

基础研究

霍乱毒素对金黄地鼠视网膜神经肽 Y 免疫
反应节细胞再生的影响

李 雯, 李海标

(中山医科大学组织胚胎学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究 NPY 免疫反应(IR)视网膜节细胞(RGCs)能否再生及玻璃体内注射霍乱毒素(CTx)或/和玻璃体植入外周神经对其再生的影响。【方法】16 只成年金黄地鼠随机分 4 组, 每组 4 只动物。切断视神经(ON)并缝接坐骨神经(attached graft, AG)为再生对照组即 AG 组; ON 切断并缝接坐骨神经后再于玻璃体内注射 CTx 或/和植入小段坐骨神经(SN)为实验组。荧光金逆行标记再生的 RGCs 结合 NPY 免疫荧光组化双标法, 观察视网膜平铺片并记数。【结果】术后 4 周, AG 组每个视网膜 NPY-IR 阳性再生 RGCs 平均数为 58 ± 22 个, 占再生 RGCs 总数的 3.36%; AG+CTx, AG+SN 和 AG+CTx+SN 各实验组该类再生节细胞平均数依次为 (143 ± 47)、(125 ± 37)和 (437 ± 37)个, 它们分别占再生 RGCs 总数的 (5.15 ± 0.89)%、(5.34 ± 0.37)%和 (8.11 ± 0.85)%, 与对照组的差异具统计学意义。【结论】成年哺乳动物 NPY-IR 阳性 RGCs 能再生, 玻璃体内注射 CTx 或/和植入 SN, 可能促进该类 RGCs 再生。

关键词: NPY; 视网膜节细胞; 再生; 霍乱毒素; 坐骨神经

中图分类号: R329.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-0005-03

The Effects of Cholera Toxin on the Regeneration of Neuropeptide
Y-Immunoreactive Retinal Ganglion Cells in Adult Golden Hamster

LI Wen, LI Hai-biao

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

Abstract:【Objective】To examine the regeneration of NPY-immunoreactivity (IR) retinal ganglion cells (RGCs) and the effects of cholera toxin (CTx) injected or/and peripheral nerve implanted on regeneration of NPY-IR RGCs.【Methods】16 adult golden hamsters were randomly divided into 4 groups. Optic nerve (ON) was transacted 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). The animals in experimental groups were further treated with CTx injection or/and implantation of a short of segment sciatic nerve (SN) intravitously. By using the retrograde labeling with fluorogold (FG) combined with fluorescent immunocytochemistry, the regenerated NPY-IR RGCs were observed and counted under fluorescent microscope.【Results】At 4 weeks after surgery, the mean number of regenerated NPY-IR RGCs per retina in AG group was 58 ± 22 which constitutes (3.36 ± 0.65)% of the total regenerated RGCs. In AG+CTx, AG+SN and AG+CTx+SN experimental groups, the mean numbers of regenerated NPY-IR RGCs per retina were 143 ± 47 , 125 ± 37 and 437 ± 77 ordinally which constitute (5.15 ± 0.89)%, (5.34 ± 0.37)% and (8.11 ± 0.85)% of the total regenerated RGCs respectively, which were increased significantly compared with those in AG group.【Conclusion】The results show that the axotomized NPY-IR RGCs have the capability of regenerating their axons into the attached PN

收稿日期: 2000-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570241, 39870266); 广东省自然科学基金资助项目(980096)

作者简介: 李(雯)(1964-)女, 河南信阳人, 博士, 副教授, 专长组织胚胎学, 神经生物学。rights reserved. <http://www.cnki.net>

graft, CTx and/or SN could enhance the regeneration of the NPY-IR RGCs.

Key words: neuropeptide Y; retinal ganglion cells; regeneration; cholera toxin; sciatic nerve

近年大量的研究业已证明,外周神经的植入可促进成年哺乳动物脊髓、脑干、丘脑、大脑和视网膜节细胞(RGCs)等中枢神经元再生^[1],然而这些再生的中枢神经元和再生的RGC是属于哪一类型的神经元,它们含有什么神经递质或调质目前大都不清楚。近20年的研究表明,神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)和胶质细胞源神经营养因子(GDNF)对中枢的某些胆碱能、多巴胺能和GABA能等神经元的存活和再生有促进作用^[2],而中枢胆碱能神经元能否再生未见报道。我们在研究神经肽在RGCs定位及霍乱毒素(CTx)能促进视网膜节细胞再生的基础上^[3,4],探讨NPY免疫阳性RGC,能否再生及CTx对其再生的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

16只成年雄性金黄地鼠(*Mesocricetus auratus*),体重80~100g,6~8周,由中山医科大学实验动物中心提供,随机分4组,每组4只:①AG组(再生对照组),近端切断视神经(ON),ON近侧残端与一段坐骨神经移植体(attached graft, AG)缝合;②AG+CTx组,在①组的基础上+玻璃体内注射CTx;③AG+SN组,在①组的基础上+玻璃体内植入小段坐骨神经分支(SN);④AG+CTx+SN组,在①组的基础上+玻璃体内联合注射CTx和植入SN。

1.2 实验方法

30g/L的戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔麻醉动物,取一段长约2cm的坐骨神经(AG)及一小段2mm腓支(SN)备用。实验组动物于眼球背侧角巩缘处扎一小孔,将SN从小孔植入玻璃体内,2μL含480pgCTx的混合液(RBI公司产品,溶于Na₂EDTA/NaCl混合液)亦从小孔注入,11/0缝线缝合针孔。全部动物于眼球后约1mm处切断ON,将2mm长的坐骨神经与ON近侧残端缝合,眼球复位后,将另一端包埋固定于颅顶的肌肉中。AG+CTx组和AG+CTx+SN组动物于ON切断前及术后7d,14d共3次注射CTx。

1.3 荧光金逆行标记和NPY免疫组化

术后4周取材。在取材前3d,于移植的坐骨神经远端约1.5cm处将其切断,放置粘有60mg/mL荧光金(fluorogold, FG, Merck公司)的明胶海绵逆行标记再生RGCs。3d后摘出眼球,剥离视网膜并置于40g/L多聚甲醛(0.1mol/L磷酸缓冲液pH7.3)固定1h,漂洗后将视网膜裱于载玻片上,用激发光为400nm的滤光片,荧光显微镜下观察并计数,颞上、颞下、鼻上、鼻下4个区域的再生RGCs数之和为每个视网膜再生RGCs的总数。

计数后的视网膜换40g/L磷酸缓冲液配制的多聚甲醛(pH10.4)固定过夜。经300g/L蔗糖过夜,于-20℃冰箱反复冻融6~8次,PBS漂洗3次,每次10min。30ml/L正常羊血清(含30g/L TritonX-100),4℃冰箱孵育2h。1:500兔NPY抗体(Sigma公司产品,含10g/L Triton-X-100及3g/L NaN₃)4℃孵育2~3d。PBS洗3次,每次15min,加入1:200(含3g/L Triton-X-100)生物素结合的羊抗兔IgG(Vector公司),4℃孵育过夜。PBS洗3次,每次15min,加1:500卵白素结合的FITC,4℃孵育3~5h,PBS清洗后裱片。用激发光540nm波长的滤光片观察NPY-IR阳性细胞,转换为400nm的滤光片可见FG标记的再生RGCs,双标的细胞即为NPY-IR再生RGCs,每个视网膜双标细胞之和为NPY-IR再生RGCs的总数。数据采用方差分析和两样本均数检验。

2 结果

2.1 NPY-IR阳性RGCs的再生

在荧光显微镜下可见3类细胞:①有FG标记又有NPY间接荧光标记的是NPY-IR阳性再生RGCs(图1A、1B)。②仅有FG标记而没有免疫荧光标记的是NPY-IR阴性的其它再生RGCs(图1A)。③仅有NPY间接荧光标记而没有FG标记的可能是异位的NPY-IR阳性无长突细胞(未显示)。ON切断后ON断端缝合坐骨神经(AG组),存活4周,每个视网膜NPY-IR阳性再生RGCs平均数为(58±22)个($n=4$),约占再生总数的3.36%(表1)。

2.2 CTx和SN对NPY-IR阳性RGCs再生的影响

表1 各组再生的 NPY-IR RGCs 均数及其占再生 RGCs 总数的比率比较

Table 1 The number of regenerated NPY-IR RGCs and its percentage in the total regenerated RGCs ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Regenerated RGCs (FG labeled)	Regenerated NPY-IR RGCs (FG+NPY labeled)	Regenerated NPY-IR RGCs/ Regenerated RGCs(%)
AG	4	1 468±395	58±22	3.36±0.65
AG+CT _x	4	2 657±994	143±47 ¹⁾	5.15±0.89 ¹⁾
AG+SN	4	2 317±565	125±37 ¹⁾	5.34±0.37 ¹⁾
AG+SN+CT _x	4	5 390±782	437±77 ²⁾	8.11±0.85 ²⁾

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

给予 CT_x 或植入 SN, RGCs 再生总数增多, NPY-IR 阳性 RGCs 再生总数也随之增多(见表 1, 图 1C、1D), 与 AG 组相比其差异有统计学意义($P < 0.05$)。NPY-IR 阳性 RGCs 再生数占再生总数的比率增高为(5.15±0.89)%和(5.34±0.37)%, 与 AG 组比较其差异也有统计学意义($P < 0.05$)。联合给予 CT_x 和植入 SN 显著增加 NPY-IR 阳性 RGCs 再生数, 其占再生总数的比率升高达(8.11±0.85)%, NPY-IR 阳性 RGCs 再生数增多及其占再生总数的比率升高与其它 3 组比较均具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

过往虽有大量研究表明, 外周神经植入能促进成年哺乳动物某些中枢神经元的再生, 然而只有少量研究涉及它能促进什么表型的中枢神经元再生。有研究表明, 外周神经植入可促进黑质的多巴胺能和丘脑网状核的 GABA 能神经元的再生^[3]。至于再生的视网膜节细胞 RGCs 含有什么神经递质或神经肽, 以及含不同神经递质或调质的 RGCs 是否具有相同的再生能力目前仍不清楚。近年国外和我们的研究工作表明, 哺乳动物视网膜节细胞 RGCs 分别含有 P 物质(SP)、神经肽 Y(NPY)、生长抑素(SOM)和其它一些经典神经递质, 如 GABA 和谷氨酸等神经递质^[3]。我们的结果表明, NPY-IR 阳性 RGCs 能再生, 它约占再生总数的 3.36%。CT_x 或/与玻璃体植入外周神经在促进 RGCs 再生的同时, 还能促进 NPY-IR 阳性 RGCs 的再生。至于其他 96%左右的再生 RGCs 含有什么神经递质或神经肽, CT_x 或/与玻璃体植入外周神经能否促进它们的再生有待进一步研究。

对 CT_x 或 CT_x 与玻璃体植入外周神经能促进

NPY-IR 阳性 RGCs 的再生的原因, 目前仍不清楚。我们推测可能与下列因素有关: ①CT_x 或/与外周神经能可促进 ON 切断后 RGCs 的存活, 而神经细胞体的存活是轴突再生的先决条件。我们和国外的研究表明, cAMP 和 CT_x 能促进某些受损中枢神经元的存活^[6~9]。②CT_x 能促进视网膜其它非神经元成份, 如 Muller 胶质细胞分泌某些神经营养因子, 通过它们促进 NPY-IR 阳性 RGCs 的再生。CT_x 是刺激性 G 蛋白(G_s)的特异性激动剂, 通过激活 G_s 提高胞内 cAMP 水平。体外培养的研究表明 VIP 可激活 Muller 胶质细胞膜上与 G_s 偶联的受体, 提高胞内 cAMP 水平, 促进分泌 BDNF^[10]。③植入的外周神经的许旺细胞可分泌大量可溶性神经营养因子, 如 NGF、BDNF、CNTF、GDNF 等, 其中某种或某些神经营养因子可能有促进 NPY-IR 阳性 RGCs 再生的作用。大量研究已表明, 一种神经营养因子只对某些受损的中枢神经元的存活和轴突再生起作用, 如 NGF 可促进某些胆碱能神经元的存活和再生, 而 GDNF 能促进黑质多巴胺能神经元的存活和再生^[2], 至于什么神经营养因子促进 NPY-IR 视网膜节细胞的再生尚待进一步研究。

(本文图见插图 1)

参考文献:

- [1] David S, Aguayo A J. Axonal elongation onto PNS "bridges" after CNS injury in adult rats [J]. *Science*, 1981, 214(20): 931.
- [2] Tomac A, Lindqvist E, Olson L, *et al.* Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo [J]. *Nature*, 1995, 373(26): 335.
- [3] Li H B, So K F, Cheuk W. Substance P-immunoreactive neurons in hamster retinas [J]. *Visual Neurosci*, 1999, 16(4): 475.

(下转第 13 页)

断中曾经遇到一些夫妇,其中一方为 α -地贫1杂合子,另一方为 β -地贫杂合子,却因生育Bart's水肿胎而就诊,最后经基因诊断证实 β -地贫杂合子一方实际上是 β -地贫合并 α -地贫1双重杂合子^[8]。本实验检测出在广东地区 β -地贫携带者同时又携带有 α -地贫1基因的发生率与广东地区人群中的 α -地贫杂合子发生率相符,因此,准确诊断 β -地贫合并 α -地贫双重杂合子对遗传咨询和准确进行产前诊断都具有重要意义。

参考文献:

[1] 曾瑞萍,胡彬,金龙金. 广东地区HbH病基因型分析及高危胎儿基因诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 1996, 13(5): 266.

[2] Krishnamurti L, Chui D H, Dallaire M, *et al.* Coinheritance of alpha-thalassemia-1 and hemoglobin E/beta Zero-thalassemia: practical implication for neonatal screening and genetic counseling [J]. J Pediatr, 1998, 132(5): 863.

[3] Giordano P C, Hartevelde C L, Bok L A, *et al.* A complex haemoglobinopathy diagnosis in a family with both

beta zero- and alpha (zero/+)-thalassemia homozygosity [J]. Eur J Hum Genet, 1999, 7(2): 163.

[4] Rhodes S L, Plonczynski M, Harrell A, *et al.* Double Heterozygosity for the codon beta 39 C-to-T nonsense mutation and a triplicate alpha-globin gene locus can cause "dominantly" inherited beta-thalassemia intermedia [J]. Am J Med Sci, 1999, 317(5): 341.

[5] Villegas A, Munoz J A, Risueno C F, *et al.* Association of alpha and beta thalassaemia with alpha gene triplication in one family [J]. Med Clin Barc, 1997, 108(20): 781.

[6] Lam Y H, Ghosh A, Tang M H, *et al.* The risk of alpha thalassaemia in offspring of beta thalassaemia carriers in HongKong [J]. Prenat Diagn, 1997, 17(8): 733.

[7] 徐葵,曾瑞萍. 对142例 β -地中海贫血基因携带者进行缺失型 α -地中海贫血1基因分析[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(4): 206.

[8] 曾瑞萍,余升红,胡彬. α -与 β -地中海贫血双重杂合子基因诊断[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(10): 525.

[9] Ko T M, Xu X. Molecular study and prenatal diagnosis of alpha and beta thalassaemias in Chinese [J]. J Formos Med Assoc, 1998, 97(1): 5.

(编辑 张敏瑞)

(上接第7页)

[4] 李雯,李海标. 霍乱毒素对金满地鼠视网膜节细胞再生作用的研究[J]. 解剖学报, 2001(2): 待发表.

[5] Holm K, Isacson O. Factors intrinsic to the neuron can induce and maintain its ability to promote axonal outgrowth: a role for Bcl2? [J]. TINS, 1999, 22(6): 270.

[6] 李雯,李海标. 霍乱毒素对金满地鼠视网膜节细胞存活的影响[J]. 神经科学进展, 1999, 5(1): 73.

[7] Meyer-Franke A, Wilkinson G A, Bares B A, *et al.* Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit trkB to the plasma membrane of CNS Neurons [J]. Neuron, 1998, 21(4): 681.

[8] Hanson M G Jr, Shen S, Wiemelt A P, *et al.* Cyclic

AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro [J]. J Neurosci, 1998, 18(18): 7361.

[9] Meyer-Franke A, Kaplan M R, Rfrieger F W, *et al.* Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture [J]. Neuron, 1995, 15(4): 805.

[10] Zafra F, Lindholm D, Castren E, *et al.* Regulation of BDNF and NGF mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes [J]. J Neurosci, 1992, 12(12): 4793.

(编辑 刘清海)

霍乱毒素对金黄地鼠视网膜神经肽 Y 免疫反应节细胞再生的影响 (正文见第 5 页)

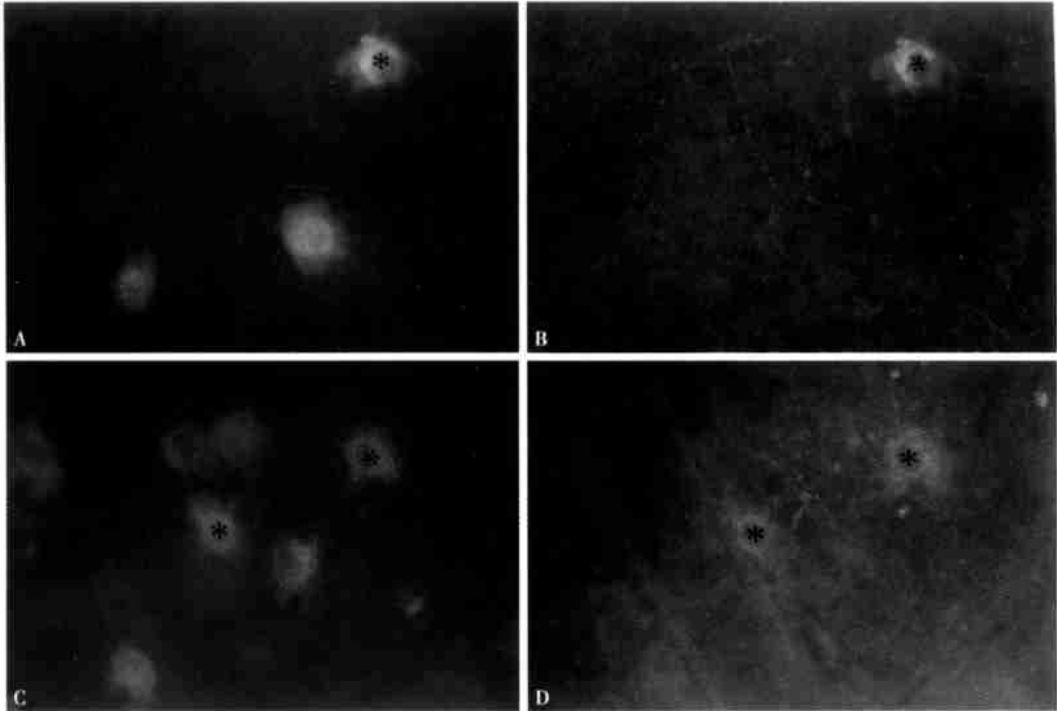


图 1 视网膜平铺片: 荧光金逆行标记及与 NPY 免疫荧光组化结合示再生的 RGCs 和 NPY-IR RGCs
Fig. 1 The wholemount preparation of retinas show the regenerating RGCs and regenerating NPY-IR RGCs by the retrograde labeling with fluorogold (FG) combined with fluorescent (FITC) immunocytochemistry
A and C: The regenerating RGCs (FG labeled) in AG group and in AG + SN + CTx group respectively.
B and D: The NPY-IR RGCs (FITC-labeled) in AG group and in AG + SN + CTx group respectively
A and B, C and D: Asterisks denote the regenerating NPY-IR RGCs (double labeling) in AG group and in AG + SN + CTx group respectively. Scale bar = 20 μ m

抗人食管癌单克隆抗体在荷瘤裸鼠体内的定位 (正文见第 19 页)

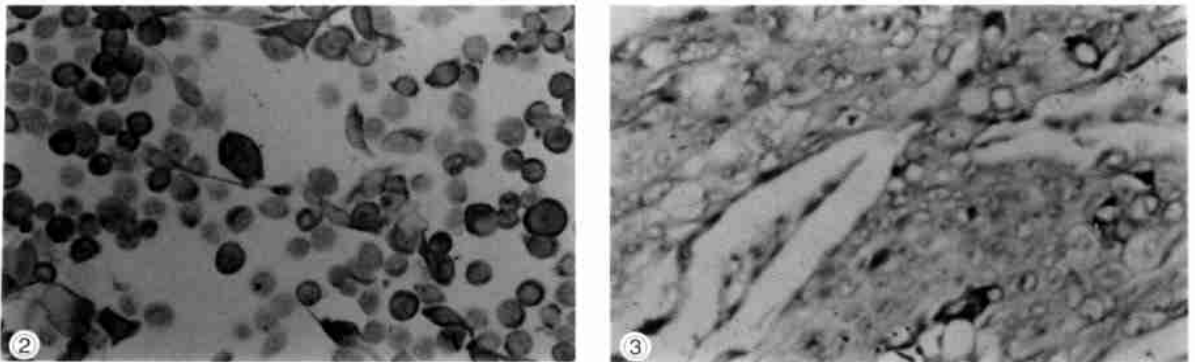


图 2 单克隆抗体 G9 在食管癌细胞株中呈阳性表达

图 3 单克隆抗体 G9 在食管癌组织呈阳性表达

Fig. 2 McAb G9 overexpression in esophageal carcinoma cells (LSAB \times 100)

Fig. 3 McAb G9 overexpression in esophageal carcinoma (LSAB \times 100)