

周围神经损伤再生后肌肉 nAChR ϵ 亚单位基因表达的变化

张盈帆¹, 江 华^{1*}, 林子豪¹, 蔡在龙², 吴包金¹

(1. 第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003; 2. 基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**建立肌肉内烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR) ϵ 亚单位 mRNA 表达水平的荧光定量检测方法,观察周围神经损伤后肌肉内 nAChR ϵ 亚单位 mRNA 表达的变化。**方法:**构建克隆载体 pMD18-T- ϵ 作为定量模板,进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 反应,同时测定该法的灵敏性、特异性和重复性。同法检测大鼠股薄肌支配神经损伤修复后不同时间肌肉标本内 nAChR ϵ 亚单位 mRNA 表达的变化。**结果:**用该方法检测 nAChR ϵ 亚单位 mRNA 表达,其线性检测范围为 6 个数量级,最低检测下限为 1×10^2 拷贝,最高检测上限为 1×10^7 拷贝。大鼠股薄肌支配神经损伤后,与对照组相比 ϵ 亚单位 mRNA 表达的拷贝数先增加后减少,在术后第 3 周降到最低后又逐渐增高,但到术后 30 周仍处于低水平($P < 0.01$)。**结论:**采用 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测 nAChR ϵ 亚单位 mRNA 的表达水平具有灵敏度高、特异性强、重复性好、线性检测范围宽的优点。神经损伤再生的晚期 ϵ 亚单位 mRNA 表达水平较损伤前有所降低。

[关键词] 烟碱型乙酰胆碱受体 ϵ 亚单位; 荧光定量逆转录聚合酶链反应; 周围神经损伤; 基因表达和调控

[中图分类号] R 651.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0013-04

Expression of acetylcholine receptor ϵ subunit gene in muscle following nerve injury and regeneration

ZHANG Ying-fan¹, JIANG Hua^{1*}, LIN Zi-hao¹, CAI Zai-long², WU Bao-jin¹ (1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences)

[ABSTRACT] **Objective:** To develop a real-time fluorescent quantitative RT-PCR method for detecting mRNA expression of acetylcholine receptor ϵ subunit based on TaqMan technique, and to detect the changes of ϵ acetylcholine receptor subunit of mRNA expression following nerve injury. **Methods:** TaqMan real-time fluorescent quantitative RT-PCR was set up by using clone vector pMD18-T- ϵ as standard object and its sensitivity, specificity and repetition were all evaluated. The mRNA expression of acetylcholine receptor ϵ subunit in the different period in the gracilis muscle following nerve injury was detected with the above method. **Results:** The dynamic range of the assay varied from 10^2 to 10^7 copies. After nerve injury the expression of ϵ subunit first increased and then decreased compared with the control. Three weeks after injury, the copies of mRNA expression of ϵ AChR subunit were reduced to the lowest level and then increased gradually. At 30 weeks the expression of ϵ subunit in the reinnervated muscle remained lower than the control ($P < 0.01$). **Conclusion:** The detection of mRNA expression of ϵ acetylcholine receptor subunit by TaqMan real-time fluorescent quantitative RT-PCR is accurate, sensitive, specific and time-saving. The decline in nAChR number following nerve injury may be attributed to mRNA expression changes of ϵ AChR subunit.

[KEY WORDS] nAChR ϵ subunit; real-time fluorescent quantitative RT-PCR; peripheral nerve injury; gene expression and regulation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 13-16]

周围神经损伤在临床上常见。随着显微外科技术的发展,损伤神经修复的实验研究和临床应用都取得很大进展,但治疗效果仍不令人满意。以往的研究认为再生神经纤维的数量是影响肌肉功能恢复的主要因素^[1],而最新的研究发现神经再生后运动终板区烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)的数量也影响到肌肉功能最终的恢复^[2,3]。从结构上看,nAChR 是一种杂合五聚体蛋白,按 ϵ 和 γ 亚单位组成的不同分为成熟型受体 ϵ -AChR($\alpha_2 \beta \epsilon \delta$)和胚胎型受体 γ -AChR($\alpha_2 \beta \gamma \delta$)。由于 γ -AChR 只在胚胎期和肌肉失神经后表达,出生后正常有神经支配

的或者损伤后获得神经再生支配的运动终板只表达成熟型受体 ϵ -AChR^[4]。因此,神经再生后终板区 nAChR 数量的减少即是 ϵ -AChR 数量的减少。对 ϵ 亚单位 mRNA 水平进行定量分析,有助于从基因水平探讨 ϵ -AChR 受体减少的原因,为进一步研究调控 ϵ -AChR 的表达打下基础。本研究旨在利用实时荧光定量 RT-PCR 技术,建立检测 nAChR

[基金项目] 上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养基金(1999076);上海市科技发展基金(024119057)。

[作者简介] 张盈帆(1977-),男(汉族),博士生。

* Corresponding author. E-mail: dosjh@sh163c.sta.net.cn

ε亚单位mRNA的新方法,并应用该方法测定大鼠股薄肌支配神经损伤修复后不同时间肌肉样本内nAChR-ε亚单位mRNA表达的变化。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组 3~4周的雌性SD大鼠42只,体质量230~270g。大鼠随机分为未接受手术的正常对照组以及神经损伤修复术后的1、2、4、10、20、30周组共7组,每组6只。大鼠腹腔注射3.0%戊巴比妥麻醉(剂量按0.1ml/100g),分离暴露双侧股薄肌,在距支配神经(闭孔神经分支)入肌点0.5cm处切断神经,在显微镜下以11-0丝线缝合神经外膜,缝合伤口。术后按术前设计的时间点收取双侧肌肉标本(即每组12个标本),液氮中冻存。

1.2 总RNA的提取及逆转录反应 肌肉样本采用TRIzol Reagent总RNA抽提试剂盒(上海华舜生物公司)进行抽提,提取总RNA经电泳鉴定其完整性。经260nm及280nm光密度值计算所获RNA的含量及纯度,逆转录操作按Superscript II(Gibco BRL公司)提供操作说明书进行,所得cDNA于-20℃保存。

1.3 pMD18-T-ε载体构建及标准品的制备 利用大鼠股薄肌总RNA按一步法RT-PCR(TaKaRa Biocatalog)扩增特异性ε基因片段(392~540bp,长149bp),上游引物序列:5'-GTC TGA CTG GGT GCG TAT GGG-3',下游引物:5'-CAC GGT GGG TAG GGG AGA TC-3',扩增产物经胶回收后纯化,装入pMD18-T载体,测序证明确实含有ε基因149bp目的片段。重组T载体经碱裂解法抽提及PEG纯化后,以260nm光密度值测定含量,根据载体分子量计算其拷贝数,以10倍进行连续稀释,得到每毫升拷贝数分别为10⁹、10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹的样品,作为实时荧光定量RT-PCR的定量标准品。

1.4 TaqMan探针及内参照 ε目的基因片段探针由上海申友生物技术公司设计及合成,序列为5'-FAM-CAG CGT TGG TGC TCT TCA GCG TCG G-TAMRA-3'。β-actin作为内源性参照物,上游引物:5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3',下游引物:5'-CCA TTG GCA ATG AGC GGT TCC GCT G-3',探针序列为5'-FAM -ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT-TAMRA-3',均由上海申友生物技术公司提供。

1.5 TaqMan实时荧光定量RT-PCR反应 PCR反应体系总量为50μl:1×PCR buffer, 2.5

mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 400 nmol/L上、下游引物, 400 nmol/L TaqMan探针, 1 μl Taq酶,反应程序:94℃ 5 min, 93℃ 30 s, 55℃ 15 s, 70℃ 15 s循环30次, 70℃ 5 min。PCR反应和数据获取均应用PE-5700型荧光定量PCR仪。

1.6 标准曲线的建立及方法线性检测范围、特异性、灵敏度的检测 将梯度稀释的定量标准品加样后在PE-5700型荧光定量PCR仪上进行扩增反应,产物进行琼脂糖电泳,部分产物于联合基因公司3700型测序仪进行测序。本研究设定大于30个循环仍无荧光信号增强为阴性样本,当以标准品进行10倍连续稀释,最低可检测的样本拷贝数即为方法测定的灵敏度,调整优化实验条件得到定量标准曲线。

1.7 定量检测 采用实时荧光定量RT-PCR方法,定量检测各时间点肌肉样本内ε mRNA及β-actin mRNA,测得ε mRNA拷贝数后通过内参β-actin mRNA表达的拷贝数进行修正。

1.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对测定结果采用t检验分析。

2 结果

2.1 标准曲线的建立及方法线性检测范围 该方法线性检测范围可达6个数量级,最高检测上限为10⁷拷贝的标准品,最低检测下限为10²拷贝,建立模板拷贝数和阈循环数(threshold cycle, Ct值)之间的定量标准曲线,直线回归相关系数r=-0.998~-0.999,斜率为-3.1~-3.6(图1)。

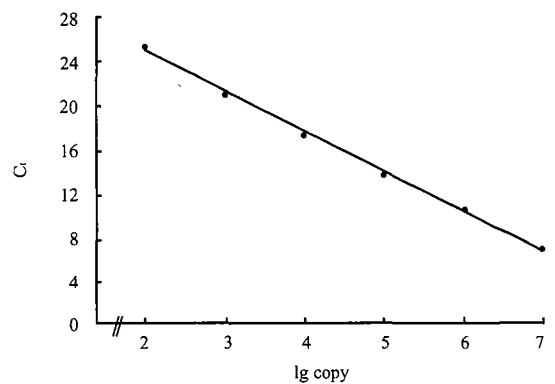


图1 ε亚单位定量检测标准曲线

Fig 1 Quantitative standard curves of ε subunit

2.2 TaqMan实时荧光定量RT-PCR方法特异性、灵敏度的检测 将拷贝数分别为10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷的标准品进行PCR反应,扩增产物分别行琼脂糖电泳(图2)以及测序鉴定,电泳结果显示扩

增出的条带分子量与 ϵ 基因目的条带相符, 联合基因公司 3700 型测序仪进行测序, 结果与 ϵ 基因目的片段一致, 保证了方法的特异性。当以标准品进行 10 倍连续稀释, 最低可检测的样本为 10^2 拷贝, 即该方法的灵敏度为 100 拷贝。

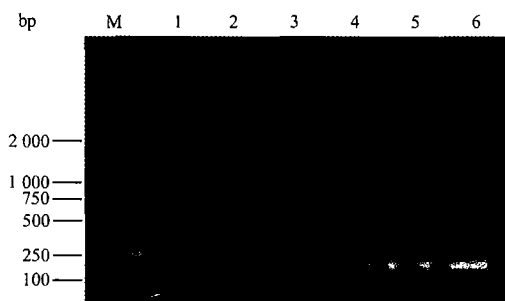


图 2 ϵ 标准品荧光定量 RT-PCR 产物电泳图
Fig 2 Electrophoretic product of ϵ standard object following real-time fluorescent quantitative RT-PCR
M: Marker; 1-6: 10^2 - 10^7 copies standard object respectively

2.3 方法的重复性 将 6 个不同稀释度的标准品 ($10^2 \sim 10^7$ 拷贝) 分 5 批次进行检测, 以拷贝数得其批间变异 (CV) 分别为 39.8%、29.9%、18.6%、12.5%、10.8%、36.1%; 将上述标准品一式三份检测, 以拷贝数得其批内 CV 分别为 46.2%、32.9%、23.3%、13.5%、8.1%、21.3%; 为观察实际样本批间与批内变异, 我们选择高值样本 15.1×10^5 拷贝,

中值样本 5.02×10^5 拷贝, 低值样本 0.55×10^5 拷贝按上述方法检测, 以实测拷贝数统计其批间 CV 为 33.1%、27.8%、40.7%, 批内 CV 为 10.2%、8.6%、17.5%。

2.4 测定 ϵ 亚单位 mRNA 的拷贝数 取全部样本的 cDNA 进行荧光定量 RT-PCR 测定, 测得 ϵ 亚单位 mRNA 拷贝数后, 通过内参 β -actin 的含量对其进行修正, 结果发现在神经损伤再生的过程中, ϵ 亚单位基因的表达发生动态的变化。损伤后 1 周, ϵ 亚单位 mRNA 拷贝数为 $(7.74 \pm 2.13) \times 10^5$ /mg RNA, 与对照组 [$(5.35 \pm 0.74) \times 10^5$ /mg RNA] 相比有所增强; 随后表达减少, 到第 3 周时降到 $(1.30 \pm 0.30) \times 10^5$ /mg RNA; 后又逐渐上升, 第 6 周时约为 $(1.91 \pm 0.77) \times 10^5$ /mg RNA, 到术后 10 周左右时, 增长接近一个平台期, 为 $(2.85 \pm 0.48) \times 10^5$ /mg RNA; 修复术后 30 周, ϵ 亚单位 mRNA 的拷贝数约为 $(3.55 \pm 1.61) \times 10^5$ /mg RNA, 仍低于正常对照组的水平 ($P < 0.01$), 但与 20 周 [$(3.21 \pm 0.66) \times 10^5$ /mg RNA] 和 10 周时的结果无显著性差异。另取部分样本 RT-PCR 扩增产物进行琼脂糖电泳 (图 3), 结果显示虽然扩增出的条带相对分子量与 ϵ 基因目的条带 149 bp 相符, 但终产物的量不能反映各组样本之间 ϵ 亚单位 mRNA 拷贝数之间的相对关系。

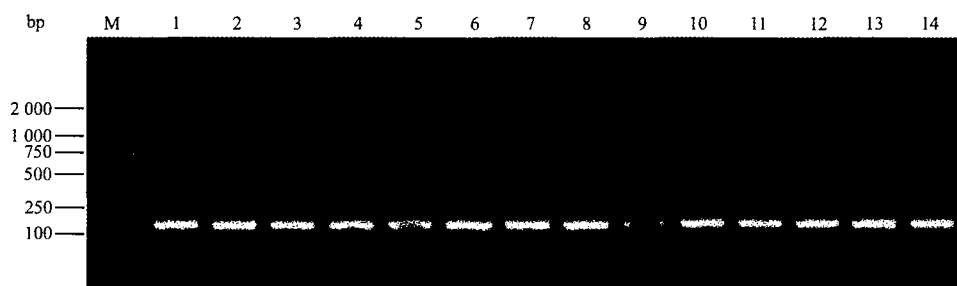


图 3 各组标本 RT-PCR 扩增产物电泳结果
Fig 3 RT-PCR results of muscle specimen in all groups
M: DL2000 DNA Ladder; 1, 2: Control; 3, 4: 1 week post-operation; 5, 6: 3 weeks post-operation; 7, 8: 6 weeks post-operation; 9, 10: 10 weeks post-operation; 11, 12: 20 weeks post-operation; 13, 14: 30 weeks post-operation

3 讨论

在具有神经支配的动物骨骼肌内, 位于神经肌肉接头突触后膜即运动终板上的 ϵ -AChR, 直接参与介导神经肌肉间的兴奋传递, 进而引起肌肉的收缩, 因此终板区保持一定数量的 ϵ -AChR 对肌肉完成正常收缩功能有十分重要的意义^[5]。近期的研究

发现, 周围神经损伤后神经再生的晚期, 终板区 nAChR (ϵ -AChR) 的数量低于损伤前的水平, 而这种改变与肌肉功能恢复不良有关^[2,3]。

为进一步在基因水平上探讨受体减少的原因, 本实验利用 PE-5700 荧光定量 PCR 仪, 设计特异的 TaqMan 荧光探针, 成功的建立了检测 AChR- ϵ mRNA 表达水平的荧光定量方法, 该方法灵敏度高

(最低可检测 100 个拷贝 mRNA 的表达)、特异性强、重复性好,且线性检测范围宽(6 个数量级范围)。

测定结果发现,在神经损伤后的再生过程中, ϵ 亚单位基因的表达发生动态的变化,与对照组相比,损伤修复术后 30 周, ϵ 亚单位 mRNA 的拷贝数仍低于正常对照组($P < 0.01$),与 20 周和 10 周时的结果无显著性差异。但据文献报道,周围神经损伤再生后,应用 Northern 杂交检测到 ϵ 亚单位 mRNA 表达恢复到损伤前的正常水平^[6]。我们认为出现这种差异可能主要是由于检测方法不同所致,荧光定量 PCR 方法较 Northern 杂交更为敏感,能检测出样本之间微小的差异^[7,8],而 TaqMan 探针的应用更增强了 PCR 的特异性。因此,以 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 法检测 ϵ 亚单位 mRNA 水平优于以往的半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交,结果更为可靠。

参照郑宏良等^[3]对神经损伤后再生过程中终板区 nAChR 数量变化的研究结果发现, ϵ 亚单位 mRNA 水平与终板区 nAChR (主要是 ϵ -AChR)数量之间大致相似的变化趋势,并且到术后晚期 ϵ 亚单位 mRNA 水平与受体数量均恢复不到术前的水平。结合 Witzemann 等^[9]的研究结果,进一步证明除外其他环节的影响因素外, ϵ 亚单位的变化主要受到 ϵ 基因转录水平的调控。因此,损伤神经再生后 ϵ 亚单位 mRNA 表达的减少,可能是 ϵ -AChR 受体数量不能恢复的重要原因。由于神经再生后肌肉 nAChR 受体数量恢复程度决定肌肉功能的恢复,所以 ϵ 亚单位基因表达的减少也间接影响了肌肉功能的恢复。另据文献报道^[10], ϵ 亚单位基因表达的突变是临床上乙酰胆碱受体缺乏症的最常见的病因,以终板电位和微终板电位的减小为主要电生理改变,临床症状表现为易疲劳型的肌肉功能减退。因而检测 ϵ 亚单位基因表达也可作为判断肌肉功能恢复的一个指标。迄今的研究认为 ϵ 亚单位基因在转录水平上主要受到神经末梢及其释放因子(包括乙酰胆碱受体活性因子 ARIA、聚集蛋白 agrin 等)的调控激活^[11,12],而受肌电活动的影响相对较小。这

提示,损伤神经再生后期,受体 ϵ 亚单位基因转录水平的降低可能主要和再生的神经数量或神经末梢释放的神经源性因子减少有关。

[参考文献]

- [1] Cederna PS, Youssef MKH, Asato H, *et al.* Skeletal muscle re-innervation by reduced axonal numbers results in whole muscle force deficits[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 105(6): 2003-2009.
 - [2] Hua J, Samuel TS, Kumar VP. Qualitative and quantitative changes in acetylcholine receptor distribution at the neuromuscular junction following free muscle transfer [J]. *Muscle Nerve*, 2002, 25(3): 427-432.
 - [3] 郑宏良,周水森,颜永碧,等. 周围神经再生时乙酰胆碱受体免疫电镜与肌功能观察[J]. *中华显微外科杂志*, 2000, 23(1): 42-45.
 - [4] Bouzat C, Bren N, Sine SM. Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors[J]. *Neuron*, 1994, 13(6): 1395-1402.
 - [5] Schwarz H, Giese G, Muller H, *et al.* Different functions of fetal and adult AChR subtypes for the formation and maintenance of neuromuscular synapses revealed in epsilon-subunit deficient mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(9): 3107-3116.
 - [6] Martinou JC, Merlie JP. Nerve-dependent modulation of acetylcholine receptor epsilon-subunit gene expression[J]. *J Neurosci*, 1991, 11(5): 1291-1299.
 - [7] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, *et al.* Real time quantitative PCR[J]. *Genome Res*, 1996, 6(10): 986-994.
 - [8] 杨佳葵,沈茜. TaqMan 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测新型趋化因子巨噬细胞炎症蛋白-2 γ mRNA 表达水平[J]. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(5): 290-292.
 - [9] Witzemann V, Brenner HR, Sakmann B. Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses[J]. *J Cell Biol*, 1991, 114(1): 125-141.
 - [10] Cossins J, Webster R, Maxwell S, *et al.* A mouse model of AChR deficiency syndrome with a phenotype reflecting the human condition[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(23): 2947-2957.
 - [11] Meier T, Masciulli F, Moore C, *et al.* Agrin can mediate acetylcholine receptor gene expression in muscle by aggregation of muscle-derived neuregulins[J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(3): 715-726.
 - [12] Won S, Si J, Colledge M, *et al.* Neuregulin-increased expression of acetylcholine receptor epsilon-subunit gene requires erbB interaction with Shc[J]. *J Neurochem*, 1999, 73(6): 2358-2368.
- [收稿日期] 2004-07-15 [修回日期] 2004-11-19
[本文编辑] 贾泽军,孙岩