

超声微泡对碱性成纤维生长因子转染大鼠损伤面神经的修复作用研究*

苏俊波, 骆文龙[△], 郝亚宁, 王德平

(重庆医科大学附属第二医院耳鼻咽喉头颈外科, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 应用超声微泡介导碱性成纤维生长因子(bFGF)基因进行受损面神经(大鼠模型)修复,研究其可行性及有效性。**方法** 将 40 只 SD 大鼠制作面神经损伤模型,并分成 4 组,每组 10 只;A 组:bFGF+超声+微泡组;B 组:bFGF+微泡组;C 组:bFGF+超声组;D 组:单纯手术组(PBS)。于 bFGF 基因转染后第 1、10、20、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后采用 RT-PCR 检测 mRNA 的表达,Western blot 检测 bFGF 蛋白表达。**结果** 转染后第 20 天,A 组大鼠术侧有少量胡须可观察到细微摆动;转染后第 28 天,A 组大鼠一般状况较 B、C、D 3 组恢复得更好。A 组面神经损伤后修复的神经电生理表现优于 B、C、D 3 组;A 组 bFGF mRNA 和蛋白表达量明显高于 B、C、D 3 组($P < 0.05$)。**结论** 超声微泡介导 bFGF 有助于面神经损伤的修复。

[关键词] 超声微泡;碱性成纤维生长因子;面神经损伤**[中图分类号]** R745.11**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)13-1747-03

Repair effect of ultrasound microbubble on injured facial nerve by bFGF transfection in rat*

Su Junbo, Luo Wenlong[△], Hao Yaning, Wang Deping

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Second Affiliated Hospital,

Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To apply the ultrasound microbubble to mediate basic fibroblast growth factor(bFGF) for conducting the injured facial nerve(rat model) repair and to investigate its feasibility and efficiency. **Methods** After establishing the models of facial nerve injury, 40 SD rats were divided into 4 groups, 10 cases in each group: group A, bFGF + ultrasound + microbubble(bFGF + MB/US), group B, bFGF and microbubble(bFGF + MB), group C, bFGF and ultrasound(bFGF + US) and group D, simple operation(PBS). The general status of rats on 1, 10, 20, 28 d after bFGF gene transfection was observed. The nerve conduction velocity (NCV), incubation period and amplitude of facial nerve action potential were measured. After taking the facial nerve tissue in injured site, mRNA expression was detected by RT-PCR. Western blot was used to detect the bFGF protein expression. **Results** On 20 d after transfection, small swing of a small quantity of beard in the operation site of the group A could be observed; on 28 d after transfection, the general status of rats in the group A was better than that in the group B, C and D. The nerve electrophysiology manifestations after facial nerve repair in the group A were superior to the group B, C and D; the amount of bFGF mRNA and protein expression in the group A was significantly higher than that in the group B, C and D. **Conclusion** Ultrasound microbubble mediated bFGF is conducive to the repair of facial nerve injury.

[Key words] ultrasound microbubble; basic fibroblast growth factor; facial nerve injury

面神经是支配面部肌肉运动的神经,面神经损伤后致面瘫,严重影响美观及患者生活质量^[1-2]。虽经国内外大量研究,面神经损伤后的修复依然是临床重要的难题。基因治疗能从分子层面纠正疾病的发生发展,是极富前景的治疗研究热点。碱性成纤维生长因子(bFGF)对受损面神经具有保护作用^[3]。本研究应用超声辐照微泡作为基因导入方法,将 bFGF 基因介导转染大鼠面神经损伤的模型,观察 bFGF 的表达及大鼠模型受损面神经恢复情况,探讨该方法的可行性、有效性,为面神经损伤后修复方法提供一种新思路。

1 材料与方

1.1 实验动物 40 只清洁级 SD 大鼠(雌雄不限),由重庆医科大学动物实验中心提供,体质量 210~240 g,合格证号:SCXK(渝)2007-0011。

1.2 试剂 脂质微泡由重医附二院超声影像学研究所提供;DFGF 菌液由重庆医科大学附属第二医院肝病研究治疗中心提供,兔抗鼠 β -actin 多克隆抗体、Trizol 试剂、羊抗兔 IgG、兔抗鼠 bFGF 多克隆抗体、化学发光试剂等由武汉谷歌生物科技有限公司提供。

1.3 方法。

1.3.1 动物模型制作 体位:仰卧位;麻醉:腹腔内注射 5% 戊巴比妥 30 mg/kg,并局部注射 5% 利多卡因;操作:在手术显微镜下切开大鼠右侧颞骨骨泡,磨去颞骨肌支面神经骨管约 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^[7]。

1.3.2 质粒提取 bFGF 菌液经大肠杆菌扩增 16 h 后提取纯

化;应用酶切电泳鉴定;浓度 1 g/L(紫外分光光度计测定)。

1.3.3 脂质微泡与 bFGF 基因的结合 在 2 mL 微泡浓度约为 $(0.5\sim 1.0)\times 10^8$ 个/mL 的微泡瓶中加入 0.5 mL 含质粒浓度为 1 g/L 的 bFGF 基因溶液,摇匀,室温静置 30 min(混合液中质粒浓度为 0.2 g/L)。

1.3.4 动物分组及给药 将面神经损伤模型大鼠分成 4 组,每组 10 只;A 组:bFGF+超声+微泡组(经股静脉注入 1 mL 含 0.2 mg bFGF 的载基因微泡溶液后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/cm^2 ,频率 1 MHz,照射 10 s,间隔 10 s,共 2 min);B 组:bFGF+微泡组(仅经股静脉注入与 A 组同等剂量载基因微泡,但不用超声辐照);C 组:bFGF+超声组(经股静脉插管注入含 0.2 mg bFGF 溶液 1 mL,并使用同 A 组参数的超声辐照);D 组:单纯手术组(仅输入 1 mL PBS 作为对照)。

1.3.5 一般状况观察 于基因转染第 1、10、20、28 天观察每组大鼠饮食、胡须摆动、鼻尖偏向、眼睑闭合情况。

1.3.6 神经电生理检测 于基因转染第 28 天,以 10%水合氯醛麻醉大鼠并固定,将针灸刺激电极分别插至神经损伤处外周和中枢端肌肉,记录电极插入面颊肌(面神经支配)约为 3~5 mm,电极间距离 4~6 mm。以频率 60 Hz、波宽 1 ms 的正方波刺激,刺激电流从 0 mA 开始,至出现动作电位。采用 BL-6420C 生物信号采集与处理系统,测定潜伏期、传导速度及动作电位波幅。

1.3.7 标本采集 面神经损伤大鼠模型经基因转染 28 d 后,腹腔注射 3%戊巴比妥钠麻醉;打开胸腔,升主动脉插管,剪开右心耳;迅速灌注 0.9%NaCl 至右心耳流出血液完全变清;先快后慢灌注约 250 mL 4%多聚甲醛致大鼠四肢僵硬。切取损伤处面神经 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 。

1.3.8 损伤处神经组织中 bFGF 基因 mRNA 转录的检测 引物由武汉谷歌生物科技有限公司合成。提取吻合处神经组织 RNA(Trizol 试剂),合成 cDNA 第一链,并以其为模板,进行 PCR 扩增($94\text{ }^\circ\text{C}$,30 s, $54\text{ }^\circ\text{C}$,30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$,40 s,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。

1.3.9 损伤处神经组织中 bFGF 蛋白表达检测 采用 Western blot 法,按 100 mg 组织:1 mL 细胞裂解液的比例, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰浴匀浆,提取总蛋白。用核酸蛋白定量仪进行蛋白定量。取 $40\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白,经 12%SDS-PAGE 分离,转移至硝酸纤维膜上,用封闭液(5%的脱脂奶粉)室温封闭 2 h;加入兔抗鼠 GDNF 多克隆抗体和兔抗鼠 β -actin 多克隆抗体(1:200 稀释), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h;PBST 洗膜,加入羊抗兔 IgG(1:400 稀释), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h;化学发光试剂反应约 2 min,发光成像仪呈像并测定条带吸光度值。以目的条带和内参条带吸光度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理 用 SPSS19.0 软件进行统计分析,采用多个样本均数间两两比较的 q 检验进行统计学检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠的一般状况 基因转染后各组大鼠无死亡,切口无感染。转染后第 1 天,每组大鼠均出现饮食降低,胡须伸直,无摆动,鼻尖偏左;转染后第 10 天,各组大鼠情况较第 1 天

无好转,组间无明显差别;转染后第 20 天,B、C、D 组一般状况无明显改变,A 组大鼠术侧有少量胡须可观察到细微摆动,鼻尖仍偏左;转染后第 28 天,B、C、D 组大鼠术侧胡须较前恢复,但摆动无力,鼻尖稍偏左,右眼不完全闭合,A 组大鼠术侧胡须可见有力的节律性摆动,鼻尖居中,右眼可闭合。

2.2 神经电生理检测 A 组大鼠神经动作电位波幅,传导速度高于 B、C、D 组,潜伏期低于 B、C、D 组($P<0.05$),见表 1。

表 1 转染后第 28 天各组大鼠损伤面神经神经电生理检测指标

组别	面神经传导速度 ($\text{v}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	潜伏期 (t/ms)	神经电位波幅 ($\text{V}/\mu\text{V}$)
A 组	18.1 ± 0.5	8.0 ± 0.4	10.5 ± 1.4
B 组	13.7 ± 0.1	10.3 ± 0.2	5.9 ± 0.4
C 组	15.0 ± 0.2	9.0 ± 0.4	7.8 ± 0.6
D 组	13.8 ± 0.4	10.4 ± 0.3	5.6 ± 0.5

2.3 各组大鼠损伤处神经组织中 bFGF 基因 mRNA 的转录水平 A 组 bFGF mRNA 表达量明显高于 B、C、D 组($P<0.05$),见图 1。

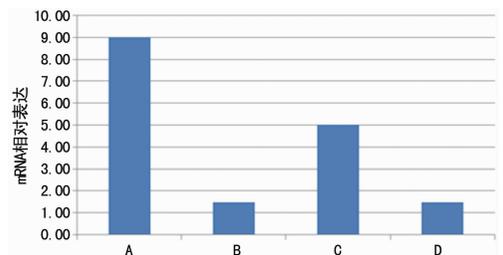


图 1 损伤神经组织中 bFGF 基因 mRNA 的转录水平

2.4 各组大鼠损伤处神经组织中 bFGF 蛋白表达水平 A 组 bFGF 蛋白表达量明显高于 B、C、D 组($P<0.05$),见图 2、3。

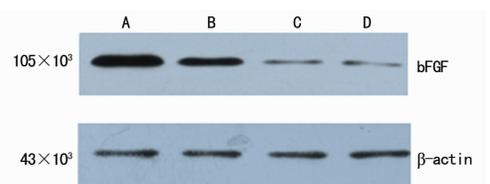


图 2 损伤神经组织中 bFGF 蛋白的表达

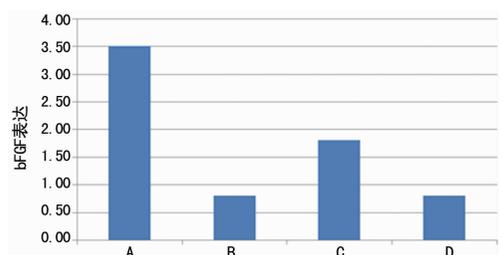


图 3 大鼠损伤处神经组织中 bFGF 蛋白表达水平

3 讨 论

面神经损伤后的修复依然是临床重要的难题。近年来,随着基因治疗的研究进一步深入,基因治疗的神秘面纱正被逐渐揭开,与传统治疗不同的是,基因治疗通过转基因转染目的基因,使损伤的面神经 bFGF 恢复到正常水平,能够从基因水平

调节神经生长因子水平,从而促进修复^[4],因此具有非常可观的前景。目前转基因的载体主要有病毒载体与非病毒载体。两种类型的载体各有优劣,病毒载体较非病毒转染效率高,但细胞毒性也高、免疫原性较强;而非病毒类载体则反之,虽然比较安全,但效率低^[5]。选择一个安全、合理以及高效的转染方式在基因治疗的应用中极为重要。既往研究已经证实超声微泡是一种安全、新型及高效的载体。低频超声可介导细胞基因转染,同时,微泡造影剂可提高超声介导基因转染的最高转染率^[6]。当微泡造影剂从静脉注射到人体后,微泡会到达靶细胞周围。此时在靶细胞周围给予适当的超声辐照,靶细胞周围的微泡即会破裂,由该微泡携带的目的基因释放进入细胞^[7]。

近年来,靶向超声微泡(球)造影剂因其不仅在疾病诊断,而且能在疾病治疗中起到特殊作用而越来越受到关注^[8]。在超声靶向治疗中,微泡造影剂有助于定点治疗,且微泡本身能与其他治疗方法相结合等诸多优势,其热效应、空化效应及辐射力等有助于药物在靶向组织中的沉积,从而为起到治疗作用^[9]。低强度超声本身也可以促进神经损伤的修复^[10]。

既往研究表明,bFGF 复合降解膜能够提高面神经离断伤延期修复神经再生。骆文龙等^[11]研究显示 bFGF 对面神经元保护作用的机制可能是其使受损面神经元 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达减少,Bcl-2 蛋白表达增多,从而使面神经元凋亡发生减少。bFGF 可以不经由雪旺细胞或血管生成机制而直接影响轴突,促进受损面神经再生^[12]。但是,由于 bFGF 半衰期短及快速的扩散,采用传统给药方式通常无明显效果^[13]。目前研究较多的是通过控制缓释^[14]和导管复合物^[15-18]等方法来实现 bFGF 对神经修复的作用。

通过文献查阅及既往研究积累,本研究应用超声微泡作为基因载体,以 bFGF 作为转染基因,获得了较好的实验效果。从结果可以得出,A 组大鼠的一般状况恢复较其余 3 组好,术侧胡须摆动、鼻尖位置及右眼闭合情况均优于其余 3 组。而从神经电生理方面,A 组大鼠的诱发电位波幅、面神经传导速度以及潜伏期也明显优于其他 3 组,A 组大鼠面神经损伤处 bFGF 蛋白及 mRNA 的表达量也显著高于 B、C、D 3 组。本研究结果充分说明超声微泡造影剂能有效地与目的基因相结合,在适当强度和频率的超声作用下,能有效将目的基因转染靶组织,为修复受损面神经提供安全高效的途径;同时,本研究证实 bFGF 够促进大鼠面神经损伤的修复,为今后面神经损伤的基因治疗提供新的思路。

参考文献

[1] 李小辉,黄权. 面神经损伤修复研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2011,10(3):284-286.

[2] 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.

[3] 王强,张竹,张士岩,等. bFGF 复合降解膜对面神经离断 3 周后神经再生的作用[J]. 中国口腔颌面外科杂志,2013,11(1):24-28.

[4] 胡智兴,耿菊敏,梁道明,等. 肝细胞生长因子减轻皮质神经元的缺氧/复氧损伤[J]. 基础医学与临床,2010,30

(3):369-373.

- [5] 郝亚宁,骆文龙. 超声辐照微泡对肝细胞生长因子转染大鼠损伤面神经的促进作用[J]. 基础医学与临床,2012,32(11):1332-1336.
- [6] 陈云超,张青萍,等. 超声和微泡造影剂介导细胞基因转染的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志,2006,15(11):864-868.
- [7] 王丹,骆文龙. 超声微泡对 pEGFP 质粒转染小鼠损伤面神经的促进作用[J]. 激光杂志,2011,32(6):84-86.
- [8] 王志刚. 超声分子影像学研究进展[J]. 中国医学影像技术,2009,25(6):921-924.
- [9] 李佳,熊屏,陈亚珠. 超声靶向治疗的研究进展[J]. 中华超声影像学杂志,2012,21(6):537-539.
- [10] Mai S, Mitsuru M, Masamichi S, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates nerve regeneration following inferior alveolar nerve transection in rats[J]. Eur J Oral Sci, 2016, 124(3):246-250.
- [11] 骆文龙,陈红江. 碱性成纤维细胞生长因子对受损面神经元凋亡及 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达影响研究[J]. 重庆医学,2007,36(12):1124-1127.
- [12] Grothe C, Ninkovic J. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration[J]. Anat Embryol (Berl), 2001, 204(3):171-177.
- [13] Toledo RN, Borin A, Cruz OL, et al. The action of topical basic fibroblast growth factor in facial nerve regeneration[J]. Otol Neurotol, 2010, 31(3):498-505.
- [14] Komobuchi H, Hato N, Teraoka M, et al. Basic fibroblast growth factor combined with biodegradable hydrogel promotes healing of facial nerve after compression injury: an experimental study[J]. Acta Otolaryngol, 2010, 130(1):173-178.
- [15] Ikegachi R, Kakinoki R, Matsumoto T, et al. Basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in a C-ion-implanted silicon chamber[J]. Brain Res, 2006, 1090(1):51-57.
- [16] Ohta M, Suzuki Y, Chou H, et al. Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve[J]. J Biomed Mater Res A, 2004, 71(4):661-668.
- [17] Ma F, Xiao Z, Chen B, et al. Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen. binding basic fibroblast growth factor facilitate recovery of sciatic nerve injury in rats[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(7/8):1253-1262.
- [18] Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, et al. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(5):1370-1378.