文章编号:1000-5404(2007)08-0717-04

论著

GDNF基因活化的细胞外基质对大鼠坐骨神经缺损的修复作用

梁安霖,蒋电明,安 洪 (重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨GDNF基因活化的细胞外基质对神经元、再生轴突和靶肌肉的保护作用。**方法** 通过化学萃取获得大鼠坐骨神经细胞外基质,复合上编码GDNF的质粒DNA,构建成基因活化的细胞外基质支架。90只成年Wistar大鼠按随机数字法分为3组:GDNF基因活化的细胞外基质桥接组(A组,$n=30$),ECM桥接组(B组,$n=30$),自体神经桥接组(C组,$n=30$),12周时用激光共聚焦显微镜等形态学方法及电生理学等方法来评价再生神经功能。**结果** GDNF基因活化的细胞外基质能作为局部的基因缓释系统来释放GDNF,高效表达12周以上;再生轴突数达(2 117±294),坐骨神经指数恢复到(30.92±2.98)%。**结论** GDNF基因活化的细胞外基质可以促进大鼠坐骨神经功能的恢复,有希望成为自体神经移植的替代品。

关键词: 胶质细胞源性神经营养因子;细胞外基质;坐骨神经损伤修复;大鼠
中图法分类号: R318.08;R622.3;R651.3 **文献标识码:** A

Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-activated matrix on repair of sciatic nerve defect of rats

LIANG An-lin, JIANG Dian-ming, AN Hong (Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene-activated matrix (GAM) in bridging rat sciatic nerve defect. Methods The peripheral nerve extracellular matrix was harvested by chemical extraction. GDNF gene-activated matrix was comprised of the extracellular matrix and plasmids encoding GDNF. Ninety adult Wistar rats were randomly divided into three groups: group A (GDNF GAM conduits), group B (extracellular matrix conduits), group C (autografts). At the end of 12 weeks, rats from each group were subjected to walking tract analysis, electrophysiological and histomorphological studies. Results GDNF DNA could be retained in GAM, promoting transgene expression in the sciatic nerve, in GAM, and more importantly, in axotomized neurons in spinal cord for 12 weeks. The number of regenerated axons for the GAM grafts in the distal sciatic nerve was lower than that for autografts (2 117±294 *vs* 2 474±297) at 12 weeks. The sciatic nerve function index for the GAM grafts was lower than that for autografts [(30.92±2.98)% *vs* (26.27±2.71)%] at 12 weeks. Conclusion GDNF GAM may be a promising alternative to autografts for repair of rat sciatic nerve.

Key words: glial cell line-derived neurotrophic factor; extracellular matrix; sciatic nerve injury and repair; rat

周围神经的缺损是长期困扰临床医生的一个难题。自体神经移植仍然是首选治疗方案,但由于取材有限,感觉纤维与运动纤维难以匹配,供区功能障碍等原因使其应用受限[1]。因此,研究可替代神经移植的桥接材料就成为目前研究的热点。本研究以去细胞的周围神经细胞外基质(extracellular matrix, ECM)为支架,复合上携胶质细胞源性神经生长因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)的质粒DNA,制备出GDNF基因活化基质(gene activated matrix, GAM),以此来桥接大鼠的坐骨神经缺损,以形态学、电生理学等方法来评价其疗效。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选择90只4月龄Wistar大鼠(购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心)作受体,雌性,体质量220~

作者简介:梁安霖(1976-),男,四川省雅安市人,博士,主治医师,主要从事周围神经损伤与修复方面的研究。电话:(023)89011212, E-mail: lianganlin@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-02-22;修回日期:2006-08-28

240 g。采用随机数字表法分为3组:GDNF基因活化的细胞外基质桥接组(A组,$n=30$),ECM桥接组(B组,$n=30$),自体神经桥接组(C组,$n=30$)。按术后第1、4、12周再分为3个组,每组10只。

1.2 GDNF基因活化的细胞外基质的体外制备

1.2.1 周围神经ECM的制备 体质量(450±10)g雌性SD大鼠30只作供体。无菌条件下在出骨盆处切取双侧坐骨神经,双蒸水浸浴12 h;3% Triton X-100浸浴12 h;4%脱氧胆酸钠浸浴24 h;再重复用3% Triton X-100和4%脱氧胆酸钠处理1次;萃取神经保存于4 ℃ 0.1 mol/L的PBS中[2]。将1 cm长的神经浸浴在多聚赖氨酸(0.1 mg/ml)中备用。

1.2.2 GDNF的质粒DNA的大量抽提 将本室保存的含有pcDNA3-GDNF-GFP的大肠杆菌DH5α大量扩增,按试剂盒(Qiagen公司)操作。

1.2.3 质粒DNA的预处理 消毒双蒸水20 μl,GDNF-GFP质粒10 μl(5 μg),TransIT Polymer Solution 10 μl,加入EP管中混匀,室温下静止10 min,再加入TransIT 1X Delivery solution 10 μl,术中备用(Mirus公司)。

1.3 动物模型制作

3.5%水合氯醛腹腔麻醉,在梨状肌下缘5 mm切除10 mm长坐骨神经,制备周围神经缺损的动物模型。A组用GAM修复,在10倍手术显微镜下用10/0无损伤缝线将浸浴了多聚赖氨酸的神经两断端各缝4针,再将上述50 μl转染液缓慢注射入支架中,缝合切口;B组用浸浴了多聚赖氨酸的ECM修复;C组为自体移植,将切除的10 mm坐骨神经调转180°缝合。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

按时间段取L_4~L_6脊髓和桥接的神经。立即冰冻切片(50 μm厚),用Leica Microsystems Heidelberg激光共聚焦显微镜观察。

1.5 光镜和电镜观察

12周时用2%戊二醛灌注固定大鼠,取L_4~L_6脊髓以及神经桥接体以远5 mm的神经段,脊髓作HE染色,光镜下(×200)计数前角运动神经元数目。神经行石蜡切片HE染色;行超薄切片做透射电镜观察。用北航CM-2000B图像分析系统测量神经横切面轴突数目、髓鞘厚度、神经组织所占面积百分比。

1.6 肌肉湿重、相对肌纤维截面积及神经电生理检测

12周时自股骨内外髁起点至跟骨结节止点完整取下腓肠肌,用电子天平准确称量肌肉湿重。以实验侧湿重/正常侧湿重×100%评价靶肌肉的神经再支配率。将实验侧腓肠肌制成石蜡切片,HE染色,在光镜下(×400)用北航CM-2000B图像分析系统测量相对肌纤维截面积。12周时用BL-410生物机能实验系统计算潜伏期、波幅、阈值和运动神经传导速度。

1.7 坐骨神经指数测量

自制大鼠行走暗箱,按照文献[3]方法做足印测量,选实验侧足(E)、正常侧足(N),测量足印的3个参数。3个参数为:① 足印长度(PL):足印的最长距离,即从足跟到足尖;② 足趾宽度(TS):第1趾到第5趾的连线距离;③ 中间足趾距离(IT):第2~4趾的连线距离。实验侧足3个参数分别为:实验侧足印长度(EPL)、实验侧足趾宽度(ETS)、实验侧中间足趾距离(EIT);正常侧足3个参数分别为正常侧足印长度(NPL)、正常侧足趾宽度(NTS)、正常侧中间足趾距离(NIT)。将上述3个变量6对数据代入Bain公式计算出SFI。SFI = −38.3×(EPL − NPL)/NPL + 109.5×(ETS − NTS)/NTS + 13.2×(EIT − NIT)/NIT − 8.8。以SFI值0时为正常值,−100为神经完全断离。

1.8 一般情况观察

观察动物术后进食情况,跛行程度,伤口愈合情况,足底及足趾溃疡等。

1.9 统计学处理

数据以$x \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

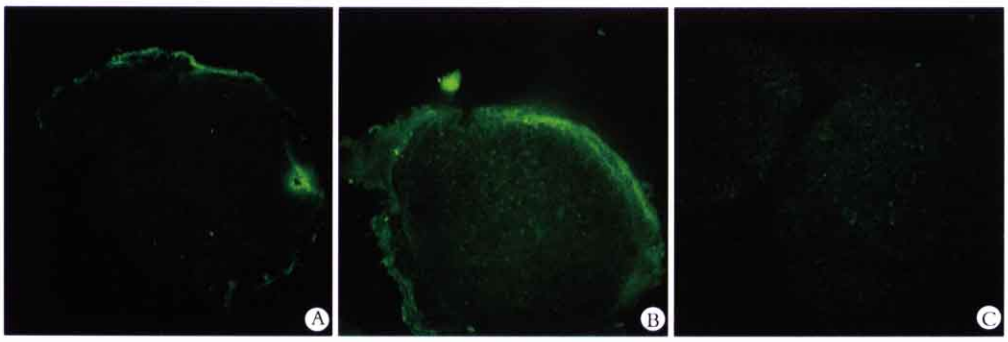
2 结果

2.1 一般观察

所有大鼠伤口Ⅰ/甲愈合,足趾无脱落,部分有小趾溃疡,术后12周均愈合;足底无溃疡。GAM植入12周后,远近端已与坐骨神经连接;移植体的组织收缩不明显;与周围肌肉有轻度黏连,无神经瘤形成。

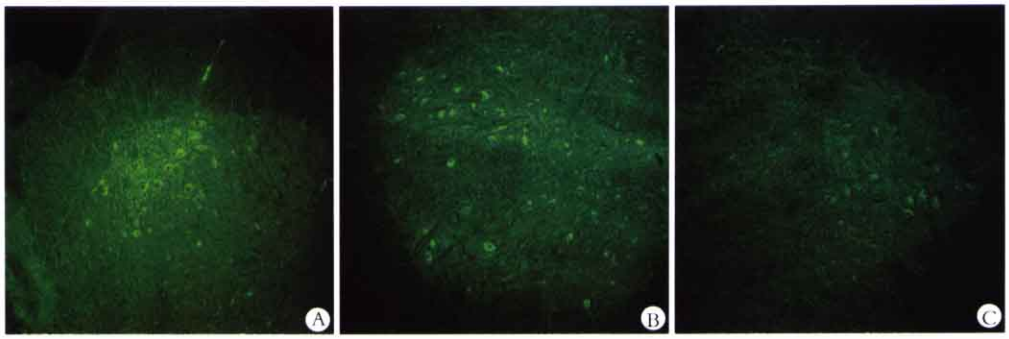
2.2 激光共聚焦显微镜观察

A组,术后第1周在支架中有很强的表达,阳性细胞均匀分布在神经外膜,束膜和轴突周围;大部分阳性细胞胞体较大,不规则,核大,是Schwann细胞;少部分阳性细胞体积小,呈圆形,可能是淋巴细胞;至术后12周维持在较高水平(图1)。术后1周在脊髓灰质中可见大量阳性着色的星形胶质细胞,胞体较大,呈星形,核圆;以及少突胶质细胞。阳性细胞成团分布,主要集中在灰质前角。至术后第12周维持在较高水平(图2)。



A:术后第1周;B:术后第4周;C:术后第12周

图1 移植GAM后近端坐骨神经中GFP的表达 (激光共聚焦显微镜×100)



A：术后第 1 周；B：术后第 4 周；C：术后第 12 周

图 2　移植 GAM 后脊髓中 GFP 的表达　（激光共聚焦显微镜 ×200）

2.3　前角运动神经元计数

术后第 1 周，A 组实验侧脊髓前角运动神经元数目较健侧明显减少，至术后第 4、12 周有所增加，与 C 组相比无显著性差异（$P>0.05$），但明显多于 B 组，差异有显著性（$P<0.01$），见表 1。

表 1　术后各组前角运动神经元计数（个数/脊髓前角视野）（$n=30, x\pm s$）

组别	术后第 1 周	术后第 4 周	术后第 12 周
细胞外基质桥接组	13.8 ± 1.3	15.2 ± 0.84	16.4 ± 0.89
ECM 桥接组	7.6 ± 1.14[a]	8.8 ± 0.84[a]	9.6 ± 0.55[a]
自体神经桥接组	14.0 ± 1.41	15.4 ± 1.14	17.6 ± 1.14

a：$P<0.01$，与自体神经桥接组比较

2.4　术后第 12 周坐骨神经横截面的光镜和电镜观察

A 组光镜下可见有髓和无髓纤维，再生轴突分布均匀，粗细不等，无明显炎症细胞浸润。再生轴突数 C 组较 A 组大，差异有显著性（$P<0.01$）；A 组较 B 组大，差异有显著性（$P<0.01$）。电镜观察神经轴突及髓鞘均较成熟，髓鞘较厚，呈同心圆板层样排列，Schwann 细胞包裹轴突紧密，细胞质内线粒体丰富。A 组的髓鞘面积百分比和神经组织所占面积百分比与 C 组相比无显著性差异（$P>0.05$），但明显高于 B 组，有显著性差异（$P<0.01$），见表 2。

表 2　术后第 12 周各组再生轴突图像分析结果（$n=10, x\pm s$）

组别	再生轴突数（个）	髓鞘面积百分比（%）	神经组织面积百分比（%）
细胞外基质桥接组	2 117 ± 294[a]	37.8 ± 2.1	19.0 ± 1.1
ECM 桥接组	1 402 ± 280[a]	18.0 ± 2.1[a]	7.3 ± 1.0[a]
自体神经桥接组	2 474 ± 297	38.0 ± 2.1	18.0 ± 1.1

a：$P<0.01$，与自体神经桥接组比较

2.5　术后第 12 周电生理检测相关指标

电生理检查显示，A 组的最大诱发电位的波幅降低，波形增宽，结果表现为潜伏期延长、动作电位的幅值增宽、传导速度降低、刺激电位的阈值升高；A 组优于 B 组，差异有显著性（$P<0.01$），但较 C 组差，差异有显著性（$P<0.01$），见表 3。

表 3　术后第 12 周各组电生理检测相关指标（$n=10, x\pm s$）

组别	潜伏期（ms）	动作电位幅值（mV）	神经传导速度（m/s）	阈值（mV）
细胞外基质桥接组	0.43 ± 0.04[ab]	2.51 ± 0.23[ab]	18.84 ± 1.84[ab]	0.34 ± 0.02[ab]
ECM 桥接组	0.60 ± 0.03[b]	1.81 ± 0.23[b]	12.87 ± 1.42[b]	0.52 ± 0.03[b]
自体神经桥接组	0.37 ± 0.02	3.33 ± 0.26	23.79 ± 2.75	0.28 ± 0.03

a：$P<0.01$，与 ECM 桥接组比较；b：$P<0.01$，与自体神经桥接组比较

2.6　术后第 12 周小腿三头肌湿重恢复率及肌纤维截面积

术后第 12 周各组实验侧小腿三头肌颜色较健侧苍白，肌肉湿重也减轻；肌纤维明显缩小，细胞核增加，细胞质减少，肌纤维间结缔组织增加。结果显示 C 组的肌肉湿重恢复率和肌纤维截面积最大，和 A 组相比无显著性差异（$P>0.05$），但 A 组明显优于 B 组，差异有显著性（$P<0.01$），见表 4。

表 4　术后 12 周小腿三头肌湿重恢复率及肌纤维截面积（$n=10, x\pm s$）

组别	肌肉湿重恢复率（%）	肌纤维截面积（μm^2）
细胞外基质桥接组	85.2 ± 2.05	6 787.0 ± 611.6
ECM 桥接组	50.0 ± 4.90[a]	4 231.0 ± 439.5[a]
自体神经桥接组	87.0 ± 1.87	8 359.6 ± 1 003.7

a：$P<0.01$，与自体神经桥接组比较

2.7　坐骨神经指数测量

术后第 2 ~ 4 周，SFI 在各组间没有明显差异；各组的 SFI 从第 4 周开始降低，随时间的延长降低的幅度减缓；术后第 12 周时 C 组 SFI 最优，A 组又优于 B 组，差异有显著性（$P<0.01$），见表 5。

表5 术后各组坐骨神经指数测量 [$n=30$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	第2周	第4周	第6周	第8周	第10周	第12周
细胞外基质桥接组	78.44±4.35	73.69±1.31	66.47±2.41[b]	45.52±2.96	35.70±2.49	30.92±2.98[a]
ECM桥接组	78.07±2.20	74.12±0.96	67.17±3.16[b]	59.90±4.06[b]	54.32±1.82[b]	46.93±2.96[b]
自体神经桥接组	75.70±2.30	71.27±1.37	56.75±3.76	43.42±1.08	33.29±1.29	26.27±2.71

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与自体神经桥接组比较

3 讨论

3.1 GAM对中枢神经元的保护

周围神经损伤后神经的再生依赖有活力的神经元,而靶源性神经营养因子逆行性运输的中断则是导致神经元死亡的重要原因之一。因此怎样将外源性神经营养因子长期、稳定地导入体内非常重要。GDNF是目前发现的生物活性最强的运动神经元营养因子,本实验结果显示通过GAM将其导入体内,GDNF能够转染中枢的神经元、胶质细胞,至少维持12周,并且A组神经元存活数量明显优于B组,说明这种GAM能够减少由周围神经损伤导致的中枢神经元的死亡,从而使神经元对其他内源性或外源性的神经营养因子保持敏感性[4-6]。A组和C组第12周时存活的前角运动神经元在数量上无显著性差异,但A组再生的轴突数却少于C组,可能是长期,大量的外源性GDNF虽然能保护前角运动神经元,促进轴突的芽生,但却阻止了神经元再生的轴突向神经根定向长入[7]。

3.2 GAM对再生轴突的作用

同种异体的神经支架主要由胶原组成的3层膜结构和Schwann细胞基底膜层构成,具有和天然神经类似的组织结构,不仅具有引导轴突再生的作用,还能尽快建立靶肌肉与中枢的联系[2]。结果显示,A组第12周时再生轴突数达接近C组;说明GAM可以使Schwann细胞向损伤区迁徙,促进再生轴突的再髓鞘化。电镜观察见远端髓鞘较厚,呈同心圆板层样排列,Schwann细胞包裹轴突紧密,细胞质内线粒体丰富。说明GAM缓释的GDNF确实能促进轴突再生和髓鞘成熟。最大诱发电位的波幅与传导纤维的数量和大小有关,能显示再生纤维的质量。A组波幅低于C组,且峰潜伏期延长,峰电位时间缩短,阈值提高,说明GAM缓释的GDNF虽然能促进轴突塑型和髓鞘成熟,但髓鞘的成熟度还不够,可能是GDNF只能在髓鞘形成前和形成早期通过神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule,NCAM)信号途径对Schwann细胞进行调节有关[8],也可能与实验观察时间较短有关。

3.3 GAM对靶肌肉的保护

周围神经修复的最终目的是恢复靶肌肉的功能,SFI除反映下肢肌力恢复情况外,还可反映下肢各肌肉间的协调功能,能够较全面地反应神经修复的效果[3]。本实验表明,术后第2~4周,由于华勒变性和再生轴突要通过两个断端等原因,SFI在各组间没有明显差异,A组的SFI接近C组,说明再生轴突能通过GAM,对靶肌肉进行再支配,恢复其部分肌力,协调各肌肉间的功能;A组转染的GDNF第12周时在脊髓仍然有较强表达,可能通过其神经元保护作用,使再生轴突能更好更多地延长。第12周时A组腓肠肌湿重恢复率与C组相比无显著性差异;而肌纤维截面积略低,但优于B组;说明GDNF的大量表达不仅能促进神经肌接头的形成和成熟,而且能促进神经再支配时的塑形和改建[1]。

同种异体神经来源广泛,取材方便,本实验以其为支架,复合上GDNF质粒,修复了大鼠坐骨神经10 mm缺损,结果表明能够促进神经功能恢复,有希望成为自体神经移植的替代品。

参考文献:

[1] 张文捷, 周 跃, 陈 菁, 等. GDNF基因修饰的雪旺细胞对大鼠坐骨神经缺损的修复作用[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(20): 1826-1829.

[2] Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction[J]. Brain Res, 1998, 795(1-2): 44-54.

[3] Schiaveto-de-Souza A, da-Silva C A, Del-Bel E A. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(5): 627-635.

[4] Bonadio J. Tissue engineering via local gene delivery[J]. J Mol Med, 2000, 78(6): 303-311.

[5] Berry M, Gonzalez A M, Clarke W, *et al*. Sustained effects of gene-activated matrices after CNS injury[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(4): 706-716.

[6] Aszmann O C, Winkler T, Korak K, *et al*. The influence of GDNF on the timecourse and extent of motoneuron loss in the cervical spinal cord after brachial plexus injury in the neonate[J]. Neurol Res, 2004, 26(2): 211-217.

[7] Blits B, Carlstedt T P, Ruitenberg M J, *et al*. Rescue and sprouting of motoneurons following ventral root avulsion and reimplantation combined with intraspinal adeno-associated viral vector-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor[J]. Exp Neurol, 2004, 189(2): 303-316.

[8] Iwase T, Jung C G, Bae H, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells[J]. J Neurochem, 2005, 94(6): 1488-1499.

(编辑 王小宾)