

大鼠脊髓损伤后腓肠肌 GDNF 基因表达及意义

宋海涛¹ 贾连顺² 陈坚³ 陈哲宇⁴ 沈强² 史建刚²

(1. 解放军第 107 中心医院骨科, 山东 烟台 264002; 2. 第二军医大学长征医院骨科;
3. 第二军医大学基础部分子遗传教研室; 4. 第二军医大学基础部神经生物教研室)

【摘要】 目的 探讨大鼠脊髓损伤后, 后肢肌 GDNFmRNA 表达的变化及其意义。方法 选用 SD 雄性大鼠 30 只, 根据脊髓损伤时间随机分为 5 组, 即伤前、伤后 3、7、10 及 21 天组。采用 Allen's 方法致大鼠脊髓 T₁₃ 段不完全性损伤, 以 β -Actin 为内参照物, 半定量 RT-PCR 方法, 观察大鼠腓肠肌在脊髓损伤前、后不同时间 GDNFmRNA 表达。结果 脊髓损伤前 GDNFmRNA 在大鼠腓肠肌微量表达, 脊髓损伤后 3 天表达上调至 3 倍, 7 天上调至 10 倍, 10 天上调至 4 倍, 21 天仍高于正常水平。结论 脊髓损伤后骨骼肌 GDNFmRNA 表达上调, 可能是神经元通过“胞体—轴突—靶器官”途径的一种自我保护反应, 用 GDNF 治疗脊髓损伤时应长期用药。

【关键词】 脊髓损伤 基因表达调控 肌

GDNF gene expression and its significance on gastrocnemius muscle of rats with injured spinal cord SONG Hai-tao, JIA Lian-shun, CHEN Jian, et al. The 107th Hospital of PLA (Shandong Yantai 264002)

【Abstract】 Objective To investigate the varieties and its significance of GDNF gene expression on hindlimbs of rats with crushed injury of the spinal cord (SCI) **Methods** 30 male SD rats were divided randomly into 5 groups (pre-operation, 3th, 7th, 10th and 21st after operation) based on the time of spinal cord injury produced with Allen's method. GDNFmRNA expression on gastrocnemius muscle of the rats with spinal cord injury at different times after the injury were observed using semi-quantitative RT-PCR method with β -Actin as a inner consult. **Results** Minimal expression of GDNFmRNA was found in gastrocnemius muscle in the normal rats, and it up-regulated 3 times 3 days after SCI, 10 times 7 days, 4 times 10 days and slight higher than normal level 21 days after SCI. **Conclusion** It may be one kind of self-protective reaction of skeletal muscle to express high standard GDNFmRNA through “motorneuron-axon-target” route in the early stage after SCI. GDNF should be supplied early and long term treatment of SCI.

【Key Words】 Spinal cord injuries Gene expression regulation Muscles

脊髓神经元通过“胞体-轴突-靶器官”轴, 顺轴向转运神经营养因子 (NTFs), 维持肌肉正常生理机能、对损伤修复起促进作用; 反之, 当脊髓神经元损伤时, 肌组织也应激产生大量 NTFs, 逆轴向转运至神经元胞体, 表现出自我保护反应^[1]。胶质细胞源性神经营养因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 是新近发现的效能最强的神经营养因子, 对离体及在体的运动、感觉神经元的存活起促进作用^[2], 在大鼠胚胎时期广泛高表达于神经系统及其靶组织, 促进其发育和分化, 出生后表达明显降低^[3], 但在组织损伤后其表达呈现上调趋势, 呈现自我保护作用。故神经元损伤后, 靶组织 GDNF 表达的程度可以从侧面反映其对神经组织的营养作

用, 为此设计该实验。

1 材料

1.1 试验动物与模型制备 SD 雄性大鼠 30 只, 体质量 (230 ~ 300) g, 由第二军医大学动物试验中心提供。根据脊髓损伤时间, 随机分成 5 组: 损伤前、损伤后 3 天、7 天、10 天、21 天。Allen's 方法致伤 T₁₃ 段脊髓, 致伤力为 10g × 7.5cm (即 10g 质量的冲击棒自 7.5cm 高处自由坠落, 冲击面用厚 1mm、直径为 3mm 硬质尼龙材料制成、底端制成 120 凹面的撞杆)。撞击成功的标志为: 大鼠尾巴痉挛性摆动, 双下肢及躯体回缩样扑动, 双下肢呈弛缓性瘫痪。截取脊髓损伤前、后右侧后肢腓肠肌 (神经-肌肉接头段), 标本质量 150 ~ 200mg, 剥离肌肉外膜, 迅速冻存于 -80℃ 冰箱中, 备用。

1.2 主要试剂 RNA 抽提试剂盒 TRIZOL Reagent (GIBCO-BRL, LIFE TECHNOLOGIES), 逆转录聚合酶链式反应试

剂盒 Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), Tris 碱、溴酚蓝、EB、EDTA、琼脂糖-分子生物级 (AMRESCO 公司), DEPC (Rluka 公司), DNA 分子量标准 DNA Marker 100bp ladder (GibcoBRL 公司), SDS (Calbiochem 公司)。-Actin 引物按文献提供的序列资料^[4], 由 Sangon 生物公司合成, 上游引物: 5' TTGTAACCAACTGGGACGATATGG3', 下游引物: 5' GATCTTGATCTTCATGGTGTAG3'; GDNF 引物设计及合成引自文献^[5], 上游引物: 5' GACATATGTCACAGATAAACAAA TGG3', 下游引物: 5' GGAA GCTTTCA GATACATCCACACC3'。所有试剂均以 DEPC 处理的双蒸水配制。

2 方法

2.1 大鼠肌肉总 RNA 的抽提 采用 Trizol 一步法获得, 取少量作紫外扫描分析和琼脂糖电泳分析, 其余 -80 保存。

2.2 RT-PCR 反应过程 PCR 扩增反应体系为 50μl, 含 2.0uTaqDNA 聚合酶、10mmol/L Tris. HCl (pH9.0)、60mmol/L KCl、1.5mmol/L MgCl₂、200μmol/L 的 dNTP, Molony Murine leukemia Virua (M-MuLV) 逆转录酶, 包括无 RNase/Dnase BSA 的 RNAGuard™ 核酸酶保护剂和稳定剂, 以 2μg 大鼠肌肉总 RNA 为模板, 加入 1μl 0.5μg/μl pd(T)₁₂₋₁₈ 为合成第一链的引物, 5', 3' 引物浓度各为 0.5μmol/L。42 30s 合成第一链, 进入热循环前 95 保温 5min 灭活逆转录酶, 按 95 1min 变性 55 1min 退火 72 1min 链延伸的程序反应 25 (iNOS) 或 32 (iNOS) 个循环, 72 延伸 7 分钟, 4 保存。

2.3 PCR 产物检测与数据处理 按常规方法用含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。凝胶扫描系统进行密度扫描后, 以对应组 -actin 密度为 100% 对照, 用图像分析系统 (由四星生物技术开发公司研制图像采取卡和 Petium 主机组成) 处理, 作扩增产物的半定量分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验。

3 结果

3.1 大鼠肌肉总 RNA 抽提 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上, 可见 28S 和 18S 两个清晰条带, 28S 与 18S 比值约为 2:1, 未见明显降解。用紫外分光光度计测抽提的总 RNA 的 OD260nm、OD280nm 和 OD230nm。结果显示, OD260nm/OD280nm > 1.6, OD260nm/OD230nm > 2.0。表明抽提的总 RNA 没有蛋白质和其他杂质的污染, 可以用作反转录的模板。根据 OD260nm 计算其浓度约为 180ng/μl。RNA 得率约为 2μl/mg (肌肉组织)。

3.2 大鼠肌肉 -Actin 表达 -Actin (-肌动蛋白) 是肌动蛋白家族中非肌细胞型肌动蛋白的一种, 其基因表达无肌细胞特异性, 在组织细胞中均有稳定的高表达, 故常用作 RT-PCR 检测基因表达时的阳性对照^[6]。本组大鼠肌肉总 RNA 扩增出 764bp DNA 片段, 与预计结果吻合。产物表达稳定、丰度高, 灰度扫描时定为 100% 标准。

3.3 大鼠肌肉 GDNF mRNA 的表达 本组逆转录产物经 PCR 扩增得到约 400bp 的片段 (图 1), 与预期的结果相同^[6]。可见在脊髓损伤前, 肌肉表达少量 GDNF mRNA, 脊髓损伤后 3 天, 表达明显上调 (约为伤前的 3 倍), 7 天达到高峰 (约为伤前的 10 倍), 10 天为伤前的 4 倍, 21 天仍明显高于正常水平

(表 1)。

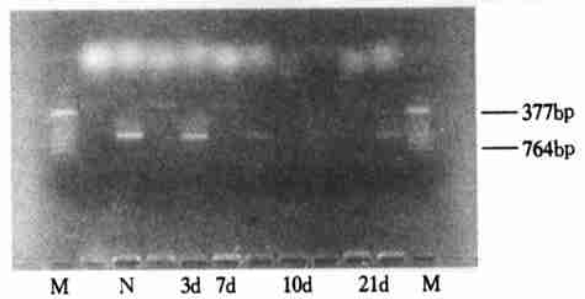


图 1 大鼠肌肉 GDNFmRNA 电泳图

Fig Electrophoresis of GDNFmRNA of skeleton muscle in rats (M 为 Mark, N 为正常对照, 其余分别为术后 3、7、10、21 天, 每组自左向右顺序均为肌肉和 β-Actin)

表 1 大鼠肌肉 GDNF mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

脊髓损伤时间	n	相对灰度 (%)
伤前	6	10.04 ±2.47
伤后 3d	6	39.71 ±4.52 *
伤后 7d	6	108.65 ±13.13 **
伤后 10d	6	54.93 ±5.34 **
伤后 21d	6	23.75 ±3.76 *

注: 伤后各组与伤前相对灰度比较: * *P* < 0.01, ** *P* < 0.001,

4 讨论

4.1 关于半定量 PCR 细胞因子 cDNA 经 RT-PCR 扩增后进行 6% 聚丙烯酰胺电泳, EB 染色后在 uv 照射下直接拍照, 进行密度扫描, 可测定不同细胞因子的含量。由于不同引物检测不同细胞因子具有不同的灵敏度, 故不能比较不同样本或同一样本中不同的细胞因子的多寡。因此, 本实验中用 -Actin 作为参照物同时扩增。尽管这些参照物表达量大大高于细胞因子, 有时不能显示低表达样本之间的差别, 但当细胞因子与参照物的引物灵敏度相近, 且两者反应都在指数扩增时, 可用来校正不同样本之间的差异^[6]。

4.2 脊髓损伤后肌组织表达 GDNF mRNA 意义 对大鼠不同发育期间 GDNF mRNA 的分布作了较为全面的检测, 发现大多数接受 GDNF 营养作用的神经及其靶组织一般都表达 GDNF mRNA^[7], 而且当组织生长或修复活跃时 GDNF mRNA 及其相关受体表达亦明显上调^[8]。Springer 等^[3,8]发现坐骨神经损伤后, 损伤灶远侧 GDNF mRNA 表达迅速上调, 1~2 周时去神经支配骨骼肌 GDNF mRNA 表达上调, 并且表达程度与神经再生密切相关。Suzuki 等^[9]研究发现, GDNF 在人体骨骼肌内高表达, 在神经、肌接头区域尤为突出, 神经轴突及雪旺细胞周围亦有少量表达, 但脊髓前角细胞未发现表达。结果提示, GDNF 在肌内产生, 在神经末梢吸收, 并在特定时期 (如神经元损伤) 由轴突逆向转运至脊髓神经元胞体, 作为靶源性神经营养因子促进神经元存活。Yamamoto 等^[10]发现在 ALS 病人中, 腰髓 GDNF mRNA 与正常对照组相比表达明显上调, 且主要反应在病变严重的脊髓前角、前柱及侧柱, 而在肌中则明显下调, GDNF mRNA 表达水平与病理变化相关密切。

本实验后肢肌表达 GDNF mRNA 上调增加, 可能是由于

脊髓损伤后产生刺激信号,通过轴突反馈到靶器官,刺激骨骼肌产生大量 GDNF,并经轴突逆行运输至脊髓神经元胞体,对其发挥营养作用^[1,9]。由于表达水平与对神经元的营养作用程度及对脊髓损伤反应程度呈正相关,可以推断,脊髓损伤后神经元对 GDNF 的需求增加,导致靶器官高表达 GDNF,这是神经元通过“胞体—轴突—靶器官”途径自我保护的一种反应形式。本系列研究还表明,脊髓损伤后脊髓组织表达 GDNF mRNA 明显上调,3 天时达到高峰,7 天仍明显高于正常,10 天接近正常(另文发表),结合本组脊髓损伤后 7 天肌肉 GDNF mRNA 表达达高峰,说明损伤脊髓神经元早期即对 GDNF 的需求反应强烈,并持续较长时间。结果提示,在应用 GDNF 治疗脊髓损伤时应早期、长期用药,以适应神经细胞对 GDNF 的需要。

参考文献

[1] Wrathall JR, Li W, Hudson LD. Myelin gene expression after experimental contusion spinal cord injury. *J Neurosci*, 1998, 18(21): 8780-8793.

[2] Lin HL, Doherty DH, Lile DJ, et al. GDNF: A glial cell-line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.

[3] Spriger JE, Mn X, Bergmann LW, et al. Expression of GDNF mRNA in the rat and human nervous tissue. *Exp Neurol*, 1994, 127(2): 167-

170.

[4] Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: Roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 8729-8733.

[5] 张哲宇, 陈秀青, 路长林, 等. 人重组 GDNF 及其生物活性研究. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(2): 207-210.

[6] Susan LS, Arvind M, Phillip GP, et al. Analysis of TGF-1 gene expression in contused rat spinal cord using quantitative RT-PCR. *Neurotrauma*, 1995, 12(6): 1003-1014.

[7] Choi Lundberg DL, Bohn MC. Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Brain Res-Dev Brain Res*, 1995, 85(1): 80-88.

[8] Naveilhan P, ElShamy WM, Ernfors P. Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR alpha after sciatic nerve lesion in the mouse. *Eur J Neurosci*, 1997, 9(7): 1450-1460.

[9] Suzuki H, Hase A, Miyata Y, et al. Prominent expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in human skeletal muscle. *J Comp Neurol*, 1998, 21(3): 303-12.

[10] Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, et al. Expression of glial cell line-derived growth factor mRNA in the spinal cord and muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 1996, 204(1): 117-120.

(收稿:2000-07-23 修回:2000-10-13 编辑:李为农)

短篇报道

经皮骨圆针内固定治疗胸锁关节脱位 9 例

张东辉

(平泉县中医院, 河北 平泉 067500)

自 1990 年以来,笔者运用闭合复位经皮骨圆针内固定治疗胸锁关节脱位 9 例,取得了满意效果,现总结如下:

1 临床资料

本组 9 例中男 7 例,女 2 例;右侧 5 例,左侧 4 例;伤后至治疗时间最短 5 小时,最长 10 天,平均 3 天。

2 治疗方法

患者取仰卧位,背部略垫高,头略低后仰。常规消毒,铺无菌巾,1%利多卡因局麻,根据锁骨粗细选用 2mm 或 2.5mm 骨圆针,将针尾钝头端用钳子咬一斜面装入骨钻锁紧,针尖对准脱出锁骨之胸骨关节面,与锁骨纵轴呈 30°角,向前上方钻入,针尖一般从锁骨内 1/3 段前上侧皮质穿出,至皮外 5~10cm。

卸下骨钻连接穿出端骨圆针锁紧后,向外退针,尾端针尖与锁骨之胸骨关节平齐,施手法将其复位。复位满足后,令助手双手拇指按压住锁骨胸骨头,术者摇动骨钻使骨圆针缓缓进入胸骨柄。进针方向以平行于胸骨柄指向胸骨柄健侧第一肋切迹处,切忌偏向胸骨后方,以免损伤胸骨后血管和气管,进针深度不超过胸骨柄宽度,一般钻入 2cm 即可,卸下骨钻,在距皮外 3cm 处剪断骨圆针,消毒后盖敷料。患肢用布带悬吊于胸前。术后酌情应用抗生素 3~5 天,5 周左右拔出骨圆针。

3 治疗结果

本组病例全部达到解剖复位,无局部隆起及异常活动与针眼感染。随访时

间半年~8 年,肩关节活动正常。

4 讨论

胸锁关节脱位以向前脱位多见,本组 9 例均为前脱位,一般复位容易,但维持对位困难,用前“8”字绷带固定或用上肢外展位皮牵引锁骨近端加压制动法很难维持对位,故效果较差。采用经皮骨圆针内固定治疗胸锁关节脱位,能有效地维持对位,从而达到治疗目的,故疗效肯定。该法勿需特殊设备,只要操作得法,则手术简便快捷,安全可靠,易于在基层推广。

注意事项:操作忌粗暴,缓慢进针,掌握好进针方向和角度,严防损伤胸骨后血管、气管及胸膜肺组织,本组 9 例未发生以上情况。

(收稿:1999-09-22 编辑:李为农)