

高渗糖溶液鞘内注射对大鼠神经病理和生理的影响

郑良杰, 肖昕, 李渚扬, 黄丽衡, 张长椿

摘要:目的 观测高渗糖溶液鞘内用药对大鼠行为学以及对大鼠背根神经节病理结构的影响。方法 70只成年SD大鼠,制作鞘内置管模型,72h后行为学观察无神经损伤者随机分成3组,分别鞘内注射NS(Normal saline),5%GS(Glucose solution),10%GS。用平行学实验和体重变化观察高渗糖溶液对大鼠的行为学影响;每组大鼠按鞘内注药后2h、24h、48h和72h分别处死并分离L4-5节段背根神经节,光镜及电镜下观察细胞结构随着时间变化和糖浓度变化的改变。结果 63只大鼠进入最终结果分析。给药后所有大鼠均未出现行为学方面的神经损伤表现。背根神经节损伤以鞘内注射葡萄糖溶液后2h-24h表现最明显,符合细胞凋亡的特点,且10%GS组的神经损伤重于5%GS组。48h-72h后神经损伤的病理表现有所减轻,甚至消失。结论 高渗葡萄糖溶液有诱发大鼠背根神经节细胞凋亡、脱髓鞘的作用,并且随着葡萄糖浓度的增加,其损伤程度越显著。但未对大鼠的行为能力造成影响。

关键词: 高渗糖溶液,鞘内注射,神经病理,生理

中图分类号 R338 文献标识码 A 文章编号 1009-9727(2012)12-1446-04

Influence of high permeability glucose solution intrathecal injection on neuropathological and neurophysiological changes in rats. Zheng Liang-jie, Xiao xin, Li Zhu-yang, Huang Li-heng, Zhang chang-chun, (Department of Anesthesiology, Shantou Central Hospital, Shantou 515000, Guangdong, P. R. China,)

Abstract: Objective To investigate the influence of high permeability sugar solution on rat behavior and rat dorsal root ganglion pathology. Methods Seventy adult SD rats were put the tube under the rat spinal cord arachnoidea and observed for 72h and then 63 rats without any spinal damage were divided randomly into 3 groups including NS group, 5%GS group and 10%GS group. Horizontal wire test and the change of body weight were used to test the recovery of motor function and common situation. Each group of rats after injecting different solution into the spinal, the rats were put to death at different time points (2h, 24h, 48h and 72h). After separating the rats' dorsal root ganglions at lumbar 4-5 segments, the cell structural changes of dorsal root ganglions were observed by light microscopy and electron microscopy over time and glucose concentration change. Results All of the involved 63 rats did not appear any behavioral nerve damage performance after catheter medicine. There is no statistical significant difference among the three groups for the horizontal wire test and body weight changes. For pathological structure changes of the cell of dorsal root ganglion, the cell apoptosis was the most obvious change between 2h-24h after catheter glucose solution, especially for 10%GS group than for 5%GS group. After 48h-72h, the severity of the damage tended to reduce, and even disappear. By light microscopy, nerve damage mainly appeared as dorsal root ganglion cell shrinks, Nissl's body decreased and rarefaction and mitochondria swelling, vacuolar degeneration, crest disappeared; endoplasmic reticulum swelling expansion, lysosome increased, myelin swelling osteoporosis, or even disintegration. Conclusion The high permeability glucose solution has induced rat dorsal root ganglion cells apoptosis, and more significant damage with the increase of glucose concentration, but hasn't the influence on the behavioral changes.

Key words: Hyperglycemia, Intrathecal injection, Neuropathology, Pathology

蛛网膜下腔阻滞麻醉常可引起一种被称为短暂神经症候群(Transient neurologic symptoms, TNS)^[1]的神经病理性疼痛,是目前临床麻醉上的一个棘手的问题。目前发生TNS的发病率在4%~33%左右,原因尚不完全清楚,患者在神经系统检查、电生理检查及核磁共振中均未见异常表现。有学者推测可能由于高渗糖溶液导致中枢神经纤维脱髓鞘,从而引发麻醉并发症^[2]。本实验通过建立大鼠鞘内置管模型,选取无行为学损伤改变的置管大鼠,鞘内注射不同浓度葡萄糖溶液,进行行为学观察,并于一段时间后摘取腰4、

5节段背根神经节,采用不同染色观察背根神经节的显微病理变化,旨在探讨高渗葡萄糖溶液与TNS是否有关系,并为进一步的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 选择70只成年SD大鼠,SPF等级,体重150-190g左右。主要试剂为尼氏体染色液、PBS缓冲液、多聚甲醛、无水乙醇、二甲苯、氢氧化钠、1%戊巴比妥钠、2.5%戊二醛、石蜡、苏木素、伊红、亚甲蓝。仪器与设备包括微量进样器、病理色彩摄像头、透射电子显微镜、石蜡切片机、恒温培养箱、电子

基金项目 广东省汕头市重点科技计划项目 [No.2010]63-30)

作者单位 汕头市中心医院麻醉科 广东 汕头 51500

作者简介 郑良杰(1979~),男,汉族,广东汕头人,硕士,主治医师,研究方向:临床。

天平秤、磁力搅拌器、PH计(酸碱计)、超薄切片机、修块机、自制导管(用内径5mm的圆珠笔芯拉制成粗端直径0.6mm,细端0.2mm的变径管)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 70只SD大鼠建立鞘内置管动物模型,24h后行为学观察无神经损伤者再按随机法分成3组,分别鞘内注射0.9%NS,5%GS,10%GS。

1.2.2 行为学观察 平行线实验^[3] 术后24h,所有置管成功大鼠均参与平行线实验。将长25cm,直径为2mm棉线在距地面30cm处水平固定。提起大鼠,使其前肢攀附于棉线上。观察松手后3s大鼠是否滑落,连续3次,每次间隔5min,3次实验中均未滑落的大鼠通过实验。计数通过实验的大鼠数,处死术前未通过实验的大鼠。将通过实验的大鼠随机平分为NS组、5%GS组和10%GS组,给药后再进行上述实验,计数3组中未通过实验的大鼠数。

热缩足潜伏期(Thermal withdrawal latency, TWL)测量 按Hargreaves法^[4]用热痛刺激仪照射大鼠足底,自照射开始至大鼠出现抬腿回避的时间为TWL。每只动物测3次,每次间隔5min,取3次平均值为大鼠TWL值,连续测3d。热刺激强度在整个实验过程中保持一致,光源自动切断时间设定为25s,以防止组织过热损伤。术前2d先测定基础TWL值。

1.2.3 体重变化 NS组、5%GS组和10%GS组分别于术前及术后24h,48h和72h称重,体重增量=术后体重-术前体重。采用t检验两两对比三组大鼠术后体重增量的统计学差异。

1.2.4 病理标本制备 第1d每组随机选取10只大鼠

处死并取背根神经节,2只进行电镜染色,4只进行HE和尼克氏体染色,第2,3d每组各处死4只做HE染色和尼克氏体染色,观察病理变化。光镜标本制备:分别于术后2h、24h、48h和72h四个时段处死取材制成切片,于4%多聚甲醛灌注固定,分离背根神经节后行石蜡包埋切片,行HE染色及尼氏体染色。电镜标本制备:大鼠于鞘内给药后2h,分离背根神经节,于2.5%戊二醛灌注固定,取材制成切片。

1.3 统计学处理 应用SPSS19.0统计软件处理实验资料,所有数据资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并作两样本均数的t检验或多样本均数两两比较作q检验,以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

1.4 形态学描述 HE染色和尼氏体染色标本直接作组织形态学描述,电镜标本每个切片随机选择10个铜网孔为观察视野,以视野中出现损伤最严重的细胞作为定性标准。

2 结果

2.1 实验动物数量分析及一般情况 参加实验大鼠70只,有63只进入最后的实验结果分析。其中1只大鼠于置管时死亡,6只大鼠因为鞘内置管后出现神经损伤而弃用。所有手术动物的切口均未发生感染。

2.2 行为学观察结果 给药后三组大鼠平行线实验均无出现滑落,各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

三组大鼠TWL比较(表1):与置管前相比,三组TWL变化均有统计学意义($P < 0.05$);组间对比,术后3d各组间两两对比TWL差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 给药前后大鼠体重增量变化(表1),各组间两两对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 大鼠热缩足潜伏期和体重增量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The comparison of thermal withdrawal latency and increased weight($\bar{x} \pm s$)

| 组别 Group | 比较项目 Comparative item | 基础值 Basic value | 1d (n=63) | 2d (n=33) | 3d (n=21) |
|--------------------------|----------------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|
| NS组 (n=21) NS group | 热缩足潜伏期 | 10.6±0.8 | 17.4±1.8 | 17.6±1.5 | 17.8±1.2 |
| 5%GS组 (n=11) 5%GS group | Thermal withdrawal latency | 10.5±1.1 | 17.4±1.7 | 18.2±1.3 | 18.5±1.6 |
| 10%GS组 (n=7) 10%GS group | | 10.7±1.2 | 18.2±1.6 | 18.8±1.3 | 19.0±1.1 |
| NS组 (n=21) NS group | 体重增量 Increased weight | | 2.11±8.01 | 2.33±9.88 | 5.33±11.1 |
| 5%GS组 (n=11) 5%GS group | | | 1.89±6.38 | 2.42±6.61 | 3.00±9.36 |
| 10%GS组 (n=7) 10%GS group | | | 3.39±4.77 | 4.00±5.54 | 4.67±7.92 |

2.3 形态学结果

2.3.1 HE染色结果 图1示经HE染色,NS组给药后2h背根神经节,少量节细胞水肿,部分节细胞脱水,胞膜完整,核大而圆,核仁清楚。24h和48h无明显变化,至72h仍然可以看到背根神经节胞膜完整,核大而圆,核仁清晰。5%GS组给药后2h背根神经节,节细胞水肿数量稍有增多,脱水明显,胞膜完整,细胞质染色变浅,核膜尚清,核仁变淡,给药后24h背

根神经节,细胞脱水有所减轻,48h背根神经节细胞轻度水肿,给药后72h背根神经节细胞水肿减轻,胞膜完整,核大而圆,核仁清晰。10%GS组给药后2h背根神经节多量节细胞皱缩,但胞膜完整,嗜碱性增强,核膜尚清,核仁消失,给药后24h背根神经节可见少量节细胞皱缩,胞膜完整,给药后48h背根神经节细胞水肿较明显,胞膜依然完整,核大而圆,核仁清晰居中,给药后72h背根神经节细胞水肿有所减轻,胞膜

完整,核大而圆,核仁清晰。

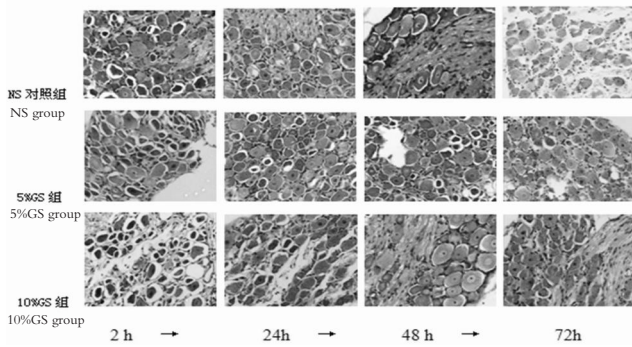


图1 三组HE染色在2h, 24h, 48h和72h 背根神经节细胞水肿情况及胞膜、核仁形态($\times 200$)

Fig 1 The change of dorsal root ganglion cell in HE stain at 2h, 24h, 48h and 72h($\times 200$)

2.3.2 尼氏体染色结果 图2示经尼氏体染色, NS组给药后2h背根神经节大多数节细胞尼氏体颗粒大,数量多,染色较深。核大而圆,核仁明显。24h, 48h至72h无明显变化,仍然可以看到背根神经节胞数量多,染色深的细胞尼氏体颗粒,大而明显的核仁。5%GS组给药后2h背根神经节部分节细胞尼氏体染色稍淡,数量减少。核大而圆,核仁明显,给药后24h, 48h和72h背根神经节尼氏体颗粒无明显变化。10%GS组给药后2h,背根神经节细胞尼氏体颗粒染色质浓缩,染色较深,尼氏体数量有所减少。核膜完整,核仁欠清;给药后24h背根神经节可见尼氏体染色较浅,数量较少。核大而圆,核仁明显;给药后72h背根神经节细胞尼氏体颗粒大,染色深,数量多。核大而圆,核仁明显。

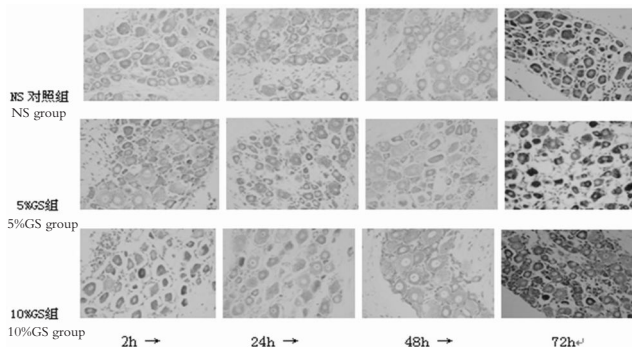


图2 三组尼氏体染色在2h, 24h, 48h和72h 背根神经节细胞水肿情况及胞膜、核仁形态($\times 400$)

Fig 2 The change of dorsal root ganglion cell in Nissl's body stain at 2h, 24h, 48h and 72h($\times 400$)

2.3.3 2h电镜染色结果 图3示经电镜染色,从图A中可看出NS对照组轻微损伤背根神经节细胞,胞膜完整,核大,核膜清晰,核仁明显,可见少量溶酶体,图B可见轻微损伤神经纤维,少部分髓鞘轻度肿胀松散,溶酶体轻度增多。图C和图D可见5%GS组中轻度

度损伤节细胞,线粒体轻度肿胀,内质网轻度肿胀,部分嵴消失,细胞核完整,溶酶体增多。图E和图F中可见5%GS组背根神经纤维轻度损伤,髓鞘轻度肿胀松散,内细胞器轻微肿胀,结构尚清,轴突少量剥离。图G中可见在10%GS组中度损伤节细胞,线粒体肿胀,空泡变性,部分内质网肿胀,核结构尚清。图H和图I中可见在10%GS组背根神经中至重度损伤神经纤维,髓鞘肿胀疏松,部分崩解,轴索皱折萎缩,内细胞器结构不清部分空泡化,溶酶体增多,可见新生髓鞘。

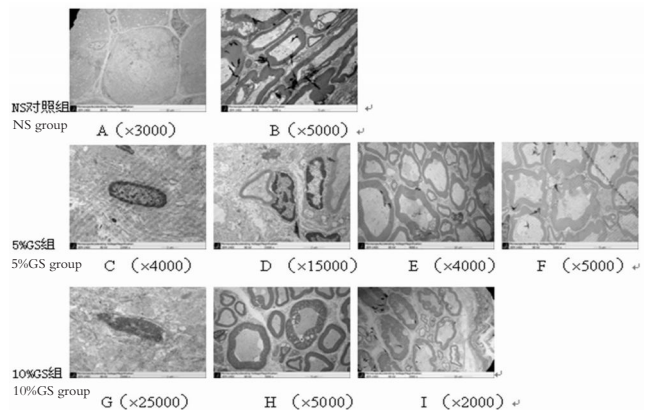


图3 三组电镜染色2h背根神经节细胞水肿情况及胞膜、核仁形态以及神经纤维形态

Fig 3 The change of dorsal root ganglion cell in electron microscopy stain at 2h, 24h, 48h and 72h

3 讨论

3.1 置管动物模型的建立 本实验采用改良Yaksh法^[5]制作大鼠鞘内置管模型,而不用经腰椎法鞘内置管,主要是该方法导管置入后不易脱出,容易固定。另外枕大池处环枕筋膜与脊髓间有一定的空隙,在此处挑开环枕筋膜不易损伤脊髓,有较大的操作空间。虽然导管在蛛网膜下腔走行距离长易造成脊髓的机械性损害而导致大鼠出现截瘫或不同程度的运动功能障碍,但只要置管材料质地柔软,大小适中,操作轻柔,神经损伤是很轻微的^[5]。本实验置管材料选用自制拉伸的聚氨酯变径导管,粗端管径0.8mm,细端管径仅0.2mm,导管细软,对大鼠脊髓的压迫作用轻微,对本实验的实验结果影响小。

3.2 高渗糖溶液对大鼠行为学方面的影响 在研究糖尿病周围神经病变的发病机制中,相关的动物实验支持高血糖的假说,在糖尿病小鼠血糖升高的第1个月,显示出感觉及运动神经元传导速度减慢与诱发痛觉过敏或异常痛觉有所进展^[6]。本实验用平行线实验、TWL的变化及体重变化来检测高渗糖溶液对大鼠行为学方面的影响。鞘内给药后63只大鼠全部通过检测,说明5%GS和10%GS均不引起大鼠神经损伤

的行为学表现。鞘内置管后所有大鼠的TWL均明显延长,与术前的基础值相比,差异有统计学意义,说明置管操作的神经损伤作用。而鞘内给药后大鼠的TWL值与给药前相比差异无统计学意义,即5%GS和10%GS未表现出导致大鼠痛觉异常的作用。体重增量的变化各组间不具有统计学意义反映大鼠摄食行为不受影响。

对于上述行为学的实验结果,我们分析认为可能有以下原因:1)葡萄糖溶液在脑脊液中的代谢快,高渗糖溶液作用于背根神经元的时间比较短,损伤尚不足以表现在行为学上的改变;2)实验的葡萄糖溶液本身浓度并不非常高,加上在体试验,葡萄糖液注入到蛛网膜下腔,经脑脊液稀释后浓度进一步减低,对背根神经元的损伤亦有所减轻。

3.3 高渗糖溶液对大鼠背根神经节形态学方面的影响 众多研究^[6-8]发现神经元暴露在高糖状态2h即可产生明显的氧化应激反应,并启动细胞的程序化死亡即细胞凋亡。凋亡早期是细胞核结构的改变,核染色质浓缩,核仁消失是其中最早的表现之一,接着核膜不完整或者消失,细胞质广泛空泡化,线粒体肿胀,内质网扩张,溶酶体大量增殖,最后是细胞膜皱缩、出芽,包裹细胞器形成一个个凋亡小体,被溶酶体吞噬、降解。从HE染色的结果发现,鞘内注射葡萄糖溶液后2h-24h,相比较NS对照组,5%GS组表现出轻微的神经损伤表现,而10%GS组的神经损伤较明显,主要表现多量节细胞皱缩,嗜碱性增强,核膜尚清,核仁消失,与上述描述的细胞凋亡的形态学特点相符。

本实验中观察到鞘内注入葡萄糖溶液后2h-24h,10%GS组表现出明显的尼氏体淡染,数量减少。说明高渗糖溶液可以影响背根神经元细胞蛋白质的合成。

无论是HE染色还是尼氏体染色均观察到,给予高渗糖48h-72h后神经损伤的病理表现均有所减轻,甚至消失。临床上TNS发生于蛛网膜下腔阻滞麻醉后24h内,短暂疼痛症状在5d内自行消失,大多病例均未进行药物干预。病理改变与TNS临床症状在时间及特点的表现非常一致。

电镜下观察到的超微结构变化仅仅是给药后2h,与NS对照组节细胞的轻微损伤(与置管导致的神经损伤有关)相比,5%GS组则表现为神经细胞的中度损伤,线粒体空泡化,内质网肿胀,溶酶体轻度增多。10%GS表现出重度神经细胞的损伤,线粒体广泛肿胀,空泡化,内质网肿胀扩张,溶酶体明显增多,核变小,核膜皱缩,核仁边集。以上变化均为细胞凋

亡的早期形态学变化。

神经功能的损害也与髓鞘结构的损伤息息相关,髓鞘结构的损伤使神经冲动的传送受到影响,从而导致疼痛的产生。电镜中观察到10%GS组的髓鞘肿胀更明显,甚至有部分崩解,内细胞器空泡样变性,轴突开始部分剥离,有局灶性脱髓鞘的表现。由于葡萄糖不能自由透过细胞膜,造成轴突外渗透压升高,轴突脱水,轴突内电解质浓度较轴突外相对增高。一方面使细胞内外钾离子浓度梯度增大,静息电位增大,轴突兴奋性下降;另一方面使细胞内外钠离子浓度梯度减小,轴突兴奋时产生的电位降低,从而形成小的局部电流。这几方面原因共同造成神经干传导速度减慢而导致疼痛的出现。这能够合理解释本实验中高渗糖溶液对大鼠背根神经节的损伤作用机制,但具体则需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Ren ZJ, Yu ZJ, Zhang Z, et al. Two different methods for repeated intrathecal administration in rats[J]. China Med., 2009, 4(6): 468-469. (In Chinese)
(任占杰, 于志军, 张增臻等. 大鼠鞘内反复给药两种方法的比较[J]. 中国医药. 2009, 4(6): 468-469.)
- [2] Wang B.C, Hillman D.E, Li D, et al. Lumbar subarachnoid catheterization in rats. Pharmacol Biochem Behav, 1991, 38(3): 685-688.
- [3] Fan L, Wang GL. Development of catheterization for subarachnoid space in rats[J]. J Tianjin Med University. 2005, (2): 165-167. (In Chinese)
(范隆, 王国林. 大鼠蛛网膜下腔微创置管方法[J]. 天津医科大学学报. 2005, (2): 165-167.)
- [4] Hargreaves K, Dubner R, Brawn F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. Pain. 1988, 32(1): 77-88.
- [5] Zhang LJ, Huang LH, Zhang CC. Progress in the study of method of catheter indwelling for subarachnoid space in rats [J]. J Clin Anesthesiol., 2011, 27(10): 1032-1033. (In Chinese)
(郑良杰, 黄丽衡, 张长椿. 大鼠蛛网膜下腔置管方法的研究进展[J]. 临床麻醉学杂志. 2011, 27(10): 1032-1033.)
- [6] Anitha M, Gondha C, Sutliff R, et al. GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway [J]. J Clin Invest. 2006, 116(2): 344-356
- [7] Sun Q; Liang XCh; Zhang H. Progress in the study of the effects of high glucose on dorsal root ganglion neurons in vitro [J]. Basic & Clin Med., 2011, 31(2): 214-217. (In Chinese)
(孙青, 梁晓春, 张宏. 高糖对体外培养背根神经节神经元影响的研究进展 [J]. 基础医学与临床. 2011, 31(2): 214-217.)
- [8] Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications [J]. JAMA. 2002, 288(20): 2579-2588.

收稿日期 2012-10-17 编辑 崔宜庆