时保持热板表面清洁干燥。

1.4 组织取材

术后 3h、6h、12h、24h、48h 和 72h 每组行热板试验后的 8 只大鼠麻醉后行手术切除椎板,暴露椎管,截取 T13~L1 段脊髓、L4~L6 段马尾神经及 L5、L6 双侧 DRG,清洗干净后,立刻放入液氮中保存,备氧化应激指标检测用。

另于术后 48h (预实验确立了术后 48h 为行为学改变和氧化应激反应的最高峰,48h 后无明显变化)每组抽取 8 只大鼠,麻醉后经颈动脉灌注 100ml 肝素生理盐水后再灌注 4%多聚甲醛溶液约 400ml,后路切除椎板,暴露椎管,截取 T13~L1 段脊髓、L4~L6 段马尾神经及 L5、L6 双侧 DRG,放入 4%多聚甲醛固定 24h,石蜡包埋,脊髓行垂直于长轴横向切片,马尾和 DRG 分别行横向和纵向切片,片厚 $4\mu\text{m}$,行组织学观察。

1.5 氧化应激指标检测

按照“脂质氧化(MDA)检测试剂盒”(中国上海碧云天生物科技有限公司 编号 S0131)说明书的操作规程,检测术后 3h、6h、12h、24h、48h 和 72h 检测 T13~L1 段脊髓、L4~L6 段马尾神经及 L5、L6 双侧 DRG 的丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。MDA 含量越高表示氧化程度越高^[7]。

1.6 组织学观察

1.6.1 HE 染色 取术后 48h 取材的切片行 HE 染色,观察相应马尾、脊髓及 DRG 的病理改变。染色后细胞核为蓝黑色,胞浆呈淡红色。

1.6.2 神经纤维蛋白染色(neurofilament protein, NF) 取术后 48h 取材的切片,按照“NF 抗体试剂盒”(丹麦 DAKO 公司 编号 M0762)的说明书进行 NF 染色,观察马尾神经纤维的形态及数量,正常神经纤维为棕黄色阳性染色,神经纤维受损

害后,神经纤维蛋白发生变性而染色为阴性^[8]。在 40 倍光镜下对每张马尾组织横切面切片分别随机选 5 个视野,计算阳性神经纤维数目和阴性神经纤维数目,阳性神经纤维率=阳性神经纤维数/(阳性神经纤维数+阴性神经纤维数) $\times 100\%$ 。

1.6.3 Caspase 3 免疫组化染色 取术后 48h 取材的切片,按照 Caspase 3 抗体试剂盒(美国 santa cruz 公司 编号 SC-623)的说明书进行 Caspase 3 染色。胞浆棕黄色染色为阳性,蓝色或不着色为阴性。应用计算机图像管理分析系统进行图像采集与分析,将免疫组化染色结果先转化为灰度值,再转换为阳性指数进行半定量分析。阳性指数越大,代表阳性产物表达程度越强。

1.6.4 细胞凋亡检测 取术后 48h 取材的切片,按照 Tunel 试剂盒(美国 Trevigen 公司 编号 cat#4828-30-DK)的说明书进行 Tunel 染色,即末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TdT-mediated X-dUTP nick end labeling)。细胞核棕黄色染色为阳性细胞,在光镜下随机选择 5 个高倍视野计数阳性细胞数,凋亡指数(apoptosis index, AI)=视野内凋亡细胞个数/视野内所有神经细胞 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学分析

所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用统计软件 SPSS 17.0 处理,多组数据用 ANOVA 分析;若方差不齐,采用非参数统计检验。 $P<0.05$ 为有显著性差异, $P<0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结果

2.1 行为学变化

各组术前及术后不同时间点热板试验大鼠缩足潜伏期见表 1。术前各组热板试验的缩足潜伏期无统计学差异。急性马尾综合征模型建立后,能观察到大鼠出现跛行、尿失禁或触摸到膀胱胀满。术后 3h 各组由于麻醉苏醒时间不一致,数据不采用。术后 6h~72h 各时间点对照组和实验组缩足潜伏期测量结果均明显高于假手术组,实验组各时间点均明显低于对照组($P<0.05$),假手术组术后 6h~72h 各时间点缩足潜伏期无明显变化($P>0.05$)。马尾综合征模型建立后 6~72h 行为学较假手术组有明显改变,但实验组较对照组行为学改变更小。

2.2 氧化应激指标

受压马尾和对应的脊髓、DRG 中 MDA 含量检测结果见表 2。术后 3h~72h 受压马尾和对应的脊髓、DRG 的 MDA 含量对照组和实验组各时间点均明显高于假手术组, 实验组各时间点均明显

表 1 三组术前及术后不同时间点热板试验大鼠缩足潜伏期 ($\bar{x}\pm s, s, n=8$)

Table 1 The paw-withdrawal latency of each group in hot plate test

	假手术组 Sham-operation group	对照组 Control group	实验组 Experimental group
术前 Preoperation	3.62±1.83	3.62±0.13	3.62±0.13
术后 6h 6h after operation	4.03±1.93	17.14±1.10 ^①	6.74±0.90 ^{①②}
术后 12h 12h after operation	3.92±1.89	19.05±1.24 ^①	8.10±1.06 ^{①②}
术后 24h 24h after operation	3.72±1.73	20.01±1.74 ^①	11.64±1.76 ^{①②}
术后 48h 48h after operation	3.68±1.65	18.04±1.60 ^①	10.33±1.76 ^{①②}
术后 72h 72h after operation	4.24±1.85	17.86±1.34 ^①	10.41±1.44 ^{①②}

注: ①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与对照组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with sham-operation groups, $P<0.05$; ② compared with control groups, $P<0.05$

低于对照组 ($P<0.01$)。术后假手术组 MDA 含量各时间点无明显变化; 对照组在 3~48h 较前一时间点均有明显增加 ($P<0.05$), 在 48h 和 72h 之间无明显增加 ($P>0.05$); 实验组在 3~48h 较前一时间点均有明显增加 ($P<0.05$), 在 48h 和 72h 之间无明显增加 ($P>0.05$)。对照组在 3h 的 MDA 增幅最大, 实验组在 24h 增幅最大 ($P<0.05$)。对照组和实验组术后各时间点的氧化应激水平均明显高于假手术组。

2.3 组织学

术后 48h, HE 染色光镜下可见假手术组马尾神经、脊髓和 DRG 组织形态基本正常。对照组马尾神经纤维松散, 部分轴突及髓鞘肿胀、脱髓鞘改变; 脊髓组织神经元出现收缩, 周围间隙明显扩大, 细胞核固缩甚至消失, 可见部分凋亡小体; DRG 细胞松散, 个别出现凋亡小体, 部分神经纤维髓鞘肿胀、脱髓鞘。实验组的脊髓、马尾、DRG 形态均较接近正常组形态, 少量细胞出现核偏移、固缩、神经纤维肿胀、脱髓鞘改变 (图 1)。

NF 染色光镜下观察, 假手术组马尾组织中神经轴突全部为强阳性的棕黄色染色, 雪旺氏细胞、

表 2 三组不同时间点相应节段脊髓、马尾和 DRG 的 MDA 含量 ($\bar{x}\pm s, \text{nmol/mg}, n=8$)

Table 2 The variation of MDA of each group

	术前 Preoperation	术后 3h 3h after operation	术后 6h 6h after operation	术后 12h 12h after operation	术后 24h 24h after operation	术后 48h 48h after operation	术后 72h 72h after operation
假手术组 Sham-operation group							
脊髓 Spinal cord	1.31±0.23	1.42±0.22	1.41±0.16	1.38±0.23	1.39±0.37	1.38±0.25	1.39±0.26
马尾 Cauda equine	1.51±0.24	1.76±0.26	1.65±0.23	1.44±0.25	1.56±0.24	1.51±0.25	1.45±0.23
DRG	1.46±0.23	1.65±0.26	1.58±0.23	1.36±0.32	1.52±0.13	1.42±0.34	1.38±0.24
对照组 Control group							
脊髓 Spinal cord	1.31±0.23	3.06±0.35 ^{①②}	3.48±0.34 ^{①②}	4.14±0.37 ^{①②}	4.28±0.18 ^{①②}	4.41±0.37 ^{①②}	4.32±0.36 ^①
马尾 Cauda equine	1.51±0.24	3.26±0.28 ^{①②}	3.56±0.24 ^{①②}	3.72±0.36 ^{①②}	3.86±0.23 ^{①②}	4.38±0.23 ^{①②}	4.33±0.24 ^①
DRG	1.46±0.23	3.15±0.26 ^{①②}	3.56±0.34 ^{①②}	3.79±0.23 ^{①②}	4.09±0.26 ^{①②}	4.38±0.33 ^{①②}	4.36±0.27 ^①
实验组 Experimental group							
脊髓 Spinal cord	1.31±0.23	1.89±0.29 ^{①②③}	2.09±0.25 ^{①②③}	2.31±0.35 ^{①②③}	2.81±0.34 ^{①②③}	3.09±0.26 ^{①②③}	3.16±0.38 ^{①③}
马尾 Cauda equine	1.51±0.24	2.13±0.23 ^{①②③}	2.38±0.35 ^{①②③}	2.88±0.28 ^{①②③}	3.18±0.27 ^{①②③}	3.27±0.23 ^{①②③}	3.18±0.26 ^{①③}
DRG	1.46±0.23	2.02±0.23 ^{①②③}	2.26±0.26 ^{①②③}	2.63±0.34 ^{①②③}	2.84±0.27 ^{①②③}	3.13±0.36 ^{①②③}	3.23±0.26 ^{①③}

注: ①与同时时间点假手术组比较 $P<0.01$; ②与同组前一时间点比较 $P<0.05$; ③与同时时间点对照组比较 $P<0.01$
①Compared with sham-operation groups, $P<0.01$; ②Compared with control groups, $P<0.01$; ③Compared with previous point-in-time groups, $P<0.05$

髓鞘和血管结缔组织则为阴性的蓝色。对照组马尾神经轴突有少量的强阳性棕黄色染色,大量为黄色的弱阳性染色或蓝色的阴性染色。实验组可见大量强阳性的棕黄色染色和弱阳性的黄色染色,只有少量的阴性染色(图 2)。假手术组的阳性纤维率 100%,对照组为 $(21.35\pm 2.38)\%$,实验组为 $(59.08\pm 6.25)\%$,三组间两两比较有统计学差异显著($P<0.01$)。

Caspase 3 染色光镜下观察,假手术组脊髓和

DRG 组织中未见胞浆棕黄色染色细胞,对照组脊髓和 DRG 组织中可见大量棕黄色阳性细胞,实验组脊髓和 DRG 组织中可见少量棕黄色阳性细胞(图 3)。三组阳性细胞指数见表 3,对照组和实验组脊髓和 DRG 的阳性指数均明显大于假手术组($P<0.01$);实验组的阳性指数均明显小于对照组($P<0.05$)。

Tunel 染色光镜下观察,正常组脊髓和 DRG 组织中可见个别胞核棕黄色阳性细胞;对照组的

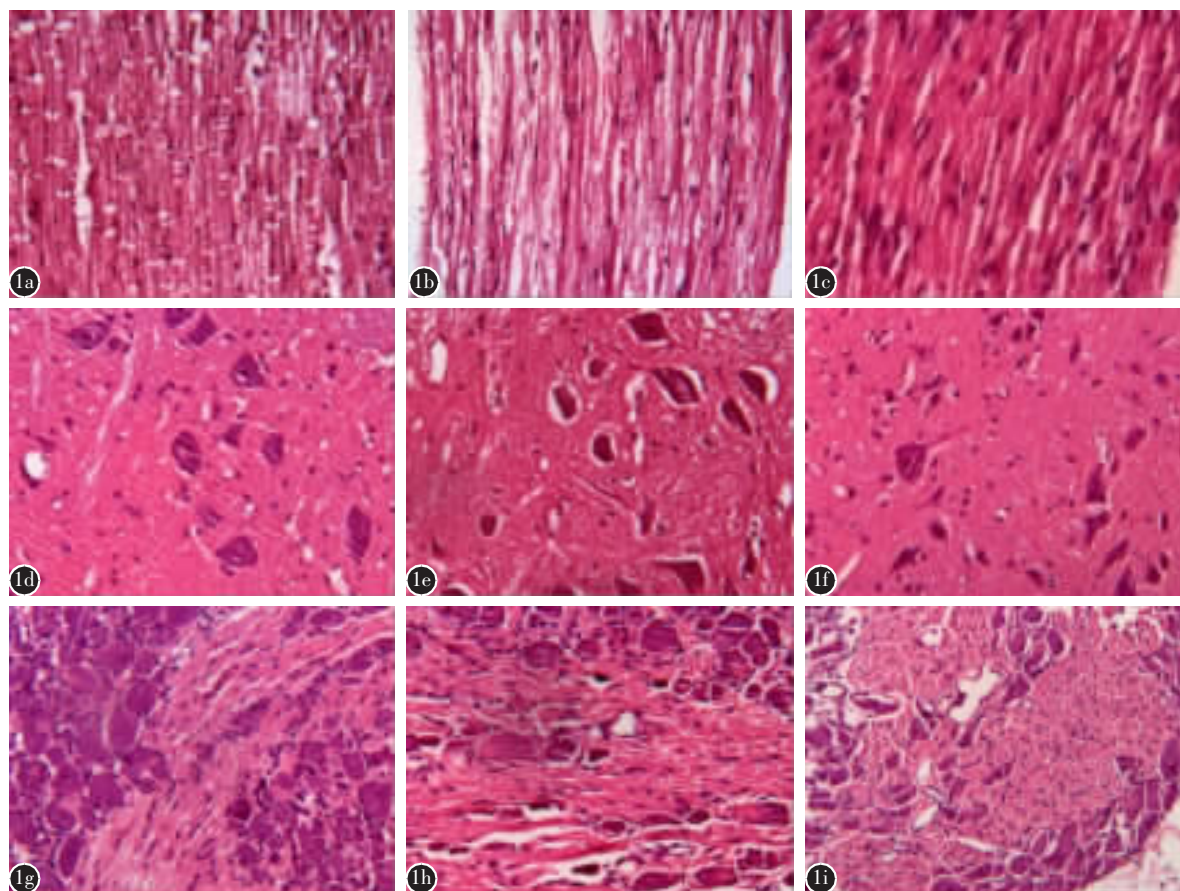


图 1 术后 48h 各组马尾、脊髓和 DRG 的 HE 染色对比($\times 400$) a 假手术组马尾组织形态正常 b 对照组马尾神经纤维松散,轴突及髓鞘肿胀、脱髓鞘改变 c 实验组马尾组织形态接近正常 d 假手术组脊髓组织形态正常 e 对照组脊髓神经元细胞出现收缩,周围间隙明显扩大,部分细胞核固缩甚至消失,可见凋亡小体 f 实验组脊髓组织形态接近正常 g 假手术组 DRG 组织形态正常 h 对照组 DRG 细胞松散,个别出现凋亡小体,部分神经纤维髓鞘肿胀、脱髓鞘 i 实验组 DRG 组织形态接近正常

Figure 1 The comparisons between each group with HE staining of spinal cord, cauda equine and DRG 48 hours after operation ($\times 400$) a Cauda equine of sham-operation group had normal tissue morphology b Cauda equine of control group, the nerve fibers became looser, swell and appeared demyelination in cauda equine c Cauda equine of experimental group had approximately normal tissue morphology d Spinal cord of sham-operation group had normal tissue morphology e Spinal cord of control group, karyopyknosis and apoptotic bodies were observed in lots of spinal cord neurons f Spinal cord of experimental group had approximately normal tissue morphology g DRG of sham-operation group had normal tissue morphology h DRG of control group, karyopyknosis, apoptotic bodies, nervous edema and demyelination were observed in DRG i DRG of experimental group had approximately normal tissue morphology

脊髓和 DRG 中可见大量阳性细胞;实验组脊髓和 DRG 组织可见少量阳性细胞(图 4)。三组凋亡指数见表 3,对照组和实验组的脊髓和 DRG 的凋亡指数均明显大于假手术组($P<0.01$);实验组脊髓和 DRG 的凋亡指数均小于对照组($P<0.01$)。

3 讨论

临床上由于腰椎间盘突出、腰椎管狭窄等马尾神经受到压迫而导致 CES 的发生率为 1.6%~8%。马尾神经受压后初始症状一般比较轻微,可能仅表现为腰腿痛,一旦压迫程度达到临界点则发生 CES,下肢疼痛、运动感觉障碍、大小便功能障碍、性功能及鞍区感觉障碍等多种症状“全面爆发”,需急诊手术治疗^[9];如果错过手术时机,即使手术解除马尾压迫,运动功能大多数能够恢复,但大小便、性功能及鞍区感觉障碍难以恢复^[10];但患者往往因为就诊时间延误而不能及时手术,致残率非常高^[11]。本实验模型中马尾受到了达到临界

点程度的压迫,模型建立后,能观察到大鼠出现跛行、尿失禁或触摸到膀胱胀满,热板试验和 HE 染色均与正常大鼠有明显差异,对照组与假手术组相比,热板试验缩足潜伏期、组织形态学、MDA 水平、Caspases 3 阳性指数和 Tunel 细胞凋亡指数在 48h 内均具有显著性差异($P<0.05$),说明模型可靠表现出了马尾受压后的行为学和病理生理学改变。

马尾受压并不都出现 CES,但鞍区感觉障碍和大小便、性功能障碍一旦出现就难以恢复,说明短期内发生了不可逆的神经细胞损害。CES“全面爆发”性损害的病理生理机制目前还不明确,但继发性氧化应激损伤而导致神经元凋亡能解释 CES 的“全面爆发”特性^[3]。从解剖学看,马尾神经具有特殊的位置,是脊髓和周围神经的桥梁,连接脊髓神经元和 DRG 假单极神经元。马尾神经受压后病理生理变化达到一定程度时,发生继发性的损害,逆行性、顺行性和跨细胞性凋亡在很短时间内发

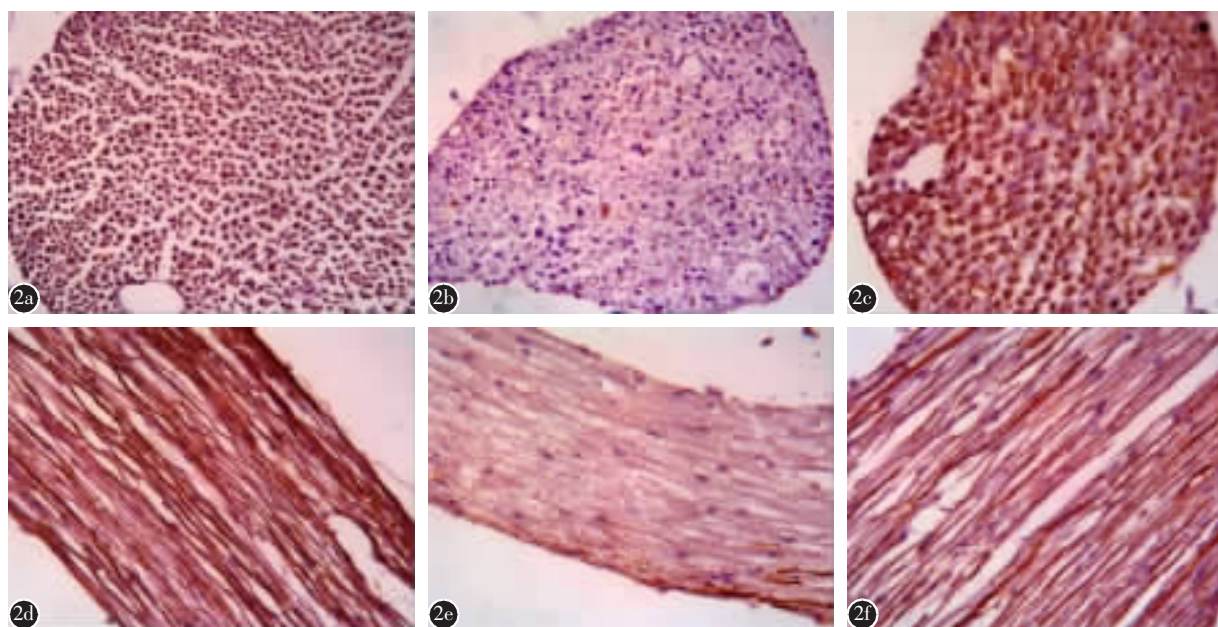


图 2 术后 48h 各组马尾神经的 NF 染色结果(×400) a 假手术组横切面,神经轴突全部为强阳性的棕黄色染色 b 对照组横切面,少量神经纤维染色为棕黄色强阳性,大部分为弱阳性和阴性 c 实验组横切面,大量神经纤维为强阳性染色 d 假手术组纵切面,神经轴突全部为强阳性的棕黄色染色 e 对照组纵切面,少量神经纤维染色为棕黄色强阳性,大部分为弱阳性和阴性 f 实验组纵切面,大量神经纤维为强阳性染色

Figure 2 The comparisons between each group with NF staining of cauda equine 48 hours after operation (×400) a Cross-section of sham-operation group, all fiber staining showed positive b Cross-section of control group, a little fiber staining showed positive and most showed negative or weakly positive c Cross-section of experimental group, most fiber staining showed positive d Longitudinal section of sham-operation group, all fiber staining showed positive e Longitudinal section of control group, a little fiber staining showed positive and most showed negative or weakly positive f Longitudinal section of experimental group, most fiber staining showed positive

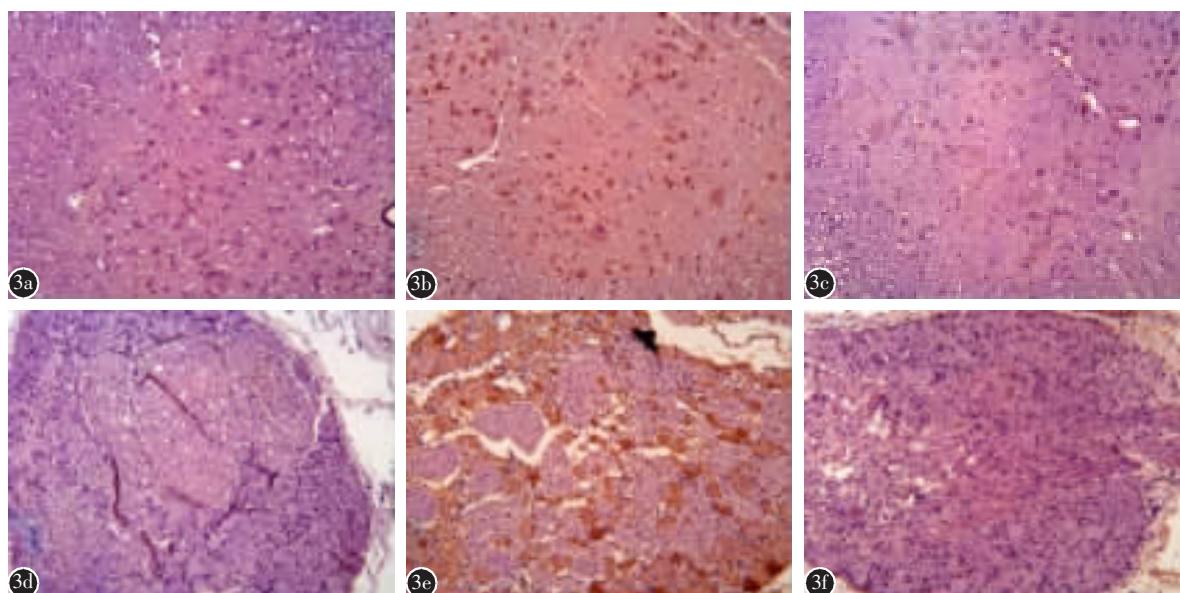


图 3 术后 48h 各组的脊髓和 DRG 的 Caspase 3 染色结果 (×200) **a** 假手术组脊髓中未见胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **b** 对照组脊髓中可见大量胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **c** 实验组脊髓中阳性细胞数量明显少于对照组 **d** 假手术组 DRG 中未见胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **e** 对照组 DRG 中可见大量胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **f** 实验组 DRG 中阳性细胞数量明显少于对照组

Figure 3 The comparisons between each group with Caspase 3 staining of spinal cord and DRG 48 hours after operation (×200) **a** Spinal cord of sham-operation group had no positive cells what cytoplasm were stained with brown madder **b** Spinal cord of control group, lots of positive cells what cytoplasm were stained with brown madder were observed **c** Spinal cord of experimental group, the number of positive cell was marked less than control group **d** DRG of sham-operation group had no positive cells what cytoplasm were stained with brown madder **e** DRG of control group, lots of positive cells what cytoplasm were stained with brown madder were observed **f** DRG of experimental group, the number of positive cell was marked less than control group

表 3 术后 48h 各组脊髓和 DRG 的 Caspase 3 阳性指数和 Tunel 凋亡指数 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 The comparisons between each group with the positive index of Caspase 3 and index of Tunel 48 hours after operation

	假手术组 Sham-operation group		对照组 Control group		实验组 Experimental group	
	脊髓 Spinal cord	DRG	脊髓 Spinal cord	DRG	脊髓 Spinal cord	DRG
Caspase3 阳性指数 Positive index of Caspase 3	1.5±0.16	1.98±0.22	24.12±2.35 ^①	35.74±2.33 ^①	12.54±1.57 ^{①②}	16.28±1.18 ^{①②}
Tunel 凋亡指数 Tunel apoptotic index	1.37±1.29	1.61±1.60	23.26±5.53 ^①	28.99±5.10 ^①	10.16±2.34 ^{①③}	8.38±3.82 ^{①③}

注: ①与假手术组比较 $P<0.01$, ②与对照组比较 $P<0.05$; ③与对照组比较 $P<0.01$

Note: ①Compared with sham-operation groups, $P<0.01$; ②compared with control groups, $P<0.05$; ③compared with control groups, $P<0.01$

生并迅速扩散,造成永久性的神经功能损害^[12]。跨细胞的神经元凋亡与马尾受压迫后产生的炎症反应关系密切^[13],炎症反应造成损伤的重要机制之一就是氧化应激损害^[14]。本研究发现,急性马尾综合征大鼠与正常大鼠对比,其 MDA 水平在 3h 增强剧烈,48h 达到高峰,并与热板试验、NF 阳性率和细胞凋亡指标的变化一致,说明急性马尾综合

征的继发损害与氧化应激有直接的关联,也为临床 48h 内尽早采取急诊手术治疗 CES 再次提供了理论依据。

本研究中,将具有抗氧化应激作用的氢生理盐水进行腹腔注射后,其一,降低了脊髓、马尾及背根神经节的 MDA 水平;其二,实验组与对照组相比,MDA 的最大增加幅度从 3h 推迟到了 24h。

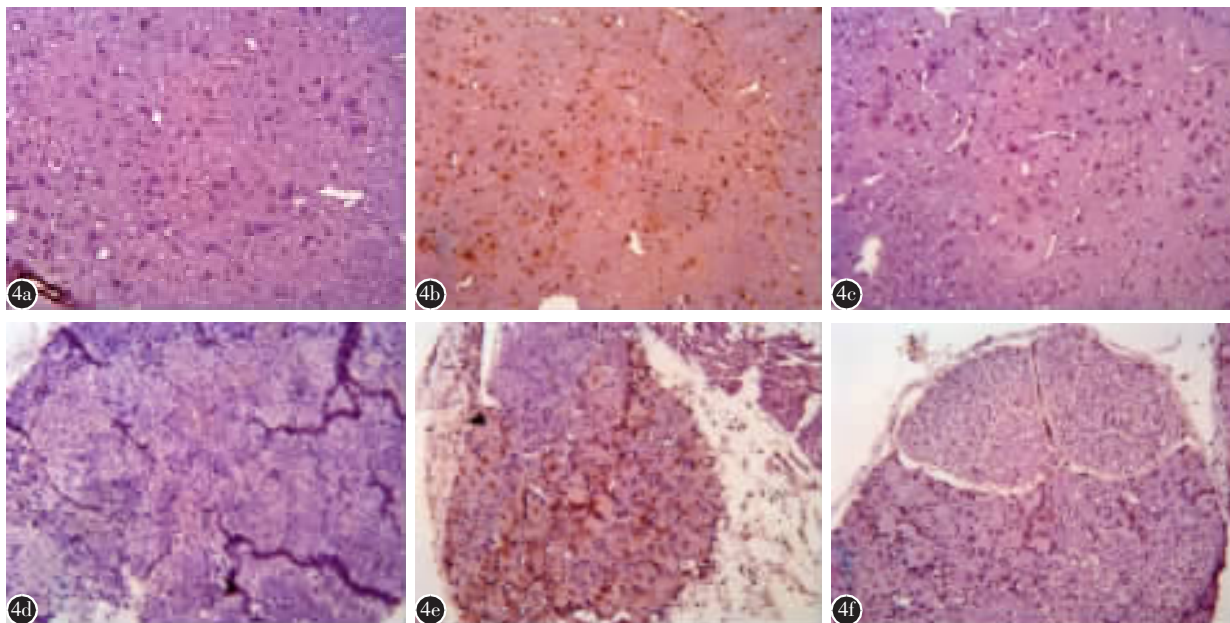


图 4 术后 48h 各组脊髓和 DRG 的 TUNEL 染色结果 ($\times 200$) **a** 假手术组脊髓中未见胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **b** 对照组脊髓中可见大量胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **c** 实验组脊髓中阳性细胞数量明显少于对照组 **d** 假手术组 DRG 中未见胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **e** 对照组 DRG 中可见大量胞浆棕黄色染色的阳性细胞 **f** 实验组 DRG 中阳性细胞数量明显少于对照组

Figure 4 The comparisons between each group with TUNEL staining of spinal cord and DRG 48 hours after operation ($\times 200$) **a** Spinal cord of sham-operation group had no positive cells what cytoplasm were stained with brown madder **b** Spinal cord of control group, lots of positive cells what cytoplasm were stained with brown madder were observed **c** Spinal cord of experimental group, the number of positive cell was marked less than control group **d** DRG of sham-operation group had no positive cells what cytoplasm were stained with brown madder **e** DRG of control group, lots of positive cells what cytoplasm were stained with brown madder were observed **f** DRG of experimental group, the number of positive cell was marked less than control group

这两个结果都说明氢生理盐水抑制了马尾综合征继发的氧化应激损害。但实验组的 MDA 水平仍明显高于假手术组,说明氢生理盐水并不能完全抑制氧化应激损害。目前关于氢在组织或细胞具有保护作用的具体机制很多,其主要机制是抗氧化应激作用,其次是信号调节、酶促反应和活性因子的调节。氢具有选择性清除羟自由基和过氧化亚硝酸盐能力,羟自由基和过氧化亚硝酸盐是非常强的氧化剂,可以和核酸、脂类以及蛋白质发生反应引起 DNA 断裂、脂质过氧化蛋白变性失活,氢选择性降低有害的羟自由基和过氧化亚硝酸盐,而对 NO 的稳定性没有影响。内源性 NO 信号通路可以调节肺血管张力以及白细胞和内皮细胞间的作用,而氢可能有利于内源性 NO 的生成^[4]。氢能增加过氧化氢酶、超氧化物歧化酶或血红素加氧酶等抗氧化酶发挥抗氧化作用;通过抑制

Caspase 3 的活性发挥抗凋亡的作用;还可以通过下调前炎症因子的表达如 IL-1 β 、IL-6、趋化因子 2 和 TNF- α 等抑制氧化应激诱发的组织炎症损伤^[15]。本研究采用腹腔注射氢生理盐水后,使马尾受压迫大鼠在 48h 内明显降低缩足潜伏期,具有较好的 HE 染色形态,提高了马尾神经纤维的 NF 阳性率,减少了脊髓和 DRG 的 Caspase 3 阳性指数和 TUNEL 凋亡指数,说明氢对急性马尾综合征大鼠具有抑制神经纤维变性抗神经元凋亡作用,也间接证明了氧化应激反应在急性马尾综合征继发损害中发挥着重要作用。

从本研究结果来看,氢生理盐水对 CES 具有良好的神经保护效果,它延缓了氧化应激进程,抑制了氧化应激反应,减少了神经纤维变性和神经元凋亡,从而改善了马尾综合征大鼠的行为学功能。

4 参考文献

1. Fraser S, Roberts L, Murphy E. Cauda equina syndrome: a literature review of its definition and clinical presentation [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2009, 90(11): 1964-1968.
2. 顾晓民, 贾连顺. 急性马尾综合征临床研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(5): 281-283.
3. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system [J]. Antioxid Redox Signal, 2004, 6(2): 277-287.
4. Zheng XF, Sun XJ, Xia ZF. Hydrogen resuscitation: a new cytoprotective approach[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, Jan 19. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05479.x. [Epub ahead of print].
5. Takenobu Y, Katsube N, Marsala M, et al. Model of neuropathic intermittent claudication in the rat: methodology and application[J]. J Neurosci Methods, 2001, 104(2): 191-198.
6. Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics (I): dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1953, 107(3): 385-393.
7. Teke Z, Aytakin FO, Kabay B, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents deleterious effects of remote ischemia/reperfusion injury on healing of colonic anastomoses in rats [J]. World J Surg, 2007, 31(9): 1835-1842.
8. Nishio T, Kawaguchi S, Fujiwara H. Emergence of highly neurofilament-immunoreactive zipper-like axon segments at the transection site in scalpel-cordotomized adult rats [J]. Neuroscience, 2008, 155(1): 90-103.
9. Raj D, Coleman N. Cauda equina syndrome secondary to lumbar disc herniation[J]. Acta Orthop Belg, 2008, 74(4): 522-527.
10. Delong WB, Polissar N, Neradilek B. Timing of surgery in cauda equina syndrome with urinary retention: meta-analysis of observational studies[J]. J Neurosurg Spine, 2008, 8(4): 305-320.
11. 吴建锋, 贾连顺, 李家顺, 等. 腰椎疾患对男性性功能影响的临床观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(12): 900-904.
12. Ma B, Wu H, Jia LS, et al. Cauda equina syndrome: a review of clinical progress[J]. Chin Med J(Engl), 2009, 122(10): 1214-1222.
13. Franson RC, Saal JS, Saal JA. Human disc phospholipase A2 is inflammatory[J]. Spine, 1992, 17(6 Suppl): 129-132.
14. Cao Y, Li G, Wang YF, et al. Neuroprotective effect of baicalin on compression spinal cord injury in rats[J]. Brain Res, 2010, 1357: 115-123.
15. Mao YF, Zheng XF, Cai JM, et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 381(4): 602-605.

(收稿日期: 2012-09-13 末次修回日期: 2012-12-24)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

第十三届国家级“脊柱畸形”医学继续教育学习班 暨成人脊柱畸形研讨会通知

由南京鼓楼医院脊柱外科举办的第十三届国家级“脊柱畸形”学习班暨成人脊柱畸形研讨会, 将于 2013 年 7 月 12~15 日在南京举办, 届时将邀请国内外著名脊柱外科专家作专题报告。

学习班授课内容: (1) 理论授课: 脊柱畸形的临床评价和支具治疗原则; 脊柱畸形矫形的美学与平衡理念; 脊柱畸形微创矫形术; 脊柱畸形全脊椎截骨和翻修手术策略; 早期半椎体切除治疗先天性脊柱侧凸的适应证及疗效分析; 强直性脊柱炎后凸畸形及外伤性迟发性后凸畸形的截骨矫形; 成人脊柱畸形的分型及治疗策略; 特发性脊柱侧凸发病机理研究进展; (2) 手术观摩: 学员将分组参观脊柱侧凸及后凸畸形的后路截骨矫形手术。(3) 病例讨论: 学习班将提供大量复杂脊柱畸形的临床病例, 学员可利用现代矫形理论进行讨论。

本次学习班结业合格授继续教育 I 类学分, 有关此继续教育的详细内容请访问南京鼓楼医院脊柱外科网站 www.soscoliosis.com。报名截止日期: 2013 年 6 月 30 日。联系电话: (025) 83105121。E-mail: scoliosis2002@sina.com。学习班报到时间: 2013 年 7 月 12 日 12:00~22:00。来信请寄: 南京市中山路 321 号南京鼓楼医院脊柱外科 张林林 收, 邮编: 210008。