DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.007
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
388 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)05-0388-03

腺病毒介导的BDNF基因脊髓内转移对神经根损伤后神经元内酶的影响

张海鸿[1],廖维宏[1],孙正义[2],伍亚民[1],张正丰[1] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042;[2]兰州医学院附属第二医院骨科,兰州 730030)

提 要:目的 观察神经根损伤后进行BDNF基因治疗对神经元的保护作用。方法 在神经根缝合基础上,通过无创注射将复制缺陷重组腺病毒载体直接转移至大鼠神经根损伤部相应的脊髓腹角。分别于术后1、3、7、14、28 d比色法测定AChE和ACP酶活性的变化。结果 AXCA-BDNF组伤后AChE活性高于损伤组,而ACP活性均低于损伤组。AXCA-BDNF能够降低酶的变化幅度。结论 神经根重建结合BDNF基因治疗可明显减轻神经元的损伤程度,是一种新的有效的治疗方法。

关键词:神经根损伤;脑源性神经营养因子;基因治疗
中图法分类号:R392.12;R651.3;R741.02 文献标识码:A

Effects of gene transfer of adenovirus-mediated BDNF into spinal cord on enzyme of neurons after nerve root injury

ZHANG Hai-hong, LIAO Wei-hong, SUN Zheng-yi, WU Ya-min, ZHANG Zheng-feng (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of gene transfer of recombinant adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor(BDNF) on neurons after nerve root injury. **Methods** Based on the nerve root suture, the vector of recombinant adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor was transferred into spinal anterior horn through non-invasive injection. Activities of acetylcholinesterase and acid phosphatase were measured by chromatometry at days 1, 3, 7, 14 and 28 after operation. **Results** The activity of acetylcholinesterase in AxCA-BDNF group was higher but that of acid phosphatase was lower than that in injury group. AxCA-BDNF lowered the change range of enzyme. **Conclusion** Nerve root reconstruction combined with BDNF gene therapy can obviously relieve the injury of neurons, which is a new and effective method for the treatment of nerve root injury.

Key words: nerve root injury; BDNF; gene therapy

脑源性神经生长因子(Brain-derived neurotrophie faetar, BDNF)对神经元具有保护作用。血-神经屏障的存在使常规给药途径受到限制。可选择的治疗策略之一是基因治疗,通过目的基因的持续表达发挥治疗作用。神经根损伤后治疗效果不佳的根本原因在于:损伤离胞体很近,残存的神经纤维短,侧支少,胞体大量失去了来自靶组织和Schwann细胞的神经营养因子(NTFs)的维持,容易产生大量的继发性死亡。神经根损伤后疗效不佳的关键在相应的脊髓部,故其治疗的根本亦因在相应的脊髓部。随着对神经元再生的深入理解和实验手段的不断完善,进行脊髓水平的神经根修复是一个新而具有挑战性的课题,也是将来的研究方向之一[1]。

神经根的运动神经元胞体主要存在于脊髓腹角。本实验通过显微注射法将BDNF基因病毒载体转移到神经根损伤部相应的脊髓腹角,使其在局部持续表达和释放BDNF,旨在通过脊髓内酶学的变化来观察AXCA-BDNF对神经元的保护作用。

1 材料和方法

1.1 腺病毒BDNF载体

腺病毒BDNF载体(AXCA-BDNF,英国,Berminham大学赵敏博士惠赠)的扩增、纯化与鉴定:按文献[2,3]介绍的方法进行。

1.2 动物分组及实验方法

Wistar大鼠60只,雌雄不限,体质量(200±50) g。随机分为两组:①损伤组:注射病毒缓冲液;②AXCA-BDNF组:注射AXCA-BDNF。每组30只动物,每组设5个时相点。腰椎板切除显露左侧$L_{4,5,6}$脊髓。纵行切开硬脊膜背侧,将神经根在神经根

基金项目:全军"十五"医药卫生科研基金资助项目(01Q104)
作者简介:张海鸿(1968—),男,甘肃省兰州市人,博士研究生,主治医师,主要从事脊髓和神经根损伤方面的研究。电话:(023)68757423
收稿日期:2002-04-12;修回日期:2002-09-05

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

-脊髓交界处切断。切断后显微镜下 10-0 丝线吻合。大鼠固定在立体定位仪上将 AXCA-BDNF 用微量注射器(玻璃微电极针尖直径 30～40 μm)注射于脊髓腹角部。注射点紧邻中央静脉左侧, 深度约 1.5 mm, 将滴度为 1×10^7 PFU/ml 的病毒载体(AXCA-BDNF) 2 μl 注入脊髓, 2 min 内推入, 然后以 1 mm/min 速度退出注射器针头。以便注入液体能被充分吸收。损伤组动物推入 2 μl 病毒缓冲液(10 mmol/L Tris pH 7.5, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 10% Glycerol)。每个动物注射两点, 两点相距 2 mm。关闭伤口, 分笼喂养。术后 1 d, 3 d, 1 周, 2 周, 4 周取 $L_{4\sim6}$ 脊髓行乙酰胆碱酯酶(AChE)和酸性磷酸酶(ACP)活性测定。

1.3　AChE 和 ACP 活性测定

取 $L_{4\sim6}$ 脊髓组织, 用冰冻生理盐水冲去血迹后立即放入 −70 ℃冰箱保存待测。测定时取出称重, 按 1∶9 加入生理盐水, 冰浴下匀浆。按试剂盒操作说明进行(南京建成)。比色法测定 AChE 和 ACh 的活性。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 并用 SPSS10.0 统计程序包进行 t 检验分析。

2　结果

2.1　载体情况

鉴定证实载体携带着外源性 BDNF 基因[2,3]。

2.2　AChE 活性变化

正常脊髓组织 AChE 含量为(0.96±0.03) μmol/mg。神经根损伤后 AChE 含量持续下降, 在 1 周内下降最明显。应用 AXCA-BDNF 载体治疗后 AChE 含量下降缓慢。损伤后 3 d、1、2、4 周, AXCA-BDNF 组脊髓 AChE 活性均较损伤组强, 两者相比差异显著($P<0.01$)。说明 AXCA-BDNF 组可以减轻因神经根损伤造成的脊髓神经元 AChE 减弱。定量分析结果见表 1、图 1。

2.3　ACP 活性变化

正常脊髓组织 ACP 含量为(20.49±6.09) U/mg。神经根损伤后 ACP 活性增强, AXCA-BDNF 组 3 d、1、2、4 周, 脊髓 ACP 活性较损伤组弱($P<0.01$, $P<0.05$)。定量分析结果见表 2、图 2。

表 1　神经根损伤后 **AXCA-BDNF** 对脊髓内乙酰胆碱酯酶的影响

Tab 1　Effect of AXCA-BDNF on activity of AChE after NRI($\bar{x}\pm s$, μmol/mg, $n=6$)

Group	Time post injury(d)				
	1	3	7	14	28
Injury	0.90±0.05	0.55±0.06	0.42±0.07	0.35±0.05	0.33±0.05
AXCA-BDNF	0.91±0.04	0.78±0.09 **	0.73±0.07 **	0.70±0.08 **	0.71±0.08 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* injury

表 2　神经根损伤后 **AXCA-BDNF** 对脊髓内酸性磷酸酶的影响

Tab 2　Effect of AXCA-BDNF on activity of ACP after NRI($\bar{x}\pm s$, U/mg, $n=6$)

Group	Time post injury(d)				
	1	3	7	14	28
Injury	24.33±5.77	32.84±5.43	40.13±4.74	37.57±5.30	30.17±2.79
AXCA-BDNF	23.21±3.01	26.22±4.46 *	29.70±2.73 **	28.03±2.73 **	23.94±3.60 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* injury

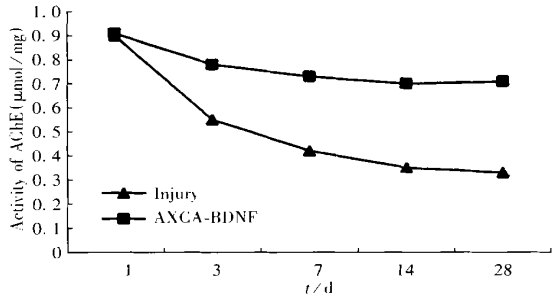


图 1　神经根损伤后 **AXCA-BDNF** 对脊髓内乙酰胆碱酯酶的影响

Fig 1　Effect of AXCA-BDNF on activity of AChE after NRI

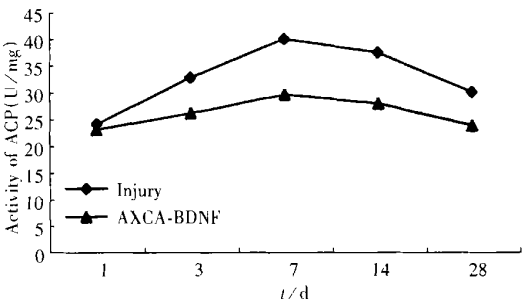


图 2　神经根损伤后 **AXCA-BDNF** 对脊髓内酸性磷酸酶的影响

Fig 2　Effect of AXCA-BDNF on activity of ACP after NRI

3　讨论

观察神经元内酶的变化可为研究形态上的改变及探索神经元死亡的机制提供依据。AChE 是胆碱能神经元递质乙酰胆碱(ACh)的降解酶, 它在胆碱能神经元中的含量与 ACh 呈平行关系, 通常采用检测 AChE 和胆碱乙酰化酶(ChAT)活性来间接反映 ACh 的水平, AChE 可用来显示神经元的活性; ACP 主要位于神经细胞的溶酶体内, 为细胞溶酶体的标志酶, 它在神经元损伤后活性增强, 表明溶酶体数量增加和功能活跃、膜通透性增高。可用来显示神经元损伤的程度[4,5]。本实验以这两种酶的活性变化来反映前角细胞的损伤程度, 并进行酶活性的动态观察, 以反映前角细胞损伤恢复的快慢。

神经根损伤是一种严重的创伤, 常见于臂丛牵拉伤。神经根损伤可导致逆行性的细胞大量死亡以及胞体内 ChAT 和 AChE 的明显降低[6]。这是因为脊神经根近侧残端缺少雪旺细胞。脊髓内的运动神经元得不到充足的营养因子维持细胞存活和产生胆碱能酶(ChAT, AChE)。相比之下, 成年动物坐骨神经切断后近侧端还存有雪旺细胞, 能够提供某种水平的神经营养因子, 防止运动神经元死亡, 虽然这种水平对维持胆碱能酶还不够[7]。Kishino[6] 发现神经根撕脱伤后 2 周 Nissl 染色阳性神经元存活 46%, ChAT 和 AChE 染色阳

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

性神经元为29%和12%，显示胆碱能酶对损伤更敏感。

BDNF能促进胆碱能神经元胞体发育，增加ChAT或AChE阳性神经元数量[8,9]。应用外源性BDNF能够显著减轻成年动物轴索切断后面神经和脊髓运动神经元ChAT的减少[4,10]，阻止神经元的死亡[11]。蛛网膜下腔持续灌注BDNF后Nissl染色阳性神经元存活84%，ChAT和AChE染色阳性神经元分别为80%和69%[6]。实验显示神经元内AChE的变化从损伤的第1天就开始出现，1周内迅速下降，以后下降较慢。因此采取保护和治疗措施应在损伤的早期进行。AXCA-BDNF组AChE活性高于损伤组，ACP活性低于损伤组；并且AXCA-BDNF组ACP酶活性先于损伤组下降。说明AXCA-BDNF组前角细胞损伤程度轻于损伤组，且恢复也较损伤组快。可见AXCA-BDNF组对脊髓前角细胞具有明显的保护作用。

神经损伤后NTFs表达的增高[12]和trk mRNA的上调[13]主要在损伤后一周内出现。这个黄金时段是外源性NTFs影响神经元存活和再生的关键时期。早期持续应用BDNF可使ChAT明显上升。相比之下，术后1～2周间歇性地用NTFs治疗只能在新生动物有短暂的疗效，不能使成年大鼠ChAT恢复[14]，也不能提高腹根撕脱伤运动神经元的存活率[15]。

临床上已经试用BDNF治疗运动神经元退行性病变如在肌萎缩性(脊髓)侧索硬化症(AIS)，Ⅰ/Ⅱ期临床试验表明BDNF降低病人呼吸能力的恶化，且证明了它的安全性和良好的耐受性。遗憾的是Ⅱ期临床试验治疗组和损伤组的呼吸能力或存活时间之间没有显示出统计学意义或临床差异。Glaser[16]认为，NTFs的有效作用在ALS症状出现时可能已经太晚，营养因子只能对病变的而不是濒临死亡的运动神经元起作用。BDNF Ⅱ期临床试验的失败还可能与皮下给药途径有关。外源性BDNF因其不易穿过血脑屏障、血清半衰期短，传统的方法需将这些大分子物质反复输注，但仍难以到达病变神经元部位并维持有效浓度。研究表明，大剂量和多次给予BDNF能产生明显的效果[17]。本研究采用基因治疗，将特定外源目的基因BDNF转入宿主细胞内，结果显示具有很好的疗效。

本实验观察了神经根损伤后AChE和ACP两项指标，发现进行AXCA-BDNF组转基因治疗对脊髓神经元有明显的保护作用，而且这种保护作用可在神经元损伤的关键阶段起作用。这一结果，对于AXCA-BDNF组治疗作用的研究以及基因治疗方法用于临床是很有意义的。

参考文献：

[1] Berger A, Shen Z L, Hiemer R. Peripheral nerve surgery: current achievements and future directions[J]. 中华手外科杂志, 2000, 16(1): 10－16.

[2] 沈 岳, 廖维宏, 王国强, 等. 腺病毒介导的脑源性神经营养因子表达对大鼠损伤脊髓轴突的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(2): 146－149.

[3] 王国强, 廖维宏, 沈 岳, 等. 重组腺病毒介导的BDNF基因转移对大鼠创伤性脑损伤后海马细胞凋亡的影响[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(5): 264－268.

[4] 刘红光, 洪光祥, 王发斌, 等. 胚胎枝芽提取物对周围神经损伤后脊髓前角运动神经元的保护作用[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(4): 223－225.

[5] 庞清江, 罗永湘, 房清敏. 神经生长因子对脊髓运动神经元的保护作用[J]. 中华手外科杂志, 1997, 13(1): 19－21.

[6] Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, *et al*. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron denegeration and induces axonal outgrowth[J]. Exp Neuro, 1997, 144(2): 273－286.

[7] Friedman B, Kleinfeld D, Nancy Y I, *et al*. BDNF and NT4/5 exert neurotrophic inflences on injured adult spinal motor neurons[J]. J Neurosci, 1995, 15(2): 1044－1045.

[8] Kunisel B, Winslow J W, Rosenthal A, *et al*. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(3): 961－965.

[9] Alderson R F, Alterman A L, Barde Y A, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor increase survival and differential functions of rat septal cholinergic neuron in culture[J]. Neuron, 1990, 5(3): 297－306.

[10] Yan Q, Matheson C, Lopez O T, *et al*. The biological responses of axotomized adult motoneurons to brain-derived neurotrophic factor[J]. J Neurosci, 1994, 14(9): 5281－5291.

[11] Novikov L, Novikova L, Kellerth J O. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion[J]. Neurosci Lett, 1995, 200(1): 45－48.

[12] Distefano P S, Curtis R. Receptor mediated retrograde axonal transport of neurotrophic factors is increased after peripheral nerve injury[J]. Prog Brain Res, 1994, 103: 35－42.

[13] Piehl F, Frisen J, Risling M, *et al*. Increased TrkB messenger RNA expression by axotimized motoneurons[J]. Neuro Report, 1994, 5(6): 697－700.

[14] Clatterbuck R E, Price D L, Koliatsos V E. Further characterization of the effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor on axotomized neonatal and adult mammalian motor nerons[J]. J Comp Neurol, 1994, 342(1): 45－56.

[15] Li L X, Wu W T, Lin L F H, *et al*. Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(21): 9771－9775.

[16] Glaser V. AIS claims another victim[J]. Nature Biotech, 1997, 15(3): 212.

[17] Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, *et al*. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF[J]. Science, 1994, 265(5175): 1107－1110.

（编辑 张大春）

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