维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2004年第13卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2004, Vol. 13, No. 5

·论 著·

大鼠自体移植脾组织 GAP-43⁺ 神经再生的实验研究

郭光金，王 林，蒋登金，左艳芳，张天飞
（第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室，重庆 400038）

［摘 要］ **目的** 研究大鼠自体脾组织移植术后移植脾组织 GAP-43⁺ 神经纤维再生及分布规律。**方法** 健康 Wistar 大鼠 105 只，随机分为自体脾组织移植组和对照组，于术后 7、15、30、60、90、120、180 d 取移植脾组织标本，应用免疫组化方法显示 GAP-43⁺ 神经纤维，并用图像分析系统，对不同时相点免疫组化 GAP-43⁺ 染色区域进行图像定量分析。**结果** 自体脾组织移植术后 30 d，移植脾组织周围大网膜内可见 GAP-43⁺ 神经纤维，并向移植脾组织内伸展；自体脾组织移植术后 60～120 d，移植脾组织内再生神经纤维逐渐增多；术后 180 d，移植脾组织中 GAP-43⁺ 神经纤维分布及密度接近正常。**结论** GAP-43⁺ 神经纤维于脾移植术后 60 d 开始出现，术后 180 d GAP-43⁺ 神经纤维接近正常脾。

［关键词］自体脾移植；神经再生；GAP-43；大鼠
［中图分类号］R657.6 ［文献标识码］A ［文章编号］1672－5042(2004)05－0289－03

Experimental study on regeneration of GAP-43 positive nerve fibers in splenic autotransplantation

GUO Guang-jin, WANG Lin, JIANG Deng-jin, ZUO Yan-fang, ZHANG Tian-fei
(Department of Surgical Applied Anatomy and Operative Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the regeneration of growth associated protein 43 (GAP-43) positive nerve fibers in splenic autotransplantation in rats. **Methods** Healthy Wistar rats were randomly divided into two groups: splenectomy plus splenic autotransplantation group, and sham-operation group. The regeneration of GAP-43 positive nerve fibers was observed by immunohistochemical method at 7, 14, 30, 60, 90, 120, and 180 d after operation. Computer image analysis was conducted for analysis of the density changes. **Results** The GAP-43 nerve fibers appeared in the greater omentum at 30 d after operation, and the density of nerve fibers became greater at 60-120 d and became almost normal on 180 d after operation. **Conclusion** GAP-43 nerve fibers are found in the autotransplant tissues at 60 d and become almost normal at 180 d after splenic autotransplantation.

Keywords: splenic autotransplantation; neural regeneration; GAP-43; rat

生长相关蛋白-43（growth associated protein, GAP-43）是脊椎动物神经细胞膜上的特异性磷蛋白，参与神经系统的发育、突触形成和神经再生[1]。在神经系统的发育和损伤再生中，能监测到 GAP 在 mRNA 水平上的明显升高[2]，因此可将 GAP-43 作为神经损伤修复的实验指标[3]。有关自体脾组织移植术后脾组织中 GAP-43⁺ 神经纤维的再生，目前尚未见报道。

本实验对自体脾组织移植术后脾组织中 GAP-43⁺ 神经纤维的再生变化规律进行研究，为临床和实验研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 动物分组及动物模型制作

1.1.1 动物及分组 健康 Wistar 大鼠 105 只（第三军医大学实验动物所提供），雌雄不限，体重 120～150 g，随机分为实验组（70 只）和对照组（35 只），实验组在无菌条件下行脾切除、自体脾组织移植术；对照组仅松动脾脏，不行其他手术处理。

1.1.2 动物模型制作 0.4% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（1 ml/100 g 体重）后，无菌条件下开腹，切下脾脏，展平大网膜，用 3/0 丝线沿大网膜边缘缝一荷包状囊袋备用，取脾脏中段部分约 50%，切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小颗粒状，植入大网膜囊袋中，收紧缝线，使脾组织颗粒完全包入，检查术野无出血点后关腹，术后大鼠隔离喂养。

1.2 免疫组化检测 GAP-43⁺ 神经纤维

1.2.1 标本取材及切片制备 术后 7、14、30、60、90、120、180 d 分别取对照组（每个时相点 3 只）及实验组（每个时相点 10 只）大鼠脾组织，置福尔马林溶液中固定备用。取福尔马林中固定后的脾组织，石蜡包埋、切片，片厚 5 μm。

1.2.2 免疫组化染色检测 每只大鼠取脾组织切片 5 张，行免疫组化 ABC 法抗 GAP-43 抗体（美国哈佛大学惠赠）染色，显示脾组织中 GAP-43⁺ 神经纤维，HE 轻度复染，透明树胶封片，显微镜下观察。

1.3 图像分析

采用医学图象分析系统，对不同时相点免疫组化 GAP-43⁺

［基金项目］重庆市科委攻关课题(2003)
［作者简介］郭光金(1953－)，男，四川省叙永县人，教授，主要从事脾外科方面的研究。电话：(023)68752250
［收稿日期］2004－06－18 ［修回日期］2004－08－05

维普资讯 http://www.cqvip.com

染色区域进行图象分析定量。每个时相点取切片5张，光镜下放大200倍，每张切片测试5个视野，所得数据进行统计分析。

1.4 数据分析及统计学处理

数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用SPSS数据包进行数据分析。($P<0.05$为相差显著，$P<0.01$为相差非常显著)

2 结果

2.1 GAP-43$^+$神经纤维

自体脾组织移植术后7、14 d，移植脾组织坏死、液化，无GAP-43阳性染色；自体脾组织移植术后30 d，移植脾组织周边大网膜内可见到条索状GAP-43$^+$神经纤维，向移植脾组织内伸展，移植脾组织中未见GAP-43$^+$神经纤维(图1)；自体脾组织移植术后60 d，移植脾组织周边部可见少量条索状GAP-43$^+$神经纤维，但组织中心部分仍未见到阳性神经纤维；自体脾组织移植术后90 d，GAP-43$^+$神经纤维主要分布于移植脾组织新生血管周围，亦可见细小条索状神经纤维，呈现向移植脾组织中央部分扩展的趋势；自体脾组织移植术后120 d，GAP-43$^+$神经纤维广泛分布于组织周边及中央部位血管周围，尤其中央动脉及脾小体动脉周围出现强阳性染色神经纤维，另有条索状神经纤维在移植脾组织实质内广泛分布(图2)；自体脾组织移植术后180 d，神经纤维分布类似正常脾组织，但密度较正常脾组织仍低(图3)。

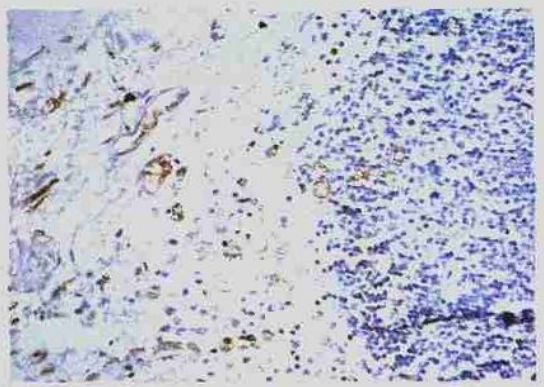


图1 自体脾组织移植术后30 d，可见GAP-43$^+$神经纤维在包绕脾移植组织的大网膜内 (GAP-43×200)

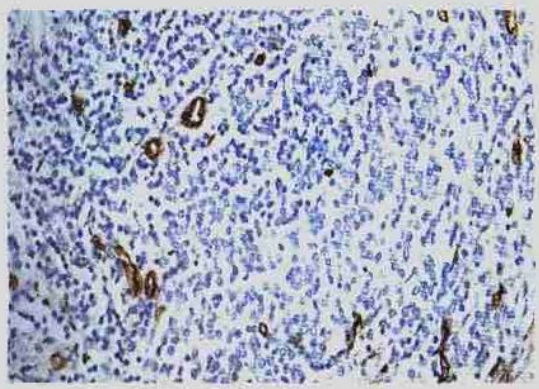


图2 自体脾组织移植术后120 d，GAP-43$^+$神经纤维分布广泛，环行包绕血管周围 (GAP-43×200)

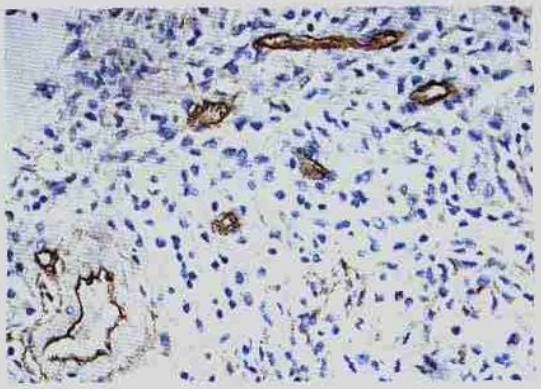


图3 自体脾组织移植术后180 d，GAP-43$^+$神经纤维分布及密度接近正常，尤其以脾小体动脉及PALS中央动脉周围多见 (GAP-43×200)

2.2 图像分析与数据统计

自体脾组织移植术后不同时相点，移植脾组织中GAP-43$^+$神经纤维的密度不尽相同(见下表)；自体脾组织移植术后7～30 d，脾组织中无神经纤维；自体脾组织移植术后60～120 d，脾组织中GAP-43$^+$神经纤维逐渐增多；自体脾组织移植术后180 d，神经纤维再生趋于稳定，但较正常脾组织稍低。

表1 不同时相点移植脾组织中GAP-43$^+$神经纤维密度变化($\bar{x} \pm s$)

时相点(d)	实验组	对照组
7	0	7.16±0.08
14	0	7.21±0.06
30	0	7.13±0.06
60	0.85±0.04★▲	7.15±0.07
90	1.97±0.06★▲	7.17±0.04
120	3.86±0.03★▲	7.20±0.07
180	6.21±0.04▲	7.16±0.05

注：与对照组比较，★$P<0.01$；各时相点组间比较，▲$P<0.01$

2 讨论

自体脾组织大网膜内移植，作为脾脏损伤后的一种最常见的保脾术式，已经被广泛认可和应用，移植成功的脾组织能够部分恢复脾脏的免疫功能[1-2]。但自体脾组织大网膜移植方式完全切断了原有脾脏血供和神经支配，而缺乏血供和神经支配的脾组织是不可能存活和发挥生物学效应的，因此，移植脾组织的血管和神经再生即成了脾脏移植成功的重要标志。实验证明[3]，当移植后的脾组织缺乏相应的神经再生时，则组织结构紊乱，免疫功能很差或无免疫功能；当移植后的

维普资讯 http://www.cqvip.com

脾组织具有较好的神经再生时，则脾组织结构近似于正常脾，红髓、白髓等结构清晰，免疫功能恢复较好。因此，移植脾组织神经纤维的再生是脾组织移植术后存活和发挥脾脏正常免疫功能的必要前提。

正常脾脏的神经支配主要是腹腔交感神经节后纤维，几乎全是无髓鞘和雪旺细胞的传出神经束，其分支随脾血管入脾，调节脾脏的免疫功能[4]。脾脏除接受NA能神经支配外，还接受肽能神经和GAP-43$^+$神经纤维的支配，尤其是后者。成年小鼠的脾内血管周围和红髓、白髓的淋巴细胞间广泛存在着GAP-43$^+$免疫反应阳性纤维，少量纤维自中央动脉向动脉周围淋巴鞘的T细胞区伸出。实验表明，脾组织内GAP-43$^+$神经纤维数量在受到免疫刺激后明显增加，且神经纤维增加的部位与胸腺依赖性或非依赖性纤维抗原刺激后抗体形成的部位非常吻合，提示GAP-43$^+$神经与脾脏功能维持和神经可塑性关系密切。为此，本文将GAP-43$^+$神经作为移植后脾组织神经再生的检测指标，对移植后脾组织神经再生规律的观测及脾功能恢复的评估较为可靠[5]。

目前，对自体脾组织移植术后的神经再生的研究甚少，有作者[6]曾对移植脾组织内NPY$^+$神经纤维的再生进行过研究。本文首次采用GAP-43$^+$神经观测移植脾组织术后神经再生。揭示了自体脾组织移植术后脾组织神经纤维的再生规律。实验结果表明：自体脾组织移植术后30 d，组织周边大网膜内可见到条索状GAP-43$^+$神经纤维，向脾组织内伸展；自体脾组织移植术后60～120 d，脾组织中GAP-43$^+$神经纤维逐渐增多；自体脾组织移植术后180 d，神经纤维再生趋于稳定，但较正常脾组织仍少。实验结果提示，自体脾组织大网膜内移植后，移植脾组织的再生过程中能实现GAP-43$^+$神经纤维的再生，神经再生来源于包裹移植脾组织的大网膜，其再生规律与NPY$^+$神经再生相似。有实验显示自体脾组织移植术后30 d，移植脾组织内出现GAP-43 mRNA，至自体脾组织移植术后90 d达到高峰，自体脾组织移植术后120～180 d基本恢复正常，直接证实了自体脾组织移植术后GAP-43$^+$神经的再生过程。神经再生的机制目前尚不十分明确，可能受到诸多因素的影响，本实验再生脾组织中神经纤维密度最终仍较正常脾组织低，提示脾功能只能部分而不能完全恢复正常，为此，如何运用各种因素（如神经营养因子，NGF等），促进神经的再生，提高自体脾组织移植的存活率，最大可能地恢复移植脾的免疫功能，有待于进一步研究。

［参考文献］

[1] Chen B, Wang JF, Sun X, et al. Regulation of GAP-43 expression by chronic desipramine treatment in rat cultured hippocampal cells [J]. Biol Psychiatry, 2003, 53(6): 530－537.

[2] Kato N, Nemoto K, Arino H, et al. Influence of peripheral inflammation on growth-associated phosphoprotein (GAP-43) expression in dorsal root ganglia and on nerve recovery after crush injury [J]. Neurosci Res, 2003, 45(3): 297－303.

[3] Marques RG, Petroianu A, de Oliveira MB, et al. Bacterial clearance after total splenectomy and splenic autotransplantation in rats [J]. Appl Radiat Isot, 2002, 57(6): 767－771.

[4] Gomez L, Egido R, Guarino G, et al. Histologic study of experimental spleen transplant in rats[J]. Minerva Chir, 2000, 55(11): 741－744.

[5] Quatacker J, Partoens P, De Potter W. Postganglionic, direct axo-axonal contacts on the splenic nerve[J]. Brain Res, 2001, 891(1-2): 213－217.

[6] 张 坤，郭光金，高朋芬，等. 自体移植脾组织神经肽Y阳性神经纤维再生的实验研究[J]. 中国普通外科杂志，2002，11(10)：616－619.

（编辑：蒋登金）

·消　息·

《解剖与临床》征订启事

《解剖与临床》杂志（CN34－1252/R，ISSN1671－7163）是由临床医学专家与解剖学专家共同创办的跨学科学术期刊，曾受到我国14位两院院士的推荐，是解剖与临床两大学科共同的学术园地。栏目主要有专家述评、论著、专题研究、临床研究、解剖观察、综述与讲座、临床与解剖问答及短篇报道等。主要刊登临床应用解剖学研究、断层影像解剖学研究以及相关临床各科诊疗研究文章。

本刊邮发代号：26－190，全国各地邮局订阅或向本刊编辑部邮购，每册单价8元，全年价32元。电话：(0552) 3053847，E－mail：JPYLC@BYFY.com.cn

地　址：安徽省蚌埠市长淮路287号（蚌医附院内）《解剖与临床》编辑部　　邮　编：233004