

CNTF 对 RGCs 再生的作用

郑建龙 唐宝丰 朱益华

作为中枢神经系统一部分的视神经损伤后缺乏神经修复和再生所需的微环境,因此视神经损伤后的治疗和功能的恢复是临床上的一大难题。神经再生潜能是在适宜的微环境条件下发生轴突侧支出芽和突触重建,当周围神经系统提供适宜的微环境就有可能促进中枢神经再生。若将周围神经移植到受损的中枢神经局部,改变中枢神经的微环境即能显著促进中枢神经再生。CNTF 是一种多效能的神经营养因子,对多种神经元的存活以及 RGCs 均有支持作用,能够促进多种神经细胞的存活,并在视网膜移植中延迟感光细胞的消亡^[1]。因而它在神经系统发育、分化和损伤修复中具有非常重要的作用。

一、CNTF 的来源、分布

CNTF 最初是自鸡胚眼的虹膜、脉络膜、睫状体抽提物中分离出的一种能促进鸡胚睫状神经节神经元存活的蛋白质,并因此而得名。CNTF 仅分布在神经系统的非神经细胞。在周围神经系统中 CNTF 的浓度大约是 5nmol/kg。在周围神经系统中 CNTF 的合成直接或间接接受来自轴突的信号调控。在出生前和新生鼠检测不到 CNTFmRNA 的存在。但在出生后第 2W 坐骨神经中的 CNTFmRNA 和蛋白质急剧增加。CNTF 也存在于中枢神经系统,但其浓度低于周围神经系统,在视神经和嗅神经中 CNTFmRNA 的浓度较高。CNTF 的合成量在脑损伤后迅速上升,是中枢神经系统的损伤修复因子。

二、CNTF 的受体

CNTF 通过与 CNTF 受体相结合而发挥其生物效应,CNTF 受体由 3 个亚基组成,即 α , LIFR β 和 gp130。 α 亚基仅特异性地结合 CNTF, LIFR β 亚基结合 CNTF 和白细胞抑制因子,并在运动神经元的存活中起重要作用,在老鼠胚胎发育中,缺乏 α 或 LIFR β 受体则有大量的运动神经元丢失,而 gp130 能与 IL 家族中的其他几种细胞因子相结合^[2]。

视神经损伤后,视网膜的 CNTFmRNA 表达水平升高,说明内源性的 CNTF 反应性升高能够应答 RGCs 的轴索损伤。Mey 等^[3]的研究表明,成年鼠视神经轴突切断后 3W,只有 7% 的 RGCs 存活,而在轴突切断后玻璃体内单次注射 CNTF(0.5ng/g),伤后 3W 仍有 26% 的 RGCs 存活。Cui 等^[4]的研究表明在众多的神经营养因子中,CNTF 是惟一能有效促进成年仓鼠 RGCs 再生的营养因子,并且治疗效果与剂量相关。其中 CNTF 的结合蛋白 CNTFRa 具有较高的保守性,是一种糖蛋白,由 372 个氨基酸组成。人、大鼠 CNTFRa 的氨基酸序列有 94% 的同源性。CNTFRa 在体内存在两种活性形式:锚着型 CNTFRa 与可溶性 CNTFRa。这两种形式均有功能,都能起激活作用。gp130 和 LIFR β 属于细胞因子受体家族成员,CNTF 和成血细胞因子共用这两个受体成分。在 CNTF 受体复合物中,gp130 和 LIFR β 两个亚基作为信号传递体。在周围神经雪旺细胞中存在大量的 CNTF,当周围神经受损伤,CNTF 得以释放进入细胞间隙,释放于损伤处的 CNTF 可通过轴突逆向转运到胞体,也可以和肌肉中存在的可溶性 CNTFRa 和 CNTF 形成复合物而发挥促神经损伤修复的作用。周围神经损伤时,肌肉组织 CNTFRa 的表达增加数十倍,可溶性 CNTFRa 和 CNTF 形成的复合物大大增多,从而有利于神经的修复^[2]。CNTF 受体不仅存在于周围神经系统,在中枢神经系统也广泛存在,在皮层、海马、侧脑室、黑质、小脑以及一些脑干核团,都有 CNTFRa mRNA 的表达,同时在脑脊液中也存在可溶性的 CNTFRa。在脊髓腹侧角运动神经元中,CNTFRa mRNA 大量表达,在与运动有关的脑区、肌肉组织中也都有 CNTFRa mRNA 的表达。当支配骨骼肌的神经去除后,骨骼肌中 CNTFRa mRNA 水平急剧升高,皮下给予大鼠外源性的 CNTF 能够阻止去神经引起的比目鱼肌萎缩。CNTFRa 在发育期视网膜上高水平表达,表明其在视觉系统发育期间起重要作用。CNTF 能诱导纯化的 RGCs 的广泛地轴突外生,具体机制不详。可能 CNTF 阻止切断的轴突在损伤部

基金项目:福建省科技厅重点项目(编号:C0520003);国家自然科学基金项目(编号:30471867)

作者单位:350005 福州,福建医科大学附属第一医院眼科

通讯作者:郑建龙,E-mail:zhengjianlong200409@tom.com

位的逆向死亡, 改变生长圆锥的行为使其突破抑制性环境, 增加轴突通路上的视网膜、生长圆锥、胶质细胞 CNTF 受体水平, 增加 RGCs 的内在生长潜能。Qiang lu 等^[5]在视神经损伤中发现, 原先在正常状态下不表达原癌基因 c-jun 的 RGC, 在视神经损伤后出现微弱的表达, 且在损伤六周内存活出现 c-jun 阳性的细胞数中的 RGC 达到 52.6%–86.5%, 而使用 CNTF 治疗后, 其所占比例更高, 故 c-jun 与 RGCs 再生中有密切关系。

三、CNTF 促进损伤的视神经再生的作用方式

CNTF 具有多种生物学效应, 被认为是唯一的能促进 RGCs 存活及轴突再生双重作用的神经营养因子^[6]。玻璃体腔内持续注射重组睫状神经生长因子 (rhCNTF), CNTF 持续应用可能通过: (1) 替代靶源性的神经营养因子或促进其逆向运输, 增强视网膜神经节细胞对原发损伤尤其是继发损伤的抵抗能力, 减轻轻微损伤和未损伤的神经元继发性、凋亡, 恢复正常细胞功能, 及时合成大量轴突修复和轴突延长所需的结构和功能物质, 增加轴浆运输的速度, 从而起到对 RGCs 较长期的保护作用, 而延缓了神经组织变性的进程, 保存相对较多的神经纤维; (2) 加强神经细胞内物质合成和新陈代谢, 缓解组织水肿, 减轻局部压力, 改善神经组织内环境, 而有利于病变的神经纤维轴浆运输功能的恢复; (3) 增强其再生反应^[7], 不全损伤后再生轴突的延长可能也参与轴浆运输的恢复, 而逆行的轴浆运输恢复又可促进神经元存活和再生。目前发现玻璃体内注射 CNTF 后可明显促进 RGCs 轴突的再生, 多次注射 CNTF 后有高达 26% 的 RGCs 轴突可再生进入外周神经移植体。另外 CNTF 还能使非常少量的 RGCs (约 0.5%) 穿越损伤部位进入视神经远端 CNTFRa 及 mRNA 在发育的视网膜中高度表达, 表明 CNTF 在视觉系统发育和视网膜损伤反应中可能起着非常重要的作用。Kirsch 等^[8]发现 CNTF 对视杆细胞的分化起着负性调节的作用, 而且作用于光感受器前体细胞而且促进光感受器的成熟和发育。

在视神经损伤中, RGCs 合成的轴突再生所需营养物质以及神经源性或靶源性的神经营养因子均依赖于轴浆运输。轴突损伤造成神经组织水肿、束内压增高, 神经轴突缺氧及微循环障碍、线粒体及微管微丝等细胞器肿胀、崩解, 能量合成降低, 物质合成不足, 轴浆传导功能障碍。Hanke^[9]实验证明一定程度的不全视神经损伤随着神经水肿的消退 2–3W 后顺行和逆行的轴浆运输可部分恢复。应用 CNTF 可促进和增强视神经不全损伤后轴浆运输能

自发性部分恢复能力。视神经损伤后视网膜内源性 CNTF 升高以应答 RGC 轴索损伤, 保护 RGC, 同时提示外源性 CNTF 能保护视神经损伤后 RGC 的变性死亡, 促进视神经损伤修复。CNTF 可以阻止成年鼠丘脑前腹侧横断所引起的神经元退行性变性和死亡。并在视神经损伤后视网膜的 CNTF mRNA 表达水平升高, 玻璃体内单次注射 CNTF, 可以延迟由于视神经损伤所致的 RGC 变性死亡。Honjo^[10]在甲基天冬氨酸 (NMDA) 与红藻氨酸 (KA) 致鼠视网膜损害模型中发现, 视网膜 Muller 细胞的 CNTF 表达增强, 在 MMDA 和 KA 注射前 2d 给予重组鼠 CNTF 能减轻 MMDA 和 KA 对视网膜的损害, 提示可能 Muller 细胞产生的 CNTF 可能是视网膜内源性神经保护系统的一部分。

四、CNTF 与视神经再生

发育期哺乳动物中枢神经系统神经元损伤后具有非常有限的轴突再生能力, 而通常在成年动物则完全不能再生。神经轴突切断后神经元死亡和轴突难以再生主要与以下两个因素有关: (1) 轴浆运输障碍导致来源于中枢靶组织及其通路的营养因子。(2) 供应的中断; 经生长抑制因子的存在。大部分 RGCs 死亡, 存活的少量 RGCs 也不能与突触后神经元重建功能性联系, 只在视神经轴突切断断端观察到少量轴突发芽。视神经损伤的部位对 RGCs 轴突再生长度有影响, 一般来讲, 视神经损伤部位离眼越远, RGCs 轴突再生能力越低。在远端轴突切断比近端轴突切断中, RGC 在后者的再生的数量较少。

Stankoff 等^[11]发现 CNTF 通过 Janus 激酶途径转导作用于少突胶质细胞, 使其最终发育成熟。Mark^[12]等发现 CNTF 还可以增加内源性间隙连接蛋白 -43 的水平和细胞间的耦联, 阻止神经胶质瘤细胞的生长。Andrew 等^[13]通过给老鼠喂一定剂量半乳糖使其出现糖尿病, 后研究 CNTF 对其的影响发现, CNTF 能通过醛糖还原酶的新陈代谢抑止血糖过高的老鼠神经功能的紊乱发生。

五、CNTF 在转基因动物中的功能

CNTF 作为神经营养因子能够促进多种神经细胞的存活, 在神经系统发育、分化和损伤修复中具有重要作用, CNTF 不仅可以在体外促进 RGCs 存活和生长, 也可以在体内起作用, 显著延缓视神经损伤后 RGCs 细胞的死亡, 提高早期存活率。在切断鼠的视神经致 RGC 凋亡变性实验研究中^[14], 转基因鼠 bcl-2 基因过度表达, 受伤后 3.5 个月, 约有 65% RGC 存活, 相比之下, 非转基因鼠 RGC 存活不足 10%。因此, 增加 bcl-2 蛋白的表达有可能对

抗损伤,免遭破坏,预防和阻滞 RGCs 死亡。视神经损伤后对 RGCs 的保护主要是停止或防止其发生凋亡。CNTF 通过上调 bcl-2 基因的表达,而减轻视神经损伤后 RGCs 凋亡发生的强度,延长 RGCs 存活的时间。Chierzi 等^[15]在转基因小鼠中的研究结果也证明了视神经损伤后 RGCs 的凋亡。他分别对野生型和 bcl-2 转基因小鼠造成视神经的挤压损伤 RGCs,发现二者在 RGCs 中均过量表达 bcl-2 基因。Huang 等^[16]在体外培养的 RGCs 中加入不同剂量的锂,发现锂不仅能维持 RGCs 存活,而且还能促进其轴突再生,RGCs 的 bcl-2 表达增加,如果抑制 bcl-2 的表达,锂的作用被消除,说明锂通过 bcl-2 机制促进 RGCs 的存活与再生,但 bcl-2 的高表达仅减轻视神经损伤后 RGCs 凋亡发生的强度,延长 RGCs 存活的时间,并不一定伴有 RGCs 再生。在发育成熟的视网膜内,CNTF 主要在 RGCs 内表达,当视网膜受到机械或光损伤、缺血后或视神经横断伤后,不仅 RGCs 内 CNTF 的表达明显增加,而且在 Muller 细胞内也出现明显的 CNTF 表达。在体外培养条件下加入 CNTF 可以使 RGCs 及光感受器的存活增加;直接向玻璃体内注射 CNTF 或通过腺病毒、腺相关病毒导入 CNTF 编码基因时,可明显增加小鼠光感受器的存活率,增加视神经横断伤后 RGCs 的存活率。在视网膜下移植睫状神经营养因子编码基因修饰的细胞保护 SD 大鼠视神经横断伤后 RGCs 变性研究中发现^[17],通过视网膜下移植 CNTF 编码基因修饰的细胞,观察到高水平表达 CNTF 的细胞对 SD 大鼠视神经横断伤后 RGCs 变性具有一定的保护作用,表现在明显延缓 RGCs 的死亡。移植后 5d, RGCs 仍然保持正常的形态,细胞移植后 14d,不仅存活的 RGCs 数量较多,而且仍保持圆形、饱满的 RGCs 数也明显增多。细胞经体外基因转染修饰后再回输到体内治疗疾病或纠正遗传缺陷是基因治疗的一种方法或策略。其优点是能够保证回输的细胞高水平并稳定表达靶基因。在视网膜下作细胞移植比在身体其他部位和器官作细胞移植具有明显的优势,移植细胞不仅局限在移植部位,还可扩展到周边部,甚至遍布整个视网膜,异种细胞也能在兔眼视网膜下间隙内存活 1 年以上,并与宿主的感光细胞建立正常的解剖关系。由于 CNTF 在视网膜局部源源不断地产生并直接发挥作用,避免了分离纯化等繁杂的步骤,可以最大限度地保存 CNTF 的生物活性并发挥其治疗作用。

六、展望

由于 RGCs 的再生机制尚不十分清楚,加强 RGCs

再生的机制的研究,对临床上各种视神经损伤的病人,视网膜功能的恢复非常有意义,增加内源性 CNTF 的表达或补充外源性 CNTF,将是临床治疗视神经损伤的一个新途径并有很大的前景。

参 考 文 献

- 1 Romeo Caffè, Annika K. Soderpalm, Inger Holmqvist, et al. A Combination of CNTF and BDNF Rescues rd Photoreceptors but Changes Rod Differentiation in the Presence of RPE in Retinal Explants [J] IOVS, January 2001, Vol. 42, No. 1
- 2 Ulrich Schweizer, Jennifer Gunnersen, et al. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *The Journal of Cell Biology*. 2002, 156(2)
- 3 Mey Thanos S Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res* 1993; 602: 2304-17
- 4 Cui Q, Lu Q, S0 K, et al. CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 3760-6
- 5 Qiang Lu, Henry K. Yip, et al. c-Jun Expression in Surviving and Regenerating Retinal Ganglion Cells: Effects of Intravitreal Neurotrophic Supply. *IOVS*, 2003, 44(12)
- 6 Cui Q, S0 KF, Yip HK, Major biological effects of neurotrophic factors on retinal ganglion cell in mammal [J]. *Biol Signal Recept* 1998; 7(4):220-226
- 7 叶剑, 王正国, 朱佩芳. 睫状神经营养因子在视神经损伤修复中的作用, *中华创伤杂志*, 2001 年 1 月第 17 卷第 1 期
- 8 Matthias Kirsch, Steffen Schulz-Key, et al. Ciliary neurotrophic factor blocks rod photoreceptor differentiation from postmitotic precursor cells in vitro. *Cell Tissue Res* (1998) 291:207-216
- 9 Hanke J. Anatomical correlation of intrinsic axon repair after partial optic nerve crush in rats [J]. *Ann Anat*, 2002, 184(2):113-123
- 10 Honjo M, Tanibera H, Kido N, et al. Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41; 552-560
- 11 Stankoff, Marie-Stephane Aigrot, et al. Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Enhances Myelin Formation: A Novel Role for CNTF and CNTF-Related Molecules. [J] *Neuroscience*, 2002, 22(21):9221-9227
- 12 Mark A. Ozog, John F, et al. Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) in Combination with Its Soluble Receptor (CNTFR α) Increases Connexin43 Expression and Suppresses Growth of C6 Glioma Cells. *Cancer research* 2002, 62:3544-3548
- 13 Andrew P, Mizisin, Yvonne Vu, et al. Ciliary Neurotrophic Factor Improves Nerve Conduction and Ameliorates Regeneration Deficits in Diabetic Rats. *Diabetes*, VOL. 53, JULY, 2004
- 14 夏翠然, 徐亮. 青光眼视网膜神经节细胞损伤及其保护, *国外医学眼科学分册*, 2001 年, 25(1):36-42
- 15 Chierzi S, Strettoi E, Cenni MC, et al. Optic nerve crush: Axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice [J]. *J Neurosci*, 1999
- 16 Huang X, Wu DY, Chen G, et al. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2 dependent mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 347-354
- 17 李惠明, 陆世铎, 夏欣, 徐萍, 王丰, 黄倩. 视网膜下移植睫状神经营养因子编码基因修饰的细胞保护 SD 大鼠视神经横断伤后视网膜节细胞变性, *中华眼科杂志*, 2005; 41(2)

(收稿时间: 2006-05)