

·基础研究·

大鼠坐骨神经损伤对脊髓原蛋白转化酶Furin及脑源性神经营养因子表达的影响

作者单位

武汉大学人民医院

a.骨科 b.神经内科

武汉 430060

基金项目

国家自然科学基金

(No.81501053)

收稿日期

2018-07-12

通讯作者

陈燕

chenyanzn@sina.

com

张向阳^a,刘世清^a,陈燕^b

摘要 目的:观察大鼠坐骨神经损伤对相应节段脊髓原蛋白转化酶Furin及脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法**:20只成年雄性SD大鼠随机分为假手术组5只和损伤组15只。采用钳夹法制备坐骨神经损伤模型,假手术组不造成坐骨神经损伤。取L5节段脊髓,通过蛋白印迹及免疫荧光观察Furin、BDNF的表达。**结果**:与假手术组相比,损伤组在损伤后第7天、第14天,BDNF和Furin差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01)。**结论**:Furin可能介导坐骨神经损伤后脊髓BDNF上调过程。

关键词 脑源性神经营养因子;坐骨神经损伤;脊髓;原蛋白转化酶

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.03.009

张向阳,刘世清,陈燕.大鼠坐骨神经损伤对脊髓原蛋白转化酶Furin及脑源性神经营养因子表达的影响[J].神经损伤与功能重建,2019,14(3):138-139,160.

周围神经损伤后可上调各种神经营养因子表达以促进神经修复。其中对脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的研究较多^[1,2]。BDNF具有保护神经元、促进轴突再生的作用。以往的研究虽然已经发现在坐骨神经损伤时内源性BDNF表达上调,但上调机制并不清楚。并且BDNF在神经环路中存在复杂的运输过程,周围神经损伤时其对应的远隔部位脊髓参与其修复调节过程^[3,4]。原蛋白转化酶Furin在神经系统表达丰富,并参与BDNF的成熟过程。研究证实BDNF的成熟过程中,Furin的切割在调控形成具有生物活性的BDNF量中起关键作用^[5]。并且笔者的前期研究发现Furin在急性缺血缺氧病理过程中介导星形胶质细胞内BDNF的分泌成熟过程^[6]。因此本研究进一步观察大鼠坐骨神经损伤后脊髓的Furin及BDNF表达变化,以探索周围神经损伤后神经内源性修复机制,期望为周围神经损伤临床治疗提供潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠20只,体质量200~250 g,由湖北省疾控中心提供。在温度20℃~25℃,湿度50%~60%,维持12 h光照12 h黑暗昼夜光变化规律下饲养。

1.1.2 主要试剂及仪器 Furin及BDNF抗体(购于美国Abcam公司);体视显微镜(购于日本Nikon公司);低温高速离心机;组织研磨器(购于天津天波玻璃仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠分组及坐骨神经损伤模型制备 实验动物按随机数字表法分为假手术组5只和损伤组15只,损伤组于损伤后第3天、第7天、第14天分别取材,每个时间点5只。采用臀部肌肉注射麻醉,无菌

条件下于股骨中段后外方2 cm处做平行于股骨的纵行切口,沿股二头肌与半膜肌之间钝性分离,暴露坐骨神经。假手术组仅分离、暴露坐骨神经后逐层缝合。损伤组于梨状肌下缘15 cm处由同一人用同一把直血管钳完全闭合钳夹坐骨神经10 s,钳夹损伤长度为3 mm。用1-0无损伤缝线标记损伤部位神经外膜,等渗盐水冲洗伤口,然后逐层关闭切口,常规饲养。

1.2.2 BDNF、Furin的免疫荧光观察 分别处死各组大鼠,大鼠以1%戊巴比妥钠腹腔麻醉下开胸,经左心室灌注肝素化生理盐水150 mL(200 U/100 mL),同时剪开右心耳放血,待放出血液无色时灌注4%多聚甲醛0.1 mol/L磷酸缓冲(pH=7.4)300 mL固定,取出L5节段脊髓,常规固定、石蜡包埋制片,横向切片,片厚4 μm,然后进行BDNF、Furin的免疫荧光检测。

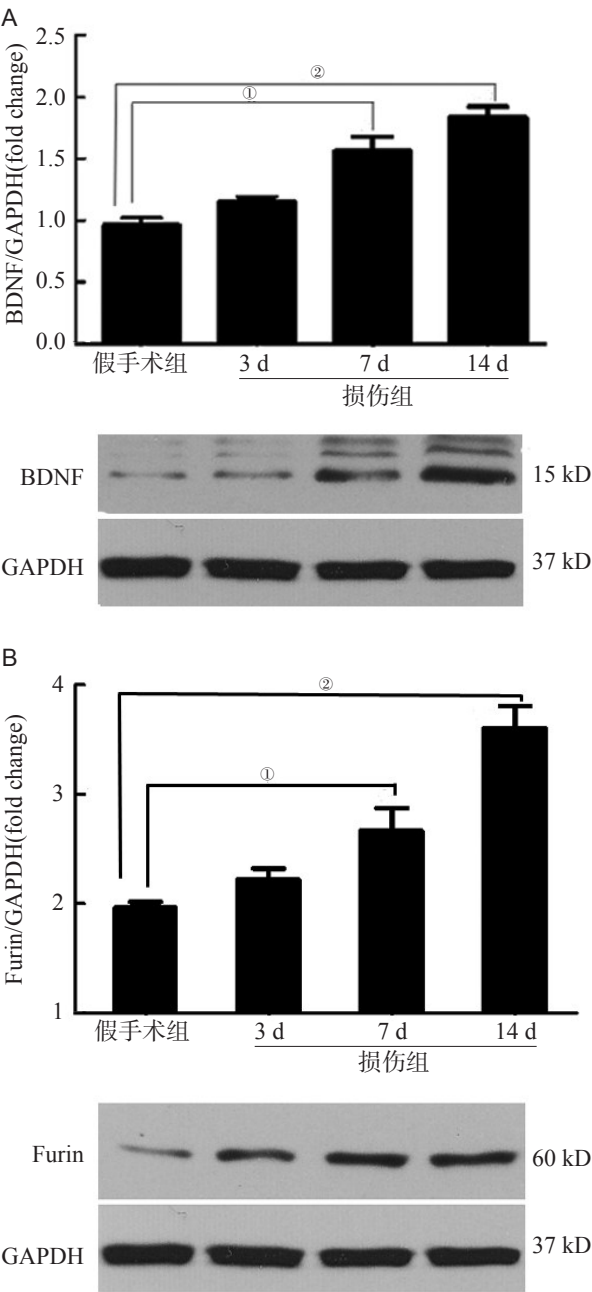
1.2.3 BDNF、Furin的免疫印迹观察 分别处死各组大鼠,暴露L5节段脊髓,体式显微镜下剥离周围结缔组织,称取湿重,按照200 mg组织加入1 mL组织裂解液,以组织研磨器进行组织匀浆,收集匀浆液并离心(2 500 r/min 20 min),取匀浆上清。然后进行蛋白定量(BCA Assay,购于碧云天公司,按试剂盒说明操作),用12% SDS-PAGE分离目的蛋白Furin、BDNF,以管家蛋白GAPDH校正上样量。将需检测蛋白标本上样,电泳,转膜,封闭,孵抗体。各抗体稀释度依次为:抗Furin抗体、抗BDNF多克隆抗体(1:1 000),二抗(1:3 000),内参GAPDH(1:5 000)。ECL发光试剂发光、显影、定影,Bio-Rad凝胶成像系统采集图像。检测重复3次。

1.3 统计学处理

采用SPSS11.0软件处理数据,采用GraphPad 10.0绘制统计图表。Furin、BDNF蛋白表达变化以假手术组为基数,计算其变化倍数,然后根据3次独立试验的倍数均数和标准差进行t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

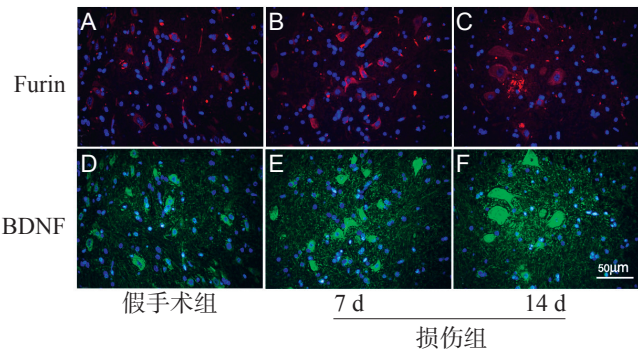
2 结果

坐骨损伤后 BDNF、Furin 的表达随着观察时间延长逐步上调。损伤组在损伤后第 3 天 BDNF 的表达已上调,但与假手术组相比差异无统计学意义($P>0.05$);损伤后第 7、14 天,损伤组的 BDNF 水平明显高于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01),见图 1A。在损伤后第 3 天损伤组的 Furin 的表达已经上调,但与假手术组相比差异无统计学意义($P>0.05$);损伤后第 7、14 天,损伤组的 Furin 水平表达进一步上调,与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01),见图 1B。在坐骨神经损伤后第 7 天及第 14 天,与假手术组相比,损伤组的 BDNF、Furin 荧光强度增强,见图 2。



注:随着时间延长,损伤组的 BDNF 和 Furin 表达逐步上调,并且在损伤第 7 天、第 14 天,与假手术组相比差异有统计学意义。与假手术组比较,① $P<0.05$,② $P<0.01$

图 1 2 组 BDNF(A)和 Furin(B)表达的动态变化



注:在损伤后第 7 天、第 14 天,损伤组的 BDNF 及 Furin 的荧光强度与假手术组相比增强。Furin 为红色荧光, BDNF 为绿色荧光, 细胞核为蓝色荧光

图 2 2 组损伤后 L5 脊髓节段 BDNF 及 Furin 的免疫荧光染色

3 讨论

周围神经损伤后存在一定自身再生修复过程,其中神经营养因子发挥重要作用^[7]。除局部神经组织本身内源性的神经营养因子参与外,其远隔部位的神经组织分泌的神经营养因子也可能间接参与修复过程^[8,9]。并且研究已经发现周围神经损伤时, BDNF 在背根神经节中表达上调^[10]。但是在周围神经损伤时对应节段脊髓的 BDNF 表达变化到目前为止并不清楚。因此本研究观察坐骨神经损伤后对应脊髓节段内 BDNF 表达变化。免疫印迹结果表明坐骨神经损伤后 BDNF 表达随着观察时间延长呈逐步上调。在损伤后第 7 天、第 14 天损伤组的 BDNF 有明显的上调,与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01)。以往研究发现周围神经损伤时,相应脊髓节段会发生重要的变化^[2,11],脊髓与周围神经间存在重要的信号交流。因此笔者推测脊髓内的上调 BDNF 可能参与坐骨神经损伤修复过程。根据以往的研究提示坐骨神经损伤时参与神经内源性修复的脊髓节段主要在 L5 节段^[12],因此本研究重点观察 L5 节段内 Furin 及 BDNF 的表达变化。

本研究虽然发现坐骨神经损伤时对应节段脊髓总体 BDNF 表达上调,但未具体明确到何种细胞分泌的 BDNF 表达上调。神经损伤时 BDNF 主要来源于星形胶质细胞。激活的星形胶质细胞上调 BDNF 的表达,分泌的 BDNF 与神经元表面 TrKB 结合促进神经元生存,调节突触可塑性。另外以往的研究已发现在慢性周围神经痛时脊髓的小胶质细胞释放 BDNF 增加^[13]。因此笔者推测坐骨神经损伤时脊髓的 BDNF 上调可能主要来源于小胶质细胞。脊髓内神经元的 BDNF 荧光强度增强,因此提示在周围神经损伤时对应节段脊髓内神经元也积极参与神经内源性修复过程。

Furin 是原蛋白转化酶家族成员之一。研究已表明 Furin 是 BDNF 细胞内分泌通路上的关键性切割酶,并且 BDNF 前体蛋白经 Furin 切割后形成具有生物活性的成熟 BDNF。在急性缺氧病理中 Furin 表达上调^[14]。坐骨神经损伤时脊髓 BDNF 的表达上调,笔者推测其关键性的内切酶可能会同步上调,本研究中 Furin 呈逐步上调,其变化趋势与 BDNF 一致。因此,笔者推断 Furin 可能介导坐骨神经损伤时对应节段脊髓内 BDNF 的上调过程。在将来的实验中拟通过体外细胞培养模型进一步证实这一结论。

(下转第 160 页)

CSS的主要临床表现,发生率在65%~92%,多数文献报道在70%左右^[3],最常见的表现形式为多发性单神经炎。此患者感觉症状明显,电生理检查显示感觉与运动神经受累程度大致相当,均以动作电位波幅下降为主,甚至不能引出波形。神经传导速度轻度下降,神经轴索变性呈现多灶性分布,与国外报道的下肢以腓肠神经,上肢以尺神经最常受累高度一致^[4]。此例患者误诊原因分析如下:①对该病的认识不足是造成误诊最主要原因,因患者临床哮喘不明显,无皮疹及发热,只着眼于周围神经病,未把发病前期的一过性过敏性鼻炎、皮疹、低热一并分析;②询问病史不详,没有注意询问发病前1月感冒的具体表现、发作诱因及个人过敏史;③对辅助检查结果分析不透,肌电图提示患者以不对称性感觉纤维受累为主,不符合吉兰-巴雷综合征对称的以运动纤维受累为主表现。

CSS的治疗主要应用糖皮质激素,急性活动期可根据病情采用足量激素甚至大剂量甲强龙冲击治疗,病情稳定后逐渐减量,尤其有肺、肾脏损害需联合免疫抑制剂治疗,环磷酰胺为首选药物;亦可应用干扰素或抗肿瘤坏死因子抗体,如英利昔单抗、依那西普等。该病例对激素效果显著,这也进一步证明AGA这个诊断。近年来静脉用免疫球蛋白治疗逐渐得到重视,2014年一项多中心双盲试验显示,对即使实验室指标显示疾病已缓解的患者,静脉注射免疫球蛋白治疗CSS残留周围神经病仍然有效,显著提高患者生活质量^[5],本例患者应用激素的同时应用丙种球蛋白,患者感觉异常明显减轻。有文献报道,CSS的总体预后与受累器官有关。病情严重程度可通过法国血管炎研究组织(French vasculitis study group)制定的五因子评分(Five Factor Score,

FFS)评分标准判断^[6]:蛋白尿>1 g/d;肾衰竭(血肌酐>140 μmol/L);心肌梗死;消化道症状;中枢神经系统受累。FFS=0时,5年病死率为12%;FFS=1时,5年病死率为26%;FFS>2时,5年病死率为46%。此患者FFS为0,预后相对较好,需长期随访。

总之,CSS的临床表现缺乏特异性,可累及多系统器官,目前治疗首选激素,总体预后与受累器官直接相关,对临床上以周围神经病为首发症状的患者,特别是当单肢不对称起病且感觉异常突出时,如同时合并哮喘,应高度警惕CSS的可能,及早行血涂片和组织活检可协助诊断及及时诊疗,改善预后。

参考文献

- [1] Natsugoe S, Matsumoto M, Okumura H, et al. Initial metastatic, including micrometastatic, sites of lymph nodes in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2014, 89: 6-11.
- [2] Masi AT, Hunder GG, Lie JT, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis)[J]. Arthritis Rheum, 1990, 33: 1094.
- [3] Pankhurst T, Savage CO. Pathogenic role of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in vasculitis[J]. Curr Opin Pharmacol, 2016, 6: 190-199.
- [4] Stassijns G, Vanderstraeten G, Troise WR, et al. Neuropathy associated with Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatous angiitis)[J]. Electrophysiol Clin Neurophysiol, 2014, 34: 391-395.
- [5] Koike H, Akiyama K, Saito T. Intravenous immunoglobulin for chronic residual peripheral neuropathy in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss syndrome): a multicenter, double-blind trial[J]. J Neurol, 2015, 262: 11-15.
- [6] Guillevin L. Advances in the treatments of systemic vasculitides[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 35: 72-78.

(本文编辑:王晶)

(上接第139页)

综上所述,本研究初步观察坐骨神经损伤后对应节段脊髓Furin、BDNF的动态表达变化,研究结果提示Furin可能参与坐骨神经损伤时脊髓内的BDNF上调过程,在一定程度揭示周围神经损伤时神经内源性修复机制。该研究结果为临床促进神经修复治疗提供一个潜在的治疗靶点。

参考文献

- [1] Sumizono M, Sakakima H, Otsuka S, et al. The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model[J]. J Pain Res, 2018, 11: 281-291.
- [2] Richner M, Ulrichsen M, Elmegaard SL, et al. Peripheral nerve injury modulates neurotrophin signaling in the peripheral and central nervous system[J]. Mol Neurobiol, 2014, 50: 945-970.
- [3] Zvarova K, Murray E, Vizzard MA. Changes in galanin immunoreactivity in rat lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia after spinal cord injury[J]. J Comp Neurol, 2004, 475: 590-603.
- [4] Starkey ML, Davies M, Yip PK, et al. Expression of the regeneration-associated protein SPRR1A in primary sensory neurons and spinal cord of the adult mouse following peripheral and central injury[J]. J Comp Neurol, 2009, 513: 51-68.
- [5] Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, et al. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases[J]. FEBS Lett, 1996, 379: 247-250.
- [6] Chen Y, Zhang J, Deng M. Furin mediates brain-derived neurotrophic

factor upregulation in cultured rat astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation[J]. J Neurosci Res, 2015, 93: 189-194.

- [7] Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, et al. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12: 4171-4180.
- [8] 汪晶,朱青,胡波,等.中枢神经系统损伤后修复的内在机制研究[J].神经损伤与功能重建, 2015, 10: 145-147.
- [9] 王选,雷晓婷,丁新生.脊髓损伤后几类促神经修复分子作用机制研究进展[J].神经损伤与功能重建, 2009, 4: 131-132.
- [10] Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model[J]. J Neurosci, 2001, 21: 4891-4900.
- [11] Lu VB, Biggs JE, Stebbing MJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury[J]. J Physiol, 2009, 587: 1013-1032.
- [12] Keast JR, Forrest SL, Osborne PB. Sciatic nerve injury in adult rats causes distinct changes in the central projections of sensory neurons expressing different glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors[J]. J Comp Neurol, 2010, 518: 3024-3045.
- [13] Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2003, 23: 4017-4022.
- [14] McMahon S, Grondin F, McDonald PP, et al. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 6561-6569.

(本文编辑:王晶)