

tained plasmid was successfully expressed in human liver cancer cells(SMMC-7721). All data suggest that telomerase antisense RNA could significantly inhibit the telomerase activity and proliferation of cells, prolong cell's doubling time and induce the apoptosis of cells.

Key words: Telomerase Apoptosis hTR

P 物质在再生视网膜节细胞中的表达及 IBMX 和 CPT-cAMP 对其表达的影响 *

朱永红 李海标

(中山医科大学组胚教研室 广州 510089)

大量的研究表明脊髓、脑干、大脑皮层和视网膜的某些神经元损伤后可以再生其轴突进入缝合的外周神经的节段内^[1-4]。也有报道,同一脑区神经元的再生能力有明显的不同,有些神经元的再生能力比其他类型的神经元强^[5]。然而,中枢神经元再生能力的不同是由于它们所含递质不同,还是轴突再生的分子机制及再生基因表达的不同所引起,至今尚未知。由于视网膜节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的胞体和髓鞘包裹的轴突易分离和观察,所以视网膜做为轴突再生模型已沿用多年。研究表明外周神经(PN)移植能促进受损的 RGCs 的再生。由于神经营养因子对中枢神经元再生有一定的促进作用,近年来在这方面做了大量的工作,结果显示,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)和睫状源性神经营养因子(CNTF)对中枢某些神经元的存活和再生有促进作用,但是否能促进中枢 P 物质神经元再生则未见报道。我们在研究 P 物质在 RGCs 定位、外周神经缝接及 IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)和/或 CPT-cAMP(CPT-环磷酸腺苷)能促进 RGCs 再生的基础上^[6,7],探讨 P 物质阳性的 RGCs 能否再生以及 IBMX 和(或)CPT-cAMP 对其再生的影响。

材料和方法

1. 实验动物及分组

16 只成年雄性金黄地鼠(*Mesocricetus auratus*),体重 80-100 克,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(attached graft),近端切断视神经(ON),ON 近侧残端与一段坐骨神经移植缝合;②AG + IBMX 组,在①组的基础上加玻璃体内注射 IBMX;③AG + CPT-cAMP 组,在①组的基础上加玻璃体内注射 CPT-cAMP;④AG + IBMX + CPT-cAMP 组,在①组的基础上加玻

璃体内联合注射 IBMX 和 CPT-cAMP。AG 组为再生对照组,其余三组为实验组。

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)备用。实验组动物于眼球背侧角巩缘处扎一小孔,用 2mol/L 的 IBMX 溶液(Sigma 公司产品,溶于生理盐水)3 μ l 和/或 5mol/L 的 CPT-cAMP(Calbiochem 公司产品,溶于生理盐水)3 μ l 从小孔注入玻璃体内。

眼球后约 1mm 处切断 ON,将 2cm 长的坐骨神经与 ON 近侧残端缝接,眼球复位后,将另一端包埋固定于颅顶的肌肉中。ON 切断前及术后 7d,14d 用上述剂量共 3 次注射。

3. 荧光金逆行标记和 P 物质免疫组化

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,放置黏有 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(0.1 mol/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。

参照李雯等人的方法进行 P 物质免疫组化染色^[8]。计数后的视网膜后固定于上述相同的固定液,4 $^{\circ}$ C 过夜。再经 300 g/L 蔗糖过夜,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱反复冻融,PBS 漂洗,30 ml/L 正常羊血清 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育。P 物质免疫组化染色一抗选用 1:100 大鼠 P 物质单克隆抗体(Pel-freeze 公司产品),4 $^{\circ}$ C 孵育 3-4d,PBS 洗 3 次,二抗选用 1:100 生物素结合的兔抗大鼠 IgG(Vector 公司),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗;再加 1:500 卵白素结合的 FITC,4 $^{\circ}$ C 孵育 3-5h,PBS 清洗后裱片。用激发光 540nm 波长的滤光片观察 P 物质阳性细胞,转换为 400nm 的滤光片可见荧光金(FG)标记的再生 RGCs,双标的细胞即为 P 物质阳性再生 RGCs,每个视网膜双标细胞之和为 P 物质阳性再生 RGCs 的总数。数据采用方差分析和

本文 2001 年 6 月 8 日收到,2002 年 1 月 8 日接受。

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

两样本均数检验。

结 果

1. P物质能 RGCs 的再生

图 a, b 和表 1 所见, AG 组术后 4 周, 荧光金和免疫组化双标的结果表明, P 物质阳性 RGCs 平均数为 45 ± 5 个/retina ($n=4$), 占再生总数的 3.4%。提示有 P 物质阳性 RGCs 再生。

2. IBMX 或 CPT-cAMP 对 P 物质阳性 RGCs 再生的影响

图 c, d 和表 1 所见, AG+IBMX 组术后 4 周, 其 P 物质阳性 RGCs 平均数为 119 ± 22 个/retina ($n=4$), 占再生总数的 6.55%; 图 e, f 所见, AG+cAMP

组术后 4 周, 其 P 物质阳性 RGCs 平均数为 127 ± 37 个/retina ($n=4$), 占再生总数的 6.15%; 两组与 AG 组相比 $P < 0.01$ 。提示 IBMX 和 CPT-cAMP 有促进 P 物质样的 RGCs 再生。

3. IBMX 和 CPT-cAMP 协同对 P 物质阳性 RGCs 再生的影响

AG+IBMX+CPT-cAMP 组术后 4 周, P 物质阳性细胞数增多为 339 ± 72 个/retina ($n=4$) 占再生总数的 7.98%, 明显高 AG 组 ($P < 0.01$), 同其他两组相比也有明显差异 ($P < 0.05$)。提示两者联合应用可协同促进 P 物质阳性 RGCs 再生 (图 g, h 和表 1)。

表 1 各组再生的 P 物质阳性 RGCs 平均数及其占再生 RGCs 总数的比率
(个/视网膜, mean \pm SD)

组 别	再生 RGCs 总数 (FG 标记)	再生的 P 物质阳性 RGCs 数 (FG 和 FITC 双标)	P 物质阳性 RGCs 数/再生 RGCs 总数 (再生率%)
AG	1329 ± 104	45 ± 5	3.4 ± 0.33
AG+I	2099 ± 419	$119 \pm 2^*$	6.55 ± 3.12
AG+cAMP	2048 ± 133	$127 \pm 37^{**}$	6.15 ± 1.10
AG+I+cAMP	4370 ± 487	$339 \pm 72^{***}$	7.98 ± 2.21

$N=4$ *** 和 ** 同 AG 相比 $P < 0.01$; *** 同 ** 相比 $P < 0.05$; ** 同 * 相比 $P > 0.05$ 。

讨 论

以往的研究表明, 外周神经移植能促进纹状体和苍白球的胆碱能神经元及丘脑网状核的 GABA 能神经元的再生^[5]。当外周神经缝合到视网膜或切断的视神经, RGCs 能够使其损伤的轴突长距离的再生进入外周神经节段。虽然再生进入外周神经节段的 RGCs 的大小, 形态及位置有变化, 但再生的 RGCs 含什么神经递质或肽, 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不清楚。近年来国外和我们的研究表明, 哺乳动物的视网膜节细胞含有 P 物质、神经肽 Y、生长抑素和一些经典神经递质如 GABA 和谷氨酸^[6,9]。我们的结果表明, 外周神经缝合于视神经残端, 可以促进 P 物质阳性 RGCs 的再生; 再生的细胞约占总再生数的 3%; IBMX 和 CPT-cAMP 可分别将再生率提高到约 6%; 而两者联合应用又可将再生率提高到约 8% (表 1)。

外周神经的缝合和玻璃体内注入 IBMX 和 CPT-cAMP 可以促进 P 物质阳性 RGCs 的再生, 但原因仍不清楚。我们推测可能是: ① IBMX 和/或 CPT-cAMP 促进 RGCs 再生, 再生的 RGCs 中有 P 物质阳性细胞。② IBMX 和/或 CPT-cAMP 可使先

前用免疫组化不能显示的 P 物质阳性节细胞能够检出。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^[10-13], 其中某种或某些神经营养因子可能有促进 P 物质阳性 RGCs 再生的作用。④ cAMP 通过其信号传导途径直接发挥作用。最近 Adler 等^[14]对培养的脊髓感觉神经元的研究发现, 发育中的神经元, forskolin 和 IBMX 可以 3 倍的提高 P 物质含量, 而抗 NGF 不能阻断 forskolin 的这一作用。因此, 他们认为 cAMP 是直接而不是通过促进许旺细胞或成纤维细胞的 NGF 的分泌而发挥作用。但外周神经的缝合和玻璃体内注入 IBMX 和 CPT-cAMP 是否是通过提高胞内 cAMP 水平而促进 P 物质能 RGCs 的再生, 仍有待进一步研究证实。

摘 要

采用金黄地鼠视神经切断并缝接坐骨神经的再生实验模型, 玻璃体内注射 IBMX 或/和 CPT-cAMP, 荧光金逆行标记再生的 RGCs 结合 P 物质免疫荧光组化双标法, 研究外周神经缝接于视神经断端能否促进 P 物质阳性的视网膜节细胞 (RGCs) 再生及 IBMX 或/和 CPT-cAMP 处理对其再生的影响。实验结果: ① 术后四周, 对照 AG 组每个视网膜

再生 RGCs 数 1329 ± 104 , 双标细胞平均数为 45 ± 5 , 占再生 RGCs 总数的 3.4%; ②AG + IBMX 组每个视网膜再生 RGCs 数为 2099 ± 419 , 再生 P 物质阳性节细胞平均数为 119 ± 22 , 占再生 RGCs 总数的 6.55%; ③AG + cAMP 组每个视网膜再生 RGCs 数为 2048 ± 133 , 再生 P 物质阳性节细胞平均数为 127 ± 37 , 占再生 RGCs 总数的 6.15%; ④AG + IBMX + cAMP 组每个视网膜再生 RGCs 数为 4370 ± 487 , 再生 P 物质阳性节细胞平均数为 339 ± 72 , 占再生 RGCs 总数的 7.98%, 与对照组的差异具有统计学意义。表明成年哺乳动物 P 物质阳性 RGCs 能再生, 玻璃体内注射 IBMX 或/和 CPT-cAMP 可以促进该类 RGCs 再生。

关键词: P 物质 视网膜节细胞 再生
3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 CPT-环磷酸腺苷
坐骨神经

参 考 文 献

- [1] So KF, et al. ,1985, *Brain res.* ,328:349-354.
- [2] Aguayo A. J. ,1985, In: C. W. Cotman (Ed.) *Synaptic plasticity*, Guilford Press, New York. ,pp. 457-484.
- [3] Benfey M. , et al. ,1982, *Nature* ,296:150-152.
- [4] Berry M. , et al. ,1986, In: G. D. Das and R. B. Wallace, (EDS.), *Neural Transplantation and Regeneration*, Springer-Verlag, New York, pp. 63-79.
- [5] Dooley JM. , et al. ,1982, *Annals of Neurology.* ,12:221.
- [6] Li HB, et al. ,1999, *Visual Neuroscience.* ,16:475-481.
- [7] 朱永红等,2001, *中山医科大学学报*,22(5):338-341.
- [8] 李雯等,2001, *中山医科大学学报*,22(1):5-8.
- [9] Caruso DM, et al. ,1990, *A computerassisted visualization. Visual neuroscience* ,5:389-394.
- [10] Rush RA. ,1984, *Nature* ,312:364-367.
- [11] Stockli KA, et al. ,1989, *Nature* ,342:920-923.
- [12] Finkbeiner S, et al. ,1997, *Neuron.* ,19(5):1031-1047.
- [13] Pizzorusso T, et al. ,2000, *J Neurosci.* ,20(8):2809-2816.
- [14] Adler, JE, et al. ,2000, *Journal of Neuroscience Research* ,59:624-631.

THE INFLUENCE OF IBMX AND CPT-cAMP ON EXPRESSION OF SUBSTANCE P IN REGENERATING RGCs

ZHU Yong Hong LI Hai Biao

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

ABSTRACT

We have used the regenerating model of optic nerve(ON) transected and then sutured a segment of autologous sciatic nerve to stump of ON in hamsters, then IBMX or/and CPT-cAMP was injected intravitally, by using the double-labeled method of Fluro-Gold(FG) retrograde tracing combined with fluorescent immunocytochemistry of substance p(SP); to examine the regeneration of SP-immunoreactivity (IR) retinal ganglion cells(RGCs) and the effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and/or 8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP (CPT-cAMP) injected on regeneration of SP-IR RGCs. Our results were: ①At 4 weeks after surgery, the mean number of regenerated RGCs per retina in AG group was 1329 ± 104 , double labeled RGCs per retina in AG group was 45 ± 5 which constitutes $3.4 \pm 0.33\%$ of the total regenerated RGCs; ②In AG + IBMX experimental group, the mean number of regenerated RGCs per retina was 2099 ± 419 , double labeled RGCs per retina was 119 ± 22 , which constitutes $6.55 \pm 3.12\%$ of the total regenerated RGCs; ③In AG + CPT-cAMP experimental group, the mean number of regenerated RGCs per retina was 2048 ± 133 , double labeled RGCs per retina was 127 ± 37 which constitutes $6.15 \pm 1.10\%$ of the total regenerated RGCs; ④In AG + IBMX + CPT-cAMP experimental group, the mean numbers of regenerated RGCs per retina were 4370 ± 487 , double labeled RGCs per retina were 339 ± 72 , which constitute $7.98 \pm 2.21\%$ of the total regenerated RGCs. The experimental groups were increased significantly compared with those in AG group. The results show that the axotomized SP-IR RGCs have the capability of regenerating their axons into the attached PN graft, It is indicate IBMX and/or CPT-cAMP could enhance the regeneration of the SP-IR RGCs.

Key word: Substance P Retinal ganglion cells Regeneration IBMX CPT-cAMP Sciatic nerve