DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.019
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0283-03

论著

神经损伤与再生中GAP-43mRNA表达和蛋白合成的实验研究

刘光久,李振强,殷玉芹,宋 林,孙建森 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究周围神经损伤与再生过程中生长相关蛋白(Growth-associated protein,GAP-43)mRNA表达和蛋白质合成的变化规律。方法 建立大鼠坐骨神经中段钳夹损伤模型,用原位杂交和免疫组化技术观察大鼠腰髓和背根神经节的GAP-43mRNA表达和蛋白质合成变化。结果 大鼠坐骨神经损伤后,腰髓腹角运动神经元和背根节感觉神经元GAP-43mRNA表达和蛋白质合成增强。结论 周围神经损伤与再生中GAP-43mRNA表达显著增强,神经再生完成后表达减弱,表明GAP-43在神经再生过程中起重要作用。

关键词:神经再生;生长相关蛋白;坐骨神经
中图法分类号:R322.85;R338;R394.2 文献标识码:A

Experimental study of GAP-43 mRNA expression and protein synthesis during nerve regeneration

LIU Guang-jiu, LI Zhen-qiang, YIN Yu-qin, SONG Lin, SUN Jian-sen (Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of GAP-43mRNA and protein in corresponding spinal cord and dorsal root ganglion (DRG) during peripheral nerve regeneration. **Methods** Using *in situ* hybridization and immunohistochemistry technique, the expression of GAP-43mRNA and protein in corresponding spinal cord and DRG were investigated after the right sciatic nerve was crushed in adult rats. **Results** The GAP-43 mRNA expression and protein synthesis were increased in motor neurons of lumbar spinal cord and primary sensory neurons of DRG after nerve injury. **Conclusion** Expression of GAP-43 mRNA was induced by axotomy and associated with the regeneration state of the neurons. High level of GAP-43 could regulate intrinsic events in neurons which might have significant effect on promoting axon regeneration.

Key words: nerve regeneration; growth-associated protein (GAP-43); sciatic nerve

生长相关蛋白(Growth-associated protein,GAP-43)是一种神经组织特异性磷酸蛋白质,与神经发育、轴突再生和突触可塑性关系密切[1]。GAP-43的发现和深入研究,为神经发育和再生过程中轴突导向性的分子基础作了进一步阐明。到目前为止,GAP-43在神经再生中的确切作用仍未完全弄清。为进一步研究GAP-43与神经再生的关系,我们设计了如下实验:用原位杂交组织化学和免疫细胞化学方法观察成年大鼠坐骨神经损伤再生过程中,脊髓运动神经元和背根节感觉神经元胞体GAP-43 mRNA表达及蛋白质合成变化规律。以期了解神经再生过程中GAP-43 mRNA表达的调控及蛋白质合成的变化,为周围神经损伤的修复提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 动物模型、取材切片

实验动物采用雄性Wistar大鼠40只,体重(200±250)g。大鼠经戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,暴露右侧坐骨神经,在梨状肌下孔下方约0.5 cm处,用血管钳压榨坐骨神经10 s 3次,缝合伤口。术后分存活1、2、4、7、14、30和60 d共7个时相组,及1组正常对照大鼠。每个时相组均为5只大鼠。到达实验存活期的动物经升主动脉灌注4%多聚甲醛的磷酸缓冲液(pH 7.4)固定。取出坐骨神经及与其相连的背根神经节(L_5、L_6)和脊髓(L_4~L_6节段)。恒冷箱切片,片厚10 μm。

1.2 GAP-43mRNA原位杂交染色

用博士德生物工程有限公司提供的GAP-43mRNA原位杂交染色试剂盒,对脊髓和背根神经节的冰冻切片按操作步骤进行GAP-43mRNA原位杂交染色。

1.3 GAP-43免疫细胞化学染色

用哈佛大学医学院Dr. Benowitz L. I.赠送的羊抗鼠GAP-43多克隆抗体按ABC法对脊髓、背根神经节和坐骨神经的冰冻切片进行免疫细胞化学染色。

1.4 图像分析和统计学处理

采用Tiger 920图像分析系统测量神经元胞体和神经纤维的积分光密度(IOD)和平均光密度(AOD),分别对原位杂交GAP-43 mRNA阳性神经元胞体、免疫组化GAP-43阳性神经元胞体和坐骨神经纤维进行图像分析。统计学分析:用单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

大鼠右侧坐骨神经损伤后2d开始,腰髓横切片上可见GAP-43mRNA表达阳性神经元。主要位于脊髓右侧腹角外侧,为大型运动神经元,其胞体及突起染成棕黄色,胞核无色,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570373)
作者简介:刘光久(1972-),男,重庆市梁平县人,硕士,助教,主要从事周围神经再生方面的研究 电话:(023)68752225
收稿日期:2001-06-20;修回日期:2001-09-30

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

见图 1。高倍镜下观察，GAP-43mRNA 表达阳性神经元胞浆内杂交反应沉积物呈棕黄色粗斑片状不均匀分布，见图 2。伤后 4d 阳性细胞增多，颜色加深；伤后 7d 阳性细胞数和光密度值达最高峰；伤后 14 d 阳性反应稍下降；伤后 30d 阳性细胞明显减少，染色变浅。右侧坐骨神经损伤后 2 d 开始，同侧背根神经节内即出现 GAP-43mRNA 表达阳性神经元。光镜下可见阳性物质呈棕黄色斑片状或颗粒状分布于胞浆中，胞核无色。阳性细胞中以中小型感觉神经元颜色较深，大细胞颜色较浅。各时相点杂交信号强弱变化与脊髓基本相同，见表 1。对照组大鼠脊髓和背根神经节均未查出 GAP-43mRNA 阳性反应结果，术后 1d 组和 60d 组阳性反应很弱。

大鼠右侧坐骨神经损伤后 4 d 开始，同侧脊髓灰质 GAP-43 免疫反应增强，以背角胶状质和腹角处较为明显，白质染色浅淡。同侧背根神经节切片上，光镜下可见免疫反应阳性感觉神经元位于被膜下和有髓神经纤维之间，阳性神经元胞浆和胞膜染成棕黄色，胞核无色，见图 3。神经节内神经元大小不等，阳性细胞以小神经元为主且着色较深，大神经元着色较浅，见图 4。术后 7 d 组阳性细胞最多，染色最深。术后 14 d 稍减弱，术后 30 d 组阳性细胞明显减少，免疫反应着色变浅；术后 60 d 组背根神经节切片上阳性神经元很少。大鼠右侧坐骨神经损伤后 4 d 开始，神经纤维出现阳性着色，光镜下免疫组化染色可见棕黄色染色颗粒均匀地沿神经纤维排列。术后 4 d 组和 7 d 组的近侧段神经纤维阳性反应强于远侧段，而术后 14 d 组和 30 d 组的近侧段神经纤维阳性反应较远侧段弱。对照组大鼠的脊髓、背根神经节及坐骨神经均未查出 GAP-43 免疫反应阳性结果，见表 2。

表 1 **GAP-43mRNA** 表达阳性神经元平均光密度值（**AOD**）（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Average opitical density（AOD）of GAP-43mRNA positive neurons in SC and DRG（$\bar{x}\pm s$）

Group	Motor neurons of SC	Sensoy neurons of DRG
2 d	1.5355±0.04 #	1.4778±0.01 #
4 d	1.6610±0.02 ※#*	1.5639±0.01 ※#
7 d	1.9981±0.04 ※*	2.0312±0.07 ※*
14 d	1.8047±0.02 ※#*	1.7812±0.01 ※#*
30 d	1.5042±0.01 #	1.5373±0.02 #

※：$P<0.01$ *vs* 2 d；#：$P<0.01$ *vs* 7 d；*：$P<0.01$ *vs* 30 d

表 2 **GAP-43** 免疫反应阳性神经元平均光密度值（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Average opitical density（AOD）of GAP-43 positive immunoreaction neurons in DRG and ScN（$\bar{x}\pm s$）

Group	Sensoy neurons of DRG	Nerve fibers of ScN
4 d	1.4467±0.03 ※#*	1.4513±0.02 ※#
7 d	2.0062±0.03 ※*	1.9148±0.04 ※*
14 d	1.6920±0.01 ※#*	1.7672±0.04 ※#*
30 d	1.2162±0.01 #	1.3030±0.02 #

※：$P<0.01$ *vs* 2 d；#：$P<0.01$ *vs* 7 d；*：$P<0.01$ *vs* 30 d

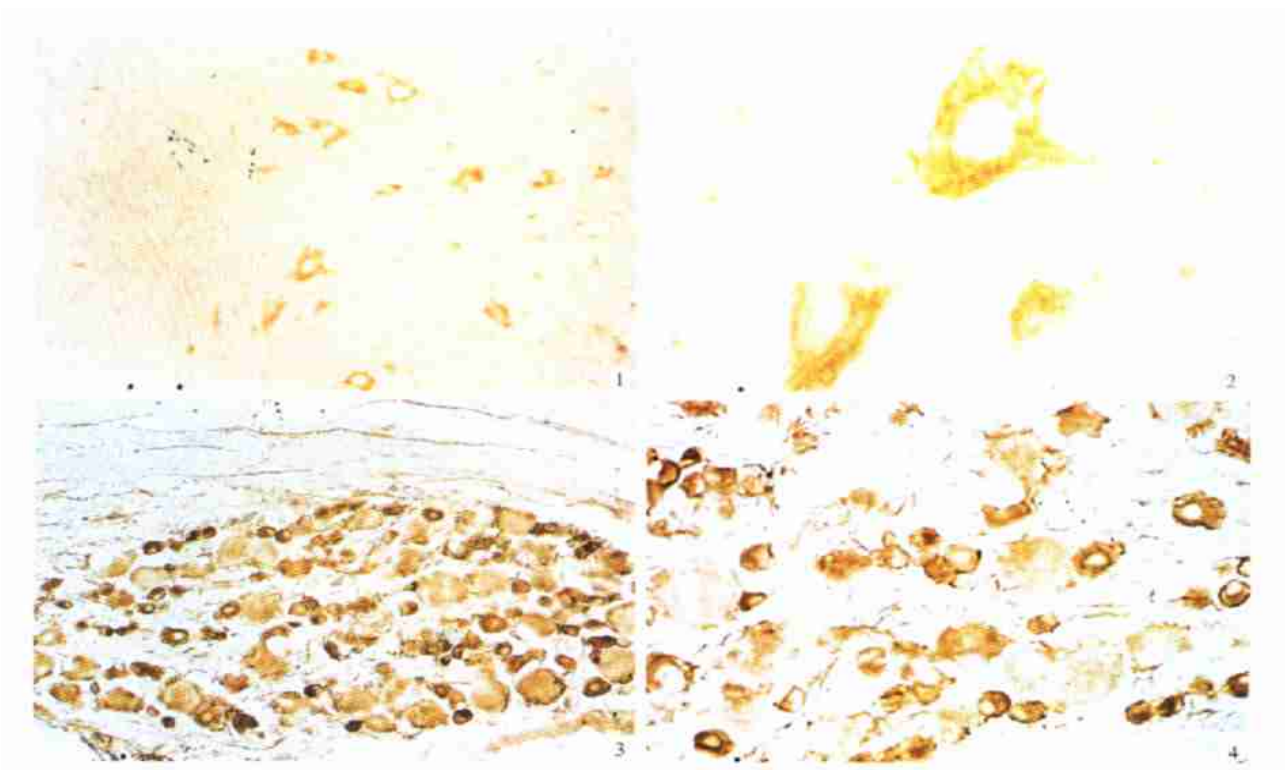


图 **1** 术后 **7 d**，腰髓运动神经元 **GAP-43mRNA** 表达阳性 （ISHH× 100）

Fig 1 Positive neurons of GAP-43mRNA in the lumbar spinal cord in rats 7 d after operation （ISHH× 100）

图 **2** 术后 **7 d**，**GAP-43mRNA** 表达阳性的运动神经元 （ISHH× 400）

Fig 2 Positive motor neurons of GAP-43mRNA in rats 7 d after operation （ISHH× 400）

图 **3** 术后 **7 d**，背根神经节 **GAP-43** 免疫反应阳性的神经元 （ICC × 100）

Fig 3 GAP-43 positive immunoreaction neurons of the dorsal root ganglion in rats 7 d after operation （ICC × 100）

图 **4** 术后 **7 d**，**GAP-43** 免疫反应阳性的感觉神经元 （ICC × 200）

Fig 4 Positive immunoreaction sensory neurons of GAP-43 in rats 7 d after operation （ICC× 200）

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

3　讨论

本实验用原位杂交方法显示, 大鼠坐骨神经损伤再生过程中, 其腰髓腹角和背根节神经元对轴突断裂损伤表现出快速和显著的反应, 细胞体 GAP-43mRNA 表达升高, 胞浆内出现棕黄色斑块状或颗粒状杂交反应沉积物。术后 2 d 开始, 脊髓腹角运动神经元胞浆中 GAP-43mRNA 表达逐渐升高。术后 7 d 达高峰, 14 d 时稍下降, 术后 30 d 已降至较低水平。背根节感觉神经元 GAP-43mRNA 的表达变化类似脊髓运动神经元。染色显示, 背根节神经元胞浆中棕黄色杂交反应沉积物主要位于细胞边缘靠近胞膜处, 这种现象可能与神经损伤后脊神经节细胞的粗面内质网和游离核糖体边集, mRNA 集中于细胞周边有关[2]。脊髓腹角运动神经元和背根节感觉神经元在轴突中断后再生活跃, GAP-43mRNA 的再表达是细胞对轴突损伤再生反应的重要活动之一, 与神经元的生长状态或再生能力密切相关[3]。再生完成后, GAP-43mRNA 表达下降至正常水平。本实验结果支持 GAP-43 在周围神经再生中具有重要作用的结论。

本实验用免疫细胞化学方法观察到大鼠坐骨神经钳夹伤后, 同侧腰髓灰质、背根节神经元胞体和坐骨神经纤维内 GAP-43 合成增加, 7 d 达到高峰, 14 d 开始下降, 30 d 则降至初始水平。术侧坐骨神经钳夹部位近侧端的神经纤维在术后 4 d 组和 7 d 组阳性反应高于远侧端, 而术后 14 d 组和 30 d 组则是近侧端神经纤维阳性反应逐渐减弱, 远侧端神经纤维阳性反应逐渐增强。结合神经元胞体 GAP-43mRNA 的表达变化, 提示神经损伤后刺激神经元 GAP-43 基因再表达, 导致 GAP-43 合成增加, 经快速轴浆流运送到受损的神经纤维, 为伤侧近端的神经纤维轴芽生长提供了必需的物质。背根节初级感觉神经元的 GAP-43 表达并不一致。小神经元表达强烈, 免疫染色较深, 而大神经元表达较弱, 免疫染色浅淡。Gonzalez 等[4] 亦观察到坐骨神经结扎后背根节 GAP-43 阳性神经元中, 小神经元占 73.8%, 并且染色更强。提示在脊神经损伤再生过程中, 背根节内小神经元似乎具有更强的 GAP-43 合成能力, 可能与再生的关系更为密切。

本实验结果中, GAP-43mRNA 的表达先于 GAP-43 的合成, 前者术后 2 d 即可检测到, 后者则在术后 4 d 才呈现较明显的免疫反应阳性。二者在术后 7 d 达高峰, 14 d 时稍下降, 但仍维持较高水平。相关实验表明, GAP-43mRNA 稳定性变化很可能调节 GAP-43 表达。在 PC12 细胞, 神经生长因子(NGF)对 GAP-43mRNA 的转录影响很小, 但能通过调节其稳定性而控制 mRNA 水平。即使在未激活状态, PC12 细胞的 GAP-43mRNA 转录也能维持适度的速率, 但合成的 GAP-43mRNA 被迅速降解(半衰期 5～8 h)。NGF 能使 GAP-43mRNA 的半衰期延长约 5 倍, 使 mRNA 稳定性提高, 降解率降低, 从而导致 GAP-43mRNA 水平升高维持一段时间[5]。NGF 和佛波醇酯(Phorbol esters)通过激活蛋白激酶 C(PKC)信号通路诱导 GAP-43mRNA, 这种诱导被发现与选择性提高 GAP-43mRNA 稳定性有关[6]。因此, GAP-43mRNA 在术后较长时间的高水平表达可能与转录后调节机制有关。活体条件下 GAP-43mRNA 的水平由转录和转录后调节机制共同作用而决定。

本实验结果显示, GAP-43mRNA 的表达和蛋白质合成与神经损伤再生密切相关。GAP-43mRNA 的表达与蛋白质合成确实是神经损伤再生活动中的一个重要组成部分, 深入研究探讨神经再生过程中 GAP-43 表达变化的机制, 将有助于深化对神经再生的认识, 为临床上周围神经损伤后获得良好功能恢复的医疗实践提供更为有利的理论参考。

参考文献:

[1] Benowitz L I, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity[J]. Trends in Neurosci, 1997, 20(2): 84－91.

[2] 成令忠 主编. 组织学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 554－555.

[3] Karl J L, Fernandes Da-Peng Fan, Tsui B J, *et al*. Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoreurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M[J]. J Comp Neurol, 1999, 414(2): 495－510.

[4] Gonzalez H T, Rustioni A. Nitric oxide synthase and growth-associated protein are coexpressed in primary sensory neurons after peripheral injury[J]. J Comp Neurol, 1999, 404(1): 64－74.

[5] Perrone-Bizzozero N I, Victor V, Cansino, *et al*. Posttranscriptional regulation of GAP-43 gene expression in PC12 cells through protein kinase C-dependent stabilization of the mRNA[J]. J. Cell Biology, 1993, 120(5): 1263－1270.

[6] Bisby M A. Dependence of GAP-43(B50, F1) transport on axonal regeneration in rat dorsal root ganglions[J]. Brain Res, 1988, 458(1): 157－161.

(编辑　陈聪连)

消息

《第三军医大学学报》荣获首届《CAJ－CD 规范》执行优秀奖

在国家新闻出版总署、中宣部、科技部、教育部等主管部门的大力支持下, 按照科学、严格、公正的原则, 中国学术期刊(光盘版)《CAJ－CD》编辑委员会规范化与评价研究中心于 2000 年 4 月至 2001 年 12 月对 5300 种入编期刊的编辑规范化和标准化进行了评估, 获得首届《CAJ－CD 规范》执行优秀奖的期刊共 1274 种,《第三军医大学学报》名列其中。

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