

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01150

腺病毒介导的碱性成纤维细胞生长因子促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复

Adenovirus-mediated FGF-2 gene promotes motor function of rats with spinal cord injury

杨彦玲*

延安大学医学院生理学教研室,延安 716000

[摘要] **目的** 观察腺病毒(Adts)介导碱性成纤维细胞生长因子2(FGF-2)直接体内转基因对大鼠脊髓损伤的治疗作用。**方法** 将SD大鼠在T₁₀水平制备脊髓损伤模型,随机分为体内转基因治疗组和损伤对照组,用携带FGF-2和绿色荧光蛋白(GFP)的Adts行直接体内转基因治疗;荧光显微镜观察体内转基因表达,后肢运动功能评分(BBB评分)检测大鼠运动功能恢复情况,EC染色观察损伤后脊髓灰质和白质残存组织的体积变化。**结果** BBB评分检测到体内转基因治疗组大鼠后肢运动功能有明显恢复,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);体内转基因治疗组脊髓灰质残存组织的体积明显增加,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 由Adts介导FGF-2的直接体内转基因治疗能够明显促进损伤脊髓的功能恢复。

[关键词] 脊髓损伤;成纤维细胞生长因子2;腺病毒载体;基因疗法

[中图分类号] R 744 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2011)10-1150-03

脊髓损伤(SCI)是中枢神经系统的严重创伤,因高致残率和高病死率一直成为医学研究的热门课题。碱性成纤维细胞生长因子2(basic fibroblast growth factor, FGF-2)是一种对神经细胞的生长、发育、分化及再生起重要调节作用的蛋白质,对细胞有强烈的促进增殖和有丝分裂作用,对脊髓损伤的再生和修复具有重要作用,并且在脊髓损伤早期所起作用更显著^[1-3]。但由于FGF-2相对分子质量较大,不能透过血脑屏障,且半衰期短,一直无法应用于临床。基因治疗SCI是一种新型的治疗方法,通过转基因技术可使被转染的细胞不断分泌FGF-2,保护神经元、促进轴突再生和神经功能恢复,能起到长期的效果。然而,FGF-2基因治疗对SCI后神经功能恢复的影响及其机制的实验研究目前少见报道。本实验通过基因治疗的常用载体腺病毒^[4]介导FGF-2基因转染至大鼠脊髓损伤局部,观察FGF-2基因在体内的表达及其对脊髓损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物和载体 雌性成年SD大鼠32只,体质量200~220 g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。分笼饲养,自由摄食及饮水,室温25℃。携带小鼠FGF-2 cDNA表达片段的复制缺陷型重组腺病毒载体由Doc. Smith(美国肯塔基州大学)惠赠。

1.2 脊髓损伤模型的制备 SD大鼠用80 mg/kg氯胺酮和赛拉嗪10 mg/kg进行腹腔麻醉,角膜上涂上人工眼泪保持眼睛湿润。俯卧位,背部剃毛备皮,乙醇碘酒消毒,铺一次性无菌单。以T₁₀棘突为中心作长约3 cm切口暴露硬脊膜。用PSI Infinite Horizon Impactor制备脊髓急性打击伤动物

模型,损伤力度200 kdynes/cm² (2×10^{-3} N),造成大鼠脊髓不完全损伤,致伤后迅速移开打击物。模型成功的判定标准:打击后,损伤处脊髓出血、水肿,大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩样扑动,麻醉清醒后双下肢呈弛缓性瘫痪。

1.3 腺病毒载体转染脊髓 损伤完成后迅速利用纳升微量注射器和微电极推进器在损伤部位尾端左侧和右侧注射不同滴度的FGF-2 Adts和GFP Adts,其中FGF-2 Adts高滴度组(1.27×10^7 pfu/rat),FGF-2 Adts中等滴度组(6.37×10^6 pfu/rat),FGF-2 Adts低滴度组(3.18×10^6 pfu/rat),绿色荧光蛋白GFP Adts(5.9×10^7 pfu/rat)。微注射器插入脊髓组织0.6 mm,每次注射50 nl,共10次,注射完后,让毛细玻璃管在组织中保留2 min,使病毒均匀扩散。左侧完成后,以同样的方法进行右侧注射,总共注射1 μ l病毒。用无菌的生理盐水冲洗伤口后,可吸收肠线缝合肌层,伤口夹子钳夹皮层。术后护理:皮下注射33.3 mg/kg头孢唑啉注射液和20 ml Ringer液,2次/d,持续3~5 d;每日膀胱按摩2次至自主排尿反射建立。电热毯加热,分笼饲养,自由取食,每天更换1次垫料保持干燥。2周后乙醚麻醉大鼠,去掉伤口夹子。注射1周后,采取心脏灌注固定法,取脊髓组织,倒置荧光显微镜下对标记的FGF-2蛋白的细胞进行观察,发现注射局部灰质和白质胶质细胞内均有荧光蛋白表达。在病毒注射部位及邻近部位(尤其在距离注射部位3~4 mm范围内),有较多的体内细胞表达绿色荧光,距离注射部位越远,表达荧光的细胞越少,但在距离注射部位7~8 mm脊髓内仍可见表达绿色荧光的细胞,说明腺病毒载体已转染入脊髓。

1.4 运动功能评估 采用BBB分级法^[5]对4组动物后肢运

[收稿日期] 2011-06-14 **[接受日期]** 2011-09-06

[基金项目] 陕西省教育厅项目(08JK161)。Supported by Project of Education Department of Shannxi Province(08JK161)。

[作者简介] 杨彦玲,硕士,副教授。

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 0911-2416666, E-mail: yangyanling8889@163.com

动功能进行评估。评分标准: 第一步, 评判动物后肢各关节活动; 第二步, 评判动物后肢的步态和协调功能; 第三步, 评估动物运动时爪子的精细运动, 3 项满分 21 分。BBB 亚评分用于后肢精细运动功能的评分, 满分为 7 分。运动功能评估于转基因后 3~4 d、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周进行, 共 7 次。采用双盲法, 每次评分由经培训后的 2 人分别独立完成, 取平均值。

1.5 组织学检测 在转基因治疗 6 周后采取心脏灌注固定法, 在戊巴比妥钠 150 mg/kg 深度麻醉下开胸, 经左心室插管至升主动脉, 剪开右心耳, 先用 4℃ 0.1 mol/L PBS 快速灌注 5 min。再以 4℃ 含 4% 多聚甲醛灌注约 200 ml, 持续 15 min。灌注完毕, 立即再次打开脊髓, 取脊髓组织 3 cm (以损伤中心上下各 1.5 cm), 多聚甲醛固定 4~6 h。0.2 mol/L PBS 过夜, 20% 蔗糖固定 24~48 h, 包埋, 做连续冰冻切片, 片厚约 20 μm, -20℃ 冷冻备用。

将自然干燥的切片置于由 2 ml 10% FeCl₃、40 ml 0.2% 铬花青 (eriochrome cyanine, EC) 和 0.5% H₂SO₄ 加纯水至 50 ml 的溶液中 10 min, 洗片, 置于 0.5% NH₄OH 1.5 min, 洗片, 脱水后盖玻片封胶。神经髓鞘和灰质的神经胞体染色呈阳性染色, 蓝色, 当 SCI 后轴突变性、坏死, 组织结构紊乱

萎缩, 几乎见不到正常的细胞结构。用赛恩图像分析系统和 Olympus E400 显微镜分析图像, 测量损伤组织和残存组织的面积 (s), 根据切片的距离 (d), 估计损伤和残存组织的体积 (V): $V = s \times d$ 。

1.6 统计学处理 采用 StatView 4.5.3 统计软件包对数据进行处理, 组间差异的比较采用单因素方差分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 运动功能情况 所有大鼠在脊髓损伤后 3~4 d 的 BBB 评分均为 0 分左右; 随后后肢的运动功能逐渐恢复, 约 28 d 后, 对照组、低滴度组和高滴度组后肢的恢复均出现平台期, 而 FGF-2 中滴度组的 BBB 评分持续稳定增加, 且与 GFP 对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1A)。BBB 亚评分用来分析后肢的精细运动功能 (如爪子的位置、掌心的悬空等), 实验结果显示: 在损伤后 6 周, 所有 FGF-2 治疗组 BBB 亚评分都逐渐增加, 所有的 FGF-2 治疗组的 BBB 亚评分明显高于 GFP 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1B)。这说明腺病毒介导的 FGF-2 有效促进了 SCI 大鼠后肢功能恢复。

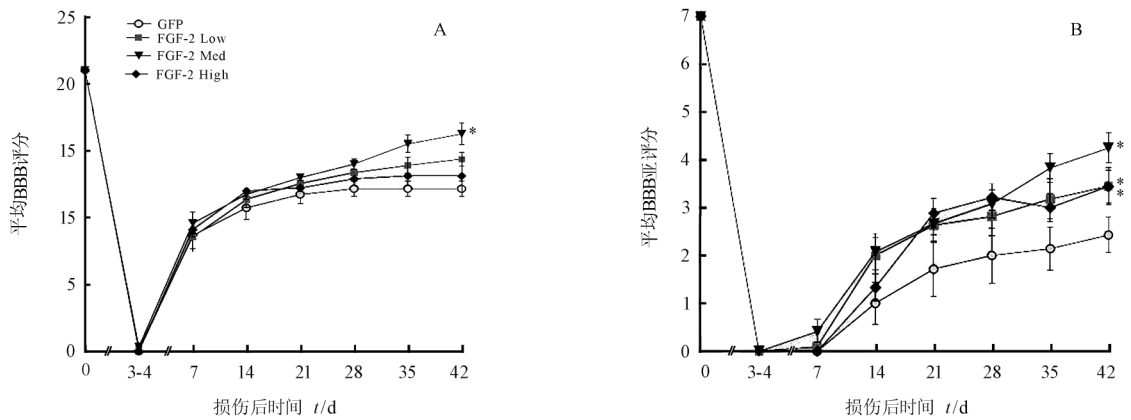


图 1 脊髓损伤后不同时间平均 BBB 评分 (A) 和 BBB 亚评分 (B)

* $P < 0.05$ 与 GFP 对照组相比; $n = 8, \bar{x} \pm s$

2.2 脊髓损伤组织和残存组织的体积变化 损伤区所有浓度的 FGF-2 转基因治疗组损伤组织的体积明显减小, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2A)。所有浓度的

FGF-2 转基因治疗组灰质残存组织体积明显增加, 与 GFP 对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2B); 但白质残存组织体积在各组间差异无统计学意义 (图 2C)。

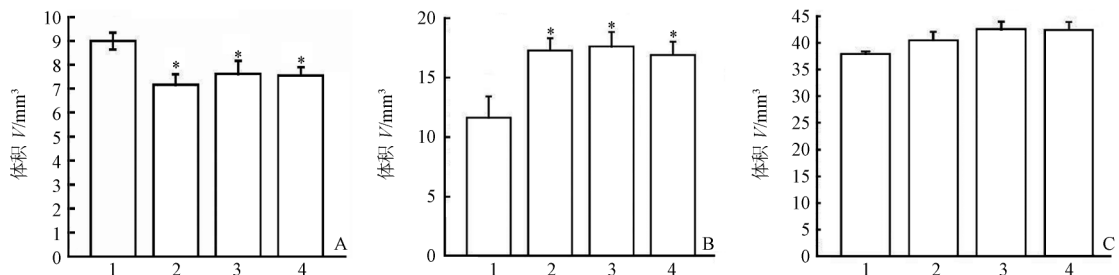


图 2 FGF-2 对脊髓损伤体积和残存组织体积的影响

1: GFP 对照组; 2: FGF-2 低滴度组; 3: FGF-2 中滴度组; 4: FGF-2 高滴度组。A: 脊髓损伤体积; B: 灰质残存组织体积; C: 白质残存组织体积。* $P < 0.05$ 与 GFP 对照组相比; $n = 8, \bar{x} \pm s$

3 讨论

FGF-2生物学作用极其广泛,它在胚胎发育、血管生成、促进创伤愈合与组织修复、促进组织再生及神经系统生长发育等许多方面发挥着重要的生物学调节作用。另外,FGF-2神经活性广泛,是一种对神经细胞的生长、发育、分化及再生起重要调节作用的蛋白质,对细胞有强烈的促进增殖和有丝分裂作用。Rabchevsky等^[6]选用蛛网膜下隙置管,微量泵连续1周给予外源性 FGF-2 的干预方法研究脊髓损伤大鼠,通过6周的观察,发现大鼠运动功能有明显恢复。这说明外源性 FGF-2 对脊髓损伤大鼠神经功能的恢复有确切作用。Meijs等^[7]在行雪旺细胞移植治疗胸髓横断伤时,发现给予外源性 FGF-2 者损伤周围轴突的再生情况比未给予外源性 FGF-2 者明显要好,说明外源性 FGF-2 可促进脊髓损伤后轴突的再生。这些研究表明 FGF-2 可以保护脊髓神经组织、促进神经纤维再生,其机制可能为:(1)促进轴突再生;(2)促进雪旺细胞增殖;(3)促进血管发生,改善血供微循环等;(4)通过增强 bcl-2 基因表达及抑制 c-fos 基因的表达来有效地调控细胞凋亡;(5)FGF 稳定细胞钙离子水平^[8-9]。

但由于 FGF-2 相对分子质量较大,不能透过血脑屏障,且半衰期短,一直无法应用于临床。基因治疗 SCI 是一种新型的治疗方法,通过转基因技术可使被转染的细胞不断分泌 FGF-2,保护神经元、促进轴突再生和神经功能恢复,能起到长期的效果。本研究旨在应用复制缺陷腺病毒,把 FGF-2 基因移植至动物体内,以足量分泌 FGF-2 因子,改善脊髓损伤微环境,支持和保护神经元,达到治疗的目的。

直接将载体引入靶组织的注射法是一种切实可行的简便方法。本实验作为转基因治疗脊髓损伤的初步研究,利用复制缺陷腺病毒载体将外源性 FGF-2 基因直接引入脊髓,可有效地感染脊髓组织和表达报告基因。由于实验条件所限,本研究未能同步检测 FGF-2 在脊髓损伤组织中的表达。实验结果提示,将 FGF-2 基因直接转染至损伤部位后 1~6 周,损伤大鼠后肢运动功能评分较 GFP 对照组明显增高,6 周后治疗组脊髓损伤组织的体积明显减小而脊髓灰质残存组织的体积明显增加,与对照组相比差异有统计学意义。由此说明,腺病毒介导 FGF-2 体内转基因治疗创伤性 SCI 的方法是

可行的,且由腺病毒介导 FGF-2 的直接体内转基因治疗能够明显促进损伤脊髓的功能恢复。

[参考文献]

- [1] Walicke P A. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions[J]. *J Neurosci*,1998,8:2618-2627.
- [2] Yabe J T, Wang F S, Chylinski T, Katchmar T, Shea T B. Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*,2001,50:1-12.
- [3] Brundin P, Karlsson J, Engård M, Schierle G S, Hansson O, Petersén A, et al. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons; a review over current approaches[J]. *Cell Transplant*,2000,9:179-195.
- [4] Douglas J T. Adenoviral vectors for gene therapy[J]. *Mol Biotechnol*,2007,36:71-80.
- [5] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*,1995,12:1-21.
- [6] Rabchevsky A G, Fugaccia I, Fletcher-Turner A, Blades D A, Mattson M P, Scheff S W. Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances tissue sparing and functional recovery following moderate spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*,1999,16:817-830.
- [7] Meijs M F, Timmers L, Pearce D D, Tresco P A, Bates M L, Joosten E A, et al. Basic fibroblast growth factor promotes neuronal survival but not behavioral recovery in the transected and Schwann cell implanted rat thoracic spinal cord[J]. *J Neurotrauma*,2004,21:1415-1430.
- [8] 王 锋,刘文革. bFGF 在脊髓损伤中保护机制的研究[J]. *医学综述*,2007,13:812-814.
- [9] Lanzetta M, Gal A, Wright B, Owen E. Effect of FK506 and basic fibroblast growth factor on nerve regeneration using a polytetrafluoroethylene chamber for nerve repair[J]. *Int Surg*,2003,88:47-51.

[本文编辑] 孙 岩