

NT-3/TrkC 信号通路在猴前交叉韧带本体感觉损伤中的作用*

张磊¹ 扶世杰² 周鑫² 郭晓光² 汪国友² 关钦元² 李义凯^{1,3}

摘要

目的:探讨NT-3/TrkC信号通路在前交叉韧带(ACL)本体感觉损伤中的作用和机制。

方法:选取12只正常的食蟹猴,随机选择9只食蟹猴进行关节镜下单侧ACL损伤造模后,将全部膝关节分为三组:正常组(3只正常食蟹猴每只选1个正常膝关节,共3个)、模型A组(9个模型中的健侧膝关节)和模型B组(9个模型中的损伤侧膝关节),模型A组和模型B组同属模型组。在造模后4、8、12周,运用RT-qPCR和Western Blot技术检测L2-S1DRG中NT-3、TrkC以及ACL中GAP-43基因和蛋白的表达水平。

结果:在同一时间点,与正常组相比,模型组DRG中NT-3、TrkC的基因和蛋白相对表达量下降,有显著性差异($P<0.01$)。与正常组相比,模型A组和模型B组ACL中GAP-43的基因和蛋白相对表达量上升,而模型B组又高于模型A组,有显著性差异($P<0.01$)。在模型组不同时间点,DRG中NT-3、TrkC的基因和蛋白相对表达量随着时间的增加而逐渐下降且均低于正常组,有显著性差异($P<0.01$)。与正常组比较,在模型A组和模型B组不同时间点,ACL中GAP-43的基因和蛋白相对表达量均上升,但随着时间的增加而逐渐下降,有显著性差异($P<0.01$)。

结论:NT-3/TrkC信号通路在ACL本体感觉损伤和康复中有着重要的作用。当ACL损伤时,引起局部GAP-43的表达上升,以及DRG中NT-3、TrkC的表达下降,同时对侧ACL本体感受器的功能也受到影响。

关键词 信号通路;前交叉韧带;本体感觉;食蟹猴

中图分类号:R684,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-05-0513-05

The changing of NT-3/TrkC proprioceptive signaling pathway after ACL injury/ZHANG Lei, FU Shijie, ZHOU Xin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(5): 513—519

Abstract

Objective: To investigate the changing and mechanism of NT-3/TrkC proprioceptive signaling pathway after ACL impairment.

Method: Totally 12 normal cynomolgus monkeys were selected, and 9 among the 12 were randomly selected to being unilateral 1/4 ACL cut off under arthroscopy. The normal group included one knee of each non-operation monkeys, 3 in total. A model group included contrast lateral knee joint in the 9 and B model group included the injured knee joint in the 9. RT-qPCR and Western-blot were used to detect the expression of GAP-43 gene and protein in L2-S1DRG, TrkC and ACL for normal monkeys and model groups at in 4, 8 and 12 weeks after modeling for model groups..

Result: Comparing with normal group, the relative expression of NT-3 and TrkC in DRG decreased for model groups. The difference was significant ($P<0.01$). Comparing with the normal group, the relative expression of GAP-43 gene and protein in ACL increased in model groups, but the model group B was higher than the mod-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.05.004

*基金项目:国家自然科学基金项目(81674095);泸州市科技计划项目[2014-S-46 (8/11)];西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合专项项目(2016-4-31)

1 南方医科大学中医药学院,广州,510515; 2 西南医科大学附属中医医院; 3 通讯作者

作者简介:张磊,男,主治医师,博士研究生; 收稿日期:2017-02-09

el group A ($P<0.01$). In the model groups at different time points, the relative expression of NT-3 and TrkC in DRG decreased gradually with the increase of time, and were lower than those in the normal group ($P<0.01$). Comparing with the normal group, the relative expression of GAP-43 gene and protein increased in ACL in the model A and model B groups at different time points, but it decreased with the time increased.

Conclusion: NT-3/TrkC signaling pathway plays an important role in ACL rehabilitation. When ACL was injured, the expression of GAP-43 increased and NT-3 and TrkC decreased in the DRG, the changes also happened in contrast lateral ACL receptors.

Author's address Academy of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, 510515

Key word signal pathway; anterior cruciate ligament; proprioception; cynomolgus monkeys

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)本体感觉障碍是导致膝关节稳定性下降的主要原因^[1]。当ACL损伤时,可能会影响与ACL本体感觉密切相关的神经递质分泌和表达,其中与神经营养因子的关系最为密切^[2-5]。

神经营养因子能够促进胚胎神经元的发育和成熟、维持成熟神经元的存活、促进损伤神经元的再生^[6-7]。主要分为:神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-4/5(neurotrophin-4/5, NT-4/5)和神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3),不同类型酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, Trk)受体的传入神经元支配的靶组织表达相关神经营养因子的mRNA, TrkA是NGF的受体, TrkB是BDNF和NT-4/5的受体, TrkC是NT-3的受体^[8-9]。因此,各种神经营养因子在靶器官内合成。经逆向运输至相应的神经元细胞^[3,5],与相应的受体相结合,形成相应的信号转导通路。位于脊髓的背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中的本体感觉神经元,表达NT-3特异性受体TrkC,提示NT-3对本体感觉神经发挥作用^[10-12]。同时,生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)是一种特异性存在于神经系统的生长相关蛋白,在神经发育和神经再生过程中表达。这种蛋白在处于发育中的神经系统内广泛存在,在神经元轴突呈高表达并在生长锥尤显丰富^[13],所以,当ACL损伤时,其本体感受器中NT-3表达下降,从而相应受体TrkC活性减弱,同时也使ACL中GAP-43被激活,启动自愈系统,对ACL本体感受器的活性有一定促进作用。因此,NT-3/TrkC信号通路对本体感觉的恢复有着至关重要的作用。

本研究对比正常食蟹猴、单膝ACL损伤模型健侧和单膝ACL损伤模型损伤侧,运用RT-qPCR和Western Blot技术检测L2-S1DRG中NT-3、TrkC以及ACL中GAP-43基因和蛋白的表达水平,探讨NT-3/TrkC信号通路在ACL本体感觉损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 实验动物:选取SPF级青年型食蟹猴12只,均为雄性,年龄3—5岁,体重4—6kg,由云南英茂生物科技有限公司提供。

1.1.2 试剂和耗材:舒泰50麻醉剂,碘伏,生理盐水,无菌关节镜器械包,止血带,尖刀,注射器,无菌纱布,缝合线,手术单等。

总RNA提取试剂盒, SYBR Premix Ex Taq II, PCR Master Mix试剂盒, 多克隆兔抗人NT-3、TrkC、GAP-43一抗抗体及二抗抗体, NT-3、TrkC、GAP-43及内参 β -actin引物, 去RNA酶, 液氮, 抗体稀释液, RIPA缓冲液, PVDF膜, TRIZOL裂解液, 氯仿, 异丙醇, 乙醇, DEPC水, 蛋白提取裂解液, 离心管、蛋白上样缓冲液, 分离胶, 蒸馏水, 浓缩胶, 蛋白电泳缓冲液, 滤纸, TBST溶液, ECL发光试剂盒等。

1.1.3 仪器:关节镜仪器, 超净手术台, 超微量核酸蛋白检测仪, PCR仪, 离心机, 电子天平, 恒温磁力搅拌器、电泳仪、垂直电泳槽、电泳转膜仪、超低温冰箱, 化学发光成像仪移液器, 摇床。

1.2 动物分组及造模

从12只食蟹猴中首先随机选出3只进行造模, 单膝ACL损伤模型采用关节镜微创造模技术, 造模方法:舒泰50肌注麻醉后, 动物取仰卧位, 作膝关节前内侧、前外侧关节镜入路切口, 探查膝关节软骨、

前后交叉韧带、半月板等均完好无损,再用钩刀将ACL横行切断1/4,生理盐水冲洗关节腔及手术切口,缝合关节镜入路切口,术毕。术后7天伤口可愈合。

造模成功后将动物分为正常组(3只正常食蟹猴每只选1个正常膝关节,共3个)、模型A组(9个模型中的健侧膝关节)和模型B组(9个模型中的损伤侧膝关节)。分别在4、8、12周时,对模型A、B组食蟹猴进行实验。正常组不做干预,在分组完成后即进行实验。

1.3 处死动物及标本提取

先将动物给予舒泰50麻醉剂麻醉后,静脉注射空气处死,快速暴露并取材DRG和ACL,用无RNA酶的生理盐水洗涤,置入5ml冻存管并快速投入液氮中,然后再放入-80℃冰箱中保存备用。

1.4 RT-qPCR

1.4.1 RNA的抽提及鉴定:称取冻存组织50mg,加入1ml TRIZOL试剂冰上匀浆后参照总RNA提取试剂盒说明书操作。RNA提取完后,于超微量核酸蛋白检测仪(Thermo Nano Drop)测定所提取RNA的浓度、纯度(A260nm/A280nm在1.8—2.0之间),剩余产物置于-80℃冰箱冷冻保存。

1.4.2 引物设计:目的基因以及内参基因的引物由上海生工公司采用Primer Premier 5.0软件设计并合成。

内参基因(β -actin)引物序列:

R- β -actin-F: 5'- GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG-3', 58.93

R- β - actin- R: 5'- GTCACAGTCCGCCTAGAAGC- 3', 60.46;163bp。

目的基因引物序列:

R- NT- 3- F: 5'- TGCCACGATCTTACAGGTGAAC- 3', 60.61

R-NT-3-R:5'-TCCTTAACGTCCACCATCTGC-3',60.07;198bp。

R-TrkC-F:5'-CAAATGCTCCACATCGCCAG-3',59.9

R- TrkC- R: 5'- CCTCCCACCCTGTAATAATCCG- 3', 59.96;179bp。

R- GAP- 43- F: 5'- TCCACTGATAACTCGCCGTC -3', 59.55

R- GAP-43-R:5'- TCCACTGATAACTCGCCGTC -3', 60.44;198bp。

1.4.3 逆转录反应:取总RNA 1 μ g,用第一链cDNA合成试剂盒对提取的总RNA进行逆转录生成对应cDNA:

反应体系为:

PrimeScript RT Master Mix	2 μ l
样本对应的总RNA	500ng
ddH ₂ O	10 μ l

反应条件:

37℃	15min
85℃	5s

将生成的cDNA置于-20℃冰箱中保存备用。

1.4.4 检测各目的基因的相对表达量:以SYBR Green为荧光标志物, β -actin为内参对照。取1 μ l cDNA加入20 μ l反应体系进行扩增。

反应体系为:

SYBR Premix Ex Taq II	10 μ l
Primer F	0.3 μ l
Primer R	0.3 μ l
cDNA	1 μ l
ddH ₂ O	8.4 μ l

扩增条件:

95℃	30s
95℃	5s
62℃	30s

共40个循环

把加好的样品放入PCR仪中进行反应。扩增反应结束后关闭仪器,分析数据,结果采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.5 Western Blot

1.5.1 蛋白样本的提取制备:取冻存组织样本提取蛋白,完成样品用BCA法进行蛋白含量测定。

1.5.2 灌胶、电泳和转膜:按照试剂盒说明书制备分离胶和浓缩胶,将前处理过的蛋白样品加入样品孔内,浓缩胶80V,分离胶100V,电泳至溴酚蓝条带至胶底部。

取下电泳装置,清除浓缩胶,把分离胶、超厚滤纸及PVDF膜置于转膜缓冲液浸泡,3min后取出,将海绵垫层、超厚滤纸、分离胶、PVDF膜、海绵垫层依次放置于黑面板的一侧。夹紧后转移至转膜槽。加

入缓冲液,200mA转2h。

1.5.3 免疫反应:转膜完成后,将PVDF膜从转膜装置中分离,移至加有TBST溶液的平皿中,在20℃下摇床上摇动封闭1h。在进行一抗孵育和二抗孵育。

1.5.4 显影并拍照:将ECL发光试剂盒的A液、B液等体积混合,在混合液加入放有PVDF膜的反应盒中,反应5min。用平头镊钳住PVDF膜置于吸水纸以吸去残液,置于化学发光成像仪中拍照并保存。

1.6 统计学分析

所有资料采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。RT-qPCR实验结果均采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行统计学分析,进行3次独立实验并收集数据。计量数据以均数±标准差表示,并应用单因素方差分析(LSD-t检验)进行统计,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

在对ACL(NT-3、TrkC)进行检测时,分为正常组、模型A组和模型B组3者比较;在对DRG(GAP-43)进行检测时,分为正常组和模型组(模型A组和模型B组属同一DRG)两者比较。

2 结果

在同一时间点,与正常组相比,模型组DRG中NT-3、TrkC的mRNA和蛋白相对表达量下降,有显著性差异($P<0.01$)。与正常组相比,模型A组和模型B组ACL中GAP-43的mRNA和蛋白相对表达量上升,而模型A组又高于模型B组,有显著性差异($P<0.01$)。

在模型组不同时间点,DRG中NT-3、TrkC的mRNA和蛋白相对表达量随时间的增加而逐渐下降,且均低于正常组,有显著性差异($P<0.01$)。与正常组比较,在模型A组和模型B组不同时间点,ACL中GAP-43的mRNA和蛋白相对表达量均上升,但随时间的增加而逐渐下降,有显著性差异($P<0.01$)。见表1—4,见图1—2。

表1 模型组和正常组DRG中NT-3和TrkC mRNA的情况 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	NT-3		TrkC	
	模型组	正常组	模型组	正常组
4周	0.63±0.01 ^{①②③}		0.58±0.00 ^{①②③}	
8周	0.51±0.00 ^{②③}	1.00±0.00	0.50±0.00 ^{②③}	1.00±0.00
12周	0.46±0.01 ^③		0.45±0.00 ^③	

①与同组8周 $P<0.01$;②与同组12周 $P<0.01$;③与正常组 $P<0.01$ 。

表2 三组ACL中GAP-43蛋白的情况 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	模型A组	模型B组	正常对照组
4周	1.32±0.00 ^{①②③④}	1.50±0.00 ^{①②④}	
8周	1.20±0.00 ^{①②③}	1.41±0.00 ^{②④}	1.00±0.00
12周	1.11±0.00 ^{③④}	1.31±0.01 ^④	

①与同组8周 $P<0.01$;②与同组12周 $P<0.01$;③与模型B组 $P<0.01$;④与正常组 $P<0.01$ 。

表3 模型组和正常组DRG中NT-3/ β -actin和TrkC/ β -actin蛋白的情况 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	NT-3/ β -actin		TrkC	
	模型组	正常组	模型组	正常组
4周	1.21±0.02 ^{①②③}		0.64±0.01 ^{①②③}	
8周	1.01±0.01 ^{②③}	1.86±0.08	0.50±0.01 ^{②③}	1.70±0.07
12周	0.82±0.02 ^③		0.39±0.00 ^③	

①与同组8周 $P<0.01$;②与同组12周 $P<0.01$;③与正常组 $P<0.01$ 。

表4 三组ACL中GAP-43/ β -actin蛋白的情况 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	模型A组	模型B组	正常对照组
4周	0.69±0.01 ^{①②③④}	1.34±0.01 ^{①②④}	
8周	0.60±0.01 ^{②③④}	1.20±0.04 ^{②④}	0.39±0.01
12周	0.53±0.03 ^{③④}	0.97±0.02 ^④	

①与同组8周 $P<0.01$;②与同组12周 $P<0.01$;③与模型B组 $P<0.01$;④与正常组 $P<0.01$ 。

图1 模型组和正常组DRG中NT-3、TrkC和 β -actin蛋白的表达

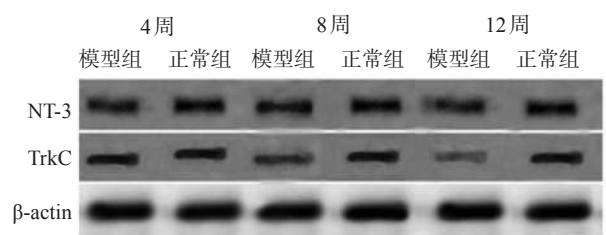
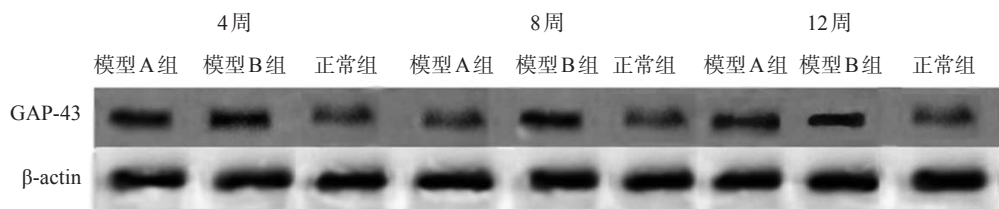


图2 三组ACL中GAP-43和 β -actin蛋白的表达



3 讨论

3.1 NT-3/TrkC信号通路

在ACL中含有大量的类型不同的本体感受器,这些感受器可以感受肌肉、关节的张力和拉力,产生一定的神经冲动,通过本体感觉传导通路传导至中枢神经系统,经过分析整合,从而产生躯体和四肢运动状态及其位置的感觉,此种感觉叫作本体感觉。诸多研究证实,神经传导信号通路上的细胞因子对本体感觉有明显的影响,当本体感觉正常时,细胞因子的分泌可保持在正常的水平和状态。一旦本体感觉受损下降,神经信号传导通路上的细胞因子必然发生紊乱,从而进一步加重本体感觉功能下降。当膝关节ACL损伤后,其中的本体感受器也相应受到损伤,神经活性降低,造成神经系统的协调性降低,使得具有保护和稳定关节的神经系统反馈机制受影响,导致ACL甚至整个膝关节本体感觉的异常。信号通路上的细胞因子可能扮演重要的角色,且不同的分泌水平对本体感觉功能也可能有不同程度的影响,但具体的信号通路尚无统一的定论。

本体感觉与神经营养因子的关系密切。神经营养因子是由不同类型细胞产生的各种多肽片段。根据它们一级结构及结合的受体的不同,把神经营养因子划分为不同的簇。神经营养因子能够促进胚胎神经元的发育和成熟、维持成熟神经元的存活、促进损伤神经元的再生。各种神经营养因子在靶器官内合成。经逆向运输至相应的神经元细胞^[14-16],与相应的受体相结合,形成相应的信号转导通路。胚胎发育中NT-3是本体感觉神经元存活所必需的神经营养因子,当小鼠缺乏NT-3、TrkC及其下游的转录因子表达,可导致DRG中的本体感觉神经元凋亡和骨骼肌内的本体感觉神经缺失^[17-19]。

NT-3是本体感觉神经纤维投射和突触联系的关键性诱导信号,如果没有NT-3在局部的表达,即使本体感觉神经纤维投射到目标附近,也不能发出分支并支配靶目标^[20-21]。成年后,牵张反射弧已经建立,此时本体感觉神经元可以不需要NT-3而继续存活,但仍需要表达NT-3,以继续发挥生理功能^[22]。对于外伤性损害一旦造成本体感觉反射弧阻断,本体感觉神经元将出现功能上和结构上的退化性变,给予外源性NT-3可以减少这一退化,保护本体感觉

神经元,维持和改善本体感觉神经功能^[23-24]。因此,NT-3/TrkC信号通路对本体感觉有着重要的作用。

3.2 单侧ACL损伤后对双侧NT-3/TrkC信号通路的影响

ACL上的本体感受器收集位置觉、运动、力觉和震动觉等信息,经传入神经传至脊髓、大脑等感觉运动中枢。信息经分析整合后由传出神经传出,膝关节作出相应反应来调整运动姿势以保持稳定性。

当一侧的ACL损伤时,ACL的本体感受器也受到损伤,使得其中的NT-3表达下降,NT-3逆向传输至脊背根神经节中的神经元细胞,与相应的TrkC受体相结合,因NT-3表达下降,使得受体激动后磷酸化水平也下降,进一步导致TrkC活性降低,同时ACL损伤时,因其自愈性,本体感受器中的GAP-43被激活,使GAP-43在ACL本体感受器内表达上升。

在同一时间点,与正常组相比,模型组DRG中NT-3、TrkC的mRNA和蛋白相对表达量下降,有显著性差异($P<0.01$)。与正常组相比,模型A组和模型B组ACL中GAP-43的mRNA和蛋白相对表达量上升,而模型B组又高于模型A组,有显著性差异($P<0.01$)。说明ACL的损伤不仅引起局部GAP-43的表达上升,同时通过神经的上行传导影响DRG中NT-3、TrkC的表达下降,进而使对侧ACL本体感受器的功能也受到影响,只不过相对于直接损伤来讲,通过神经传导的交互性影响,对侧损伤程度较小。

此外,在模型组不同时间点,DRG中NT-3、TrkC的mRNA和蛋白相对表达量随时间的增加而逐渐下降,且均低于正常组,有显著性差异($P<0.01$)。与正常组比较,在模型A组和模型B组不同时间点,ACL中GAP-43的mRNA和蛋白相对表达量均上升,但随时间的增加而逐渐下降,有显著性差异($P<0.01$)。这说明不管是损伤侧还是对侧,本体感觉的损伤程度会随着时间的增加而加重,同时,当ACL损伤时,GAP-43会呈现高表达,但随时间的增加而逐渐下降,也说明ACL自身有一定的修复能力。已有研究^[25]表明,除了在发育期有表达外,GAP-43在成年哺乳动物中枢神经系统损伤后可出现重新表达。因此,GAP-43与神经系统的发育、突触形成、可塑性以及再生有密切的关系,在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用,被认

为是神经元生长发育和可塑性的重要标志^[26-27]。神经一经受损则又可诱其表达上调,功能联系重建后随即下降。

3.3 研究的不足

第一,选用的实验动物食蟹猴均为雄性,无法评估模型性别对实验是否有影响。第二,受客观原因的限制,研究的时间只有12周,无法观察ACL本体感受器基因和蛋白的长期随访变化。

4 结论

NT-3/TrkC信号通路在ACL本体感觉损伤和康复中有着重要的作用。当ACL损伤时,使其中的NT-3分泌减少,同时可以通过神经的上行传导影响DRG中NT-3、TrkC的表达下降,同时引起局部GAP-43的表达上升,进而使对侧ACL本体感受器的功能也受到影响,因此,我们在基础研究和临床治疗中不仅要关注膝关节损伤侧的本体感觉的缺失以及恢复情况,更应特别关注对侧健肢本体感觉的缺失以及恢复情况。

因此,我们在临床中,在针对本体感觉的康复中,我们可以通过某种方式或手段激活NT-3/TrkC信号通路,使得ACL的本体感受器NT-3表达增加,并逆向运输至DRG中的神经元细胞,与相应增加的TrkC受体相结合,受体激动后可促发胞质内TrkC的磷酸化,使得TrkC活性增强,同时也使ACL中GAP-43被激活,使GAP-43在ACL本体感受器内聚合能力加强,从而增加了ACL本体感受器的活性,改善本体感觉功能。

此外,通过研究提示,在ACL损伤中以及损伤后,损伤侧以及对侧ACL本体感觉的变化情况。同时,通过探讨NT-3/TrkC信号通路在ACL本体感觉损伤中的作用,来阐明膝关节ACL本体感觉的损伤机制,对ACL本体感觉的基础研究有一定帮助,同时对ACL损伤的康复治疗思路有一定的参考价值。

参考文献

[1] Mather RC, Koenig L, Kocher MS, et al. Societal and economic impact of anterior cruciate ligament tears[J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(19): 1751—1759.
[2] Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, et al. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuro-

plasticity[J]. J Neurophysiol, 2002, 88(5): 2187—2195.
[3] Gao L, Li LH, Xing RX, et al. Gastrocnemius-derived BDNF promotes motor function recovery in spinal cord transected rats[J]. Growth Factors, 2012, 30(3): 167—175.
[4] Dupont-Versteegden EE, Houle JD, Dennis RA, et al. Exercise-induced gene expression in soleus muscle is dependent on time after spinal cord injury in rats[J]. Muscle Nerve, 2004, 29(1): 73—81.
[5] Ogborn DI, Gardiner PF. Effects of exercise and muscle type on BDNF, NT-4/5, and TrkB expression in skeletal muscle[J]. Muscle Nerve, 2010, 41(3): 385—391.
[6] Badowska-Szalewska E, Ludkiewicz B, Krawczyk R, et al. Age-Related (Aged vs Adult) comparison of the effect of two mild stressors on the nerve growth factor (NGF) in the rat hypothalamic supraoptic nucleus (SON)-immunohistochemical study[J]. Folia biologica, 2016, 62(6): 212—219.
[7] Rao S, Martínez-Cengotitabengoa M, Yao Y, et al. Peripheral blood nerve growth factor levels in major psychiatric disorders[J]. Journal of Psychiatric Research, 2016, 86(9): 39—45.
[8] Tseng PT, Chen YW, Tu KY, et al. State-dependent increase in the levels of neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 in patients with bipolar disorder: A meta-analysis[J]. Journal of psychiatric research, 2016, 79(3): 86—92.
[9] Loch AA, Zanetti MV, de Sousa RT, et al. Elevated neurotrophin-3 and neurotrophin 4/5 levels in unmedicated bipolar depression and the effects of lithium [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2015, 56(4): 243—246.
[10] Liu S, Blanchard S, Bigou S, et al. Neurotrophin 3 improves delayed reconstruction of sensory pathways after cervical dorsal root injury[J]. Neurosurgery, 2011, 68(2): 450—461.
[11] Wang XY, Gu PY, Chen SW, et al. Endogenous neurotrophin-3 promotes neuronal sprouting from dorsal root ganglia [J]. Neural Regen Res, 2015, 10(11): 1865—1868.
[12] Kuo LT, Tsai SY, Groves MJ, et al. Gene expression profile in rat dorsal root ganglion following sciatic nerve injury and systemic neurotrophin-3 administration[J]. J Mol Neurosci, 2011, 43(3): 503—515.
[13] Wu XF, Sha LZ, Sha ZQ, et al. Expression of growth-associated protein 43 in the hippocampus of mesial temporal lobe epilepsy mouse model[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2013, 35(6): 589—594.
[14] Gao L, Li LH, Xing RX, et al. Gastrocnemius-derived BDNF promotes motor function recovery in spinal cord transected rats[J]. Growth Factors, 2012, 30(3): 167—175.
[15] Ito K, Enomoto H. Retrograde transport of neurotrophic factor signaling: implications in neuronal development and

- pathogenesis[J]. *Journal of Biochemistry*, 2016, 160(2): 77—85.
- [16] Chou YH, Lirng JF, Hsieh WC, et al. Neither cortisol nor brain-derived neurotrophic factor is associated with serotonin transporter in bipolar disorder[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2016, 26(2): 280—287.
- [17] Lnoe K, Ozaki S, Shiga T, et al. Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(10):946—954.
- [18] Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, et al. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons[J]. *EMBO J*, 2002, 21(13): 3454—3456.
- [19] Livingston BP, Nichols TR. Effects of reinnervation of the triceps brachii on joint kinematics and electromyographic patterns of the feline forelimb during level and upslope walking[J]. *Cells Tissues Organs*, 2014, 199(6): 405—422.
- [20] Chen HH, Hippenmeyer S, Arber S, et al. Development of the monosynaptic stretch reflex circuit[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13(1): 96—102.
- [21] Zanin JP, Battisto NL, Rovasio RA. Neurotrophic factor NT-3 displays a non-canonical cell guidance signaling function for cephalic neural crest cells[J]. *Eur J Cell Biol*, 2013, 92(8-9): 264—279.
- [22] Petrosyan HA, Alessi V, Hunanyan AS, et al. Spinal electro-magnetic stimulation combined with transgene delivery of neurotrophin NT-3 and exercise: novel combination therapy for spinal contusion injury[J]. *J Neurophysiol*, 2015, 114(5): 2923—2940.
- [23] Liu Y, Kelamangalath L, Kim H, et al. NT-3 promotes proprioceptive axon regeneration when combined with activation of the mTor intrinsic growth pathway but not with reduction of myelin extrinsic inhibitors[J]. *Experimental neurology*, 2016, 283(Pt A):73—84.
- [24] Li S, Shen T, Liang Y, et al. Effects of miniscalpel-needle release on chronic neck pain: A retrospective analysis with 12-month follow-up[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):133—137.
- [25] Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system[J]. *Nature*, 2000, 407(6807): 963—970.
- [26] Grasselli G, Strata P. Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43[J]. *Front Neural Circuits*, 2013, 7(25): 1—7.
- [27] Juan WS, Huang SY, Chang CC, et al. Melatonin improves neuroplasticity by upregulating the growth-associated protein-43 (GAP-43) and NMDAR postsynaptic density-95 (PSD-95) proteins in cultured neurons exposed to glutamate excitotoxicity and in rats subjected to transient focal cerebral ischemia even during a long-term recovery period [J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(2):213—223.