维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0930-05

GDNF 基因活化的细胞外基质对大鼠坐骨神经损伤后神经元的保护作用

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)

【摘 要】目的:探讨 GDNF 基因活化的细胞外基质对神经元的保护作用。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。60 只成年 Wistar 大鼠按随机数字法分为 3 组:A 组(n=20) GDNF 基因活化的细胞外基质桥接组,B 组(n=20) ECM 桥接组,C 组(n=20)自体神经桥接组,术后 3 天、1 周、4 周、12 周时用 RT-PCR、激光共聚焦显微镜等形态学方法来评价神经元保护作用。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,在脊髓中高效表达 12 周以上。GDNF mRNA 的表达和 Nissl 染色阳性细胞的数量在脊髓中明显增加,而 iNOS 表达明显下降。神经元存活率明显优于对照组(78.04%±3.50% vs 56.09%±1.89%)。结论:GDNF 基因活化的细胞外基质可以促进 GDNF mRNA 在脊髓中表达,增加前角运动神经元的存活率,其机制可能与 iNOS 受抑制有关。

【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;神经元

【中国图书法分类法分类号】R651.3;Q789 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-28

Effects of GDNF gene-activated matrix on neuron protection after sciatic nerve injury in rats

LIANG Anlin, et al

(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene-activated matrix (GAM) in protection of neurons after sciatic nerve injury. *Methods*: The peripheral nerve extracellular matrix was harvested by chemical extraction. GDNF GAM was comprised of the extracellular matrix and plasmids encoding GDNF. Sixty adult Wistar rats were randomly divided into three groups: group A (GDNF GAM conduits, n=20), group B (ECM conduits, n=20), group C (autografts, n=20). Lumbar enlargement was processed for Nissl staining, immunohistochemistry and RT-PCR for GDNF or iNOS and fluorescence observation. Fluorescence observation was used to confirm the expressing of GDNF in the spinal cord. Motoneurons (MN) of lesioned (L) and normal (N) sides were counted, and MN survival ratio (MSR=L/N) was calculated. *Results*: GDNF DNA can be retained in GAM, promoting transgene expressing in axotomized neurons in spinal cord for 12 weeks. In GAM group, the expression of GDNF mRNA was maintained for 12 weeks while the number of iNOS positive cells was decreased in comparison with ECM group. GAM grafts obviously increased the survival rate of motor neurons than that of ECM grafts (78.04%±3.50% vs 56.09%±1.89%) at 12 weeks postaxotomy. *Conclusion*: These results suggest that (1) GDNF GAM increases the GDNF mRNA and the amount of Nissl positive cells in the lumber enlargement; (2) GDNF GAM protects MN through a mechanism in relation to iNOS.

【Key words】Glial cell line-derived neurotrophic factor; Extracellular matrix; Sciatic nerve injury and repair; Rat; Neuron

严重的周围神经损伤后相应神经元即发生大量死亡,即便通过手术方法恢复了神经的连续性,也不可能获得满意的疗效,因此在修复神经损伤时怎样更好地保护神经元成为研究的热点。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,以分子生物学、形态学方法来评价

作者介绍:梁安霖(1976-),男,主治医师,
主要研究方向:周围神经损伤修复。

维普资讯 http://www.cqvip.com

其对神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选择 60 只 4 月龄 Wistar 大鼠（购于第三军医大学大坪医院动物中心）作受体，雌性，体质量(220~240)g。采用完全随机分组法分为 3 组：A 组用 GAM 修复(n=20)；B 组用浸浴了多聚赖氨酸的 ECM 修复(n=20)；C 组为自体移植(n=20)。按 3 天、1 周、4 周、12 周再分为 4 个组，每组 5 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 12h；3%Triton X-100(Sigma 公司)浸浴 12h；4%脱氧胆酸钠（Sigma 公司）浸浴 24h；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℃ 0.1mol/L 的 PBS 中[1]。将 1cm 长的神经浸浴在多聚赖氨酸(0.1mg/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(green fluorescent protein，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 20μl，GDNF-GFP 质粒 10μl（5μg)，TransIT Polymer Solution 10μl，加入 EP 管中混匀，室温下静止 10min，再加入 TransIT 1X Delivery solution 10μl，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，在左侧梨状肌下缘 5mm 切除 10mm 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 50μl 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 10mm 坐骨神经调转 180° 缝合。

1.4 RT-PCR 检测

①引物序列：β-actin 引物按文献[2]提供的序列资料，上游：5' TTGTAACCAACTGGGACGATATGG 3'，下游：5'GATCTTGA TCTTCATGGTGCTAG3'；扩增片段长为 760bp。GDNF 引物设计及合成参照文献[3]，上游：5'GACATATGTCACCAGATAAA CAAATGG 3'，下游：5'GGAAGCTTTCAGATACATCCACA CC3'，扩增片段长为 380bp。由 Sangon 生物公司合成。

②PCR 条件：95℃ 1min 1cycle；95℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 1min 25cycle；72℃ 1min 1cycle；4℃保存。

③PCR 产物分析：以上产物经 1.7%琼脂糖凝胶电泳，在 Bio-Rad 凝胶成像仪上观察结果并照相，用 Bio-rad 公司凝胶成像系统 Quantity one 软件分析结果，以目的条带和内参条带的灰度之比表示。

1.5 激光共聚焦显微镜观察

按时间段取 A 组 L4~L6 脊髓和桥接的神经。立即冰冻切片(50μm 厚)，用 Leica Microsystems Heidelberg 激光共聚焦显微镜观察。

1.6 光镜观察

灌注固定大鼠，取 L4~L6 脊髓，作尼氏染色，光镜下×200 观察，计数尼氏小体着色呈虎斑状的脊髓前角外侧核大、中型神经元的数目，以损伤侧与正常侧同类神经元的比率作为脊髓前角运动神经元的存活率。脊髓切片作诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase，iNOS)免疫组化染色，用 CM-2000B 图像分析系统(北京航空航天大学)进行分析。

1.7 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。

1.8 统计学分析

用 SPSS 10.0 统计软件进行处理，数据用均数 ± 标准差表示，两两比较采用 t 检验，P<0.05 有统计学差异。

2 结 果

2.1 一般观察

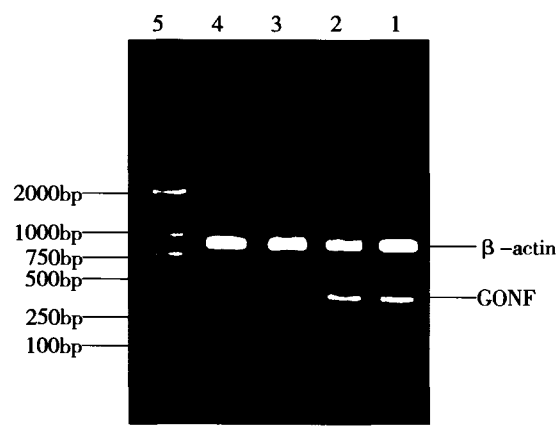
所有大鼠伤口Ⅰ/甲愈合，足趾无脱落，部分有小趾溃疡，术后 12 周均愈合；足底无溃疡。GAM 植入 12 周后，远近端已与坐骨神经连接；移植体的组织收缩不明显；与周围肌肉有轻度粘连，无神经瘤形成。

2.2 RT-PCR 结果

表 1 脊髓组织中各时间点 RT-PCR 结果

时间点	3 天	1 周	4 周	12 周
(相对灰度，%)	121.34 ± 12.77	87.65 ± 7.53△△	11.37 ± 2.18△△	8.62 ± 2.24△△

△△表示 A 组中其余时间点与 3 天相比 P<0.01



1:3 天； 2:1 周； 3:4 周； 4:12 周； 5:DNA 标记；

图 1 A 组脊髓组织各时间点 RT-PCR 结果

2.3 激光共聚焦显微镜观察

A 组术后 3 天在脊髓灰质中可见大量阳性着色

维普资讯 http://www.cqvip.com

的神经元、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（图 2）。至术后 12 周维持在较高水平（图 3）。

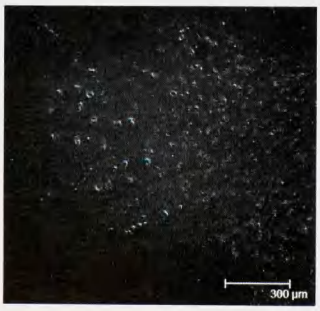


图 2 A 组移植 GAM 后 3 天脊髓中 GFP 的表达

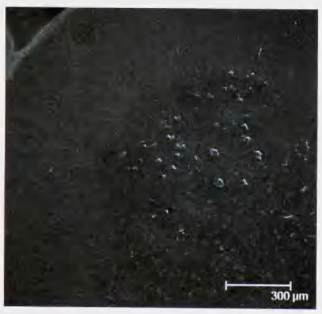


图 3 A 组移植 GAM 后 12 周脊髓中 GFP 的表达

2.3 尼氏染色结果

腰段脊髓前角运动神经元胞体中的尼氏小体染色呈蓝色，虎斑状。脊髓前角运动神经元胞体在坐骨神经损伤后细胞核浓缩并逐渐从中央至周边，染色质密度增高，尼氏体首先浓缩，向胞膜周边移行，逐渐变细，溶解甚至消失，形成所谓的轴突反应；它们呈境界分明的块状或新月形小体。术后 1 周，损伤侧脊髓前角神经元与对侧相比减少，有一部分神经元染色变淡，各实验组的前角运动神经元恢复率没有明显差异（$P>0.05$）。术后 4 周，A 组、C 组与术后 1 周有所下降，但没有显著性差异（$P>0.05$），B 组则下降明显，与术后 1 周相比有显著性差异（$P<0.01$）。术后 12 周，A 组、C 组与术后 1 周相比没有明显差异（$P>0.05$），且明显高于 B 组，有显著性差异（$P<0.01$）（表 2，图 4~图 9）。

表 2 术后不同时间点伤侧与健侧尼氏染色阳性神经元的百分率

分组	例数	1 周	4 周	12 周
A	5	86.48% ± 2.62%	80.07% ± 1.81%	78.04% ± 3.50%
B	5	82.77% ± 4.02%	59.42% ± 3.48%△△	56.09% ± 1.89%△△
C	5	85.18% ± 6.36%	76.21% ± 5.7%	75.26% ± 4.48%

△△表示与 C 组相比 $P<0.01$

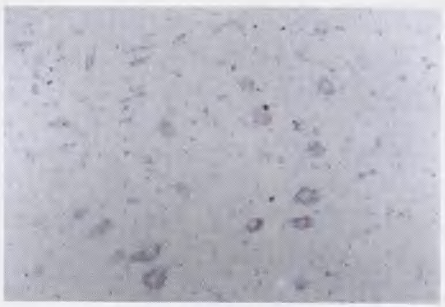


图 4 术后 12 周 L4~L5 脊髓前角尼氏染色 A 组伤侧（×200）

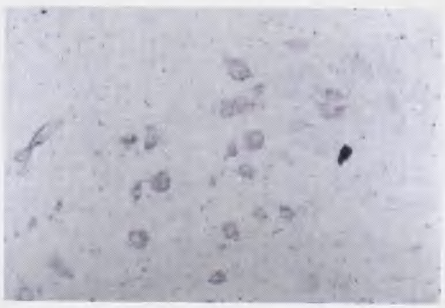


图 5 术后 12 周 L4~L5 脊髓前角尼氏染色 A 组健侧（×200）

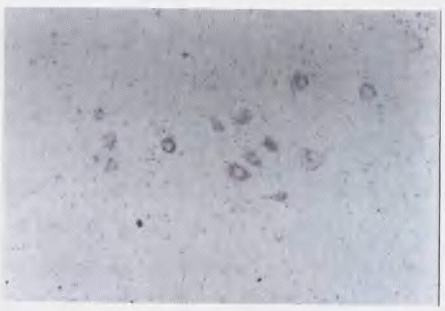


图 6 术后 12 周 L4~L5 脊髓前角尼氏染色 B 组伤侧（×200）

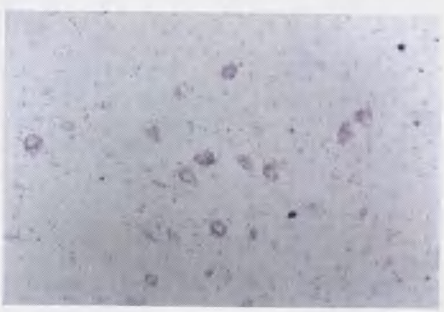


图 7 术后 12 周 L4~L5 脊髓前角尼氏染色 B 组健侧（×200）

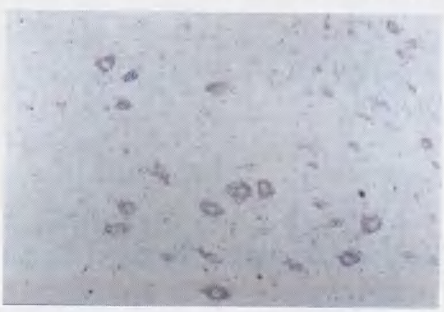


图 8 术后 12 周 L4~L5 脊髓前角尼氏染色 C 组伤侧（×200）

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 9 术后 12 周 L4~L5 脊髓前角尼氏染色 C 组健侧(×200)

表 3 iNOS 免疫组织化学图像分析结果
(面积积分光密度 IOD/μm²)

分组	A	B	C
例数	5	5	5
面积积分光密度	0.56 ± 0.09△△	0.72 ± 0.02	0.51 ± 0.04△△

△△表示与 B 组相比 $P<0.01$



图 10 A 组术后 4 周脊髓 iNOS 免疫组化染色(×200)



图 11 B 组术后 4 周脊髓 iNOS 免疫组化染色(×200)

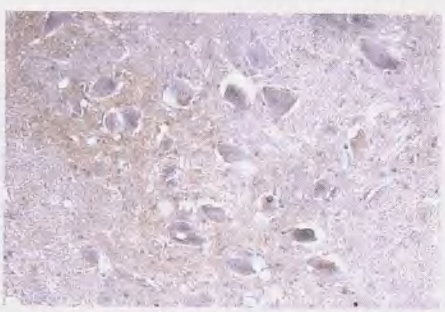


图 12 C 组术后 4 周脊髓 iNOS 免疫组化染色(×200)

2.4 术后 4 周 iNOS 免疫组化结果染色结果

术后 4 周各组均可见到 iNOS 免疫组化阳性细胞,包括神经元,星形胶质细胞,小胶质细胞等,广泛分布于脊髓的灰质和白质,阳性细胞的胞膜和胞浆呈棕黄色。A 组与 C 组之间无显著性差异($P>0.05$),但均低于 B 组,差异有显著性($P<0.01$)(表 3,图 10~12)。

3 讨 论

3.1 GAM 对 GDNF 表达的影响

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[4]。GDNF 是由 Lin[5]于 1993 年从大鼠胶质细胞系 B49 分离纯化的一种具有神经营养作用的同二聚体蛋白质。是目前发现的生物活性最强的靶源性神经元营养因子,可以缓解损伤诱导的乙酰胆碱酯酶活性的降低,对外周运动神经元,感觉神经元具有营养作用,在促进神经元存活,生长和分化方面有着其他神经生长因子不可替代的作用[6]。GDNF 作为外源性基因或蛋白质用于周围神经缺损的治疗已有不少报道,但 GDNF 质粒在缺损局部直接转染对脊髓运动神经元的影响未见详细报道。

实验结果发现 GDNF mRNA 术后 3 天在脊髓中的表达即达高峰,术后 1 周有较高表达,术后 12 周仍可检测出,明显延长了周围神经损伤所介导的中枢神经细胞表达 GDNF 的时间,说明在周围神经系统使用 GAM 仍然可以增强中枢神经系统中 GDNF mRNA 的表达。激光共聚焦显微镜提示术后 3 天在脊髓灰质中可见大量 GFP 阳性的神经元和胶质细胞,说明 GAM 中 GDNF 质粒 DNA 可以逆行运输至相应的神经细胞,并实现转染。术后 12 周脊髓中 GFP 的表达仍然维持在较高水平,说明这种体内转基因的方式是持续性的,而不是一过性的爆发表达,这种表达方式可能更符合神经再生的需求。这种通过 GAM 在外周修复神经缺损的同时也达到了高效、持续向中枢转染 GDNF 的效果。

3.2 GAM 对神经元数量的影响

当神经元受到损害时,如出现轴突断裂、尼氏小体逐渐分解以至消散,这种现象称为染色质溶解,此时神经元的尼氏染色将变淡或消失。因此常借尼氏体来辨认或鉴定神经细胞的存在和它们的分布及是否发生病理性改变[7]。本实验发现术后第

维普资讯 http://www.cqvip.com

1、4、12 周，A 组中神经元数目在 4 周内不断减少，但减少的速度变慢，神经元并不是一直减少下去，术后 12 周神经元数目没有继续减少，说明坐骨神经切断 4 周后，神经元数目就基本稳定，神经元的死亡不再增多。术后 1 周，各组之间相比无明显差异($P>0.05$)；术后 12 周 A 组的恢复率高于 B 组，差异有显著性($P<0.05$)；与 C 组相比无明显差异($P>0.05$)；说明 GAM 能够明显增加脊髓前角运动神经元的数目，改善神经元的功能。

3.3 GAM 对 iNOS 表达的影响

周围神经损伤后脊髓内 iNOS 合成增加，iNOS 阳性细胞产生过量的 NO，NO 可与超氧阴离子(OZ^-)反应生成亚硝基阴离子($ONOO^-$)，之后也可生成羟自由基(OH^-)和 NO，这种过程周而复始，对氧自由基产生起到级联放大作用，促发了细胞凋亡的发生[8]。因此，我们通过免疫组化来研究 GAM 对脊髓组织中 iNOS 表达的影响，以此来了解 GAM 保护神经元的机制。结果显示：术后 4 周，GDNF-GAM 能够减轻坐骨神经损伤诱导的 iNOS 合成增加；并且 iNOS 的减少和存活神经元的数量是一致的，说明 GAM 能够通过向体内转染 GDNF，表达的 GDNF 不仅可以减少 iNOS 合成[9]，而且可以对抗 iNOS 促进神经元凋亡的作用[10]，最终保护了神经元。

本实验表明 GDNF 基因活化的细胞外基质可以促进 GDNF mRNA 在脊髓中表达，增加前角运动神经元的存活率，其机制与 iNOS 受抑制有关。

参 考 文 献

[1] 丁 海，胡汝麟，周建生. 大鼠坐骨神经去细胞基膜管的组织形态学研究[J]. 解剖与临床，2005；10(2)：110-112.

[2] 陈哲宇，陈秀青，路长林，等. 人重组 GDNF 及其生物活性研究[J]. 生物化学与生物物理学报，1999；31(2)：207-210.

[3] Nadeau KC，Azuma H，Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts：roles for cytokines RANTES and MCP-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1995；92(19)：8729-8733.

[4] Burke RE. GDNF as a candidate striatal target-derived neurotrophic factor for the development of substantia nigra dopamine neurons[J]. J Neural Transm Suppl，2006；(70)：41-45.

[5] Airaksinen MS，Holm L，Hatinen T. Evolution of the GDNF family ligands and receptors[J]. Brain Behav Evol，2006；68(3)：181-190.

[6] Abrams M，Widenfalk J. Emerging strategies to promote improved functional outcome after peripheral nerve injury[J]. Restor Neurol Neurosci，2005；23(5-6)：367-382.

[7] Rogerio F，Jordao H Jr，Vieira AS，et al. Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment[J]. Brain Res，2006；1112(1)：80-90.

[8] Martin LJ，Chen K，Liu Z. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation[J]. J Neurosci，2005；25(27)：6449-6459.

[9] Pannu R，Singh I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase：neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms[J]. Neurochem Int，2006；49(2)：170-182.

[10] Lee SH，Chun W，Kong PJ，et al. Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus[J]. J Pineal Res，2006；40(1)：79-85.

(上接第 929 页)

no rats similarities to astrocyte grafts[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1998；95：3908-3913.

[8] Koc ON，Gerson SL，Cooper BW，et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-bllod stem cells and expand marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy[J]. J Clincal Oncology，2000；18(2)：307-316.

[9] Colter DC，Sekiya I，Prockop DJ，et al. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. Pro Nalt Acad USA，2001；98(14)：7841-7845.

[10] Schwartz RE，Reyes M，Koodie L，et al. Mutipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiation into functional hepatocyte-like cells[J]. J Clin Invest，2002；109：1291-1302.

[11] Ye L，Haider Hkh，Sim Ek. Adult stem cells for cardiac repair：a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood)，2006；231(1)：8-19.

[12] Mari Dezawam，Hiroshi Kanno，Mikio Hoshino，et al.Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation[J]. J Clin Invest，2004；113：1701-1710.

[13] Zhao ZG，Tang XQ，Li J，et al. Isolation and identification of chronic myelogenous leukemia bone marrow mesenchymal stem cells and their functional characteristics[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi，2005；85(29)：2054-2057.

[14] von Drygalski A，Savatski L，Eastwood D，et al. The rate of marrow recovery and extent of donor engraftment following transplantation of ex vivo-expanded bone marrow cells are independently influenced by the cytokines used for expansion[J]. Stem Cells Dev，2005；14(5)：564-575.