

臂丛神经损伤对热休克蛋白和神经型一氧化氮合成酶表达的影响

郑玲玲¹ 吴建中^{1,3} 支 晔² 韦培湧¹ 薛雯娣¹

摘要 目的:观察臂丛神经远侧不同损伤后脊髓前角运动神经元中热休克蛋白 70(Hsp70)、热休克蛋白 27(Hsp27), 以及神经型一氧化氮合成酶(nNOS)的表达变化,探讨其与运动神经元存活和再生的相互关系。**方法:**选用 18 只健康成年雄性 SD 大鼠,随机分为 3 组:肌皮神经切断组、挫伤组和对照组。术后 2 个月进行 Grooming 实验,检测其患肢运动功能的恢复。后取脊髓 C5 节段标本,观察脊髓运动神经元中三种蛋白的表达情况。**结果:**神经切断组和挫伤组的运动功能恢复均较明显,4 级以上的百分比挫伤组(86%)优于切断组(57%)。与对照组相比,两实验组损伤侧脊髓运动神经元中三种蛋白的表达均显著上调。切断组较挫伤组表达较高水平的 Hsp70 ($140.61 \pm 1.25, 130.08 \pm 2.38$)和 Hsp27($143.86 \pm 1.32, 138.93 \pm 1.58$);而 nNOS 蛋白在挫伤组中有较高水平的表达(挫伤组: 106.12 ± 0.91 ;切断组: 68.18 ± 0.63)。**结论:**肌皮神经切断和挫伤后脊髓运动神经元中三种蛋白表达有所不同,其与损伤后功能恢复直接相关。

关键词 肌皮神经; 热休克蛋白; 神经型一氧化氮合成酶; 运动神经元

中图分类号: R743.3, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2008)-08-0729-03

The impact of brachial plexus injury on the expressions of heat shock proteins and neuronal nitric oxide synthase/ZHENG Lingling, WU Jianzhong, ZHI Ye, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23 (8): 729—731

Abstract Objective: To observe the expression changes of Hsp70, Hsp27 and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in spinal motoneurons following different distal injury of brachial plexus and to investigate the correlation of the expression changes and the survival and regeneration of motoneurons. **Method:** A total of eighteen adult male SD rats were randomly divided into three groups: musculocutaneous nerve cut group (n=7), crushed group (n=7) and control group (n=4). Two months later, motor function was assessed by Grooming test standard to evaluate the functional recovery at the experimental side. Then the C5 spinal cord were harvested and immunohistochemical examination were performed. **Result:** In cut group and crushed group, the function recovery were all significant. Moreover, the percentage of above grading 4 in crushed group(86%) was better than in cut group(57%). Compared to control group, the expressions of all the three proteins at motoneurons of experimental side in the two experimental groups increased significantly. The number of Hsp70 and Hsp27 positive motoneurons in cut group ($140.61 \pm 1.25, 130.08 \pm 2.38$) were more than that in crushed group ($143.86 \pm 1.32, 138.93 \pm 1.58$), but the number of nNOS positive motoneurons in crushed group (106.12 ± 0.91) was more than that in cut group (68.18 ± 0.63). **Conclusion:** The expressions of three proteins in spinal motoneurons following musculocutaneous nerve cut and crush lesion were different from the normal, and it were directly correlated with the motor function recovery.

Author's address Dept. of Anatomy, Medical College of Shantou University, Shantou, 515041

Key words musculocutaneous nerve; heat shock protein; neuronal nitric oxide synthase; motoneuron

周围神经损伤后脊髓前角运动神经元出现一系列的病理改变, 神经元中多种蛋白的表达水平发生变化, 有的对神经元具有保护作用, 有的则促进了细胞凋亡。热休克蛋白分子参与了各种缺血损伤时对脑组织的保护作用, 至于在周围神经损伤后它们对于脊髓运动神经元的作用如何, 这方面的报道尚少。对于神经型一氧化氮合成酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 在神经系统损伤的作用研究较多, 但是目前对于其作用还没有一致的看法。本文旨在探讨周围神经损伤后三种蛋白对脊髓运动神经元存

活及再生的作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

1.1.1 试验动物: 选用健康成年雄性 SD 大鼠 18 只 (南方医科大学实验动物中心提供), 体重 250—

1 汕头大学医学院解剖学教研室, 汕头, 515041

2 汕头国际眼科中心

3 通讯作者

作者简介: 郑玲玲, 女, 在读硕士生

收稿日期: 2007-12-14

300g,随机分成肌皮神经切断组(7只)、肌皮神经挫伤组(7只)及对照组(4只)。

1.1.2 试剂:nNOS抗体(兔抗BA0360)、Hsp27抗体(兔抗BA0361)、Hsp70抗体(兔抗BA0928)、即用型SABC免疫组织化学试剂盒(SA1022)、DAB试剂盒(AR1022)均购自武汉博士德公司。

1.2 实验方法

1.2.1 手术操作:将大鼠用盐酸胺碘酮与氯丙嗪1:1混合液(0.2ml/100g体重)腹腔注射麻醉后固定于手术台上,选择右侧为实验侧,术野脱毛消毒。取右侧锁骨下横切口切开皮肤,分离肌肉后暴露臂丛神经,剥离出肌皮神经。切断此神经并在外科手术显微镜下用11号线行断端吻合;挫伤组采用显微镊钳夹肌皮神经30s,显微镜下观察肌皮神经的神经外膜保持连续,而神经纤维断开。对照组中只显露臂丛神经,不造成损伤。术后逐层缝合切口,将大鼠分笼饲养。

1.2.2 取材:术后2个月,将大鼠麻醉打开胸腔,于左心室插管至升主动脉,右心房切开开放血,灌注生理盐水100ml冲洗,而后灌注含4%多聚甲醛的磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH 7.4)500ml固定。取脊髓C5节段后固定,然后置于30%的蔗糖液中过夜。行恒冷箱冰冻切片,片厚30 μ m,收集保存。

1.2.3 SABC法检测Hsp70、Hsp27、nNOS表达:用免疫组织化学技术SABC法检测脊髓运动神经元中Hsp70、Hsp27、nNOS蛋白的表达,操作按说明书进行,阴性对照用PBS代替一抗。计数脊髓C5节段前角中三种蛋白表达阳性运动神经元数。

1.2.4 Grooming实验:采用Bertelli等^[1]方法,观察大鼠屈肘运动恢复程度,了解大鼠肌皮神经的恢复情况。功能等级分5级,达到3级者为恢复良,4级或以上为优。

1.3 统计学分析

采用SPSS13.0统计包,t检验, χ^2 检验, $P<0.05$ 差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Grooming实验检测结果

术后两个月各组大鼠功能恢复等级见表1。结果分析恢复效果优良排列顺序为:切断组<挫伤组<对照组。

表1 术后两个月各组的功能恢复情况 (只)

组别	鼠数	Grooming 测试分级						4级以上 百分比(%)
		5级	4级	3级	2级	1级	0级	
挫伤组	7	2	4	1	0	0	0	86
切断组	7	0	4	3	0	0	0	57
对照组	4	4	0	0	0	0	0	100

2.2 免疫染色结果

与对照组相比,两实验组损伤侧脊髓运动神经元中三种蛋白的表达均显著增强($P<0.01$)。免疫着色位于神经元胞浆和树突(图1,见前置彩色插页6)。免疫阳性神经元形态各异,可见锥体形、三角形、椭圆形等不同染色神经元,损伤侧神经元胞体较对照侧明显增大。Hsp70和Hsp27在神经切断组中的表达强于挫伤组,而nNOS在切断组的表达弱于挫伤组,均具有显著性差异($P<0.01$)。对照组和未损伤侧运动神经元三种蛋白表达无变化,各蛋白在切断组和挫伤组中的阳性神经元数见表2。

表2 Hsp70、Hsp27和nNOS阳性运动神经元细胞数($\bar{x}\pm s$)

组别	Hsp70	Hsp27	NNOS
挫伤组	130.08 $\pm$ 2.38 ^①	138.93 $\pm$ 1.58 ^①	106.12 $\pm$ 0.91 ^①
切断组	140.61 $\pm$ 1.25 ^①	143.86 $\pm$ 1.32 ^①	68.18 $\pm$ 0.63 ^①
对照组	69.48 $\pm$ 1.73	109.05 $\pm$ 2.31	9.00 $\pm$ 0.61

①与对照组相比 $P<0.01$

3 讨论

热休克蛋白是生物细胞在受热和许多损伤因素刺激下发生应激反应时诱导合成的蛋白,它与细胞的许多生理、病理过程密切相关。由于其能提高细胞对应激原的耐受性、分子伴侣作用、参与维持细胞信号传导过程,以及抗细胞凋亡等作用,其对受损细胞有一定的保护作用。在脊髓的神经元中有Hsp70和Hsp27的基础性表达^[2],神经损伤后两种蛋白的表达上调,对受损神经元起到了保护作用^[3-4]。本实验采用肌皮神经不同损伤模型,观察到脊髓运动神经元中同样存在Hsp70和Hsp27的高表达,且神经切断组的表达高于挫伤组,说明损伤越严重两种蛋白的表达越强,这种增强的表达可能进一步增加了对神经元的保护作用。其机制可能包括三个方面:①作为分子伴侣,识别未折叠蛋白,通过使它们保持分解状态阻止细胞内蛋白的聚集反应,从而保护细胞免受应急损伤。②作为凋亡调节分子,抑制了凋亡小体的形成,阻止了各种刺激激发的细胞死亡。Hsp27维持着细胞内氧化还原平衡状态以及线粒体的稳定性,抑制了由反应性氧簇所导致的凋亡^[5]。③Hsp27作为细胞骨架的保护因子^[6],Hsp27的细胞保护作用也涉及细胞骨架活性的调节。在应急时,磷酸化的Hsp27蛋白与微丝相互作用,抑制细胞骨架的紊乱^[7]。在神经损伤晚期(2个月),肌皮神经的功能恢复有赖于受损神经元的存活与再生,Hsp70和Hsp27在损伤早期对脊髓运动神经元起到了保护作用,从而使其能有效地进入到神经再生过程中。是否在后期的再生过程中它们同样起到促进作用,

Hirata^[7]的研究显示,在坐骨神经压伤后 3 周内,在损伤位点的近侧端可见 Hsp27 强阳性的线性结构,且逐渐从近侧断端越过损伤位点到达远侧断端。而且 Hsp27 的这种上调是与胶质纤维酸性蛋白的再表达或中间丝成束数量的增加是同时的,这就说明 Hsp27 参与了周围神经的早期修复再生过程。Hopkins 等^[8]研究也证实,迷走神经损伤后 3 个月 Hsp27 持续存在于运动神经元和侧芽中,提出了其在神经元的长期存活和再生中起作用。我们的实验显示,在损伤后 2 个月,肌皮神经功能已获得较好的恢复,此时脊髓运动神经元中两种热休克蛋白的表达仍然显著高于对照组,而且运动神经元的胞体较大,处于功能活跃状态,说明了热休克蛋白在运动神经元再生中可能起作用。

nNOS 广泛表达于神经系统,其催化产生的 NO 在中枢神经系统发育和神经调控中起重要作用。生理状态下,它在周围神经和中枢神经中均有结构性表达,但是其表达水平较低。在多种损伤模型中其表达水平呈增高趋势,对其表达增高所起的作用尚无定论。多数观点认为 NO/NOS 参与谷氨酸的兴奋性神经毒性作用,导致神经细胞的死亡^[9]。但也有观点认为,神经根撕脱伤后运动神经元 NOS 的表达可能代表了损伤神经元抵抗某种能直接引起神经细胞死亡的未知分子机制^[10]。生理状态下,脊髓运动神经元中 nNOS 不表达或微弱表达。周围神经损伤后,其表达上调,与本实验结果相一致。在肌皮神经损伤后 2 个月依然可见其高表达,此时受损的神经轴突已经发生再生,可以设想 nNOS 参与了周围神经的再生。Liu 等^[11]显示坐骨神经结扎后 2 周时结扎的近端可见大量的 NOS 阳性纤维,4 周时,近侧端仍可见到阳性纤维数的增加,其中一些还越过结扎位点向远端行进。而且在近侧端的强阳性纤维显示出了再生的特性——生长锥的迁移。之后,阳性纤维数开始慢慢下降。这些说明了 NOS 参与了周围神经损伤后的早期神经修复。还有研究显示,NO 供体抑制了缺乏神经营养因子由神经分化的 PC12 细胞的凋亡,加强了神经营养因子诱导神经的生长,而这些作用是通过 cGMP 水平的增高来介导的^[12]。再生轴突中长时间 nNOS 活性的增加维持了鸟苷酸环化酶活性,导致 cGMP 水平的升高,从而促进轴突的生长。Wu 等^[10]提出在神经营养因子被剥夺后 nNOS 可能作为一种神经营养因子的替代。在我们的实验中,肌皮神经挫伤组较切断组表达更高水平的 nNOS,同时此组中神经功能恢复也较好,同样也说明了 nNOS 的促再生作用。

神经损伤后的康复有赖于靶器官的保护、肌萎缩和终板变性的延缓、神经再生的促进、再生神经功能的改善等等^[13]。周围神经损伤后脊髓运动神经元中 Hsp70、Hsp27、nNOS 的高表达促进了神经元的存活及再生,从而改善了损伤后运动功能的恢复。

参考文献

- [1] Bertelli JA, Mira JC. Behavioral evaluating methods in the objective clinical assessment of motor function after experimental brachial plexus reconstruction in the rat [J]. *Neurosci Methods*, 1993, 46(3): 203—208.
- [2] Yamamoto M, Fan L, and Wakayama T, et al. Constitutive expression of the 27-kDa heat-shock protein in neurons and satellite cells in the peripheral nervous system of the rat [J]. *Anat Rec*, 2001, 262(2): 213—220.
- [3] Benn SC, Perrelet D, Kato AC, et al. Hsp27 upregulation and phosphorylation is required for injured sensory and motor neuron survival [J]. *Neuron*, 2002, 36(1): 45—56.
- [4] Kalmar B, Burnstock G, Vrbova G. Upregulation of Heat Shock Proteins Rescues Motoneurons from Axotomy-Induced Cell Death in Neonatal Rats [J]. *Exp Neurol*, 2002, 176(1): 87—97.
- [5] Concannon CG, Gorman AM, Samali A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 61—70.
- [6] Williams KL, Rahimtula M, Mearow KM. Hsp27 and axonal growth in adult sensory neurons in vitro [J]. *BMC Neurosci*, 2005, 6(1):24.
- [7] Hirata K, He J, Hirakawa Y, et al. HSP27 is markedly induced in Schwann cell columns and associated regenerating axons [J]. *Glia*, 2003, 42(1): 1—11.
- [8] Hopkins DA, Plumier JCL and William Currie R. Induction of the 27-kDa Heat Shock Protein (Hsp27) in the Rat Medulla Oblongata after Vagus Nerve Injury [J]. *Exp Neurol*, 1998, 153(2), 173—183.
- [9] Wu W, Chai H, Zhang JY, et al. Delayed implantation of a peripheral nerve graft reduces motoneuron survival but does not affect regeneration following spinal root avulsion in adult rats [J]. *Neurotrauma*, 2004, 21(8):1 050—1058.
- [10] Wu YG, Li YFi, Liu HL, et al. Induction of nitric oxide synthase and motor neuron death in newborn and early postnatal rats following spinal root avulsion [J]. *Neurosci Lett*, 1995, 194(1-2): 109—112.
- [11] Liu W, Hirate K and Kawabuchi M. The occurrence of nitric oxide synthase-containing axonal baskets surrounding large neurons in rat dorsal root ganglia after sciatic nerve ligation [J]. *Arch Histol Cytol*, 2005, 68(1):29—40.
- [12] Hindley S, Juurlink BH, Gysbers JW, et al. Nitric oxide donors enhance neurotrophin induced neurite outgrowth through a cGMP-depedent mechanism [J]. *Neurosci Res*, 1997, 47(4):427—439.
- [13] 田德虎.周围神经损伤与康复 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(2): 9.