

大鼠脊髓损伤后胶质细胞生长因子的 mRNA 表达变化

魏梅洋¹, 董 艳², 陈宗雄¹, 李家顺³, 贾连顺³, 叶晓健³, 薛亚军²

(1 南京军区福州总医院骨二科 350025 福州市; 2 第二军医大学附属长征医院神经外科, 3 骨科 200003 上海市)

【摘要】目的:探讨胶质细胞生长因子(glial growth factor, GGF)在大鼠脊髓损伤后的表达变化及意义。**方法:**采用改良 Allen's 脊髓损伤打击模型, 用逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测胚胎大鼠脊髓内、正常成年大鼠脊髓内以及脊髓损伤后不同时间点伤段脊髓组织中 GGF 的 mRNA 表达。**结果:**GGF 在成年大鼠正常脊髓内低水平表达, 在胚胎脊髓中高水平表达。大鼠脊髓损伤后 GGF 的 mRNA 表达持续降低, 在脊髓损伤后 5d 达到最低峰, 之后 GGF 的 mRNA 表达可逐渐恢复。**结论:**GGF 在脊髓生长发育中起重要作用; 大鼠脊髓损伤后 GGF 的表达降低可能与脊髓损伤后少突胶质细胞大量死亡或凋亡有关, 与脊髓损伤后轴突无法再生、脱髓鞘的髓鞘再生困难有关。

【关键词】胶质细胞生长因子; 逆转录-聚合酶链反应; 基因表达; 脊髓损伤; 大鼠

中图分类号: R683.2, Q593+2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-11-0679-04

Expression of glial growth factor mRNA after spinal cord injury in rats/WEI Meiyang, DONG Yan, CHEN Zhongxiong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(11): 679-682

【Abstract】Objective: To study the expression of glial growth factor (GGF) mRNA in spinal cord after spinal cord injury (SCI) in rats. **Method:** The contusion model of SCI resulting incomplete paraplegia in rats was established according to the method of modified Allen's. The expression of mRNAs encoding the GGF in the rat spinal cord after SCI, as well as in the spinal cord of normal rat and E16 and E18 embryos was measured through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** The expression level of GGF mRNA was low in adult rats while significantly higher in E16 and E18 embryos ($P < 0.01$). The expression level of GGF mRNA appeared to decrease during the first 5 days after SCI, thereafter it appeared to recover in the next two weeks. **Conclusion:** High level expression of GGF in embryos spinal cord of rats indicates that GGF may play an important role in the progression of spinal cord. The early reduction of GGF expression in the injury site of spinal cord after SCI may be related to the widely necrosis or apoptosis of oligodendrocyte, and thus result in the difficulty of axon regeneration and remyelination in the spinal cord after SCI.

【Key words】 Glial growth factor (GGF); Reverse transcription polymerase chain reaction; Gene expression; Spinal cord injury; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command Region, Fuzhou, 350025, China

胶质细胞生长因子(glial growth factor, GGF)及其受体 ErbB 对少突胶质细胞与雪旺氏细胞的增殖与存活起重要的调控作用, 参与髓鞘的形成, 在中枢及外周神经的生长发育中起重要作用^[1-4]。在外周神经损伤后可诱导轴突源性 & 雪旺氏细胞

源性 GGF mRNA 的表达显著增加, 雪旺氏细胞 ErbB2/ErbB3 受体表达也持续增加, 进而促进雪旺氏细胞的增殖, 对外周轴突的再生和髓鞘化起至关重要的作用^[5]。然而在中枢神经脊髓损伤后, GGF 的表达情况及其在中枢神经损伤后的作用仍不清楚。本研究采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)测定大鼠胚胎脊髓及脊髓损伤前后 GGF 的 mRNA 表达变化, 探讨其在脊髓损伤中的

第一作者简介: 男(1977-), 医学博士, 主治医师, 研究方向: 脊柱外科

E-mail: meiyangwei1001@163.com

作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康、成年 SD 大鼠, 体重(275±25)g, 雌雄不限, 随机分为: 假手术组(正常对照组), 脊髓损伤后 6h、1d、3d、5d、1 周、2 周、3 周组; E16、E18 胚胎 SD 大鼠组。每组 6 只。

1.2 主要仪器和材料

美国 Beckman coulter 公司 DU R 640 蛋白/核酸分析仪, 美国 Beckman 公司 AVANTI™ 30 高速低温冷冻离心机, Perkin Elmer 9600 PCR 仪, 上海复日科技有限公司 Smart View 2001 生物电泳图像分析系统。Trizol 总 RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品。焦碳酸二乙酯 (DEPC) 为 Sigma 公司产品。Agorose、dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品; PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成, 其中 GGF 上游引物: 5'-GGTGGTGATCGAGGAAA-3'; 下游引物: 5'-ATGTACCTGCTGTCCTCCTTGA-3'; 其扩增产物长度为 384bp。内参照 GAPDH 上游引物: 5'-CACGAATTCGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGC-3'; 下游引物: 5'-GCTGGATCCGACGCCTGCTT-CACCACCTTCTT-3'; 其扩增产物长度为 482bp。

1.3 动物模型的制备

按改良 Allen's 撞击法制作脊髓损伤模型。0.3%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉, 以 T8 棘突为中心取背部正中切口, 长约 5cm, 显露 T6~T10 棘突及椎板。用特制手术钳咬除 T8 棘突及全椎板, 以脊髓为中心显露直径约 2.8mm 圆形区, 在硬膜表面垫一弯曲度与脊髓表面一致的塑料垫片, 用直径 2.4mm、重 10g 的圆柱状金属棒在细玻璃管的引导下从 2.5cm 高处垂直落下, 打击垫片致 T8 脊髓急性挫伤(致伤力为 25gcf)。对照组仅行椎板切除。

1.4 总 RNA 的提取

依不同的实验分组, 将大鼠腹腔麻醉, 严格无菌操作, 取出伤段脊髓组织, 采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒, 按说明书操作, 提取脊髓组织中的总 RNA, 溶解于 20μl Rnase-free 水中, -80℃ 保存。以电泳和波长 260nm 光谱吸收的情况来判定所抽提 RNA 的质量和浓度。

1.5 cDNA 合成

采用 Invitrogen 公司的反转录试剂盒, 按说明书操作, 合成 cDNA。

1.6 PCR 反应

25μl 反应体系中, 含 cDNA 2μl, 引物对 200nmol/L, dNTP 150μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1u 及相应缓冲液。PCR 反应条件按 99℃ 变性 2min 后, 94℃ 30s、50℃ 30s、72℃ 45s, 35 次反复循环扩增, 最后 72℃ 延伸 5min。同时以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照进行 PCR。

1.7 扩增产物鉴定

取 PCR 扩增产物 10μl, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 用 Smart View 2001 生物电泳图像分析系统分别对 GGF 和 GAPDH 进行吸光度扫描, 计算出 GGF 基因表达量与 GAPDH 基因表达量的比值。

1.8 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件包处理, *t* 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有非常显著性差异。

2 结果

2.1 E16、E18 胚胎大鼠脊髓和正常成年大鼠脊髓内 GGF 的表达情况

见图 1。GGF mRNA 在正常成年大鼠脊髓中呈低水平表达, GGF/GAPDH 比值为 0.255±0.104, 而在 E16、E18 胚胎脊髓中高度表达, 其 GGF/GAPDH 比值分别为 0.831±0.124 和 0.750±0.136, 与正常成年大鼠脊髓比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 大鼠脊髓损伤后不同时间点损伤区脊髓组织中 GGF mRNA 的表达

见表 1、图 2。大鼠脊髓损伤后 6h、1d、3d、5d

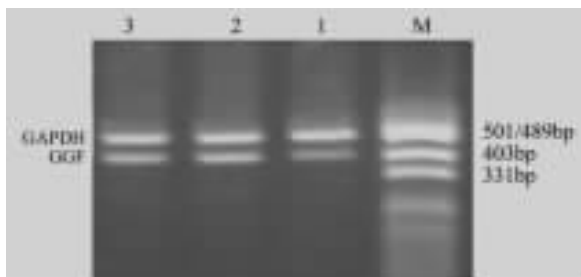


图 1 正常大鼠脊髓及胚胎大鼠脊髓内 GGF mRNA 表达电泳图 (M 泳道为 DNA Marker; 第 1~3 泳道分别为正常成年大鼠、胚胎 E16、E18)

表 1 脊髓损伤后不同时间点大鼠的 GGF mRNA 表达

	n	GGF/GAPDH
正常对照组	6	0.906±0.063
脊髓损伤后		
6h	6	0.854±0.096
1d	6	0.730±0.102 ^①
3d	6	0.530±0.113 ^{①②}
5d	6	0.308±0.075 ^{①②}
1周	6	0.562±0.084 ^{①②}
2周	6	0.915±0.085
3周	6	1.012±0.091 ^③

注:①与对照组比较 $P<0.01$, ②与损伤后 3 周比较 $P<0.01$, ③与对照组比较 $P<0.05$

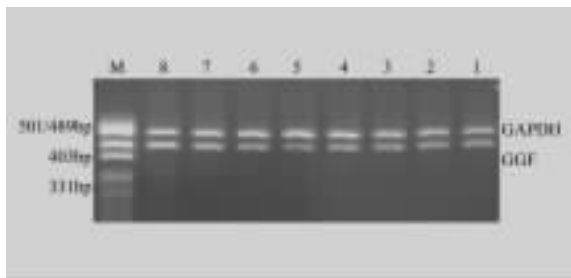


图 2 大鼠脊髓损伤后 GGF mRNA 表达电泳图 (M 泳道为 DNA Marker; 第 1 泳道为对照; 2~8 泳道分别为损伤后 6h、1d、3d、5d、1 周、2 周、3 周)

损伤区域脊髓内 GGF mRNA 的表达持续降低, 在第 5d 达到最低水平, 之后 GGF mRNA 的表达可逐渐恢复, 在损伤后 3 周达到高峰。与对照组比较, 脊髓损伤后 1d、3d、5d、1 周时 GGF mRNA 表达显著低于对照组的表达 ($P<0.01$), 也显著低于损伤后 3 周时的表达 ($P<0.01$)。损伤后 3 周时 GGF mRNA 的表达较对照组轻度上调 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 GGF 在神经发育中的作用

Neuregulin 属于多潜能促进生长的多肽家族, 对神经和间质组织的发育起重要作用^[6]。NRG1 特指 NRG1 基因的产物, 因其可促进胶质细胞的增殖与分化, 包括雪旺氏细胞和少突胶质细胞, 最先被指定为胶质细胞生长因子 (GGF) 家族。GGF cDNA 于 1993 年被克隆出^[7]。研究显示该基因除了表达 GGF 外, 还表达 Heregulins、Neu 分化因子、乙酰胆碱受体诱导活性物质、感觉神经元和运动神经元源性因子^[1]。

GGF 为可溶性生长因子, 能与 ErbB 受体的

异二聚体或同二聚体结合, 催化多肽链中的酪氨酸磷酸化, 激活下游信号分子而发挥其生理作用。进一步研究发现, GGF 通过不同的受体复合物作用于中枢和外周神经系统髓鞘形成细胞, 通过 ErbB2/ErbB4 异二聚体作用于少突胶质细胞, 通过 ErbB2/ErbB3 异二聚体作用于雪旺氏细胞^[8]。研究显示, GGF 及其受体在发育及成熟神经系统中广泛分布。GGF 能促进雪旺氏细胞和少突胶质细胞前体细胞、少突胶质细胞的增殖与存活。在中枢神经脱髓鞘病变中 GGF 能促进轴突的重新髓鞘化, 从而促进神经功能的恢复^[9,10]。GGF 能够促进神经元沿着放射状的胶质细胞迁移^[11], 促进培养的视网膜神经元存活和突触生长^[12]。GGF 的上述生物学功能提示其在神经系统再生过程中具有重要作用。

本实验结果显示, 在胚胎大鼠脊髓内 GGF 有高强度的表达, 表明 GGF 通过作用于 ErbB 受体在大鼠胚胎脊髓的发育生长中起着重要的作用。在成年大鼠脊髓内 GGF 也有持续低强度的表达, 表明 GGF 对正常成年大鼠脊髓内的功能维持也发挥作用。

3.2 GGF 在神经损伤修复中的作用

在外周神经损伤后, 轴突源性 GGF mRNA 表达立即增加, Wallerian 变性的雪旺氏细胞 ErbB3 受体表达诱导性持续增加, 进而促进雪旺氏细胞的增殖。也有研究显示, 雪旺氏细胞自身产生 GGF 并以旁分泌或自分泌形式促进雪旺氏细胞的增殖^[9]。雪旺氏细胞去分化和增殖是外周神经损伤后轴突再生的必备条件, 而外周神经损伤后上述因子和受体的表达变化是外周神经损伤后轴突能进行再生的关键。然而, 在中枢神经损伤后轴突却很难再生。研究显示, 在脊髓腹索损伤后疤痕组织内胶质细胞中少突胶质细胞比率少于 5%, 而正常成年脊髓腹索内少突胶质细胞比例大约为 60%^[13]。腹索损伤后少突胶质细胞的迅速死亡可能与观察到的轴突再生困难有关。

Lindholm 等^[14]研究了两种发生于中枢神经和外周神经之间的轴突再生情况, 包括损伤的运动神经元轴突芽穿过中枢神经类型的疤痕, 到达腹侧根支持的雪旺氏细胞; 原发的嗅轴突在嗅神经束中生长并进入嗅鞘细胞包绕的嗅球。在这三种环境中 (疤痕组织、反应的腹侧根和嗅神经束) 均表达 ErbB3 受体, 而 ErbB4 受体表达水平低下。

因此可认为周围细胞表达 ErbB3 受体是轴突成功再生的必要条件。生长的运动神经元或嗅神经元分泌的 GGF 诱导周围细胞表达 ErbB3 受体的可能性不能排除,而轴突的生长又能增加 ErbB3 受体的密度。外周神经损伤与中枢神经腹索损伤后的差别是中枢神经的疤痕组织不能诱导 GGF 表达的增加,而外周神经变性后将导致局部 GGF 合成的增加。

本研究结果显示,在大鼠急性脊髓损伤后 1h、6h、1d、3d、5d 内损伤区脊髓内 GGF 的表达持续降低,在损伤后 5d 达最低峰,之后 GGF 的表达逐渐恢复正常,并在损伤后 3 周表达较正常脊髓内表达轻度上调。与外周神经损伤后早期即出现 GGF 的明显诱导性表达增高,并持续存在的现象相反,中枢神经脊髓损伤后早期无法诱导 GGF 的表达增加,反而降低。外周神经损伤后诱导性 GGF 的表达与外周神经轴突再生是密切相关的。提示中枢神经损伤后早期 GGF 表达的降低与 SCI 后少突胶质细胞大量死亡或凋亡有关,与 SCI 后轴突无法再生、脱髓鞘轴突重新髓鞘化困难有关。

4 参考文献

1. 黄杨中,梅林. Neuregulin/ErbB 信号传导通路在神经发育中的作用[J]. 江西医学院学报, 2001, 41(2): 17-23.
2. Maurel P, Salzer J. Axonal regulation of schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI-3 kinase activity [J]. J Neurosci, 2000, 20 (12): 4635-4645.
3. Bozzali M, Wrabetz L. Axonal signals and oligodendrocyte differentiation[J]. Neurochem Res, 2004, 29(5): 979-988.
4. 薛亚军,董艳,江基尧. 胶质细胞生长因子的研究进展[J]. 生理科学进展, 2003, 34(2): 159-161.
5. Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, et al. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration [J]. J Neurosci, 1997, 17 (5): 1642-1659.
6. Lemke GE, Brockes JP. Identification and purification of glial growth factor[J]. J Neurosci, 1984, 4(1): 75-83.
7. Marchionni MA, Goodearl AD, Chen MS, et al. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system[J]. Nature, 1993, 362(6418): 312-318.
8. Vartanian T, Goodearl A, Lefebvre S, et al. Neuregulin induces the rapid association of focal adhesion kinase with the erbB2-erbB3 receptor complex in schwann cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271(2): 414-417.
9. Marchionni MA, Cannella B, Hoban C, et al. Neuregulin in neuron/glia interactions in the central nervous system: GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination [J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 468(): 283-295.
10. Wilson HC, Onischke C, Raine CS. Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors[J]. Glia, 2003, 44(2): 153-165.
11. Anton E, Marchionni M, Lee K, et al. Role of GGF/neuregulin signaling in interaction between migrating neurons and radial glial in the developing cerebral cortex[J]. Development, 1997, 124 (18): 3501-3510.
12. Berminham-McDonogh O, McCabe KL, Reh TA. Effects of GGF/neuregulin on neuronal survival and neurite outgrowth with erbB2/neu expression in developing rat retina [J]. Development, 1996, 122(5): 1427-1438.
13. Cullheim S, Carlstedt T, Risling M. Axon regeneration of spinal motoneurons following a lesion at the cord-ventral root interface[J]. Spinal Cord, 1999, 37(12): 811-899.
14. Lindholm T, Cullheim S, Deckner M, et al. Expression of neuregulin and ErbB3 and ErbB4 after a traumatic lesion in the ventral funiculus of the spinal cord and in the intact primary olfactory system[J]. Exp Brain Res, 2002, 142(1): 81-90.

(收稿日期: 2005-03-29 修回日期: 2005-09-09)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

2006年《实用骨科杂志》征订启事

《实用骨科杂志》由中华医学会山西分会和北京大学第三医院主办,山西医科大学第二医院承办。本刊设有论著、实验研究、经验、短篇、个案、基层园地、麻醉、护理、影像、骨科史萃等栏目,宗旨是以实用和普及为主,兼顾提高。本刊大 16 开版,96 页,铜版纸印刷,每册 8.50 元,全年 6 册,共 51.00 元。双月刊,逢双月 25 日出版,全国各地邮局(所)均可订阅,如有不便,也可向编辑部邮购。中国标准连续出版物号:ISSN 1008-5572/CN 14-1223/R。国内邮发代号:22-174。国外代号:BM 1499。邮编:030001;地址:山西省太原市五一一路 382 号山西医科大学第二医院内《实用骨科杂志》编辑部;E-mail:SGKZ@Chinajournal.net.cn;http://SGKZ.Chinajournal.net.cn;电话:(0351)3365705;3072133;传真:(0351)3072133。