

A 型肉毒素重链干预对大鼠脊髓损伤后生长相关蛋白表达的影响

王亚芳, 兰 婧, 刘 福, 白 娟, 李夏青*

(山西医科大学基础医学院病理生理教研室, 太原 030001)

【摘要】 目的 探讨人工重组 A 型肉毒素重链 (BoNT/A 重链) 对在体大鼠脊髓损伤局部生长相关蛋白表达的影响, 为阐明 BoNT/A 重链促神经突起再生机制提供依据。**方法** 建立大鼠单侧腰段脊髓横断损伤模型并局部及鞘内给予 BoNT/A 重链; 对用药后不同时间局部骨髓组织进行双向电泳检测总体蛋白表达; 选择生长相关蛋白-43 (GAP-43) 和颈上神经节蛋白 10 (SCG 10) 进行蛋白印迹和免疫荧光检测以观察二者在 BoNT/A 重链影响下的表达及分布。**结果** (1) 单侧腰髓离断损伤模型动物呈现明显单侧运动及感觉功能障碍; (2) 脊髓损伤后给予 BoNT/A 重链可影响损伤局部蛋白表达谱变化; BoNT/A 重链可引起损伤局部蛋白点群在变化的基础上逆转或表达进一步增加, 尤以 MW 位于 35 ~ 45 kDa 及 18 ~ 25 kDa、等电点在 5 ~ 7 范围的蛋白点表现明显; (3) 蛋白印迹和免疫荧光染色结果提示: BoNT/A 重链可促进 p-GAP 43 和 SCG 10 的表达 ($P < 0.05$), 且 p-GAP 43 及 SCG 10 主要以损伤周围细胞阳性明显, 胞浆及突起皆呈阳性。**结论** 脊髓损伤后给予 BoNT/A 重链可促进脊髓损伤后选择性生长相关蛋白 p-GAP 43 和 SCG 10 的表达。

【关键词】 肉毒素; A 型肉毒素重链; 脊髓损伤; 生长相关蛋白-43 (GAP-43); 颈上神经节蛋白 10 (SCG 10)

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0012-08

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2018. 02. 003

Effect of botulinum neurotoxin type A heavy chain on the growth-related proteins after spinal cord injury in rats

WANG Yafang, LAN Jing, LIU Fu, BAI Juan, LI Xiaqing*

(Department of Pathophysiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of recombinant botulinum neurotoxin serotype A heavy chain (BoNT/A heavy chain) on local proteins which are related to nerve growth after spinal cord injury in rats, and to get some experimental evidence to explain the mechanism of BoNT/A heavy chain in stimulating neuritogenesis. **Methods** Recombinant botulinum neurotoxin serotype A heavy chain was applied locally or intrathecally to rats with ipsilateral semi-dissociated lumbar spinal injury. Local spinal tissue was extracted for general protein expression by two dimension electrophoresis plus nitrate silver staining after different time period of injury. Based on the results of 2-D gel electrophoresis, growth-associated protein 43 (GAP-43) and of superior cervical ganglion 10 (SCG 10) were selected to examine the changes of their expression and distribution features under BoNT/A heavy chain administration using SDS-PAGE, western blot and immunofluorescence. **Results** (1) The model of spinal cord injury (SCI) in this study was an

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81171178); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2012046)。

【作者简介】 王亚芳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经损伤与再生的病理生理机制。

【通信作者】 李夏青, 女, 教授, 博士后, 研究方向: 神经损伤与再生的病理生理机制。E-mail: xqli2013@sxmu.edu.cn

ipsilateral semi-dissociated lumbar SCI in rat. The rats showed obvious motor and sensory dysfunction in the ipsilateral hind limb. (2) The results from 2-D gel electrophoresis plus nitrate silver staining showed that the administration of BoNT/A heavy chain based on SCI altered the local protein expression pattern. The decrease or increase in the expression of some protein dots /dots group was clearly seen after single SCI. However, these changes were transformed by BoNT/A heavy chain treatment, which appeared as a reversed pattern turning toward that in control group or further increased expression upon SCI, such as the dots located respectively at 35 – 45 kDa and 18 – 25 kDa level, pI between 5 – 7. In addition, the expression of the two dots located at the level as above increased after SCI only, and showed further increase in their expression with BoNT/A heavy chain intervention. (3) The changes of selective GAP-43 and SCG 10 expression and distribution by western blot and immunofluorescence indicated that the administration of BONT/A heavy chain based on SCI amplified the expression of GAP-43 and SCG 10 ($P < 0.05$). Meanwhile, the positive immunofluorescent staining for both GAP-43 and SCG 10 mainly distributed nearby the proximal area of injury, both cytoplasm and neuronal processes were positively stained. **Conclusions** Intrathecal delivery of BoNT/A heavy chain increases the expression of growth-associated proteins GAP 43 and SCG 10 after SCI in rats.

【Key words】 botulinum neurotoxins; botulinum neurotoxin serotype a heavy chain; spinal cord injury; growth associated protein 43 (GAP-43); superior cervical ganglion 10 (SCG 10)

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是指各种创伤或非创伤因素引起的损伤平面以下运动、感觉和自主神经功能不同程度的丧失。由于成年哺乳动物脊髓损伤后再生能力极为有限^[1-2], 损伤后再生障碍, 脊髓损伤后致残率极高, 严重影响病人的生存质量^[3]。脊髓损伤后之所以不能再生的原因归结于脊髓损伤后局部大量轴突再生抑制因子的产生及损伤脊髓组织内轴突再生相关基因不能上调或激活、细胞或轴突再生相关蛋白合成障碍^[4-5]。

A 型肉毒杆菌毒素 (botulinum neurotoxin serotype A, BoNT/A) 是由肉毒杆菌产生的神经毒素之一^[6-7]。A 型肉毒素的毒性机理主要基于其可选择性地与运动终板神经突触前膜上相应受体结合入胞、导致突触囊泡蛋白 25 (synaptosomal-associated protein 25, SNAP-25) 裂解、阻断囊泡内神经递质 (乙酰胆碱) 的释放^[8-9], 致使所支配的骨骼肌收缩障碍发生麻痹^[10]。除影响乙酰胆碱外, 肉毒素也可抑制或阻止突触囊泡内其它物质的释放, 譬如: 降钙素基因相关多肽 (CGRP)、P 物质等^[11]。从化学结构上, A 型肉毒素是由二硫键相连的双肽链, 其中较长的一条位于毒素氨基端, 称为重链 (heavy chain, HC), 负责与靶细胞膜结合及介导毒素的内吞; 较短的一条位于毒素的氨基侧, 称为轻链 (light chain, LC)。轻链部分具有 Zn^{+} 依赖的蛋白水解酶活性, 是毒素的毒性催化单位^[12-13]。一些在体实验发现 A 型肉毒素引起肌肉麻痹的恢复期 (注射后 3 ~ 4 月), 随着肌肉功能的逐渐恢复, 局部组织内可见运动终板样神经末梢结构^[14]。因此, 根据 BoNT/A 化学结构的功能特征, 在去除轻链的毒性作用后,

BoNT/A 重链本身也可能影响神经细胞的多种功能及其结构变化^[15]。

为此, 本文拟在大鼠脊髓损伤模型的基础是, 采用人工重组的 BoNT/A 重链进行髓腔内间断性给药, 探讨其对脊髓损伤后生长相关蛋白表达的影响及其促进神经突起再生的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 6 ~ 7 周龄, 体重 200 ~ 220 g, 由北京海淀实验动物养殖场提供 [SCXK (京) 2014 - 0013]。所有动物在本实验室独立动物房饲养 [SYXK (晋) 2015 - 0001], 室温 (24 ± 1) °C, 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 每日提供充足的标准食物与饮水。动物的使用及操作按照本校动物管理委员会 (IACUC2017-001) 的规定执行, 在使用动物的过程中充分考虑动物福利原则, 尊重动物, 善待动物, 最大程度减少对动物的伤害和痛苦。

1.2 主要试剂和仪器

A 型肉毒素重链购自美国 List Biological Laboratories, Inc; PE-10 (RWD Life Science, 62324, China); 多功能酶标仪 (Molecular Devices, SpectraMax[®] 190, USA); 多功能电泳仪 (Bio-Rad, USA); Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒 (Sangon Biotech, C503031, China); EasySee Western blot kit (TRAN, DW101, China); 兔抗磷酸化 GAP43 单克隆抗体 (Thermo Fisher, PAI-4626, USA); 兔抗 SCG 10 多克隆抗体 (Thermo Fisher, 720178, USA); 兔抗-GAP-DH 多克隆抗体 (Bioword, AP0063, China); 辣根过

氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (Bioword, AP0063, China); 凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA); 冰冻切片机 (Leica, 1950-Cryostat, Germany); 兔抗磷酸化 GAP 43 单克隆抗体 (Bioword, BS4791, China); Alexa Fluor 594 结合的羊抗兔 IgG 二抗 (Lifetechnologies, A11012, USA); Alexa Fluor 488 结合的驴抗兔 IgG 二抗 (Lifetechnologies, A21206, USA); 抗衰变荧光封片剂 (Invitrogen, P36931, USA); 荧光倒置显微镜 (Olympus IX71, Japan)。

1.3 实验方法

1.3.1 腰段脊髓半横断损伤模型建立

将全身麻醉后的大鼠后背位固定于鼠台, 剃去背部被毛, 以髂前上棘确定 $L_3 \sim L_4$ 椎间隙, 并依次向上确定 $T_9 \sim T_{10}$ 椎间隙。以 $T_9 \sim T_{10}$ 为中心, 沿背部正中皮肤切开 2 ~ 3 cm 的切口, 分离脊柱周围肌肉筋膜, 暴露椎板, 剪去 T_9 棘突并用咬骨钳移除 T_9 椎板, 暴露脊髓。以脊髓正中静脉为标志, 在显微镜下, 用眼科镊子从脊髓正中静脉左侧插入直至椎板, 横向夹断脊髓。止血消毒后逐层缝合肌肉筋膜及皮肤。苏醒后的大鼠呈现左后肢拖地行走、抓力显著下降、热痛敏时间无限延长。动物置于温暖环境中常规饲养至实验终止。

1.3.2 BoNT/A 重链给药及实验分组

通过两个部位间断给予 BoNT/A 重链制剂: (1) 损伤局部给药: 于损伤同时局部给予 BoNT/A 重链 4 μg (4 μg /4 μL); (2) 腰骶部鞘内置管给药^[16]: 模型建立后每周给予 BoNT/A 重链 2 μg (2 μg /2 μL)。BoNT/A 重链制剂配置: 50 μL 0.9% 的医用无菌生理盐水溶入一支 A 型肉毒素重链冻干粉中 (50 μg), 震荡摇匀, 即可配置成 A 型肉毒素重链注射液 (1 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$), 每次以 20 μL 总容量用药。实验分为 3 组 (每组 6 只): (1) 假手术组 (Control 组): 切开皮肤, 剪去椎板、暴露脊髓, 但不损伤脊髓; (2) 单纯损伤组 (Injury 组): 切开皮肤, 剪去椎板、暴露脊髓并行一侧脊髓离断术; (3) 脊髓损伤 + BoNT/A 重链干预组 (BoNT/A HC 组): 单侧腰段脊髓离断同时局部给予及随后每周鞘内给予 BoNT/A 重链制剂。根据时间点, 单纯损伤组和脊髓损伤 + BoNT/A 重链干预组又分为 2 d、7 d、14 d 和 28 d 组。

1.3.3 双向电泳—硝酸银染色检测脊髓蛋白总体表达

各实验组大鼠分别在不同时间点 (2、7、14、28

d) 用 1% 的戊巴比妥钠深度麻醉, 沿原手术部位切开背部皮肤, 打开 $L_3 \sim L_4$ 以上椎板至脊髓损伤部位, 充分暴露脊髓。用剃须刀片切取包括损伤中心、距损伤中心上下各 0.5 cm 的损伤侧脊髓组织。

将标本置于预冷的蛋白裂解液 (蛋白裂解液配方: 尿素: 21 g, 硫脲: 7.9 g, 二硫赤鲜醇 (dithioerythritol, DTE): 0.5 g, Tris: 0.5 g 纯水定容至 50 mL) 内, 用剪刀剪碎, 并于玻璃研磨器内进行研磨制备组织悬液, 随后将组织悬液用超声粉碎机进一步破碎。组织悬液充分混匀后采用 Bradford 法测定蛋白浓度。每组标本取 150 mg 蛋白, 上样于 pH 3 ~ 10 的 NL IPG 预制干胶条进行第一向等电聚焦; 将聚焦完成的胶条用 2D equilibration buffer [6 mol/L 尿素, 50 mmol/Tris-HCl (pH 8.8), 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT, 痕量溴酚蓝] 进行充分清洗和平衡后进行第二向电泳 (12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶)。对完成电泳后的凝胶进行硝酸银染色。采用 Bio-Rad 凝胶成像系统对 0.1% 硝酸银染色后的胶条进行成像及分析处理。

1.3.4 选择性生长相关蛋白的 Western blot 检测

每组样本取 20 μg 蛋白样品上样 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶。将蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 加入选择性生长相关蛋白抗体: 兔抗磷酸化 GAP 43 单克隆抗体 (1: 3000, Thermo Fisher, PAI-4626, USA) 或兔抗 SCG 10 多克隆抗体 (1: 1000), 及兔抗-GAPDH 多克隆抗体 (1: 5000), 4℃ 冰箱摇床过夜; TBST 充分洗膜后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (1: 1000), 室温孵育 1 h, 充分洗涤后加入新鲜配置发光工作液反应 3 min, 暗室曝光显影后, 于凝胶成像分析系统上对胶片上的蛋白条带进行扫描及摄像分析。

1.3.5 免疫荧光检测

各实验组大鼠分别在不同时间点 (2、7、14、28 d) 时在 1% 的戊巴比妥钠深度麻醉下用 4% 多聚甲醛经心插管灌注固定后, 取出以损伤脊髓为中心长约 0.5 cm 的脊髓置于相同固定液中后固定 1 h, 移入 30% 的蔗糖溶液中 4℃ 过夜。OCT 包埋, 制作冰冻切片。由背部向前面的额状纵切面连续切片, 厚度为 16 μm 。0.1% TritonX-100 穿透 10 min, 0.1 mol/L 的 PBS 洗涤 (5 min $\times$ 3 次), 10% 正常血清封闭 1 h, 分别加入选择性生长相关蛋白抗体: 兔抗磷酸化 GAP 43 单克隆抗体 (p-GAP 43, 1: 100,

Bioword, BS4791, China) 或兔抗 SCG 10 多克隆抗体(1:500),4℃ 冰箱孵育过夜。弃去 1 抗,PBS 充分冲洗(5 min×3 次)后加入二抗:Alexa Fluor 594 结合的羊抗兔 IgG 二抗(1:500)或 Alexa Fluor 488 结合的驴抗兔 IgG 二抗(1:500),室温避光孵育 1 h,PBS 充分冲洗后加入含有抗衰变荧光封片剂,置于荧光倒置显微镜下进行观察并采集图片。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件对数据进行统计学处理,实验数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。蛋白条带的量化采用 ImageJ 软件进行,多组间均数差异用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较用 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

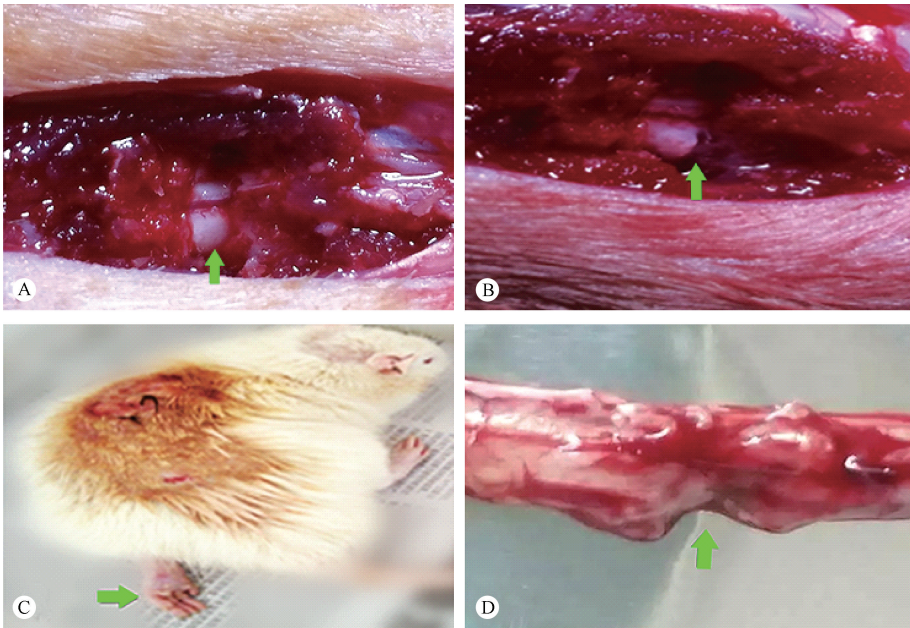
2.1 单侧腰段脊髓损伤模型的大体观察及术后体态特征

本实验通过髂嵴解剖学标志定位 T₉~T₁₀ 椎骨,

并去除第 9 椎板暴露腰髓,用眼科镊子沿脊髓正中静脉左侧夹断一侧腰髓。术后动物呈现左侧后肢瘫痪、拖地行走,抓力及热痛敏感觉实验表明大鼠运动功能及感觉功能障碍,脊髓损伤模型成功。另外,脊髓大体特征也显示损伤基本位于腰膨大部位(图 1)。

2.2 BoNT/A 重链对脊髓损伤后局部蛋白总体表达谱的影响

双向电泳及硝酸银染色结果表明单纯脊髓损伤后局部蛋白表达与正常呈现明显不同。损伤后脊髓局部有些蛋白表达下降或升高,这些蛋白表达的增高和降低呈现单独的蛋白表达点的变化,亦或者是数个点的变化趋势;给予 BoNT/A 重链后局部蛋白表达的最大特点是:不论单纯损伤时蛋白表达的变化如何,BoNT/A 重链作用下蛋白表达皆呈现升高趋势,譬如:分子量 35~45 kDa 之间、等电点在 4~5 及分子量在 18~25 kDa 之间、等电点在 7 左右的蛋白表达点在单纯损伤时较正常对照组增多,而采用 BoNT/A 重链后其表达进一步增多(图 2 中红、绿箭头所示)。

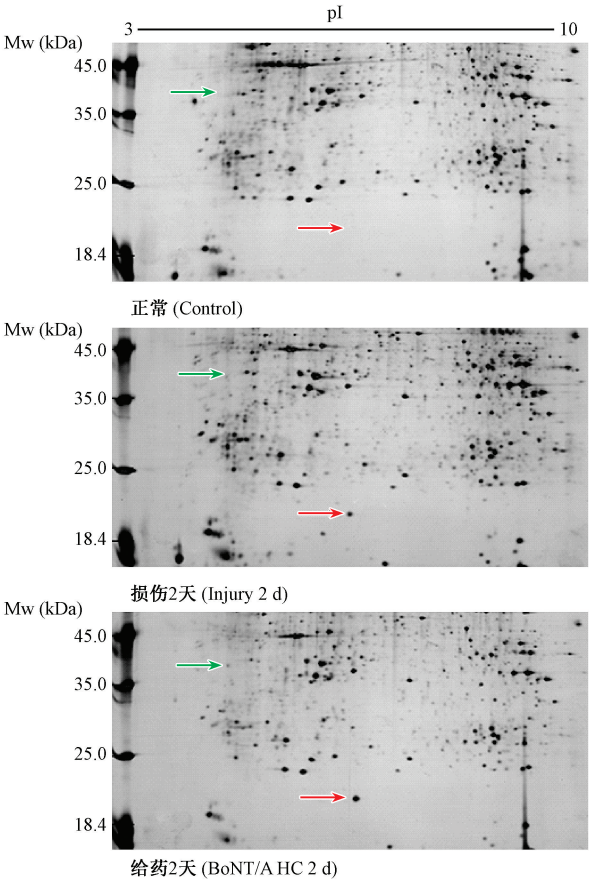


注:A; 只行椎板切除术,暴露的脊髓及正中静脉;B: 行椎板切除术,且脊髓半横断;C: 大鼠麻醉苏醒后手术侧后肢拖地行走;D: 取出脊髓可见横断的断端;A、B 图中箭头指示暴露的脊髓和正中静脉的位置;C 图中箭头指示手术侧后肢;D 图中箭头指示横断脊髓的断口。

图 1 大鼠脊髓腰部半横断术大体及体态特征

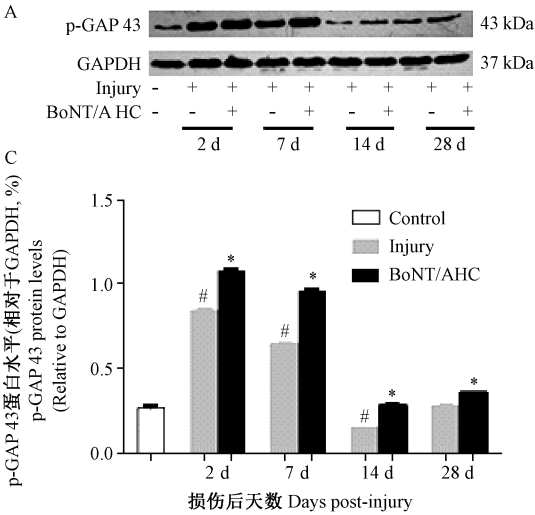
Note. A: Only laminectomy, spinal cord and median vein were exposed. B: Laminectomy and spinal cord hemisection. C: After anesthesia the surgery side dragging the hind leg walking. D: Hemisection of the spinal cord was visible. The arrow points to the spinal cord and the median vein (A,B). The arrow in C points to the surgical side of the hind limb. The arrow in D points to the spinal cord incision.

Fig.1 Photos of the exposed spinal cord and median vein during surgery in the SCI group and the movement of the hind limb post-SCI and visible spinal cord incision



注:图中红绿箭头指向差异表达的两个蛋白点。
图 2 分子量在 18.4 ~ 45 kD 左右的蛋白表达变化
Note. Positions of the differentially expressed spots are indicated with red and green arrows.

Fig. 2 The differentially expressed proteins whose molecular weight is between 18.4 – 45 kD

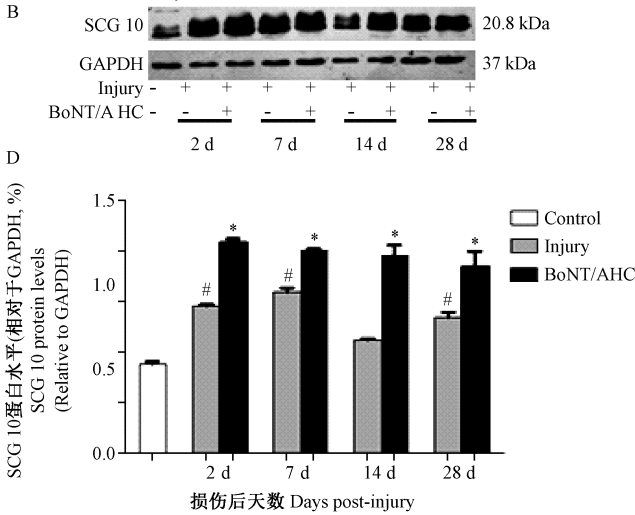


2.3 BoNT/A 重链对选择性生长相关蛋白表达的影响

根据双向电泳蛋白表达谱的变化,我们选取分子量接近 45 kDa 的磷酸化 GAP-43 (p-GAP 43) 和分子量位于 18.4 ~ 25 kDa 的 SCG 10 作为目标蛋白进行免疫蛋白印迹检测验证。结果显示单纯脊髓损伤 2 ~ 7 d 时, p-GAP 43 和 SCG 10 的表达皆较正常偏高, 而给予 BoNT/A 重链后两个时间点, 局部 p-GAP 43 和 SCG 10 的表达增高的趋势更为明显, 与单纯损伤组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。随着损伤时间的延长及连续给予 BoNT/A 重链, 当损伤时间达到 14 d 以上, 单纯损伤组和 BoNT/A 重链干预组 p-GAP 43 的表达皆较正常对照组下降, 但 BoNT/A 重链干预组的 p-GAP 43 表达仍较单纯损伤组为高 ($P < 0.05$); 而对于 SCG 10, 当损伤达到 14 d 和 28 d 时, 其表达略有下降, 而给予 BoNT/A 重链的大鼠损伤的 SCG 10 表达仍呈明显增高的现象 (图 3)。上述结果表明脊髓损伤后给予 BoNT/A 重链可增强两种选择性生长相关蛋白的表达, 其变化特征与双向电泳结果一致。

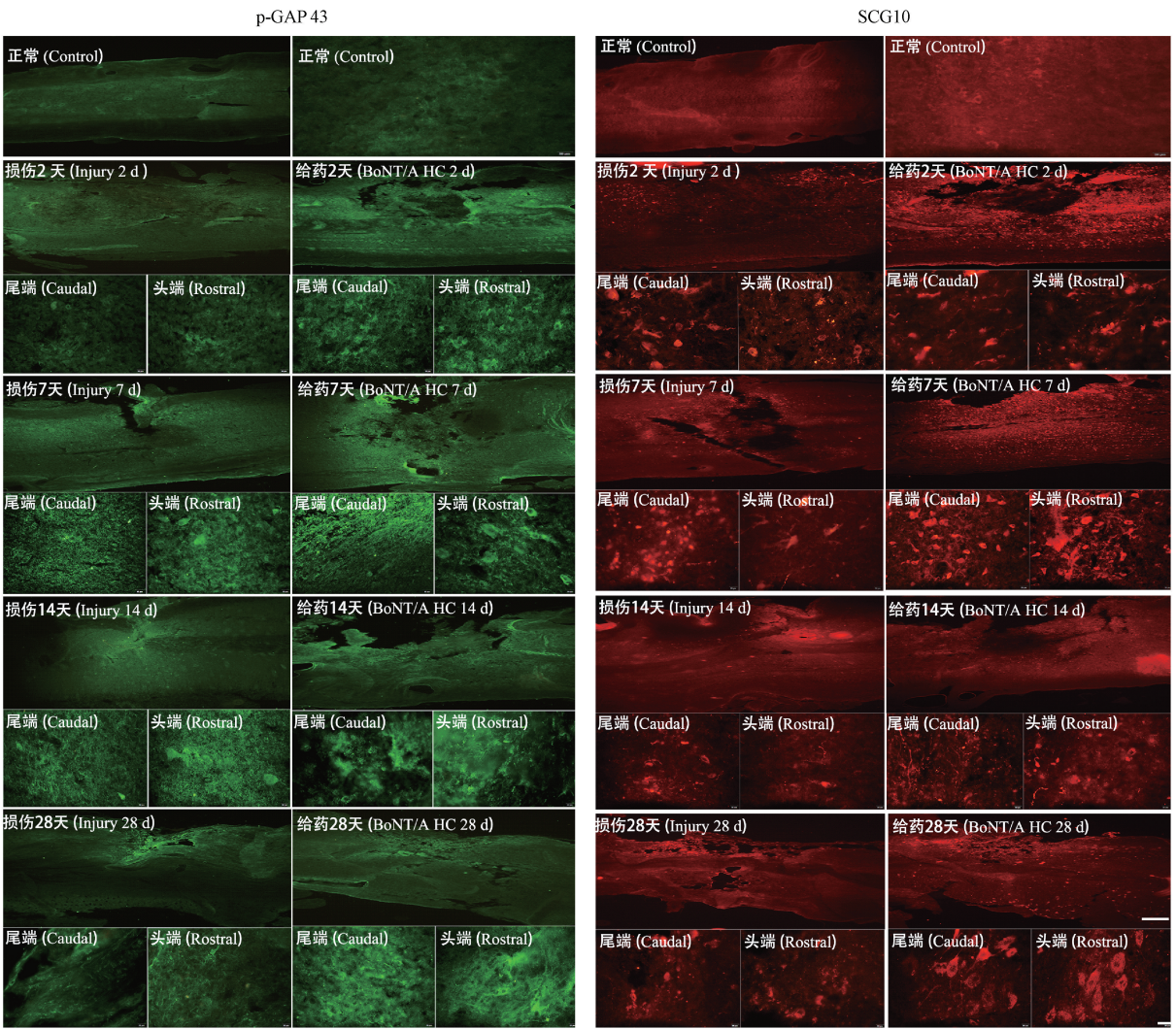
2.4 BoNT/A 重链用药后 p-GAP-43 和 SCG 10 在损伤局部的分布

采用免疫荧光技术分别对 p-GAP 43 和 SCG 10 在脊髓损伤局部的分布变化进行了观察。与 western blot 结果相似: 在损伤后 2、7 d 时, 脊髓损伤局部的头尾两端 p-GAP 43 和 SCG 10 的荧光强度都有所增强, 免疫荧光阳性的部位主要分布与细胞



注:与正常对照组相比, [#] $P < 0.05$;与单纯损伤组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。
图 3 BoNT/A 重链对 p-GAP 43 和 SCG 10 表达的影响

Note. Compared with the control group, [#] $P < 0.05$. Compared with the injury group, ^{*} $P < 0.05$.
Fig. 3 Effects of BoNT/A HC on the expression of p-GAP 43 and SCG 10



注:Control、Injury 和 BoNT/A HC 中的 Bar = 500 μ m;Caudal 和 Rostral 中的 Bar = 20 μ m。

图 4 BoNT/A HC 对 p-GAP 43 和 SCG 10 分布的影响

Note. Scale bar = 500 μ m in the control (left), Injury and BoNT/A HC sites. Scale bar = 20 μ m in the control (right), caudal and rostral sites.

Fig. 4 Effects of BoNT/A HC on the distribution of p-GAP 43 and SCG 10

体;但在损伤 14 d 后逐渐减弱;采用 BoNT/A 重链连续给药后,同时时间点损伤局部头尾端的荧光强度比单纯损伤组更为增强(图 4)。高倍镜下的荧光特征显示采用 BoNT/A 重链干预的动物,脊髓损伤局部 p-GAP 43 和 SCG 10 阳性荧光染色不仅分布于细胞胞浆,同时细胞突起也呈现阳性反应,由此而使细胞突起显而易见。免疫荧光结果也提示 BoNT/A 重链干预的脊髓损伤组织,p-GAP 43 和 SCG 10 局部分布特征相似,皆主要以损伤周边表达增强。由于细胞突起显而易见,因此,可以认为 BoNT/A 重链干预脊髓损伤周边组织内神经突起的长度和数目(图 4)。

3 讨论

本研究主要通过单侧腰段脊髓损伤基础上局部和鞘内间断性给予 BoNT/A 重链,以此观察 BoNT/A 重链对脊髓损伤局部生长相关蛋白表达的影响。实验结果表明,BoNT/A 重链可干预脊髓损伤后蛋白表达,对于选择性生长相关蛋白 p-GAP 43 和 SCG 10 则具有增强其表达、增加其在神经细胞及其突起内的分布。

与周围神经系统(PNS)相比,中枢神经系统(CNS)损伤后通常不能再生^[17-18],其原因主要归结于损伤的成熟 CNS 处于富含抑制蛋白和糖蛋白的抑制环境。此外,损伤的成熟 CNS 神经元内在的生

长程序的启动非常有限^[7]。因此,作为 CNS 之一的脊髓发生损伤后的再生修复是非常有限的。大多数 SCI 患者面临着神经功能障碍和终身残疾的问题。因此,通过各种方式激活 CNS 的内在生长程序^[19]、或通过提供一个允许的环境来促进 CNS 的神经细胞或轴突再生,积极探讨促进脊髓损伤后的再生修复的策略和方法是再生医学的焦点之一。

本实验中所采纳的 BoNT/A 重链为人工重组的多肽链,保留了 BoNT/A 与宿主细胞结合的功能结构。我们前期的体外实验已经证明,将人工重组的 BoNT/A 重链加入培养的 Neuro-2a 细胞内,可促进该细胞神经突起增长、突起数目增多等,具有促神经生长的作用^[20-21]。因此可以推论在体应用 BoNT/A 重链时,只要能够保持重链进入体内不被分解、维持有效浓度,则可发挥其在体外类似的促神经突起生长作用。本实验采用损伤当时局部给予 BoNT/A 重链及术后经腰骶部插管进行鞘内间断性给药的方法,尽可能保证将 BoNT/A 重链直接导入损伤局部、维持一定药物浓度,避免其被外周抗体中和单核吞噬细胞吞噬的结局,可以保证药物在实验观察阶段持续有效。因此,此种给药方法适合用于观察干预脊髓损伤后再生修复的一些药物/制剂的长期疗效。

损伤轴突的最终成功再生依赖于再生相关基因(regeneration-associated genes, RAGs)及其对应蛋白质在神经细胞内的转录和翻译合成^[22]。研究者曾经观察外周神经损伤早期的细胞体反应时发现,外周神经损伤后所属神经元的 mRNA 及其相关蛋白的合成明显增加,这种反应呈现了损伤后的积极主动的再生修复过程^[23-24],譬如:损伤后轴突特异生长相关蛋白-43(GAP-43)的表达上调被认为积极参与轴突再生^[25-26]。除 GAP-43 外,本实验中所选择的另一个生长相关蛋白(颈上神经节蛋白 10, SCG 10)亦是参与神经轴突再生的主要结构蛋白。GAP-43 主要以磷酸化形式参与成熟神经轴突发芽和再生,在神经损伤时表达上调;而 SCG 10,也被称为 STMN 蛋白 2(STMN2),属于 stathmin 家族蛋白,主要参与轴突内的微管动力学和蛋白质转运^[27-28],是神经轴突再生的标志蛋白之一^[29]。本研究之所以选择 GAP-43 及 SCG 10 作为 BoNT/A 重链是否干预脊髓损伤后再生修复的标志蛋白主要是基于上述两种蛋白的促神经生长作用,同时还由于二者的分子量恰好位于双向电泳结果中呈现变化的蛋

白点水平范围内。针对这两种选择性生长相关蛋白的 SDS-PAGE 及 Western Blot 结果显示:不论 p-GAP-43 或 SCG 10,在单纯脊髓损伤时二者的表达均有所增多;不论二者在损伤后随时间变化的特征有何差异,损伤基础上的 BoNT/A 重链应用皆可促进二者的表达进一步增强。本研究的实验结果提示:脊髓损伤后的 p-GAP 43 和 SCG 10 的表达增加是脊髓组织对损伤做出的有限再生反应,由于中枢神经系统损伤后局部还有大量的髓磷脂抑制因子的产生及对神经轴突再生的抑制作用,因此单纯损伤后的 p-GAP 43 和 SCG 10 的表达增加并不能代表神经轴突可以进行有效再生;BoNT/A 重链对 p-GAP 43 和 SCG 10 表达的进一步促进可以看做是 BoNT/A 重链在体发挥干预作用的一部分。事实亦是如此,BoNT/A 重链对神经细胞的干预作用并不仅限于干预生长相关蛋白的表达。我们同期的实验研究已观察到 BoNT/A 重链可以抑制髓鞘相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)的表达,并可拮抗 MAG 促 ROCK 的磷酸化(另文发表)。

结合本实验结果可以推断:在体脊髓损伤后局部给予 BoNT/A 重链通过其促进多种生长相关蛋白的表达等最终发挥其促损伤后神经再生修复的作用。然而,由于本实验仅仅观察了 BoNT/A 重链对 p-GAP 43 和 SCG 10 的表达,其对在体 CNS(包括脊髓)损伤后更多参与再生修复蛋白的影响尚需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(2): 146-156.
- [2] Giger RJ, Hollis ER, Tuszynski MH. Guidance molecules in axon regeneration [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(7): a001867.
- [3] Simpson LA, Eng JJ, Hsieh JT, et al. The health and life priorities of individuals with spinal cord injury: A systematic review [J]. J Neurotrauma, 2012, 29(8): 1548-1555.
- [4] Ferguson TA, Son YJ. Extrinsic and intrinsic determinants of nerve regeneration [J]. J Tissue Eng, 2011, 2(1): 2041731411418392.
- [5] He Z. Intrinsic control of axon regeneration [J]. J Biomed Res, 2010, 24(1): 2-5.
- [6] Burgen AS, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction [J]. J Physiol, 1949, 109(1-2): 10-24.
- [7] Schiavo G, Rossetto O, Benfenati F, et al. Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the

- neuroexocytosis apparatus [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 710: 65–75.
- [8] Navarrete AL, Rafferty KL, Liu ZJ, et al. Botulinum neurotoxin type A in the masseter muscle: effects on incisor eruption in rabbits [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2013, 143(4): 499–506.
- [9] Park SY, Park YW, Ji YJ, et al. Effects of a botulinum toxin type A injection on the masseter muscle: An animal model study [J]. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2015, 37(1): 10.
- [10] Ansved T, Odergren T, Borg K. Muscle fiber atrophy in leg muscles after botulinum toxin type A treatment of cervical dystonia [J]. *Neurol*, 1997, 48(5): 1440–1442.
- [11] Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy [J]. *Headache*, 2004, 44(1): 35–42.
- [12] Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(2): 717–766.
- [13] Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, et al. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity [J]. *Nat Struct Biol*, 1998, 5(10): 898–902.
- [14] 李夏青. 肉毒杆菌毒素的临床应用及其前景[M]. 北京:知识产权出版社, 2012: 1–200.
- [15] Ayyar BV, Tajhya RB, Beeton C, et al. Antigenic sites on the HN domain of botulinum neurotoxin A stimulate protective antibody responses against active toxin [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15776.
- [16] 邓亚南, 刘艳芳, 陈建平, 等. 经大鼠腰骶部鞘内置管给药技术的研究 [J]. *中国医学创新*, 2014, 11(18): 33–35.
- [17] Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, et al. Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells [J]. *Science*, 2002, 296(5574): 1860–1864.
- [18] Fernandes KJ, Fan DP, Tsui BJ, et al. Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoneurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 414(4): 495–510.
- [19] Fagoe ND, van Heest J, Verhaagen J. Spinal cord injury and the neuron-intrinsic regeneration-associated gene program [J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(4): 799–813.
- [20] 高美玲, 王红, 张彩云, 等. 血清型 A 肉毒杆菌神经毒素重链对 Neuro-2a 细胞的促神经突起再生作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(12): 2221–2227.
- [21] 王红, 高美玲, 兰婧, 等. 小鼠神经母细胞瘤细胞株用于 A 型肉毒毒素重链体外实验的可行性研究 [J]. *中华细胞与干细胞杂志: 电子版*, 2015, 5(4): 23–28.
- [22] Ma TC, Willis DE. What makes a RAG regeneration associated? [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 43.
- [23] Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury [J]. *Int Rev Neurobiol*, 1971, 14: 49–124.
- [24] Grafstein B. The nerve cell body response to axotomy [J]. *Exp Neurol*, 1975, 48 (3 pt. 2): 32–51.
- [25] Skene JH, Willard M. Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems [J]. *J Cell Biol*, 1981, 89(1): 96–103.
- [26] Skene JH. Axonal growth-associated proteins [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1989, 12: 127–156.
- [27] Ozon S, Maucuer A, Sobel A. The stathmin family — molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 248(3): 794–806.
- [28] Wang J, Shan C, Cao W, et al. SCG 10 promotes non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein by facilitating its trafficking to the cell surface [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(24): 4888–4900.
- [29] Shin JE, Geisler S, Diantonio A. Dynamic regulation of SCG 10 in regenerating axons after injury [J]. *Exp Neurol*, 2014, 252(3): 1–11.

[收稿日期]2017-08-31