文章编号:1000-5404(2006)21-2153-04

论著

坐骨神经损伤后肝细胞生长因子受体 c-Met 在脊髓和背根节的表达及其意义

郑林丰[1],谢应桂[4],王 瑞[2],许愿忠[1],张建伟[1],易西南[3],余清平[1] ([1]中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系,[2]湘雅医院神经内科,长沙 410013;[3]海南医学院基础部神经生物学研究室,海口 571101;[4]湘南学院基础医学部人体解剖学教研室,郴州 423000)

提 要: 目的 观察坐骨神经损伤后肝细胞生长因子受体 c-Met 在脊髓和背根节(dorsal root ganglion, DRG)的表达。**方法** 采用免疫组织化学方法结合图像分析技术检测大鼠坐骨神经结扎后 1、3、5、7、14、21 和 28 d c-Met 在脊髓和 DRG 内的表达变化情况。**结果** 术后 5 d DRG c-Met 表达开始增加,7~14 d 达高峰,之后渐恢复正常;损伤后脊髓前角 c-Met 免疫阳性产物未见明显变化,但脊髓后角免疫阳性面积 5 d 表达开始增加,7~14 d 达高峰,之后恢复正常。**结论** c-Met 可能参与了神经损伤后的再生过程。

关键词: c-Met; 坐骨神经; 结扎; 大鼠
中图法分类号: R363; R651.3; R977.6 **文献标识码**: A

Expression of hepatocyte growth factor receptor c-Met in spinal cord and dorsal root ganglion after sciatic nerve injury in rats

ZHENG Lin-feng[1], XIE Ying-gui[4], WANG Rui[2], XU Yuan-zhong[1], ZHANG Jian-wei[1], YI Xi-nan[3], YU Qing-ping[1] ([1]Department of Human Anatomy & Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, [2]Department of Neurology, Xiangya Hospital, Changsha 410013, [3]Department of Neurobiology, Hainan Medical College, Haikou 571101, [4]Department of Human Anatomy, Xiangnan College, Chenzhou 423000, China)

Abstract: Objective To observe the expression changes of hepatocyte growth factor (HGF) receptor c-Met in spinal cord and dorsal root ganglion (DRG) after sciatic nerve injury. **Methods** The sciatic nerve ligation was made in 42 SD rats. On day 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28 after ligation, the expression of c-Met was detected by immunohistochemical method and image analysis technique. **Results** c-Met in DRG increased at day 5 after sciatic nerve ligation, peaked at 7 – 14 d, and gradually returned to normal level. No changes of immuno-positive production in spinal ventral horn after injury were observed, but the immnuno-positive area of spinal dorsal horn increased at 5 d, peaked at 7 – 14 d, then down to normal level. **Conclusion** c-Met may be involved in the course of nerve regeneration following peripheral nerve ligation.

Key words: c-Met; sciatic nerve; ligation; rat

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种多效性细胞因子,主要通过与其高亲和性酪氨酸激酶受体 c-Met 结合后激活细胞质内信号通路的途径发挥生物学作用,在器官发生和多种组织的再生过程中发挥着重要的作用[1-3]。研究表明 HGF 和 c-Met 在神经系统有广泛的分布,并且 HGF 可以发挥类似神经营养因子的功能[1-6],促进神经元的存活和损伤神经的再生,引导轴突靶向生长[7]。周围神经损伤后 HGF 的受体 c-Met 的研究资料还比较缺乏。本研究采用坐骨神经结扎模型,运用免疫组化结合图像分析技术观察损伤后 c-Met 在背根节(dorsal root ganglion, DRG)和脊髓前、后角的表达变化,为 HGF 在神经损伤后促进再生修复过程中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和模型

健康成年 SD 大鼠 42 只,由中南大学湘雅医学院动物学部

作者简介:郑林丰(1976-),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。现在长沙民政职业技术学院。电话:(0731)2625134, 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:2005-08-02;修回日期:2006-03-28

提供，雌雄不限，体质量200 g左右，用随机数字表随机分为右侧坐骨神经结扎损伤后存活1、3、5、7、14、21、28 d组（$n=6$）。2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（40 mg/ kg），右后肢股中部纵切口约3 cm，梨状肌下暴露坐骨神经，分离神经后用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[8]。左侧为自身对照。术后分笼饲养，抗生素预防感染，分别于术后1、3、5、7、14、21、28 d处死。

1.2 取材

动物深麻下开胸，经左心室插管入升主动脉，快速灌注生理盐水约100 ml冲洗血液，随后灌注含4%多聚甲醛的0.1 mol/ L磷酸缓冲液（PB，pH 7.2～7.4）约400 ml，先快后慢，时间持续约1 h。灌注完毕立即取L_{4-6} DRG和相应节段脊髓，后固定2 h，入用0.1 mol/ L PB配制的15%、20%和30%梯度蔗糖溶液内直至标本沉底（4 ℃）。连续冠状冰冻切片，隔5张取1张，片厚20 μm，切片收集于0.01 mol/ L PBS液内，待用。

1.3 c-Met免疫组织化学染色

采用SABC漂浮法，主要步骤如下：切片入3% H_2O_2 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；加入含0.1% Triton X-100的兔抗c-Met抗体（1∶200，Santa Cruz），4 ℃过夜；生物素化抗兔IgG（1∶200，Vector）室温孵育2 h；ABC复合物（1∶200，Vector）室温孵育1 h；新鲜配制的含0.03% H_2O_2的0.05% DAB（Sigma）显色液显色5 min。阴性对照用PBS代替一抗，其余的步骤与上述相同，结果为阴性。

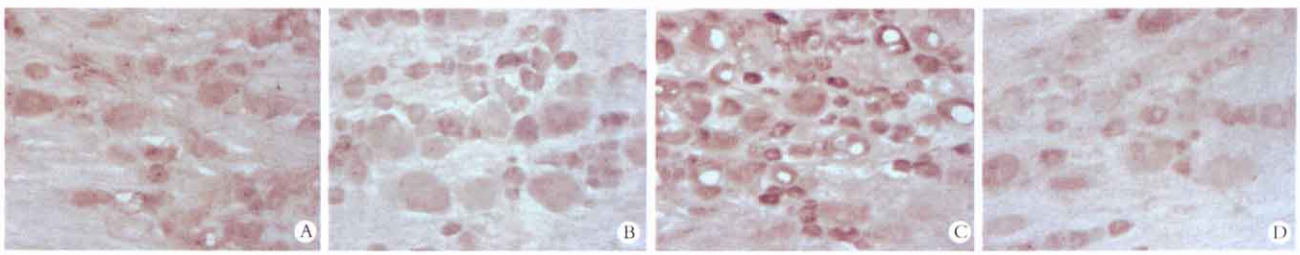
1.4 图像分析与统计学处理

每例标本选5张L_{4-6} DRG和相应节段脊髓切片，Motic显微镜（德国）下每张切片随机选5个200×高倍视野，Motic 3.2图像分析软件测量脊髓前后角、DRG的免疫反应灰度值和脊髓后角的免疫反应阳性面积。数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件行方差分析和t检验。

2 结果

2.1 c-Met在DRG的表达

c-Met免疫阳性物质主要位于DRG神经元细胞质内，呈均质状，可见核仁着色，以大、中型细胞为主。对照侧表达较弱（图1A）；术后5 d手术侧免疫阳性细胞明显增多，c-Met阳性产物表达明显增强；7～14 d达高峰，并出现较多的强阳性的小细胞；21 d开始下降，但仍高于正常；28 d基本恢复至正常水平（图1B～D）。灰度值测定结果显示：对照侧c-Met灰度值各组相比差别无统计学意义（$P>0.05$）；手术侧灰度值测定显示，术后7、14 d，与对照侧相比有统计学意义（$P<0.05$），与其他各组相比差别有统计学意义（$P<0.05$），见表1。



A：对照侧；B：1 d组；C：7 d组；D：28 d组

图1 DRG神经元c-Met表达的变化 （SABC×200）

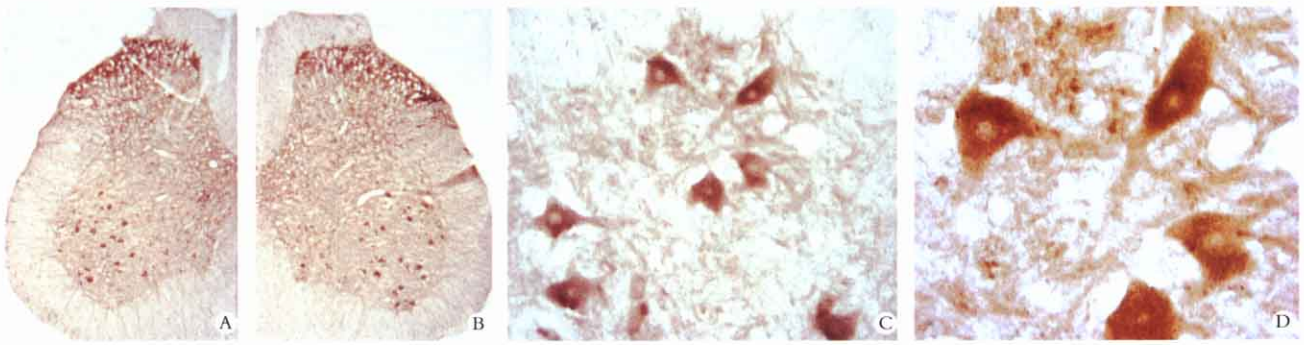
表1 脊髓、DGR C-Met免疫阳性灰度值测量（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d	28 d
背根节							
对照侧	168.63±2.55	173.38±3.41	173.10±2.68	169.24±3.81	169.99±3.04	172.20±3.43	169.33±3.46
手术侧	167.16±8.93[bc]	174.62±7.85[bc]	165.85±7.64[bc]	156.57±7.96[a]	156.83±7.03[a]	168.45±1.91[bc]	167.83±3.01[bc]
后角							
对照侧	205.03±1.74	207.36±1.43	208.17±3.39	205.91±4.22	204.11±2.91	208.52±3.75	209.70±4.39
手术侧	205.87±3.52	206.02±1.81	209.55±2.26	207.72±3.88	204.15±5.16	208.17±3.57	207.16±3.77
前角							
对照侧	175.99±15.81	178.03±15.87	183.50±1.59	180.91±8.35	178.01±7.47	186.32±1.90	184.76±2.29
手术侧	175.04±16.42	180.42±14.38	181.41±2.77	179.74±7.76	178.95±5.09	187.97±2.04	186.27±1.09

a：$P<0.05$，与对照侧相比；b：$P<0.05$，与7 d组相比；c：$P<0.05$，与14 d组相比

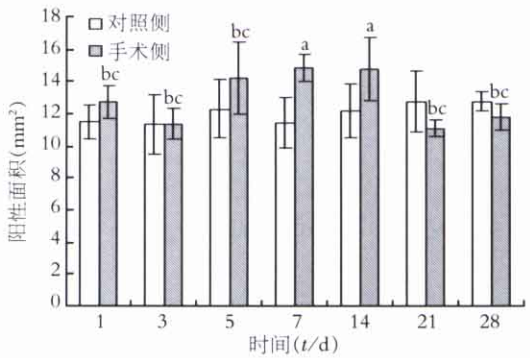
2.2 c-Met在脊髓的表达

2.2.1 c-Met在脊髓后角的表达 在脊髓后角可见c-Met免疫阳性纤维表达，主要分布于灰质板层Ⅰ、Ⅱ层（图2A、B）。灰度值测定结果显示：对照侧、手术侧与手术侧各组之间后角差别均不显著（$P>0.05$）。免疫阳性面积测定结果显示：对照侧后角免疫阳性面积差别均无统计学意义（$P>0.05$），但手术侧后角免疫阳性面积5 d开始增加，7～14 d达高峰，与对照侧和其他各组相比差别有统计学意义（$P<0.05$），之后（21～28 d）恢复正常，见图3。



A：对照侧脊髓　(SABC×40)；B：手术侧脊髓　(SABC×40)；C：手术侧脊髓前角运动神经元　(SABC×200)；D：手术侧脊髓前角运动神经元　(SABC×400)

图 2　大鼠脊髓前、后角 c-Met 的表达 5 d 组



a：$P<0.05$，与对照侧相比；b：$P<0.05$，与 7 d 组相比；c：$P<0.05$，与 14 d 组相比

图 3　脊髓后角 c-Met 免疫反应阳性面积测定

2.2.2　c-Met 在脊髓前角的表达　　c-Met 免疫阳性物质呈均质状，主要位于脊髓前角运动神经元细胞质和突起内(图 2)。灰度值测定结果显示：对照侧、手术侧各组之间差别均无统计学意义($P>0.05$)，见表 1。

3　讨论

周围神经损伤后基本的修复机制是神经元存活，轴突发芽和延伸与靶细胞建立突触连接。神经营养因子对神经再生起重要的作用，多种营养因子可促进再生。HGF 是神经营养因子家族的新成员，可促进神经系统的生长发育，保护成人运动、感觉、交感神经元，引导轴突靶向生长从而促进神经再生[4,7,9]。c-Met 为 HGF 的高亲和力受体，为原癌基因 *c-met* 编码的跨膜多肽二聚体，属于Ⅱ型酪氨酸激酶受体。c-Met 在神经系统分布很广，在中枢神经系统的大脑皮层、嗅球、初级嗅觉皮层、海马 CA-1 区和小脑的神经元、脊髓前角运动神经元及后角以及胶质细胞都有表达；在周围神经系统，DRG 感觉神经元和施旺细胞都表达 c-Met[1,4]。

本研究表明神经结扎损伤后 DRG 的 c-Met 表达发生明显的变化：正常 DRG 有一定的基础表达，主要以大、中型神经元为主；损伤后 5 d 表达增加，7～14 d 到高峰，28 d 渐恢复至正常水平，高峰期内可见小直径的神经元增多；术侧脊髓后角 c-Met 免疫阳性面积增加且与 DRG 的 c-Met 表达高峰期平行。推测，神经结扎后靶器官来源的 HGF 减少或中断，供给 DRG 神经元胞体的神经营养因子减少，损伤诱导 DRG 神经元胞体 c-Met 受体的表达增加可以更有效的利用不足的 HGF，使 HGF 与其结合发挥神经元的保护作用，避免神经元死亡。DRG 内的神经元据其胞体的大小与功能可分为大、中、小三类，中小型神经元主要与支配皮肤、内脏的伤害性感觉有关。本研究表明术后小直径 DRG 神经元 c-Met 表达上调，且脊髓后角的免疫阳性面积随损伤时间延长而增大。脊髓后角灰质板层Ⅰ、Ⅱ层有大量的痛觉传入纤维的终末[10]，因此 c-Met 可能参与痛觉的传递调节。Hashimoto 等[4]研究发现周围神经损伤后神经干的 c-Met 表达增高且呈现损伤远端、损伤点、近端的空间模式。这些均提示 c-Met 在感觉神经的再生和可塑性方面起重要的作用。

本实验中脊髓前角对照侧和手术侧免疫阳性物质未见明显的变化。Hashimoto 等[4]用原位杂交方法发现结扎后 HGF mRNA 表达没有发生变化，另有研究表明血液中可以监测到 HGF，因此我们推测血源性的 HGF 与 c-Met 结合可能对运动神经元发挥作用有关。但详细机制尚不清楚。

总之，周围神经结扎后 c-Met 的表达发生了明显的变化，这种变化可能使周围神经再生的微环境更加完善，促进再生。但其在周围神经再生中的机制和地位还有待进一步深入研究。

参考文献：

[1] HONDA S, KAGOSHIMA M, WANAKA A, *et al*. Localization and

functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1995, 32(2): 197-210.

[2] WONG V, GLASS D J, ARRIAGA R, *et al*. Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor[J]. J Biol Chem, 1997, 272(8): 5187-5191.

[3] KORHONEN L, SJOHOLM U, TAKEI N. Expression of c-Met in developing rat hippocampus: evidence for HGF as a neurotrophic factor for calbindin D-expressing neurons[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(10): 3453-3461.

[4] HASHIMOTO N, YAMANAKA H, FUKUOKA T, *et al*. Expression of HGF and cMet in the peripheral nervous system of adult rats following sciatic nerve injury[J]. Neuroreport, 2001, 12(7): 1403-1407.

[5] SUN W, FUNAKOSHI H, NAKAMURA T. Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-met in the rat developing cerebral cortex[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 103(1-2): 36-48.

[6] NAGAYAMA T, NAGAYAMA M, KOHARA S, *et al*. Post-ischemic delayed expression of hepatocyte growth factor and c-Met in mouse brain following focal cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2004, 999(2): 155-166.

[7] KATO N, NEMOTO K, NAKANISHI K, *et al*. Nonviral HVJ (hemagglutinating virus of Japan) liposome-mediated retrograde gene transfer of human hepatocyte growth factor into rat nervous system promotes functional and histological recovery of the crushed nerve[J]. Neurosci Res, 2005, 52(4): 299-310.

[8] 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.

[9] 任国山,赵长义,张喜平,等. 肝细胞生长因子对新生大鼠受损面神经运动神经元的营养作用[J]. 解剖学杂志, 2004, 27(3): 284-287, 290.

[10] HASHIMOTO N, YAMANAKA H, FUKUOKA T, *et al*. Expression of hepatocyte growth factor in primary sensory neurons of adult rats[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 97(1): 83-88.

(编辑 周 芳)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)21-2156-01

凋亡抑制基因 Survivin 在喉鳞癌中的表达及临床意义

陈锦屏 (郑州市第五人民医院耳鼻咽喉科, 郑州 450003)

Survivin是凋亡抑制蛋白家族的一个新成员,是迄今发现最强的凋亡抑制因子[1]。近年研究表明,survivin与肿瘤的发生、发展密切相关。本研究旨在探讨喉癌组织中survivin蛋白的表达及其与淋巴结转移的关系,为临床治疗及提高患者的生存率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

取自我院病理科2002-2004年存档的43例住院患者手术切除喉鳞状细胞癌组织石蜡标本,术前均未接受放射治疗和化学治疗。其中男性23例,女性20例,年龄39-84岁,平均51岁。声门上型喉癌18例,声门型12例,声门下型8例,声门旁型3例,混合型2例。按1987年UICC制订的TNM分期标准分期,其中Ⅰ期5例,Ⅱ期11例,Ⅲ期20例,Ⅳ期7例。其中颈淋巴结转移阳性者16例,阴性者26例。病理分化程度:高分化19例,中分化11例,低分化13例;20例癌旁组织取自距癌组织0.5-1.0 cm。

1.2 Survivin的检测

采用免疫组织化学链酶抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)法染色,S-P试剂盒购于北京中山生物技术有限公司,用兔抗人survivin多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)检测survivin的表达,严格按照说明书操作。已知阳性喉鳞癌切片作为阳性对照,PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照。结果判定:以细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞,高倍镜下计数500个细胞,≥10%为阳性,<10%为阴性。

1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件包。计数资料的比较采用χ^2检验及Fisher精确概率法。

2 结果

2.1 Survivin蛋白表达

肿瘤组织中survivin蛋白阳性染色颗粒主要定位于肿瘤细胞质内。癌旁组织survivin阳性表达率为0%(0/20),喉鳞癌组survivin蛋白阳性表达率62.8%(27/43),喉鳞癌组survivin蛋白阳性表达率显著高于癌旁组织组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 Survivin蛋白阳性表达与喉鳞癌临床病理特征的关系

淋巴结转移组survivin蛋白阳性表达率(75%,21/28)显著高于无淋巴转移组(46.2%,6/15)($P<0.05$);根据临床病理分期,Ⅰ+Ⅱ期组(50.0%,8/16)与Ⅲ+Ⅳ组(70.4%,19/27)期之间survivin蛋白阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$);随临床分期增加及淋巴结的转移,survivin蛋白阳性表达率逐渐升高($P<0.05$)。Survivin蛋白阳性表达与患者年龄、性别、肿瘤组织大小、部位及分化程度无显著差异($P>0.05$),见表1。

(下转2159页)

作者简介:陈锦屏(1967-),女,陕西省汉中市人,主治医师,主要从事耳鼻咽喉肿瘤方面的研究。电话:(0371)63843900

收稿日期:2005-08-25;修回日期:2006-03-07