文章编号:1000-5404(2008)23-2191-03

论著

腺病毒介导的神经生长因子基因治疗大鼠坐骨神经损伤的疗效研究

陈 渝[1],王大勇[2],王祖贵[2],范大礼[2],翁 政[2],邓忠良[1] ([1]重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆 400016;[2]重庆市第九人民医院骨科,重庆 400700)

摘 要:目的 观察腺病毒介导神经生长因子(Ad-NGF)基因治疗对大鼠坐骨神经损伤修复的疗效。**方法** 取SD大鼠16只,切断右侧坐骨神经并缝合,随机分为Ad-NGF治疗组、神经生长因子(NGF)局部注射组、空腺病毒载体组和生理盐水(NS)局部注射组。术后第31天行坐骨神经功能指数及神经电生理测定,Western blot检测神经生长因子蛋白质表达水平。**结果** 腺病毒介导神经生长因子较其余3组可显著增加局部NGF蛋白质表达水平,改善坐骨神经功能指数和神经传导速度。**结论** 腺病毒介导神经生长因子基因治疗可有效促进大鼠坐骨神经损伤后修复。

关键词: 坐骨神经;神经生长因子;神经损伤;腺病毒
中图法分类号: R459.9; R651.405; R977.6 **文献标识码:** A

Effect of adenovirus expressing nerve growth factor on sciatic nerve injury in rats

CHEN Yu[1], WANG Da-yong[2], WANG Zu-gui[2], FAN Da-li[2], WENG Zheng[2], DENG Zhong-liang[1] ([1]Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Orthopedics, Chongqing Ninth People's Hospital, Chongqing 400700, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of adenovirus expressing nerve growth factor (Ad-NGF) on sciatic nerve injury in rats. **Methods** Sciatic nerve injury model was established by transection of right sciatic nerve in 16 male SD rats, and then randomly divided into 4 groups: Ad-NGF group, nerve growth factor (NGF) group, adenovirus vector group and normal sodium group. The effect of various treatments on injured sciatic nerve was evaluated by examining sciatic nerve function index (SFI) and protein expression of NGF by Western blotting, performing electrophysiological test on day 31 after operation. **Results** Ad-NGF increased the protein expression of NGF and improved SFI and nerve conduction velocity significantly, as compared with the other 3 groups. **Conclusion** Ad-NGF can effectively promote the repair of sciatic nerve injury in rats.

Key words: sciatic nerve; nerve growth factor; nerve injury; adenovirus

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)作为NGF家族第一个被发现的成员,具有促进中枢及外周神经系统中神经元的存活、分化,促进损伤神经的轴突再生,防止细胞坏死的功能[1]。但局部神经、肌肉注射等给药方法常导致NGF浓度波动大,影响了NGF的临床疗效。本研究拟观察5型腺病毒介导神经生长因子(adenovirus expressing nerve growth factor, Ad-NGF)基因治疗对周围神经损伤的修复作用,探讨基因治疗在周围神经损伤中的应用价值。

作者简介: 陈 渝,男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事脊柱及周围神经损伤方面的研究。电话:(023)60750680, E-mail: chenyu@vip.163.com
通信作者: 邓忠良,电话:(023)67959416, E-mail: cqcyalex@hotmail.com
收稿日期: 2008-01-02; **修回日期:** 2008-04-07

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠癌细胞株HT-29由重庆医科大学病理生理学研究室提供,5型腺病毒穿梭质粒pCA13及骨架质粒pBHGE3为加拿大Microbix Biosystems公司产品,Lipofectamine 2000为Invitrogen公司产品,内切酶*Eco*RⅠ及*Xba*Ⅰ购自宝生物工程(大连)有限公司,两端构建有*Eco*RⅠ、*Xba*Ⅰ酶切位点的NGF基因序列(NGF/*Eco*RⅠ+*Xba*Ⅰ)购自上海生工生物技术服务有限公司。

1.2 动物分组及手术方法

雄性SD大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供)16只,体质量180~200 g,随机分成4组:Ad-NGF治疗组、NGF局部注射组、空腺病毒载体组和生理盐水(NS)局部注射组。手术按参考文献[2]进行。5%戊巴比妥(40 mg/kg)作腹腔注射麻醉

动物。无菌条件下取右后肢斜切口,长约2 cm,分离显露右侧坐骨神经约2 cm,距梨状肌下缘0.8 cm处切断坐骨神经,在10倍手术显微镜视下以11-0无创尼龙针线缝合,关闭切口。术后Ad-NGF治疗组及空腺病毒载体组分别给予Ad-NGF及Ad-control注射手术同侧腓肠肌(1×10^8 PFU/次,隔天1次,共3次),NGF组每天给予NGF(200 U/d,连续3周)注射手术同侧腓肠肌。生理盐水组每天给予NS(100 μl/d,连续3周)注射手术同侧腓肠肌。于手术后第31天行坐骨神经功能指数及神经电生理测定,之后处死,无菌条件下切取吻合处及其远端1.0 cm的坐骨神经-80 ℃保存。

1.3 Ad-NGF构建方法

Ad-NGF构建参照参考文献[3]进行。将pCA13质粒用*Eco*RⅠ+*Xba*Ⅰ双酶切,得到线性化的pCA13/*Eco*RⅠ+*Xba*Ⅰ酶切体系;连接两端构建有*Eco*RⅠ、*Xba*Ⅰ酶切位点的NGF基因序列(NGF/*Eco*RⅠ+*Xba*Ⅰ)和PCA13/*Eco*RⅠ+*Xba*Ⅰ,得到重组质粒pCA13-NGF,并酶切鉴定;将质粒pCA13-NGF及骨架质粒pBGHE3用Lipofectamine2000共转染HEK-293细胞株(重庆医科大学病理生理研究室提供)扩增、分离获得Ad-NGF。提取病毒DNA,并以其为模板,进行PCR扩增,将PCR产物于1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析仪上观察,出现约500 bp的条带为正确,同时基因测序鉴定扩增的序列为插入的外源性NGF基因序列。

1.4 检测方法

1.4.1 坐骨神经功能指数(sciatic nerve function index, SFI)检测 按参考文献[4]进行。让大鼠走过一个42 cm×8.2 cm大小,末端为暗箱的过道,过道底部铺上白纸,大鼠在行走时,两后足均匀沾染蓝黑色墨水,行走后纸上留有足印,取左右侧足(E试验侧,N正常侧)各测3个参数(精确到mm):足印长度(PL)即从足跟到足尖的最长距离,每次使用最长的PL;TS即第1趾到第5趾的连线距离,每次使用最长的TS;中间足趾距离(IT)即第2趾到第4趾的连线距离,每次使用最长的IT。将上述参数代入公式:

$$SFI=109.5\times(E_{TS}-N_{TS})/N_{TS}-38.3\times(E_{PL}-N_{PL})/N_{PL}+13.3\times(E_{IT}-N_{IT})/N_{IT}-8.8$$

公式计算结果0为正常;-100为神经完全损伤,功能丧失。伤侧以爪背拖行者,SFI为-100。

1.4.2 神经电生理检测 按参考文献[2]进行。分离大鼠坐骨神经,于神经损伤处近端置入3个相距5 mm的刺激电极,由近到远分别标记为S1、S2、S3,刺激时使正极在神经干近端,于胫前肌肌腹中插入2个引导电极和一个接地电极。先在S1、S2处运用不同强度的电流刺激神经,记录刺激脉冲开始时到肌肉动作电位产生的时间(刺激神经干诱发出动作电位的潜伏期)。同样再在S2、S3进行刺激和测定。根据数据计算神经传导速度(nerve conduction velocity, NCV)。

神经传导速度=近端刺激点与远端刺激点的距离/(近端点刺激时诱发电位的潜伏期-远端点刺激时诱发电位的潜伏期)

1.4.3 Western blot检测NGF蛋白表达水平 按照100 mg组织1 ml细胞裂解液的比例,4 ℃冰浴匀浆,提取总蛋白。以核酸蛋白定量仪进行蛋白定量。每孔加入40 μg蛋白进行12% SDS-PAGE凝胶电泳,蛋白电泳转移仪将分离后的蛋白条带转至NC膜上,封闭液室温封闭2 h,按1∶200分别加入兔抗鼠NGF多克隆抗体(Santa Cruz)和兔抗鼠β-actin多克隆抗体(Santa Cruz),37 ℃孵育2 h,PBST洗膜,按1∶400加入羊抗兔二抗(北京中杉金桥),37 ℃孵育2 h,化学发光试剂反应2 min,发光成像仪取像并测定条带灰度值。以目的条带与内参条带光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.5 统计学方法

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 坐骨神经功能指数检测

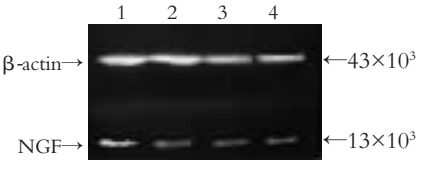
坐骨神经功能检测显示Ad-NGF组坐骨神经功能指数(-32.62±1.86)明显优于NGF组(-39.26±1.93)、空病毒组(-51.99±2.46)和NS组(-58.92±2.91)($P<0.05$)。

2.2 神经电生理检测

神经电生理检测显示Ad-NGF组神经传导速度[(37.02±1.91)m/s]明显优于NGF组[(29.72±1.47)m/s]、空病毒组[(26.08±1.39)m/s]和NS组[(26.29±1.56)m/s]($P<0.05$)。

2.3 Western blot检测各组坐骨神经NGF蛋白表达水平

手术后第31天,Western blot检测4组β-actin杂交条带亮度相似,位于13×10^3蛋白条带位置均呈现NGF特异性蛋白杂交条带的表达,但亮度有明显差异:Ad-NGF组蛋白条带亮度明显高于其余3组(图1)。用NGF灰度值/β-actin灰度值反应NGF蛋白的相对表达量。ImageMsater TotalLab图像系统分析显示,Ad-NGF组表达量(52.15±2.59)显著高于NGF组(30.31±1.67)、空病毒组(23.86±1.44)及NS组(26.07±1.52)。



1:Ad-NGF组;2:NGF组;3:空病毒组;4:NS组

图1 Western blot检测NGF蛋白表达水平

3 讨论

随着显微外科的不断发展,神经解剖结构的恢复已经成为可能,但周围神经损伤后功能恢复是临床仍未解决的一大难题,其主要原因是神经元的死亡和继发性损害的不断加重。NGF是神经系统中最重要的生物活性物质之一,对神经系统的发育及促进再生等方面均有重要的生物学作用[5]。NGF可调控氨基酸和小分子的摄入,增强功能蛋白和结构蛋白质合成,促进

神经修复与再生的功能[6]。研究发现神经组织存在两种 NGF 受体,即高亲和力受体(TrkA)和低亲和力受体(p75)。NGF 通过与其受体结合发挥其生物学作用。

NGF 及其受体在正常周围神经组织中处于不表达或低表达状态,在神经损伤后表达升高。这种损伤作为一种刺激信号启动 NGF 及其受体的合成[7]。周围神经损伤后,损伤远端 NGF 及其受体各自的分子及 mRNA 水平显著增高,几小时内轴突即可再生[8]。神经损伤后雪旺细胞(Schwann cell,SC)膜上再表达的 NGF 受体(NGFR)属于 p75,再生神经轴突膜上表达的是 TrkA,SC 分泌的 NGF 或其他靶细胞源性 NGF 先结合在 SC 表面的 p75 受体上,并在此聚集存贮,当近端神经再生轴突生长锥接触到 SC 表面时,NGF 随即从 p75 受体上脱落,与轴突膜上的 TrkA 受体结合,进而被吞饮入轴突内,经逆行轴浆运输到细胞体,与细胞核上的受体结合,从而调节神经元代谢,维持损伤神经元存活[9]。SC 上低亲和力受体与轴突生长锥上高亲和力受体对 NGF 的脱落、结合,再脱落的过程,加上生长锥与局部基底膜、SC 膜表面其他粘连分子如层粘蛋白、纤粘蛋白,神经节苷脂及基质成分等共同作用,在再生轴突前方扩散形成一个浓度梯度,引导生长锥沿 SC 细胞膜表面向前生长,并与靶细胞建立联系,最终使再生轴突成熟及髓鞘化,达到完全再生和恢复功能的目的[10]。同时,NGF 可作用于雪旺细胞,使其释放内源性神经诱导因子,促进髓鞘的形成,加速轴突的成熟与恢复。此外,NGF 还被认为可介导神经元许多结构蛋白和脂质的合成增加,这些产物被运输到轴突远端为轴突生长提供原料。给新生的大鼠脑内连续 7 ~ 10 d 注入 NGF,发现从交感神经节神经细胞体上伸展出神经纤维,该纤维通过脊神经节进入脊髓,并向着注射 NGF 的方向生长。另外实验表明 NGF 是一类引导神经生长锥移动的分子,从而决定神经轴突的延伸方向,这种延伸方向由 NGF 的浓度梯度决定[11]。

目前临床中 NGF 的常用给药方式包括皮下或腹腔内注射、肌肉或静脉注射及损伤神经局部显微注射等。但由于 NGF 活性半衰期较短,在水溶液中活性丢失快,且易受湿度、酸碱度等多种因素的影响,全身应用将被快速灭活,局部分次给药又无法保证每次给药部位的准确性,因此对于周围神经损伤中 NGF 的给药方式尚在不断探索中。

腺病毒作为基因治疗载体具有基因结构、功能清楚,易于制备、纯化、浓缩,宿主范围广,感染率高,理化性质稳定,不整合宿主基因组(这样既避免了插入突变,又保证了转入基因的正常表达),既可以转染分裂期细胞又能转染静止期细胞等优点。实验发现腺病毒局部注射可有效转染 SC 细胞,并持续表达 1 个月以上,且对 SC 的生理功能无影响[12]。

本研究显示采用 Ad-NGF 局部注射较 NS 组、空病毒组和 NGF 组可显著增加局部 NGF 蛋白质合成水平,改善大鼠坐骨神经功能指数和神经传导速度。研究结果还提示在经过 3 次局部注射后,局部 NGF 可持续高水平表达超过 30 d。

综上所述,我们推测:携带神经生长因子基因序列的 5 型腺病毒 Ad-NGF 与常规给药途径相比能将 NGF 基因转移至受损神经 SC,在损伤神经局部持续大量地表达 NGF,并通过 NGF 的有效表达来促进周围神经再生。

参考文献:

[1] Micera A, Puxeddu I, Aloe L, *et al*. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(5): 369 - 374.

[2] 高延明, 李靖年, 王鸿飞, 等. 局部连续应用神经生长因子对周围神经修复与再生的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(4): 664 - 666.

[3] 王春毅, 傅仲学. Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(13): 1293 - 1297.

[4] 武　震, 刘晓化, 李魁章, 等. 银杏叶提取物对坐骨神经再生的影响[J]. 中国骨伤, 2005, 18(8): 480 - 482.

[5] Aloe L. Rita Levi-Montalcini and the discovery of nerve growth factor: past and present studies[J]. Arch Ital Biol, 2003, 141(2 - 3): 65 - 83.

[6] Diensthuber M, Lenarz T, Stover T. Neurotrophic factor expression in vestibular schwannoma. An overview[J]. Laryngorhinootologie, 2006, 85(10): 731 - 737.

[7] Gao X, Dauqherty R L, Tourtellotte W G. Regulation of low affinity neurotrophin receptor (p75(NTR)) by early growth response (Egr) transcriptional regulators[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 36(4): 501 - 514.

[8] Wild K D, Bian D, Zhu D, *et al*. Antibodies to nerve growth factor reverse established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 322(1): 282 - 287.

[9] Bennet M R, Gibson W G, Lemon G. Neuronal cell death, nerve growth factor and neurotrophic models: 50 years on[J]. Auton Neurosci, 2002, 95(1 - 2): 1 - 23.

[10] Tomita K, Kubo T, Matsuda K, *et al*. The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury[J]. Glia, 2007, 55(11): 1199 - 1208.

[11] Levi-Montaleini R, Skaper S D, Dal-Toso R, *et al*. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine[J]. Trends Neurosci, 1996, 19(11): 514 - 520.

[12] Zhu J Y, Huang Y T Zhu Q S, *et al*. Expression of adenovirus-mediated neurotrophin-3 gene in Schwann cells of sciatic nerve in rats[J]. Chin J Traumatol, 2003, 6(2): 75 - 80.

(编辑　汪勤俭)