

GDNF 基因体内转染对大鼠面神经损伤后的修复作用*

赵 莉¹ 关宿东² 单增强¹ 陈传好¹ 王小标¹

摘要 目的:探讨胶质细胞源神经营养因子(GDNF)基因体内转染对大鼠面神经损伤后的修复作用,为基因治疗周围神经损伤提供依据。**方法:**用脂质体介导 pEGFP-GDNF cDNA 基因转染受损面神经所支配的面肌,计算损伤侧面神经元的存活率。观察动物触须节律性拂动的恢复情况,检测修复神经的传导速度。**结果:**面神经损伤后第 7d、14d、21d 和 28d 时间段,对照组面神经运动神经元的存活率分别为 93.06%、76.06%、72.38% 和 70.69%, 转染组分别为 94.00%、84.00%、79.25% 和 78.06%。转染组第 10.4±1.3d 鼠触须开始拂动,18.5±1.3d 节律性拂动基本恢复正常;对照组 13.5±1.2d 触须开始拂动,27.3±1.0d 节律性拂动基本恢复正常。转染组神经干传导速度恢复率快于对照组。**结论:**面神经损伤后经脂质体介导 GDNF 基因体内转染靶器官后,对受损面神经的修复有促进作用。

关键词 基因转染;面肌;面神经;修复

中图分类号:R745.1, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-09-0785-02

The repairing effect of GDNF gene transfection in vivo on facial nerve in rats/ZHAO Li, GUAN Sudong, SHAN Zengqiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(9): 785—786

Abstract Objective: To explore the repairing effect of expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene in vivo on facial nerve in rats and to provide basis for the gene therapy of peripheral nerve injury. **Method:** The complexes of recombinant plasmid pEGFP-GDNF cDNA were transfected into skeletal muscles dominated by facial nerve adopting the method of liposome mediation. The survival rate of motor neurons of injured facial nerve was calculated. The condition of rats' palp movement and nerve conductive velocity were observed. **Result:** At the 7th d, 14th d, 21st d and 28th d after facial nerve injuring the survival rate of facial motor neurons was 93.06%, 76.06%, 72.38% and 70.69% in control group respectively. While it was 94.00%, 84.00%, 79.25% and 78.06% in GDNF gene transfection group respectively. The movement of rats' palp began at day 10.4±1.3 and the movement of rats palp approached to normal at day 18.5±1.3 in GDNF gene transfection group. The movement of rats' palp began at day 13.5±1.2 and the movement of rats palp approached to normal at day 27.3±1.0 in control group. The nerve conduction velocity was faster in transfection group than in control group. **Conclusion:** The expression of GDNF gene can repair injured facial nerve in rats.

Author's address Dept. of Anatomy, Bengbu Medical College, Anhui, 233030

Key words gene transfection; facial muscle; facial nerve; repair

面神经损伤导致面部表情肌瘫痪,加快损伤的面神经再生,促进其功能恢复是临床上亟待解决的难题。近年来,有学者采用神经营养因子进行治疗,取得一定的疗效^[1-2]。胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)对维持大鼠胚胎神经元的存活,促进神经再生有作用^[3-5],但能否促进成年鼠面神经再生和功能恢复,报道不多。本研究采用 GDNF 基因体内转染方法,观察对损伤的面神经的修复作用,旨在为周围神经损伤的基因治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、载体及主要试剂

GDNF cDNA 由南方医科大学蒋立新博士惠

赠,重组质粒 pEGFP-GDNF cDNA 为本实验室构建,浓度为 0.75μg/μl。阳离子脂质体 Dc-chol 购自 Promega 公司。

1.2 神经损伤模型制备及动物分组

雄性 SD 大鼠 32 只,体重 220—250g,经 3%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉后,在右侧面部切开皮肤,暴露面神经颊支和下颌缘支,分别在两神经中段,钳夹神经,时间 1min,手术显微镜下见神经纤维被压断回缩,但神经外膜连续,左侧不作任何处理作

* 基金项目:安徽省教育厅自然科学基金重点项目(2000JH165zd)

1 蚌埠医学院解剖学教研室,安徽,233030

2 蚌埠医学院生理学教研室

作者简介:赵莉,女,硕士,教授

收稿日期:2006-12-19

为正常对照, 随机将动物分为两组, 对照组和 GDNF 转染组, 每组 16 只。

1.3 基因转染方法及观测

将 Dc-chol 6 μ l 和 pEGFP-GKNF cDNA 2 μ g 混合后, 用微量注射器将其注入转染组神经损伤侧的面肌内, 注射速度 1 μ l/min, 注射完毕留针 2min, 拔出针头关闭切口。对照组行神经损伤后即关闭切口。在相同条件下, 分笼饲养^[6]。

1.4 行为学观察

正常情况下大鼠触须向前竖起, 并有节律拂动。面神经损伤后, 触须即向尾侧垂下, 而且失去拂动能力。自面神经损伤后第一天起, 观察两组动物触须节律性拂动的恢复情况, 并观察鼻、口角歪斜情况。

1.5 电生理检测再生神经的传导速度

分别于面神经损伤, 基因转染后的第 7d、14d、21d、28d, 每组各取 4 只鼠, 经腹腔麻醉后采用日本光电三通道刺激器, SS-201J 刺激隔离器, Doctor-852 电生理信号处理系统, 将刺激电极置于面神经损伤的近侧端, 接受电极置于面神经损伤的远侧端, 检测神经干的传导速度, 同时检测正常侧神经干传导速度, 以损伤侧神经干占正常侧传导速度的比率来表示损伤侧神经的恢复率。刺激强度 6V, 波宽 0.2ms, 频率 1Hz, 室温 22℃。

1.6 组织切片制备、HE 染色和光镜观察

将电生理检测后的鼠杀死, 经升主动脉插管灌注 10% 的福尔马林固定。取出鼠脑, 修剪面神经的脑干部, 常规石蜡包埋, 行脑冠状切面, 隔 10 片取 1 片, 厚 4 μ m, HE 染色。计数双侧面神经核内的全部神经元(只统计胞体中尼氏体染色均匀, 胞核、核仁明显位于胞体中央的神经元), 以损伤侧神经元占正常侧的比率来表示损伤侧神经元的存活率。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件中成组设计两样本均数比较的 t 检验, 分析结果。

2 结果

行为学变化: 面神经损伤后, 大鼠触须即向尾侧垂下, 失去拂动能力, 口角歪向健侧。在 GDNF 转染组, 转染后的第 4.3 $\pm$ 0.6d 鼠触须已展开, 10.4 $\pm$ 1.3d 触须开始拂动, 口角歪斜减轻, 随着时间延长, 拂动的幅度加大, 18.5 $\pm$ 1.3d 节律性拂动基本恢复正常, 面部两侧基本对称。对照组 5.4 $\pm$ 1.0d 触须展开, 平均在 13.5 $\pm$ 1.2d 触须开始拂动, 口角歪斜减轻。27.3 $\pm$ 1.0d 节律性拂动基本恢复正常。神经干传导速度、面神经元存活情况, 见表 1—2。

表 1 面神经损伤后两组神经不同时段神经干传导速度恢复率

组别	鼠数	7d	14d	21d	28d
对照组	16	39.47 $\pm$ 10.23	62.98 $\pm$ 10.17	81.53 $\pm$ 4.51	89.30 $\pm$ 2.54
GDNF 转染组	16	45.45 $\pm$ 7.10	84.00 $\pm$ 5.11	91.03 $\pm$ 4.70	93.83 $\pm$ 2.54
t		0.96	3.7	2.92	2.52
P		>0.05	<0.01	<0.05	<0.05

表 2 面神经损伤后不同时段两组运动神经元的生存率

组别	鼠数	7d	14d	21d	28d
对照组	16	93.06 $\pm$ 2.90	76.06 $\pm$ 5.03	72.38 $\pm$ 4.06	70.69 $\pm$ 3.82
GDNF 转染组	16	94.00 $\pm$ 2.61	84.00 $\pm$ 3.27	79.25 $\pm$ 2.89	78.06 $\pm$ 2.22
t		1.38	5.30	5.52	5.43
P		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

周围神经损伤后能否成功再生与有无适合胞体存活和轴突延伸的微环境有关, 神经营养因子是微环境中重要因素。GDNF 是 1993 年由 Lin 发现对多巴胺神经元有特异性营养作用的神经营养因子^[7], 是转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族的同型糖蛋白二聚体, 在神经损伤后对保护神经元和促进神经再生起着重要作用^[8], 但该因子在损伤的局部浓度低, 远不足以维持神经元胞体的存活^[8], 如何能使神经修复时局部不断合成 GDNF, 维持其有效作用, 又避免给药途径的不便, 基因转染技术为实现这一目标提供了可能。Gimenez Y 等^[4]以腺病毒介导 GDNF 基因转染新生鼠的面肌取得一定的效果, 但腺病毒载体免疫源性较强^[8], 本研究选用免疫原性弱、毒性低的脂质体介导, 脂质体与目的基因的比例参阅国外文献的最适比例^[9], 采用活体直接注射法将外源基因直接导入受损成年大鼠面神经所支配的肌内, 经荧光显微镜观测转染成功^[6]。

面神经损伤后的第 7d, 经形态学检测发现: 转染组面神经运动神经元存活率与对照组相比差别不大, 无显著性意义, 这间接说明此阶段面神经核内 GDNF 的含量不高, 这与神经损伤的早期 GDNF 基因转染至面神经运动神经元或受转染的面肌产生的 GDNF 自外周逆行运输至胞体需要一定的时间有关。损伤后的第 14d, GDNF 转染组面神经运动神经元的存活率比对照组提高约 8%, 提示: GDNF 基因转染发挥了有效的作用。

周围神经损伤后的功能恢复取决于再生轴突是否达到靶器官, 故损伤的神经需要经过一段时间修复后才能观察到行为学变化, 本研究采用诱发神经干动作电位方法观察到: 只要有少量的再生神经纤

(下转 789 页)