

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.11.002

促红细胞生成素经超声微泡介导治疗大鼠 损伤面神经的研究*

苏俊波, 骆文龙[△], 郝亚宁, 王德平, 刘 进

(重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010)

摘要:目的 探讨超声微泡介导促红细胞生成素(EPO)基因修复大鼠受损面神经模型的可行性及有效性。方法 选取40只SD大鼠制作面神经损伤模型,随机分为4组,每组10只。A组为EPO+超声组,B组为EPO+微泡组,C组为EPO+超声+微泡组,D组为单纯手术组(PBS)。于EPO基因转染后第1,7,14,28天,观察各组大鼠一般状况,检测损伤面神经传导速度、潜伏期及动作电位波幅。提取损伤处面神经组织,采用RT-PCR检测EPO mRNA的表达。结果 转染后第14天,C组大鼠术侧有少量胡须可观察到细微摆动;转染后第28天,C组大鼠一般状况较A组、B组、D组恢复得更好,C组面神经损伤后修复的神经电生理表现优于A组、B组、D组,C组中EPO mRNA表达量明显高于A组、B组、D组($P < 0.05$)。结论 超声微泡介导EPO基因有助于面神经损伤的修复。

关键词:促红细胞生成素;超声微泡;面神经损伤

中图分类号:R965.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)11-0005-03

Study on Erythropoietin Mediated by Ultrasound Microbubble for Treating Injured Facial Nerve of Rats

Su Junbo, Luo Wenlong, Hao Yaning, Wang Deping, Liu Jin

(The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400010)

Abstract: Objective To investigate the feasibility and efficacy of erythropoietin(EPO) gene mediated by ultrasound microbubble for treating injured facial nerve of rats models. **Methods** Totally 40 rats models of facial nerve injury were selected and divided into 4 groups, 10 cases in each group. Group A: EPO and ultrasound(EPO + US) group, group B: EPO and microbubble (EPO + MB) group, group C: EPO + ultrasound + microbubble(EPO + MB/US) group, group D: PBS group. On the first, seventh, fourteenth, twenty-eighth day after EPO gene transfection, the general condition of rats in each group was observed, and the nerve conduction velocity(NCV), potential latency and action potential amplitude of injured facial nerve were detected. The injured facial nerve tissue was taken and the expression of EPO mRNA was detected by RT-PCR. **Results** On the fourteenth day after EPO gene transfection, there was a few beard could be observed in fine wobble on the rats' operated side in group C. On the twenty-eighth day after EPO gene transfection, the general condition of rats in group C recovered better compared with group A, B, D. The nerve electrophysiological expression of injured facial nerve in group C was better than that of group A, B, D. The expression level of EPO mRNA in group C was significantly higher than that of group A, B, D($P < 0.05$). **Conclusion** EPO gene mediated by ultrasound microbubble is helpful for repairing and regeneration of the injured facial nerve.

Key words: erythropoietin; ultrasound microbubble; facial nerve injury

面神经是支配面部表情肌的混合神经,若受损易致面瘫,损伤后的修复是多学科合作的重要研究领域。近年来,学者们逐渐认识到神经生长微环境的重要性,并发现了多种神经营养因子,其中促红细胞生成素(EPO)主要由肾脏合成,有促进红细胞生成作用^[1]。EPO及其受体在神经系统广泛分布,具有抗凋亡、抗炎、促进神经营养因子释放和神经再生等作用^[2]。但EPO在人体内降解较快,全身给药神经营养效果不佳。微泡造影剂利用超声波与微泡造影剂相互作用所产生的生物学效应,可实现靶向治疗。本研究中运用超声靶向微泡(UTMD)介导EPO基因治疗大鼠面神经损伤,观察治疗后EPO基因mRNA转录水平及治疗效果,为研究和评价超声

靶向微泡介导的面神经基因转染提供可靠依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:超声转染仪,BL-6420C型生物信号采集与处理系统及脂质微泡(白色冻干粉末状)由重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所提供。

试剂:EPO液由重庆医科大学附属第二医院肝病研究治疗中心提供,PT-PCR引物,Trizol试剂由武汉谷歌生物科技有限公司提供。

实验动物:清洁级成年健康SD大鼠(雌雄不限),40只,体质量220~230g,许可证号为SCXK(渝)2012-

*基金项目:重庆市教育委员会科学技术研究项目[KJ1600219]。

第一作者:苏俊波,男,硕士研究生,讲师,研究方向为耳鼻咽喉头颈外科学,(电话)023-63693582(电子信箱)498799425@qq.com。

[△]通信作者:骆文龙,男,博士研究生,教授,研究方向为耳鼻咽喉头颈外科学,(电话)023-63693593(电子信箱)luowenlong163@163.com。

0001,由重庆医科大学动物实验中心提供,遵循实验动物伦理学原则进行处置。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取

EPO 液经大肠杆菌扩增 16 h 后,提取纯化,经酶切电泳鉴定,紫外分光光度计测定质量浓度为 1 g/L。

1.2.2 脂质微泡与 EPO 基因的结合

脂质微泡中加入 2 mL 生理盐水混合摇匀,微泡直径 3~5 μm ,浓度 $0.5 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^8/\text{mL}$ 。加入含 EPO 基因溶液(质粒质量浓度为 1 g/L)0.5 mL,混匀,室温下静置 30 min,使基因充分黏附,检测混合液中质粒质量浓度为 0.2 g/L。

1.2.3 动物模型制作

采用 5% 戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉大鼠,局部注射 5% 利多卡因追加麻醉;在手术显微镜下切开大鼠右侧颞骨骨泡,用磨钻磨去面神经镫骨肌支骨管约 3 mm,蚊式钳钳夹面神经干长约 2 mm,力量为三扣,持续 60 s,松开 30 s,再钳夹 60 s,手术显微镜观察,面神经损伤程度为束膜性神经中断,符合 Sunderland 损伤 IV 度^[3],缝合皮肤。各大鼠术后混合饲养。

1.2.4 动物分组及给药

应用随机数字表法将面神经损伤大鼠分为 4 组,每组 10 只。A 组:EPO + 超声组,经股静脉插管注入含 EPO 0.2 mg 基因溶液 1 mL,并使用超声转染仪紧贴大鼠面神经受损部位体外照射,功率 0.75 W/cm²,频率 1 MHz,照射 10 s,间隔 10 s,共 2 min;B 组:EPO + 微泡组,经股静脉注入载基因微泡溶液 1 mL;C 组:EPO + 超声 + 微泡组,注入载基因微泡溶液 1 mL,再用超声触发,参数同 A 组;D 组:单纯手术组,输入 1 mL PBS 作为对照。

1.2.5 一般状况观察

于面神经损伤后第 1,7,14,28 天观察每组大鼠进食、活动、眼部闭合、鼻尖偏向、胡须摆动、局部皮肤肌肉情况。

1.2.6 神经电生理检测

面神经损伤后第 28 天,以 10% 水合氯醛麻醉大鼠并固定,将记录电极插入面神经支配的面颊肌,电极间距约为 4~6 mm,深度为(4±1)mm。针灸针刺激电极分插至神经损伤处近中枢段和外周端肌肉,采用 BL-6420C 型生物信号采集与处理系统,以波宽 1 ms 的正方波刺激,频率 60 Hz,电流从 0 mA 开始,至出现动作电位。测定面神经动作电位波幅、潜伏期及传导速度。

1.2.7 标本采集

面神经损伤大鼠模型经基因转染 28 d 后,以 10% 水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠;采用升主动脉插管,剪开右心耳;快速灌注生理盐水 300 mL,至右

心耳流出血液完全变清;立即用 4% 多聚甲醛 PBS 液,先后慢灌注约 250 mL,直至大鼠四肢僵硬。切取损伤处神经组织约 1 mm。

1.2.8 损伤面神经组织中 EPO 基因 mRNA 转录的检测

采用 PT-PCR 法,引物由武汉谷歌生物科技有限公司提供,根据 GenBank 中登录的 EPO 基因合成。提取损伤处面神经组织 RNA(Trizol 试剂),以合成的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增(反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s,共 35 个循环)。mRNA 水平用 β -actin 作为内标,以扩增倍数 = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示基因相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差表示,多个样本均数间两两比较行 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况

各组大鼠术后无死亡,切口无感染。面神经损伤后第 1 天,每组大鼠均出现饮食降低,活动范围缩小。损伤侧胡须倒伏、无摆动,鼻尖左偏,无闭眼;转染后第 7 天,各组大鼠胡须摆动情况较第 1 天无好转,组间无显著差别;损伤后第 14 天,A 组、B 组、D 组大鼠仍无明显变化,C 组大鼠术侧有少量胡须可观察到细微摆动,鼻尖仍向左偏,有上睑细微运动;术后第 28 天,A 组、B 组、D 组大鼠术侧胡须较前有明显恢复,A 组大鼠胡须部分向前竖起,但摆动无力,鼻尖稍偏左,右眼闭合不完全,C 组大鼠术侧胡须可见有力的节律性摆动,鼻尖基本居中,右眼可闭合,肌肉萎缩较其余组大鼠程度轻。

2.2 神经电生理检测指标

C 组大鼠面神经动作电位波幅和面神经传导速度高于 A 组、B 组、D 组,潜伏期低于其余 3 组($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠转染后第 28 天损伤面神经电生理检测指标比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	面神经传导速度 (m/s)	潜伏期 (ms)	面神经动作电位波幅 (μV)
A 组	14.8 ± 0.3	8.8 ± 0.2	7.6 ± 0.4
B 组	14.0 ± 0.2	9.7 ± 0.3	5.6 ± 0.5
C 组	17.8 ± 0.3	7.9 ± 0.5	11.0 ± 0.8
D 组	13.9 ± 0.4	10.6 ± 0.3	5.4 ± 0.6

2.3 大鼠损伤处神经组织中 EPO mRNA 转录水平

C 组大鼠面神经损伤处 EPO mRNA 表达量明显高于 A 组、B 组、D 组($P < 0.05$)。详见图 1。

3 讨论

面神经从桥脑发出,经过内听道及岩骨中狭长的骨

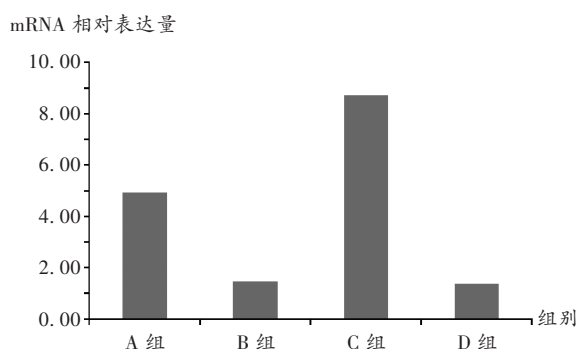


图1 大鼠损伤处神经组织中 EPO 基因 mRNA 转录水平

性管道-面神经管,通过茎乳孔出颅腔,在这之间的任何部位受到损伤,皆可导致部分性或完全性面瘫。目前,面神经损伤的治疗多强调手术修复,但手术治疗存在风险,手术的适应证及获益仍不明确。研究发现,面神经损伤后的功能修复需要神经元胞体的存活和轴突的延伸。远端面肌来源的神经营养因子向神经元胞体逆行性运输发生障碍,使损伤局部神经营养因子缺乏,导致轴突再生的微环境遭到破坏^[4]。此外,损伤细胞凋亡机制参与了面神经元的变性和死亡^[5]。

EPO 已被证实是一种新型的神经营养因子^[6],其与 EPO 受体结合后,使 JAK2 发生自体磷酸化,通过激活磷脂酰肌醇 3,进一步激活 STAT-5。活化的 JAK2 激活 Bcl-2 相关的细胞死亡促进蛋白等底物,发挥抑制凋亡作用;同时,活化的 STAT-5 移至细胞核,刺激线粒体内抗凋亡蛋白的释放,并通过抑制与细胞色素 C 释放有关的基因活性,减少凋亡发生^[7]。

Viviani 等^[8]发现,EPO 能诱导脑源性神经营养因子(BDNF)的表达,而 BDNF 在神经保护作用中也具有重要地位。另外,EPO 能增加星型胶质细胞释放 β -神经生长因子(β -NGF)促进神经元生长。在坐骨神经损伤的动物试验中发现,EPO 组损伤处雪旺氏细胞数量较对照组明显增加,体外试验则发现,EPO 通过激活 JAK2 机制,刺激雪旺细胞增殖^[9]。在自身免疫性脑脊髓炎动物模型中,EPO 可增强少突胶质细胞的增殖和促进髓鞘的再生。本研究中,C 组大鼠的面神经功能恢复较 A 组、B 组、D 组好,术侧胡须摆动、右眼闭合情况及鼻尖位置及均优于 A 组、B 组、D 组;神经电生理方面,C 组大鼠的面神经动作电位波幅、面神经传导速度及潜伏期也明显优于 A 组、B 组、D 组,进一步证实了 EPO 的神经营养作用。

EPO 有促进红细胞生成的作用,全身用药将会引起血液黏稠、血栓形成,甚至产生抗 EPO 抗体,出现纯红细胞再生障碍性贫血。超声微泡作为载体不但可在体循环中减少药品不良反应,提高病变区域的药物浓度,还

可保护基因片段不被清除和降解^[10]。同时,超声微泡作为一种非病毒载体,具有转染效率高、制备简易、无免疫原性等优势^[11]。本研究中 C 组大鼠面神经损伤处 EPO 基因 mRNA 的表达量也显著高于 A 组、B 组、D 组。说明超声微泡造影剂能与目的基因有效结合,将目的基因转染靶组织,为修复受损面神经提供了安全、高效的途径。

综上所述,超声微泡介导 EPO 对受损面神经具有修复作用,为面神经的生物学治疗提供了新方法。

参考文献:

- [1] Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(35): 17156-17163.
- [2] 代喻兵, 骆文龙, 陈红江, 等. 面神经损伤后 rhEPO 对面神经运动神经元的保护作用[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(6): 491-494.
- [3] 任国山, 赵长义, 张喜平, 等. 面神经在不同功能状态下所需神经元的定量分析[J]. 中国临床康复, 2005, 9(25): 40-41.
- [4] 刘 阳, 苏俊波, 骆文龙. 肝细胞生长因子对面神经损伤后运动终板及肌纤维修复作用的研究[J]. 重庆医学, 2004, 33(8): 1231-1233.
- [5] Butler DP, Grobbelaar AO. Facial palsy: what can the multidisciplinary team do? [J]. Journal of multidisciplinary healthcare, 2017, 10: 377-381.
- [6] Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury[J]. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2001, 15(10): 1804-1806.
- [7] Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, et al. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin[J]. Experimental hematology, 2003, 31(4): 290-299.
- [8] Viviani B, Bartsaghi S, Corsini E, et al. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor[J]. Journal of Neurochemistry, 2005, 93(2): 412-421.
- [9] Kang SY, Kang JH, Choi JC, et al. Expression of erythropoietin in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Journal of Clinical Neurology, 2009, 5(1): 39-45.
- [10] Ho YJ, Chang YC, Yeh CK. Improving Nanoparticle Penetration in Tumors by Vascular Disruption with Acoustic Droplet Vaporization[J]. Theranostics, 2016, 6(3): 392-403.
- [11] Sato M, Motoyoshi M, Shinoda M, et al. Noriyoshi Shimizu. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates nerve regeneration following inferior alveolar nerve transection in rats[J]. Eur J Oral Sci, 2016, 124(3): 246-250.

(收稿日期: 2017-12-28; 修回日期: 2018-02-07)