

文章编号: 0258-7025(2009)11-3084-05

激光照射对急性脊髓损伤后脊髓再生的促进作用

王哲¹ 夏雷¹ 龚凯¹ 刘飞² 王健² 徐新智¹ 罗卓荆¹

(¹ 第四军医大学西京骨科医院, 陕西 西安 710032)
(² 第四军医大学神经生物研究所, 陕西 西安 710032)

摘要 建立大鼠皮质脊髓背侧束全横断模型,利用弱激光照射脊髓受损部位的皮肤,观察激光照射对急性脊髓损伤后脊髓再生的促进作用。30 只 SD 大鼠,随机分成对照组和照射组。照射组:急性皮质脊髓背侧束全横断后 15 min 进行连续 14 d 采用弱激光照射脊髓受损部位的皮肤。对照组:急性皮质脊髓背侧束全横断后未行弱激光经皮照射治疗。术后两组分别于第 3,7,14 d 分别取材,用苏木精-伊红染色法(HE)染色和免疫荧光标记染色观察。实验发现,脊髓损伤后 14 d,照射组的空洞及瘢痕形成面积小于对照组,有统计学差异($p < 0.05$);对照神经胶质酸性组蛋白(GFAP)和硫酸软骨素(CS)表达强烈分布紧密,照射组 GFAP 和 CS56 表达达微弱且分布稀疏;对照组少量神经微丝蛋白(NF)在损伤区周围,神经生长相关蛋白(GAP43)形态肿大变形分布紊乱,照射组大量成纤维丝状的 NF 分布在损伤区周围,并与 GAP43 相伴行。结果表明,脊髓损伤急性期采用弱激光照射脊髓受损部位的皮肤,可减少脊髓损伤后空洞形成,并促进轴突再生。

关键词 医用光学;弱激光照射;脊髓损伤;胶质瘢痕

中图分类号 R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093611.3084

Positive Effect of Low Power Laser Irradiation on Neuron Regeneration after Acute Spinal Cord Injury

Wang Zhe¹ Xia Lei¹ Gong Kai¹ Liu Fei² Wang Jian² Xu Xinzhi¹ Luo Zhuojing¹

(¹ Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)
(² Institute of Neurobiology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract This study designed to establish a complete transaction of dorsal corticospinal tract SD rat model and discuss about the effect of low power laser irradiation on neuron regeneration after acute spinal cord jury. 30 SD rats were equally and randomly divided into two groups. Complete transaction of dorsal corticospinal tract was done to each rat. Then, irradiation group was undertaken local consecutive low power laser irradiation 15min after surgery and lasted for 14 days. Compared to irradiation group, there was no postoperative irradiation after surgery in control group. After infusion, 1 cm length of spinal cord, which was above and below T₈ level, were extracted on the 3rd, 7th and 14th day after surgery. Hematoxylin and eosin stain and immunofluorescence stain were use for evaluation. At two weeks after surgery, the value of gial scar area was less than that of control group with statistically significant differences. There was intensive expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Chondroitin Sulfate (CS56) around the injury area in control while sparsate distribution of GFAP and CS56 was found in irradiation group. An amount of fibriform Neurofilament (NF) expression associated with regularly Growth Associated Protein 43 (GAP43) expression were located around the injury area, However, scrambled and slight GAP43 and NF expression were found in control. The result of our study showed that low power laser irradiation can improve regenerate of axon and decrease formation of gial scar area during the acute stage of spinal cord injury.

Key words medical optics; low power laser irradiation; spinal cord injury; gial scar

收稿日期:2009-06-22;收到修改稿日期:2009-09-22

基金项目:陕西省社发攻关基金(2006k12-G3(9))资助项目。

作者简介:王哲(1969—),男,博士,副教授,主要从事脊柱脊髓损伤方面的研究。E-mail:wangzhe@fmmu.edu.cn

1 引言

由于弱激光具有减轻病理损伤并无创性促进组织修复的特性效应,在临床治疗中已得到广泛应用。在以往的研究中发现,应用低能量氮-氛激光照射家兔脊髓的相应节段的皮肤,刺激外周神经损伤修复可促进家兔脊髓运动神经细胞功能,加快外周神经轴突的再生速度^[1,2]。但目前对弱激光治疗脊髓损伤的生物效应并不十分清楚^[3],为此本实验采用急性皮质脊髓背侧束全横断的大鼠模型^[4],观察弱激光照射脊髓损伤区皮肤对急性脊髓损伤后胶质瘢痕形成的影响,为临床应用弱激光进行无创性辅助治疗急性脊髓损伤提供参考。

2 材料和方法

2.1 材料

正常成年雄性SD大鼠30只,体重200~250g,由第四军医大学实验动物中心提供。星形胶质细胞标记物神经胶质酸性组蛋白(GFAP)抗体,生长相关蛋白标记物神经生长相关蛋白(GAP43)抗体,神经纤维丝标记物神经微丝蛋白(NF)及硫酸软骨素(CS)蛋白多糖标记物CS-56抗体,均购自Sigma公司。荧光二抗Alexa Fluor 488标记的羊抗兔IgG和Texas Red标记的羊抗鼠IgG购自Molecular Probes公司。AGE-200I型弱激光治疗仪由第四军医大学生物医学工程系提供。

2.2 方法

2.2.1 动物分组和脊髓损伤模型的建立

随机分为两组。照射组:急性皮质脊髓背侧束全横断后15 min进行弱激光照射脊髓损伤区皮肤,照射时间50min/d持续天数14 d;对照组:急性皮质脊髓背侧束全横断后未行弱激光照射治疗。选取第3,7,14 d作为观察时间点,每个时间点两组各5只。

脊髓损伤模型的建立:质量分数为1%的戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉后俯卧位固定,后正中切口,以T₈棘突为中心长约3 cm;切开皮肤,紧贴棘突骨面纵行剪开椎旁肌,显露T_{6~10}椎板、棘突,分离T₈两侧肋横关节并剪开T₈两侧上关节突,在椎管内紧贴椎板与脊髓平行进剪,将T₈两侧椎弓根剪断,显露T₈节段脊髓。纵向剪开硬脊膜和蛛网膜,用虹膜剪横断脊髓背侧约1.5 mm(剪刀刃上预先做好标记),逐层缝合伤口并记录手术结束时间。术后动物注意保温20~23℃,人工辅助排尿,一天2次,直至排尿功能恢复。

2.2.2 弱激光治疗

脊髓背侧束横断约15 min后行弱激光照射脊髓受损部位的皮肤,连续照射14 d(波长810 nm,功率150 mW,50 min/d),光斑大小约为0.3 cm²,集中在损伤区域的皮肤^[5](T₈体表投影为中心)。除首次照射外,在进行弱激光照射前,实验大鼠被轻微麻醉(质量分数为1%的戊巴比妥钠腹腔注射,30 mg/kg)并且放在保温毯上,所有的激光照射都在暗室中进行。

2.2.3 观察项目及评定指标

于各时间点分别灌注取材。戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射,麻醉后开胸,输液管经左心室插入主动脉内,生理盐水快速灌注150 mL,4℃多聚甲醛(40 g/L)快速灌注200 mL,缓慢滴注300 mL,持续1.5~2.0 h,取材范围为以T₈为中心上下各1 cm段脊髓,浸入质量分数为30%的蔗糖液4℃过夜。冰冻切片机连续切片,片厚20 μm,光镜下观察脊髓损伤大体情况。舍弃头尾段正常脊髓切片,间隔80 μm随机取10张切片,其中5张行苏木精-伊红染色法(HE)染色,5张行免疫组织荧光染色,观察NF和GAP43免疫双标荧光染色,CS56和GFAP荧光染色。

使用Photoshop10.0测量损伤区面积,并采用SPSS11.0统计软件包进行统计学处理,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 p 值表示统计学的差异, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HE染色

大鼠急性皮质脊髓背侧束全横断后,48 h内为出血期;3~7 d为急性期,出血逐渐吸收,同时以损伤处为中心,灰质大部分崩解,残存部分白质开始形成空洞及瘢痕组织,但与周围分界尚不清楚;14 d时出血已经基本吸收,周围残存白质进一步减少,空洞及瘢痕组织明显形成。结果显示各时间点上,照射组空洞及瘢痕面积均小于对照组,如图1,表1所示。

表1 不同时间点两组脊髓损伤区空洞及瘢痕形成面积比较

Table 1 Comparison of glial scar and cavity area between the two groups at different time points after surgery

Group	3 d	7 d	14 d
Control /cm ²	1.50±0.24	1.86±0.45	2.01±0.33
Irradiation /cm ²	0.85±0.01*	1.05±0.30*	1.28±0.01*

* $p < 0.05$ irradiation group versus control.

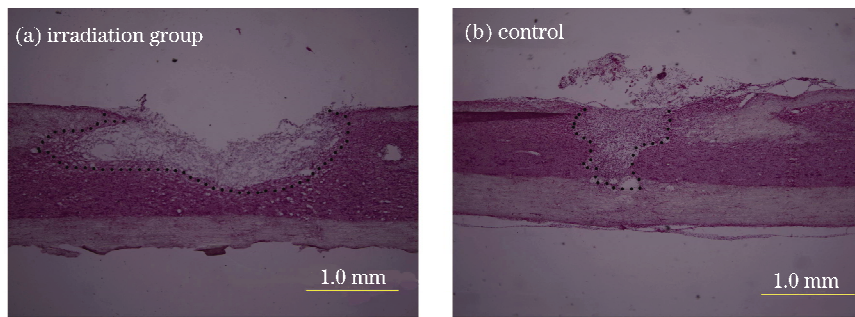


图 1 脊髓损伤 14 d 后 HE 染色

Fig. 1 HE stain of the spinal cord 14 days after surgery

3.2 免疫荧光染色

大鼠急性皮质脊髓背侧束全横断后 3, 7, 14 d CS56 与 GFAP 双标染色结果显示: 对照组空洞及周围可见 CS56 和 GFAP 密布表达且信号强度高, 形成明显屏障, 并随时间推移表达加强; 照射组空洞及周围可见 CS56 和 GFAP 分布稀疏且表达微弱, 无明显屏障形成, 各时间点间无明显差异, 如图 2 所

示。脊髓损伤后 3, 7, 14 d NF 和 GAP43 双标染色结果显示: 对照组空洞内区域 NF 呈短棒状稀疏分布, GAP43 分布区域与 NF 无明显一致性, 且表达较弱; 照射组空洞内区域可见 NF 及 GAP43 均呈明显细长的神经纤维丝状密布表达, 表达分布区域基本一致, 部分神经纤维样结构穿越空洞区域, 如图 3 所示。

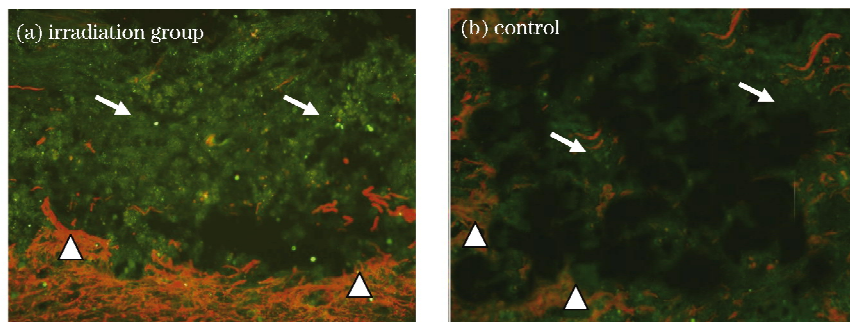


图 2 脊髓损伤 14 d 后损伤区周围 CS56(三角形)及 GFAP(箭头)分布情况

Fig. 2 Distribution of CS56 (triangle) and GFAP (arrow) around the injury area

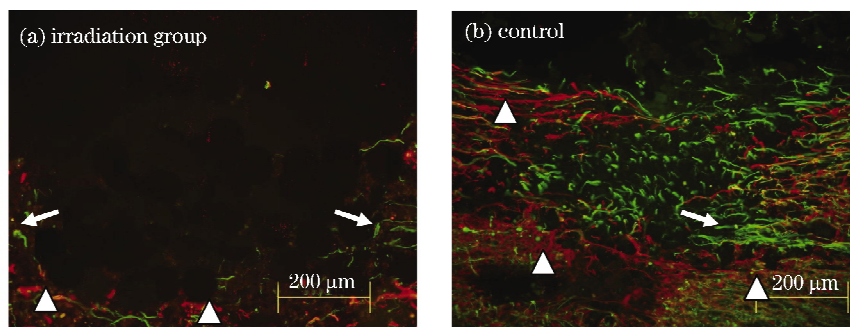


图 3 脊髓损伤 14 d 后损伤区周围 NF(三角形)和 GAP43(箭头)分布情况

Fig. 3 Distribution of NF (triangle) and GAP43 (arrow) around the injury area

4 讨 论

研究表明, 脊髓损伤后 65% 以上患者的脊髓在解剖学上是连续的。但脊髓原发损伤后引发的继发性损伤, 加重了损伤程度, 扩展了损伤范围, 是导致

残余神经通路丧失功能, 神经功能不可逆性损害乃至截瘫的重要原因^[6]。因此, 如何在脊髓损伤早期实施干预治疗, 减轻继发性损伤程度, 尽可能地保护残余神经束路的功能, 改善损伤的微环境, 促进神经

元的轴突再生^[7],成为研究脊髓损伤治疗策略中首要的关键环节。

弱激光对生物组织有多方面的刺激作用,能够促进免疫反应、增强巨噬细胞吞噬功能、改善全身状况^[8];能影响神经电生理活动和神经损伤后再生过程^[9];能促进软骨组织和骨组织愈合^[10];改善血液流变学性质,促进组织微循环^[11]。近年来,针对弱激光对组织损伤修复作用的研究也逐渐增多,低能激光照射能明显减轻创伤后炎症,调节炎性介质分泌及炎性细胞运动^[12]。He-Ne 激光能抑制 I 型前胶原基因合成,并通过诱导 G0/G1 期细胞停滞和细胞凋亡继而抑制体外培养的瘢痕成纤维细胞生长^[13]。对挫伤后的大鼠坐骨神经给予局部透皮低能 He-Ne 激光照射后,损伤神经可出现 AP 值增高,局部神经血供增加,再生轴索增长,瘢痕形成减少^[14]。较之周围神经损伤,胶质瘢痕的大量形成及屏障是阻碍中枢神经损伤后轴突再生的主要原因之一。这些研究结果都提示,于脊髓损伤早期(急性期)使用弱激光照射,可能会有效减少继发性炎症反应和瘢痕形成,继而促进轴突再生功能恢复。

实验研究结果发现,波长 810 nm,功率为 150 mW 弱激光经皮照射皮质脊髓背侧束全横断大鼠 14 d,照射组脊髓空洞及瘢痕面积明显减少,形态观察结果一定程度上证实了弱激光早期应用可有效减少继发性损伤。脊髓急性损伤后主要依靠小胶质细胞和星形胶质细胞清除碎片,大量的碎片难以清除成为损伤区不断扩大的一个重要原因^[7]。而弱激光^[5]可加速 TGF- β ,干扰素 γ (IFN- γ)等细胞因子的释放,加强炎性细胞的趋化及其吞噬功能。实验还观察到,照射组 14 d 后损伤区域及周围 CS56 和 GFAP 表达微弱且分布稀疏,未形成完整的屏障作用,而对照组则有明显胶质瘢痕形成。同时大量成纤维丝状的 NF 规律分布在损伤区及周围,与 GAP43 相伴行,并显示部分新生神经纤维丝通过损伤区域。在中枢神经损伤修复中,微环境是影响轴突生长的主要因素之一,其中把胶质化控制在一个理想的水平则是关键。实验结果初步证明了弱激光照射后损伤区域局部神经再生阻碍因素^[15]GFAP 及 CS56 减少而再生促进因素 GAP43 增加,并同时观察到神经轴突规律再生,穿过空洞区域。上述结果也提示弱激光的生物刺激性同样有利于脊髓损伤及修复。但是不同于皮肤等部位瘢痕形成,中枢系统损伤后,形成继发性网络调节,内环境更为复杂,弱激光的相应具体生物学机制有待进一步研究及

阐明。

5 结 论

采用 810 nm,150 mW 弱激光早期照射皮质脊髓背侧束全横断大鼠相应节段的皮肤,可减少大鼠脊髓空洞及胶质瘢痕形成,并促进轴突再生。但具体生物学机制尚不清楚。拟于下一步以此模型为基础,进行损伤大鼠弱激光治疗后功能恢复与神经束路追踪方面研究,以期为临床上脊髓损伤提供一种潜在的、新型无创、有效的早期辅助治疗手段。

参 考 文 献

- 1 Shi Kaijun, Lü Rong, Xu Xinzhi *et al.*. Influence of low energy He Ne laser on spinal motor nerve cell [J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 1997, 11(1):10~13
石凯军,吕 荣,徐新智等. 低能量氦-氖激光对脊髓运动神经细胞的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 1997, 11(1):10~13
- 2 Xu Xinzhi, Lü Rong, Shi Kaijun *et al.*. Electrophysiological study of low energy He-Ne laser on regeneration of peripheral nerve [J]. *Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2001, 23(5):291~293
徐新智,吕 荣,石凯军等. 低能量氦氖激光对周围神经再生的电生理研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23(5):291~293
- 3 J. C. Furlan, M. G. Fehlings. A web-based systematic review on traumatic spinal cord injury comparing the "Citation Classics" with the consumers' perspectives [J]. *Neurotrauma*, 2006, 23(2):156~169
- 4 F. Liu, S. W. You, L. P. Yao *et al.*. Secondary degeneration reduced by inosine after spinal cord injury in rats [J]. *Spinal Cord*, 2006, 44(7):421~426
- 5 K. R. Byrnes, R. W. Waynant, I. K. Ilev *et al.*. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2005, 36(3):171~185
- 6 C. Boldin, J. Raith, F. Fankhauser *et al.*. Predicting neurologic recovery in cervical spinal cord injury with postoperative MR imaging [J]. *Spine*, 2006, 31(5):554~559
- 7 S. Xiang, W. Pan, A. J. Kastin. Strategies to create a regenerating environment for the injured spinal cord [J]. *Curr. Pharm Des.*, 2005, 11(10):1267~1277
- 8 E. Mester. The biomedical effect of laser application [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1985, 5:31~39
- 9 Qiao Xiaoyan, Li Gang, He Bingjun *et al.*. Effects of low level laser Irradiation on delayed rectifier potassium current in neuron membrane [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, 33(9):1288~1293
乔晓艳,李 刚,贺秉军等. 弱激光对神经细胞膜延迟整流钾通道电流特性的影响[J]. *中国激光*, 2006, 33(9):1288~1293
- 10 Yang Xiaohong, Liu Chengyi, Liu Shaojie *et al.*. Photobiomodulation on chondrocyte proliferation; in vitro evaluation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, 33(12):1692~1698
杨小红,刘承宜,刘少杰等. 软骨细胞光生物调节作用的体外实验[J]. *中国激光*, 2006, 33(12):1692~1698
- 11 Xu Feng, Hu Lin, Wang Xianwei *et al.*. Effects of low power laser irradiation on human's red blood cell [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, 35(6):957~960
许 锋,胡 林,王现伟等. 低强度激光照射对离体人红细胞的影响[J]. *中国激光*, 2008, 35(6):957~960
- 12 J. Ty Hopkins, Todd A. McLoda, Jeff G. Seegmiller *et al.*.

- Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans; a triple-blind, sham-controlled study [J]. *Journal of Athletic Training*, 2004, **39**(3);223~ 229
- 13 K. Gaida, R. Koller, C. Isler *et al.*. Frey M low level laser therapy—a conservative approach to the burn scar? [J]. *Burns*, 2004, **30**(4);362~367
- 14 S. Rochkind, G. E. Ouaknine. New trend in neuroscience; low power laser effect on peripheral and central nervous system [J]. *Neurol Res.*, 1992, **14**(1);2~11
- 15 L. W. Yick, P. T. Cheung, K. F. So *et al.*. Axonal regeneration of clarkes neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC [J]. *Exp. Neurol.*, 2003, **18**(2);160~168