文章编号:1000-5404(2006)22-2269-03

论著

神经生长因子在新生大鼠耳蜗的定位及其意义

池 君[1],张学渊[1],宋武战[2] ([1]第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038;[2]成都军区昆明总医院核医学科,昆明 650032)

提 要:目的 观察神经生长因子在新生大鼠耳蜗中的定位,为进一步研究其在听觉通路中的作用机制提供依据。**方法** 出生后5~7 d健康SD大鼠20只,制备耳蜗石蜡切片,用兔抗小鼠神经生长因子(nerve growth factor, NGF)多克隆抗体行免疫组织化学染色(S-P法),检测NGF在耳蜗中的表达。**结果** 新生SD大鼠膜迷路呈类三角形结构,可清晰看见幼稚柯替器、螺旋神经节细胞、蜗轴中的细胞染色阳性,细胞核及细胞质内均有表达。**结论** NGF对出生后5~7 d大鼠螺旋神经节细胞和毛细胞的存活、成熟密切相关。

关键词:神经生长因子(NGF);耳蜗;免疫组织化学
中图法分类号:R322.923;R329.26;R341 **文献标识码**:A

Distribution and significance of NGF in cochleae of neonate rats

CHI Jun[1], ZHANG Xue-yuan[1], SONG Wu-zhan[2] ([1]Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of NGF in the cochleae of neonate rats and to explore the mechanism of NGF in the auditory path. **Methods** Twenty healthy neonate SD rats aged 5 – 7 d were selected and their cochlear paraffin sections were labeled with a rabbit anti-NGF polyclonal antibody by SP method. **Results** The membranous labyrinth of neonate rats appeared similar to triangle and NGF expression was observed in immature corti's organ, in spiral ganglion cells and in nerve fibers throughout the cochlea. The distribution located in both cytoplasm and nucleus. **Conclusion** The distribution of NGF was closely related to survival and maturation of spiral ganglion cells and hair cells in rats aged 5 – 7 d.

Key words: NGF; cochlea; immunohistochemistry

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)作为神经系统发育过程中重要的信号调节分子,在神经细胞的生存、分化、轴突定向生长和神经网络的形成中发挥着重要的作用。随着对内耳感觉上皮和听觉通路发育分子机制研究的深入,越来越多的征象表明NGF信号通路可能参与耳蜗发育。大鼠出生后7 d左右是螺旋神经节细胞从幼稚开始发育成熟的时期,也是原始感觉上皮各层细胞开始分化的阶段[1]。此阶段NGF在耳蜗中的作用如何,目前尚少见相关报道。本研究选取这个时相点,采用免疫组织化学方法观察NGF在耳蜗中的表达及分布,从发育神经生物学的角度初步探讨大鼠出生后7 d NGF在感觉神经元发育及神经联系建立中的作用。

作者简介:池 君(1974-),女,湖北省孝感市人,博士,主治医师,主要从事耳科基础和临床工作方面的研究。电话:(023)68765390
通讯作者:张学渊,E-mail: yingsc@public.cta.cq.cn
收稿日期:2006-09-11;**修回日期**:2006-10-21

1 材料与方法

1.1 标本制备

选用出生后5~7 d健康SD大鼠(购自第三军医大学实验动物中心)20只,雌雄不限,检查无外耳、中耳疾病。无麻下迅速断头,快速取出听泡,暴露类圆锥形耳蜗。于蜗尖钻一小孔,开放圆窗和卵圆窗。自蜗尖缓慢注入4%多聚甲醛(pH 7.4)3~5 ml,将耳蜗置于相同的固定液中固定过夜(4 ℃)。10%乙二胺四乙酸二钠(pH 7.0)4℃ 脱钙2 d。常规石蜡包埋。沿耳蜗纵轴连续切片,切片厚5 μm。选取10只正常成年昆明小鼠(购自第三军医大学实验动物中心),分离其颌下腺组织,4%多聚甲醛固定过夜后,无须脱钙,即同法标本制备,以作阳性对照用。

1.2 免疫组织化学染色

取40张石蜡切片(含蜗轴),其中实验组20张,阴性对照20张;小鼠颌下腺取10张切片作阳性对照用,10张进行阴性对照。均按常规脱蜡至水。3%双氧水孵育5~10 min以消除内源性过氧化物酶活性。0.01 mol/L PBS浸泡5 min,试剂A

(SP9001 试剂盒,北京中山生物技术有限公司)室温孵育 15 min(消除背景色),加兔抗小鼠 NGF 的亲和纯化的多克隆抗体(一抗)(Chemicon 公司,美国),1∶200 稀释倍数,4 ℃过夜。次日取出后加生物素标记羊抗兔 IgG 二抗(北京中山生物技术有限公司),室温孵育 15 min,PBS 冲洗;辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育 15 min,DAB 显色 10 min。自来水充分冲洗。复染、脱水、透明、中性树胶封片。光学显微镜下观察结果。各组实验试剂除了阴性对照组中一抗被生理盐水替代外,其余均相同。

1.3 观察指标

20 张实验组切片均选取螺旋神经节、毛细胞区域、支持细胞区域、神经纤维这 4 个区域,用 MIG2000 图像分析仪分别测量 NGF 在这 4 个区域免疫阳性染色的平均灰度值,得到 4 组数据。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件进行各组数据间的单因素方差分析。

2 结果

2.1 耳蜗形态学观察

出生后 5~7 d 大鼠耳蜗还没有发育成熟。膜迷路为类三角形。盖膜形成。基底膜已经变薄,Cortis 器还没有完全发育成熟,内、外毛细胞形态不典型,内、外柱细胞没有分开,内隧道和 Nuel 间隙没有完全形成。螺旋神经节细胞数目变少,排列疏散,神经细胞增大,细胞质增多明显。蜗轴神经纤维排列不齐。

2.2 NGF 在新生大鼠耳蜗内的分布部位

基底膜上内、外毛细胞质染色阳性。支持细胞质染色阳性。盖膜、周围间充质免疫反应阴性(图 1)。

螺旋神经节细胞的细胞质及细胞核中均有阳性染色,神经节细胞体积大,细胞质丰富,细胞核及细胞质界限清楚。节细胞间界限不清,细胞分布不均匀(图 2)。连接毛细胞的周围突免疫染色阳性。在蜗轴中可见阳性染色的神经纤维,排列不齐(图 3)。

在阴性对照组中,所有细胞核为蓝色,细胞质为背景色。

在小鼠颌下腺阳性对照组中,可见腺管腺腔内呈棕黄色,与周围背景呈明显对比(图 4);阴性对照组中仅见蓝色的细胞核,余均显示背景色。

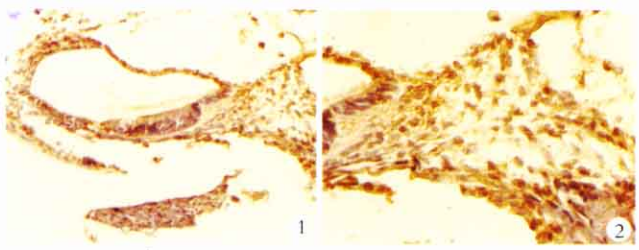


图 1 NGF 在基底膜上毛细胞、支持细胞中染色阳性 (S-P×100)

图 2 NGF 在螺旋神经节细胞中定位于细胞核、细胞质 (S-P×100)

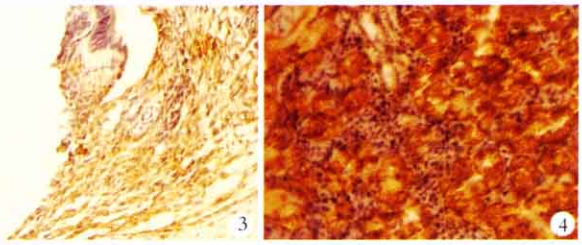


图 3 NGF 在蜗轴神经纤维中的染色 (S-P×100)

图 4 NGF 在小鼠颌下腺中的阳性染色阳性对照 (S-P×200)

2.3 NGF 在耳蜗内各部位免疫组化染色强弱比较

NGF 在耳蜗各部位阳性染色灰度值:毛细胞组 0.934 2±0.014 1、螺旋神经节组 0.932 6±0.013 2、支持细胞组0.930 2±0.012 7、神经纤维组 0.931 8±0.013 4,各组间 NGF 表达水平无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

出生后 5~7 d 的大鼠耳蜗还没有完全发育成熟,但感觉上皮已经开始分化,螺旋神经节细胞已初具成年形态,与毛细胞已形成突触联系[2]。Cotis 器原基已经形成。本实验可以看见其表面有一些细胞突起,周围有许多纤毛,但是内外毛细胞尚无法分清,毛细胞核大,内、外柱细胞还没有分开。毛细胞间可见有内隧道和 Nuel 间隙的雏形,指细胞突起不是很明显,其他支持细胞呈柱状结构,在基底膜上排列有序。从内、外毛细胞底部可见神经纤维向蜗轴延伸。细胞在发育成熟中,细胞质增多,浆核体积比变大,细胞器增多。Sanchez 等[3]指出新生儿阶段螺旋神经节细胞的核浆比较胚胎期小,提示细胞面积与细胞成熟有关。本实验中螺旋神经节细胞质较丰富,为形态不一的类圆形或多角形,提示处于幼稚状态。Echteler 等[4]对沙鼠发育中的螺旋神经节细胞的数量进行定量研究后指出在出生后 7 d 神经细胞的数量减少 27%。Nikolic 等[5]认为细胞的增殖和凋亡在内耳形态发生中具有重要的作用。本实验中,出生后 5~7 d 的大鼠,螺旋神经节细胞体积进一步增大,细胞密度明显降低,细胞排列疏松,细胞间质增多,提示正向分化成熟的细胞过渡。此时Ⅰ型和Ⅱ型神经元还无法鉴别,神经细胞的周围突与毛细胞底部已形成突触联系。中枢突在蜗轴中的排列不齐。围绕神经元胞体的髓鞘仅含有几层疏松的神经胶质,胶质的分布与神经元突起的分布一致[6]。

神经生长因子(NGF)的发现是发育神经生物学上的一个里程碑。该因子存在于多种组织器官的发育

中[7],尤其对神经元的分化、成熟、凋亡、突触联系的建立起着重要的作用。神经生长因子都是与其相应的受体结合后发挥生理效应。NGF 的受体分低亲和力受体 $P^{75LNGFR}$ 和高亲和力受体 TrKA。大鼠出生后 1 周 $P^{75LNGFR}$mRNA 在感觉上皮和螺旋神经节有表达。Dai 等[8]用免疫组织化学技术检测大鼠、小鼠等啮齿动物内耳 TrkA 的分布发现出生后 6 d 耳蜗中可以检测到微弱的 TrkA 表达,分布于内、外毛细胞、支持细胞和螺旋神节细胞中。高亲和力 TrkA 受体被公认为 NGF 功能性受体。本实验中螺旋神经节细胞有 NGF 的表达,结合其形态特征,提示 NGF 在诱导细胞突起生长,刺激细胞肥大和细胞器的发育中起着作用。$P^{75LNGFR}$ 具有增强 NGF 和 TrKA 的结合率、逆行性运输神经营养因子等功能。有研究表明,$P^{75LNGFR}$ 与受体相关蛋白 2 相连,能促进 NGF 依赖的 NF-kB 发生核转位,从而将细胞内的死亡信号转变为存活信号,阻止细胞死亡[9]。除此之外,$P^{75LNGFR}$ 还可作为信号转导子引发或阻止凋亡。Nikolic 等[5]研究发现,大鼠位听神经节的凋亡主要发生在胚胎期和出生后早期。这个时期正是耳蜗神经建立联系的阶段。赵燕玲等[10]观察到大鼠出生后 5 ~ 7 d 螺旋神经节细胞有凋亡现象,推测可能与外毛细胞神经支配改建有关。整个内耳感觉器官的发育是在细胞的增殖和凋亡的动态平衡中进行的。本实验可见出生后 7 d 神经节细胞密度减少,细胞间质增加,提示在凋亡的发生中 NGF 与 $P^{75LNGFR}$ 发挥一定的作用。在神经系统的发育中,轴突沿特定的路线生长、延长,并伸向与它建立突触联系靶细胞或神经元的胞体、树突或轴突。神经元及其突起外围被髓鞘包裹。出生后 4 ~ 5 d,髓鞘开始包裹神经细胞的突起,第 6 ~ 8 天开始包裹细胞体。本实验中可见髓鞘 NGF 染色阳性,提示髓鞘形成细胞中的 NGF 能与神经元突起膜上的受体结合而发挥生理效应。在 Bronx waltzer (bv) 小鼠内耳离体培养中,80% 内毛细胞的丢失是由神经元细胞间突触发生的失败所致,而神经营养因子可以影响突触的发生,但只有 NGF 能成功地促进感觉神经元之间的稳定联系[11]。

NGF 是靶源性营养因子,主要由其营养的神经元的靶细胞产生,通过轴突末端受体介导,沿神经细胞轴突逆向运输到达胞体,进而对神经细胞存活、分化和功能起作用[12, 13]。因此,螺旋神经节细胞及其纤维中的 NGF 应该主要通过逆向运输来自听感觉上皮(特别是内外毛细胞)。本研究观察到内、外毛细胞染色阳性,连接毛细胞和螺旋神经节细胞的神经纤维染色阳性,提示毛细胞分泌的 NGF 通过螺旋神经节细胞的轴突,逆向运输到螺旋神经节细胞,发挥其营养效应。

通过研究出生后 5 ~ 7 d 大鼠耳蜗 NGF 的分布,我们初步探讨了 NGF 在大鼠听觉感受器和听觉神经元的发育及突触建立中的作用,从耳蜗发育生物学的角度阐述了 NGF 在耳蜗发育中的功能。

参考文献:

[1] ROMAND R, ROMAND M R. Qualitative and quantitative observations of spiral ganglion development in the rat[J]. Hear Res, 1985, 18(2): 111 - 120.

[2] BRUCE L L, CHRISTENSEN M A, WARR W B. Postnatal development of efferent synapses in the rat cochlea[J]. J Comp Neurol, 2000, 423(3): 532 - 548.

[3] SANCHEZ-DEL-REY A, SANCHEZ-FERNANDEZ J M, MARTINEZ-IBARGUEN A, *et al*. Morphologic and morphometric study of human spiral ganglion development[J]. Acta Otolaryngol, 1995, 115(2): 211 - 217.

[4] ECHTELER S M, NOFSINGER Y C. Development of ganglion cell topography in the postnatal cochlea[J]. J Comp Neurol, 2000, 425(3): 436 - 446.

[5] NIKOLIC P, JARLEBARK L E, BILLETT T E, *et al*. Apoptosis in the developing rat cochlea and its related structures[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2000, 119(1): 75 - 83.

[6] SCHWARTZ A M, PARAKKAL M, GULLEY R L. Postnatal development of spiral ganglion cells in the rat[J]. Am J Anat, 1983, 167(1): 33 - 41.

[7] ROSSI F M, SALA R, MAFFEI L. Expression of the nerve growth factor receptors TrkA and p75NTR in the visual cortex of the rat: development and regulation by the cholinergic input[J]. J Neurosci, 2002, 22(3): 912 - 919.

[8] DAI C F, STEYGER P S, WANG Z M, *et al*. Expression of Trk A receptors in the mammalian inner ear[J]. Hear Res, 2004, 187(1 - 2): 1 - 11.

[9] SCHOR N F. The P75 neurotrophin receptor in human development and disease[J]. Prog Neurobiol, 2005, 77(3): 201 - 214.

[10] 赵燕玲, 李华伟, 王正敏. 大鼠出生后发育中螺旋神经节神经元凋亡的观察[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2002, 10(3): 183 - 184.

[11] SOBKOWICZ H M, AUGUST B K, SLAPNICK S M. Influence of neurotrophins on the synaptogenesis of inner hair cells in the deaf Bronx waltzer (bv) mouse organ of Corti in culture[J]. Int J Dev Neurosci, 2002, 20(7): 537 - 554.

[12] MULLER Y, DUPERRAY C, CARUSO F, *et al*. Autocrine regulation of proliferation of cerebellar granule neurons by nerve growth factor[J]. J Neurosci Res, 1994, 38(1): 41 - 55.

[13] 席　恺, 董明敏. 新生豚鼠海马神经干细胞的分离培养及鉴定[J]. 郑州大学学报:医学版, 2005, 40(3): 471 - 473.

(编辑　薛国文)