

· 基础研究 ·

大鼠脑内囊出血后脊髓缝隙连接蛋白 Cx32 和运动诱发电位的变化及意义

李书林 曾琳 龙在云 蒋晓江 谢顺清 陈曼娥

【摘要】目的 观察大鼠脑内囊出血后皮层运动传导束功能改变以及脊髓灰质中细胞缝隙连接的变化及可能意义。**方法** 制备大鼠右侧内囊出血模型,应用电生理学方法检测运动诱发电位,同时采用免疫组织化学方法观察脊髓组织中缝隙连接蛋白 Cx32 的表达变化。**结果** 动物内囊出血后经右侧皮层刺激的 MEP 波幅较左侧显著降低($P < 0.01$),且经右侧皮层刺激的 MEP 潜伏时显著延长($P < 0.01$)。脑出血后 1 和 2 周,脊髓左侧灰质中 Cx32 表达明显增加,而脊髓前角几乎没有表达;相反右侧脊髓灰质中未能观察到其表达。**结论** 大鼠脑内囊出血后引起皮层运动传导通路的电生理改变,而该出血侧通路所支配的对侧脊髓灰质中细胞表达 Cx32 明显增加,这可能是皮质脊髓束损害后脊髓 γ 环功能亢进的原因。

【关键词】 脑出血; 运动诱发电位; 脊髓; 缝隙连接

Connexin32 expression in spinal cord and motor evoked potential following internal capsular-oriented hemorrhage in rats LI Shu-lin, ZENG Lin, LONG Zai-yun, JIANG Xiao-jiang, XIE Shun-qing, CHEN Man-e. Department of Neurology, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】Objective To investigate the conductivity of corticospinal tract and change of intercellular gap junction in grey matter of spinal cord in rats following experimental cerebral internal capsular hemorrhage. **Methods**

Following the establishment of right capsular-oriented hemorrhage model of the rat, the motor evoked potentials (MEP) were measured by electrophysiological method. The expression levels of connexin32 of the spinal tissues were observed by immunohistochemistry analysis. **Results** After internal capsular hemorrhage in rats, the amplitude of the MEP evoked by stimulating the right sensorimotor cortex was lower than that of the left ($P < 0.01$), the latencies of MEP were also significantly prolonged in comparison with those for the left ($P < 0.01$). In the first and second week after the hemorrhage, the expression level of the connexin32 in the left gray matter of spinal cord was increased, but in the anterior horn there was less connexin32 expression. No expression of connexin32 in the right spinal cord could be detected. **Conclusion** Capsule-orientated hemorrhage may induce change of the conductivity of cortex-oriented motor path way. Meanwhile, in the grey matters of the contralateral spinal cord, the expression of connexin32 is significantly increased. This may be one of the causes of γ -loop hyperreflex in spinal cord following corticospinal cord injury.

【Key words】 Cerebral hemorrhage; Motor evoked potential; Spinal cord; Gap junction

上运动神经元损害后常引起肌痉挛而成为偏瘫肢体功能恢复的重要障碍因素之一^[1]。本实验应用大鼠脑内囊出血模型,观察上运动神经元的传导功能及脊髓缝隙连接的变化,以了解脑出血致内囊损害后运动诱发电位的变化规律,同时探讨脊髓灰质内细胞缝隙连接的变化及其意义,可为神经功能的康复治疗提供实验依据。

材料和方法

一、实验分组及动物模型制备

应用 Wistar 大鼠 20 只,体重 220 ~ 300 g,分别在

伤前、伤后 1 周和 2 周进行皮层运动诱发电位和脊髓缝隙连接的观察。取动物脑及部分脊髓组织进行病理检查。

采用 2% 戊巴比妥钠,按 40 mg/kg 体重对大鼠进行腹腔麻醉,然后将大鼠固定于立体定位仪上。常规消毒后,手术暴露颅骨,用牙科钻行颅骨钻孔(直径约 2 mm。位点为前囟向后 3.3 mm、矢状缝右侧 3.2 mm)。钻孔成功后,将大鼠尾部去毛、常规消毒,应用 4.5 号婴儿头皮针行大鼠尾动脉穿刺,见血液自动流入硅胶管,再用 200 ml 微量注射器(微量注射器预先肝素化)吸出 150 ml 大鼠尾动脉血,在立体定位仪的导引下,缓慢将微量注射器中自体血注入右侧内囊,注射部位为前囟向后 3.3 mm,矢状缝右侧 3.2 mm,深 7.2 mm。拔出注射针后,缝合创口并以碘

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科

酒消毒。手术完成后用青霉素(4 万 U, 肌注 1 次/d)预防感染。在动物清醒的各时相点,根据 Bederson 评定方法观察其偏瘫体征:1 级—将大鼠尾巴提起,瘫痪侧前肢回收屈曲于腹下,正常侧前肢向地面伸展;2 级—除 1 级体征外,向瘫痪侧推大鼠时阻力较对侧明显降低;3 级—除以上体征外,大鼠有向瘫痪侧旋转的行为^[2]。

二、大鼠运动诱发电位(motor evoked potential, MEP)的观察^[3,4]

实验应用丹麦产诱发电位肌电图记录仪,按 Yu^[3]等的方法,分别在各个时相点将大鼠麻醉后,将双极银球电极冠状位置于右侧感觉运动皮层脑膜表面,阳极在内侧,阴极在外侧,相距 2 mm。应用直流方波电脉冲刺激,强度 15 mA,波宽 0.2 ms,频率 3 Hz。记录电极为同心针电极,将其垂直于肌纤维方向插入左侧腓肠肌肌腹,地线固定于大鼠腰部。左侧皮层刺激方法同右侧。

三、腰膨大脊髓缝隙连接的变化^[5]

大鼠在各个时相点行过度麻醉,经主动脉灌注 0.1 M 的 PBS 后,用 4% 多聚甲醛灌注固定,取出腰膨大并行后固定过夜,用 30% 高渗蔗糖冷藏保存。连续冰冻切片,具体操作按 SABC 试剂盒使用说明书进行。切片置于经赖氨酸处理的载玻片上,将冰冻切片放入纯甲醇(含 0.5% H_2O_2)中,室温浸泡 30 min,蒸馏水冲洗 3 次。用 0.1% Triton 处理 30 ~ 60 min 后于蒸馏水中冲洗。正常血清封闭(室温 20 min)后,滴加 1:100 稀释的 Cx32 山羊多克隆抗体(美国 Santa 公司产),室温 60 min 后过夜(4℃)。滴加 1:100 生物素化山羊抗兔 IgG,随后用 SABC-FITC (20 min, 室温)冲洗,封片剂封片。荧光显微镜观察, Cx32 阳性细胞发出黄绿色光。SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

四、病理观察

灌注固定后,取出脊髓组织,常规制样,HE 染色,光镜下观察大脑和脊髓的病理改变。

五、统计学方法

所有数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析及配对 t 检验进行统计学分析。

结 果

一、神经症状

大鼠内囊出血致肌痉挛模型制备成功后,待动物清醒后 2 h,所有动物均发生了 2 级以上的偏瘫,但在以后的时相大鼠偏瘫体征多基本恢复正常水平。

二、实验性大鼠脑损伤后 MEP 波幅的变化

大鼠右侧内囊出血后,左、右侧 MEP 波幅差异有显著性($P < 0.01$),脑出血后 7 d 和 14 d 右侧 MEP 波

幅分别低于左侧同时相点 MEP 波幅($P < 0.01$, $P < 0.01$)。脑出血 7 d 和 14 d,右侧 MEP 波幅明显降低,与出血前比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$, $P < 0.01$)。左侧 MEP 波幅在出血前、后各个时相点差异无显著性意义($P > 0.05$)。详见图 1。

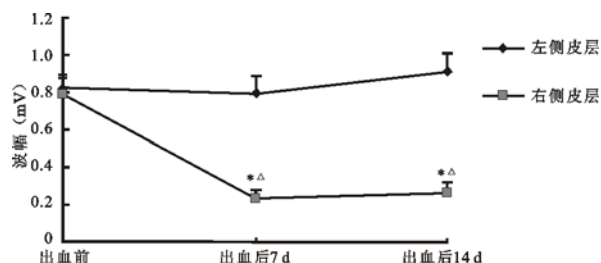


图1 脑损伤后 MEP 波幅的变化

* 与左侧同时相点 MEP 波幅比较, $P < 0.01$; Δ 与出血前比较, $P < 0.01$

三、实验性大鼠脑损伤后 MEP 潜伏时变化

大鼠脑出血后 MEP 潜伏时右侧较左侧明显延长,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。两组间出血后 7 d,右侧皮层 MEP 潜伏时就显著延长,与出血前比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$),伤后第 7 天明显升高,达(18.78 ± 3.25) ms,第 2 周潜伏时延长更显著,与出血前比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。详见图 2。

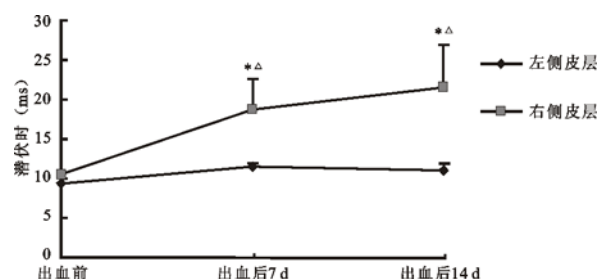


图2 损伤后 MEP 潜伏时的变化

* 与左侧同时相点 MEP 潜伏时比较, $P < 0.01$; Δ 与出血前比较, $P < 0.01$

四、大鼠脊髓腰膨大缝隙连接的变化

出血后 1 周,大鼠脑出血后脊髓灰质缝隙连接 Cx32 的表达变化,荧光显微镜下观察到:左侧脊髓灰质 Cx32 的表达明显, Cx32 阳性表达细胞数目较多,细胞大小不等,表现为圆形、椭圆形、三角形等,其中较小的细胞除了小的神经元外,可能还有部分少突胶质细胞也表达了 Cx32(许多研究证实 Cx32 可以表达在神经元和少突胶质细胞)。而且多分布于脊髓灰质中间带到后角的区带,而脊髓前角几乎没有观察到 Cx32 的表达。右侧脊髓灰质没有观察到 Cx32 的表达。脑出血后 2 周仍可明显观察到 Cx32 在左侧脊髓灰质中的表达,右侧仍然未能观察到,其分布特点没有明显变

化。详见图 3~5。

五、病理改变

脑出血后早期可见血肿明显的占位效应,晚期可见部分形成囊腔,胶质细胞增生明显。脊髓灰质前角、后角等未观察到明显的病理变化。

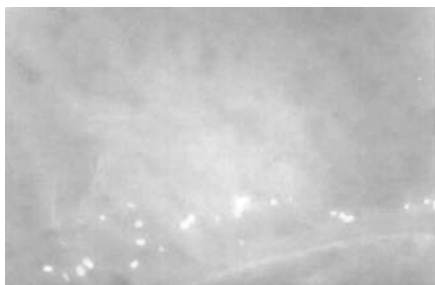


图 3 脑出血后 1 周,左侧腰膨大脊髓后角灰质表达 Cx32 的细胞,细胞外形大小不等,呈三角形、圆形、椭圆形 (SABC 法, $\times 200$)



图 4 脑出血后 2 周,左侧脊髓腰膨大灰质表达 Cx32 细胞 (SABC 法, $\times 200$)



图 5 脑出血后 1 周,脊髓灰质表达 Cx32 神经细胞,细胞形态相差较大,部分小的细胞可能为少突胶质细胞 (SABC 法, $\times 400$)

讨 论

MEP 的传导路径主要是皮质脊髓束,其潜伏期的长短反映神经传导速度,波幅可反映放电运动神经元的数量^[2]。MEP 由一组不同极性的波组成,其潜伏期和波幅各不相同。通常第一个波叫 D 波或直接波,呈单个的正相波,它的潜伏期较短,是皮层运动区第 V 层锥体细胞的轴突始段兴奋的结果,其传导不经过突触传递。D 波之后的一系列波称为 I 波或间接波,需要联络纤维的传递,潜伏期长。本实验

破坏了锥体束,一方面不能使 D 波单独地致脊髓前角细胞去极化,另一方面锥体束损伤仅剩余神经元产生的 D 波和 I 波使脊髓前角细胞达到阈值,且传导能力下降了^[6]。因而在脑出血后,内囊损伤侧 MEP 波幅显著降低伴潜伏期延长,这支持内囊出血后皮质脊髓束的损伤,不仅是传导束结构的损害,同时其电生理学特性也发生了改变。

缝隙连接是由一对六个连接蛋白形成的细胞间的两个连接子组成的中空亲水性电突触^[7,8]。实验中观察到内囊出血后 1 周和 2 周时,内囊出血对侧脊髓灰质细胞缝隙连接蛋白 Cx32 的表达明显增加,而脑出血同侧脊髓灰质中未能观察到 Cx32 的表达。这可能是皮质脊髓束对脊髓灰质中细胞缝隙连接具有直接或间接的调节作用,相反损伤的传导通路同侧脊髓灰质中没有观察到 Cx32 的表达,这显然与上神经元的支配路径有一定关系,也决定了脊髓灰质中 Cx32 的表达区域和范围。内囊损伤后对侧脊髓神经元和少突胶质细胞均可表达 Cx32,很可能提示皮质脊髓束不仅对神经元缝隙连接起调节作用,同时也影响少突胶质细胞的缝隙连接,而少突胶质细胞对于神经传导的影响是很突出的,是否影响了少突胶质细胞缝隙连接的通讯,间接改变神经的传导功能,这一点还需要进一步证明。

大鼠皮质脊髓束位于脊髓薄束、楔束的腹侧,终止于 IV、VII 板层(大鼠一般缺乏第 VI 板层),同时也终止于脊髓后角初级传入纤维和感觉中继神经元而控制着感觉功能。红核脊髓束与皮质脊髓束在脊髓中行走一致,其脊髓中的终止部位相似,因此有人将它看成是非直接的皮质脊髓束,皮质脊髓束启动运动,红核脊髓束则纠正运动中出现的错误^[9]。皮质脊髓束有抑制脊髓牵张反射的作用,其损害后引起牵张反射亢进的机制与脊髓 γ -环的活跃有关,神经元缝隙连接的作用主要包括使神经元活动快速同步化,在神经元间交换第二信使^[2],这可能引起 γ 神经元兴奋性升高,使梭内肌纤维张力升高, Ia 传入纤维冲动传入增加,导致牵张反射亢进、肌张力增加。同时 α 运动神经元兴奋性也有不同程度的增加。电突触在早期的神经发育和神经损伤后均有明显的表达^[6,10],这与细胞间的信息流有着密切的关系,如星形细胞钙波的远距离扩散、引起生物电磁场的改变,无疑对于神经的发育有着重要影响。而对神经损伤的早期缝隙连接的表达而言,一方面有利于缓冲有害因素,同时由于有害因素的扩散,使得处于濒死的细胞损伤进一步加重,加速了继发性损伤,这种改变是否有利于再生信号的诱导,目前尚未见文献报道;而且由于电突触的作用,使细胞网络群的生物电特

性发生了改变,这很可能是脊髓中间神经元兴奋性升高,介导了脊髓前角运动神经元,特别是 γ 运动神经元环路兴奋性增高,引起脊髓牵张反射亢进。

综上所述,大鼠脑内囊出血后运动传导通路的运动诱发电位改变的同时,引起相应的运动传导通路所支配的脊髓灰质中细胞表达 Cx32 的明显增加,使脊髓灰质中细胞缝隙连接电通讯改变,有可能是皮质脊髓束损害后脊髓 γ 环功能亢进的重要原因;内囊损害后,运动诱发电位的改变可能影响了上级神经元递质的释放,从而促进了脊髓灰质中细胞缝隙连接 Cx32 表达的增加。所有这些,尚需要进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Wang RY. Effect of proprioceptive neuromuscular facilitation treatment on gait in patient with hemiplegia of different durations. *Phys Ther*, 1994, 74:1106-1115.
- 2 李书林. 实验性大鼠脑出血后运动诱发电位和内囊区血流量的改变. *中国临床康复*, 2002, 6:2536-2537.
- 3 Yu K, Rong W, Li J, et al. Neurophysiological evidence of spared up-

- per motor conduction fibers in clinically complete spinal cord injury: discomplete SCI in rats. *J Neurol Sci*, 2001, 189:23-36.
- 4 余科伟,李家顺,贾连顺,等. 大鼠电刺激运动诱发电位的起源及传导规律的研究. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8:802-804.
- 5 Solomon IC, Halat TJ, El-Maghrabi MR, et al. Localization of connexin26 and connexin32 in putative CO(2)-chemosensitive brainstem regions in rat. *Respir Physiol*, 2001, 129:101-121.
- 6 余国平,曾起龙. 运动诱发电位的研究进展. *中华物理医学杂志*, 1995, 17:50-52.
- 7 Kandel ER, Siegelbaum SA. Overview of synaptic transmission (Part III). In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Principles of Neural Science*. 4th ed. Peking: Science Press, 2001. 175-186.
- 8 Froes MM, Menezes JR. Coupled heterocellular arrays in the brain. *Neurochem Int*, 2002, 41:367-375.
- 9 Afifi AK, Bergman RA. *Functional neuroanatomy · text and atlas*. Xi'an: Xi'an World Publishing Corporation and McGraw-Hill, 1998. 59-90.
- 10 Leung DS, Unsicker K, Reuss. Expression and developmental regulation of gap junction connexins cx26, cx32, cx43, cx45 in the rat mid-brain-floor. *Int J Dev Neurosci*, 2002, 20:63-75.

(收稿日期:2002-09-30)

(本文编辑:熊芝兰)

· 病例报道 ·

半导体激光鼻腔内照射对持续性植物状态的治疗价值 ——附 1 例报告

肖学长 褚晓凡 郭毅 董加政 苏晓琳 周次雄 索萍

持续性植物状态(persistent vegetative state, PVS)的治疗是当今神经康复领域的棘手问题,虽然已有很多治疗尝试,但由于 PVS 时的病理变化极为复杂,至今尚无明确有效的方法。最近我们尝试采用低强度半导体激光鼻腔内照射(laser irradiation in nasal cavity, LINC)治疗 1 例重度颅脑外伤致 PVS 患者,取得了意想不到的效果,现报道如下。

病例和方法

一、临床资料

患者詹某某,女,22 岁,某大学学生。患者于 2001 年 8 月 23 日因车祸致头部外伤,当时即昏迷。急送北京大学深圳医院,做头颅 CT 示右额颞部硬膜下血肿,急诊行血肿清除术。术后第 2 天原发血肿部位再次出现硬膜下血肿,行第 2 次手术治疗。9 月 1 日复查头颅 CT 示脑积水,遂做脑积水脑室-腹腔分流术,术后止血、抗炎、护脑治疗。2001 年 10 月 25 日入院深圳市人民医院颅脑外科。入院时情况:持续昏迷,右额颞部见手术伤口,无自主运动,生命体征稳定,四肢腱反射活跃, Glasgow 昏迷量表(GCS)评分 6 分,给予高压氧等治疗。2001 年 12

月 19 日行右额颞颅骨残损修补术。2002 年 4 月 25 日转住神经内科行康复治疗。

转入时情况:神志不清呈浅昏迷状态,角膜反射存在,睫毛征(+),瞳孔等大,圆形,对光反射存在,双上肢肌力 2~3 级。双下肢肌力 2 级。肌张力增高,腱反射亢进,右下肢 Babinski 征(±),脑电图示两侧不对称,左侧各导联呈 9~9.5 c/s 10~30 mV α 节律,见低波幅 β 活动,偶见 θ 波活动;右侧各导联呈 10 c/s 3~5 mV α 活动并夹杂有较多的 θ 波或 θ 活动,可见较多 15~30 c/s 5~10 mV β 活动;视反应、过度换气均不能配合。提示脑电图异常。

转入时临床评价:昏迷量表评分 7 分;Rancho Los Amigos (RLA)认知评级^[1] II 级;脑 SPECT 评价(2002 年 4 月 29 日)见右侧额叶、顶叶、颞叶皮质、丘脑、基底神经节脑供血严重障碍,脑细胞功能严重受损(见图 1);半导体激光鼻腔内血液照射(功率 4.0 mW)30 min 后复查即时效应,可见右侧额叶、顶叶、颞叶皮质、丘脑、基底神经节等上述部位部分脑血供恢复;神经传导检查示双侧腓神经、左胫神经运动传导功能严重受损;左侧腓肠神经、腓浅神经感觉传导功能严重受损;脑干听觉诱发电位(BAEP)检查提示,听觉传导通路左侧外周至脑干段功能轻度受损,右侧功能大致正常;双侧上、下肢 SEP 检查提示,躯体感觉传导通路左侧皮层功能严重受损,右侧功能部分受损。

作者单位:518020 深圳,深圳市人民医院(暨南大学医学院二附院)神经内科