

[文章编号] 1000-2200(2004)02-0104-02

·基础医学·

大鼠失神经支配表情肌 NT-3 基因转染的实验研究

陈传好^{1,2}, 韩 卉¹, 陈昌杰³

[摘要] 目的: 观察神经营养素 3 (neurotrophin 3, NT-3) 基因转染大鼠失神经支配表情肌的情况及对其功能恢复的影响。方法: 离断大鼠面神经的下颌缘支和颊支后无张力外膜吻合制备面神经损伤模型, 以直接注射法将脂质体 DC-Chol 和重组质粒 pcDNA3.1(+)-NT-3 混匀后注入受损神经处的神经所支配的肌肉内。采用 RT-PCR 技术检测转基因处肌肉的 NT-3 表达, 并观察 NT-3 基因转染后大鼠触须活动情况。结果: 经脂质体 DC-Chol 介导 NT-3 基因可有效地转染组织并得到表达, 大鼠转基因实验侧的触须拂动比对照侧提前开始恢复。结论: 经脂质体介导的外源性 NT-3 在损伤局部表达并具有促进和加快面神经功能恢复的作用。

[关键词] 面神经; 神经营养素 3; 基因转染; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 322.85 [文献标识码] A

NT-3 gene transfer to facial muscle denervation in rats

CHEN Chuan-hao, HAN Hui, CHEN Chang-jie

(Department of Anatomy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of neurotrophin-3 (NT-3) gene transfer on the function recovery of facial muscle denervation in rats. **Methods:** The model of facial nerve lesion was established in rats by cutting the marginal mandibular branch and buccal branches of facial nerve. The recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-NT-3 and DC-chol liposome admixture were injected into the muscles around the injured facial nerve. RT-PCR was adopted to confirm whether NT-3 cDNA expressed after the injection, and the movement of the rats' palp was observed. **Results:** The muscles were infected by injecting the DC-chol mediated NT-3 transfer and NT-3 gene was expressed. The movement of the rats' palp at the side injected NT-3 began to recover earlier than the control side. **Conclusions:** Transfer of NT-3 can promote the recovery of the function of the injured facial nerve by increasing local expression of exogenous NT-3.

[Key words] facial nerve; neurotrophin-3; gene transfer; rats

周围神经损伤后的再生和功能恢复一直是困扰神经科学界的难题及研究的重点之一。临床采用显微外科技术治疗周围神经损伤, 效果一直不理想。随着神经科学的发展, 人们发现影响周围神经再生微环境和神经生长导向性的因素对受损神经再生起着至关重要的作用^[1]。近年的研究证实, 外源性神经营养因子 (neurotrophic factors, NTFs) 具有促进创伤后神经的再生和功能恢复的作用^[2]。有关用 NT-3 基因治疗面神经损伤, 目前少有报道。本实验采用基因转染的方法, 给受损面神经创造一个再生的微环境, 观察 NT-3 基因的体内表达情况及对面神经功能恢复的影响, 为进一步探讨 NT-3 对面神

经损伤治疗作用的机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 重组 pcDNA3.1(+)-NT-3 为本实验室构建, 浓度为 0.5 μg/μl, 阳离子脂质体 DC-Chol 购自 Promega 公司。Wistar 大鼠由蚌埠医学院实验动物科提供。Trizol Reagent 为 GIBCORL 公司产品, 逆转录试剂盒为 BBI 公司产品。

1.2 面神经损伤动物模型的制备 成年 Wistar 大鼠 20 只, 雌雄不分, 体重 200~250 g。用 3% 硫喷妥钠腹腔麻醉。采用无菌操作, 在手术放大镜下分离暴露两侧面神经的下颌缘支和颊支的主干, 剪刀剪断两神经干后, 在无张力条件下, 用 11-0 缝线对离断神经行神经外膜吻合。

1.3 基因转染方法及观测指标 用微量注射器将 DC-Chol (15 μl) 和 pcDNA3.1(+)-NT-3 (10 μl) 混合物直接注射到大鼠的右侧 (实验侧) 面神经切断处神

[收稿日期] 2003-09-05

[作者单位] 1. 安徽医科大学 解剖学教研室, 安徽 合肥 230032; 蚌埠医学院 2. 解剖学教研室; 3. 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 陈传好 (1971-), 男, 安徽五河县人, 讲师。

经所支配的肌肉内,左侧(对照侧)只注射 DC-Chol (15 μ l)和 pcDNA3.1(+)(10 μ l)混合物,缝合关闭切口。术后保持伤口清洁无感染,在同等条件下,分笼饲养。转基因第 7 天,随机选取 1 只大鼠断颈处死,取出两侧基因转染处的肌肉,肌肉经总 RNA 抽提后,按照 cDNA 合成试剂盒推荐方法操作合成 cDNA。取 2 μ l 反转录产物为模板,按常规的 PCR (50 μ l 反应体系)条件,先将样品于 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min,按下列参数循环 35 次;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,56 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 反应 10 min。

1.4 行为学观察 正常情况下,大鼠触须向前竖起有节律性拂动。面神经损伤后,触须即向尾侧垂下并失去拂动能力^[3]。自动物手术后第 2 天开始,每天观察记录动物实验侧和对照侧触须节律性拂动的恢复情况。

2 结果

2.1 NT-3 mRNA 表达 大鼠面神经损伤后的两侧基因转染处肌肉的总 RNA 抽提(见图 1),RT-PCR 扩增后的结果显示,实验侧获得约 780 bp 大小的片段(见图 2),与预期结果相符,而对照侧无此片段。

2.2 行为学观察结果 面神经切断后大鼠两侧触须即向尾侧垂下,并失去拂动能力。实验后第 8 天起 pcDNA3.1(+)-NT-3 基因转染的右侧有少数触须出现小幅度的拂动,随着时间延长,触须拂动范围增大,且频率增加。术后第 14.6(13~16)天大鼠右侧的触须节律性拂动基本恢复正常,对照侧(左侧)触须至 29.4(28~31)天开始拂动,且动度较小,仍倒向尾侧,至 40.7(39~46)天时,拂动范围才开始加大。

3 讨论

神经营养素 3(neurotrophin-3, NT-3)是肌源性神经营养因子,为神经营养因子家族的一个成员。NT-3 在体内具有广泛的生物学作用,在中枢神经元的保护、周围神经的损伤及营养肌肉、阻止轴突和运动终板退变发挥重要作用^[4,5]。本实验应用基因克隆技术构建了重组质粒 pcDNA3.1(+)-NT-3 真核表达载体(另文发表),采用的阳离子脂质体与目的基因比例是参阅国外文献推荐的最适比例(DNA:Liposome 为 1 μ g:3 μ l)^[6]。在面神经损伤处神经所

支配的肌肉内直接导入 NT-3 基因,RT-PCR 显示结果证明,受损面神经支配的骨骼肌在 mRNA 水平有 NT-3 表达,表明 pcDNA3.1(+)-NT-3 能有效的转染到受损神经所支配的骨骼肌细胞。

面神经颊支和下颌缘支支配口周肌,颊支以支配鼻唇肌为主,下颌缘支以支配颊肌为主,口周肌的收缩会造成大鼠触须节律性拂动。面神经下颌缘支和颊支损伤后,口周肌瘫痪,触须节律性拂动消失。李云春等^[7]研究表明 NT-3 在面神经有明显的逆行转运。在面神经右侧损伤处神经所支配的肌肉内导入外源性神经营养因子 NT-3,NT-3 可能被面神经支配的外周靶器官骨骼肌摄入后经逆行转运至神经元胞体,促进和加快面神经损伤后的修复和再生。右侧触须 8 天后开始拂动,但动度较小,说明面神经功能开始恢复。而注入空载体的对照侧(左侧)触须出现拂动时间较晚(4 周左右),且动度小,可能由于面神经损伤后,它所支配的靶器官其它 NTFs 的表达所致。实验侧触须节律性拂动恢复较快,可能是由于损伤面神经处神经所支配的肌肉 NT-3 基因的高表达,给受损面神经提供一个良好的再生的微环境。有关实验侧骨骼肌功能恢复较早的机制还有待于通过分子生物学和免疫组化手段进一步研究证实。

(本文图 1、2 见封四)

[参 考 文 献]

- [1] 秦兆冰. 神经营养因子与面神经的损伤及再生研究进展[J]. 国外医学·耳鼻咽喉科学分册, 2000, 24(4): 219~222.
- [2] Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans[J]. *Proc Natl Acadsci USA*, 1993, 90(23): 11 307~11 311.
- [3] Angelov DN, Skouras E, Guntinas-Lichius O, et al. Contralateral trigeminal nerve lesion reduces polyneuronal muscle innervation after facial nerve repair in rats[J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(4): 1 369~1 378.
- [4] Munson JB, Shelton DL, McMahon SB. Adult mammalian sensory and motor neurons: Roles of endogenous neurotrophins and rescue by exogenous neurotrophins after axotomy[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(1): 470~476.
- [5] Sterne GD, Brown RA, Green CJ, et al. Neurotrophin-3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration[J]. *Eur J Neurosci*, 1997, 9(7): 1 388~1 396.
- [6] Yang K, Clifton GL, Hayes RL. Gene therapy for central nervous system injury: The use of cationic liposomes: An invited review[J]. *J Neurotrauma*, 1997, 14(5): 281~297.
- [7] 李云春, 王全林, 杨晓川, 等. 神经营养素 3 在面神经的转运研究[J]. 中华核医学杂志, 2001, 21(3): 185~186.

次氯酸钠法孵化猪带绦虫卵的观察(正文见 97 页)

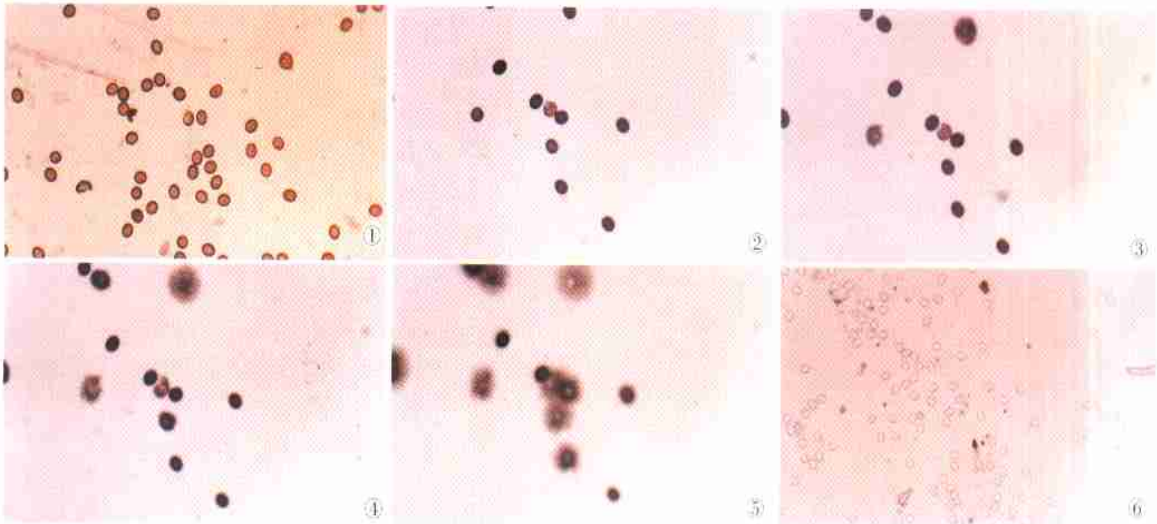


图1 未孵化虫卵 ×160 图2 孵化中的虫卵(孵化 1.0min) ×160 图3 孵化中的虫卵(孵化 2.0min) ×160 图4 孵化中的虫卵(孵化 2.5min) ×160 图5 孵化中的虫卵(孵化 3.0min) ×160 图6 六钩蚴 ×160

活动期瘤样钙质沉着症 13 例分析(正文见 130 页)

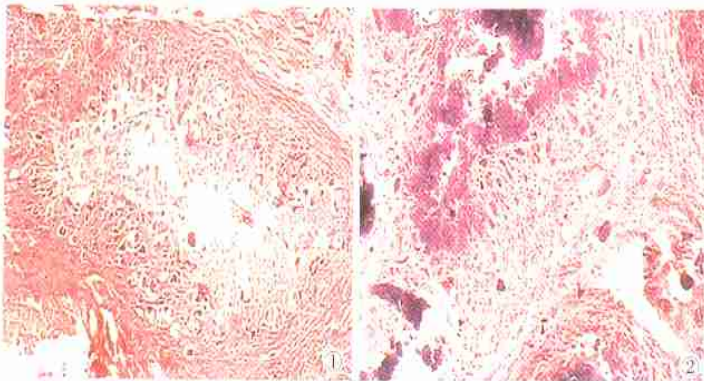


图1 囊壁由肉芽组织构成 HE ×40 图2 囊内为大小不等的钙盐颗粒, 囊壁由肉芽组织构成 HE ×40

大鼠失神经支配表情肌 NT-3 基因转染的实验研究(正文见 104 页)

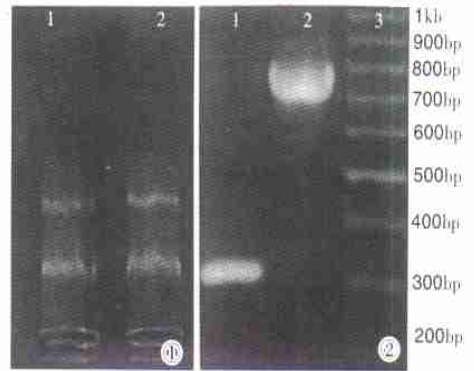


图1 大鼠基因转染处的肌肉总 RNA(1 对照侧, 2 实验侧)
图2 转染第 7 天的实验侧 NT-3 mRNA 的表达(1. β -actin, 2. PCR 产物, 3. marker)