

# 外周神经和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤对成年 金黄地鼠视网膜节细胞再生的影响

朱永红, 李海标

(中山医科大学组织学与胚胎学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:** 【目的】探讨玻璃体内插入外周神经和玻璃体内注射 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)对轴突损伤的视网膜节细胞再生的影响。【方法】20 只成年金黄地鼠随机分 4 组, 每组 5 只动物。切断视神经(ON)并缝接坐骨神经(attached graft, AG)为再生对照组; ON 切断并缝接坐骨神经后再于玻璃体内注射 IBMX 和/或插入一小段自体坐骨神经(SN)为实验组。采用逆行示踪标记术, 观察视网膜平铺片节细胞数。【结果】①对照组(AG)每个视网膜再生的节细胞数为(1 428 ± 284)个/retina; ②外周神经组(AG+SN)为(2 220 ± 415)个/retina; ③ IBMX 组(AG+IBM X)为(2 424 ± 1 026)个/retina; ④外周神经和 IBMX 联合组(AG+IBM X+SN)为(3 065 ± 654)个/retina; 其中, AG+SN 组同 AG 组相比存在显著性差异( $P < 0.01$ ); AG+IBM X+SN 组同 AG、AG+IBM X 和 AG+SN 组相比均有显著性差异( $P < 0.01$ )。【结论】研究结果提示联合应用外周神经和 IBMX 可大幅提高受损视网膜节细胞的再生。

**关键词:** 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤; 视网膜神经节细胞; 坐骨神经; 神经再生

**中图分类号:** R329.25      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2001)05-0338-04

## Effects of Peripheral Nerve and IBMX on Regeneration of Retinal Ganglion Cell in Adult Golden Hamster

ZHU Yong-hong, LI Hai-biao

(Department of Histology & Embryology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effects of transplantation of sciatic nerve(SN) and injection of 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBM X) into the vitreous on axotomized retinal ganglion cells (RGC) in adult hamsters. 【Methods】20 adult golden hamsters were randomly divided into 4 groups. Optic nerve (ON) was transected and a segment of autologous sciatic nerve (attached graft, AG) was removed and sutured to the proximal stump of ON in regenerating control group (AG group). Animals in the experimental groups were further treated with IBM X injection and/or implantation of a short of segment sciatic nerve (SN) intravitously. Use the fluorescent retrograde labeling method to measure the quantity of RGC. 【Results】①In control (AG) retinas, the mean number of regenerating RGC was (1 428 ± 284)/retina, ②In AG + SN group, the mean number was (2 220 ± 415)/retina, ③In AG + IBM X group, the mean number was (2 424 ± 1 026)/retina, ④The mean number in AG + IBM X + SN group was (3 065 ± 654)/retina. AG + SN group was significantly different from AG group ( $P < 0.01$ ). AG + IBM X + SN group was significantly different from AG, AG + IBM X and AG + SN groups ( $P < 0.01$ ). 【Conclusions】The results indicate that SN combined with IBM X exert significant effects on promoting the regeneration of RGC after axotomy.

**Key words:** 3-isobutyl-1-methylxanthine; retinal ganglion cells; sciatic nerve; nerve regeneration

收稿日期: 2001-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870266); 广东省自然科学基金项目(980096)

作者简介: 朱永红(1964-), 女, 安徽芜湖人, 博士, 李海标, 教授, 导师。

神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质源性神经营养因子(GDNF)及睫状源性神经营养因子(CNTF)等神经营养因子对某些中枢神经元的存活和再生起重要作用<sup>[1-3]</sup>,它们可作用于细胞表面的相应受体,然后分别通过相应的信号传导通路来调控某些基因的表达起作用。最近体外培养的研究表明,细胞内高水平的cAMP可协同某些神经营养因子,对中枢神经元的存活和突起的生长起重要作用<sup>[4]</sup>。但cAMP能否促进在体中枢神经元的再生,国内外尚未见报道。3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)是磷酸二酯酶抑制剂<sup>[5]</sup>,可抑制cAMP的降解从而提高胞内cAMP的水平。我们先前的研究表明<sup>[6]</sup>,IBMX可促进轴突受损的成年金黄地鼠视网膜节细胞的存活。在此基础上,我们进一步探讨IBMX单独或联合玻璃体内插入一小段自体坐骨神经是否对受损视网膜节细胞(Retina ganglion cell, RGC)的再生有促进作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

成年健康雄性金黄地鼠20只,体质量80~100g,年龄6~8周,由中山医科大学实验动物中心提供。本实验动物随机分为4组,每组5只动物:①再生对照(attached graft, AG),在切断的视神经近侧残端缝接一段自体坐骨神经;②AG+IBMX组,在AG的基础上加玻璃体内注射IBMX;③AG+SN组,在AG的基础上加玻璃体内植入一小段自体坐骨神经;④AG+IBMX+SN组,在AG的基础上加玻璃体内注射IBMX及植入一小段自体坐骨神经。

### 1.2 实验试剂

IBMX(Sigma),先溶于DMSO,然后用生理盐水稀释到所需浓度(DMSO:生理盐水约为1:1000),浓度为2mmol/L。粒蓝(Granular Blue, GB),德国Merck公司试剂,用生理盐水配制成30g/L的浓度,4℃冰箱避光保存备用。

### 1.3 手术方法

30g/L戊巴比妥钠腹腔注射(50mg/kg)麻醉动物,暴露左侧坐骨神经,剪取一段长约2cm的坐骨神经及一小段2mm腓支备用。于眼球背侧角巩缘处用5号针头扎一小孔,穿上11/0的无损伤

缝线,在玻璃微管的辅助下将小段坐骨神经(SN)插入玻璃体内,用玻璃微管将3 $\mu$ L IBMX注入,缝合针孔。全部动物于眼球后约1mm处切断ON,将2cm长的坐骨神经用10/0缝线缝接至ON近侧残端,眼球复位后,将另一端包埋固定于颅顶的肌肉中(图1)。AG+IBMX组和AG+IBMX+SN组动物于ON切断前及术后5、10d共3次注射IBMX。

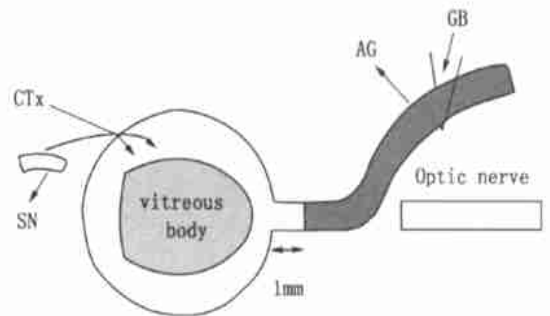


图1 视网膜神经节细胞再生模型

Fig. 1 Regenerating model of retina ganglion cells

### 1.4 再生视网膜节细胞的标记和计数

术后4周取材。在取材前3d,在移植的坐骨神经远端约1.5cm处将其切断,放置沾有30g/L粒蓝的明胶海绵逆行标记再生的RGC。3d后,在麻醉状态下摘出眼球,于40g/L多聚甲醛(0.1mol/L磷酸缓冲液,pH7.3)中剥离视网膜,4℃固定1h,0.1mol/L磷酸缓冲液中漂洗,漂洗后将视网膜裱于载玻片上(视网膜平铺片的制备见文献<sup>[7]</sup>),用激发光为400nm波长的滤光片在荧光显微镜下观察并用双盲法统计整个视网膜的视网膜节细胞数,数据处理使用方差分析和两样本均数检验。

## 2 结果

各组视网膜节细胞再生数见表1,其中AG+IBMX组(图2A)与AG组(图2B)比较,无显著性差异( $P>0.05$ );玻璃体内植入一小段自体坐骨神经的AG+SN组对视网膜节细胞的再生有影响(图2C),与AG组比较, $P<0.01$ ;联合应用SN和IBMX可大幅提高受损视网膜节细胞的再生(图2D),AG+SN+IBMX组与AG组、AG+SN组和AG+IBMX组比较,有显著性差异, $P<0.01$ 。

表1 IBMX 和/或 SN 对存活4周 RGC 再生数的影响  
Table 1 Effects of IBMX and/ or SN on RGC regeneration  
in 4 weeks survival group ( $\bar{x} \pm s$ , /retina)

Groups	n	Regenerated RGC
AG	5	1 428±284
AG+ SN	5	2 220±415 <sup>1)</sup>
AG+ IBMX	5	2 424±1 026 <sup>2)</sup>
AG+ SN+ IBMX	5	3 065±654 <sup>3)</sup>

1) Compared with the AG group,  $P < 0.01$ , 2) compared with the AG group,  $P > 0.05$ ; 3) compared with the other 3 groups,  $P < 0.01$

### 3 讨论

我们用 ON 近端切断后缝接一段自体坐骨神经诱导受损 RGC 再生的模型, 探讨玻璃体注入 IBMX 和植入一小段自体坐骨神经对 RGC 再生的作用, 结果表明玻璃体植入一小段自体坐骨神经提高 RGC 再生数; 而单纯注入 IBMX 对 RGC 再生影响不大; 当联合应用 SN 和 IBMX, 可明显提高 RGC 再生数。我们的前一结果同先前报道的一致<sup>[8]</sup>, 而后两结果则未见报道。

过去的研究表明, 外周神经缝接于切断的 ON, 可促使 RGC 轴突再生, 长入移植的外周神经, 玻璃体内额外植入 SN 可进一步促进 RGC 再生, 都可能与外周神经的雪旺细胞分泌大量可溶性神经营养因子(NTF)有关, 但目前已知的 NTF 中, 只有 CNTF 有明显的促进 RGC 再生的作用<sup>[9]</sup>。玻璃体内注入 CNTF 可大幅提高近端或远端 ON 切断后 RGC 再生, 推测 CNTF 经玻璃体的扩散, 作用于 RGC 的胞体, 提高 RGC 的胞体克服少突胶质细胞及髓鞘的抑制作用的能力。其他 NTF, 如 BDNF、NT4/5、GDNF 的作用主要是维持受损的 RGC 存活。我们的结果表明 IBMX 加玻璃体内植入 SN 可明显提高成年哺乳动物受损的 RGC 再生, 但 IBMX 是和哪一种神经营养因子协同促进 RGC 的再生目前还不清楚。

IBMX 单独应用对视网膜节细胞的再生无明显的促进作用, 我们推测可能 IBMX 单独应用时, 只有短暂提高胞内 cAMP 水平的作用。IBMX 是 cAMP 降解酶的抑制剂, 抑制 cAMP 降解而提高胞内 cAMP。以往的实验也显示在常用的提高胞内 cAMP 水平的试剂中, IBMX 的作用最弱。IBMX

诱导的胞内 cAMP 的水平升高不足以促进受损视网膜节细胞轴突再生, 但其可以刺激轴突损伤的视网膜节细胞的存活<sup>[6]</sup>。至于 IBMX 与 SN 联合应用可明显促进视网膜节细胞的再生, 可能与下列因素有关: ①中枢神经元的再生失败可能与其受损后胞内 cAMP 水平下降, 导致它们对多种 NTF 的反应性下降而使 NTF 的生物效应大受影响有密切关系。IBMX 通过提高胞内 cAMP 水平, 使受损 RGC 内的 cAMP 水平得以恢复, 从而也恢复了其对某些神经营养因子的反应性。玻璃体插入一小段自体坐骨神经后, 雪旺细胞可以分泌大量的可溶性神经营养物质, 如 NGF、BDNF、CNTF、GDNF 等多种神经营养因子弥散分布到视网膜节细胞胞体周围, cAMP 协同这些神经营养因子(特别是 CNTF)促进轴突损伤的视网膜节细胞的再生。②无论体内还是体外的研究均表明髓鞘是轴突再生的主要抑制物之一, 其中髓鞘相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)的抑制作用最突出。在体外培养的小脑神经元和后根节神经元用 cAMP 类似物提高 cAMP 水平可以抑制 MAG 和髓鞘对突起生长的抑制作用, 表明提高 cAMP 水平或激活 PKA 能够阻断 MAG 和髓鞘的抑制作用<sup>[10]</sup>。玻璃体插入一小段自体坐骨神经后, 雪旺细胞可以分泌大量的可溶性神经营养因子, 同时玻璃体注入 IBMX, 有一定的提高胞内 cAMP 水平的作用, 两者联合阻断了 MAG 和髓鞘的抑制作用而促进受损视网膜节细胞轴突再生。

目前对 cAMP 促进视网膜节细胞的再生机制仍不清楚。已有的研究表明, 神经营养因子, 如 NGF、BDNF、CNTF 和 GDNF 等对某些中枢神经元的存活和再生具有重要的作用, 它们分别通过 Ras-MAPK(小 G 蛋白-丝裂原蛋白激酶)、PI-3K(磷酸肌醇 3 激酶)、Jak-STAT(信号的转导子和转录子)等信号传导途径调控某些基因的表达而起作用。新近研究还表明, 原癌基因 Bcl-2 的表达对受损视网膜节细胞的存活和再生起关键作用, 生长相关蛋白 GAP-43 持续表达与轴突生长密切相关<sup>[11]</sup>。cAMP 能通过激活蛋白激酶 A(PKA)使某些转录子如 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化来调控有关基因的表达促进神经元的存活和再生; PKA 还能激活 MAPK 和转录子 E1K-1, 诱导 PC12 细胞分化, 突起生长。因此, cAMP 很可能通过影响某些神经营养因子的信号传导途径, 或调控

某些再生相关基因的表达,从而促进受损的 RGC 再生。至于 IBMX 是否通过抑制磷酸二酯酶,提高其胞内 cAMP 水平,后者再协同雪旺细胞分泌的可溶性神经营养因子,作用于 PKA、MAPK 或 PI-3K 等信号传递通路,调控相关基因如 BCL-2、GAP-43 等表达,促进 RGC 的再生仍有待深入探讨。

(本文图 2A~D 见插页 2)

#### 参考文献:

[1] Adrlana D P, Ludwig JA, Robert J D. *et al.* Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 3978.

[2] Verity A N, Wyatt T L, Lee W, *et al.* Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in human neuroblastoma and glioblastoma cell lines [J]. *J Neurosci Res* 1999, 55(2): 187.

[3] Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, *et al.* Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor [J]. *Nature*, 1989, 342(6252): 920.

[4] Martin G, Hanson J R, Baves B A, *et al.* Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal moter neuron in vitro [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(18): 7361.

[5] Kalderon A E, Dobbs J W, Greenberg M L. Localiza-

tion of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase (cAMP-PDEase) activity in isolated Bovine thyroid plasma membranes [J]. *Histochemistry*, 1980, 65(3): 277.

[6] 朱永红, 李海标. IBMX 对成年金满地鼠视网膜节细胞存活的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2): 96.

[7] 李 雯, 李海标. 霍乱毒素对金满地鼠视网膜神经肽 Y 免疫反应节细胞再生的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(1): 5.

[8] Berry M, Carlile J, Hunter A. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve [J]. *J Neurocytol*, 1996, 25(2): 147.

[9] Cui Q, Liu Q, So K F, *et al.* CNTF, not other trophic factors promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(3): 760.

[10] Dongming C, Yingjing S, MariaElena D B. *et al.* Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism [J]. *Neuron*, 1999, 22(1): 89.

[11] Doster S K, Lozano A M, Aguago A J. Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury [J]. *Neuron*, 1999, 6(4): 635.

(编辑 刘清海)

#### ·简 讯·

### 探索人类生殖奥秘, 我国试管婴儿技术发展迅速

我国辅助生育技术起步较晚, 1988 年北京医科大学第三医院张丽珠教授首先辅助成功我国第 1 例体外受精试管婴儿, 同年在湖南医科大学也成功诞生 1 例赠胚胎的试管婴儿, 与世界首例试管婴儿的成功足足落后 10 年。但中国人有志气, 庄广伦教授带领中山医科大学生殖医学中心的科技工作者, 努力探索人类生殖奥秘, 为祖国生殖医学技术的发展作出了重大的贡献。1994 年中山医科大学生殖中心周灿权教授首先成功多胎妊娠早期选择性减胎术; 同年李洁博士对 1 例年轻的卵巢早衰妇女采用供卵及激素替代疗法获得成功的分娩。随后, 近百例供卵及代孕母亲获得试管婴儿生育成功。1996 年由中山医科大学生殖中心李蓉博士成功进行了卵浆内单精子注射技术, 将与国外的差距缩为 4 年。1999 年徐艳文博士应用荧光原位杂交技术进行人类胚胎植入前性别诊断, 对两例甲型血友病的携带者成功选择了健康的女婴, 成为我国首例胚胎诊断试管婴儿技术的成功者。同年李晓红博士应用荧光聚合酶链反应技术进行地中海贫血的胚胎植入前诊断, 成功诞生了全球第 1 例  $\alpha$ -地中海贫血携带者的健康女婴。随后中山医科大学方丛博士与湖南医科大学的李秀蓉博士对染色体结构异常等遗传病也进行了胚胎植入前诊断并成功妊娠。中山医科大学对我国试管婴儿中心的发展起了极大的推动作用, 从南到北, 从东到西国内有 70% 的辅助生育技术中心是在中山医科大学培训或派出的技术小分队帮助下建立的。目前全国辅助生育技术中心近 100 家, 大部分可开展体外受精、精子注射技术, 少数单位可开展胚胎诊断试管婴儿技术。与此同时, 还开展了多层次的技术服务, 例如配子输卵管、宫腔移植、赠卵、赠胚与代母, 选择性减胎术等临床项目。在实验室开展序贯囊胚培养、辅助孵出、配子与胚胎冻存, 以提高临床妊娠率。初步估计每年进行试管婴儿周期约 1 万以上, 临床妊娠率保持 30% ~ 40%, 近期出生试管婴儿超过 3 000 个。生殖医学存在敏感的伦理道德问题, 并且涉及计划生育政策, 在发展生殖医学同时要注意加强法制教育和管理, 试管婴儿技术不能一哄而上。技术要发展, 要与国际接轨, 必需加强基础研究, 多学科交叉, 建立经常性广泛的国际交流。去年 9 月在珠海举行的祖国内地、香港、台湾生殖医学研讨会, 对两岸三地生殖医学交流起了积极作用。将来, 孩子怎样出生、怎样应用组织工程胚胎干细胞去建造组织器官来延长寿命? 目前, 世界上—支由医学妇产科、男性学、胚胎学、遗传学、分子生物学、生物学、动物学组成的多学科交叉的研究队伍正在深入探索, 为进一步揭开人类生殖的奥秘, 实现生育的自我调控而共同努力。

人羊膜诱导胚胎干细胞向表皮样干细胞的定向分化 (正文见第 325 页)

Differentiation of Embryonic Stem Cell into Epidermal-like  
Stem Cell Induced by Amnion (Text in page 325)

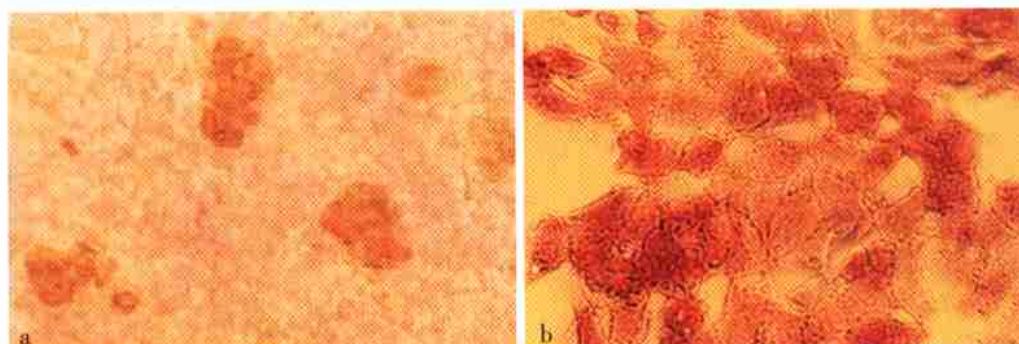


图 2  $\beta_1$  整合素免疫组化染色结果

Fig. 2 Integrin  $\beta_1$  immunohistochemical staining results

(a) colonies adhered to epithelial surface of amnion; (b) cells adhered to the wall of dish.

外周神经和 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤对成年金黄地鼠视网膜节细胞再生的影响 (正文见第 338 页)

Effects of Peripheral Nerve and IBMX on Regeneration of Retinal Ganglion Cell  
in Adult Golden Hamster (Text in page 338)

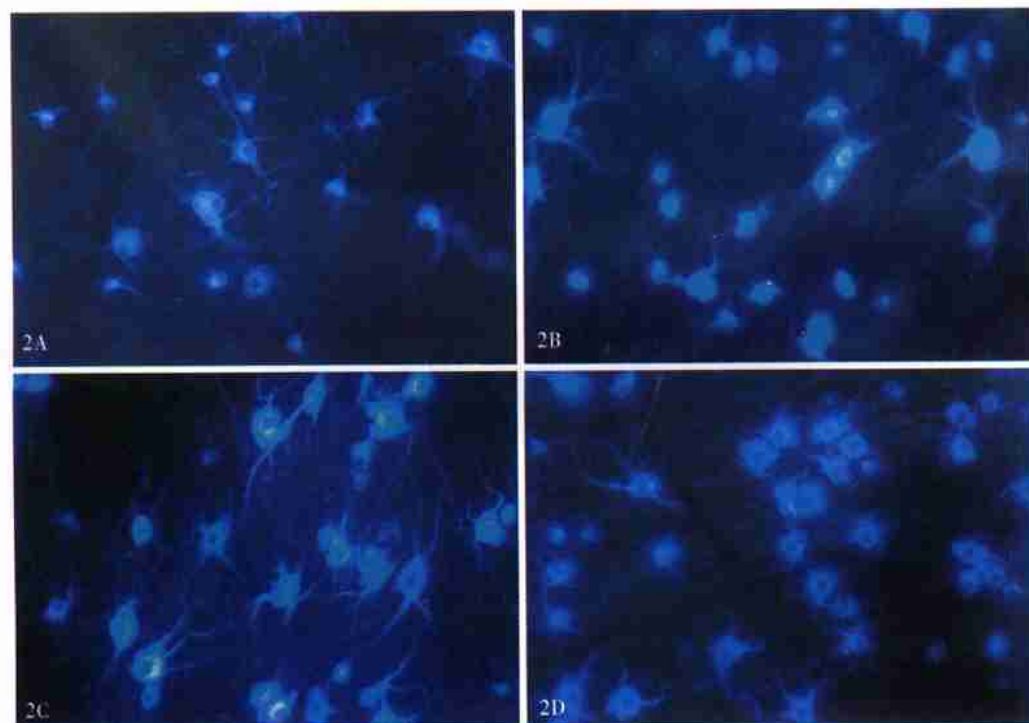


图 2 术后 4 周粒蓝标记的再生视网膜节细胞

Fig. 2 Regenerating RGC in 4 weeks survival groups showed by the retrograde labeling with granular blue

2A: AG group; 2B: AG + IBMX group; 2C: AG + SN group; 2D: AG + IBMX + SN group; Scale bar = 40 $\mu$ m; in the upper-temporal quadrant retina 1mm from optic disc