DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.020
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
146 2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0146-04

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

沈 岳,廖维宏,王国强,李 芳,伍亚民,龙在云,李应玉,陈恒胜 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所创伤中心,重庆 400042)

提 要 目的:研究腺病毒介导的脑源性神经营养因子(BDNF)基因在大鼠损伤脊髓内的表达规律,观察外源性BDNF对损伤脊髓的作用。方法:利用激光束描记位移的重力打击装置,制备可靠的定量损伤模型;以直接注射法将带有BDNF基因表达框的复制缺陷重组腺病毒载体直接转移至大鼠损伤脊髓,用X-Gal染色检测基因转移有效性,并观察损伤轴突计量形态学改变,损伤脊髓BDNF mRNA表达,BDNF和神经中丝(Neurofilament,NF)免疫组化活性的改变。结果:腺病毒载体直接引入脊髓可有效地感染脊髓组织和表达报告基因。直接转染BDNF腺病毒载体可明显减少伤后两周轴突丧失;同时,NF免疫反应阳性的轴突较正常增多。结论:实验性腺病毒介导的BDNF基因损伤脊髓转移是可行的。在基因直接转移局部外源性BDNF过表达对神经具有保护作用,可减少轴突丧失,促进神经元骨架蛋白的修复。这种双重作用可能在脊髓损伤治疗中有重要的价值。

关键词 脊髓损伤;脑源性神经营养因子;腺病毒载体;重力打击模型;基因治疗
中图法分类号 R373.1;R349.32;R651.2 文献标识码 A

Protective effects of adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factors on spinal axon after spinal cord injury in rats

SHEN Yue, LIAO Wei-hong, WANG Guo-qiang, LI Fang, WU Ya-min, LONG Zhai-yun, LI Ying-yu, CHEN Heng-sheng
(Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract **Objective**: To investigate the effects of the expression of exogenous brain-derived neurotrophic factors (BDNF) on injured spinal cord following *in vivo* adenoviral gene transfer to the cord. **Methods**: The model of quantitative injury was established in rats with the weight-drop apparatus with a laser compression recorder. The replicate-defect recombinant adenoviral vector was transferred into the injured spinal cord through direct injection. The gene transfer was verified with X-Gal staining and the changes in morphology of the injured axon were quantitatively determined. Meanwhile, the expression of BDNF mRNA and immunohistochemical reactivity of BDNF and NF in the injured spinal cord were investigated. **Results**: The spinal cord was infected by injection of the adenoviral vector and expressed the report gene. The loss of axons reduced following the *in vivo* infection of adenoviral vector carrying exogenous BDNF gene after SCI, while more positive axons in immunohistochemical reaction than that of normal spinal cord were seen. **Conclusion**: *In vivo* transfer of adenoviral vector into the foci can provide protection to some extent to injured axons through increasing local expression of exogenous BDNF and facilitate repair of the cytoskeleton in the injured neurons. These effects are important in gene therapy of SCI.

Key words spinal cord injury; brain derived neurotrophic factor; adenoviral vector; weight-drop model; gene therapy

神经营养因子家族(Neurotrophins, NTFs)可促进中枢神经系统(Central nervous system, CNS)创伤后神经的修复与再生。但是NTFs因来源困难、半衰期短、组织含量低、不能通过血脑屏障,所以常规途径应用疗效较差[1]。脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factors, BDNF)是神经营养因子家族的代表之一,正常情况下在脊髓中很难检测到表达[2],而在损伤时脊髓

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670740)
作者简介:沈 岳(1959.3),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事脊髓损伤及创伤救治方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68757624
收稿日期:1999-09-15;修回日期:1999-12-21

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

中呈现明显表达[3]，可能在脊髓损伤过程中有重要的作用。腺病毒载体是新的载体，具有可感染不具有分化能力的中枢神经系统神经细胞的能力，致病性小等特点[4]，在中枢神经系统转基因研究中有重要的应用前景。

1　材料和方法

1.1　主要材料

AxCA-BDNF 为含小鼠 BDNF cDNA 表达框的重组腺病毒载体，赵敏博士（英国 Berminham 大学）惠赠。293 人胚肾细胞（ATCC CRL1573；Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd，Osaka）。抗 NF_{200} 单克隆抗体，抗 BDNF 多克隆抗体（北京原平生物化学试剂公司）。BDNF 寡核苷酸探针（上海生物工程研究所合成，本室自行 3’ 末端地高辛标记）。S-P 免疫组化试剂盒（福洲迈新生物技术开发公司）。江湾 I 型立体定位仪。自行研制的激光描计重力打击装置。恒冷冰冻切片机（CM1850，Laica，德国）。

1.2　实验分组与动物模型制备

选用 Wistar 大鼠 36 只，体重（304±20）g，雌性，随机分为 3 组。①单纯损伤组；②损伤＋AxCA-BDNF 感染组；③正常对照组。前 2 组各 15 只，正常对照组 6 只动物。手术切除 T_3 椎板，暴露脊髓。采用改良 Allen′s 重物打击法致伤。打击高度为 1.25 cm，重物为 10 g。致伤装置自行研制，配有激光描计装置，可对脊髓压缩幅度进行精确定量（另文报道）。

1.3　实验方法与观测指标

1.3.1　腺病毒载体转染脊髓方法　　动物麻醉后固定于立体定位仪上。在 T_3 处硬脊膜背侧中血管旁轻轻挑开一个纵行小口，利用微电极推进器和微量注射器，向头侧呈 45°角进针，深度约 1.5 mm，将滴度为 1×10^7 PFU/ml 的病毒载体（AxCA-BDNF）或含 LACZ 基因的腺病毒载体稀释液 2 μl 注入脊髓，2 min 内推入，保留 5 min 后退出。正常对照组动物推入 5 μl 生理盐水。关闭伤口，分笼喂养。

1.3.2　标本采集及处理　　在术后 2 d，2 周和 4 周时取脊髓标本。用于免疫细胞化学染色和 X-Gal 染色的标本用 4%多聚甲醛灌注固定，恒冷冰冻切片机中切片，切片厚 20 μm。用于甲苯胺蓝染色的标本以 2.5%戊二醛灌注固定，“半薄”切片，切片厚 1 mm。

1.3.3　X-gal 染色　　取含 LACZ 基因转移的标本，参照文献[5]方法进行 X-gal 组织化学染色。

1.3.4　行为学观察　　采用改良 LeMay 评分法[6]，判定伤后下肢神经功能变化。

1.3.5　形态学观察　　分别作常规病理切片，HE 染色，“半薄切片”，甲苯胺蓝染色。半薄切片甲苯胺蓝染色后，除定性观察外，参照 Rosenberg 方法[7]在白质腹内侧区域，相当于灰质腹角内侧部位随机取 2 个视野，用图像系统进行定量分析，轴突计数。

1.3.6　免疫组织细胞化学观察　　BDNF mRNA 原位分子杂交：取注射 AxCA-BDNF 动物的标本，按标准方法杂交，并参照蔡文琴方法[8]略加修改。NF 和 BDNF 免疫组化染色，采用 S-P 法。NF_{200} 免疫反应阳性轴突，用图像分析系统进行定量分析。分析部位的选择同前述轴突定量的方法。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，并用 EXCELL 软件和 SPSS 统计程序包进行 t 检验分析。

2　结果

2.1　转移基因检测

X-gal 染出的蓝色斑可以在注射部位和损伤脊髓段内出现。术后第 4 周时在损伤节段仍有半乳糖苷酶表达，可见到明显的染色，见图 1。

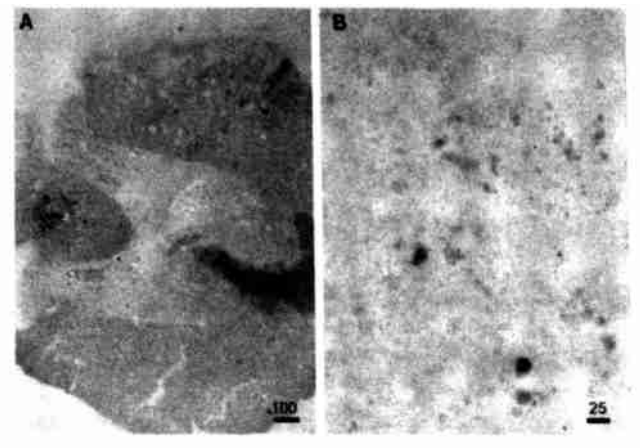


图 1　注射部位脊髓切片

A：注射含 LACZ 基因载体后 2 d，注射部位出现蓝色斑（X-gal×50）；B：注射后 4 周（X-gal×200）

Fig 1　Sections of the spinal cord at injection site

A：Two days after injection of the vectors containing LACZ gene，the blue spots were found at the injection site（X-gal×50）；B：Four weeks after injection（X-gal×200）

2.2　行为学观察

正常对照组术后 12 h 和 24 h 观察，LeMay 评分结果：可见部分大鼠麻醉清醒后有一过性的功能障碍，术后 1 d 均得到恢复。伤后第 1 天单纯损伤组、损伤＋AxCA－BDNF 组的 LeMay 平均评分结果分别为 8.11、7.44；伤后第 2 周平均评分分别为 6.00、4.67，提示动物均迅速地出现一定程度的恢复。各时相点之间比较有显著性差异。但在相同时相点，各组之间未能发现有统计学意义的区别。

2.3　轴突定量观察

脊髓白质腹内侧轴突计数表明单纯损伤后 3 d 和 2 周有明显的轴突丧失。而损伤加 AxCA-BDNF 组轴突的丧失较少，见图 2、表 1。

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

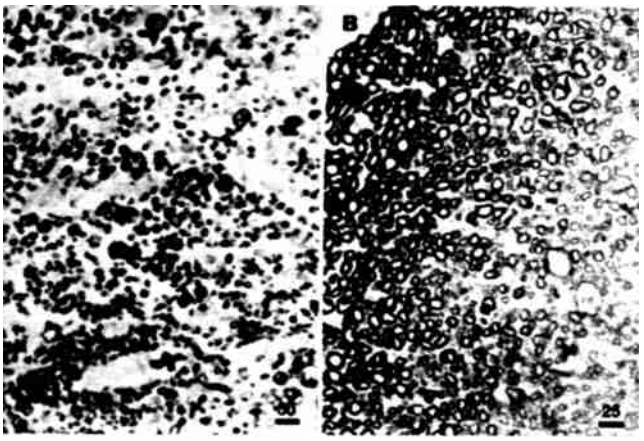


图 2 伤后 2 周脊髓切片 (甲苯胺蓝法×200)
A:单纯损伤组的轴突明显丧失;B:损伤+AxCA—BDNF 组保存的轴突较少

Fig 2 Sections of the spinal cord after two weeks (Toludine staining×200)
A: Significant axons loses in injury group; B: More axons were lesser in injury+AxCA—BDNF group

表 1 两组轴突数目比较($n=15, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of axon numbers between the two groups($n=15, \bar{x} \pm s$)

Groups	Post-injury		
	3 days	2 weeks	4 weeks
Injury	1716.25 ± 176.28	1061.25 ± 163.13 **	1346.25 ± 99.87 **
Injury + AxCA - BDNF	1767.50 ± 127.06	1645.00 ± 188.35 ++	1482.50 ± 172.32 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* the previous time points; ++: $P<0.01$ *vs* injury

2.4 损伤脊髓免疫组化改变

2.4.1 BDNF mRNA 原位分子杂交结果显示伤后 3 d 和 2周时,除对照组外,均有阳性运动神经元在灰质前角附近出现。而 4周时仅在损伤+AxCA-BDNF 组中可以见到阳性杂交信号。

2.4.2 BDNF 正常时 BDNF 免疫组化反应阳性的神经元和神经纤维末梢仅仅见于脊髓灰质后角及其附近。单纯损伤组伤后 3 d 可出现于损伤段附近脊髓灰质前角, 2 周时阳性反应很难见到。损伤+AxCA-BDNF 组到第 4 周时仍可发现阳性反应细胞。

2.4.3 NF_{200} 伤后 3 d,各组动物白质中的 NF 阳性轴突明显减少,尤其以靠近灰质附近的阳性轴突减少明显。2 周时,单纯损伤组仍然有继续阳性轴突丧失,而损伤+AxCA-BDNF 组未继续减少。4 周时,损伤+AxCA-BDNF 组阳性轴突有所增加,见表 2。

表 2 两组 NF 阳性轴突比较($n=15, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of numbers of NF-positive axons between the two groups($n=15, \bar{x} \pm s$)

Groups	Post-injury		
	3 days	2 weeks	4weeks
Injury	624.50 ± 182.94	484.25 ± 132.03 *	552.38 ± 137.74
Injury + AxCA - BDNF	624.50 ± 140.33	624.50 ± 92.03 ++	721.63 ± 107.85 +

*: $P<0.05$ *vs* the previous time points;
+: $P<0.05$, ++: $P<0.01$ *vs* injury

3 讨论

本实验作为转基因治疗脊髓损伤的初步研究, 利用复制缺陷腺病毒载体将外源性 BDNF 基因直接引入脊髓, 证实该载体可有效地感染脊髓组织和表达报告基因, 并且进一步证实转染 AxCA-BDNF 基因后局部 BDNF 基因的表达增加。近年来人们付出了极大的努力来探索克服血脑屏障向中枢神经系统释放基因材料的方法。基于成熟神经元不具有分裂能力这一特性,目前 CNS 基因治疗研究较为新颖和有效的方法是先将外源基因插入作为载体的复制缺陷病毒 (如 AVV, Ad, HSV-1, 这些病毒的共同特征是转染的效率高, 并可以转染不分裂的成熟细胞), 然后转染体内细胞直接在成熟的神经元中表达目的基因 (属体内直接途径法,主要用于动物实验)[9]。

直接将载体引入靶组织的注射法是一种切实可靠的简便方法。Zhang[5] 采用的注射剂量约为 0.5 μl[8]。而我们的剂量稍大, 但结果证明单纯注射本身引起的创伤对下肢功能没有明显损害。后期的观察未发现功能障碍表明重组腺病毒所引起的局部反应也未造成功能损害。因属不完全性损伤, 故行为学观察大多数动物均有不同程度的功能恢复。LeMay 评分[6] 虽然为较理想的功能评估方法,但主要是一个综合性评分系统,因而较难证实各组动物之间在相同时相点功能障碍程度上的较细微差异。

实验中发现, 尽管直接转染病毒的方法可以使局部注射点周围较广泛节段的脊髓细胞受到感染, 但该方法似乎主要是使脊髓灰质前角运动神经元表达在正常时很少表达的 BDNF mRNA,这种作用在脊髓损伤病理生理过程中的价值值得探讨。

Novikov[10] 证实了 BDNF 具有减少脊髓损伤后神经元死亡和损伤区大小的作用。他所用的 BDNF 是通过导管引入,定期给药,所用的模型为胫运动神经元池模型。本研究进一步用直接和间接转基因的方法将 BDNF 引入脊髓, 观察其对临床最为常见类型脊髓挫

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

伤的作用。结果证实脊髓白质轴突计数提示伤后 2 周直接转染 BDNF 腺病毒载体组动物的轴突减少程度较少。BDNF 这种防止脊髓损伤后轴突减少的作用有重要的意义，因为保存残留轴突并促进这些轴突修复和再生是脊髓损伤治疗和研究中最为重要的内容。仅仅多挽救百分之几的轴突就可能给伤员带来完全不同的生存质量。神经中丝(NF)是构成神经细胞尤其是神经轴突的主要框架结构。我们所用的抗 200×10^3 u 的抗体，正常时仅仅存在于轴突内。故一般情况下胞体不着色。当脊髓细胞修复或神经细胞功能增强而在胞体中大量合成 200×10^3 u 的神经中丝时，轴突的着色增加，胞体也可着色。本实验利用 NF_{200}对神经骨架蛋白进行初步观察结果表明：BDNF 直接转基因治疗的动物在伤后 4 周时，NF 免疫反应阳性的轴突较正常增多。提示 BDNF 过表达不但与防止轴突丧失的机制有关，还与促进神经元骨架蛋白的修复机制有关。这种双重作用可能在脊髓损伤治疗中有重要的价值。

参考文献

[1] Zlokovic B V, Apuzzo M L J. Cellular and molecular neurosurgery: pathways from concept to reality[J]. Neurosurgery, 1997, 40(4): 789—803.

[2] Yan Q, Rosenfeld R D, Matheson C R, *et al*. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system[J]. Neuroscience, 1997, 78(2): 431—448.

[3] 李兵仓，王正国，朱佩芳，等．脑源性神经营养因子 mRNA 在胚胎脊髓修复成鼠脊髓损伤过程中的变化[J]．Natl Med J China, 1997, 77(7): 516—520.

[4] Kojima H, Inuzuka S, Miwa T, *et al*. Construction and characterization of adenoviral vector expressing biologically active brain derived neurotrophic factors[J]. Biochemical Biophysical Research Communication, 1995, 212(2): 712—717.

[5] Zhang Y, Dijkhuyizen P A, Anderson P N, *et al*. NT-3 delivered by an adenoviral vector induces injured dorsal root axons to regenerate into the spinal cord of adult rats[J]. J Neuroscience Research, 1998, 54(3): 554—562.

[6] LeMay D R, Neal S, Neal S, *et al*. Paraplegia in the rat induced by aortic cross-clamping: model characterization and glucose exacerbation of neurologic deficit[J]. J Vasc Surg, 1987, 6(4): 383—390.

[7] Rosenberg L J, Wrathall J R. Quantitative analysis of acute axonal pathology in experimental spinal cord contusion[J]. J Neurotrauma, 1997, 14(11): 823—838.

[8] 蔡文琴，王伯沄．实用免疫细胞化学及核酸分子杂交技术[M]．成都：四川科学技术出版社，1994.421—428.

[9] Sayers S T, Khan N, Ahmed Y, *et al*. Preparation of brain-derived neurotrophic factor-and neurotrophin-3-secreting Schwann cells by infection with a retroviral vector[J]. J Mol Neurosci, 1998, 10(2): 143—160.

[10] Novikov L, Novikova L, Kellerth J O. Brain derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long term survival of adult rat spinal motoneurons *in vivo*[J]. Neuroscience, 1997, 79(3): 765—774.

（编辑　谢义霞）

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