文章编号:1000-5404(2006)17-1791-04

论著

大鼠坐骨神经结扎后降钙素基因相关肽的变化

郑林丰[1],谢应桂[2],许愿忠[3],张建伟[3],易西南[3],吴贤群[3],张灵芝[3] ([1]长沙民政职业技术学院,长沙 410004;[2]湘南学院基础医学部人体解剖学教研室,郴州 423000;[3]中南大学湘雅医学院人体解剖与神经生物学系,长沙 410013)

提 要:目的 研究大鼠坐骨神经结扎模型的降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)的时空变化规律,为探讨其在神经再生中的机制与作用提供实验依据。**方法** SD 大鼠随机分为假手术对照组和坐骨神经结扎组,实验组结扎后分别存活 1 d 到 28 d,免疫组化结合图像分析技术观察 CGRP 在坐骨神经、背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)、脊髓分布和含量的变化。**结果** 结扎后 1 d 坐骨神经 CGRP 大量堆积,结扎近端多于远端,随后逐渐下降,近端至 14 d 基本消失,远端至 7 d 基本消失;结扎后 7 d DRG CGRP 开始下降,21 d 达最低值,28 d 仍低于正常;结扎后 14 d 脊髓后角 CGRP 下降,但后角免疫阳性面积未见明显变化;各时间点脊髓前角 CGRP 未见明显变化。**结论** 神经结扎后 CGRP 表达变化呈现一定的时空模式,可能与靶源性神经营养因子的缺乏有密切关系。

关键词:降钙素基因相关肽;大鼠;坐骨神经;结扎
中图法分类号:R341.6; R361.2; R651.3 **文献标识码**:A

Changes of calcitonin gene-related peptide after rat sciatic nerve ligation

ZHENG Lin-feng[1], XIE Ying-gui[2], XU Yuan-zhong[3], ZHANG Jian-wei[3], YI Xi-nan[3], WU Xian-qun[3], ZHANG Ling-zhi[3] ([1]Changsha Social Work College, Changsha 410004, [2]Department of Human Anatomy, Xiangnan College, Chenzhou 423000, [3]Department of Human Anatomy & Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To study the temporo-spatial changing laws of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat model of sciatic nerve ligation. **Methods** Totally 48 Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group ($n=6$) and experimental groups which survived for 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 d respectively after sciatic nerve ligation ($n=6$ at each time point). The distribution and quantity of CGRP in sciatic nerve, dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord were detected by immunohistochemistry and image analysis methods. **Results** A large amount of CGRP piled up in the sciatic nerve at 1 d after the ligation, significantly higher in proximal segment than that in distal segment, gradually dropping till disappear basically at 14 d in proximal segment and at 7 d in distal segment. The expression of CGRP in DRG at 7 d began to drop after the ligation, at 21 d to the minimal value and at 28 d lower than normal. The CGRP-immunoreactivety in ipsilateral spinal dorsal horn at 14 d decreased after operation, but the immuno-positive areas of CGRP were of no changes. There are no changes in the CGRP-positive spinal ventral motoneurons of all groups. **Conclusion** The changes of CGRP presented a temporo-spatial pattern following peripheral nerve legation, maybe resulting from the deficiency of neurothrophins from target organs.

Key words: calcitonin gene-related peptide; rat; sciatic nerve; ligation

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)作为神经递质广泛存在于中枢和周围神经系统内。研究表明,在神经损伤后的再生过程中 CGRP 可能发挥重要的作用[1,2]。神经损伤后可导致 CGRP 的表达变化,不同类型的损伤其变化不同,且神经损伤后的变化呈现一定的时空模式[2,3]。研究也表明,来自靶器官的神经营养因子可调节 CGRP 的表达,那么机械阻断这些靶源性的营养因子后,对 CGRP 的表达有何影响?本实验利用免疫组化方法检测大鼠坐骨神经结扎后早期脊髓前后角、背根节 CGRP 表达的时空动态变化,为进一步揭示 CGRP 在周围神经损伤后再生过程中的作用及其机制提供实验依据。

作者简介:郑林丰(1978-),男,河南省郑州市人,硕士研究生,医师,主要从事周围神经损伤与修复方面的研究。电话:(0731)2650426, E-mail: zhenglinfeng04@yahoo.com.cn
通讯作者:谢应桂,电话:(0735)2653158, E-mail: xieyinggui@163.com
收稿日期:2005-10-08;修回日期:2006-01-20

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康成年SD大鼠48只(湘雅医学院实验动物中心提供),雌雄不限,体质量(200±20)g,用随机数字表随机分为假手术对照组和坐骨神经结扎组,结扎组再按存活时间分为1、3、5、7、14、21、28 d组(各组$n=6$)。

1.2 坐骨神经结扎模型制备与取材

戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(2%,40 mg/kg),无菌条件下右下肢股后部纵切口约3 cm,暴露坐骨神经,在梨状肌下1 cm处用4-0丝线穿过神经,拉紧丝线结扎,注意不要损伤神经下方的结构[4],左侧为自身对照。术后分笼饲养,分别存活1、3、5、7、14、21、28 d。假手术对照组动物切开皮肤,暴露但不结扎坐骨神经,存活7 d。处死前戊巴比妥钠深麻下经左心室向升主动脉插管快速灌注生理盐水100 ml,然后快速灌注4%多聚甲醛磷酸缓冲液150 ml,缓慢滴注150 ml持续30 min。取L4~6背根神经节(dorsal root ganglion,DRG)和相应脊髓节段,后固定2 h后浸入30%蔗糖的磷酸缓冲液中4 ℃至标本沉底。OCT胶包埋,连续恒冷冰冻切片(DRG和脊髓片厚20 μm,神经片厚10 μm)。

1.3 CGRP免疫组织化学

采用SABC法,主要步骤如下:切片入3% H_2O_2处理15 min以阻断内源性过氧化物酶,入含有0.3% Triton X-100的5% BSA室温封闭1 h;入含0.1% Triton X-100的多克隆兔抗CGRP(1∶5 000,Sigma)4 ℃冰箱过夜;生物素化羊抗兔IgG(1∶200,Vector)室温孵育2.5 h;卵白素标记的HRP复合物(1∶200,Vector)室温孵育1 h;新鲜配制的DAB显色液显色5 min。裱片,自然晾干,常规脱水、透明后封片。阴性对照用PBS代替一抗,采用上述同样操作,结果为阴性。

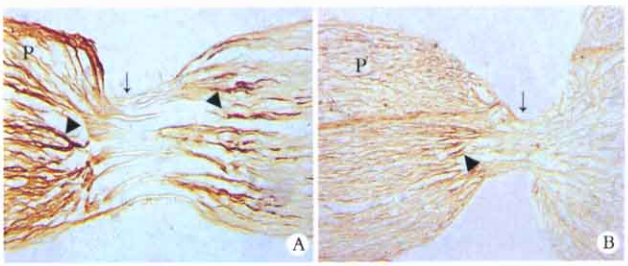
1.4 图像采集和统计学分析

每个标本随机取5张DRG、腰骶膨大段脊髓和神经切片,Motic显微镜(德国)下每张切片随机取5个高倍视野(×200),用Motic3.2图像分析软件测量坐骨神经、DRG、脊髓前后角CGRP免疫反应灰度值和脊髓后角的免疫反应阳性面积。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0软件包,各组实验数据比较用方差分析,同一标本损伤侧与对照侧比较用t检验。

2 结果

2.1 坐骨神经

对照组正常坐骨神经可见弱阳性CGRP表达。结扎后1 d,在结扎部位的近、远端CGRP免疫阳性产物大量堆积,结扎近端明显多于远端(图1 A);此后CGRP堆积逐渐减少,到结扎后7 d,结扎近端仍有阳性产物堆积,远端的堆积消失(图1 B)。14~28 d CGRP阳性产物堆积基本消失恢复到正常水平。



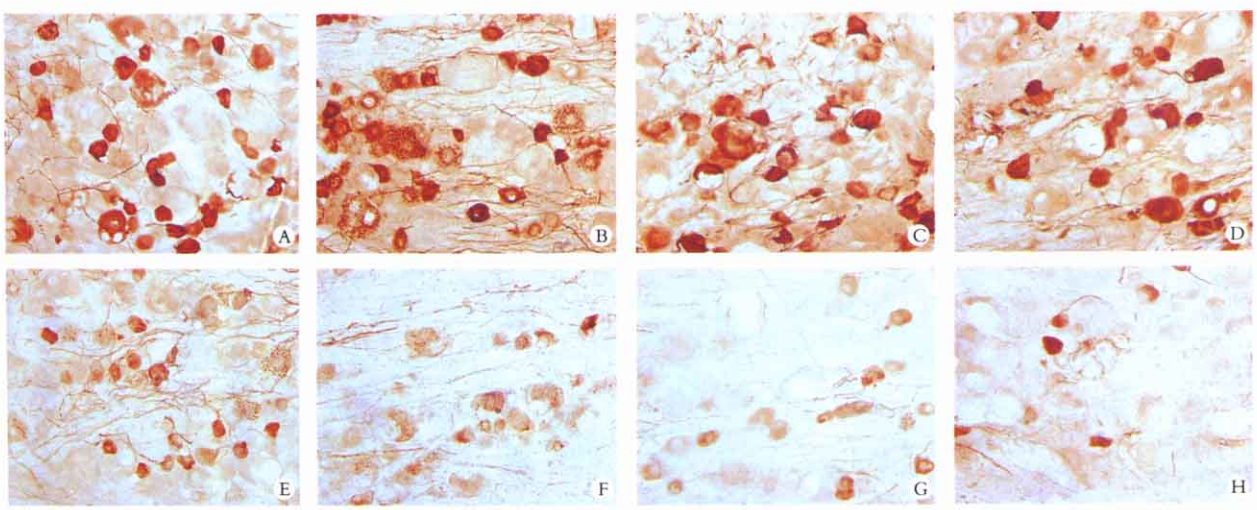
A:1 d组;B:7 d组

↓:结扎部位;P:近端;▲:CGRP聚集部位

图1 术侧坐骨神经CGRP表达的变化 (SABC×40)

2.2 DRG

对照组DRG内CGRP主要分布于中、小型感觉神经元的细胞质和突起内,呈颗粒型,可见到较多的强阳性细胞(图2A)。结扎后1~5 d CGRP的表达无明显变化,术后7 d CGRP的表达开始减弱,21 d到最低值,28 d仍低于正常(图2B-H)。灰度值测定显示:假手术组和结扎1、3、5 d组术侧CGRP表达与对侧无明显差别($P>0.05$);7、14、21、28 d术侧与对侧相比有统计学意义($P<0.05$);7、14、21、28 d组术侧与假手术组相比差别有统计学意义($P<0.05$),见表2。



A:对照组;B:1 d组;C:3 d组;D:5 d组;E:7 d组;F:14 d组;G:21 d组;H:28 d组

图2 术侧背根节神经元CGRP表达的变化 (SABC×200)

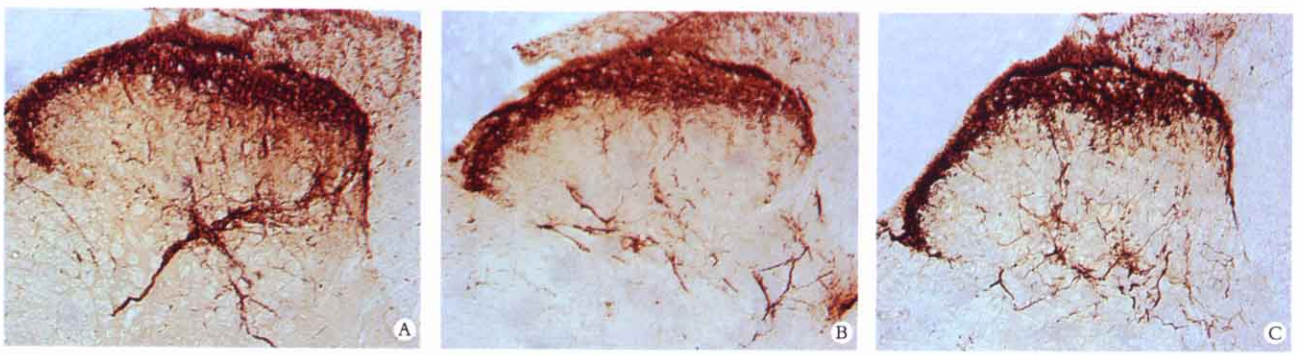
表 2　脊髓、背根节 CGRP 免疫阳性灰度值测量（$\bar{x} \pm s$，$n=6$）

组别	DRG		后角		前角	
	对照侧	手术侧	对照侧	手术侧	对照侧	手术侧
假手术组	162.40 ± 3.38	160.39 ± 3.58[c]	162.41 ± 3.72	163.73 ± 4.20[d]	187.20 ± 4.68	186.84 ± 5.05
1 d	163.73 ± 3.20	164.49. ± 3.48[c]	163.80 ± 6.55	161.13 ± 9.60[d]	188.67 ± 3.77	188.50 ± 4.20
3 d	165.42 ± 2.96	164.04 ± 3.32[c]	163.21 ± 5.34	165.82 ± 6.10	185.95 ± 3.53	184.94 ± 3.89
5 d	161.91 ± 8.11	164.42 ± 8.70[c]	158.32 ± 4.94	161.52 ± 6.10[d]	188.99 ± 5.98	187.53 ± 5.47
7 d	163.55 ± 4.76	171.36 ± 6.41[ab]	158.51 ± 3.76	159.32 ± 2.72[d]	185.44 ± 6.29	184.01 ± 7.58
14 d	159.82 ± 5.65	167.44 ± 3.46[ab]	161.51 ± 3.86	169.63 ± 4.18[ab]	185.26 ± 4.06	185.31 ± 3.50
21 d	165.72 ± 3.56	175.19 ± 3.17[ab]	162.18 ± 2.80	161.05 ± 2.86[d]	187.02 ± 2.22	186.74 ± 2.34
28 d	163.49 ± 3.95	171.11 ± 5.52[ab]	165.33 ± 2.95	164.96 ± 4.33	183.49 ± 2.01	183.66 ± 1.50

a：$P<0.05$，与对照侧比较；b：$P<0.05$，与假手术组比较；c：$P<0.05$，与 28 d 组比较；d：$P<0.05$，与 14 d 组比较

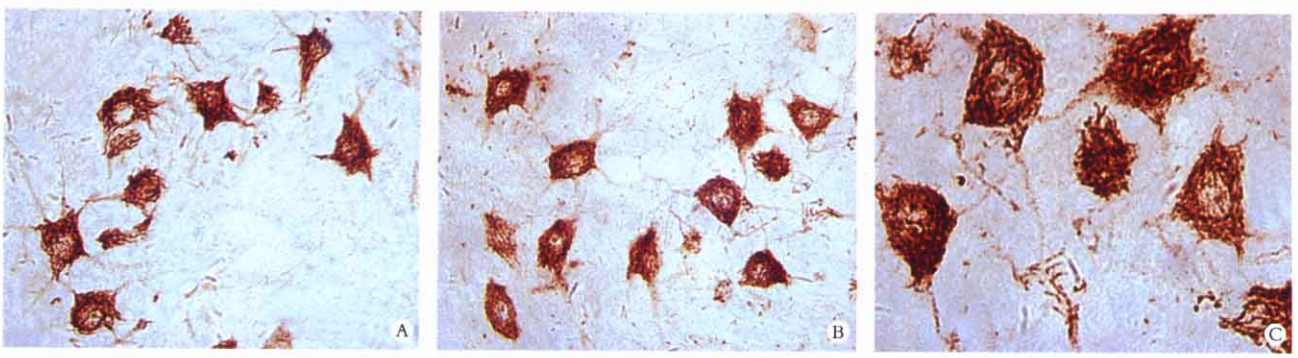
2.3　脊髓

在对照组主要分布于后角Ⅰ、Ⅱ板层和前角运动神经元，后角Ⅲ、Ⅳ板层内有少量阳性纤维；前角细胞多为大细胞，阳性物质呈颗粒状位于细胞质内和突起内，可见到长的突起（图 3、4）。结扎后 14 d 后角 CGRP 阳性纤维和终末表达减弱（图 3B），但各时间点免疫阳性面积无明显变化（资料未显示）。结扎后各时间点前角运动神经元 CGRP 表达无变化（图 4）。脊髓前、后角 CGRP 免疫阳性产物灰度值测定结果显示：术后 14 d 后角 CGRP 表达降低，与对侧和对照组以及 1、5、7、21 d 组相比有统计学意义（$P<0.05$）；术后各时间点前角运动神经元 CGRP 灰度值差别无统计学意义（$P>0.05$，表 2）。



A：1 d 组；B：14 d 组；C：28 d 组

图 3　术侧脊髓后角 CGRP 表达的变化　（SABC × 100）



A：7d 组 手术侧　（SABC × 200）；B：21d 组手术侧　（SABC × 200）；C：21d 组手术侧　（SABC × 400）

图 4　脊髓前角运动神经元 CGRP 表达

3　讨论

CGRP 与多种生理活动有关如调节心血管、胃肠道、免疫系统的活动，参与伤害性感觉的形成与维持[1,5]。神经损伤后 CGRP 呈现复杂的表达变化模式，不同的神经元在不同的损伤模型中呈现不同的表达变化模式[1,2]，神经压榨伤可导致 DRG 内 CGRP 表达的上调[2]；而周围神经切断时 DRG 内 CGRP 表达下

调[6]。神经损伤后 CGRP 可能通过以下机制参与再生过程:调节神经血流;改变神经元的兴奋性;促进立早基因的表达[7];调节轴浆运输等[8]。

感觉和运动神经元合成的 CGRP,可经顺行或逆行运输发挥作用。DRG 内 CGRP 的表达受来自中枢突的某些因子以及源于周围靶器官的神经生长因子(nerve growth factor, NGF)共同影响[3]。表达 CGRP 的 DRG 神经元中有 84% 同时可以表达 NGF 的高亲和力受体 trkA[9]。本实验中 DRG CGRP 表达 7 d 开始减弱,21 d 到最低点,28 d 仍低于正常;脊髓后角的表达在 14 d 亦减弱。推测神经结扎后,轴浆运输被机械阻断后,来自靶器官的 NGF 不能运送到 DRG 神经元的胞体参与 CGRP 的表达调节,引起 DRG 的 CGRP 表达减弱。应用外源性的 NGF 可促进 DRG 的 CGRP 表达[10]亦证实了我们的推测。脊髓后角只在 14 d 的表达下降,而其余时间点未见明显变化,但 DRG 的 CGRP 的表达在 21 d 最低,因此推测后角 CGRP 除了来源于 DRG 外,可能后角局部神经元亦合成 CGRP,这些神经元也可能参与伤后突触的重塑[5]。

脊髓前角运动神经元内 CGRP 的表达受上运动神经元的传出信息以及外周传入信息的调节,上运动神经元的传导信号促进脊髓前角运动神经元内 CGRP 的合成,而外周正常传入信号则抑制 CGRP 的合成,故脊髓横断损伤后,脊髓前角运动神经元失去上一级神经元的支配,CGRP 合成减少;而外周神经切断后,抑制作用减弱,CGRP 合成增加[11]。神经营养因子可调节脊髓前角运动神经元内 CGRP 的表达,Ramer 等[12]发现胶质细胞源性神经营养因子能明显增加脊髓前角运动神经元内 CGRP 的表达。本实验中脊髓前角运动神经元表达没有变化,推测可能有以下原因:①周围神经损伤信号不能传递到运动神经元胞体;②运动神经元调节存活的信号传递通路可能不涉及 CGRP 表达的改变;③阻断的逆行轴浆运输到胞体的 NGF 不能触发脊髓前角运动神经元内 CGRP 表达信号传递通路。

本实验中正常神经内未显示 CGRP 的堆积,结扎后 1 d 在损伤部位近、远端 CGRP 阳性产物大量堆积,持续到 7 d 基本消失。研究表明运动神经元胞体合成的 CGRP 可顺轴浆流转运至靶器官发挥作用。运动神经元合成的 CGRP 与运动终板的可塑性和靶肌肉细胞的营养有着密切的关系[13]。因此我们推测周围神经结扎后,由神经元胞体顺轴浆流运输至运动终板的 CGRP 被阻断,从而引起 CGRP 在结扎近端部位的大量堆积。结扎部位的远端的堆积尚需进一步研究。

综上所述,周围神经结扎后 CGRP 发生明显的时空模式表达改变,来自靶器官的神经营养因子 NGF 的调节作用与 CGRP 的变化密切相关。但是 NGF 通过什么信号转导途径和机制参与对 CGRP 的调节,结扎导致的 CGRP 表达变化的意义以及在神经再生中的作用和地位,还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] LI X Q, VERGE V M, JOHNSTON J M, *et al*. CGRP peptide and regenerating sensory axons[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(10): 1092-1103.

[2] 许愿忠,张建伟,王 瑞, 等. 大鼠坐骨神经压榨损伤后早期降钙素基因相关肽的变化[J]. 解剖学杂志, 2005, 28(2): 178-181.

[3] INAISHI Y, KASHIHARA Y, SAKAGUCHI M, *et al*. Cooperative regulation of calcitonin gene-related peptide levels in rat sensory neurons *via* their central and peripheral processes [J]. J Neurosci, 1992, 12(2): 518-524.

[4] SELTZER Z, DUBNER R, SHIR Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury [J]. Pain, 1990, 43(2): 205-218.

[5] FERNANDEZ H L, CHEN M, NADELHAFT I, *et al*. Calcitonin gene-related peptides: their binding sites and receptor accessory proteins in adult mammalian skeletal muscles[J]. Neuroscience, 2003, 119(2): 335-345.

[6] MULDER H, ZHANG Y, DANIELSEN N, *et al*. Islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide expression and down-regulated in dorsal root ganglia upon sciatic nerve transection[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 47(1-2): 322-330.

[7] PRILLER J, REDDINGTON M, HAAS C A, *et al*. Stimulation of P2Y-purinoceptors on astrocytes results in immediate early gene expression and potentiation of neuropeptide action[J]. Neuroscience, 1998, 85(2): 521-525.

[8] HIRUMA H, SAITO A, ICHIKAWA T, *et al*. Effects of substance P and calcitonin gene-related peptide on axonal transport in isolated and cultured adult mouse dorsal root ganglion neurons[J]. Brain Res, 2000, 883(2): 184-191.

[9] KASHIBA H, UEDA Y, SENBA E. Coexpression of preprotachykinin-A, alpha-calcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons [J]. Neuroscience, 1996, 70(1): 179-189.

[10] RUIZ G, BANOS J E. The effect of endoneurial nerve growth factor on calcitonin gene-related peptide expression in primary sensory neurons [J]. Brain Res, 2005, 1042(1): 44-52.

[11] 王庚, 吴新民,赵国立, 等. 上运动神经元损伤后脊髓前角运动神经元中降钙素基因相关肽的变化[J]. 中华麻醉学杂志, 2000, 20(5): 283-285.

[12] RAMER M S, BRADBURG E J, MICHAEL G J, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in sensory and motoneurons *in vivo*[J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(10): 2713-2721.

[13] 王树森,黄耀添,褚晓朝, 等. 大鼠坐骨神经损伤后降钙素基因相关肽与运动终板的关系[J]. 中华显微外科杂志, 1997, 20(4): 270-272.

(编辑 龙 亮)