

·基础研究·

携带 LacZ 基因腺病毒载体示踪大鼠上肢神经通路的研究*

韩久卉¹ 田德虎¹ 韩金豹¹ 孔令伟¹ 李 宁¹ 韩聚川¹ 张 斌¹

摘要 目的: 经外周导入携带 LacZ 基因腺病毒载体(AdLacZ), 示踪大鼠尺神经、正中神经轴突及其靶运动和感觉神经元。**方法:** 经尺神经或正中神经近断端导入 AdLacZ, 然后吻合神经。在转染后不同时间点取出 C4—T2 脊髓节段、DRGs 连同臂丛神经, 行 X-gal 染色, 计数被标记的脊髓和 DRGs 神经元数目、部位及其范围; 观察相应神经根及周围神经轴突被标记情况。**结果:** 载体所导入神经同侧的脊髓前角运动神经元和 DRGs 感觉神经元被转基因产物 β -gal 标记; 由尺神经、正中神经所标记的神经元分别在 C7—T1 及 C6—T1 节段; 各神经相应的神经根及神经干轴突被标记, 轴突被标记长度可达吻合口远端。不同神经所标记的神经元数目不同, 随着时间推移标记物逐渐消退。**结论:** Ad 介导的 LacZ 基因能从远距离特异、高效地逆行标记尺神经、正中神经的靶神经元, 然后又顺行标记该神经。这对臂丛神经解剖学研究、臂丛神经损伤和再生机制的研究具有实用价值。

关键词 腺病毒载体; LacZ 基因; 臂丛神经; 脊髓; 神经通路示踪

中图分类号: R651.3, R49 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2008)-02-0138-03

Tract tracing of nerves of upper extremity using adenoviral vectors containing LacZ gene/HAN Jiu-hui, Tian De-hu, HAN Jin-bao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(2): 138—140

Abstract Objective: To trace ulnar nerve, median nerves and their targeted neurons by remote delivery of adenoviral vectors containing LacZ gene (AdLacZ). **Method:** AdLacZ were administrated to the proximal stumps of ulnar nerves or median nerves in Wistar rats and the transected nerves were repaired. At different time points post transfection, the spinal cord of C4—T2 and their corresponding DRGs and brachial plexus nerves were harvested and processed for X-gal staining. **Result:** The motor neurons of ventral horns of spinal cords and sensory neurons of DRGs were labeled by transgene product β -gal in C7—T1 segments transfected from ulnar nerve and C6—T1 segments transfected from median nerves. The corresponding neural roots and nerve trunks of transfected nerves were also labeled. The number of labeled neurons of ulnar nerves was different from that of median nerves. The labeled neurons and axons could not be observed after several weeks post transfection. **Conclusion:** LacZ gene mediated by Ad could specially target the motor and sensory neurons retrogradely and then label the axons of the ulnar and median nerves anterogradely. This gene delivery method renders this system particularly attractive for neuroanatomical tracing studies of brachial plexus nerves and might offer potentialities for gene therapy of peripheral nerve injury.

Author's address Department of Hand Surgery, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050051

Key words adenoviral vector; LacZ gene; brachial plexus nerves; spinal cords; neural tract tracing

随着社会的发展与进步, 高能量创伤日益增多。臂丛神经损伤已成为临床上的常见病、多发病, 但是治疗效果很不满意, 致残率很高^[1]。追踪臂丛神经通路对阐明臂丛神经损伤与修复机制具有重要作用。由于臂丛神经结构复杂, 轴突长, 再生过程缓慢, 适合这些特点的示踪剂的选择比较困难。本研究首次利用携带 LacZ 基因腺病毒载体 (adenoviral vectors containing LacZ, AdLacZ) 示踪臂丛神经的终末支尺神经、正中神经及其靶神经元的组成, 为臂丛神经的解剖学研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和动物

腺病毒载体为 E1 与 E3 缺失的复制缺陷型重组腺病毒, 携带 LacZ 基因, 滴度分别为 1.0×10^{10} pfu/ml, 由上海医元生物基因科技发展有限公司提供。X-gal (Promega, 美国), 铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化镁(上海)。健康雌性 Wistar 大鼠 240 只, 体重 200—250g, 由河北医科大学实验动物中心提供。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471749); 河北省自然科学基金资助项目(C2006000847)

¹ 河北医科大学第三医院手外科, 石家庄市, 050051

作者简介: 韩久卉, 主任医师, 医学博士, 硕士生导师, 教授

收稿日期: 2007-10-08

1.2 手术方法

大鼠经腹腔注射氯胺酮/塞拉嗪麻醉, 随机分成正中神经组和尺神经组, 各 120 只。手术过程如下: 在尺神经组, 沿腋窝作纵向切口直至肘部, 分离胸大肌暴露臂丛神经。在尺神经与背阔肌肌腱交叉部位远端 3mm 处切断尺神经, 将 2 μ l (2 \times 10⁷pfu) AdLacZ 滴在神经近断端, 用 10—0 无创线缝合神经断端, 用 4—0 无创线缝合伤口。正中神经组是在正中神经与背阔肌肌腱交叉部位远端 3mm 处切断该神经, 其余方法同上。在转染病毒后 7 周内 20 个不同时间点将大鼠经腹腔深麻醉后, 用 4 $^{\circ}$ C 4% 甲醛溶液经心脏灌注固定, 将 C4—T2 节段的脊髓连同脊髓后根神经节 (dorsal root ganglia, DRGs)、臂丛神经完整取出后, 将标本置入 4% 甲醛溶液内后固定 4h。

1.3 脊髓横切片 X-gal 染色及阳性细胞计数

将两组标本 C4—T1 脊髓节段切成 50 μ m 厚的连续冰冻横切片。37 $^{\circ}$ C 下在 0.1% X-gal 溶液内孵育 4h, 出现蓝染的细胞为 X-gal 染色阳性, 说明被转基因产物 β -半乳糖苷酶 (β -glycosidase, β -gal) 所标记。挑选有阳性反应的切片贴片、中性红复染、光镜下观察不同时间点细胞形态并计数阳性细胞数量。

1.4 DRGs 及臂丛神经整体标本 X-gal 染色

37 $^{\circ}$ C 下将 C4—T1 节段的 DRGs 连同臂丛神经在 0.1% X-gal 溶液内孵育 12h, 然后经甘油逐级透明, 在实体显微镜下观察蓝染出现在 DRGs 神经元、整个神经丛的范围、时间及其神经吻合口的情况。

1.5 DRGs 纵切片及阳性细胞计数

将 DRGs 与臂丛或骶丛神经根分离, 以琼脂包埋, 用震动切片机切成 40 μ m 厚的连续纵切片, 贴片后光镜下计数阳性细胞数量。

1.6 统计学分析

为了避免对相邻切片上被切开的神经元的重复计数, 可在计数后用 Abercrombie 方法校正^[2]。应用 Stata7.0 软件包, 所得数据用均数 \pm 标准差表示, 组间行成组比较 *t* 检验。P<0.05 为有显著性意义。

2 结果

AdLacZ 特异性标记了转染同侧的正中神经和尺神经及其神经根、感觉和运动神经元, 没有发现标记物跨突触传递。

2.1 转基因产物 β -gal 标记脊髓神经元情况

光镜下观察两组脊髓切片, 被标记的细胞为脊髓前角运动神经元, 24h 内细胞蓝染主要限于胞体, 但以后多数细胞胞体和突起都被蓝染 (图 1, 见前置彩色插页 5)。最早观察到被标记细胞的时间在转染

后 16h, 以后阳性细胞数逐渐增多。尺神经组: 在转染后第 2d 达高峰, 高峰期持续至第 5d, 以后逐渐下降, 在转染后 3 周左右消失。所标记的神经元在 C7—T1 节段, 集中在 C8—T1 节段。正中神经组: 在转染后第 3d 达高峰, 高峰期持续至第 7d, 以后逐渐下降, 在转染后 3 周左右消失。所标记的神经元分别在 C6—T1 节段, 但多集中在 C8 节段。高峰期间正中神经组所标记的运动神经元数高于尺神经组 (P<0.05) (表 1)。

表 1 转基因表达高峰期 X-gal 染色的阳性神经元数目 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

时间	正中神经组		尺神经组	
	运动神经元数	感觉神经元数	运动神经元数	感觉神经元数
第 2 天	52.00 \pm 3.30	173.83 \pm 4.91 ^①	39.17 \pm 5.50 ^②	141.83 \pm 14.65 ^①
第 3 天	110.33 \pm 5.85	190.33 \pm 7.33 ^①	67.33 \pm 8.87 ^②	129.00 \pm 12.47 ^{①②}
第 4 天	130.17 \pm 10.47	198.00 \pm 11.47 ^①	70.50 \pm 7.73 ^②	135.33 \pm 9.99 ^{①②}
第 5 天	132.33 \pm 10.00	194.50 \pm 11.06 ^①	44.17 \pm 7.51 ^②	150.00 \pm 15.66 ^{①②}
第 6 天	138.50 \pm 11.06	217.83 \pm 16.71 ^①	22.83 \pm 3.47 ^②	184.83 \pm 16.69 ^①
第 7 天	117.50 \pm 10.83	154.50 \pm 11.50 ^①	23.67 \pm 4.15 ^②	141.00 \pm 12.45 ^①
第 8 天	81.67 \pm 11.93	144.83 \pm 15.20 ^①	11.00 \pm 3.18 ^②	122.16 \pm 9.47 ^①

①相同时间点组内比较 P<0.05; ②相同时间点组间同种神经元比较 P<0.05

2.2 转基因产物 β -gal 标记 DRGs 神经元情况

光镜下观察两组 DRGs 切片, 被标记的细胞为 DRGs 感觉神经元 (图 2, 见前置彩色插页 5)。最早观察到被标记细胞的时间在转染后 12h, 以后阳性细胞数逐渐增多。尺神经组: 至转染后第 2 天达高峰, 高峰期持续至第 8 天, 以后逐渐下降, 在转染后 5 周左右消失。所标记的神经元在 C7—T1 节段, 较集中在 C8 节段。正中神经组: 至转染后第 2 天达高峰, 高峰期持续至第 7 天, 以后逐渐下降, 在转染后 5 周左右消失。由正中神经标记的神经元在 C6—T1 节段, 较集中在 C7—C8 节段。高峰期间两组所标记的感觉神经元数均高于运动神经元数 (P<0.05), 正中神经组所标记 DRGs 感觉神经元数高于尺神经组 (P<0.05) (表 1)。

2.3 DRGs 及臂丛神经整体标本标记情况

两组体视显微镜下观察可见 DRGs、根丝、前后根、脊神经、神经干及神经吻合口近远端在病毒转染后由近及远顺序被标记。从神经干导入载体部位至根丝入脊髓部位的距离平均 26mm, 至 DRGs 的距离平均 23mm。转染后 3d 可见已经有少数轴突由根丝顺行标记至神经吻合口部位, 术后 8d 可见到吻合口远端再生轴突被标记, 6 周后神经干蓝染消失。由尺神经转染的标本, 被标记的轴突由 C7—T1 节段发出, 其中 C8、T1 神经根染色最深 (图 3, 见前置彩色插页 5)。由正中神经转染的标本, 被标记的轴突由 C6—T1 节段发出, 其中 C7、C8 神经根染色最深 (图 4, 见前置彩色插页 5)。

3 讨论

本实验从臂丛神经的终末支正中神经、尺神经导入 AdV 携带的 LacZ 基因, 远距离特异、高效逆行示踪其靶神经元; 又顺行标记其周围神经轴突直至吻合口远端, 这在以前未见报道。其机制如下: 首先 AdLacZ 由神经断端摄入, 逆行传递至该神经的脊髓前角运动神经元和 DRGs 感觉神经元, 报告基因 LacZ 在神经元内表达产生 β -gal 蛋白存在于胞浆, 并顺轴浆流输送到神经元突起及轴突^[3], 通过组化染色 β -gal 蛋白显示蓝色, 从而标记神经元及其轴突。

文献报道指出, 从神经干导入病毒载体到其靶神经元最早被标记的时间, 包括病毒载体逆行输送到神经元所需时间加上转基因产物 β -gal 在神经元内合成所需时间^[3]。本实验结果显示 DRG 感觉神经元和脊髓前角运动神经元分别在转染后 12h 和 16h 被标记, 从病毒载体导入部位至上述相应神经元的距离平均为 23mm, 26mm, 而输送亚细胞颗粒的快速轴浆运输的速度为 16mm/h。这样我们推测仅利用轴浆运输机制不足以在上述时间内将载体输送到神经元, 而是神经的损伤加速了轴浆运输速度^[4]。在基因表达高峰期正中神经组被标记的运动或感觉神经元数均高于尺神经组, 而且每组内所标记的感觉神经元数多于运动神经元数。这可能是由于正中神经的靶神经元总数高于尺神经, 而且正中神经和尺神经的感觉神经元数多于运动神经元^[5-6]。

实验结果显示, 转基因表达在神经元和周围神经内逐渐减少, 数周后消失。一些研究已证实炎症和免疫反应是转基因表达消失的原因之一^[7]。近年来的研究显示 CNS 的细胞特别是神经元, 其 MHC 分子表达水平很低; 而且由于血-脑屏障及血-脊髓屏障的作用, 使炎症细胞因子、白细胞和抗体进入脑组织受到限制, 这就造成了 CNS 与外周器官的免疫环境不同, 使 CNS 对外来抗原的免疫应答比其他器官弱^[8]。有文献报道将含外源性基因的 AdV 注入大脑实质, 转基因表达可持续数周直至数月; 而注入脑室后, 就被特异性免疫系统识别, 转基因表达在数周内被清除^[9]。本实验中转染时将病毒载体附着在臂丛神经近断端, 在这一操作过程中有少量病毒黏附在神经周围软组织或直接进入血循环, 这样有可能诱导系统性免疫应答, 而导致转基因表达在数周内的消失。

本研究采用的是远距离投入示踪剂的方法, 与直接脊髓实质内或硬膜腔内注射相比, 具有操作简便快捷, 不需要暴露脊髓和神经节, 脊髓局部炎症反应轻, 无神经元损害, 且转基因表达具有神经元特异

性等特点^[8,10]。有文献报道神经干内注射 Ad 的示踪研究, 但其转基因表达主要局限于注射部位, 被转染的细胞主要是神经外膜的神经膜细胞和间质细胞^[11]。另外, Glatzel 报道肌肉内注射 Ad 后, 无论是该肌肉脊髓靶细胞还是支配该肌肉的神经纤维均未被标记^[11]。近来一些研究应用携带 EGFP 或 LacZ 基因的伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)作为神经通路示踪剂, 由于这种病毒具有跨突触传递的特点, 常用于中枢神经系统特定功能区神经元之间连接的研究^[12-13], 而且感染这种病毒的动物通常几天内死亡, 因此不适合我们的示踪周围神经再生轴突研究。

4 结论

Ad 介导的 LacZ 基因能从远距离特异、高效和安全地逆行标记臂丛神经的靶神经元, 然后又顺行标记臂丛神经终末支。这对研究臂丛神经解剖, 进一步研究周围神经损伤和再生机制有重要应用价值。

参考文献

- [1] 朱家恺. 周围神经损伤诊断与治疗进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(4): 319-323.
- [2] Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections[J]. Anat Rec, 1946, 94: 239-247.
- [3] Terashima T, Miwa A, Kanegae Y, et al. Retrograde and anterograde labeling of cerebellar efferent projection by the injection of recombinant adenoviral vectors into the mouse cerebellar cortex[J]. Anat Embryol (Berl), 1997, 196: 363-382.
- [4] Fournier AE, McKerracher L. Tubulin expression and axonal transport in injured and regeneration neurons in the adult mammalian central nervous system[J]. Biochem Cell Biol, 1995, 73: 659-664.
- [5] Sunderland S. Anatomical features of nerve trunks in relation to nerve injury and nerve repair [J]. Clin Neurosurg, 1970, 17: 38-62.
- [6] 刘志雄, 张伯勋, 主编. 周围神经外科学[M]. 第1版. 北京: 北京科学技术出版社; 2004. 19-23.
- [7] Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms[J]. Gene Therapy, 2004, 11: S10-S17.
- [8] Lowenstein PR, Castro MG. Inflammation and adaptive immune responses to adenoviral vectors injected into the brain: peculiarities, mechanisms, and consequences [J]. Gene Therapy, 2003, 10: 946-954.
- [9] Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, et al. T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases[J]. Brain, 2001, 124: 2203-2214.
- [10] Oulis NM, Bhatia V, Brindle TI, et al. Adenoviral nerve growth factor and beta-galactosidase transfer to spinal cord: a behavioral and histological analysis [J]. J Neurosurg, 1999, 90(1 Suppl): 99-108.
- [11] Latzel M, Flechsig E, Navarro B, et al. Adenoviral and adeno-associated viral transfer of genes to the peripheral nervous system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (1): 442-447.
- [12] Sik A, Cote A, Boldogkoi Z. Selective spread of neurotropic herpesviruses in the rat hippocampus[J]. J Comp Neurol, 2006, 496: 229-243.
- [13] Kerman IA, Akil H, Watson SJ. Rostral elements of sympathetic-motor circuitry: A virally mediated transsynaptic tracing study[J]. J Neurosci, 2006, 26(13): 3423-3433.