

家兔面神经撞击伤后胶质细胞源性的神经营养因子 mRNA 在面神经元中的表达特点

王琛 周树夏 郑春梅 邱建勇 宋俊峰

摘要 目的:了解胶质细胞源性的神经营养因子(GDNF)mRNA在面神经撞击伤这一特定致伤条件下的表达特点,结合其他学者的实验结果,探讨GDNF在面神经损伤后再生中可能发挥的生物学作用。方法:以撞击枪在10 m/s撞击速度,7.5 J撞击能量下建立家兔面神经撞击伤模型,撞击后3、7、14、21 d采用原位杂交方法分别检测面神经元及周围面神经中GDNF mRNA的表达范围及表达特点,并对面神经元表达数量进行计数分析。结果:面神经受到撞击后在不同时间点的面神经元中均可检出强烈的GDNF mRNA表达,第7天达高峰,随后逐渐下降,至第21天仍可见较高水平表达。周围神经雪旺氏细胞及正常面神经元均不表达GDNF mRNA。结论:GDNF是一种应激性表达的运动神经元营养因子,其表达特点与面神经撞击伤后的再生过程在时间上具有一致性,表明它可能在面神经损伤后的再生过程中发挥作用。

关键词 胶质细胞源性的神经营养因子 mRNA 撞击伤 面神经 原位杂交

The Character of Glial Line-cell Derived Neurotrophic Factor mRNA Expression in a Facial Nerve-striking Model

Wang Chen

The Stomatological Department of the Second Rocket Army General Hospital

Zhou Shuxia, Zheng Chunmei

The Stomatological College, the Fourth Military Medical University

Qiu Jianyong, Song Junfeng

The Institute of Neuroscience, the Fourth Military Medical University

Abstract

Objective: It has been known that glial line-cell derived neurotrophic factor (GDNF) has the nutritional and protective effect in motor neurons. In this experiment, we investigated the character of GDNF mRNA expression in a facial nerve-striking model; combined with other scholars' experimental results; and analyzed what role GDNF plays in the regeneration process of injured motor nerves. **Methods:** We established a striking model in rabbit facial nerves with a striking gun with the striking velocity of 10m/s and the total striking energy of 7.5J. Then we detected the GDNF mRNA expression in facial neurons and axons with *in situ* hybridization on days 3, 7, 14 and 21 after striking. We counted the expression numbers of facial neurons and, compared with normal facial neurons and peripheral facial nerves. **Results:** We detected GDNF mRNA expression in the facial neurons from day 3 to day 21 after the facial nerve injured by striking. The peak of GDNF mRNA expression appeared on the 7th day, and then the expression number of facial neurons decreased gradually. A high level expression was also detected on day 21. GDNF mRNA expression was not detected neither in Schwann cells nor in normal facial neurons from the 3rd day to the 21st day. **Conclusion:** GDNF is a kind of neurotrophic growing factor (NGF) that could be activated by injury. The character of GDNF mRNA expression was accordant to the process of nerve regeneration. These results showed that GDNF plays a very important role in the regeneration of injured motor nerves.

Key words: glial line-cell derived neurotrophic factor mRNA facial nerve striking *in situ* hybridization

作者单位:100088 第二炮兵总医院口腔科(王琛),第四军医大学口腔医学院(周树夏,郑春梅),第四军医大学神经科学研究所(邱建勇,宋俊峰)

胶质细胞源性的神经营养因子(glial line-cell derived neurotrophic factor, GDNF)已被证实对运动神经元具有强大的营养及保护作用^{1,2},但这种作用

的分子生物学机制尚不清楚。已有学者在面神经切断及钳夹模型中探讨了 GDNF 受体 mRNA 的表达及调控³, 本文在建立了家兔面神经撞击伤模型的基础上, 首次通过原位杂交方法初步探讨了面神经撞击伤后面神经元中的 GDNF mRNA 的表达及调控机制, 希望通过了解不同损伤条件下 GDNF 及其受体 mRNA 的表达, 以进一步探讨其在神经损伤后再生中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年长耳白毛家兔 18 只, 第四军医大学动物中心提供, 5~6 月龄, 雄性, 体重 2.0~2.5 kg, 单笼兔块料饲养。

1.2 实验材料

两个各含有 GDNF DNA 碱基序列的寡核苷酸探针由北京赛百盛生物工程公司合成。地高辛标记原位杂交试剂盒为 SIGMA 公司产品。

GDNF 寡核苷酸探针碱基对排列顺序分别为:

5' > GGC CGC TTC ACA GGA ACC GCT ACA TAT CGA AAG ATC AGT TCC TCC TTG A < 3'

5' GCC TGC AAC ATG CCT GGC CTA CCT TGT CAC TTG TTA GCC TTC TAC TTC GA < 3'

1.3 动物模型的建立

采用 DS-50 型撞击枪撞击家兔面神经, 部位为相对瞳孔正下方之颊支, 撞击条件为撞击头直径 7 cm, 撞击速度 10 m/s, 撞击能量 7.5 J, 撞击后所有动物均存活, 同时出现部分面瘫症状。

1.4 取材

将实验动物分为实验组及对照组, 2 只为正常对照组, 16 只为实验组。实验组再分为 4 组, 每组 4 只, 分别于伤后 3, 7, 14, 21 d 以 4% 多聚甲醛行左心室持续灌注, 取家兔脑组织及周围面神经, 立即行冰冻切片, 正常组同法灌注后取脑组织作切片。

1.5 切片和染色

将脑组织及神经干行冰冻切片, 脑组织切至面神经核平面, 面神经干则行纵断及横断切片, 切片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min 后再放入 37℃ 温箱中干燥 4 h, 然后行原位杂交染色。部分面神经干切片再行 HE 染色。光镜观察。

1.6 结果分析

于撞击伤动物面神经核 3, 7, 14, 21 d 及正常面神经核原位杂交片中分别等距、随机选取 8 个切片标本, 分别计数每一切片中表达的细胞, 计算均数及标准差。

2 结果

2.1 面神经核中的 GDNF mRNA 表达

面神经受到撞击后, 在 3, 7, 14, 21 d 时面神经核中的面神经元胞浆中均可检出 GDNF mRNA 表达, 其形态为典型的大运动神经元, 见图 1~4。而正常面神经核中仅有极少量神经元有较微弱的阳性表达, 几乎检测不出, 见图 5。

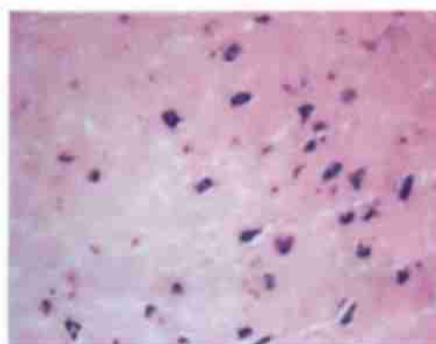


图 1 撞击后 3 d 面神经元 GDNF mRNA 出现高表达
原位杂交 ×100

Fig1 The facial neurons has a high expression of GDNF mRNA at 3d after striking in situ hybridization ×100

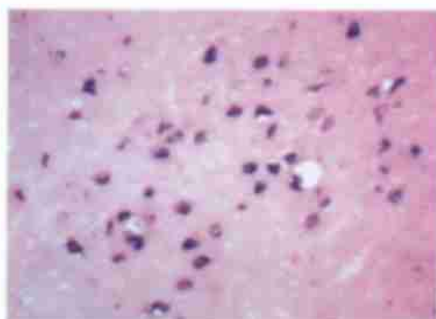


图 2 撞击后 7 d 面神经元中 GDNF mRNA 表达达到高峰
原位杂交 ×100

Fig2 The expression of GDNF mRNA arrive at the highest level at 7d in situ hybridization ×100

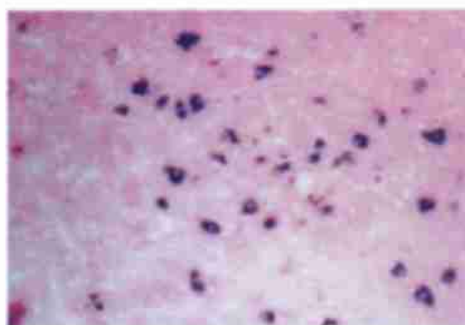


图 3 撞击后 14 d 面神经元中 GDNF mRNA 表达仍较高
原位杂交 ×100

Fig3 The facial neurons still has a high expression of GDNF mRNA at 14d after striking in situ hybridization ×100

面神经撞击伤后不同时间神经元阳性表达细

胞数是:撞击后3 d为 25.0 ± 1.7 , 7 d为 41.6 ± 1.7 , 14 d为 31.6 ± 2.6 , 21 d为 27.2 ± 2.0 。

2.2 周围面神经中的 GDNF mRNA 表达

不同损伤时间的面神经干,其损伤部位周围雪旺氏细胞均未检出明确 GDNF mRNA 表达

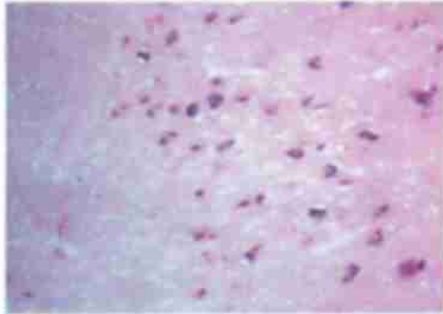


图4 撞击后21 d面神经元中 GDNF mRNA 表达已减弱,但仍维持在较高水平 原位杂交 $\times 100$

Fig4 The expression of GDNF mRNA has been decreased, but still maintain a high level in situ hybridization $\times 100$

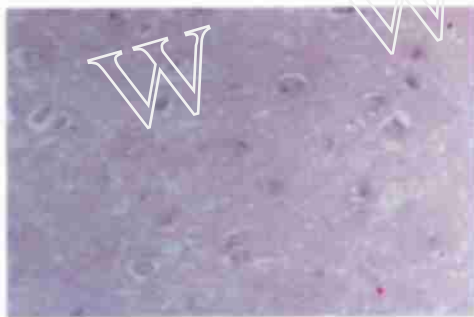


图5 正常面神经元不表达 GDNF mRNA 原位杂交 $\times 100$

Fig5 Normal facial neurons does not express GDNF mRNA in situ hybridization $\times 100$

2.3 周围面神经的 HE 染色结果

面神经受到撞击损伤后于不同的时间段中均可见到血栓形成,近束膜处髓鞘结构消失,呈大的空泡样及网状变性,轴突连续性消失,雪旺氏细胞肿胀,分布散乱。横断切片可见髓鞘膨大,部分呈空泡样变。近神经外膜处髓鞘及轴突变性明显,近神经中心部分则改变不明显。

3 讨 论

Burazin⁴ 采用成年大鼠以面神经切断及钳夹两种模型研究 GDNF 受体 mRNA 在面神经元内的变化,结果表明:作为信号传导部分的 GDNF 受体 c-Ret 其 mRNA 在面神经切断及钳夹后 1~3 d 内其水平升至 1.4 倍,7~21 d 恢复正常。GDNFR -mR-

NA 在面神经压榨后 1~3 d 上升至 2~3 倍,面神经切断后 GDNFR -mRNA 上调时间可达 21 d。实验还发现,c-Ret 及 GDNFR -mRNA 在神经损伤后 21 d 的恢复过程与轴突的恢复过程是一致的。提示 GDNF 对损伤后的神经具有潜在的生物学作用。

GDNF mRNA 在正常面神经元中通常表现为低水平的表达,其作用在于:发挥其神经营养作用,维持神经元细胞的形态及功能。行使其信号监控作用。此即 GDNF 的信号/营养系统⁴。当神经受到撞击损伤后,此系统即被激活,一方面面神经元中 GDNF 的合成作用加强,使其发挥对神经元的营养作用,减少神经元的死亡数量,另一方面 GDNF 可促进神经元内的物质合成,有利于损伤神经的再生。

本实验未能检出周围神经雪旺细胞中的 GDNF mRNA,但这一结果并不能证明受损神经干中缺乏 GDNF。国外学者采用 Northern-Blotting 法明确检出神经干中的 GDNF 受体 mRNA 表达,由于此方法通过提纯神经干中的总 mRNA 进行定量分析,因此较为精确、可靠。

已有实验表明,面神经受到撞击伤后至第 15 d 病理学改变已趋稳定,30 d 时即可见明显恢复⁵。本实验显示,GDNF mRNA 的表达高峰出现于神经损伤后的第 7 天,即面神经损伤的早期,这与轴突的再生过程具有一致性,即:GDNF 在面神经损伤早期发挥其营养及保护作用,当神经损伤达稳定阶段,即第 14~21 天后,GDNF 即下调其表达强度,但仍维持在一个合理的水平上发挥作用。即 GDNF 是一种应激性表达升高的因子,它在运动神经损伤后的修复及再生中可能发挥营养及保护作用。

参考文献

- 1 Oppenheim RW, Houenou JE, Johnson JE, et al. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*, 1995, 373(9):344~347
- 2 Matheson CR, Wang J, Collins FD, et al. Long-term survival effects of GDNF on neonatal rat facial motoneurons after axotomy. *Neuroreport*, 1997, 8(7):1739~1743
- 3 Philippe Naveilhan, Wael ME, Patrik E. Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR after Sciatic nerve lesion in the mouse. *Eur J Neurosci*, 1997, 9(6):1450~1454
- 4 Burazin TC, Gundlach AL. Up-regulation of GDNFR-alpha and c-ret mRNA in facial motor neurons following facial nerve injury in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 55(2):331~334
- 5 王琛,周树夏,金岩,等.家兔面神经撞击伤后的组织病理学改变. *实用口腔医学杂志*, 1999, 15(3):210~212

(2000-11-21 收稿,2002-02-06 修回)

(本文编辑 王 晴)