DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.022
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0153-03

缓慢牵伸肢体延长时周围神经损害及修复过程中生长相关蛋白-43 mRNA表达的实验研究

范少地[1],许建中[1],李起鸿[1],吴 康[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院骨科;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室;重庆 400038)

提 要 目的:观察缓慢牵伸肢体延长时周围神经相应的脊髓及背根神经节(DRG)中生长相关蛋白-43(GAP-43)mRNA表达。方法:29只日本大耳白兔胫骨以1 mm/d的速度缓慢牵伸延长至20%、40%,停止延长后2、4周,用原位杂交技术观察坐骨神经相应背根神经节及脊髓中GAP-43 mRNA的表达及定位,以图像分析仪进行半定量分析。结果:缓慢牵伸至20%时相应脊髓及神经节呈阳性表达,延长40%时呈强阳性表达,停止延长4周恢复正常。结论:缓慢牵伸周围神经虽无神经临床损害症状,但引起GAP-43 mRNA表达的上调,并在停止延长后4周恢复正常;缓慢牵伸过程中神经的亚临床损害广泛存在,并存在着强烈的神经再生反应。

关键词 肢体延长;周围神经;生长相关蛋白-43;原位杂交
中图法分类号 R394.3;R683.405 文献标识码 A

Expression of GAP-43 mRNA in course of injury and repair of peripheral nerve during and after limb lengthening in rabbits

FAN Shao-di, XU Jian-zhong, LI Qi-hong, WU Kang (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To investigate the expression of GAP-43 mRNA in corresponding DRG and spinal cord during and after the limb lengthening. Methods: Using in situ hybridization, we investigated the expression of GAP-43 mRNA in corresponding spinal cord and dorsal root ganglion after 20% and 40% lengthening and at the 2nd and 4th week after 40% lengthening in rabbits. Results: There was positive expression in 20% lengthening group and stronger expression in 40% lengthening group. But the expression recovered to normal at the 4th week after limb lengthening. Conclusion: The expression of GAP-43 mRNA can be up-regulated during limb lengthening, which is corresponded to the subclinical damage of peripheral nerve. However, it can gradually recover to normal after the lengthening stops.

Key words limb lengthening; peripheral nerve

生长相关蛋白-43(Growth associated protein 43, GAP-43)是由神经元胞体产生的一种特异性蛋白,其基因表达仅限于神经系统。生长相关蛋白与神经系统的发育,突触的形成,神经的可塑性及神经的再生密切相关[1],当周围神经受损时,GAP-43会迅速升高,当神经再生完成后,这种蛋白表达即迅速下调[2]。急性牵伸周围神经超过20%时即可造成神经轴索的断裂,产生不可逆转的损害,然而缓慢牵伸的幅度远远超过此极限,而不产生临床神经损害,其原因是什么?本实验运用GAP-43 cDNA探针原位杂交技术来观察这一变化过程中GAP-43 mRNA表达水平,阳性细胞定位及分布的变化。

1 材料与方法

1.1 动物模型

选用体重2.0~2.5 kg的日本大耳白兔,雌雄不拘。一侧后肢行胫骨截骨延长。动物手术:采用兔胫骨上干骺端外固定支架截骨延长模型[3]。术后第5天先除去骨断端加压,然后按每日1mm分2次的速度延长肢体,术后被动伸屈膝踝关节以防关节僵直,每7~10 d摄X光片1次了解肢体延长速度及幅度,延长率按骨延长度占胫骨原长度的百分率计。

1.2 GAP-43 mRNA表达观察——原位杂交

1.2.1 探针制备 将GAP-43 cDNA质粒进行转化、扩增、纯

作者简介:范少地(1966.7),男,陕西省西安市人,硕士,主治医师,主要从事周围神经、下肢延长方面的研究。电话:(023)68773081

收稿日期:1999-07-12;修回日期:1999-12-27

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

化、鉴定后回收。采用德国 Boehringer Mamheim 公司地高辛标记 DNA 试剂盒，按其说明标记 DNA 片段，并保留部分用于对照实验。

1.2.2 取材 取延长至 20%、40%，延长 40%后停止延长 2、4 周动物各 6 只，正常对照组 5 只，于 3%戊巴比妥钠静脉麻醉下，以 4℃的 4%多聚甲醛和 0.3%饱和苦味酸混合固定液行升主动脉插管全身持续灌注 40 min 后冰箱放置 3~4 h，取 $L_{6\sim7}$ 脊髓及相应神经节在同一固定液中后固定，脱水后冰冻切片。

1.2.3 原位杂交实验 上述各时相点胫后神经延长区相应脊髓及背根神经节切片同一批以同样的方法，同样的条件下实验，以避免实验条件不同造成的误差。以贴片法行原位杂交实验，具体步骤参照蔡文琴[4]原位杂交技术方法。

1.3 图像分析

每个时相 6 份标本，正常对照 5 份标本，每个标本随机抽取 6 个视野，对原位杂交实验后 GAP-43 mRNA 阳性细胞进行图像分析，将玻片置于×40 显微镜下，显微镜与 Tiger920G 图像扫描仪相连。共获得 318 幅图像，计算机自动显示平均阳性细胞计数和平均积分光密度值（*IOD*），总测量面积均为 3.4138E+005（图像分析仪自动控制）。

1.4 统计学处理

采用第四军医大学统计学教研室 SPLM 数理统计包行方差分析。

2 结果

正常的神经节内仅有较弱 GAP-43 mRNA 阳性表达，染色很浅，且多为中小直径的感觉神经元。延长至 20%和 40%时坐骨神经相应神经节中可见夹杂在神经纤维中的 GAP-43 mRNA 阳性神经节细胞，典型的 GAP-43 mRNA 阳性神经节细胞呈圆形或椭圆形，脱水后收缩呈凹陷形或月芽形，紫蓝色颗粒仅存在于胞浆内，胞核及神经纤维不着色，在延长至 40%组 GAP-43 mRNA 呈强阳性表达，阳性细胞数目多，大、中、小直径的神经元均有表达，染色深，见图 1。停止延长后 2 周，GAP-43 mRNA 表达明显减弱，阳性细胞数目减少，染色较为浅淡。停止延长后 4 周时，仅有较弱的 GAP-43 mRNA 表达，和正常对照相似。见表 1。

表 1 背根神经节 GAP-43 mRNA 阳性细胞计数及 *IOD* 值

Tab 1 Number and *IOD* of GAP-43 mRNA positive cells in related DRG

Group	No. of positive cells	*IOD*
20% group($n=6$)	$28.843\pm7.941^{**}$	$179.547\pm21.43^{**}$
40% group($n=6$)	$35.833\pm5.564^{**}$	$239.833\pm30.96^{**}$
2 weeks after 40% lengthening($n=6$)	$22.667\pm5.955^{*}$	$90.339\pm14.73^{*}$
4 weeks after 40% lengthening($n=6$)	10.667 ± 3.502	30.221 ± 12.79
Control($n=5$)	11.8 ± 2.864	33.041 ± 12.06

$^{*}: P<0.05$, $^{**}: P<0.001$ *vs* control

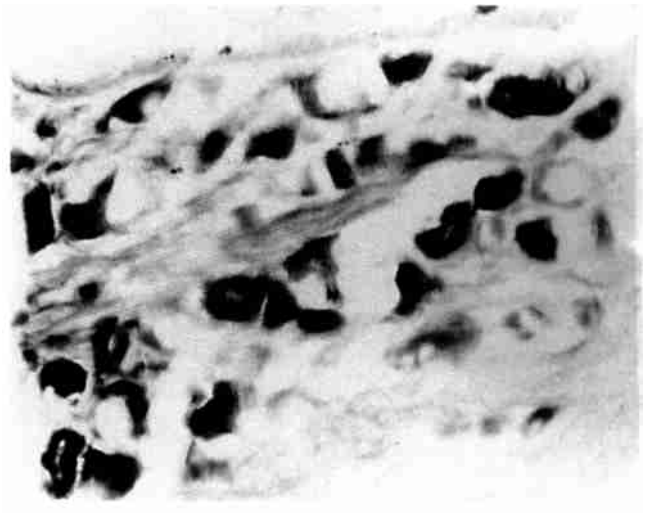


图 1 延长 40%时相应神经节 GAP-43 mRNA 阳性细胞 （NBT/BCIP×200）

Fig 1 Positive cells of GAP-43 mRNA in related DRG in 40% lengthening （NBT/BCIP×200）

在相应的脊髓，正常情况下无阳性表达，延长 20%时呈阳性表达。延长至 40%组 GAP-43 mRNA 呈强阳性表达，其阳性细胞主要分布于脊髓灰质的前角，在中央管周围及灰质的其它区域仅有散在的表达，而相对应白质无阳性细胞表达，见图 2。典型的 GAP-43 mRNA 表达阳性细胞呈星形及多角形，神经细胞轮廓清晰。细胞核为无染色的圆形结构，胞浆内充满紫蓝色的细杂交颗粒，细胞周围呈无色的圆形透明区；停止延长后 2 周组，脊髓中阳性细胞数明显减少，染色亦较浅淡。停止延长后 4 周，阳性细胞基本消失，见表 2。



图 2 延长 40%时相应脊髓 GAP-43 mRNA 阳性细胞 （NBT/BCIP×200）

Fig 2 Positive cells of GAP-43 mRNA in related spinal cord in 40% lengthening （NBT/BCIP×200）

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

表 2　脊髓灰质前角 GAP-43 mRNA 阳性细胞计数及 *IOD* 值

Tab 2　Number and *IOD* of GAP-43 mRNA positive cell in related spinal cord

Group	No. of positive cells	*IOD*
20% group($n = 6$)	23.632 ± 6.871 **	47.397 ± 11.274 **
40% group($n = 6$)	21.167 ± 3.312 **	56.618 ± 13.563 **
2 weeks after 40% lengthening($n = 6$)	10.167 ± 3.488 **	27.499 ± 16.471 *
4 weeks after 40% lengthening($n = 6$)	0.5 ± 1.225	1.573 ± 3.853
Control($n = 5$)	0	0

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.001$ *vs* control

3　讨论

对于急性神经切断伤, 挫裂伤后 GAP-43 mRNA 表达的研究较多, 然而缓慢下肢延长周围神经虽然不出现临床症状, 但其亚临床损害是广泛存在的[3]。而对于缓慢牵伸周围神经过程中以及停止牵伸后 GAP-43 mRNA 表达的变化, 却未见有文献报道。本实验结果表明: 周围神经的亚临床损害亦可引起 GAP-43 mRNA 表达上调。缓慢牵伸下肢延长时, 相应脊髓前角及背根神经节均有 GAP-43 mRNA 阳性表达, 表明再生反应强烈。且随延长幅度的增加而表达越强烈, 停止延长后 2 周, 这种表达即明显下调。停止延长后 4 周, 这种表达与正常对照已无显著性差异。

Chong[5] 报道在神经切断伤和挫裂伤时, 脊髓相应节段神经元及背根神经节 GAP-43 mRNA 将持续强阳性表达。Van der Zee[6], Hoffman[7] 等对周围神经挫裂伤后的实验结果亦证实, 神经损伤 16 h 至 2 d, GAP-43 mRNA 水平达到高峰, 并维持到 14 d, 于 37 d 恢复到正常水平。而缓慢牵伸延长停止后 2 周, 这种表达已经明显减弱, 提示后者再生反应下调较早。这是由于在缓慢牵伸过程中就存在着同步的再生。我们在组织学的研究表明[3], 缓慢牵伸过程中周围神经中超微结构可见新髓鞘形成, 表明修复与损害同步进行。

Fitzgerald[8] 的研究表明, GAP-43 mRNA 在脊髓背根神经节的发育过程中的表达与轴突生长一致, 胚胎第 12 d, 轴突生长快, GAP-43 mRNA 表达也强, 随着神经元的发育成熟, 神经元之间突触的建立, GAP-43 mRNA 的表达也随之减弱乃至消失。缓慢牵伸下肢延长, 周围神经被动拉长, 轴突亦被被动拉长, 产生类似于轴突生长的过程, 然而这种过程是建立在轴突不断的微损伤和不断的再生基础之上, 完全不同于胚胎时期的生长发育, 推测可能正是由于存在着不断的损伤与再生, GAP-43 mRNA 表达越强烈, 这和 Hoffman[7] 研究大鼠坐神经不同程度损伤后 GAP-43 mRNA 表达结果相一致, 压榨坐骨神经 16 h, 同侧背根神经节中 GAP-43 mRNA 含量开始升高, 24 h 升高 2.5 倍, 48 h 达 10 倍, 37 d 降至正常。提示缓慢牵伸过程中神经再生反应强烈。

大量的实验表明: 周围神经和中枢神经受损后, GAP-43 的表达都会增强[5,6,7]。因此 GAP-43 作为神经再生的标志, 在神经的发育, 轴突的延长过程中起到重要的作用。但其作用机制尚不很清楚。GAP-43 是由 226 个氨基酸组成的。它和 G 蛋白的受体反应位点具有交叉性, 轴突延长是一个持续的过程。在缺乏抑制性信号的情况下, 它不会停止生长, 抑制性信号能导致生长锥的崩解或生长的停止, GAP-43 结合到 G 蛋白受体反应位点上, 解除了抑制性信号, 从而允许轴突的生长[2]。

参考文献

[1] Skene J H P, willard M. Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems [J]. J Cell Biol, 1981, 89(4): 96－103.

[2] 严恒林 . 生长相关蛋白(GAP-43)与神经发育和再生 [J]. 神经解剖学杂志, 1993, 9(2): 155－162.

[3] 许建中, 李起鸿, 吴宗耀 . 周围神经适应缓慢牵伸机理的电生理观察 [J]. 中华物理医学杂志, 1998, 20(4): 195－198.

[4] 蔡文琴, 王伯[illegible]云 . 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. 406－414.

[5] Chong M S, Woolf C J, Rews P, *et al*. The down-regulation of GAP-43 is not responsible for the failure of regeneration in freeze-killed nerves grafts in the rat[J]. Experimental Neurology, 1994, 129(2): 311－320.

[6] Van der Zee C E, Nielander H B, Vos J P, *et al*. Expression of growth associated protein B50 (GAP-43) in dorsal root ganglia and sciatic nerve during regenerative sprouting[J]. J Neurosci, 1989, 9(10): 3 505－3 512.

[7] Hoffman P N. Expression of GAP-43: A rapid transported growth associated protein and class II beta tublin, a slowly transported cytosketetal protein, are coordinated in regenerating neurons[J]. J Neurosci, 1989, 9(3): 893－897.

[8] Fitzgerald M, Reynolds M L, Benowitz L Z. GAP-43 expression in the developing rat lumbar spinal cord[J]. Neuroscience, 1991, 41(1): 187－199.

（编辑　冯崇英）

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