

[文章编号] 1000-1182(2010)01-0095-04

p75神经营养蛋白受体基因敲除 对小鼠面神经损伤后神经再生的影响

张风河¹ 黄萍² 杨丕山¹ 张雪¹

(1.山东大学口腔医院 口腔颌面外科; 2.山东大学齐鲁医院 放疗科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的 探讨p75神经营养蛋白受体(p75NTR)在面神经损伤后神经再生中的作用。方法 对p75NTR基因敲除小鼠和野生型129sv小鼠的一侧面神经总干在神经出颅2 mm处进行损伤, 损伤后第2天, 一部分小鼠在神经干损伤的近中侧注射霍乱毒素B(CTB)进行逆行示踪标记, 损伤后3、7 d, 应用免疫组织化学方法对神经纤维再生轴突进行长度测定及计数分析。另一部分小鼠在面神经总干损伤后第4天切断神经, 将切断的面神经断端置入含有Fast Blue的聚氯乙烯单端小管中进行逆行示踪标记, 荧光显微镜下对面神经核运动神经元进行计数分析。结果 p75NTR基因敲除小鼠与野生型129sv小鼠相比较, 再生的神经纤维轴突长度明显不足, 二者间面神经核再生运动神经元数量差异有统计学意义($P<0.05$)。再生轴突的免疫组织化学染色表明, p75NTR基因敲除小鼠再生的神经纤维轴突数量也明显降低($P<0.01$)。结论 p75NTR基因可以增强面神经的再生。

[关键词] p75神经营养蛋白受体; 霍乱毒素B; 再生; 基因敲除

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.01.025

Influence of p75 neurotrophin receptor knockout on the regeneration of facial nerves after crush injury in mouse ZHANG Feng-he¹, HUANG Ping², YANG Pi-shan¹, ZHANG Xue¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Radiotherapy, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of p75 neurotrophin receptor(p75NTR) in the regeneration of facial nerve crush injury. **Methods** In p75NTR knockout mice and wild type mice, the regenerating fibres in the facial nerve were also labelled by an anterograde tracer cholera toxin B(CTB). The next day after injury of facial nerve, CTB was injected into the trunk of the nerve in the proximal side of the crush, and then anterograde tracing and immunohistochemistry were used to examine the regeneration of axons after facial nerve crush injury. In p75NTR knockout mice and wild type mice, the facial nerves on one side were crushed and regenerating neurons in the facial nerve nucleus were labelled by Fast Blue. The facial nerve trunk was cut in the bifurcated region in the 4th day after injury and the stump was inserted into a small polymer tube containing Fast Blue. Retrograde tracing and labling motoneuron counting were used to examine the survival of motoneurons in the facial nerve nucleus after facial nerve crush injury. **Results** The results showed that the axonal growth of injured axons in the facial nerve of p75NTR knockout mice was significantly retarded. The number of regenerated neurons in the facial nerve nucleus in p75NTR knockout mice was significantly reduced($P<0.05$). Immunohistochemical staining of regenerating axons also showed the reduction in nerve regeneration in p75NTR knockout mice($P<0.01$). **Conclusion** p75NTR plays an important role in the regeneration of injured peripheral nerves after injury.

[Key words] p75 neurotrophin receptor; cholera toxin B; regeneration; knockout

神经营养蛋白在神经发育和功能维持方面起着重要作用, 其功能作用的信号传导主要是通过2种受体来完成, 即酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein

kinase, Trk)受体(TrkA、TrkB、TrkC)和p75神经营养蛋白受体(p75 neurotrophin receptor, p75-NTR)。研究表明, 单纯抑制p75NTR并不能提高脊髓的再生^[1], 但在发育和周围性神经损伤中, p75NTR在雪旺氏细胞髓鞘化以及再髓鞘化中是必需的^[2]。在周围神经的雪旺氏细胞中, 神经损伤是p75NTR表达的有力刺激因素^[3], 这提示p75NTR在周围神经再生调控

[收稿日期] 2009-01-13; [修回日期] 2009-11-21

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Y2008C54)

[作者简介] 张风河(1965—), 男, 山东人, 教授, 博士

[通讯作者] 杨丕山, Tel: 0531-88382368

中具有重要作用。然而，p75NTR在损伤的周围神经再生中是正向还是反向调控作用目前仍不清楚，本研究对p75NTR在p75NTR基因敲除小鼠面神经损伤后再生中的作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

选取由澳大利亚弗林德丝大学医学中心提供的实验动物90只，其中野生型129sv小鼠和p75NTR基因敲除小鼠各45只。年龄6~8周，体重25~29 g，健康，雌性，手术后在相同标准条件下喂养。2种小鼠用于霍乱毒素B(cholera toxin B, CTB)顺行标记和免疫组织化学检测各35只(其中各5只通过顺行标记方法观察再生轴突长度)，用于Fast Blue逆行标记各10只。

1.2 实验仪器和试剂

Olympus SZX-12解剖显微镜(Olympus公司，日本)，Leica冷冻切片(Leica公司，德国)，微量注射器(Hamilton公司，美国)，CTB、Fast Blue、鼠生长相关肽43抗体(GAP43)(Sigma公司，美国)，羊CTB抗体(List Biologicals公司，美国)，兔抗-PGP9.5(1:5 000)(Invitrogen公司，美国)，兔抗钙基因相关肽(rabbit anti-calcitonin gene related peptide, CGRP)(Merke公司，德国)。

1.3 方法

1.3.1 面神经损伤及位置记录 采用 $1 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ 氯胺酮和 $0.5 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ illumxylazil腹腔注射麻醉90只小鼠，常规消毒铺巾，在右侧耳根部做1 cm弧形切口，沿着外耳道向下分离，显微镜下仔细分离结缔组织后解剖出面神经干，牵引开腮腺组织暴露神经分叉及前端的分支，然后用特制的夹持钳在距胸锁乳突窝神经出颅2 mm处夹持30 s，然后松开旋转90°再夹持30 s，显微镜下观察可见神经形成透明带的度损伤。左侧不损伤，作为对照。为标记神经损伤的精确部位，将0/8丝线缝合于损伤处神经外膜上。

1.3.2 面神经核运动神经元再生的逆行标记 在面神经损伤手术后第4天，选取野生型129sv小鼠和p75NTR基因敲除小鼠各10只重新打开创口，在面神经总干分叉处切断，然后将近中残端置入含有5% Fast Blue的 $0.2 \mu\text{L}$ 一端封闭的聚氯乙烯小管中。经固定后，分层缝合。手术后第7天，在水合氯醛腹腔麻醉下，经心脏4%多聚甲醛全身灌注，然后取出脑干，置于4%多聚甲醛中充分固定24 h，然后依次置于10%、20%、30%的蔗糖缓冲液中过夜， -20°C 冷冻连续切片($16 \mu\text{m}$)，直接贴到明胶处理过的玻片上，干燥后置于PBST溶液中清洗后封片，在荧光

显微镜下对面神经核运动神经元进行计数分析。

1.3.3 神经元计数 在荧光显微镜下由其他研究人员进行双盲计数，观察光的波长为370 nm。计数时每3个连续切片计数1个，只计算含有细胞核的神经元，将得到的实验侧和对照侧面神经核神经元细胞总数相除，每只小鼠得到1个百分比。

1.3.4 面神经损伤后轴突再生的顺行标记 手术后第2天，选取野生型129sv小鼠和p75NTR基因敲除小鼠各5只重新打开创口，在损伤近心端微量注射器注射CTB $0.2 \mu\text{L}$ ，停留1 min以免渗漏。手术后第3天，水合氯醛腹腔麻醉下，经心脏4%多聚甲醛全身灌注，取出面神经。神经取出后，置于4%多聚甲醛中充分固定24 h，然后依次置入10%、20%、30%的蔗糖缓冲液中过夜， -20°C 冷冻连续切片($20 \mu\text{m}$)，以备做CTB免疫组织化学。

1.3.5 免疫组织化学检测 将顺行标记3 d后以及损伤后7 d的面神经标本进行冷冻切片，直接贴到明胶处理过的玻片上，待干燥后，用PBST清洗，阻断并用20%普通马血清(normal horse serum, NHS)进行孵育2 h。分别加入羊CTB抗体(1:10 000)、GAP-43(1:500)、兔抗-PGP9.5(1:5 000)以及CGRP过夜。PBST彻底冲洗后加入适当的FITC标记二抗(1:100) 2 h，经过充分的清洗，标本放在荧光显微镜下观察。为观察CTB标记的再生轴突长度，在面神经损伤处远中不同距离对标记阳性的神经纤维进行测量。应用GAP43、PGP9.5和CGRP进行再生轴突的计数，于面神经损伤远中3 mm处获取图像，在选取的断面划一条神经长轴垂直线，对经过此线且对3种标记物有免疫反应的所有再生轴突进行计数。然后计算平均数作为每个断面标记纤维的数量。

1.4 统计学分析

采用SPSS 12.0统计软件对数据进行分析，各组所获得的平均及百分比数据进行t检验分析。

2 结果

2.1 p75NTR敲除对轴突再生速度的影响

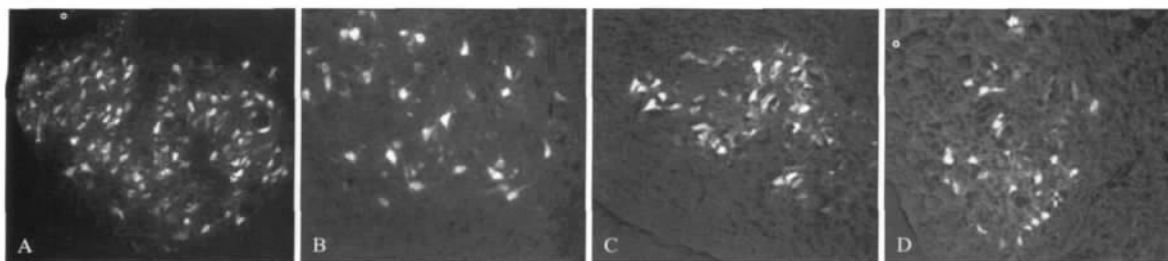
面神经损伤后，将顺行标记物CTB注射到损伤神经点的近中来标记轴突生长速度。损伤3 d后，野生型129sv小鼠轴突再生速度可以达到每天2 mm。损伤后3 d新生轴突最多可以达到6 mm。相比较而言，p75NTR基因敲除小鼠轴突生长速度大大低于野生型小鼠，一般不超过每天1 mm，损伤后3 d新生轴突最多可以达到2.5 mm。

2.2 p75NTR敲除对运动神经元再生的影响

面神经损伤7 d后，p75NTR基因敲除小鼠面神经核运动神经元的数量比野生型129sv小鼠有显著降

低(图1)。野生型129sv小鼠实验侧运动神经元标记指数为(77.8±4.5)% , p75NTR基因敲除小鼠实验

侧运动神经元标记指数为(53.1±5.2)% , 二者间差异有统计学意义($P<0.05$)。



A、B: 野生型129sv小鼠对照侧、实验侧; C、D: p75NTR基因敲除小鼠对照侧、实验侧。

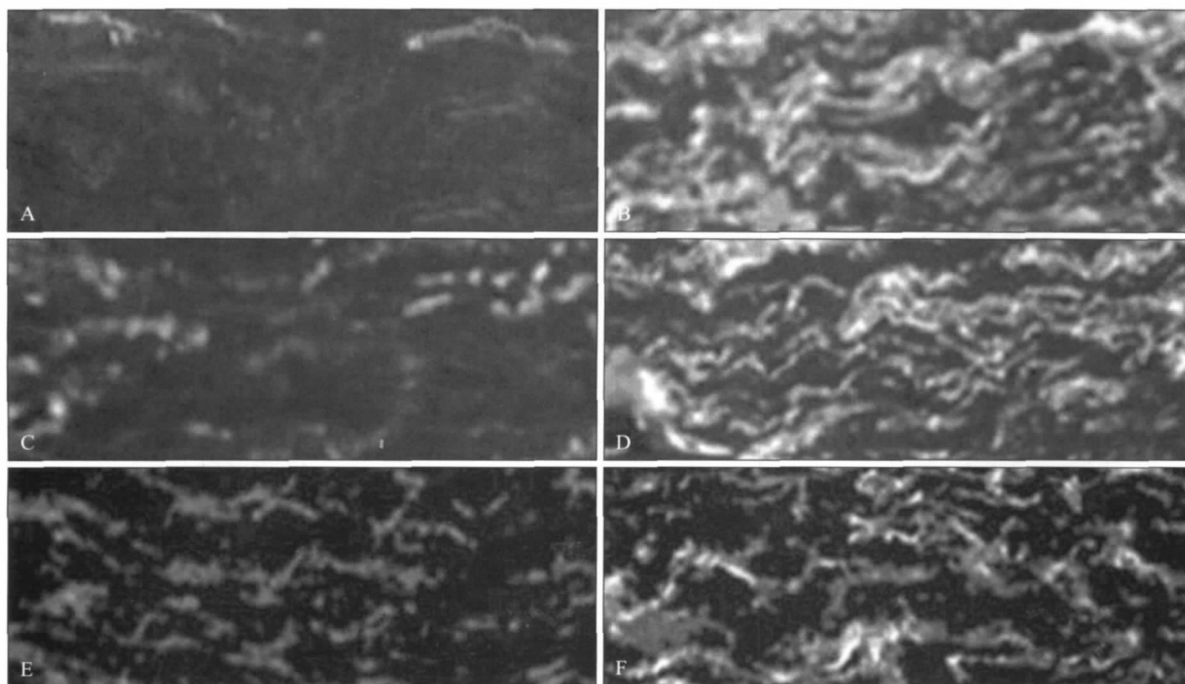
图1 野生型129sv小鼠和p75NTR基因敲除小鼠面神经损伤后面神经核运动神经元再生情况 荧光显微镜 ×100

Fig 1 The regeneration of facial motoneurons in the facial nerve nucleus in wild type 129sv mice and p75NTR knockout mice fluorescence microscope ×100

2.3 p75NTR敲除对轴突再生数量的影响

为观察神经再生轴突数量, 损伤神经的远中部分进行GAP43、PGP9.5和CGRP染色, 2种小鼠在神经损伤远中3 mm处再生的神经纤维都会出现对这些标记物的免疫反应(图2)。定量检测表明野生型

129sv小鼠对GAP43、PGP9.5及CGRP产生免疫反应的纤维数量分别为27.5±3.2、38.6±4.1、20.4±2.9。而p75NTR基因敲除小鼠对GAP43、PGP9.5及CGRP产生免疫反应的纤维数量分别为14.2±2.2、20.8±3.4、9.7±2.1, 二者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。



A、C、E: 分别为p75NTR基因敲除小鼠面神经纤维对GAP43、PGP9.5、CGRP产生的免疫反应; B、D、F: 分别为野生型129sv小鼠面神经纤维对GAP43、PGP9.5、CGRP产生的免疫反应。

图2 野生型129sv小鼠和p75NTR基因敲除小鼠面神经损伤后面神经纤维对GAP43、PGP9.5、CGRP产生的免疫反应 荧光显微镜 ×400

Fig 2 The facial nerve fibres immunoreactive for GAP43, PGP9.5 and CGRP in wild type 129sv mice and p75NTR knockout mice fluorescence microscope ×400

3 讨论

先前的许多研究试图去探索p75NTR在神经再生中的功能性作用, 但所得结论是有争议的, 这可能归因于研究分析所采用的不同模型和不同方法。通过一个胫腓总神经受损的模型, Boyd等^[4]发现p75NTR敲除的小鼠未受损的运动神经元数量减少但再生的

运动神经元的相对数量却明显增加了。在脊神经背根被横切的模型中, p75NTR敲除的小鼠背角中检测到更多的单胺能神经元的再生和基本的传入^[5]。上述研究似乎表明p75NTR在神经元中的存在可能会对轴突的生长和再生造成阻碍。但本研究发现在面神经挤压性损伤的模型中, p75NTR基因敲除小鼠神经元的再生速度和再生神经元的数量明显下降。利用

在CTB下的逆行追踪技术,发现p75NTR基因敲除小鼠轴突生长速度相对于野生型小鼠来说要慢的多。利用逆行追踪技术发现面神经核中再生的运动神经元的数量在p75NTR基因敲除小鼠中也明显减少。从CGRP、PGP9.5和GAP43标识阳性的轴突中得到的数据也显示p75NTR基因敲除小鼠外周神经轴突再生的延迟性,从而证明p75NTR的存在是外周神经运动轴突快速生长的关键。

p75NTR在外周神经中促进轴突生长的机制可能和受伤后雪旺氏细胞中神经营养因子浓度变化有关。周围神经受损后,雪旺氏细胞中的神经营养因子和p75NTR将会上调^[6]。其原因是p75NTR在雪旺氏细胞中扮演神经营养因子聚集底物的角色,可以在局部建立神经营养因子梯度方面起关键作用。研究发现p75NTR在卫星细胞中的上调与因外周神经损伤而侵犯脊神经背根神经节形成篮状结构的异常去甲肾上腺素能神经再生相关联^[7]。由于篮状结构的形成需要p75NTR的表达,表明神经胶质中p75NTR与轴突再生和生长有关。雪旺氏细胞表面p75NTR的缺失将会导致神经损伤后的神经营养因子梯度的丧失和再生轴突生长的延迟或侧突轴突的生长。

另外,在雪旺氏细胞和外周神经元中p75NTR可能会产生受体介入膜内蛋白水解作用(the receptor-mediated intramembrane proteolysis, RIP)^[8-9]。RIP在髓鞘伴蛋白质引起的轴突崩解的小脑神经元中是需要的^[10]。p75NTR的RIP产物在细胞外可能会中和髓鞘抑制因子对再生神经元的作用和促进神经元的再生。但是,仍无法解释对神经再生起积极作用的p75NTR不仅仅在受损的雪旺氏细胞和卫星神经胶质细胞中表达,其同时也在运动和感觉神经元中高度表达。p75NTR在神经元表达的同时显示了促进和抑制作用。当外周神经也表达髓鞘抑制因子时,这些神经元中的p75NTR可以通过NgR/LINGO-1/p75NTR受体通道对这些抑制因子作出反应导致轴突崩解^[11]。本研究发现p75NTR基因敲除小鼠的轴突再生出现延迟,表明NgR/LINGO-1/p75NTR信号在外周神经中不是显性的。但是需要利用条件性敲除的模型或体外培养模型作进一步的研究去区分神经元p75NTR和神经胶质p75NTR对神经再生和轴突生长的作用。

p75NTR还可以通过调节雪旺氏细胞迁移来影响周围神经发育。雪旺氏细胞对轴突生长具有重要作用,生长期轴突和雪旺氏细胞之间具有双向信号调节。因此,雪旺氏细胞可以调控轴突发育,轴突也可以反向调控雪旺氏细胞的迁移^[12]。对轴突及其相关的雪旺氏细胞进行电镜观察,发现在发育中的轴突上雪旺氏细胞数量确实减少,这表明在发育中

的轴突上雪旺氏细胞的再髓鞘化被严重破坏,这说明p75NTR对雪旺氏细胞发育以及神经元具有多功能的调节作用^[13]。由于p75NTR在神经元和雪旺氏细胞中都有表达,因此在神经的发育中p75可能在动态的双向活动中有重要作用。

致谢:感谢澳大利亚弗林德丝大学周新富教授在本研究中的帮助。

[参考文献]

- [1] Song XY, Zhong JH, Wang X, et al. Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(2) 542-546.
- [2] Song XY, Zhou FH, Zhong JH, et al. Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice[J]. *J Neurochem*, 2006, 96(3) 833-842.
- [3] Johnson EM Jr, Taniuchi M, DiStefano PS. Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells [J]. *Trends Neurosci*, 1988, 11(7) 299-304.
- [4] Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 15(4) 613-626.
- [5] Scott AL, Borisoff JF, Ramer MS. Deafferentation and neurotrophin mediated intraspinal sprouting: A central role for the p75 neurotrophin receptor[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(1) 81-92.
- [6] Funakoshi H, Frisén J, Barbany G, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve[J]. *J Cell Biol*, 1993, 123(2) 455-465.
- [7] Zhou XF, Li HY. Roles of glial p75NTR in axonal regeneration [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(8) :1601-1605.
- [8] Ahmed Z, Mazibrada G, Seabright RJ, et al. TACE-induced cleavage of NgR and p75NTR in dorsal root ganglion cultures disinhibits outgrowth and promotes branching of neurites in the presence of inhibitory CNS myelin[J]. *FASEB J*, 2006, 20(11) : 1939-1941.
- [9] Ahmed Z, Suggate EL, Brown ER, et al. Schwann cell-derived factor-induced modulation of the NgR/p75NTR/EGFR axis disinhibits axon growth through CNS myelin *in vivo* and *in vitro*[J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 6) :1517-1533.
- [10] Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, et al. MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth[J]. *Neuron*, 2005, 46(6) 849-855.
- [11] Pot C, Simonen M, Weinmann O, et al. Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury[J]. *J Cell Biol*, 2002, 159(1) 29-35.
- [12] Bhattacharyya A, Brackenbury R, Ratner N. Axons arrest the migration of Schwann cell precursors[J]. *Development*, 1994, 120 (6) :1411-1420.
- [13] Mandemakers WJ, Barres BA. Axon regeneration: It's getting crowded at the gates of TROY[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(8) R302-R305.