

· 基础研究 ·

坐骨神经损伤后脊髓肝细胞生长因子 mRNA 及蛋白的表达

冯凯 林世和 吕宪民 王海英 吕艳华 高轩 孟晓梅 吴秀玲

【摘要】目的 研究坐骨神经损伤后再生过程中脊髓肝细胞生长因子(HGF)mRNA 和蛋白的表达及经时变化规律,探讨周围神经损伤的机制。**方法** 采用原位杂交及免疫组化技术检测坐骨神经损伤后再生过程中脊髓 HGF 的 mRNA 及蛋白的表达。**结果** 大鼠坐骨神经损伤模型损伤侧的神经细胞胞质颗粒阳性染色强于未损伤侧;神经损伤后第 3,7 和 14 天,感觉、运动和副交感神经元内杂交信号明显增强,以第 7 天的变化最为显著。HGF 蛋白的表达均于坐骨神经损伤后第 1 周开始增强,第 2 周时达峰值,然后下降。**结论** 周围神经损伤后,内源性 HGF mRNA 和蛋白表达增强,对神经元具有保护作用。

【关键词】 肝细胞生长因子; 周围神经损伤; 原位杂交; 免疫组化技术

Messenger RNA and protein expression of spinal cord hepatocyte growth factor after sciatic nerve injury

FENG Kai*, LIN Shi-he, LV Xian-min, WANG Hai-ying, LV Yan-hua, GAO Xuan, MENG Xiao-mei, WU Xiu-ling.

* Department of Neurology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China

【Abstract】Objective To study hepatocyte growth factor(HGF) mRNA and protein expression in the spinal cord during regeneration after sciatic nerve injury. To investigate the mechanism of peripheral nerve injury. **Methods** Seventy-four Wistar rats were divided into three groups: a regeneration after nerve injury group (injury group), a sham injury group and a normal control group. Crash injury or sham injury was induced of the sciatic nerve on the right side of the animals in the injury group or the sham injury group by using forceps. In situ hybridization and immunohistochemistry techniques were used to detect HGF mRNA and protein expression in the spinal cord during the course of regeneration after sciatic nerve injury had been induced. **Results** Compared with the uninjured side, positive dyeing of cytoplasmic granules on the injured side of the spinal cord was obviously enhanced. Clearly enhanced hybridization signals were observed at the 3rd, 7th and 14th day after injury, especially at the 7th day. Enhanced expression of HGF protein began in the 1st week and peaked in the 2nd week after sciatic nerve injury, then began to descend. **Conclusion** Endogenous HGF mRNA production and protein expression increased, and it plays a protective role after peripheral nerve injury.

【Key words】 Hepatocyte growth factor; Peripheral nerve injury; In situ hybridization; Immunohistochemistry

新近研究表明,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)是一种新的神经营养因子^[1,2],存在于大脑皮质、小脑的大神经元以及脊髓的神经元中。HGF mRNA 在中枢神经系统中广泛表达,对神经元具有保护作用。但周围神经损伤后,HGF mRNA 及蛋白在脊髓中表达、分布及经时变化规律目前还不清楚。本研究采用原位杂交及免疫组化技术,检测坐骨神经损伤后再生过程中脊髓 HGF mRNA 的表达、分布及经时变化规律,旨在进一步探讨周围神经损伤的机制。

材料与方法

一、动物分组及处理

作者单位:100730 北京,卫生部北京医院神经内科(冯凯、孟晓梅);吉林大学第一医院神经内科(林世和);唐山工人医院神经内科(吕宪民、王海英、吕艳华、高轩、吴秀玲)

Wistar 大鼠 75 只,体重为 200 ~ 250 g,随机分为坐骨神经损伤组、正常对照组和未损伤神经组,每组 25 只。坐骨神经损伤组大鼠采用 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉,剂量为 3.5 ml/kg 体重,麻醉后俯卧位固定于固定板上,备皮后消毒;于股部右侧坐骨神经走向处切开皮肤,用止血钳钝性分离股二头肌、半腱肌和半膜肌,显露右侧坐骨神经;在坐骨结节下方 0.5 cm 处,用特制的无齿蚊式钳钳夹坐骨神经 15 s,造成 2 mm 长的挫伤;用丝线标记捻挫点处肌肉,缝合分离的肌肉和皮肤。正常对照组不做任何处理。未损伤神经组只显露右侧坐骨神经,然后缝合分离的肌肉和皮肤。3 组动物分别于术后第 1,3,7,14 和 28 天,在麻醉下进行心内穿刺灌注固定。先用约 250 ml 含肝素的生理盐水迅速洗净组织内血液,然后灌入含焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate,DEPC)水的 4% 多聚甲醛固定液

约 250~300 ml, 固定至鼠尾变硬。沿第 12 肋基部腰脊髓水平离断脊髓, 剥离相应水平的 L₃₋₅ 脊髓 (未损伤侧留取脊神经作为标本), 制成冰冻切片及石蜡切片备用。

二、原位杂交法检测 HGF mRNA 的表达

应用经地高辛标记的 HGF 特异性寡核苷酸探针试剂盒 (由武汉博士德生物制品公司提供)。大鼠 HGF mRNA 靶基因的寡核苷酸探针序列为: 5' GAA GGC AGA AGG GAA AGC TGC CTC TAC CAC 3'。冰冻切片用 3% H₂O₂ 甲醇在室温下处理 30 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 滴加以 3% 柠檬酸新鲜稀释的复合消化液 (3% 柠檬酸 1 ml 加 2 滴浓缩型复合消化液) 在 37℃ 下消化 60 s; 加 10~20 μl 含寡核苷酸探针的原位预杂交液在 4℃ 下杂交过夜; 加 10~20 μl 含寡核苷酸探针的原位预杂交液在 37℃ 恒温箱中杂交 4~5 h; 30~37℃ 的 2 × SSC (柠檬酸钠和氯化钠的缓冲液) 洗涤 3 次, 每次 5 min; 4℃ 下静置 30 min; 滴加生物素化兔/小鼠抗地高辛, 于 4℃ 下作用 1~2 h; 滴加链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物, 于 4℃ 下作用 2~4 h; DAB 显色。

三、免疫组织化学法检测 HGF 蛋白的表达

采用过氧化物酶标记的链霉卵白素染色法 (SP 法)。取以 10% 中性福尔马林固定的石蜡切片, 厚度为 5 μm, 常规脱蜡、水化; 于 3% H₂O₂ 中浸泡 5 min, 去除内源性过氧化氢酶活性; 用正常山羊血清封闭非特异性抗体; 滴加稀释的一抗 (1:100 稀释度); 滴加适量山羊抗兔 IgG 抗体; 滴加酶标抗体, PBS 洗 3 次; DAB 显色; 苏木素轻度复染、脱水、透明和封片。

四、图像分析

每张切片中随机选出 20 个以上的神经元, 用

CMIAS 型真彩色图像分析系统 (北航公司) 测量各类神经细胞内 HGF mRNA 及蛋白表达信号的平均光密度值。

五、统计学分析

所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.0 版统计软件, 采用 *t* 检验进行统计学分析。

结 果

一、坐骨神经损伤组损伤侧与未损伤侧 HGF mRNA 的表达

损伤侧脊髓神经细胞胞浆内 HGF mRNA 胞质染色较未损伤侧强。损伤后第 3、7 和 14 天, 前角运动神经元、侧角副交感神经元和后角感觉神经元内杂交信号明显增强 ($P < 0.01$), 以第 7 天的变化最为显著, 可见大部分神经细胞呈强阳性反应, 杂交信号充满胞质。各观察时间点损伤侧与未损伤侧 HGF mRNA 杂交信号的图像分析结果见表 1 和图 1、2。正常对照组、未损伤神经组及坐骨神经损伤组未损伤侧的 HGF mRNA 杂交信号比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

二、坐骨神经损伤组损伤侧与未损伤侧 HGF 蛋白的表达

损伤侧的前角运动神经元、侧角副交感神经元和后角感觉神经元内 HGF 蛋白的表达均于坐骨神经损伤后第 1 周开始增强, 第 2 周达峰值, 与未损伤侧相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 第 4 周仍明显高于未损伤侧, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各观察时间点损伤侧与未损伤侧 HGF 蛋白表达分析结果见表 2 和图 3、4。正常对照组、未损伤神经组及坐骨神经损伤组未损伤侧的 HGF 蛋白表达比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 坐骨神经损伤组损伤侧与未损伤侧 HGF mRNA 的表达 ($n = 25, \bar{x} \pm s$)

损伤侧别	时间				
	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
未损伤侧	0.124 ± 0.023	0.112 ± 0.015	0.135 ± 0.013	0.115 ± 0.017	0.166 ± 0.025
损伤侧					
前角运动神经元	0.163 ± 0.049	0.235 ± 0.035 *	0.279 ± 0.014 *	0.224 ± 0.042 *	0.183 ± 0.025
侧角副交感神经元	0.150 ± 0.035	0.246 ± 0.043 *	0.269 ± 0.037 *	0.237 ± 0.053 *	0.181 ± 0.063
后角感觉神经元	0.165 ± 0.032	0.219 ± 0.029 *	0.252 ± 0.023 *	0.230 ± 0.029 *	0.192 ± 0.034

注: 与未损伤侧比较, * $P < 0.01$

表 2 坐骨神经损伤组损伤侧与未损伤侧 HGF 蛋白的表达 ($n = 25, \bar{x} \pm s$)

损伤侧别	时间				
	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
未损伤侧	0.224 ± 0.038	0.229 ± 0.047	0.248 ± 0.034	0.236 ± 0.026	0.225 ± 0.014
损伤侧					
前角运动神经元	0.234 ± 0.036	0.256 ± 0.038	0.331 ± 0.031 *	0.351 ± 0.037 *	0.291 ± 0.064 #
侧角副交感神经元	0.251 ± 0.035	0.256 ± 0.043	0.324 ± 0.057 *	0.357 ± 0.053 *	0.281 ± 0.073 #
后角感觉神经元	0.247 ± 0.037	0.247 ± 0.048	0.331 ± 0.063 *	0.330 ± 0.049 *	0.302 ± 0.075 #

注: 与未损伤侧比较, * $P < 0.01$, # $P < 0.05$

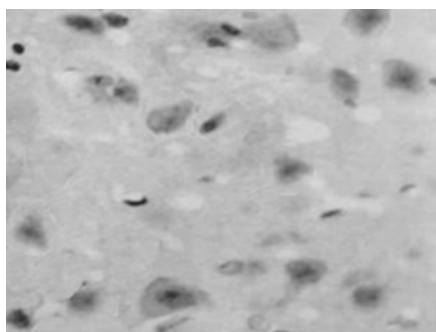


图1 坐骨神经损伤组损伤侧脊髓前角 HGF mRNA 的表达 (原位杂交, $\times 200$)

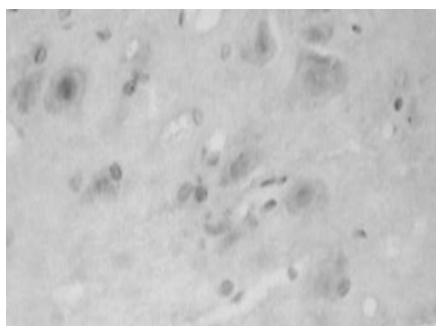


图2 坐骨神经损伤组未损伤侧脊髓前角 HGF mRNA 的表达 (原位杂交, $\times 200$)

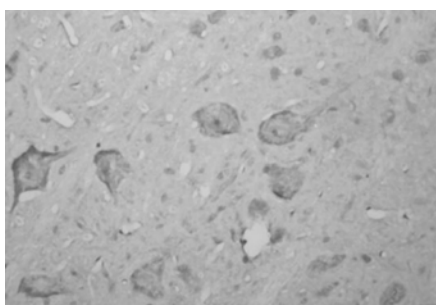


图3 坐骨神经损伤组损伤侧脊髓前角 HGF 蛋白的表达 (免疫组化, $\times 200$)

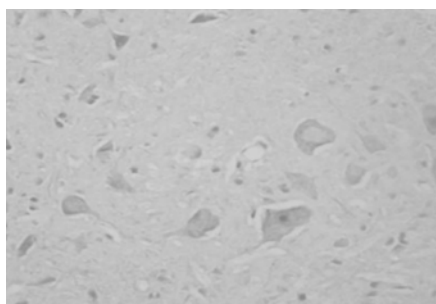


图4 坐骨神经损伤组未损伤侧脊髓前角 HGF 蛋白的表达 (免疫组化, $\times 200$)

讨 论

1994 年, Koliatsos 等^[3]报道了周围神经损伤后, 脊髓神经元胞体会发生死亡。以后, 人们对周围神经损伤的认识逐渐深入, 对周围神经再生的研究从细胞

和亚细胞水平发展到分子水平, 并提出了一些新的概念和理论, 认为周围神经损伤的性质是细胞损伤, 病变不仅位于损伤局部, 还包括神经元和效应器, 是三个水平的病变^[4]。神经营养因子 (neurotrophic factor, NTF) 能在上述三个水平保护神经元, 促进神经的再生。以往的研究主要集中在中枢神经损伤后局部 NTF 表达的改变, 而对于周围神经损伤后中枢神经元 NTF 表达的报道较少。Tsuzuki 等^[1]发现, HGF 可减轻鼠局部缺血引起的神经元损伤, 减小梗死体积, 是一种新的神经营养因子。Hayashi 等^[5]证明, HGF 是神经再生功能修复的重要促进因素。HGF 效应通过受体介导, 与效应细胞的膜复合体 c-Met 结合后, 沿轴浆经轴突转运至胞核, 引起一系列的反应。HGF 在运动神经元的发育和存活、轴突的生长和导向、肌肉的营养中都起着重要的作用。国外有 HGF 促进周围神经恢复作用的相关报道^[6,7]。在胚胎的发育中, 运动神经元的发育依赖于正确的神经通路的建立, 运动神经元轴突延伸到靶点, 形成完整突触联系的过程不是随机的, 而是高度特异和限制的, 这种作用受到某些正、负反馈的分子调控, HGF 就是其中之一^[8]。我们以往的研究发现^[9], 外源性 HGF 对周围神经损伤具有保护作用, 可促进运动神经的恢复, 是 NTF 的一种。

本研究发现, 坐骨神经损伤后第 3, 7 和 14 天, 前角运动神经元、侧角副交感神经元和后角感觉神经元内 HGF mRNA 杂交信号明显增强, 以第 7 天变化最为显著; HGF 蛋白的表达均于坐骨神经损伤后第 1 周开始增强, 第 2 周达峰值, 然后下降。这说明在周围神经损伤这一伤害信息传入中枢神经元后, 机体可作出相应的反应, 提高 HGF 蛋白的表达, 而 HGF 的增加将起到保护中枢神经元的作用^[8]。外周神经系统损伤后, 内源性 HGF 表达的增加可保护神经元, 加快轴突的生长, 促进神经纤维的修复。国外有研究报道, HGF 在大脑及外周神经系统的发育和形态维持中起一定作用, 它通过自分泌 (如颈上神经节的交感神经元)、旁分泌 (如促雪旺氏细胞的分裂作用) 以及经典的轴突逆向运输方式与特异性的受体结合而起神经营养作用^[10]。我们的研究结果显示, 周围神经损伤后再生过程中, 脊髓神经细胞胞浆内 HGF mRNA 杂交信号及蛋白表达明显增强, 推测可能在周围神经损伤后, 脊髓神经元通过自分泌后转运, 诱导近侧残端或中枢神经元轴突再生, 重建神经环路, 对神经元及周围神经起到保护作用。同时, 侧角和后角神经细胞胞浆内 HGF mRNA 杂交信号及蛋白表达也明显增强, 说明在感觉和副交感神经系统中, HGF 与其他生长因子一样也能促进神经元及周围神经的存活, 对轴

突的生长具有导向作用,有利于坐骨神经功能的早期恢复。其机制可能是通过自分泌方式与特异性的受体结合而起作用,与国外的文献报道一致^[10,11]。

参 考 文 献

- 1 Tsuzuki N, Miyazawa T, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neurochir Suppl*, 2000, 76:311-316.
- 2 Hashimoto N, Yamanaka H, Fukuoka T, et al. Expression of hepatocyte growth factor in primary sensory neurons of adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 97:83-88.
- 3 Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, et al. Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons. *J Comp Neurol*, 1994, 344:160.
- 4 陈伟中,主编.周围神经损伤基础与临床研究.山东:山东科学技术出版社,1998.341-346.
- 5 Hayashi K, Morishita R, Nakagami H, et al. Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Gene Ther*, 2001, 8:1167-1173.
- 6 Kato N, Nemoto K, Nakanishi K, et al. Nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor improves streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Diabetes*, 2005, 54:846-854.
- 7 Koyama J, Yokouchi K, Fukushima N, et al. Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on neonatal facial motor neurons. *Neurol Res*, 2003, 25:701-707.
- 8 Krull CE, Koblar SA. Motor axon pathfinding in the peripheral nervous system. *Brain Res Bull*, 2000, 53:479-487.
- 9 冯凯,林世和,吕宪民,等.肝细胞生长因子对坐骨神经损伤保护作用的研究.中国神经免疫学和神经病学杂志,2005,2:122-124.
- 10 Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, et al. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev*, 1997, 11:3341-3350.
- 11 Davey F, Hilton M, Davies AM. Cooperation between HGF and CNTF in promoting the survival and growth of sensory and parasympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci*, 2000, 15:79-87.

(收稿日期:2005-06-20)

(本文编辑:吴倩)

· 短篇论著 ·

微波透热对颈部肿瘤放疗患者甲状腺功能恢复的影响

雷欣 马常英 牛晓南 张龙奎 叶大勇 陈志明

虽然放射治疗颈部恶性肿瘤的疗效十分肯定,但对甲状腺组织的放射性损伤却难以避免。我们采用微波局部辐射,减轻放疗后局部副损伤,并通过甲状腺功能参数测定,证实微波透热治疗对甲状腺在放疗损伤后的功能恢复具有较好的促进作用。

一、资料与方法

在放疗科进行放射治疗的颈部肿瘤并锁骨上转移瘤患者 60 例,男 40 例,女 20 例;年龄 32 ~ 75 岁。左颈部肿瘤、左锁骨上转移瘤 25 例,右颈部肿瘤、右锁骨上转移瘤 32 例,双侧锁骨上转移瘤 3 例。原发病灶:鼻咽癌 12 例,肺癌 15 例,乳腺癌 7 例,喉癌 10 例,食道癌 8 例,其它癌症 5 例,原发病灶不明 3 例。根据就诊顺序自然分为微波透热组 40 例和对照组 20 例。2 组患者的放射治疗均采用直线加速器 X 线照射,照射野包括原发病灶及转移灶,平均总剂量是 6 000 cGy,常规分割,每周 5 次,每次 200 cGy,平均治疗 30 d,放射治疗后 2 h 内进行微波治疗。微波透热组采用大连产 MH-I 型微波治疗机进行治疗,频率为 2 450 MHz(厘米波),圆柱形辐射器,直径约 8 cm。将辐射器对准肿瘤区(放疗模拟机已定位,体表皮肤标记),保持垂直距离 3 ~ 5 cm。输出功率为 40 ~ 50 W,肿瘤表面皮肤温度 40 ~ 42℃,每次 30 min,每周 3 次,1

个疗程为 10 ~ 20 次,或随同放疗次数进行。对照组未进行微波治疗。

血清甲状腺激素测定包括 T₃, T₄, TSH, FT₃ 和 FT₄。两组患者分别于放疗前、放疗结束 3 d、放疗结束后 1 个月、放疗结束后 2 个月测定甲状腺激素水平。

二、结果

表 1 中数据显示,①观察组放疗前、后甲状腺功能相比较,仅 TSH 提高 24.91%,其它基本无变化,与对照组同期相比基本相同。②放疗后 1 个月,甲状腺功能数值与放疗后比较,改变较大,T₃ 下降 35.00%, T₄ 下降 28.03%, FT₃ 下降 33.33%, FT₄ 下降 41.98%, TSH 上升 81.71%。而变化幅度比对照组同期小。③放疗后 2 个月,甲状腺功能数值与放疗后 1 个月比较,均值改变较大,基本恢复到放疗前水平,T₃ 上升 30.77%, T₄ 上升 23.02%, FT₃ 上升 25.00%, FT₄ 上升 32.55%, TSH 下降 29.72%。其变化幅度比对照组同期明显加大。

对照组:①对照组放疗前、后甲状腺功能相比较,仅 TSH 提高 20.92%,其他基本无变化。②放疗后 1 个月,甲状腺功能与治疗后比较,改变较大,T₃ 下降 40.48%, T₄ 下降 40.74%, FT₃ 下降 37.90%, FT₄ 下降 46.94%, TSH 上升 110.56%。③放疗后 2 个月,甲状腺功能与放疗后 1 个月比较,其他 5 项都有所改变。T₃ 上升 6.670%, T₄ 上升 7.02%, FT₃ 上升 4.91%, FT₄ 上升 0.70%, TSH 下降 3.20%。

作者单位:161005 齐齐哈尔,黑龙江省齐齐哈尔市第一医院康复医学科(雷欣、叶大勇),肿瘤放疗科(马常英、陈志明),核医学科(牛晓南、张龙奎)