

· 基础研究 ·

脊髓损伤大鼠运动及神经功能自然恢复规律的探讨

王红星 徐冬晨 姚莉 雷晓婷 刘兴波 丁新生 王彤

【摘要】 目的 观察不完全脊髓损伤(SCI)大鼠运动及神经功能自然恢复情况,为SCI后运动训练时机选择提供依据。方法 共选取45只成年SD大鼠,分为实验组(40只)和假手术组(5只)。实验组手术切除T₁₀椎板暴露脊髓,采用改良Allen's撞击法致SCI;假手术组仅手术切除T₁₀椎板暴露脊髓。实验组分别于损伤前及损伤后1,3,5,7,14 d,21 d和28 d,假手术组分别于术前及术后1,3,5,7 d时采用斜板试验、改良Tarlov评分、Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)评分进行运动功能评定,采用脊髓诱发电位评定神经功能。实验组于上述各时间点分别取5只大鼠处死,假手术组于术后7 d时处死,取2组大鼠T₁₀节段脊髓进行形态学检测。结果 ①实验组大鼠在损伤后1~3 d斜板角度、改良Tarlov评分和BBB评分均较损伤前显著降低,自损伤后5 d时开始增加,至14 d时达到平台期,显著高于术后1,3,5 d及7 d时水平($P < 0.05$),与21,28 d时结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但仍低于损伤前水平($P < 0.05$)。假手术组术后与术前比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。②实验组大鼠在损伤后1 d时脊髓体感诱发电位(SCEP)潜伏期较损伤前明显延长($P < 0.05$);随时间进展该潜伏期呈逐渐缩短趋势,至术后21 d时达到平台期,但仍显著长于损伤前水平($P > 0.05$);波幅在损伤后1 d时明显降低,随时间进展呈逐渐增加趋势;假手术组术后各时间点潜伏期和波幅与术前比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。③2组大鼠术前脊髓结构完整,实验组术后1~3 d脊髓灰白质可见片状出血、细胞肿胀及变性;术后5~7 d炎性细胞减少,可见细胞内嗜碱性颗粒沉积、胶质细胞及少量神经纤维增生等;术后14~28 d可见胶质细胞、神经纤维增生明显,细胞内有空泡结构形成;假手术组大鼠脊髓形态学方面手术前后无明显改变。结论 SCI大鼠运动功能、神经功能及脊髓病理形态学变化均与损伤时程密切相关,其运动功能改善一般于损伤后14 d时达到平台期,而神经功能改善一般于损伤后21 d时达到平台期。

【关键词】 脊髓损伤; 运动功能; 脊髓诱发电位

Natural recovery of locomotor and neurological function in rats after spinal cord injury WANG Hong-xing*, XU Dong-chen, YAO Li, LEI Xiao-ting, LIU Xing-bo, DING Xin-sheng, WANG Tong. *Department of Rehabilitation Medicine, The 1st Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China
Corresponding author: WANG Tong, Email: wangtong60621@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To observe the natural recovery of locomotor and neurological functioning in rats after incomplete spinal cord injury. **Methods** Forty-five Sprague-Dawley rats were divided into two groups: an experimental group and a sham-operation group. In the experimental group, the spinal cord was exposed at the T₁₀ level by laminectomy, and an animal model of spinal cord injury (SCI) was created using a modification of Allen's method. The sham-operation group received only laminectomy without spinal cord injury. Locomotor and neurological functioning were evaluated using inclined plane tests, modified Tarlov scores, Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scales and spinal cord evoked potential (SCEP) before the operation and on the 1st, 3rd, 5th, 7th, 14th, 21st and 28th day post surgery. Histomorphological changes were observed by light microscopy. **Results** (1) In the experimental group, the angles of the inclined plane test and the Tarlov and BBB scores had decreased significantly 1 and 3 days post-injury compared with those before the injury, and then increased gradually from the 5th day onwards, and peaking at the 14th day after injury. In the sham-operation group no significant changes in the inclined plane test results, modified Tarlov scores or BBB scores were observed 1, 3, 5 or 7 days post surgery. (2) In experimental group, SCEP latency had increased significantly on the 1st day after SCI, but it then decreased gradually until reaching a plateau at the 21st day after the operation. The SCEP amplitude also decreased significantly at the 1st day after SCI,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671018)

作者单位:210029 南京,南京医科大学第一附属医院康复医学科(王红星、雷晓婷、刘兴波、丁新生、王彤),骨科(姚莉);南京特殊教育职业技术学院(徐冬晨)

通讯作者:王彤,Email:wangtong60621@yahoo.com.cn

then increased gradually from the 3rd to the 21st day. In the sham-operation group, no significant changes in SCEP latency or amplitude were observed. (3) One and 3 days after the operation, hemorrhage and edema in the spinal cord as well as nerve fiber degeneration was observed in the experimental group. From day 5 to day 7, empty cavities formed gradually and astrocytes increased, a few nerve fibers grew. By days 14 and 28, more nerve fibers and astrocytes were found. **Conclusion** The recovery of locomotor and neurologic function correlated closely with the natural course of spinal cord recovery, and becomes stable 14 to 21 days after injury.

【Key words】 Spinal cord injury; Locomotor function; Somatosensory evoked potential

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是重要的致残原因之一。相关实验及临床观察发现,运动训练能有效促进 SCI 后功能恢复,是促进脊髓神经再生及功能恢复的有效措施之一^[1-3]。由于 SCI 后机体神经结构及功能变化复杂,难以确定运动训练的最佳介入时机。本研究通过观察 SCI 大鼠模型运动与神经功能自然恢复的时间规律,为 SCI 患者康复介入时机选择提供实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取成年健康雄性 SD 大鼠 55 只,体重(320 ± 30)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[许可证号 SCXK(沪)2003-0003]。在模型制作过程中及术后共死亡 10 只被剔除,余 45 只纳入实验分析,将其分为实验组(40 只)和假手术组(5 只)。实验组大鼠行手术切除 T₁₀椎板暴露脊髓并致 SCI,假手术组大鼠则仅手术切除 T₁₀椎板暴露脊髓组织。

二、SCI 模型制作过程

参照文献[4]介绍的方法,采用 1% 戊巴比妥钠(0.5 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉成功后,将大鼠俯卧位固定,暴露 T₁₀椎骨棘突,切除椎板,暴露硬脊膜,然后将大鼠固定于立体定位器上,使脊柱处于水平位。采用改良 Allen's 撞击法,在脊髓背侧面放置一金属垫片作为打击板,将 10 g 的砝码自 4 cm 高度垂直落下撞击打击板致大鼠 SCI(术后大鼠尾巴痉挛摆动后双下肢瘫痪表明制模成功)。预防性应用青霉素进行肌肉注射(20 万 U,1 次/d,共 3 d)。实验组大鼠制模后每日上、下午各进行 1 次腹部按摩和挤压操作以协助排尿。

三、运动功能评定

实验组大鼠于损伤前、损伤后 1,3,5,7 d,14,21 d 及 28 d 时进行运动及神经功能评定,假手术组大鼠于术前及术后 1,3,5 d 和 7 d 时进行功能评定。具体评定内容包括以下方面。

1. 斜板试验:将实验大鼠置于光滑木板上,其身体轴线与平板纵轴平行,平板每次升高 5°,以大鼠能停留 5 s(期间保持不下滑)的最大角度为其功能值^[5]。

2. Tarlov 评分:0 级——后肢无活动,不能负重;1

级——后肢可见活动,但不能负重;2 级——后肢活动频繁或有力,不能负重;3 级——后肢可支持体重,能走 1~2 步;4 级——可行走,仅有轻度障碍;5 级——行走功能正常^[6]。

3. Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)评分^[7]:该评分系统将大鼠后肢运动功能分为 22 个等级,其中后肢全瘫为 0 分,功能完全正常为 21 分,主要观察内容包括关节活动数目和范围、负重程度及前后肢协调性、前后爪和尾部活动情况等。上述运动功能评定时间均统一为上午 8:00。

四、脊髓诱发电位检查

参照文献[8,9]介绍的方法,采用 Medtronic Keypoint 4ch 型诱发电位仪检测大鼠脊髓体感诱发电位(spinal cord evoked potential, SCEP),电刺激强度为 10 mA,波宽 1 ms,频率 2 Hz,叠加 200 次,将刺激电极正极插入大鼠后肢刺激胫后神经,负极位于正极远端 2 cm 处,记录电极则插于 T₈~T₉ 棘间韧带处,参考电极位于同一水平皮下,与记录电极间隔 2 cm,地线插在腹部皮下。以第 1 个负波(N 波)的潜伏期和波幅作为观察指标,均重复测定 3 次,求其平均值。

五、形态学检查

实验组于各观察时间点随机处死 5 只大鼠取材;假手术组大鼠于术后 7 d 时取材。采用 1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠后,用 4% 中性甲醛溶液进行心脏灌注,取损伤部位及上、下 1 cm 范围内脊髓组织,制作标本切片行常规 HE 染色,观察组织学变化情况。

六、统计学分析

采用 SPSS 14.0 版软件进行数据统计分析,所得数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、运动功能结果分析

1. 斜板试验:实验组大鼠 SCI 后第 1 天时,其斜板角度由损伤前的(38.2 ± 2.4)°降低到(19.7 ± 1.7)°,差异具有统计学意义($P < 0.05$),斜板角度自 SCI 后第 5 天时开始呈增加趋势,至第 14 天时增加到(32.6 ± 3.8)°,与 SCI 后 1,3,5 d 及 7 d 时比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),但仍显著低于损伤前

水平($P < 0.05$);SCI 后第 21,28 天时斜板角度无进一步增加($P > 0.05$)。假手术组大鼠术后第 1 天斜板角度较术前降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),术后第 3,5,7 天时斜板角度与术前水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 改良 Tarlov 评分:实验组大鼠 SCI 后第 1 天时,其改良 Tarlov 评分由损伤前的 5.0 分降低到(0.02 ± 0.15)分,至 SCI 后 5 d 时仍无明显恢复;于 SCI 后第 7 天时 Tarlov 评分开始逐渐增高,至第 14 天时恢复到(2.6 ± 0.7)分,显著高于损伤后 1,3,5 d 及 7 d 时评分($P < 0.05$),但仍显著低于损伤前水平($P < 0.05$);SCI 后第 21,28 天时 Tarlov 评分仍有增加趋势,但与第 14 天时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。假手术组大鼠 Tarlov 评分术前及术后比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3. BBB 评分:实验组大鼠 SCI 后第 1 天时,其 BBB 评分由损伤前的 21 分降低到(0.09 ± 0.05)分,于 SCI 后第 5 天时开始呈增加趋势,至损伤后 14 d 时恢复到(13.4 ± 3.3)分,与 SCI 后 1,3,5 及 7 d 时比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但仍明显低于损伤前水平($P < 0.05$);至术后第 21,28 天时无进一步提高,与术后第 14 天时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。假手术组术前、术后 BBB 评分无明显变化($P > 0.05$)。具体结果详见表 1。

二、脊髓诱发电位结果分析

实验组大鼠 SCI 后第 1 天时的 SCEP 潜伏期 [(11.6 ± 2.4) ms] 较损伤前水平 [(5.7 ± 1.0) ms] 明显延长,差异具有统计学意义($P < 0.05$);随着时间进展,SCEP 潜伏期呈缩短趋势,于 SCI 后第 21 天时恢复至(7.5 ± 1.5) ms,但仍显著长于损伤前水平($P > 0.05$),至第 28 天时 SCEP 潜伏期再无进一步缩短,与第 21 天时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);SCEP 波幅在 SCI 后第 1 天时明显降低,并随时间进展呈逐渐增加趋势。假手术组大鼠术后各时间点 SCEP 潜伏期和波幅与术前比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。具体数据详见表 1。

三、形态学观察结果分析

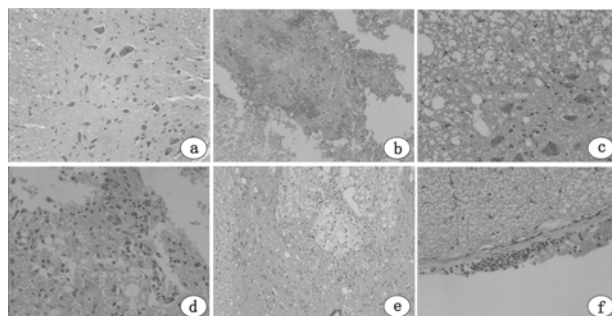
实验组大鼠损伤前脊髓组织结构完整,神经细胞形态正常,无出血现象;SCI 后 1~3 d 脊髓病理改变包括灰白质明显出血、细胞变性、神经纤维组织溶解、灰白质界限不明显、炎性细胞浸润等;SCI 后 5~7 d 病理改变包括神经元变性、出血不明显、炎性细胞减少、细胞质内可见嗜碱性颗粒沉积,同时还有少量神经纤维增生及新生血管;术后 14~28 d 胶质细胞增生明显,白质内细胞嗜碱性颗粒沉积,灰质内见小灶区域空泡变性及神经纤维增生。假手术组仅见脊髓硬膜外中性

粒细胞浸润和少量出血,大脑灰白质无明显变化(见图 1)。

表 1 2 组大鼠不同时间点运动功能及脊髓诱发电位结果比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	斜板试验 (°)	Tarlov 评分(分)	BBB 评分 (分)	脊髓体感诱发电位		
				潜伏期 (ms)	波幅 (μV)	
实验组(<i>n</i> = 40)						
术前	38.2 ± 2.4	5.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	5.7 ± 1.0	1.23 ± 0.21	
术后 1 d	19.7 ± 1.7	0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.05	11.6 ± 2.4	0.43 ± 0.06	
术后 3 d	19.2 ± 2.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.4 ± 2.1	0.46 ± 0.11	
术后 5 d	23.0 ± 2.7	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3	10.3 ± 2.0	0.54 ± 0.12	
术后 7 d	28.9 ± 3.6	1.9 ± 0.6	8.4 ± 4.5	9.2 ± 1.8	0.55 ± 0.15	
术后 14 d	32.6 ± 3.8 ^a	2.6 ± 0.7 ^a	13.4 ± 3.3 ^a	8.4 ± 2.1 ^a	0.67 ± 0.20	
术后 21 d	32.4 ± 2.6 ^a	2.9 ± 1.0 ^a	15.5 ± 4.0 ^a	7.5 ± 1.5 ^b	0.86 ± 0.23 ^b	
术后 28 d	31.7 ± 2.6 ^a	2.8 ± 0.9 ^a	15.3 ± 5.9 ^a	7.3 ± 1.3 ^b	0.87 ± 0.21 ^b	
假手术组(<i>n</i> = 5)						
术前	38.4 ± 4.1	5.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	6.1 ± 1.1	1.16 ± 0.34	
术后 1 d	35.0 ± 3.5	5.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	6.1 ± 0.7	1.14 ± 0.31	
术后 3 d	37.5 ± 3.7	5.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	6.2 ± 0.9	1.20 ± 0.26	
术后 5 d	38.0 ± 3.4	5.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	6.0 ± 0.7	1.10 ± 0.30	
术后 7 d	38.2 ± 4.4	5.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	6.2 ± 1.3	1.22 ± 0.27	

注:与组内术前及术后 1,3,5,7 d 时比较,^a $P < 0.05$;与术后 1,3,5,7 d 及 14 d 时比较,^b $P < 0.05$



注:图 1a~图 1e 均为实验组,图 1a 示损伤前脊髓组织结构完整,神经细胞形态正常;图 1b 示损伤后 1 d 时脊髓灰白质明显出血,组织水肿,细胞变性,灰白质界限不明显及炎性细胞浸润;图 1c 示损伤后 5 d 时神经元变性,出血不明显,炎性细胞减少,细胞质内可见嗜碱性颗粒沉积;图 1d 示损伤后 14 d 时胶质细胞增生明显,灰质内可见小灶区域空泡变性;图 1e 示损伤后 28 d 时胶质细胞增生明显,白质内细胞嗜碱性颗粒沉积,灰质内见小灶区域空泡变性,神经纤维增生;图 1f 为假手术组,可见脊髓硬膜外中性粒细胞浸润和少量出血,灰白质无明显变化

图 1 2 组大鼠手术前、后不同时间点脊髓形态学变化分析(HE 染色, $\times 200$)

讨 论

本研究发现大鼠 SCI 后,随着时程延长,其斜板试验结果、改良 Tarlov 评分和 BBB 评分均呈逐渐增加趋势,以术后 7~14 d 期间恢复较显著,并于术后 14 d 时进入平台期,术后 21 d 及 28 d 时上述指标均无显著改善,提示 SCI 大鼠运动功能最大程度自然恢复的时间窗为 7~14 d,之后随着时程延长,大鼠受损功能不再

有明显改善。实验组 SCI 大鼠 SCEP 潜伏期随时程延长呈缩短趋势,于术后 21 d 时进入平台期,波幅的变化情况同潜伏期变化趋势基本一致,且均迟于运动功能恢复进程,其原因可能系 SCEP 主要评价脊髓后束感觉传导功能,不能完全反映运动传导束功能状态;而本研究采用的是不完全性 SCI 模型,其直接撞击部位为脊髓后束,因此后束损伤程度较运动传导束严重;但 SCEP 与脊髓损伤程度具有高度相关性,仍可较好地反映脊髓损伤程度及神经功能^[10]。后续研究需进行磁刺激运动诱发电位测定,以全面评估神经功能。

本研究综合采用斜板试验、改良 Tarlov 评分、BBB 评分对大鼠运动功能进行评估,以求全面、准确反映 SCI 后运动功能变化情况;但 BBB 评分系统不能区分大鼠后肢是自发性运动或是自主运动,由于大鼠等低等哺乳动物存在自发性后肢运动,而这种自发性后肢运动功能恢复并非由脊髓组织修复引起^[11]。相关研究表明,自发性运动功能恢复多在受伤 2 周后才会出现,而本研究结果显示,SCI 大鼠运动功能恢复均于 14 d 时达到平台期,因此可排除自发性运动成分对研究结果的影响^[12]。

本研究形态学观察结果显示,在 SCI 后 1~3 d 时,实验组大鼠灰质、白质内出血明显,炎症反应较重,灰白质界限不清,5~7 d 时炎症反应减轻,细胞增生明显,并可见神经纤维增生和血管新生,至 14 d 后胶质细胞增生显著,神经纤维增生较多。上述形态学方面的时程变化特点提示大鼠运动功能和神经功能恢复与损伤部位病理变化过程密切相关,SCI 后 5~7 d 随着出血量减少,组织细胞水肿和炎症反应消退,未损伤神经元及神经纤维逐渐恢复功能,从而使部分运动及神经功能得到改善。Gomez-Pinilla 等^[1]研究发现,于 SCI 后 2 d 时进行运动训练,并不能诱导神经生长因子表达及促进神经功能恢复,但于 SCI 后 5 d 时进行运动训练则能显著促进神经生长因子表达,该研究中的运动训练介入时机与本实验中运动功能最大程度恢复的时间点较为接近,提示在急性期过后进行运动训练,可能更有利于产生促神经再生作用。

综上所述,不完全性 SCI 大鼠运动功能、神经功能及病理形态学变化均与损伤时程密切相关,其运动功

能改善在损伤后 14 d 时进入平台期,而神经功能在损伤后 21 d 时达到最大程度恢复;SCI 大鼠术后 1~7 d 可见脊髓组织出血、水肿及炎性反应,神经及运动功能严重缺损,此阶段不适于介入康复运动训练;而在 SCI 发生 7 d 以后,上述各项病理改变及神经、运动功能均趋于稳定状态,此期间较适于介入康复训练,以进一步提高疗效。

参 考 文 献

- [1] Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, et al. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol*, 2002, 88: 2187-2195.
- [2] 王翔, 王彤, 宋凡. 减重平板训练改善 T₁ 损伤伴脊髓空洞症患者步行能力. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 428-429.
- [3] 王彤, 王翔. 减重平板训练对瘫痪后步行障碍患者的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 98-101.
- [4] Falconer JC, Narayana PA, Bhattacharjee M, et al. Characterization of an experimental spinal cord injury model using waveform and morphometric analysis. *Spine*, 1996, 21: 104-112.
- [5] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*, 1996, 273: 510-513.
- [6] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in rat. *J Neurosurg*, 1977, 47: 577-581.
- [7] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 1995, 12: 1-21.
- [8] 王相莉, 夏萍, 平少华, 等. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后功能恢复影响的研究. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004, 14: 609-612.
- [9] Hu Y, Luk KD, Lu WW, et al. Prevention of spinal cord injury with time-frequency analysis of evoked potentials: an experimental study. *J Neurol Neurosurg Psych*, 2001, 71: 732-740.
- [10] 周红俊, 汪家琮, 刘根林, 等. 脊髓损伤完全与否与体感诱发电位的关系. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 160-161.
- [11] 陈向荣, 游思维, 金大地. BBB 评分评估脊髓损伤大鼠后肢运动功能的探讨. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004, 14: 547-550.
- [12] 胡俊勇, 李佛保, 廖威明, 等. 大鼠脊髓横断后后肢运动功能恢复的规律. *中华创伤杂志*, 2003, 19: 592-595.

(收稿日期: 2007-11-29)

(本文编辑: 易 浩)

· 消息 ·

作者补遗

《中华物理医学与康复杂志》2008 年 2 月第 30 卷第 2 期 105-108 刊登的《医院-社区-家庭康复模式对脑瘫患儿粗大运动功能的影响》论文通讯作者为吴建贤, Email: wangyaya@mail. hf. ah. cn.