DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.028

论著

文章编号:1000-5404(2003)20-1840-03

大鼠自体脾组织移植后神经再生中生长相关蛋白mRNA的表达

王 林,郭光金,蒋登金,张天飞,文 灿,张集建,左艳芳 (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)

提 要:目的 研究自体脾组织移植术后不同时相再生脾组织中生长相关蛋白(GAP-43)mRNA的表达,阐明GAP-43$^+$神经在自体移植脾组织中的再生规律。方法 健康Wistar大鼠108只,雌雄不限,体质量100~120 g,随机分为实验组和假手术组,术后15、30、60、90、120、180 d取两组脾组织,行RT-PCR及凝胶图像分析定量测定GAP-43mRNA。结果 脾组织移植手术后30 d,自体移植脾组织中出现GAP-43 mRNA;手术后90 d达到高峰;手术后120~180 d,移植脾组织中GAP-43 mRNA逐渐接近正常脾组织。结论 GAP-43 mRNA在自体移植脾组织中有表达,其表达规律与移植脾组织中神经纤维的再生规律相一致。

关键词:生长相关蛋白;自体脾移植;再生;大鼠
中图法分类号:R657.6;R329.24;R394.2 文献标识码:A

Expression of growth associated protein mRNA in nerves of splenic autograft after autotransplantation in rats

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

Abstract: Objective To investigate the expressions of growth associated protein (GAP) mRNA and to explore the regeneration characteristics of GAP-43$^+$ nerves after splenic autotransplantation in rats. Methods A total of 108 healthy Wistar rats (both sexes, weight: 100~120 g) were randomly divided into two groups: splenectomy and splenic autotransplantation group and sham-operation group. The expressions of GAP-43 mRNA were detected on days 15, 30, 60, 90, 120 and 180 by RT-PCR and quantitatively determined with image analysis. Results Expression of GAP-43 mRNA was found in splenic autograft on day 30, reached the peak on day 90 and nearly reached the level of the normal splenic tissues on days 120~180 after operation. Conclusion There is expression of GAP-43 mRNA in the splenic autograft. The expression is closely associated with the regeneration of nerve fiber in the splenic autograft.

Key words: GAP-43; splenic autotransplantation; regeneration; rat

脾脏具有十分重要的免疫功能,脾切除后易发生凶险性感染(Overwhelming postsplenectomy infection, OPSI)及艾滋病,机体抗肿瘤免疫力减弱[1]。因此,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,已经被广泛采用。但移植脾组织能否存活和发挥免疫功能,与血管和神经的再生关系密切[2],尤其是神经再生起着至关重要的作用。生长相关蛋白(Growth associated protein, GAP-43)是一种神经系统特异性蛋白质,广泛分布于神经系统中,与神经系统的发育,突触形成和可塑性以及神经再生有密切的关系。在神经系统的发育和损伤再生中,常能监测到GAP在mRNA水平上的明显升高[3],因此常将GAP-43列为神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针[4]。同时,有研究表明,GAP-43$^+$神经纤维在正常鼠脾脏中的分布与脾脏的应激免疫功能成正相关[5],故本实验将GAP-43作为自体脾组织移植后神经再生的研究指标。自体脾组织移植后再生脾组织中GAP-43$^+$神经纤维的再生情况,目前尚未见有报道。本实验从基因水平对术后不同时相自体脾组织中GAP-43的再生变化规律进行研究,阐明其再生的动态变化过程与脾组织结构功能恢复的关系,为脾脏外科临床和实验研究提供理论依据。

作者简介:王 林(1972—),男,四川省崇州市人,硕士研究生,讲师,主要从事自体脾移植方面的研究。电话:(023)68752251
通信作者:郭光金,电话:(023)68752250
收稿日期:2003-05-23;修回日期:2003-07-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　动物模型制作

1.1.1　动物分组　　健康 Wistar 大鼠 108 只(第三军医大学实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 100～120 g。实验动物分为: ①脾切除自体移植组(实验组)90 只; ②假手术组(对照组)18 只。

1.1.2　动物模型制作　　大鼠以 0.3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 无菌条件下剖腹; 实验组大鼠将脾脏切下后取 30%脾, 切成 1 mm× 1 mm× 1 mm 均匀颗粒, 植入自身大网膜内; 对照组仅松动脾脏, 不行其他手术处理。

1.2　GAP-43 mRNA 检测

1.2.1　标本取材　　术后 15、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 15 只)大鼠脾组织, 冰冻备用。

1.2.2　引物合成　　按 GAP-43 基因序列合成引物(上海生物工程技术有限公司合成)。上游引物: -ACAAGGAAAAAGCT-CAAAG 下游引物: GACGGGGAGTTATCA GTG G-

1.2.3　RT-PCR　　称取各组脾脏组织约 50 mg, 采用 Tripure 试剂, 按常规方法提取组织中总 RNA。采用 M-MLV 逆转录试剂盒(Promega 公司), 按照产品介绍方法将总 RNA 逆转录 cDNA。

目的基因引物序列由上海生物工程技术有限公司合成, 各组均以β-Actin 作为内参照。PCR 反应条件: 94 ℃10 min; 94 ℃ 30 s 55 ℃ 30 s 72 ℃35 个循环; 72 ℃ 10 min, 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观测, 目的片段为 292 bp。

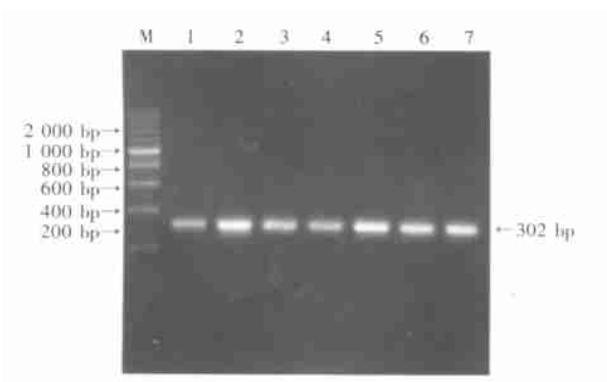
1.3　统计学处理

采用凝胶图像分析系统(GEL-1000, 美国 Bio-Rad 公司)测定各组的 D_λ 值, 以 D_λGAP-43 /D_λβ-Actin 作为衡量指标。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计数据包进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　RT-PCR

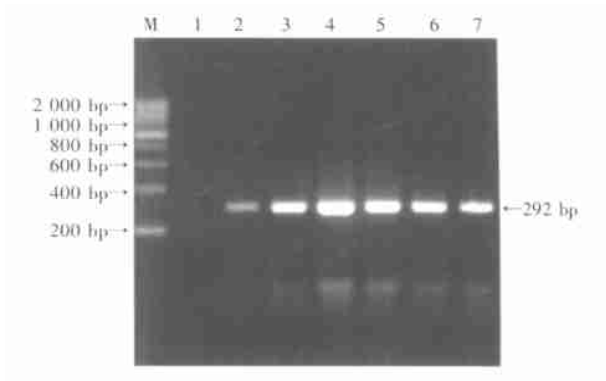
正常脾组织中含有 GAP-43 mRNA, 但表达量较低。自体脾移植术后再生脾组织中 30 d 可见 GAP-43 mRNA, 90 d 达到高峰, 120～180 d 后逐渐恢复至正常水平, 见图 1, 2。



M: Marker; 1: 15 d; 2: 30 d; 3: 60 d; 4: 90 d; 5: 120 d; 6: 180 d; 7: Normal

图 1　自体脾移植术后各时相点β-Actin

Fig 1　β-Actin expression in different groups of rats undergoing splenic autotransplantation



M: Marker; 1: 15 d; 2: 30 d; 3: 60 d; 4: 90 d; 5: 120 d; 6: 180 d; 7: Normal

图 2　自体脾移植术后各时相点 GAP-43 D_λ 值

Fig 2　GAP-43 expression in different groups of rats undergoing splenic autotransplantation

2.2　图像分析

各组中 GAP-43 的表达: 经凝胶图像分析系统对各组及其β-Actin D_λ 值的检测及比值的计算显示, 在脾切除后 30 d 开始有表达, 在 90 d 达到峰值, 随后开始下降, 在 180 d 恢复正常水平, 见图 3。

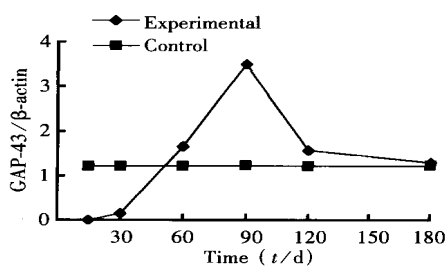


图 3　自体脾移植术后各组 GAP-43 mRNA 表达

Fig 3　Expressions of GAP-43 mRNA in different groups after splenic autotransplantation

3　讨论

外周免疫器官是神经系统和免疫系统结构上的惟一汇聚点, 也是神经系统将电信号转化成化学信号影响免疫系统的重要场所, 因此, 脾脏作为全身最大的免疫器官, 其功能受到神经系统的严密调控。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[6]。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[7], 尤其是后者。实验表明, 脾脏内的 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脾抗体形成的部位吻合, 提示 GAP-43$^+$ 神

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

经与脾脏功能维持和神经可塑性关系密切[5]。

GAP-43是脊椎动物神经细胞膜上的特异性磷蛋白,其分子量为43×10^3~57×10^3,广泛分布于神经系统中,参与神经系统的发育、突触形成和神经再生[8]。在外周神经中GAP-43的表达,主要位于直径小于10 μm的交感、感觉纤维及血管周围的神经末梢内。正常情况下,成熟神经中GAP-43的表达很低,当周围神经的轴突受损时,轴突的延长和重建被重新诱导,表现出与神经发育过程类似的反应,即轴突的再生与神经的修复。此时,作为快速转运蛋白的GAP-43迅速被合成,集中于生长锥,促进受损神经的再生。因此再生神经纤维轴浆内的GAP-43较正常神经纤维明显增多。GAP-43在自体脾组织移植后的消长变化,可作为判断自体脾组织移植后神经再生多少及速度的一项客观指标。目前对自体脾组织移植后的神经再生研究较少,采用GAP-43$^+$神经对自体脾组织移植后的神经再生研究尚未见报道。张坤等[9]研究表明,自体脾组织大网膜内移植术后30~60 d,移植脾组织内出现NPY$^+$神经纤维,术后180 d,NPY$^+$神经纤维的分布接近正常脾脏。本研究结果显示,术后30 d,移植组织内出现GAP-43 mRNA,至术后90 d达到顶峰,120~180 d基本恢复正常。根据mRNA先于蛋白质出现的规律,可以推论自体脾组织移植术后再生脾组织中有GAP-43$^+$神经的再生,且再生规律与其他神经纤维的再生规律相一致。

关于GAP-43 mRNA的来源目前尚不清楚,有作者认为,GAP-43主要由神经元胞体产生,近年来发现,神经胶质细胞、少突胶质细胞和Schwann细胞也可表达GAP-43[10]。本研究认为,自体移植脾组织中的GAP-43 mRNA,主要来自于移植脾组织再生过程中从大网膜随血管进入脾组织的GAP-43$^+$神经纤维,此部分mRNA来源于神经元,经神经纤维转运至神经再生部位一生长锥;另一部分可能来自Schwann细胞。正常Schwann细胞不表达GAP-43,但当周围神经的轴突受损时,失去神经支配的Schwann细胞会发生短暂增殖并大量合成GAP-43[11]。

本研究认为,当脾脏切除和自体移植手术后,原有神经上的Schwann细胞因失去神经支配而大量合成GAP-43,从而表现出GAP-43 mRNA的表达。自体脾组织移植术后不同时相再生脾组织中生长相关蛋白GAP-43 mRNA的表达,证明自体移植脾组织中出现有神经再生。自体移植脾组织中GAP-43 mRNA表达的动态变化规律与移植脾组织脾功能恢复有密切关系。

参考文献:

[1] 邱培才,陈积圣. 脾切除对诱发性肝癌大鼠免疫功能的影响[J]. 普外基础与临床杂志,2000,7(4):224-225.

[2] 郭光金,陈维佩,李晓林,等. 自体移植脾组织的血供动态变化[J]. 局解手术学杂志,1997,6(4):16-17.

[3] Honer W G, Falkai P, Chen C, *et al*. Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness[J]. Neuroscience, 1999, 91(4): 1245-1255.

[4] Naoki Kato, Koichi Nemoto, Hiroshi Arino, *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.

[5] 杨 宏,王 凌. 免疫应答中小鼠脾GAP-43神经支配的可塑性-神经纤维数量和分布的变化[J]. 解剖学报,1998,10(4):356-357.

[6] Quatacker J, Partonens P, Potter W, *et al*. Postganglionic, direct axo-axonal contacts on the splenic nerve[J]. Brain Res, 2001, 891(1-2): 213-217.

[7] Mosevitsky M I, Capony J P, Skladchikova G, *et al*. The BASP1 family of myristoylated proteins abundant in axonal termini. Primary structure analysis and physico-chemical properties[J]. Biochimie, 1997, 79(6): 373-384.

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

[9] 张 坤,郭光金,高朋芬. 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.

[10] Matsuura Y, Ochim M, Uchio Y, *et al*. The time-dependent difference of GAP-43 expression between sensory neurons and motoneurons after peripheral nerve transection[J]. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1999, 33(3): 267-272.

[11] 丁 雯,崔学芝,顾晓松. 生长相关蛋白及其mRNA在大鼠损伤坐骨神经中的表达[J]. 神经解剖学杂志,2002,18(3):211-214.

(编辑 郭建秀)

欢迎订阅《中国皮肤性病学杂志》

《中国皮肤性病学杂志》是由教育部主管,西安交通大学(2000年前由原西安医科大学主办)主办的向国内外公开发行的国家级学术刊物,为《中国学术期刊》光盘版、《中国期刊网》全文录入期刊,属中文核心期刊、统计源期刊及综合评价数据库源期刊、中国期刊方阵"双效期刊"。本刊开设的栏目有论著(包括基础研究和临床研究)、临床经验、性病、病例报告、综述、检验技术、中医中药、皮肤病护理、皮肤美容、误诊教训、短篇、基层园地、争鸣园地及为药厂宣传药品开设的药物与临床栏目。本刊邮发代号52-17,2004年将改为月刊,每本定价7.50元,欢迎广大读者通过邮局订阅或直接在本刊编辑部订阅。

地 址:陕西省西安市西五路兴乐里2号,西安交通大学第二医院内《中国皮肤性病学杂志》编辑部

邮 编:710004 电 话:(029)7678312,7217312

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net