

基础研究

大鼠胸段脊髓损伤后后肢神经肌肉的自然变化

王元元¹, 张军卫^{1,2}, 洪毅^{1,2}, 唐和虎², 王雪菲¹, 蔡青³

(1 首都医科大学康复医学院 100068 北京市; 2 中国康复研究中心脊柱脊髓外科 100068 北京市;

3 首都医科大学实验与测试中心 100069 北京市)

【摘要】目的:观察大鼠完全性脊髓损伤后损伤平面以下周围神经和骨骼肌的自然变化,为脊髓损伤治疗与康复相关基础研究提供科学依据。**方法:**将 50 只健康成年雌性 SD 大鼠随机分为对照组(A 组)5 只、假手术组(B 组)10 只和脊髓损伤组(C 组)35 只,B 组行单纯椎板切除术;C 组在椎板切除基础上用横断法制成 T10 完全脊髓损伤模型。分别对 3 组大鼠术前、B 组术后 1、2 周、C 组术后 1、2、4、12、24 周进行 BBB 评分,并检测腓肠肌的运动单位计数(motor unit number estimation, MUNE);再于各时间点处死大鼠,取坐骨神经和腓肠肌内侧头,应用光镜和透射电镜观察坐骨神经-运动终板-腓肠肌的形态变化。对 3 组所有结果进行对比分析。**结果:**C 组术后各时间点的 BBB 评分与术前及 A 组、B 组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$),C 组术后 4 周时的 BBB 评分与其他时间点比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。C 组术前 MUNE 数值与 A 组、B 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);C 组术后各时间点与术前比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$),术后 4 周与 24 周比较差异无统计学意义,其余各时间点比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。A 组和 B 组术后 1、2 周时坐骨神经有髓神经纤维髓鞘外形正常。C 组术后 1、2 周时与 A 组、B 组无明显差异;4 周时部分有髓神经纤维髓鞘崩解、板层分离;12 周时髓鞘崩解明显增多,高倍电镜观察见崩解的髓鞘板层清晰;24 周时有髓神经纤维髓鞘崩解、融合,新生神经纤维管壁细薄,无髓神经纤维增多,高倍电镜观察见崩解的髓鞘板层模糊。A 组肌细胞肌束膜及肌内膜边界清晰,肌细胞核位于肌膜下方。B 组术后 1、2 周时与对照组无明显区别。C 组术后 1、2 周时,除肌细胞截面积轻度缩小外,与对照组无明显不同;4 周时肌细胞截面积缩小,局部肌细胞破坏;12 周时多数肌细胞边界模糊,细胞核相对聚集,结缔组织增生明显;24 周时肌细胞融合,细胞核密集,融合细胞间可见大小不一空隙,结缔组织增生更加明显。A 组和 B 组术后 1、2 周运动终板结构清晰完整。C 组术后 1、2、4 周时运动终板结构较 A 组、B 组无明显差别;术后 12 周时相对完好运动终板与破坏运动终板并存,高倍电镜下观察见突触前膜、突触间隙、突触后膜层次分明,各层结构内可见细小颗粒,突触间隙内可见多个类圆形突触小泡,肌板清晰,同时也可见突触皱褶及突触前、后膜不可辨,肌板结构不清晰;术后 24 周时找不到运动终板。**结论:**大鼠完全横断性脊髓损伤后损伤平面以下周围神经和骨骼肌形态结构随时间退变程度逐步加重甚至消失;损伤后 12 周时已有明显变化,24 周时出现显著的结构损害和功能丧失。

【关键词】脊髓损伤;自然变化;运动终板;透射电镜;运动单位计数;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2015.03.13

中图分类号:R683.2,R322.7 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2015)-03-0264-10

A study of natural change of the nerves and muscles of hind limb in thoracic spinal cord injury rats/
WANG Yuanyuan, ZHANG Junwei, HONG Yi, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015,
25(3): 264-273

【Abstract】 Objectives: To investigate the natural change of peripheral nerves and skeletal muscles of hind limb after complete spinal cord injury(SCI) in rat models, and to provide scientific basis for the treatment and rehabilitation of spinal cord injury. **Methods:** Fifty healthy adult SD rats were randomly divided into control group(group A), laminectomy group(group B) and spinal cord injury group(group C). Complete SCI models were made by totally transecting the cord through laminectomy at T10 level in group C. For all groups, the sciatic nerve and gastrocnemius medialis were sampled for observation. Group A was sampled and observed one time,

基金项目:财政部中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金资助(编号:2010CZ-1)

第一作者简介:女(1984-),医学硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤、脑血管病的康复,现就职于北京市第二医院康复科

电话:(010)66061122 E-mail:wysagull@163.com

通讯作者:张军卫 E-mail:13910158172@163.com

while for group B, pre-operation, 1 week and 2 weeks after operation were selected, and for group C, pre-operation, 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 12 weeks and 24 weeks after SCI were selected. The study indexes included the nerve and muscle morphology, BBB score and motor unit number estimation(MUNE). **Results:** (1) After operation in group C, the BBB score at each observing time point was significantly lower than that of the group A and B($P<0.05$), and partially increased at 4 weeks compared with other time points($P<0.05$). (2) The MUNE values showed no difference between group C and group A at pre-operation ($P>0.05$), between group C and group B at pre-operation ($P>0.05$). The MUNE values showed significant differences between pre- and post-operation in group C($P<0.05$), among all observing time points of post-operation($P<0.05$) except for 4 weeks and 24 weeks. (3) In group C, 1 week and 2 weeks after operation showed no abnormal myelin axon morphology; at 4 weeks, part of myelin broke down, lamellar separated; at 12 weeks, myelin breakdown significantly increased, and lamellar of broken myelin was clear at the high magnification; at 24 weeks, myelin was in disintegration and fusion, regenerated myelin sheath was thin and unmyelinated nerve fibers increased, and lamellar of fragmented myelin was vague in the high magnification. (4) In group C, at 1 week and 2 weeks after operation, the muscle cell area appeared slightly smaller, yet no obvious difference with that of group A; at 4 weeks, the muscle cell area decreased, muscle cell boundary showed fuzzy; at 12 weeks, the hyperplasia of connective tissue was identified; at 24 weeks, muscle cell fusion and nuclear gathering appeared, while the connective tissue hyperplasia was obvious. (5) In group C, at 1 week, 2 weeks and 4 weeks after operation, the synaptic folds, pre- and post-synaptic membrane could be seen clearly with granular materials; at 12 weeks, relatively intact and destructive motor endplates coexisted. In the high magnification, synaptic folds, pre- and post-synaptic membrane was distinct, and messy synaptic folds, synaptic structure and uncontinuous Z line were also seen; at 24 weeks, the endplate structure could not be found. **Conclusions:** In transected SCI rats, morphological degeneration in peripheral nerves and skeletal muscles of hind limbs are gradually severe, which cause the collapse of the structure and complete loss of electrophysiological function at 24 weeks.

[Key words] Spinal cord injury; Natural change; Motor endplate; Transmission electron microscope; Motor unit number estimation; Rat

[Author's address] School of Rehabilitation Medicine, Capital Medical University; Department of Spine and Spinal Surgery, China Rehabilitation Research Center, Beijing, 100068, China

脊髓损伤治疗的目的是恢复损伤平面以下的运动、感觉及大小便功能^[1]。前提是脊髓、脑和周围神经、肌肉都保持良好的结构和功能^[2]。临床经验显示,无论脊髓损伤的自然恢复还是治疗显现效果,功能改善大多出现于伤后数周甚至长达半年的时间^[3,4]。那么,在脊髓损伤后,受中枢神经支配的远端神经、肌肉发生了何种变化?如果在脊髓损伤后的自然病程中出现远端神经或肌肉的结构和功能的损害,将影响脊髓损伤恢复所带来的效果^[4]。迄今为止,针对脊髓损伤后原发损害局部和脑的研究报告较多^[5],但关于远端神经、肌肉变化的报告较少^[6],且多为单一组织、单时间点取材的形态学研究^[7]。本研究采用多时间点取材,应用运动评估、电生理指标及形态学观察相结合的方法,观察脊髓损伤后损伤平面以下周围神经和肌肉的自然变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

成年(7周龄)雌性 SPF 等级 SD 大鼠 50 只,体质量为 200~220g,由首都医科大学实验动物部提供。将 50 只大鼠采用数字化随机法分为 3 组:对照组(A组)5 只,假手术组(B组)10 只,脊髓损伤组(C组)35 只。A 组为正常大鼠;B 组大鼠实施 T10 椎板切除术,不损伤脊髓;C 组实施 T10 椎板切除及相应节段脊髓完全横断。分别对三组大鼠术前、B 组术后 1、2 周,C 组术后 1、2、4、12、24 周时检测其后肢运动功能及坐骨神经和腓肠肌的形态变化,包括 BBB 评分、运动单位计数(motor unit number estimation,MUNE)和神经-运动终板-肌肉的形态。

1.2 动物模型的制备

大鼠术前禁食 12h,称质量,采用体积分数

10%水合氯醛(0.3~0.4ml/100g 体重)腹腔注射麻醉。B 组和 C 组大鼠俯卧位固定于手术台上,备皮消毒后,以 T10 棘突为中心行背部正中纵行切口,长约 3cm,紧贴棘突骨面纵形分离椎旁肌及软组织,显露出 T9~T11 的椎板和棘突,咬除 T9~T11 棘突并切除 T10 椎板,充分暴露 T10 水平脊髓。C 组大鼠用眼科剪刀迅速横断 T10 水平的脊髓,并于脊髓断端头侧切除 2mm 脊髓组织^[8],脊髓断端之间置入明胶海绵。术毕将椎旁肌、筋膜及皮肤逐层对合缝合。术后每日人工排尿 2~3 次,直到动物自身排尿反射恢复。B 组仅行棘突和椎板切除,不损伤脊髓。A 组不做任何处理。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 BBB 评分 三组大鼠术前,B 组术后 1、2 周,C 组术后 1、2、4、12、24 周时行 BBB 评分,观察大鼠后肢运动功能情况。为减少误差,采用双盲法(即双人独立观察记录)^[8]。

1.3.2 MUNE 检测 分别对三组大鼠术前,B 组术后 1、2 周,C 组术后 1、2、4、12、24 周行 MUNE 检测。检测均为右后肢。使用日本光电公司生产的肌电诱发电位仪(Neuropack μ)和 QP351B MUNE 软件进行腓肠肌 MUNE 测定。敏感度:测最大复合动作电位(compound motor action potential, CMAP)时设为 1~5mV/Div;测单个运动电位(motor unit potential, MUP)时设为 100~200 μ V/Div;刺激条件:频率 0.7Hz、时限 0.1ms;滤波范围 30Hz~3kHz,刺激强度以 0.2mA 递增。在室温 25℃的检查室中进行。刺激和记录电极均为单极针电极。受检大鼠取俯卧位,记录电极置于腓肠肌内侧肌腹处,参考电极置于其远端肌腱上,距记录电极 2~3cm。接地电极置于大鼠背侧皮肤。刺激电极阴极置于股骨近端,阳极置于股骨远端,两者相距约 1cm,对坐骨神经进行刺激。选 3~5 个刺激点,每点相距约 1cm。刺激时首先测定 CMAP,逐渐增加刺激量,波幅增加;当波幅不再增大时,再增加刺激量 20%~30%,波幅仍不增加,即为 CMAP。然后由远及近以非常低的强度在不同点刺激神经,刺激某一点达到一个阈值时可产生一个 MUP 的小的全或无的波形,继续增大刺激量仍按全或无的原则得到连续 2~3 个递增的 MUP^[9]。由仪器自动获取 10 个不同的 MUP。选择对线(alignment),以减少选择性偏倚。最后通过软件自动分析,CMAP 波幅除以平均 MUP 波幅即为

MUNE。

1.3.3 坐骨神经和运动终板电镜观察 三组大鼠行 BBB 评分和 MUNE 检测后,采用心脏灌注处死后取出右侧坐骨神经和运动终板标本,在 4%多聚甲醛中固定 12h 后,将标本细切为 1mm³ 的小块,进行戊二醛前固定、缓冲液清洗、饿酸后固定、梯度酒精脱水、低粘度剂包埋,再行半薄切片、光镜定位、超薄切片、铅-铀染色、透射电镜下观察。

1.3.4 腓肠肌光镜观察 在心脏灌注后取出腓肠肌内侧标本,在 4%多聚甲醛中固定 12h,进行后固定、梯度酒精脱水、石蜡包埋后行连续横向切片,而后行 HE 染色,树脂封片,光镜观察。

1.4 统计方法

应用 SPSS 13.0 统计分析软件。BBB 评分采用 Kruskal-Wallis 检验,并进行非参数两两比较。组间 MUNE 值比较行单因素方差分析,组内各观察时间点间行 LSD 法两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBB 评分

3 组大鼠各观察时间点的 BBB 评分见表 1。C 组术后各时间点的 BBB 评分与术前及 A 组、B 组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);C 组术后 4 周时的 BBB 评分与其他时间点比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 MUNE

3 组大鼠各观察时间点的 MUNE 值见表 1。A 组、B 组术前和术后 1、2 周的差异均无统计学意义($P>0.05$)。C 组术前与 A 组、B 组比较差异均无统计学意义($P>0.05$);C 组术后各时间点与术前比较差异均有统计学意义($P<0.05$);术后 4 周与 24 周比较差异无统计学意义,余各时间点间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 坐骨神经透射电镜下观察结果

A 组和 B 组术后 1、2 周时右后肢坐骨神经中有髓神经纤维髓鞘外形正常。C 组术后 1、2 周时与 A 组、B 组无明显差别;4 周时部分有髓神经纤维髓鞘崩解、板层分离;12 周时髓鞘崩解明显增多,高倍镜下观察见崩解的髓鞘板层清晰;24 周时有髓神经纤维髓鞘崩解、融合,新生神经纤维管壁薄,无髓神经纤维增多,高倍镜下观察见崩

表 1 3 组大鼠不同观察时间点右后肢 BBB 评分和右侧腓肠肌 MUNE 值

Table 1 BBB score of right hind limb and MUNE value of right medial gastrocnemius in SCI, Sham and control groups

	BBB评分(P ₂₅ -P ₁₅) BBB score	MUNE计数($\bar{x}\pm s$) MUNE value
对照组 Control group	21(21,21)	120.40±11.74
假手术组 Sham group		
术前 Pre-operation	21(21,21)	114.50±10.81
术后 1w 1w post-operation	21(20.25,21)	112.10±10.76
术后 2w 2w post-operation	21(21,21)	114.70±10.69
SCI组 SCI group		
术前 Pre-operation	21(21,21)	116.20±10.74
术后 1w 1w post-operation	0(0,1)	102.77±10.13 ^{①②③④}
术后 2w 2w post-operation	1(1,2)	53.39±10.58 ^{①②③④}
术后 4w 4w post-operation	3(3,4)	37.19±11.22 ^{①②③}
术后 12w 12w post-operation	1(0,1)	90.36±10.94 ^{①②③④}
术后 24w 24w post-operation	1(0,1)	39.14±10.62 ^{①②③}

注:①与同组术前比较 $P<0.05$;②与对照组比较 $P<0.05$;③与假手术组同时点比较 $P<0.05$;④与同组其余各时间点比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with pre-operation, $P<0.05$; ②compared with control group, $P<0.05$; ③compared with sham group, $P<0.05$; ④intra-group comparison of post-operation except 4 weeks and 24 weeks, $P<0.05$

解的髓鞘板层模糊(图 1)。

2.4 腓肠肌光镜下观察结果

A 组腓肠肌内侧肌细胞肌束膜及肌内膜边界清晰,肌细胞核位于肌膜下方。B 组术后 1、2 周时与对照组无明显区别。C 组术后 1、2 周时,除肌细胞截面积轻度缩小外,与对照组无明显不同;4 周时肌细胞截面积缩小,局部肌细胞破坏;12 周时多数肌细胞边界模糊,细胞核相对聚集,结缔组织增生明显;24 周时肌细胞融合,细胞核密集,融合细胞间可见大小不一空隙,结缔组织增生更加明显(图 2)。

2.5 运动终板透射电镜下观察结果

A 组和 B 组术后 1、2 周运动终板结构清晰完整。C 组术后 1、2、4 周时运动终板结构较 A 组、B 组无明显差别;术后 12 周时相对完好运动

终板与破坏运动终板并存,高倍镜下观察见突触前膜、突触间隙、突触后膜层次分明,各层结构内可见细小颗粒,突触间隙内可见多个类圆形突触小泡,肌板清晰,同时可见突触皱褶及突触前、后膜不可辨,肌板结构不清晰;术后 24 周时找不到运动终板(图 3)。

3 讨论

3.1 脊髓损伤后大鼠运动功能的变化

本研究显示,大鼠在单纯 T10 椎板切除后 1 周时部分大鼠右侧后肢 BBB 评分为 20 分,余均正常,2 周时后肢运动功能完全正常;在 T10 急性完全横断性脊髓损伤后右侧后肢完全瘫痪,1 周时右侧后肢无明显自主运动,4 周时达恢复高峰,12 周时运动再度减少,24 周时已无自主运动。表明大鼠在行单纯椎板切除后 1 周内局部创伤对后肢运动有微弱影响,2 周时局部创口愈合及组织修复后后肢运动完全正常,并且单纯椎板切除未引起大鼠神经功能障碍。大鼠在胸髓完全横断未接受任何干预措施的情况下,仍存在后肢运动功能的恢复,并随时间呈现规律性变化。早期这种运动恢复的机制考虑与损伤部位以下腰骶段脊髓内的低级步行控制中枢——中枢模式发生器(central pattern generator,CPG)有关。许多动物的脊髓都存在 CPG^[10],由脊髓中间神经元组成,之间有神经信号通讯,其所构成的网络可使脊髓在完全失去下行运动神经支配和上行感觉传入的情况下产生一些节律性运动。然而随着脊髓损伤后自然病程的延长,后肢出现关节挛缩或关节僵直,导致后肢活动受限或消失。有研究报道,大鼠在 T10 完全性脊髓横断后 1 周未见自发运动功能的恢复,在 2~8 周 BBB 评分达 1~5 分^[8],这与我们的研究较为一致。

3.2 脊髓损伤后远端神经-运动终板-肌肉的形态变化

3.2.1 周围神经形态变化 本研究发现,大鼠胸脊髓横断性损伤 4 周时坐骨神经已出现有髓神经纤维髓鞘退变,并随时间进行性加重,12 周时髓鞘崩解、碎裂明显,24 周时髓鞘崩解、融合,伴有新生薄髓及大量无髓神经纤维,且髓鞘板层结构模糊,而对照组和假手术组大鼠坐骨神经形态无变化。表明脊髓损伤后其远端神经元发出的轴突构成的周围神经发生了退变,并随时间进行性加

重。我们认为脊髓损伤后存在跨神经元变性。然而,关于脊髓损伤后损伤平面以下运动神经元及其轴突构成的周围神经是否发生跨神经元变性一直存在争议。McBride 等^[11]使用荧光金(Fluoro-Gold)逆行标记发现,T9 完全性脊髓损伤大鼠在损伤后 10 周、20 周、52 周右侧坐骨神经的运动神经元数目及分布均较对照组无差异,在损伤后 20 周所标记神经元的平均截面积均较对照组无明显差异,认为在脊髓损伤后并未发生跨神经元变性。但张庆民等^[9]在大鼠 T10 完全性脊髓横断损伤模型中,采用光镜及电镜观察腓总神经的形态学变化,发现脊髓损伤后腓总神经髓鞘和轴索出现明显退变,且退变随时间推移逐渐加重,同时出现轴

突发芽现象,认为大鼠完全横断性脊髓损伤可以导致损伤水平以下周围神经发生跨神经元变性。关于跨神经元变性的报道差异,考虑与以下因素有关:(1)实验动物不同。不同的实验动物的寿命不同,那么在造成脊髓损伤后其发生跨神经元变性的时间窗可能有差异。(2)观察时间不同。对于同一实验动物而言,脊髓损伤后各研究选择的观察时间有所差异,有早期研究,亦有长程研究,导致观察结果不同。(3)动物模型不同。脊髓损伤的动物模型制作有多种方式,包括:挫伤模型、压迫模型、缺血损伤模型、横断模型,对同一实验动物,不同的脊髓损伤模型对损伤远端结构形态及运动功能影响亦不同。(4)研究方法不同。关于跨神经

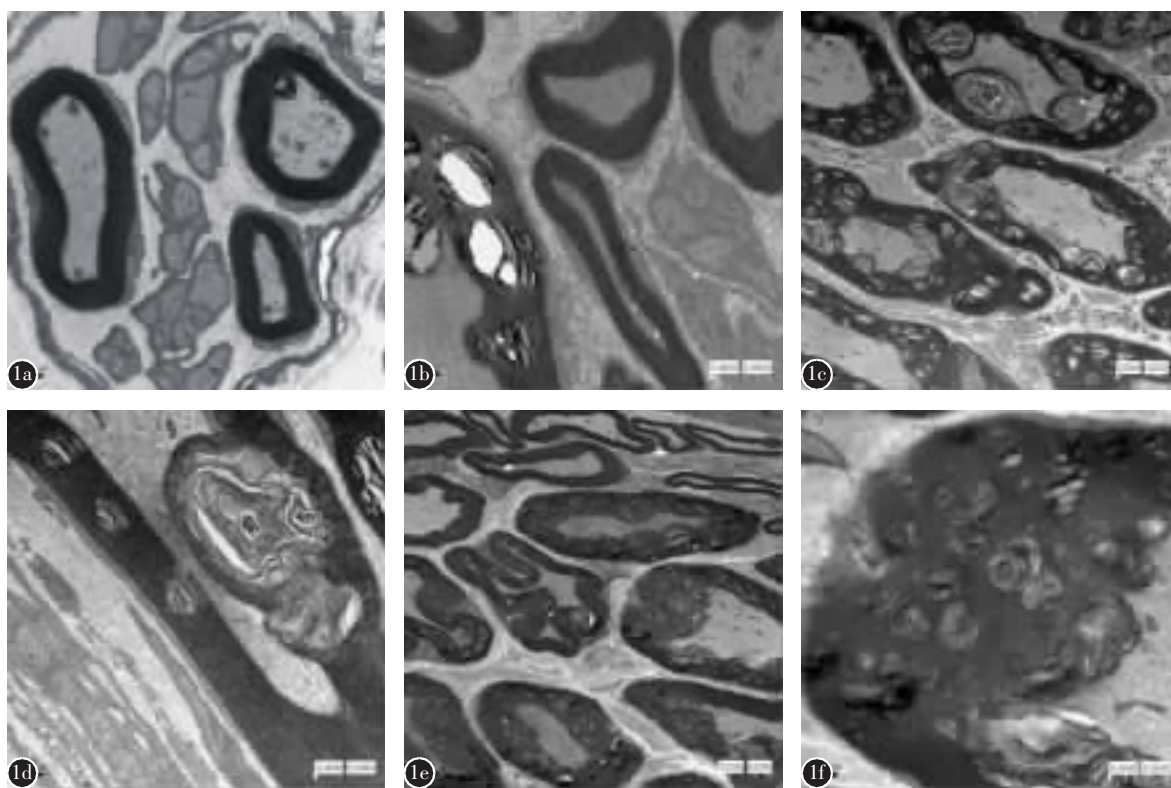


图 1 三组大鼠坐骨神经透射电镜观察结果 **a** A 组有髓神经纤维髓鞘外形正常 ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$) **b** C 组术后 4 周时,部分有髓神经纤维髓鞘崩解、板层分离 ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$) **c** C 组术后 12 周时,有髓神经纤维髓鞘崩解明显增多 ($\times 2500, 2\mu\text{m}$) **d** C 组术后 12 周时,有髓神经纤维崩解的髓鞘板层清晰 ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$) **e** C 组术后 24 周时,有髓神经纤维髓鞘崩解、融合,新生神经纤维髓鞘管壁薄,无髓神经纤维增多 ($\times 2500, 2\mu\text{m}$) **f** C 组术后 24 周时,有髓神经纤维崩解的髓鞘板层模糊 ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$)

Figure 1 The images of transmission electron microscope of rats' sciatic nerve in three groups **a** Group A showed myelin sheaths were normal ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$) **b** Group C showed part of myelin broke down, lamellar separated at 4 weeks ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$) **c** Group C showed myelin breakdown significantly increased at 12 weeks ($\times 2500, 2\mu\text{m}$) **d** Group C showed lamellar of broken myelin was clear at 12 weeks ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$) **e** Group C showed myelin was in disintegration and fusion, regenerated myelin sheath was thin and unmyelinated nerve fibers increased at 24 weeks ($\times 2500, 2\mu\text{m}$) **f** Group C showed lamellar of disintegrated myelin was vague at 24 weeks ($\times 10000, 0.5\mu\text{m}$)

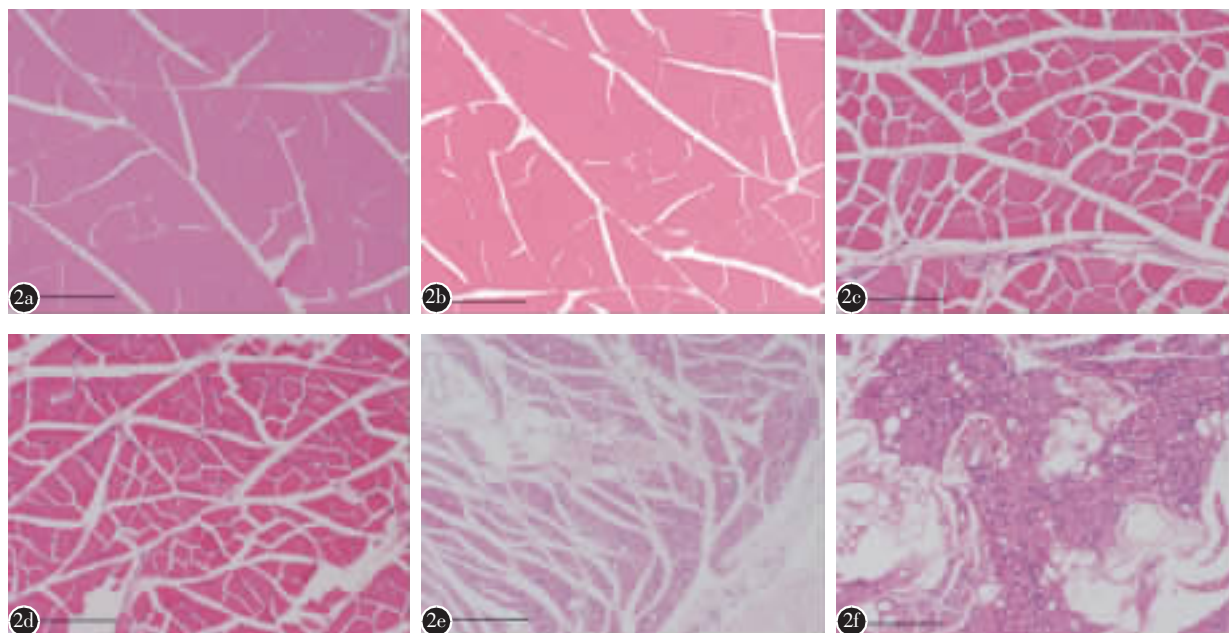


图 2 三组大鼠腓肠肌内侧光镜观察结果 (×200, 200μm) **a** A 组肌细胞肌束膜及肌内膜边界清晰, 肌细胞核位于肌膜下方 **b** B 组术后 2 周时, 肌细胞肌束膜及肌内膜边界清晰 **c** C 组术后 2 周时, 肌细胞截面积略缩小 **d** C 组术后 4 周时, 肌细胞截面积较 SCI 2 周时缩小, 局部肌细胞破坏 **e** C 组术后 12 周时, 多数肌细胞边界模糊, 肌细胞核相对聚集, 结缔组织增生明显 **f** C 组术后 24 周时, 肌细胞融合, 细胞核密集, 结缔组织增生更加明显

Figure 2 The images of light microscope of rats' medial gastrocnemius in three groups (×200, scale bar: 200μm) **a** Group A showed the borders of perimysium and endomysium were distinct, myocyte nucleus located in the edge of muscle fibers **b** Group B showed boundary of perimysium and endomysium were clear at 2 weeks **c** Group C showed the muscle cell area decreased slightly at 2 weeks **d** Group C showed the muscle cell area decreased further, muscle cell boundary was fuzzy at 4 weeks **e** Group C showed the border of most myocytes was obscure with obvious hyperplasia of connective tissue at 12 weeks **f** Group C showed muscle cell fusion and nuclear gathering appeared, while the connective tissue hyperplasia was more obvious at 24 weeks

元变性的研究方法,有间接的方式,包括下运动神经元逆行标记法、体视学测量技术等,也有直接的方法,包括神经活检病理技术、灌注固定光镜电镜观察等。通过神经元数目或体积的测量,相较于更直接的形态学观察尤其超微结构的观察,后者更有说服力,并且这些方法上的不同,一定程度上也导致了研究结果的差异。

3.2.2 运动终板形态变化 本研究通过透射电镜观察到脊髓横断性损伤 4 周内腓肠肌内侧运动终板结构完整,突触皱褶清晰,12 周时退变运动终板与完整运动终板并存,到 24 周时已找不到运动终板。表明在完全性脊髓损伤的自然病程中,随着观察时间的延长,运动终板结构逐渐出现了不可逆退变。国内外学者通过不同技术对脊髓损伤后运动终板进行研究,均发现有运动终板结构退变。段平国等^[12]通过氯化金染色发现,脊髓半横断损

伤大鼠在 SCI 后 1 周、2 周时运动终板在着色、数量上与正常组无明显差别;SCI 后 4 周时肌纤维运动终板开始出现退变,终板染色变浅,轴索终末分支减少,终板核减少,肌浆淡染,部分终板边缘皱缩,中央出现空泡样淡染区;SCI 后 8 周时运动终板明显退变,出现大的染色空白区,终板减少甚至消失,显示模糊的轮廓。Burns 等^[13]通过免疫组化技术,证明了横断性脊髓损伤大鼠其后肢神经肌肉接头发生了解剖学不稳,包括突触前轴突终末的回缩、突触后乙酰胆碱(Ach)受体的丢失、并行的突触前后结构的减少以及轴突终末的芽生,神经肌肉突触出现的选择性分解提示神经肌肉接头(NMJs)存在着多种亚群,其突触前、后结构的易损性有明显差异。其在研究中发现在脊髓横断后 2 周腓肠肌内侧的突触稳定,没有出现分解或重组较少。Rigoard 等^[14]在大鼠脊髓半切损伤实验

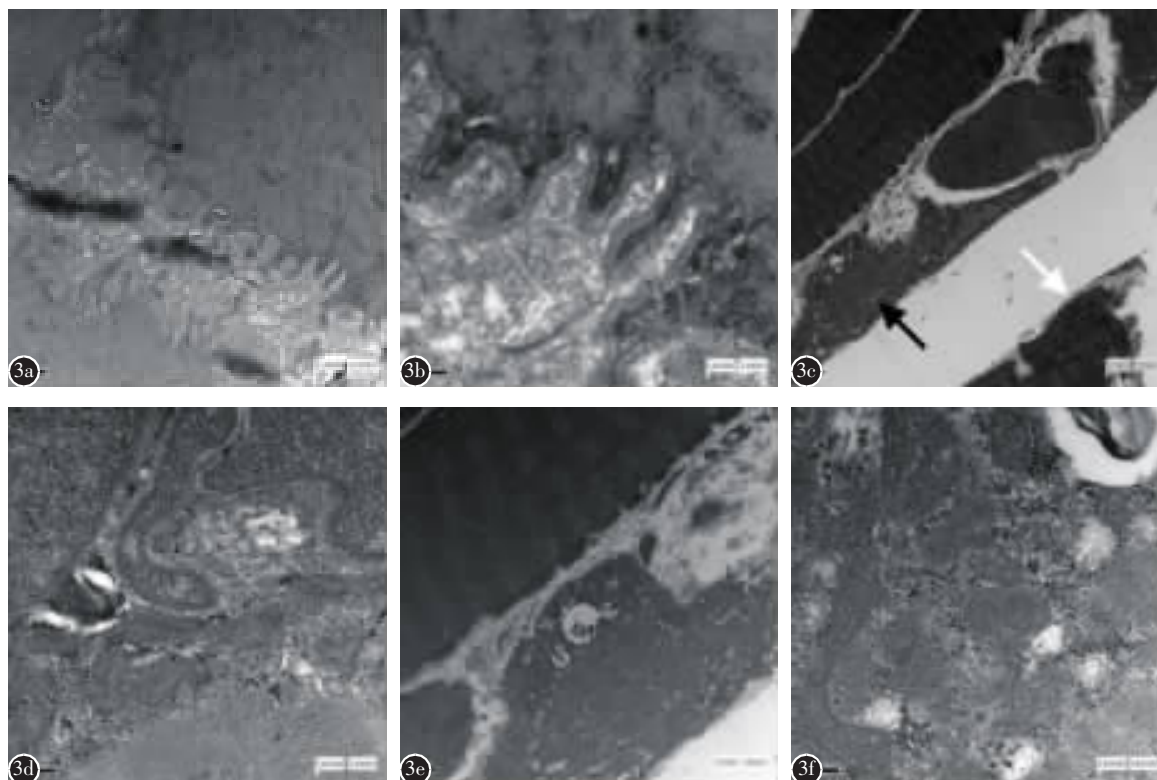


图 3 SCI 组大鼠运动终板突触结构透射电镜观察结果 **a** 术后 4 周时,突触皱褶结构清晰,突触内可见较均匀细颗粒状物质(横截面, $\times 10000$, $0.5\mu\text{m}$) **b** 术后 4 周时,突触前膜、突触间隙、突触后膜清晰可辨,各结构内可见细小颗粒(横截面, $\times 40000$, $0.2\mu\text{m}$) **c** 术后 12 周时,相对完好运动终板(白色箭头)与破坏运动终板(黑色箭头)并存(纵切面, $\times 2000$, $2\mu\text{m}$) **d** 术后 12 周时,突触前膜、突触间隙、突触后膜层次分明,各层结构内可见细小颗粒,突触间隙内可见多个类圆形突触小泡,肌板清晰(纵切面, $\times 40000$, $0.2\mu\text{m}$) **e** 术后 12 周时,突触结构凌乱;肌纤维明、暗带尚清晰,Z 线不连续(纵切面, $\times 5000$, $1\mu\text{m}$) **f** 术后 12 周时,突触皱褶及突触前、后膜不可辨,肌板结构不清晰(纵切面, $\times 40000$, $0.2\mu\text{m}$)

Figure 3 The images of transmission electron microscope of rats' motor endplate in spinal cord injury group **a** The synaptic folds could be seen distinctly with tiny granular materials at 4 weeks (cross section, $\times 10000$, $0.5\mu\text{m}$) **b** The synaptic folds, pre- and post-synaptic membrane could be seen clearly with granular materials at 4 weeks (cross section, $\times 40000$, $0.2\mu\text{m}$) **c** Relatively intact (white arrow) and destructive (black arrow) motor endplates coexisted at 12 weeks (vertical section, $\times 2000$, $2\mu\text{m}$) **d** Pre- and post-synaptic membrane and synaptic space was distinct with the tiny granular materials, quasi-circular synaptic vesicles could be seen in synaptic space, muscle plates were clear at 12 weeks (vertical section, $\times 40000$, $0.2\mu\text{m}$) **e** The synaptic structure was messy, bright and dark stripes were visible, Z lines were uncontinuous at 12 weeks (vertical section, $\times 5000$, $1\mu\text{m}$) **f** The synaptic folds, pre- and post-synaptic membrane were undistinguishable, muscle plates were indistinct at 12 weeks (vertical section, $\times 40000$, $0.2\mu\text{m}$)

中,通过免疫组化方法用激光共聚焦显微镜观察 NMJ 分子成分的定位与表达,用光镜和电镜观察神经和肌肉的退变,结果发现无病理改变的 NMJs 与完全失神经支配的 NMJs、神经再支配的 NMJs 共存。

3.2.3 肌肉形态变化 本研究发现,脊髓损伤后 4 周时腓肠肌内侧肌细胞截面积缩小,12 周时肌细胞萎缩明显,并伴有大量结缔组织增生,24 周时肌细胞已大片融合,无法明确分辨肌细胞结构,

且结缔组织增生更明显,而对照组和假手术组大鼠腓肠肌内侧形态无变化。表明肌细胞在完全性脊髓损伤后无干预措施情况下经历着进行性退变,早期主要表现为肌肉湿重下降、肌细胞截面积减小,后期主要表现为肌纤维形态结构的破坏并被结缔组织填充。有研究^[7]表明,脊髓损伤后瘫痪肌肉明显萎缩,以肌纤维数目减少和残存肌纤维萎缩(shrinking)为特点,主要表现为肌肉截面积(cross-sectional area, CSA)缩小、肌肉湿重下降、

肌肉脂肪(intramuscular fat, IMF)堆积。然而关于肌肉形态结构的改变及其动态过程研究相对较少。有文献报道,脊髓横断性损伤后 HE 染色光镜观察发现,在脊髓损伤后 10d 趾长伸肌和比目鱼肌形态上没有明显变化,表明在脊髓横断后肌纤维没有明显的破坏^[6]。在本研究中也发现腓肠肌内侧在 SCI 后 4 周内均未见明显变化。也有研究显示,大鼠在 T6 脊髓横断性损伤后,大体观察趾长伸肌呈进行性萎缩^[15],并且肌肉干重在脊髓损伤后 10d 降至最低;光镜和免疫化学染色表明在横断后 2 周肌纤维萎缩,考虑肌细胞面积有所缩小,但形态结构无明显变化,这与我们的早期观察并不冲突。

3.3 神经电生理功能的变化

人类和动物脊髓损伤后肌电图检查可见自发电位(spontaneous activities, SA)(纤颤电位和正锐波)。纤颤电位是肌肉失神经支配的特征。研究表明,脊髓损伤后肌肉 SA 并非由运动神经损害所致,运动神经轴索性损害及肌肉 SA 均为前角运动神经元损害的继发表现^[2]。MUNE 是对其直接定量的检测手段,同时被认为是评估肌肉中存活运动单位数目的唯一电生理检测工具^[16]。MUNE 检测是一种测定骨骼肌中有功能运动单位(motor unit, MU)数目的神经电生理手段,目前有多种检测方法,以多点刺激法(multiple point stimulation, MPS)和统计学方法应用较为广泛^[17]。MUNE 检测广泛应用于运动神经元病的运动单位检测,在脊髓损伤的临床研究及动物实验中亦有应用。

本研究通过测量 T10 横断性 SCI 大鼠腓肠肌内侧 MUNE 值发现,脊髓损伤 4 周内运动单位数目逐渐降至最低值,12 周时明显回升但仍明显低于损伤前水平,24 周时再次回落至最低值,MUNE 值变化呈“∩”样规律性改变,而假手术组大鼠 MUNE 值与对照组比较无明显变化。本研究中测得 50 只正常雌性 SD 大鼠的内侧腓肠肌 MUNE 值为 116.28 ± 10.73 ,与 Arasaki 等^[18]通过脊髓运动神经元逆行标记法获得的数值(103 ± 16)及 MUNE 多点刺激测量技术获得的数值(93 ± 22)较接近。熊国星等^[19]在临床研究中发现,T6 以上 SCI 亚急性期(SCI 后 1~6 个月)患者胫骨前肌 MUNE 值明显减少,甚至为 0;随访 3 个月变化无统计学差异,但 M 波波幅逐渐增大;慢性期(SCI 后 1 年至 4 年余)患者 M 波仍较正常值小,但 MUNE

值与正常值无统计学差异。在大鼠的动物实验中,T10 横断性 SCI 后 56d 内,腓肠肌内侧 MUNE 值呈“U”形改变,在伤后 28d 降到最低,伤后 56d 逐渐恢复到接近损伤前水平。上述研究表明,无论人类或动物脊髓损伤后,损伤平面以下骨骼肌 MUNE 值均随时间呈规律性改变,即先下降后上升的趋势。本研究中 MUNE 值呈“∩”样改变,T10 横断性 SCI 后 12 周内变化与上述研究一致,在 24 周时 MUNE 再次下降并接近术后急性期内低值,考虑有以下几方面原因:(1)周围神经及运动终板退变,包括解剖结构的退变及各种功能因子的变化。运动终板正常结构与功能的维护有赖于与中枢神经元的完整联系,并与轴浆运输所供应的各种营养因子、递质以及糖蛋白有密切关系^[20]。本研究中在脊髓损伤 4 周时坐骨神经结构即出现了变化,在 12 周时虽可见结构完整的运动终板,但也已出现了退变的运动终板。另外,降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)与 Ach 共存于运动终板,运动神经元的 CGRP 不仅调节 Ach 受体(AchRs)的代谢,而且还直接或者间接参与终板处 AchE 的调节^[21]。有研究报道脊髓损伤后神经及运动终板中这些功能因子发生了变化^[22]。(2)肌肉的改变。包括脊髓损伤所致的肌细胞退变及肌肉的废用性改变,两者均导致了肌肉的结构形态改变。除结构基础的变化,也有大量研究阐述了脊髓损伤后肌肉收缩性能的变化。(3)衰老。在人类的 MUNE 研究中,随着年龄的增大,70 岁较 20~30 岁健康成人鱼际肌 MUNE 下降了 $1/3 \sim 1/2$ ^[9]。本研究中选用的实验动物是 SD 大鼠,健康 SD 大鼠的寿命一般是 3~4 年。在本研究中,观察时间长达 6 个月,而这是健康大鼠寿命的 $1/8 \sim 1/6$,同时在完全性横断性脊髓损伤背景下,其生存年龄会有所缩短,加速了衰老,这一点可能也是影响测定结果的因素。然而,关于衰老是否及如何影响大鼠的运动单位的数量,有待进一步探讨。

3.4 形态学改变和运动功能变化的关系

本研究在大鼠脊髓完全性横断损伤后 4 周,损伤平面以下坐骨神经、运动终板、腓肠肌内侧形态结构基本完整,12 周时均出现了明显退变,24 周时结构破坏更加明显,甚至已找不到运动终板。而在大鼠后肢运动功能观察中,BBB 评分 4 周时达恢复高峰 [3 (3,4)],12 周时运动再度减少,24 周时已无自主运动。早期的这种运动恢复的机制

考虑与损伤部位以下腰骶段脊髓内的低级步行控制中枢——中枢模式发生器^[10](central pattern generator, CPG)有关,同时与损伤部位以下神经肌肉结构形态基本完整有关。CPG 由脊髓中间神经元组成,之间有神经信号通讯,其所构成的网络可使脊髓在完全失去下行运动神经支配和上行感觉传入的情况下产生一些节律性运动。同时损伤平面以下的神经肌肉结构的完整性决定了中枢模式发生器发放的冲动能否有效传递。随着脊髓损伤后自然病程的延长,损伤平面以下神经肌肉结构破坏进行性加重,以及后肢逐渐出现关节挛缩或关节僵直,导致后肢活动进一步受限直至消失。

3.5 形态学改变和电生理功能变化的关系

本研究在脊髓完全性横断损伤后 4 周,损伤平面以下坐骨神经、运动终板、腓肠肌内侧形态结构基本完整,12 周时均出现了形态结构变化,24 周时结构破坏更加明显,甚至已找不到运动终板。而在腓肠肌内侧神经电生理测量中,MUNE 值呈“∩”样改变,在 T10 横断性 SCI 后 4 周时降至最低,12 周时有所上升,但明显低于损伤前水平,24 周时明显下降至 4 周时水平。MUNE 的早期改变机制可能是由于可逆性的跨神经元变性、暂时的下运动神经元功能抑制和/或运动单位的功能重组致急性期 SCI 后运动单位呈“假死”状态。Ollivier-Lanvin 等^[23]通过神经电生理研究发现,在脊髓损伤后 6 周,NMJ 传递功能尽管有轻度的下降,但在超强电刺激中 NMJ 传递功能大部分保持完整;从结构形态上 4 周时周围神经虽有轻度退变,但运动终板及肌肉无明显结构破坏。本研究 12 周时观察到分解与完整运动终板共存,这与 Rigoard 等^[14]在大鼠脊髓半切损伤实验中发现无病理改变的 NMJs 与完全失神经支配的 NMJs、神经再支配的 NMJs 共存一致,同时破坏与相对完整的肌细胞共存,表明运动单位仍存在一定的结构基础,由于部分结构破坏导致 MUNE 值低于损伤前水平。在 24 周时,运动终板消失,MUNE 亦下降至最低值,也表明了运动终板是神经传递链的重要链接。

本研究结果显示,在大鼠完全横断性脊髓损伤后的自然病程中,损伤平面以下运动功能、神经电生理功能及形态结构(周围神经、运动终板、骨骼肌)均呈规律性改变,BBB 评分及 MUNE 数值在脊髓损伤 24 周内整体减低并呈“∩”型变化,远

端神经肌肉形态结构随时间退变程度逐步加重甚至消失;总体表现为损伤后 12 周时已有明显变化,24 周时出现显著的结构损害和功能丧失。

4 参考文献

- 林惠,李桂珍,逢辉. 康复治疗脊髓损伤功能恢复的疗效观察[J]. 中华理疗杂志, 2001, 24(6): 352-354.
- 王红星,陈文红,顾绍钦,等. 脊髓损伤患者双下肢神经肌肉的电生理特征[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(6): 513-517.
- 陈银海,姚红华. 早期康复对脊髓损伤患者 ADL 及功能独立性的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(3): 252-253.
- 徐长磊,李晓光. 慢性脊髓损伤的病理学变化及其修复特点[J]. 中国临床康复, 2006, 10(28): 141-143.
- 张庆民,关骅,洪毅. 完全横断性脊髓损伤后跨神经元变性的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(11): 840-842.
- Dupont-Versteegden EE, Houle JD, Gurley CM, et al. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise [J]. Am J Physiol, 1998, 275(4 Pt 1): C1124-C1133.
- Gorgey AS, Dudley GA. Skeletal muscle atrophy and increased intramuscular fat after incomplete spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 2007, 45(4): 304-309.
- Aoki M, Kishima H, Yoshimura K, et al. Limited functional recovery in rats with complete spinal cord injury after transplantation of whole-layer olfactory mucosa: laboratory investigation[J]. J Neurosurg Spine, 2010, 12(2): 122-130.
- Wang FC, Delwaide PJ. Number and relative size of thenar motor units estimated by an adapted multiple point stimulation method[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(9): 969-979.
- Marder E, Bucher D. Central pattern generators and the control of rhythmic movements[J]. Curr Biol, 2001, 11(23): R986-996.
- McBride RL, Feringa ER. Ventral horn motoneurons 10, 20 and 52 weeks after T-9 spinal cord transection[J]. Brain Res Bull, 1992, 28(1): 57-60.
- 段平国,刘德明,杨宝林. 脊髓半横断损伤后大鼠运动终板的氯化金染色研究[J]. 四川解剖学杂志, 2006, 14(3): 48-49.
- Burns AS, Jawaid S, Zhong H, et al. Paralysis elicited by spinal cord injury evokes selective disassembly of neuromuscular synapses with and without terminal sprouting in ankle flexors of the adult rat[J]. J Comp Neurol, 2007, 500(1): 116-133.
- Rigoard P, Buffenoir K, Chaillou M, et al. Morphological study of CNS lesions and the consequences on rat neuromuscular junction and peripheral nerve using confocal laser scanning microscopy and Koelle's technique [J]. Neurochirurgie, 2009, 55(Suppl 1): S110-123.
- Carter JG, Sokoll MD, Gergis SD. Effect of spinal cord transection on neuromuscular function in the rat[J]. Anesthesiology, 1981, 55(5): 542-546.

16. Bromberg MB, Brownell AA. Motor unit number estimation in the assessment of performance and function in motor neuron disease[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2008, 19(3): 509-532.
 17. Bromberg MB. Updating motor unit number estimation (MUNE)[J]. Clin Neurophysiol, 2007, 118(1): 1-8.
 18. Arasaki K, Tamaki M, Hosoya Y, et al. Validity of electromyograms and tension as a means of motor unit number estimation[J]. Muscle Nerve, 1997, 20(5): 552-560.
 19. 熊国星, 张军卫, 洪毅, 等. 脊髓损伤后胫骨前肌运动单位数目测定的意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(6): 429-433.
 20. Tsujihata M, Satoh A, Yoshimura T, et al. Effect of myasthenic immunoglobulin G on motor end-plate morphology [J]. J Neurol, 2003, 250(1): 75-82.
 21. Fernandez HL, Ross GS, Nadelhaft I. Neurogenic calcitonin gene-related peptide: a neurotrophic factor in the maintenance of acetylcholinesterase molecular forms in adult skeletal muscles[J]. Brain Res, 1999, 844(1-2): 83-97.
 22. 段强, 彭卫华, 樊继军, 等. 大鼠完全性脊髓横断及坐骨神经损伤后运动终板变化[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(15): 2176-2179.
 23. Ollivier-Lanvin K, Lemay MA, Tessler A, et al. Neuromuscular transmission failure and muscle fatigue in ankle muscles of the adult rat after spinal cord injury[J]. J Appl Physiol (1985), 2009, 107(4): 1190-1194.
- (收稿日期: 2014-12-21 末次修回日期: 2015-01-29)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)

消息

第三届颈椎微创技术及显微外科操作班会议通知

近年来,随着脊柱微创技术的迅速发展,各种微创技术如:椎间盘镜、椎间孔镜、介入技术在颈椎外科中得到了较好的应用,并且收到了良好的疗效。另一方面,在颈椎外科手术中运用显微外科技术具有天然的优势,它提高了手术的精细度和安全性,在颈椎外科中熟练使用手术显微镜将使脊柱外科医生如虎添翼,而且通过显微外科技术的辅助,一些常规的开放手术可以通过微创方式来完成。

2013年7月4~6日,我们在上海举办了第一届中国显微颈椎微创外科论坛暨国际显微颈椎微创外科操作学习班,首次在中国进行显微颈椎微创外科技术的解剖操作实践培训,收到了较好的效果。在此基础上,为了进一步推广和探讨微创技术及显微外科技术在颈椎外科中的应用,我们拟于2015年6月5~7日在上海举办第三届颈椎微创技术及显微外科操作班,学习班学员招收对象为有志于脊柱微创技术的骨科、脊柱外科、神经外科、疼痛科及介入科等相关科室的医生。

为了让学员能够更好地掌握相关理论和操作技巧,此次学习班采用理论和实践操作相结合的小班课教学模式,以操作为主,理论教学为辅,学习班学员限20人。学习班内容包括:(1)椎间孔镜技术在颈椎外科中的应用;(2)椎间盘镜在颈椎外科中的应用;(3)显微外科技术在颈椎及上颈椎外科中的应用;(4)其他颈椎微创相关技术。

操作班学员收取学费3000元/人,本次操作培训班非国家级继续教育项目,不授予学分。

学员报名联系方式:请在5月10日前通过电话或者E-mail进行报名。

联系人:严宁:15900853645;虞舜志:15618780517;吴信波:15221781653。

电话:(021)66307330;E-mail:hss7418@aliyun.com。

有关论坛及培训班更多详细情况请访问同济大学附属上海第十人民医院脊柱外科/脊柱微创中心网站:www.tongjispine.com。