

大鼠脊髓损伤后 Wnt 信号分子的表达变化

梁新军, 吴燕峰, 唐 勇, 黄 霖, 杨 睿, 王 鹏, 沈慧勇

(中山大学附属第二医院骨科, 广东省脊柱脊髓疾病研究中心 510120 广州市)

【摘要】目的:探讨大鼠脊髓损伤后不同时期 Wnt 信号分子 Wnt-1、 β -连锁蛋白(β -catenin)及糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)在脊髓损伤局部的表达情况。**方法:**50 只成年雌性 SD 大鼠随机均分为对照组和实验组, 麻醉下手术显露 T9~T11 椎板, 切除 T10 全椎板, 实验组大鼠用 NYU 打击器以 10g $\times$ 5cm 的打击能量致伤 T10 脊髓, 对照组只行全椎板切除, 不致伤脊髓。分别于术后 1d、3d、5d、7d、14d 每组各取 5 只大鼠, 取以损伤区为中心共 15mm 范围内(对照组取相应部位)脊髓组织, 提取总 RNA, 采用半定量 RT-PCR 的方法检测脊髓组织中 Wnt-1、 β -catenin 及 GSK-3 β 的 mRNA 表达量。**结果:**脊髓损伤后 1d 和 3d 时 Wnt-1 和 β -catenin 出现高表达, 5d 后其表达逐渐减弱, 14d 左右其表达基本恢复到正常水平, 而在脊髓损伤后 1d 和 3d 时 GSK-3 β 呈低表达, 5d 后其表达逐渐增强, 各时间点之间差异有显著性($P<0.05$)。对照组中 Wnt-1 和 β -catenin 及 GSK-3 β 均呈低表达, 各时间点表达无显著差异($P>0.05$)。**结论:**大鼠脊髓损伤后损伤局部脊髓组织中 Wnt-1、 β -catenin 及 GSK-3 β 的表达发生变化, 提示 Wnt 信号在脊髓损伤后的早期被激活, 其可能与脊髓损伤后的修复再生有关。

【关键词】 脊髓损伤; Wnt-1; β -连锁蛋白; 糖原合成酶激酶-3 β

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.12.12

中图分类号: R683.2, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-12-0931-04

The expression of Wnt signaling gene after spinal cord injury in rats/LIANG Xinjun, WU Yanfeng, TANG Yong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(12): 931-934

【Abstract】 Objective: To observe the changes of expression of Wnt signaling gene Wnt-1, β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) at different time period following spinal cord injury in rats. **Method:** Fifty adult female SD rats were randomly divided into two groups: the sham group (only laminectomy, $n=25$) and the spinal cord injury (SCI) group ($n=25$). SCI model was established by hitting T10 spinal cord with NYU impactor in the force of 10g $\times$ 5cm. The total RNA of the spinal cord tissue was extracted for the examination of the mRNA expression of Wnt-1, β -catenin and GSK-3 β by using RT-PCR at the 1, 3, 5, 7 and 14 days after spine injury or laminectomy. **Result:** In the SCI group, the expression of Wnt-1 and β -catenin mRNA had a notable increase at 1 and 3 days after injury, then the expression began to decrease at 5 days after injury and it was almost back to normal after 14 days. GSK-3 β mRNA showed low expression at 1 and 3 days after injury and the expression began to increase at 5 days later. The lower expression of Wnt-1, β -catenin and GSK-3 β was observed in the sham group and presented no significant difference in the expressions among the different time periods ($P>0.05$). **Conclusion:** The expression changes of Wnt-1, β -catenin and GSK-3 β mRNA after spinal cord injury suggest that Wnt signaling may play an important role in the neural regeneration after spinal cord injury.

【Key words】 Spinal cord injury; Wnt-1; β -catenin; Glycogen synthase kinase-3 β

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Sun-Yat-Sen Memorial Hospital, Sun-Yat-Sen University, Guangzhou, 510120, China

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800634)(30973033); 广东省自然科学基金资助项目(7301395)(7001603); 广东省科技计划项目(2008B030301326)

第一作者简介: 男(1976-), 医学博士, 主治医师, 研究方向: 脊髓损伤与骨肿瘤

电话: (020)81332032 E-mail: doctorlxj@yahoo.com.cn

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是人类高致残率疾患之一。由于脊髓损伤后自身神经元的再生能力有限, 一旦损伤难以修复, 因而损伤后脊髓的结构重建和功能恢复是 SCI 治疗的关键所在, 也是当今生命科学领域研究的热点和难点^[1]。研究表明, Wnt 信号通路参与了神经系统的发育

过程, 其与自身基因及外来信号等诸多因素的共同作用, 促进了神经系统的发育并在神经干细胞增殖分化和轴突导向中起到了关键作用^[2]。但在脊髓损伤后, Wnt 是否有表达及表达的变化尚不十分清楚。本研究通过观察成年 SD 大鼠脊髓损伤后, 损伤局部 Wnt 信号分子 Wnt-1、 β -连锁蛋白 (β -catenin) 及糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 的表达变化, 以期阐明脊髓损伤分子水平的调控机制, 为脊髓损伤的修复治疗提供新的思路和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制作

成年雌性 SD 大鼠 50 只, 由中山大学北校区实验动物中心提供, 体重 200~250g。随机分为对照组和实验组, 每组 25 只。用 10% 的水合氯醛腹腔注射 (剂量为 3.5ml/kg) 麻醉, 5~10min 大鼠麻醉良好后, 背部剃毛, 俯卧置于操作台上, 常规碘伏消毒。计数肋骨确定 T10 水平, 取背部正中切口, 长约 2cm, 切开皮肤、皮下, 紧贴椎板切开竖棘肌并向两边剥离至横突外侧, 显露 T9~T11 椎板, 用显微剪将 T10 全椎板切除, 显露硬膜。实验组大鼠固定 T9、T11 棘突, 应用 NYU 打击器, 用 10g 重锤自 5cm 高度处自由下落打击 T10 脊髓; 对照组大鼠只显露 T10 硬膜, 不打击脊髓。依次缝合硬脊膜、皮下组织与皮肤。实验组大鼠脊髓打击后双下肢发生抽搐, 尾巴甩动, 随后完全松弛。所有模型均在中山大学脊髓损伤研究所完成, 手术场所及所用器械均经严格消毒。麻醉苏醒后分笼饲养, 术后应用抗生素 (青霉素钠 10000U/100g) 3d 预防感染。每天两次进行膀胱按摩挤尿, 并防止褥疮发生。两组大鼠均未在取材前死亡。

1.2 脊髓损伤组织中 Wnt-1、 β -catenin 和 GSK-3 β mRNA 水平检测

分别于造模后 1d、3d、5d、7d、14d 每组各取 5 只大鼠, 腹腔注射麻醉后在无菌条件下按原手术切口切开, 实验组取出以打击点为中心长约 15mm 的脊髓组织, 对照组取相应部位同样范围的脊髓组织。匀浆后用 Trizol 试剂提取组织总 RNA。分光光度计检测 RNA 浓度和纯度, 按 RT-PCR 试剂盒说明进行逆转录, PCR 扩增 Wnt-1、 β -catenin 和 GSK-3 β , 同时扩增 GAPDH 作为内参照。引物由上海博亚公司合成, 其引物序列和产

物长度见表 1。

PCR 循环条件: 预变性 95℃ 30s, 变性 94℃ 1min, 退火 (Wnt-1 56℃, β -catenin 58℃, GSK-3 β 56℃) 1min, 延伸 72℃ 90s, 循环 35 次; 72℃ 延伸 10min。将 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下观察并拍照。重复实验 3 次。应用图像分析系统对 RT-PCR 结果进行图像分析, 计算条带的积分吸光度 (IA), IA=平均吸光度×面积, 采用被测条带与内参 GAPDH 积分吸光度比值来表示其表达量。

1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 统计包中的方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

表 1 Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β 及内参考照物的引物序列及产物长度

	引物序列	产物长度 (bp)
Wnt-1	上游: 5'-TCCTCGGGCAATCTCTCACT-3'	427
	下游: 5'-CCTCTCGCTGGAATCCACA-3'	
β -catenin	上游: 5'-CACCCGCGAGTACAACCATC-3'	338
	下游: 5'-TGTAGAAAGTGTGGTGCCA-3'	
GSK-3 β	上游: 5'-CAGTTACACAGACACTAAAGTC-3'	342
	下游: 5'-CTTCTGAACAGCTGCTACATAT-3'	
GAPDH	上游: 5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3'	242
	下游: 5'-CTGGAAGATGCTGATGGGTTTC-3'	

2 结果

在对照组大鼠脊髓组织中, Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β 均呈低表达, 且各时间点的表达无明显差异 (表 2, $P > 0.05$)。实验组大鼠在脊髓损伤后 1d 和 3d 时, 损伤部位脊髓组织中 Wnt-1 和 β -catenin 出现高表达, 5d 后其表达逐渐减弱, 14d 左右其表达基本恢复到正常水平, 各时间点的差异有显著性 (图 1、2, 表 3, $P < 0.05$); 在脊髓损伤后 1d 和 3d 时, 损伤脊髓组织中 GSK-3 β 呈低表达, 5d 后其表达逐渐增强, 各时间点的差异有显著性 (图 3、表 3, $P < 0.05$)。

3 讨论

脊髓损伤是中枢神经系统严重的致残性疾病。目前全世界有超过 250 万的 SCI 患者, 并以每年超过 13 万的速度增长^[1]。脊髓损伤后神经的再生与修复是目前研究的热点与难点之一。以往认

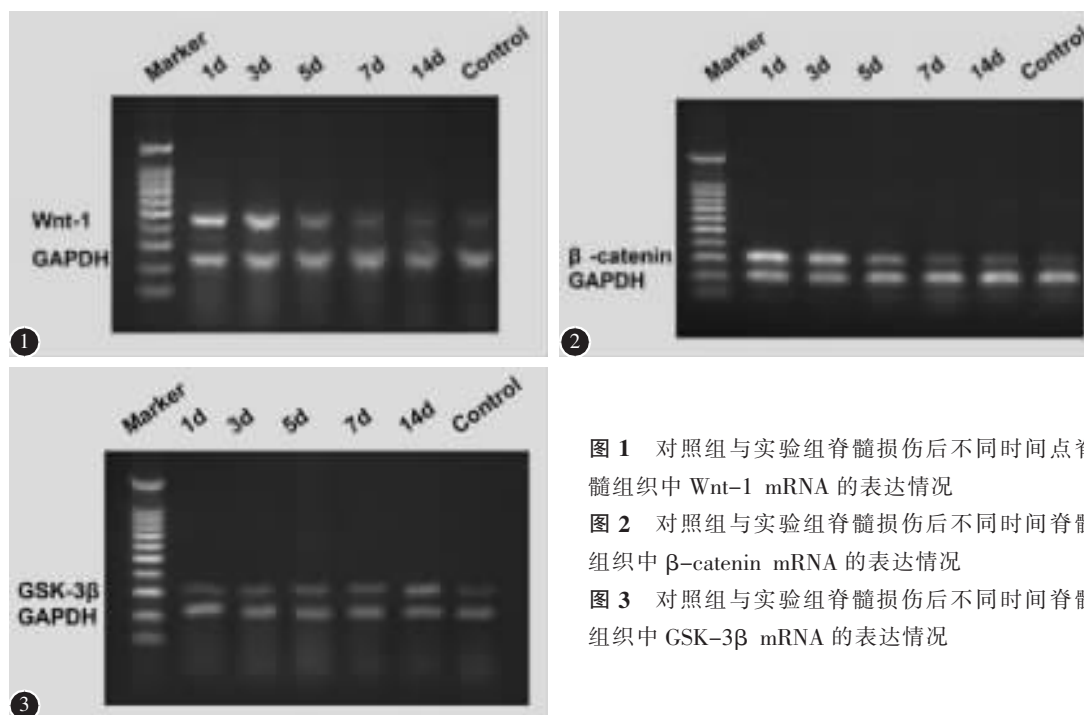


图 1 对照组与实验组脊髓损伤后不同时间点脊髓组织中 Wnt-1 mRNA 的表达情况

图 2 对照组与实验组脊髓损伤后不同时间脊髓组织中 β-catenin mRNA 的表达情况

图 3 对照组与实验组脊髓损伤后不同时间脊髓组织中 GSK-3β mRNA 的表达情况

表 2 对照组大鼠不同时间点脊髓组织中 Wnt-1、β-catenin 和 GSK-3β 与内参 GAPDH 条带的积分吸光度的比值

	1d	3d	5d	7d	14d	P值
Wnt-1	0.65±0.05	0.68±0.05	0.64±0.09	0.71±0.13	0.66±0.08	>0.05
β-catenin	0.72±0.06	0.69±0.06	0.71±0.07	0.70±0.06	0.67±0.08	>0.05
GSK-3β	0.62±0.06	0.58±0.04	0.63±0.06	0.61±0.07	0.64±0.04	>0.05

表 3 实验组大鼠不同时间点损伤脊髓组织中 Wnt-1、β-catenin 和 GSK-3β 与内参 GAPDH 条带的积分吸光度的比值

	1d	3d	5d	7d	14d	P值
Wnt-1	1.42±0.13	1.37±0.17	0.98±0.11	0.79±0.09	0.73±0.09	<0.05
β-catenin	1.59±0.18	1.48±0.14	1.01±0.13	0.83±0.11	0.76±0.07	<0.05
GSK-3β	0.67±0.05	0.85±0.07	0.93±0.09	1.13±0.12	1.29±0.11	<0.05

为成年哺乳动物的中枢神经系统在损伤后，死亡的神经元和损伤的轴突不能再生，因此丧失的功能也不能恢复^[3]。

Wnt 基因是从小鼠乳腺癌中克隆出的一种原癌基因，最早称为 int。随后的研究发现，此基因在小鼠胚胎发育中起重要作用，是果蝇无翅基因 (wingless) 的同源物，因而将其合称为 Wnt^[5]。Wnt 信号途径是调控细胞生长增殖的关键途径，在胚胎发育和恶性肿瘤的发生发展中起重要作用，目前已成为研究的热点。近年来有研究发现，Wnt 信号通路在神经系统发育过程和轴突导向中起到了关键性的作用^[4]。

在哺乳类动物的神经系统，Wnt 信号分子对

神经管和神经嵴细胞增殖、凋亡及命运决定的调控作用近年来逐步受到关注。Kiecker 等^[6]在研究非洲蟾蜍胚胎发育过程中发现，通过抑制 Wnt 信号途径，能够抑制其腹侧神经系统的形成；如果 Wnt-1 与 Wnt-3a 这两个信号蛋白缺失，那么背侧神经节形成就会减少。这表明 Wnt 信号途径调控着非洲蟾蜍神经节的形成。Castelo 等^[7]的研究发现，Wnt 蛋白能够促使神经干细胞向神经元转化的比率明显增高。Lu 等^[4]通过基因敲除大鼠模型发现 Wnt 的特异性受体 ryk 在轴突生长的导向性方面起了关键作用。这些研究都表明，Wnt 信号在神经发育及突触形成中扮演了重要的角色，Wnt 信号途径调控着大脑、脊髓和运动神经元等

的发育过程^[8,9]。但有关脊髓损伤后 Wnt 信号分子是否表达及其表达规律,目前尚未明确。

本研究采用半定量 RT-PCR 结合图像分析及统计学分析手段,在体研究了 Wnt 信号通路关键因子 Wnt-1 及其下游分子 β -catenin 和 GSK-3 β 在脊髓损伤后的表达变化。研究发现对照组中各时间点 Wnt-1 和 β -catenin 均呈低表达;在脊髓损伤后 1d 和 3d 时 Wnt-1 和 β -catenin 出现高表达,5d 后其表达逐渐减弱,14d 左右其表达基本恢复到正常水平。PCR 检测同时发现在对照组中各时间点 GSK-3 β 均呈低表达。在脊髓损伤后 1d 和 3d, GSK-3 β 呈低表达,5d 后其表达逐渐增强。这一结果说明 Wnt 信号通路在脊髓损伤的早期被重新激活。

有研究^[10]发现,脊髓内源性神经干细胞在脊髓损伤后短暂性增殖反应增强,至第 5 天开始减弱,这一过程和我们观察到的 Wnt 信号分子表达的变化刚好吻合。本研究通过 RT-PCR 的方法初步检测了脊髓损伤后 Wnt 信号重要分子 Wnt-1、 β -catenin 及 GSK-3 β 的表达情况,发现 Wnt 信号在脊髓损伤的早期呈激活状态,结合国内外学者研究发现 Wnt 信号通路在中枢神经系统发育过程和神经干细胞增殖分化中的重要作用,我们推测, Wnt 信号通路可能参与了脊髓损伤后内源性神经干细胞的募集,以修复和弥补受损伤的神经元, Wnt 信号分子有望成为脊髓损伤后调控神经再生的新靶点。但有关 Wnt 信号通路在脊髓损伤中的确切作用及其机制目前仍不十分清楚,尚需进一步的研究证实。

4 参考文献

1. Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work[J]? Nat Rev Neurosci, 2006, 7(8): 644-653.
2. Ille F, Sommer L. Wnt signaling: multiple functions in neural development [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(10): 1100-1108.
3. Cho SR, Yang MS, Yim SH, et al. Neurally induced umbilical cord blood cells modestly repair injured spinal cords[J]. Neuroreport, 2008, 19(13): 1259-1263.
4. Lu W, Yamamoto V, Ortega B, et al. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth [J]. Cell, 2004, 119(1): 97-108.
5. Hirsch C, Campano LM, Wohrle S, et al. Canonical Wnt signaling transiently stimulates proliferation and enhances neurogenesis in neonatal neural progenitor cultures [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(3): 572-587.
6. Kiecker C, Niehrs C. A morphogen gradient of Wnt/ β -catenin signaling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus* [J]. Development, 2001, 128(21): 4189-4201.
7. Castelo BG, Wagner J, Rodriguez FJ, et al. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(22): 12747-12752.
8. Yu W, McDonnell K, Taketo MM, et al. Wnt signaling determines ventral spinal cord cell fates in a time-dependent manner [J]. Development, 2008, 135(22): 3687-3696.
9. Kalani MY, Cheshier SH, Cord BJ, et al. Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(44): 16970-16975.
10. Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, et al. Generation of the central nervous system using endogenous repair mechanisms [J]. J Neurochem, 2007, 102(5): 1459-1465.

(收稿日期: 2009-09-21 修回日期: 2009-10-29)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

中国老年学学会脊柱关节疾病专业委员会第三届学术大会会议通知

中国老年学学会脊柱关节疾病专业委员会第三届学术大会定于 2010 年 6 月中旬在浙江省温州市举行。由中国老年学学会脊柱关节疾病专业委员会主办, 浙江省温州医学院附属第二医院骨科承办。大会将邀请国内外知名专家授课, 并望国内有关专业的专家积极投稿。

征稿内容: 老年脊柱、关节疾病如老年性骨质疏松症、骨质疏松性骨折、老年退行性脊柱疾病、老年退行性骨关节疾病等内容的预防、诊断、治疗、围手术期处置的临床经验及相关内容的研究进展。

会议具体时间地点见第二轮通知。

征稿截止时间: 2010 年 5 月 15 日。

联系人: 林胜铭; 电话: 15088981225, 0577-88879123; E-mail: feyjk@126.com。