DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.004

胚胎脊髓移植对脊髓内源性 NGF影响的实验观察*

胡 建** 王正国*** 朱佩芳*** 李兵仓*** 李应玉*** (第三军医大学附属西南医院骨科)重庆, 400038

提 要 目的: 观察胚胎脊髓移植后,脊髓内源性神经生长因子(NGF) mRNA的表达及 NGF多肽的合成。方法: 采用分子生物学和免疫组化方法。结果: 胚胎脊髓移植可以促进和在一定时间内增加损伤脊髓内 NGF mRNA的表达和 NGF多肽的合成;胚胎脊髓植入后早期能在宿主脊髓内表达和合成 NGF;损伤和移植条件下, NGF mRNA的表达与合成主要在脊髓前角神经元。结论: 内源性 NGF在移植后的损伤脊髓中可能对再生轴突起重要的趋化诱导作用。

关键词 神经生长因子;胚胎脊髓移植;脊髓损伤

中图法分类号 R651.2

神经生长因子(NGF)是神经系统最重要的生物活性分子之一。它营养某些神经元并诱导其突起生长,是神经系统维持正常发育和功能的必要因素[1]。大量的实验资料表明, NGF是参与损伤神经再生和功能修复的重要因素[2]。在组织移植的同时辅以外源性的 NGF,不仅会改善移植物的存活,而且将促进脊髓的再生[3~5]。然而,有关胚胎脊髓移植条件下,内源性 NGF的变化规律以及内源性 NGF的分布情况等都尚未见报道。针对这些问题,我们设计了本实验,以期阐明胚胎脊髓移植条件下内源性 NGF的变化规律,从而进一步完善胚胎脊髓移植修复损伤脊髓作用机制的研究。

1 材料与方法

1.1 胚胎脊髓移植模型的制备

采用鼠脊髓半切洞式模型。受体为成年 Wistar大鼠 89只,体重 200±30 g,雌雄不拘。随机分为单纯损伤与胚胎脊髓移植2组,观察时相点为术后 1、3、5、7、10、15、30 d,每个时相点 6只动物,正常对照 5只。乌拉坦腹腔麻醉(1.25 g/kg),无菌条件下,暴露脊髓腰膨大,半侧脊髓造洞。供体为同种异体妊娠 14 d胎鼠,自母体取出胎鼠,仔细选择颈胸段脊髓约 3 mm,玻璃针头注入预制的脊髓腔洞内,无创缝合硬脊膜。术后抗感染 3 d,次日为其灌胃、按摩排尿直至自主功能恢复。

1.2 NGF cDNA探针制备[6]

NGF选用 Bluescript S K-质粒载体, NGF DNA片段长 500 bp,插入位点在 AccI、PstI,选择标记为氨苄青霉素。常规制备和地高辛标记探针,定量后 4℃保存备用。

1.3 组织总 RNA的提取

采用 Chomczynski[7]一步法提取脊髓组织总 RNA分装存放 -70℃。取 10 μl提取 RNA电泳证实无明显降解。1∶50稀释,紫外分光光度计上测 A_{260}及 A_{280}读数,计算 RNA含量约为 1.5 g/L, A_{260}/A_{280}比值在 1.6~2.1左右。

1.4 NGF mRNA斑点杂交

取总 RNA水溶液,加等量甲醛变性溶液, 60℃水浴 30 min;冷却后,将样品和经倍比稀释的标准品点到 NC膜上; 80℃, 2 h;入杂交袋,按 0.2 ml/cm²加预杂交液, 42℃~54℃ 1 h;去液,按 0.1 ml/cm²加新配杂交液,内含探针 200 μg/L, 43℃~45℃杂交 24 h; 2× SSC, 0.1% SDS洗涤数次,每次 5 min; 0.1× SSC, 0.5% SDS 55℃洗 2次,每次 30 min;缓冲液 1、2各洗 5 min× 2次,加 NBT/BCIP避光过夜显色; 0.2 mol/L EDTA终止反应。所获图像扫描入计算机,按标准品计算出反应强度-浓度变化曲线。测量样品各点灰度值,依曲线求出各点每 mg总 RNA中 mRNA的拷贝数。

1.5 NGF组织原位杂交[6]

4%多聚甲醛灌注固定的脊髓标本,冰冻切片 25 μm,浸泡于 4%多聚甲醛内; 0.01 mol/L PBS(pH7.2)洗 2× 3 min;选几张切片作为 RNA酶对照组[切片浸入 RNA酶(100 u/ml)溶液内, 37℃孵育 30 min, 2× SSC冲洗, 2× 3 min,与其它切片一起进行下列处理]; 0.1 mol/L甘氨酸/PBS(pH7.2) 5 min; 0.3% Triton X-100/PBS(pH7.2) 30 min; 0.1 mol/L Tris·HCl(pH8.0)/50 mmol/L EDTA pH8.0,内含蛋白酶 K 1 mg/L, 37℃孵

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39470715

** 胡 建,男, 35岁,副主任医师,副教授,博士

*** 附属大坪医院野战外科研究所 重庆, 400042

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

育 20 min; 4% 多聚甲醛 /PBS 5 min;浸入新鲜配制的 0.25% 乙酸酐 (0.1 mol/L三乙醇胺配制) 10 min; 0.1 mol/L PBS(pH7.2)漂洗 2× 5 min; 2× SSC漂洗 10 min;切片入含 NGF cDNA探针 (200μg/L)的杂交液 , 42℃水浴 , 24 h; 4× SSC漂洗 15 min; 2× SSC 37℃漂洗 30 min; 1× SSC; 0.5× SSC 37℃各漂洗 10 min; 0.05 mol/L PBS(pH7.2) 10 min× 2;抗地高辛抗血清 ,室温 12 h; 0.5 mol/L PBS(pH7.2) 10 min× 3;缓冲液 1 2× 15 min;缓冲液 3× 2 min;入 NBT/BCIP过夜显色 ;切片入缓冲液 4铺片 ;常规复染、脱水透明、封片。光镜下观察 ,每个标本于 20×10倍随机摄取 5个图像 ,共得 400幅光镜图像。计算反应细胞的面数密度。于每个视野下 ,随机测量 10个细胞的反应灰度值 ,求其均值 ,进行统计分析。

1.6　NGF免疫组化实验[6]

经 4% 多聚甲醛灌注固定的标本 ,冰冻切片 25μm,浸于 4% 多聚甲醛内; 0.1 mol/L甘氨酸 /PBS(pH7.2) 5 min; 0.3% Triton X-100/PBS(pH7.2) 30 min;蛋白酶 K, 37℃孵育 20 min; 4% 多聚甲醛 /PBS 5 min; 0.1 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 2× 5 min;入正常血清 , 20 min;加入兔抗鼠 NGF抗体 (1∶300),室温孵育 20 h;对照组 1加正常兔血清 ;对照组 2加抗体稀释液。生物化羊抗兔抗体 , 37℃孵育 1 h; 0.01 mol/L PBS(pH7.2) 5 min× 3;加 ABC复合物 37℃ 90 min; 0.01 mol/L PBS(pH7.2) 10 min;用 DAB-H_2O_2液显色 15 min;捞片、复染、脱水 ,封片后光镜观察 ,并按原位杂交方法进行图像分析。

1.7　数据处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$表示 ,并用 MSOFFICE中的 EXCEL和 SPSS统计程序包进行 t检验分析和相关显著性检验。

2　结果

2.1　NGF斑点杂交结果

各组 NGF斑点杂交结果见表 1

表 1　各组 NGF斑点杂交结果 (mRNA考贝数 /μg总 RNA)

Tab 1　The results of each group of NGF dot-blot (mRNA copies/μg total RNA)

Group	Control	Days after operation(t /d)						
		1	3	5	7	10	15	30
Injured	0.03± 0.01	0.13± 0.05#	0.14± 0.02#	0.26± 0.04##	0.29± 0.06##	0.18± 0.04#	0.10± 0.01#	0.03± 0.01
Transplanted		0.22± 0.02#*	0.25± 0.05#*	0.32± 0.09##**	0.38± 0.03##**	0.49± 0.03##**	0.44± 0.04##**	0.17± 0.04##

#: $P<0.05$,##: $P<0.01$ *vs* control;*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* injured group

2.2　NGF组织原位杂交结果

NGF组织原位杂交结果见表 2 组织学观察发现: 无论移植物和非移植组 ,反应主要发生在脊髓前角运动神经元 ,见图 1,并且其反应程度随愈合时间延长而逐渐加强。胚胎移植物内可见有 NGF mRNA表达阳性的细胞 ,见图 2 神经胶质细胞也有一定程度的 NGF mRNA表达。



图 1　宿主脊髓灰质 (Hgm)内的前角神经元 ,呈 NGF mRNA原位杂交阳性反应

Fig 1　The positive reaction of NGF mRNA *in situ* hybridization took place at the anterior neuron of grey matter in host spinal cord

图 2　移植的胚胎脊髓 (FSC)中 ,有大量的 NGF原位杂交阳性反应细胞

Fig 2　Lots of positive reaction neuron of NGF mRNA *in situ* hybridization in transplanted embryonic spinal cord (FSC)

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

表 2 各组 NGF组织原位杂交反应神经元数(个 /100μ m²)和灰度值(grey)

Tab 2 The number of reactive neuron(No. /100μ m²) and the value of grey (grey) of ISHH in each group

Group		Days after operation (t /d)						
		1	3	5	7	10	15	30
Injured	No. of neuron	3.43± 0.36	7.00± 1.14#	12.63± 2.71##	23.79± 4.14##	13.59± 1.53##	11.45± 1.01#	8.19± 0.74#
	Grey	55.68± 7.85	112.47± 12.12##	152.13± 11.13##	193.6± 29.01##	174.07± 14.30##	148.57± 25.60#	112.37± 10.79#
Transplanted	No. of neuron	10.35± 1.19#**	20.90± 1.62##**	20.70± 1.20##**	37.87± 5.12##**	42.14± 2.63##**	39.15± 1.66##*	20.23± 4.62#*
	Grey	76.61± 24.20#	149.87± 23.57##*	178.80± 8.82##*	186.72± 7.77##	206.70± 5.55##	176.50± 15.84##	130.83± 26.04#

Note: The number of reactive neuron of ISHH in control group is 2.89± 1.05; Grey is 39.07± 11.65; # : $P < 0.05$;## : $P < 0.01$ *vs* control;* : $P < 0.05$;** : $P < 0.01$ *vs* injured group

2.3 NGF免疫组化实验结果

表 3为各组 NGF免疫组化的实验结果。光镜观察发现: 移植术后早期,最先在宿主脊髓白质内的神经纤维和胚胎脊髓内出现 NGF多肽组化阳性反应,随着时间的延续,脊髓各板层的神经细胞开始出现明显的反应,至术后 7~ 10 d反应最强烈时,脊髓前角和移植的胚胎脊髓内有大量的 NGF组化阳性反应细胞,见图 3

表 3 各组 NGF组化反应神经元数(个 /100μ m²)和灰度值(grey)

Tab 3 The number of reactive neuron(No. /100μ m²) and the value of grey (grey) of ABC in each group

Group		Days after operation (t /d)						
		1	3	5	7	10	15	30
Injured	No. of neuron	0.87± 0.10	1.77± 0.31#	3.97± 0.48##	6.37± 1.04##	4.94± 0.94##	3.59± 0.61##	1.44± 0.29#
	Grey	26.35± 9.76	51.01± 14.20	55.07± 7.09##	78.55± 14.79##	73.61± 10.21##	52.88± 4.08##	42.85± 8.39#
Transplanted	No. of neuron	3.74± 0.55##**	7.53± 0.74##**	9.70± 0.67##**	12.94± 0.72##**	14.16± 2.84##**	11.87± 3.72##**	5.57± 0.38##**
	Grey	42.62± 9.22#	84.55± 8.36##*	81.52± 4.09##*	91.73± 3.52##	96.18± 6.35##*	75.24± 13.80##*	64.78± 10.63##*

Note: The numer of reactive neuron of ISHH in control group is 0.73± 0.27; Grey is 19.38± 3.05; # : $P < 0.05$, ## : $P < 0.01$ *vs* control;* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* injured group



图 3 宿主脊髓灰质(Hgm)内的前角神经元,呈 NGF组化反应阳性

Fig 3 The anterior neuron of grey matter in host spinal cord appears positive reaction of NGF immunocytochemistry

3 讨论

分子生物学的发展,使对内源性 NGF变化规律的研究已不再是一项可望而不可及的工作。Eckenstein等[8]人观察到在发育过程中,动物脑及脊髓内高浓度表达 NGF,成年后,NGF的表达显著降低,而在脊髓则几乎没有 NGF的表达。然而,最近的研究[9]发现,当脑和脊髓受到损伤时,可重新诱导 NGF表达增加。由此可见,内源性 NGF与中枢神经损伤修复之间亦存在着密切的关系。

形态结构观察证实,胚胎脊髓移植能在一定程度上促进损伤脊髓神经的再生[3]。但这一作用的分子机制究竟是什么呢? 鉴于 NGF在神经损伤修复中的作用,我们对胚胎脊髓移植后,损伤脊髓中内源性 NGF mRNA的表达及 NGF多肽的合成情况进行了研究,结果证实: 单纯损伤和胚胎脊髓移植后早期,脊髓内 NGF mRNA的表达及 NGF多肽的合成大致呈逐渐增加的趋热。7 d以后,未移植组的表达及合成量逐渐降低,至 15 d左右基本恢复正常水平。这一结果与 Bakhit[10]等的研究基本相似。移植组 NGF的表达与

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

合成将持续到 10~ 15 d后才逐渐开始下降,至术后 30 d时,基本接近和恢复正常水平。

脊髓损伤后,内源性 NGF的来源问题,目前国内外尚未见有报道。经组织原位杂交和组织化学实验,我们发现:损伤和移植后,成体宿主脊髓内内源性 NGF合成的主要细胞成分为脊髓前角运动神经元和部分神经胶质细胞,存活的胚胎移植组织内的神经母细胞也是参与这一合成的主要细胞成分。本研究中我们观察到,在不同恢复时期,胚胎移植组织内均有 NGF mRNA表达及 NGF多肽合成的阳性反应细胞存在。毫无疑问,正是由于胚胎移植组织的参与,才使胚胎脊髓移植组的 NGF mRNA表达及 NGF多肽合成水平明显高于非移植组。令人遗憾的是,这一高表达没能在移植 15 d后得到进一步维持。

另一值得强调的是,在同一脊髓上,移植和损伤侧 NGF的表达程度明显强于对侧。造成这一现象的原因,作者认为可能是与 NGF的神经趋化作用有关,即诱导再生的神经突起向损伤侧生长。

参考文献

1 Levi-Montatcini R. The nerve growth factor thirty-five years later. Science, 1987; 237: 1154

2 Snider W D, Johnson E M. Neurotrophic molecules. Annal Neurol, 1989; 26: 289

3 Bernstein J J, Goldberg W J. Experimental spinal cord transplantation as a mechanism of spinal cord regeneration. Paraplegia, 1995; 33(5): 250

4 Shinoda M, Hoffer B J, Olson L. Interactions of neurotrophic factors GDNF and NT-3, but not BDNF, with the immune system following fetal spinal cord transplantation. Brain Res, 1996; 722(1-2): 153

5 郭世绂,胥少汀编著.脊髓损伤.北京:人民卫生出版社, 1993: 55~ 56

6 蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社, 1994: 121~ 134, 406~ 434

7 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987; 162: 156

8 Eckenstein F. Transient expression of NGF-receptor-like immunoreactivity in postnatal rat brain and spinal cord. Brain Res, 1988; 448: 149

9 Martinez-Murillo R, Caro L, Nieto-Sampedro M. Lesion-induced expression of low-affinity nerve growth factor receptor-immunoreactive portein in Purkinje cells of the adult rat. Neuroscience, 1993; 52(3): 587

10 Bakhit C, Armanini M, Wong W L *et al*. Increase in nerve growth factor-like immunoreactivity and decrease in choline acetyltransferase following contusive spinal cord injury. Brain Res, 1991; 554: 264

(收稿: 1997-12-16;修回: 1998-03-18)

(编辑　王　红)

Effects of embryonic spinal cord transplantation on endogenous nerve growth factor in the spinal cord*

Hu Jian, Wang Zhengguo, Zhu Peifang, Li Binchang, Li Yingyu (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the effects of embryonic spinal cord transplantation on endogenous nerve growth factor (NGF) in the spinal cord. **Methods**: Molecular biological and immunohistochemical techniques were used. **Results**: The expression of NGF mRNA and synthesis of NGF polypeptide were improved by embryonic spinal cord transplantation in a certain period of time after spinal cord injury. The embryonic spinal cord could express and synthesize NGF at the early period after transplantation. Under the conditions of injury and transplantation, the expression of NGF mRNA was mainly localized in the anterior neurons. **Conclusion**: Endogenous NGF may play an important role in regeneration of the axon after embryonic spinal cord transplantation.

Key words nerve growth factor; embryonic spinal cord transplantation; spinal cord injury

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China　No. 39470715

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