文章编号:1000-5404(2010)22-2383-06

论著

脑源性神经营养因子基因转染修复大鼠坐骨神经损伤的组织学观察及功能评价

李培建[1],李兵仓[2] (100700 北京,北京军区总医院神经外科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

【摘要】 目的 观察重组腺病毒载体 AxCA-BDNF 转染大鼠损伤坐骨神经后的脊髓前角运动神经元存活、神经生长和功能恢复情况。**方法** 将90只成年 Wistar 大鼠分成3组,AxCA-BDNF 转染组(硅胶管内置 AxCA-BDNF 原液)、BDNF 组(硅胶管内置 BDNF 溶液)和对照组(硅胶管内置空白病毒稀释液),每组30只,另取5只 Wistar 大鼠作为正常组。应用组织学图像分析技术对脊髓前角运动神经元和新生神经纤维进行计数,对新生神经髓鞘厚度进行测量分析;应用足印分析和电生理检查技术,从功能角度判定 BDNF 基因转移的生物效应。**结果** 在3、7、14 d 及1个月4个时相点,光镜、电镜病理组织学检查和图像分析证实,AxCA-BDNF 转染组和 BDNF 组脊髓前角运动神经元存活的数量、新生神经纤维数目及其髓鞘厚度均明显优于对照组($P<0.01$);HRP 逆行示踪也证实神经联接的再形成优于对照组($P<0.01$);在坐骨神经功能指数测定、神经传导速度和复合肌肉动作电位振幅等神经功能恢复指标上,AxCA-BDNF 转染组和 BDNF 组均优于对照组($P<0.01$)。**结论** 应用腺病毒介导的 BDNF 基因转移,不仅能促进损伤神经纤维再生,也能保护损伤的脊髓神经元,大鼠的神经功能得到了明显改善。

【关键词】 坐骨神经损伤;重组腺病毒;脑源性神经营养因子;基因转染;免疫组织化学;坐骨神经功能指数
【中图法分类号】 R651.3;R322.85;R394.2 **【文献标志码】** A

Effect of adenovirus-mediated BDNF transfer on sciatic nerve injury in rats and functional evaluation

Li Peijian[1], Li Bingcang[2] ([1]Department of Neurosurgery, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injuries, Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【Abstract】 Objective To observe the peripheral nerve regeneration of injured sciatic nerve after adenovirus-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adult rats. Methods Totally 90 Wistar rats were inflicted to sciatic nerve injury by cutting off a nervous fragment of 10 mm. and then divided into 3 group. A silicone tube containing AxCA-BDNF solution, BDNF solution, or AxCA buffer was grafted as a support to bridge adult rat sciatic nerve gap for the 3 groups correspondingly, Another 5 rats with no any injury served as normal control. In 3, 7, 14 d and 1 month after injury, the rats were sacrificed and their lumbar vertebra (L_3 to L_6) were resected for frozen section. The number of new nerve fibers and motoneurons in anterior horn of the spinal cord was observed with transmission electron microscopy (TEM), histomorphometry and image analysis, and the myelin sheath thickness of the new nerve fibers was measured. The sciatic nerve function recovery was evaluated with sciatic function index (SFI) and the electrophysiological parameters, including the nerve conduction velocity (NCV) and compound muscle action potential (CMVP) amplitude. Results There were more survival neurons, new nerve fibers and thicker myelin sheath in AxCA-BDNF group and BDNF group than in the control group ($P<0.01$). Retrograde axonal transport of HRP tracer indicated that the injured sciatic nerve reconnected with neurons in spinal cord were better in AxCA-BDNF group and BDNF group than in the control group ($P<0.01$). So were the SFI, NCV and CMVP amplitude ($P<0.01$) in the 2 BDNF groups. Conclusion Adenovirus-mediated gene transfer of BDNF *in vivo* not only promotes nerve regeneration but also protects the neurons in the spinal cord for sciatic nerve injury in adult rats.

【Key words】 sciatic nerve injury; recombinant adenovirus; BDNF; gene transfer; immunocytochemistry; sciatic function index

Supported by the Special Fund of National Basic Research Program (973 Program, G1999054206). Corresponding author: Li Bingcang, Tel: 86-23-68757469, E-mail: bcli1118@yahoo.com

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划,G1999054206)
【通信作者】 李兵仓,电话:(023)68757469,E-mail:bcli1118@yahoo.com

周围神经损伤后能成功地再生主要取决于神经元胞体的存活,神经远断端的存在,轴突进入相应的内膜管以及与正确的靶器官建立再联系。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)可促进多种神经元的发育和再生,对损伤神经元具有挽救和保护作用[1-3]。该因子的基因结构已经被确定。为了观察携带小鼠 BDNF cDNA 表达片段的重组腺病毒载体 AxCA-BDNF 转染大鼠坐骨神经后对神经再生修复的影响,我们进行了基因表达方面的研究[4],在此基础上,本研究对脊髓前角运动神经元和新生神经纤维进行计数,对新生神经髓鞘厚度进行测量分析,评价大鼠坐骨神经损伤处理后脊髓前角运动神经元存活和神经生长情况,并应用足印分析和电生理检查技术,测定坐骨神经功能指数(sciatic nerve function index, SFI)、坐骨神经传导速度(nerve conduction velocity, NCV)和复合肌肉动作电位(compound muscle action potential, CMVP),从功能角度判定 AxCA-BDNF 转染大鼠损伤坐骨神经后对神经再生修复的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备及试剂

甲苯胺蓝(北京化学试剂公司),冰冻切片机,石蜡切片机,光学显微镜,电子显微镜,恒温水温箱,恒温烤箱,微量移液器;APES,多聚甲醛,戊二醛,大鼠足印行走箱(自制),碳素墨水(市售),八道电生理仪(Power Lab/8sp AD Instruments, Australia)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 90 只 Wistar 大鼠(雌雄不限,体质量 200 g 左右,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),用 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,俯卧位固定。在大鼠右侧股后部作纵行切口,无菌条件下显露坐骨神经,自股中部切除 10 mm 坐骨神经;用医用硅胶管 15 mm 桥接坐骨神经两断端。90 只大鼠分为 3 组:AxCA-BDNF 转染组(硅胶管内置 AxCA-BDNF 原液)、BDNF 组(硅胶管内置 BDNF 溶液)和对照组(硅胶管内置空白病毒稀释液),每组 30 只。另取 5 只 Wistar 大鼠作为正常组:不切断坐骨神经,也不进行任何干预。

1.2.2 灌注固定和组织切片制备 分别在术后 3、7、14 d,1、2、4 个月,共 6 个时相点,各组取动物 5 只进行灌注。灌注结束后,取坐骨神经及相应腰段(L_3 ~ L_6)脊髓,在固定液中 4 ℃后固定 6 h。组织后固定的洗涤采用 DEPC 水多次换水浸泡。需作冰冻切片的标本,再入 30% 蔗糖液中浸泡,直至组织块沉至瓶底。脊髓标本横断面,坐骨神经标本纵切面,石蜡切片厚度 5 μm,冰冻切片厚度 15 μm。

1.2.3 病理学观察及图像分析 脊髓标本采用甲苯胺蓝神经元尼氏小体染色方法,坐骨神经标本采用甲苯胺蓝髓鞘染色法,进行光镜检测。透射电子显微镜观察损伤的坐骨神经病理改变和新生神经的生长情况。图像分析采用 MIG2000 图像分析测量系统对手术侧和正常侧脊髓前角运动神经元进行计数,计算手术侧和正常侧的比值(×100);对新生神经纤维有髓神经纤维总数和正常侧坐骨神经有髓神经纤维进行计数(×100);对新生神经和正常神经髓鞘厚度进行测量分析(×200)。

1.2.4 辣根过氧化物酶(HRP)神经逆行示踪 分别在术后 1、2、4 个月取 AxCA-BDNF 转染组、BDNF 组和对照组大鼠各 5 只,麻醉后显露正常侧和实验侧坐骨神经,用 25 μl 微量注射器斜形刺入神经远端,双侧坐骨神经各注入 8 μl CB-HRP(质量浓度:辣根过氧化物酶 1 μg/μl,霍乱素 B 0.42 μg/μl),动物存活 60 ~ 72 h 后,在麻醉下进行 4% 多聚甲醛灌注固定,取 L_3 ~ L_6 脊髓节段,4 ℃后固定 6 h,30% 蔗糖液中浸泡至组织块沉底,冰冻切片,切片厚度 35 μm。四甲基联苯胺/硝普钠(TMB/SNP)显色后,每只动物取脊髓(L_3 ~ L_6)横断面切片 4 张,采用 MPI-AS2000 多媒体彩色病理图文分析系统(×200),计数具有胞核或胞体轮廓完整、突起明显的 CB-HRP 标记神经元,计算实验侧与正常侧标记神经元数的比值(轴突再生神经元的百分率)。

1.2.5 坐骨神经功能指数(SFI)测定 3 组动物术前及术后每 10 天进行 SFI 的测定,直至术后 4 个月。自制宽 8.5 cm,长 50 cm,一侧开门的大鼠足印行走箱。将白纸裁成与行走相等长、等宽尺寸放在箱底。在培养皿内放入少许棉花,倒入适量碳素墨水使棉花浸湿,将大鼠后足在培养皿内蘸一下,放入行走箱的一端,让其自行走向箱的另一端,并从侧门走出。每侧足能留下 3 或 4 个足印。选用实验足(E)、正常侧足(N)、足印测量 3 个变量。根据公式计算 SFI(0 为正常值,-100 为神经完全离断)。计算 1、2、3、4 个月 SFI 的恢复率(%)。将上述 3 个变量代入 Bain 公式[5],计算 SFI。

$$SFI = -38.3\left(\frac{EPL-NPL}{NPL}\right)+109.5\left(\frac{ETS-NTS}{NTS}\right)+13.3\left(\frac{EIT-NIT}{NIT}\right)-8.8$$

公式中 EPL:实验侧足印长度;NPL:正常侧足印长度;ETS:实验侧足印宽度;NTS:正常侧足印宽度;EIT:实验侧中间足趾距离;NIT:正常侧中间足趾距离。

1.2.6 神经电生理检查 分别于 1、2、4 个月将 3 组动物用 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,俯卧位固定。无菌条件下在大鼠实验侧(右侧)及正常大鼠右侧股后部均做纵行切口,解剖原手术部位,游离硅胶管及上下段部分神经。应用八道电生理仪进行测定,记录电极采用双极针形电极,于踝关节上方 10 mm 处插入腓肠肌腹中部,两极排列方向与腓肠肌肌纤维方向一致,两极尖端相距 2 mm,深度为 5 mm。用接地线钳夹皮肤并接地。将两刺激电极置于硅胶管套接体近端神经,两极相距 2 mm。调节好电极刺激近侧端神经,找出引起诱发动作电位的阈值及最大刺激后再重复刺激数次,待示波荧光屏显示的诱发复合动作电位图形稳定,伪迹及动作电位起点清楚后冻结图形,读取各潜伏期、复合肌肉动作电位 CMVP(mV)振幅。最后测量刺激电极与记录电极之间沿神经走向的距离,计算运动神经传导速度:NCV(m/s) = 距离/传导时间;传导时间 = 肌肉动作电位潜伏期 - 刺激波潜伏期。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析,多样本均数的两两比较采用 LSD 法。

表 1　大鼠坐骨神经损伤后各组实验侧与正常侧脊髓前角尼氏体阳性神经元数的比值（%，$\bar{x} \pm s$，$n=5$）

组别	3 d	7 d	14 d	1 个月	2 个月	4 个月
AxCA-BDNF 转染组	92.34 ±4.58[a]	90.36 ±6.51[a]	84.89 ±4.85[a]	80.42 ±5.28[a]	81.63 ±5.16[a]	82.54 ±4.96[a]
BDNF 组	93.66 ±5.21[a]	91.65 ±5.74[a]	85.16 ±6.88[a]	79.97 ±6.22[a]	80.68 ±4.77[a]	81.87 ±5.14[a]
对照组	86.71 ±3.67	83.43 ±5.62	77.65 ±5.81	70.24 ±6.51	71.58 ±4.65	72.25 ±4.32

a：$P<0.01$，与对照组比较

2　结果

2.1　坐骨神经标本大体观察

术后 3、7 d 硅胶管内可见淡红色胶冻样物质，术后 14 d 可见纤细浅红色条索状物把坐骨神经两断端连接起来；术后 1～4 个月硅胶管内再生神经逐渐变粗、变韧，呈两端膨大中间略细的哑铃形。

2.2　脊髓及坐骨神经标本光镜检查

脊髓标本石蜡切片经甲苯胺蓝尼氏体染色，脊髓神经元细胞核呈淡蓝色，尼氏小体为深蓝色，背景无色（图 1）。经图像分析和统计学处理的结果显示，各时相点实验侧与正常侧脊髓前角尼氏体阳性神经元数的百分比值，AxCA-BDNF 转染组和 BDNF 组均高于对照组（$P<0.01$，表 1）。坐骨神经标本半薄切片经甲苯胺蓝液染色，髓鞘呈深蓝色，显示清晰，各组手术侧有髓神经纤维与正常侧存在着显著差异（图 2）。术后 1 个月手术侧神经纤维数量明显少于正常侧，轴突直径小于正常侧，髓鞘厚度较薄，形态较不规则，排列稀疏。随着术后的恢复至 4 个月，上述指标均有明显的改善，手术侧神经纤维数量明显增加，轴突增粗，髓鞘增厚，形态较规则，排列更为紧密。图像分析和统计学处理的结果显示：各个时相点，AxCA-BDNF 转染组和 BDNF组的新生神经中段有髓神经纤维总数多于对照组（表 2），轴突直径、髓鞘厚度均大于对照组（表 3），提示 AxCA-BDNF 转染组和 BDNF 组新生神经轴突及髓鞘的再生情况优于对照组。

2.3　坐骨神经标本电镜观察

术后第 3 天各组动物损伤坐骨神经近、远端轴突及髓鞘变性崩解，髓鞘碎片包裹崩解的轴突碎块形成卵圆体，可见残余的雪旺细胞及其褶皱的基膜；第 4 天雪旺细胞增生肥大，在神经内膜管内成群排列，形成 Büngner 细胞索。5 d 后雪旺细胞增生并浸润到轴突之间，包绕轴突。有髓神经纤维的雪旺细胞盘旋缠绕轴突，开始重新形成髓鞘的分层结构。无髓神经纤维的变性与有髓神经纤维的改变相似，但不伴有雪旺细胞的变化。轴突、髓鞘和雪旺细胞等的变性以远端神经为重。各组远近端神经的伤后变性程度未观察到明显差别，但 AxCA-BDNF 转染组和 BDNF 组近断端轴突中积累的大量囊泡、内质网、线粒体及分层小体等明显多于对照组。术后 1～2 个月，各组损伤神经近、远端和硅胶管内新生神经均可观察到再生的有髓神经纤维和无髓神经纤维，近端多于远端和新生神经。再生的有髓神经纤维被雪旺细胞盘旋包绕形成髓鞘，再生的无髓神经纤维亦被雪旺细胞所包围。术后 4 个月，再生神经纤维数量增多、髓鞘增厚、轴突增粗，AxCA-BDNF 转染组和 BDNF 组的新生神经纤维的形态结构接近于正常，无论是有髓及无髓神经纤维的数量、轴突直径、髓鞘厚度，还是轴突内线粒体和内质网的形态、数量等均优于对照组，这在损伤神经远、近端和新生神经中情况基本相同（图 3）。

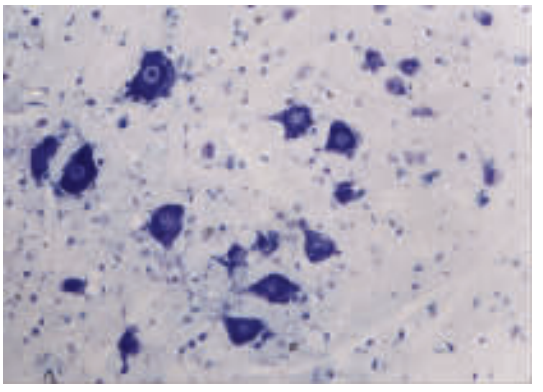
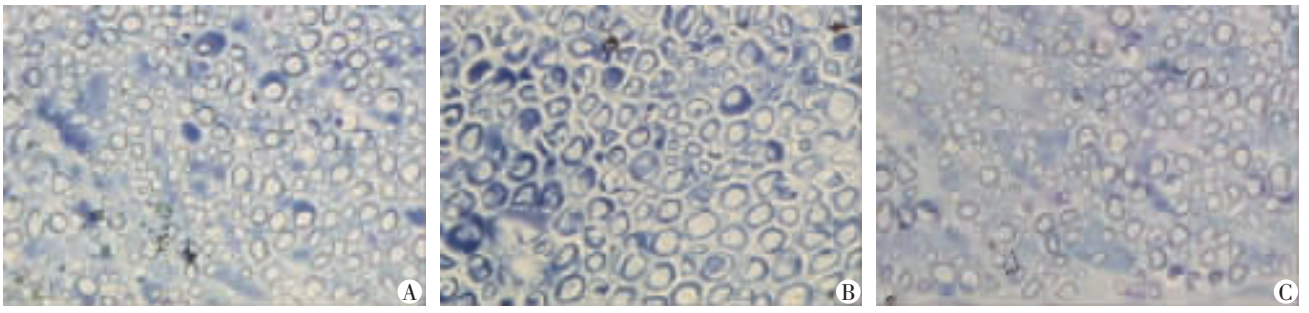


图 1　AxCA-BDNF 转染组坐骨神经损伤 2 个月脊髓前角运动神经元甲苯胺蓝尼氏体染色观察（LM ×200）

表 2　大鼠坐骨神经损伤后各组再生神经中段有髓神经纤维总数（条，$n=5$，$\bar{x} \pm s$）

组别	1 个月	2 个月	4 个月
正常组	4 385 ±521	4 385 ±521	4 385 ±521
AxCA-BDNF 转染组	2 705 ±397[ab]	3 276 ±470[ab]	3 651 ±532[ab]
BDNF 组	2 698 ±404[ab]	3 269 ±474[ab]	3 668 ±504[ab]
对照组	1 726 ±366[b]	2 117 ±375[b]	2 452 ±401[b]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与正常组比较



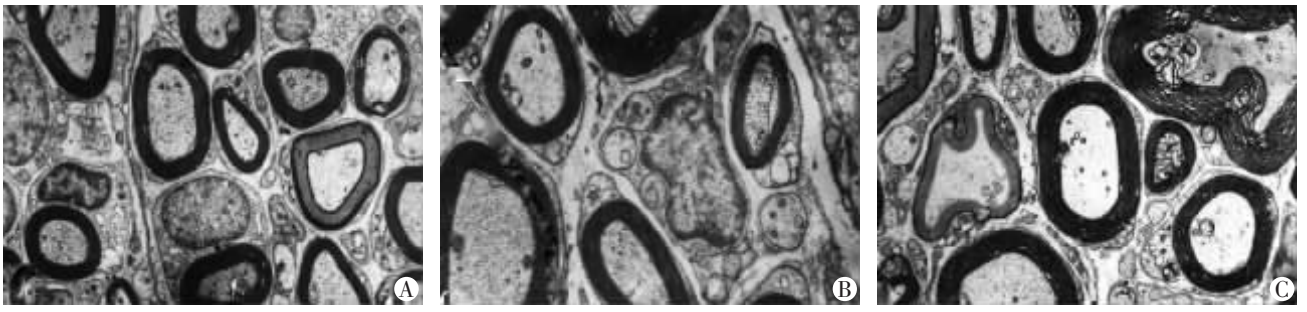
A：AxCA-BDNF 转染组（×200）；B：BDNF 组（×200）；C：对照组（×100）

图 2　坐骨神经损伤 4 个月后各组新生神经纤维髓鞘甲苯胺蓝染色观察　（LM）

表3　大鼠坐骨神经损伤后各组再生神经中段有髓神经纤维轴突直径和髓鞘厚度（μm，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

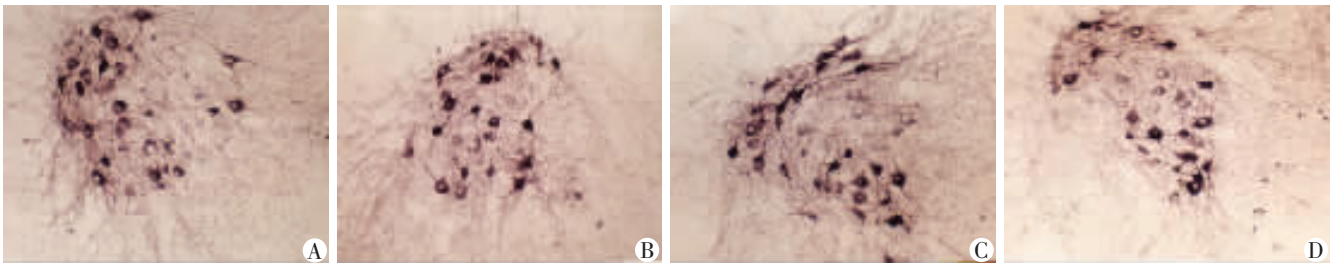
组别	轴突直径			髓鞘厚度		
	1个月	2个月	4个月	1个月	2个月	4个月
正常组	4.52±0.45	4.52±0.45	4.52±0.45	1.46±0.24	1.46±0.24	1.46±0.24
AxCA-BDNF转染组	2.59±0.28^{ab}	3.07±0.37^{ab}	4.15±0.32^{a}	0.75±0.12^{ab}	1.02±0.15^{ac}	1.29±0.17^{a}
BDNF组	2.48±0.31^{ab}	2.99±0.41^{ab}	4.08±0.34^{a}	0.77±0.14^{ab}	0.98±0.12^{ab}	1.31±0.21^{a}
对照组	1.78±0.22^{b}	2.05±0.26^{b}	3.14±0.28^{b}	0.47±0.11^{b}	0.71±0.13^{b}	0.93±0.11^{b}

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与正常组比较



A：AxCA-BDNF转染组（×3 000）；B：BDNF组（×4 000）；C：对照组（×4 000）

图3　坐骨神经损伤4个月后各组透射电镜观察



A：正常组；B：AxCA-BDNF转染组；C：BDNF组；D：对照组

图4　HRP神经逆行示踪后各组脊髓灰质前角TMB染色阳性标记的运动神经元突起呈树枝状（TMB ×200）

2.4　HRP神经逆行示踪结果

在光学显微镜下观察，脊髓灰质前角阳性标记的运动神经元呈蓝色，其突起呈树枝状（图4）。无论是CB-HRP标记神经元数目还是轴突再生神经元的百分率，AxCA-BDNF转染组和BDNF组在各时相点上均显著高于对照组（表4）。

表4　大鼠坐骨神经损伤后各组HRP标记神经元实验侧与对照侧的比值（%，$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	1个月	2个月	4个月
AxCA-BDNF转染组	33.47±5.63^{a}	65.92±7.14^{a}	75.11±7.34^{a}
BDNF组	34.15±6.27^{a}	66.24±8.03^{a}	74.86±6.91^{a}
对照组	21.78±3.18	47.36±7.35	58.65±6.24

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.5　坐骨神经功能指数（SFI）的恢复率

术后1～4个月，各组动物SFI均有明显恢复，但AxCA-BDNF转染组和BDNF组的SFI恢复率明显优于对照组（$P<0.01$，表5）。

表5　大鼠坐骨神经损伤后各组SFI恢复率（%，$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	1个月	2个月	3个月	4个月
AxCA-BDNF转染组	24.18±3.11^{a}	35.06±4.26^{a}	44.59±3.97^{a}	48.82±3.42^{a}
BDNF组	23.82±3.23^{a}	35.19±4.33^{a}	43.14±3.95^{a}	49.29±3.31^{a}
对照组	14.98±2.97	26.28±2.17	35.67±4.03	40.81±3.99

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.6　神经电生理检查结果

大鼠坐骨神经损伤后1、2、4个月，各组动物坐骨神经电生理检测结果显示，在NVC和CMVP振幅指标上，AxCA-BDNF转染组和BDNF组均优于对照组（$P<0.01$，表6）。

表6　大鼠坐骨神经损伤处理后各组动物神经传导速度和复合肌肉动作电位（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	NVC（m/s）			CMVP（mV）		
	1个月	2个月	4个月	1个月	2个月	4个月
正常组	44.83±4.72	44.83±4.72	44.83±4.72	18.26±2.05	18.26±2.05	18.26±2.85
AxCA-BDNF转染组	15.46±2.34^{ab}	26.41±3.30^{ab}	35.83±3.25^{ab}	6.12±0.66^{ab}	10.37±1.07^{ab}	14.11±1.65^{ab}
BDNF组	14.79±2.67^{ab}	27.16±3.95^{ab}	35.74±3.11^{ab}	6.08±0.53^{ab}	9.83±1.12^{ab}	13.84±1.77^{ab}
对照组	9.32±1.51^{b}	18.54±2.61^{b}	27.16±3.27^{b}	3.15±1.43^{b}	5.49±1.98^{b}	9.31±1.23^{b}

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与正常组比较

3 讨论

周围神经损伤修复后如何促进再生,提高神经损伤后的治疗效果,一直是基础和临床研究的热点。随着基因工程技术的迅速进步,基因治疗将有可能成为解决这一问题的主要手段之一。从技术的角度来说,基因治疗的关键条件是合适的目的基因、适宜的基因载体和有效的转移途径。腺病毒(adenovirus, Ad)重组载体能高效、安全地将外源基因导入静止或终末分化细胞(包括雪旺细胞和神经元),因而在神经系统基因治疗中得到广泛应用[6-9]。体内直接转基因技术是将含外源基因的重组病毒、脂质体或裸露的DNA等直接导入体内,不需要中介细胞的参与,操作简便,更接近于临床。已知神经营养因子由靶器官、雪旺细胞及神经元等自分泌或旁分泌,可经轴突进行逆行和顺行运输。很多实验证实腺病毒能有效转染雪旺细胞,采用Ad介导,将神经营养因子(NTFs)基因直接转移至在体受损周围神经的雪旺细胞,通过目的基因的有效表达来促进周围神经再生的可行性[10-13]。

周围神经损伤基因治疗的目的是保护受损伤的神经元和促进轴突再生。尽管周围神经损伤部位是在轴突部分,但不可避免地要殃及神经元胞体。一般认为,神经损伤后,相应的神经元会出现溃变、死亡或在短期退变后再恢复正常。有两种因素对胞体的影响较大:一是生物体的年龄;二是损伤部位与胞体的距离。目前较为一致的观点是动物的年龄越低,周围神经损伤后对胞体的影响越大,而且损伤部位越靠近中枢对神经元的影响越重。

中枢神经元的存活是周围神经再生的基础和先决条件,NTFs不仅对生长发育和损伤的各类神经元均具有支持和保护作用,也能挽救濒死的神经元[14,15]。研究证实,BDNF对周围和中枢神经元具有广谱作用,但局部或全身一次性应用BDNF仅能在神经切断的2周内暂时拯救运动神经元[16,17]。应用基因治疗能避免重复注射而得到BDNF的持续表达,在较长的时间内保护中枢神经元。本实验应用携带BDNF基因表达片段的重组腺病毒载体AxCA-BDNF,直接神经内注射修复大鼠坐骨神经损伤后,脊髓前角尼氏体染色结果显示,AxCA-BDNF转染组、BDNF组和对照组动物坐骨神经损伤侧的阳性神经元数在各时相点均低于正常对照侧,其中AxCA-BDNF转染组和BDNF组实验侧与正常侧阳性神经元数的比值均高于对照组,可能与BDNF的表达和局部应用有关,而对照组神经元的数量明显低于正常和其他两组的水平,则说明周围神经损伤需要对中枢神经元加以保护的重要性。

本实验结果显示,AxCA-BDNF转染组和BDNF组坐骨神经轴突及髓鞘的再生情况明显优于单纯硅胶管套接的对照组,表明BDNF的表达和局部应用能明显的促进损伤神经轴突的再生。在损伤神经远、近端和新生神经中,AxCA-BDNF转染组和BDNF组无论是有髓及无髓神经纤维的数量、轴突直径、髓鞘厚度,还是轴突内线粒体和内质网的形态、数量等均优于对照组,显示腺病毒介导的BDNF过表达和直接局部应用BDNF减轻了神经元损伤,促进了轴突生长代谢和加速了损伤神经的修复。

尼氏体是神经元内含有的特异性嗜色质,尼氏小体的存在或减少,表示神经元的正常或异常状态,当神经元遭受不能恢复的损害,尼氏小体消失,神经元退变,故一般习惯借尼氏体来辨认或鉴定神经元的存在和它们的分布及是否发生病理性改变。本实验应用甲苯胺蓝进行脊髓标本石蜡切片的尼氏体染色和再生神经半薄切片的髓鞘染色,光镜下观察脊髓前角运动神经元数目、再生有髓神经纤维的数量和髓鞘的厚度,结构清晰、简单易行。

HRP逆行示踪显示神经纤维与脊髓神经元的联系和周围神经再生有其准确性和特异性。本实验在正常侧和实验侧坐骨神经远端注入CB-HRP后,不仅清晰标记了脊髓前角运动神经元,计数结果也显示AxCA-BDNF转染组和BDNF组神经元的数目和实验侧标记神经元占正常侧的百分比值在各时相点上显著多于对照组。这说明BDNF基因转染不仅提高了神经纤维再生的数量,也促进了神经联接的再形成。再生神经纤维的数量和神经联接的再形成,一方面反映了神经元的存活状态,另一方面则反映了神经元的自我修复能力,因而进一步证实转染的BDNF基因不仅提高了神经纤维的再生能力,也保护了相应的神经元胞体。BDNF基因转染后1、2、4个月,AxCA-BDNF转染组实验侧与正常侧标记神经元的比值分别为(33.47±5.63)%、(65.92±7.14)%和(75.11±7.34)%,与此同时,局部应用BDNF后,百分比值也逐步提高,证明基因转移后表达的BDNF与局部应用的BDNF具有同样的生物效应。至于为什么HRP标记神经元没有完全达到正常侧的水平,这仍然和神经元的功能状态及神经纤维的再生能力有关,表明BDNF基因转移虽然保护了脊髓神经元,提高了神经纤维的再生能力,但不能达到完全正常的水平。因而,联合基因转移和探索更有效的措施,应是未来的努力方向。

SFI除反应下肢肌力恢复情况外,还可反应下肢

各肌肉间的协调功能,并可随时动态观察,不需处死动物,被认为是非常有价值的评价坐骨神经再生的检查方法。本实验结果显示,各组大鼠的SFI自术后20 d开始恢复,20 d至3个月恢复明显,3~4个月恢复趋于平缓。AxCA-BDNF转染组和BDNF组的SFI恢复率在各时相点上与对照组的相比,均有非常显著的差异($P<0.01$),但AxCA-BDNF转染组和BDNF组之间的SFI恢复率差异不显著($P>0.05$),说明基因转移后所表达的BDNF与局部应用的BDNF一样,使再生的神经功能得到了一定程度的恢复,进而不同程度的恢复了下肢肌力和下肢各肌肉间的协调功能。

神经电生理学检测是评价周围神经再生与功能恢复的基本方法之一。其中NCV和CMVP的出现表明再生轴突已通过吻合口,且已到达靶器官,并随着再生神经纤维髓鞘的形成、直径的增粗和数量的增多,NCV逐渐加快、CMVP振幅逐渐增高,因此二者与神经纤维的再生呈正比关系。本实验对NCV和CMVP的测定结果显示,各时相点AxCA-BDNF转染组和BDNF组的测定值均优于对照组,说明BDNF基因转染后的确提高了神经再生能力,促进了神经功能的恢复,这一结果不仅与SFI测定结果相一致,也与前述的组织形态学检查和CB-HRP追踪结果相一致。从神经电生理检查的测定结果也可以看出,尽管NCV和CMVP较对照组有了明显的改善,但并没有完全恢复到正常大鼠的水平。这一结果再次表明,虽然转移BDNF基因所获得的生物学效应与局部直接应用BDNF基本相同,但这仅仅表明了周围神经损伤基因治疗的技术可行性和一定程度的有效性,若彻底恢复损伤神经的结构和功能,仍需在联合基因转移、转移基因的长期有效表达、基因治疗和其他神经修复技术相结合以及神经干细胞等方面做进一步探索。

参考文献:

[1] Lin G, Shindel A W, Fandel T M, *et al*. Neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor in major pelvic ganglia of young and aged rats[J]. BJU Int, 2010, 105(1):114-120.

[2] Unsain N, Nunez N, Anastasia A, *et al*. Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction[J]. Neuroscience, 2008, 154(3):978-993.

[3] Nakajima H, Uchida K, Yayama T, *et al*. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35(5):497-504.

[4] 李培建,李兵仓. 重组腺病毒载体AxCA-BDNF转染大鼠损伤坐骨神经后基因表达的检测[J]. 中华显微外科杂志, 2007, 30(3):206-208.

[5] Bain J R, Mackinnon S E, Hunter D A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat[J]. Plast Reconstr Surg, 1989, 83(1):129-138.

[6] Araki K, Shiotani A, Watabe K, *et al*. Adenoviral GDNF gene transfer enhances neurofunctional recovery after recurrent laryngeal nerve injury[J]. Gene Ther, 2006, 13(4):296-303.

[7] Hermening S, Kugler S, Bahr M, *et al*. Improved high-capacity adenoviral vectors for high-level neuron-restricted gene transfer to the CNS[J]. J Virol Methods, 2006, 136(1/2):30-37.

[8] Gaspar T, Domoki F, Lenti L, *et al*. Neuroprotective effect of adenoviral catalase gene transfer in cortical neuronal cultures[J]. Brain Res, 2009, 1270:1-9.

[9] Kim H W, Cho K J, Park S C, *et al*. The adenoviral vector-mediated increase in apurinic/apyrimidinic endonuclease inhibits the induction of neuronal cell death after transient ischemic stroke in mice[J]. Brain Res, 2009, 1274:1-10.

[10] Shi Q, Zhang P, Zhang J, *et al*. Adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor expression regulated by hypoxia response element protects brain from injury of transient middle cerebral artery occlusion in mice[J]. Neurosci Lett, 2009, 465(3):220-225.

[11] Xu K, Uchida K, Nakajima H, *et al*. Targeted retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene prevents loss of mouse (twy/twy) anterior horn neurons *in vivo* sustaining mechanical compression[J]. Spine (Phila-Pa-1976), 2006, 31(17):1867-1874.

[12] Watanabe T S, Ohtori S, Koda M, *et al*. Adenoviral gene transfer in the peripheral nervous system[J]. J Orthop Sci, 2006, 11(1):64-69.

[13] Moro K, Shiotani A, Watabe K, *et al*. Adenoviral gene transfer of BDNF and GDNF synergistically prevent motoneuron loss in the nucleus ambiguous[J]. Brain Res, 2006, 1076(1):1-8.

[14] Ciobanu C, Reid G, Babes A. Acute and chronic effects of neurotrophic factors BDNF and GDNF on responses mediated by thermo-sensitive TRP channels in cultured rat dorsal root ganglion neurons[J]. Brain Res, 2009, 1284:54-67.

[15] Lee N, Robitz R, Zurbrugg R J, *et al*. Conditional, genetic disruption of ciliary neurotrophic factor receptors reveals a role in adult motor neuron survival[J]. Eur J Neurosci, 2008, 27(11):2830-2837.

[16] Li F, Li L, Song X Y, *et al*. Preconditioning selective ventral root injury promotes plasticity of ascending sensory neurons in the injured spinal cord of adult rats possible roles of brain-derived neurotrophic factor, TrkB and p75 neurotrophin receptor[J]. Eur J Neurosci, 2009, 30(7):1280-1296.

[17] Leng J, Jiang L, Chen H, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor and electrophysiological properties of voltage-gated ion channels during neuronal stem cell development[J]. Brain Res, 2009, 1272:14-24.

(收稿 2010-05-13 修回 2010-08-12)

(编辑 汪勤俭)