

# 睫状神经营养因子在面神经再生中的表达变化及 TGF- $\beta$ 、rhBMP-2 的调控

聂鑫 金岩 GL Tipoe

**【摘要】** 目的 探讨睫状神经营养因子(CNTF)在面神经切断后的免疫定位及转化生长因子(TGF- $\beta$ )及人重组骨形成蛋白2(rhBMP-2)对其的调控作用。方法 选取面神经切断后不同时期的面神经核组织切片,通过免疫组化染色和图像分析对比不同时期面神经核中CNTF的浓度变化。结果 面神经切断后,术后1 d CNTF就开始表达并逐渐增加,分别于术后1周和1月面神经核运动元中CNTF的含量达到最大。此后逐渐下降。rhBMP-2对CNTF的表达无明显作用,而TGF- $\beta$ 能促进神经再生过程中CNTF的表达。结论 内源性CNTF在神经再生过程中对神经轴突的延伸也具有一定的促进作用。TGF- $\beta$ 可通过促进CNTF的表达而对面神经运动神经元起着重要的保护作用。

**【关键词】** 神经营养因子; 神经; 再生; 转化生长因子

## Expression of CNTFs in Facial Motoneurons During Facial Nerve Regeneration in Rats and Their Association with TGF- $\beta$ and rhBMP-2

NIE Xin<sup>\*</sup>, JIN Yan, GL Tipoe. (<sup>\*</sup> Department of Oral Pathology, Stomatology College, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to observe the expression of ciliary neurotrophic factors (CNTFs) in the facial motor neurons in rats during facial nerve regeneration. **Methods** The expression amount of CNTFs in eight groups was determined with immunohistochemical staining and image analysis. **Results** The expression of CNTFs increased during the process of nerve regeneration, and reached the maximum one-week and one-month after nerve injury respectively. After one month, the intensity of CNTFs reduced gradually. The expression of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) did not show distinct difference comparing with the control, but beta transforming growth factors (TGF- $\beta$ ) benefited the expression of CNTFs during nerve regeneration. **Conclusion** The endogenous CNTFs promotes the axon outgrowth during regeneration, and TGF- $\beta$  promotes the expression of CNTFs to rescue motoneuron during facial nerve regeneration.

**【Key words】** neurotrophic factor; nerve; regeneration; transforming growth factor

当面神经切断后,神经元会出现一系列的应激反应,如神经元胞体的膨大,基因表达的变化,由于靶组织来源的生长因子的丧失,这种损伤导致的逆行反应可导致部分神经元的死亡。此时,神经元的存活主要依赖于面神经元自身的神经营养因子的变化。此外,随着对转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族研究的不断深入,发现其对神经损伤后修复也具有一定的作用<sup>1</sup>。因此,本研究旨在探讨内源性睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)在神经损伤后的表达变化以及TGF- $\beta$ 、人重组骨形成蛋白2(recombinant human bone morphogenetic

protein-2, rhBMP-2)对其的调控,进一步认识TGF- $\beta$ 、rhBMP-2与外周神经再生之间的关系并揭示各因子在面神经再生过程中的相互作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物制备及样本固定

实验动物为雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 250 ~ 350 g 共 84 只(购自第四军医大学动物实验中心),分为 TGF- $\beta$  处理组、rhBMP-2 处理组及生理盐水处理组。每组根据术后处死时间又分为 7 小组,每小组 4 只。大鼠在 846 合剂(1 ml/kg)麻醉下,暴露右侧面神经。从茎乳孔外 0.5 cm 处切断面神经。在面神经切断近心端处分别注入 TGF- $\beta$  50  $\mu$ l (0.2  $\mu$ g/ml)及 rhBMP-2 50  $\mu$ l (0.4  $\mu$ g/ml)及生理盐水 50  $\mu$ l,将面神经断端用 9-0 线对位吻合。术后隔日 3 个组在右侧面神经损伤处分别注射 TGF- $\beta$  50  $\mu$ l 及 rhBMP-2 50  $\mu$ l 及生理盐水 50  $\mu$ l。大鼠分别于术后 1、2、7、14 d 及 1、2、3 月在深麻下行 40 g/L 多聚甲醛 400 ml 心脏灌注,取出大鼠脑干,200 g/L 蔗糖脱水直至下沉。实验组

本课题获军队杰出人才基金资助(编号 98J010)

作者单位:710032 第四军医大学口腔医院病理科(聂鑫,金岩),香港大学解剖系(GL Tipoe)

及对对照组每只大鼠分别切取脑干面神经核团,做冰冻系列切片,片厚 20 μm。左侧为对照侧,不作任何处理。

### 1.2 免疫组化

将切片放入丙酮中 30 min,晾干。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min 去除内源性过氧化物酶,加入封闭血清 37 °C 孵育 20 min 以降低背景,抗 CNTF 抗体(1:100, Santa 公司)4 °C 湿盒孵育过夜,兔抗羊血清 37 °C 孵育 30 min,生物素化二抗 37 °C 孵育 30 min,加入 HRP 复合物 37 °C 孵育 30 min, DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色 5 min,常规封片,苏木精未衬染。

### 1.3 图像及统计分析

利用同济大学 HPIAS-1000 高清晰度彩色图像分析系统测定平均灰度值,染色越强,灰度值越小。每次测量前均用同一切片的空白区矫正背景值 235。每张切片随机选取面神经核测量区域以减少人为误差。通过自动测量,检测出每个神经元的平均灰度值。将整个神经核阳性神经元的平均灰度值的总和除以阳性单位,得出每组的平均灰度值,神经元实际灰度值为背景灰度值减去所测平均灰度值。利用第四军医大学统计教研室研制的统计软件将数据进行 *t* 检验。

## 2 结 果

### 2.1 免疫组织化学染色结果

因用硫酸镍胺增强显色,阳性信号为深蓝色颗粒。在光镜下可见 CNTF 阳性单位主要为面神经运动神经元和星形胶质细胞,运动神经元主要为胞浆着色。其它细胞如星形胶质细胞也有着色。在正常的鼠脑面神经核中,运动神经元 CNTF 无表达,术后 1 d,两侧面神经核运动神经元中都开始出现 CNTF 的表达,此时可出现细胞核体积变大,一些细胞出现空泡变性。术后 1 周,CNTF 阳性表达水平达到最大值。术后 1 月,CNTF 阳性表达水平又有所增加,形成第二个高峰。术后 2 月开始出现下降。术后 3 月基本恢复正常水平,无法检测到 CNTF 阳性运动神经元。

### 2.2 图像及统计分析结果

图像分析结果见表 1。可见在对照侧阳性单位多于切断侧,而平均灰度值低于切断侧。在切断后对照侧 CNTF 的表达变化与切断侧基本一致。TGF- $\beta$  处理组的平均灰度值高于生理盐水组,在术后 1 月最为显著。统计分析显示在不同时期切断侧和对照侧 CNTF 蛋白的表达有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。切断侧蛋白的平均表达水平高于对照侧。TGF- $\beta$  处理组在面神经切断后期表达增加,与生理盐水组相比有显著性差异。3 月组未检测出运动神经元 CNTF 阳性表达,因此未作图像分析。

## 3 讨 论

CNTF 最初为 Adler 等<sup>2</sup> 由靶组织分离鉴定的睫

状神经节副交感神经元存活因子。除了对睫状神经元的作用外,在体外,它对多种神经元如交感神经,背根神经节,三叉神经有明显的生物学效应<sup>3,4</sup>。在胚胎发育期它存在于雪旺氏细胞,主要以非靶源性神经营养因子方式调控运动神经元存活,是新生运动神经元的维持因子<sup>5</sup>。在外周神经的雪旺氏细胞存在大量的 CNTF,神经损伤后,CNTF 通过逆行运输单独发挥作用或与肌肉中的 CNTF 形成复合物而发挥促进神经损伤修复的作用<sup>6,7</sup>。虽然 CNTF 在体外具有广泛的作用,但对于中枢神经系统的内源性 CNTF 蛋白在面神经损伤后是否起着同样的作用仍不十分明确。

表 1 面神经核 CNTF 免疫阳性运动神经元的平均灰度值

Tab 1 The positive density of CNTF in the facial nucleus motoneurons

时间	生理盐水组	TGF- $\beta$ 组	rhBMP-2 组
1 d	17.70 $\pm$ 0.55	17.40 $\pm$ 0.24	17.50 $\pm$ 2.38
2 d	24.50 $\pm$ 0.32	22.50 $\pm$ 2.71	25.90 $\pm$ 0.40
1 周	59.50 $\pm$ 0.32	58.40 $\pm$ 0.35	45.70 $\pm$ 0.46
2 周	21.50 $\pm$ 0.78	23.20 $\pm$ 0.34	20.80 $\pm$ 0.27
1 月	29.70 $\pm$ 0.58	42.60 $\pm$ 0.24 *	27.90 $\pm$ 0.37
2 月	16.30 $\pm$ 0.43	20.40 $\pm$ 0.39	17.10 $\pm$ 0.38

\*与生理盐水组相比有显著性差异

本实验检测了面神经损伤后,CNTF 及其受体在面神经核中的表达变化。在正常情况下,未发现 CNTF 阳性运动神经元。损伤后,CNTF 急剧增高,这表明内源性 CNTF 在面神经元损伤后的神经元存活具有重要的意义。在术后 1 周和术后 1 月分别出现两个高峰,则可能与神经元的损伤反应和再生有关,在第一个高峰期,CNTF 的增高可能有两种原因,一种是由于损伤刺激,外周神经的雪旺氏细胞存在的 CNTF 得以释放,通过逆行运输进入神经元胞体,另一种是运动神经元的应激反应使 CNTF 蛋白的表达增加,起着神经保护作用。在第二个高峰期,此时正是面神经元轴突伸长的时期,其生长相关性蛋白 GAP-43 表达最强,CNTF 可能起着促进面神经轴突生长的作用,以促进面神经功能恢复。

在本实验中,笔者研究了 TGF- $\beta$  及 BMP-2 对 CNTF 在再生过程中的表达调控。TGF- $\beta$  及 BMP-2 都属于 TGF- $\beta$  超家族成员,该家族成员参与了广泛的生理调控,如细胞增殖与分化、血管形成、免疫抑制、感染组织的修复和胚胎形成<sup>8,9</sup>。最新的研究表明 TGF- $\beta$  及 BMP 参与了神经系统的发育、再生及病变过程的调控。此外,TGF- $\beta$  及 BMP 能与多种神经营养因子相互作用。TGF- $\beta$  能与神经营养因子 共同促进

脊神经节神经元的存活。TGF- $\beta_1$ 能促进雪旺氏细胞表达LIFmRNA。BMP可以刺激胶质细胞的合成及释放GDNF因子。在体内,BMP-2能促进神经营养因子及其受体trk-C的表达<sup>10</sup>。但TGF- $\beta_1$ 及rhBMP-2对CNTF表达是否具有作用尚不清楚。实验显示TGF- $\beta_1$ 对CNTF的表达强度有一定的促进作用,在神经再生过程中,TGF- $\beta_1$ 处理组CNTF的表达强度高于生理盐水组,则可能是由于TGF- $\beta_1$ 对CNTF的维持时间有一定的延长作用。而rhBMP-2对CNTF的表达无促进作用。

综上所述,内源性CNTF在面神经元损伤及再生过程中的表达均出现了不同程度的提高,则说明内源性CNTF在神经损伤中可减少损伤引起的神经元死亡,起着神经保护作用。而且在再生过程中能促进神经元轴突的伸长。而TGF- $\beta_1$ 能促进CNTF蛋白的表达,这可能是TGF- $\beta_1$ 与CNTF具有协同作用,对面神经轴元再生中的轴突伸长具有促进作用。

### 参考文献

- 1 Henrich NP, Prehn JH, Kriegstein J. Neuroprotective effects of TGF-beta 1. J Neural Transm Suppl, 1994, 43(Suppl): 33-45
- 2 Adler R, Landa KB, Manthorpe M, et al. Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. Science, 1979, 204(4400): 1434-1436
- 3 Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE. Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 2222
- 4 Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture. J Neurol Sci, 1990, 10(11): 3507-3515
- 5 Rudge JS, Eaton ML, Mather P, et al. CNTF induces raphe neuronal precursors to switch from a serotonergic to a cholinergic phenotype in vitro. Mol Cell Neurosci. 1996, 7(3): 204-221
- 6 Masu Y, Wolf F, Lioltmann R, et al. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. Nature, 1993, 365(6441): 27-32
- 7 Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor. J Neurobiol, 1994, 25(11): 1436-1453
- 8 Sendtner M, Thoenen H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. J Cell Biol, 1992, 118(1): 139-148
- 9 司晓辉, 金岩, 杨连甲, 等. rhBMP-2和TGF- $\beta_1$ 刺激骨膜成骨实验研究. 第四军医大学学报, 1997, 18(5): 433-436
- 10 Marzella HL, Clark GM, Shepherd RK, et al. Synergy between TGF-beta 3 and NT-3 to promote the survival of spiral ganglion neurons in vitro. Neurosci Lett, 1998, 240(2): 77-80

(2000-09-14 收稿, 2002-06-10 修回)

(本文编辑 王晴)

## 新型超声工作尖与牙周病龈下治疗

龈下洁治和根面平整是为了去除龈下菌斑、牙石、内毒素、生物膜等。目前认为,脂多糖(LPS)不会粘附于根面,并且稍加使用超声器械即可去除。这说明了去除感染的牙骨质层是没有必要的。

与手用器械相比,超声器械的工作速度更快,病人感觉更舒适。但如果不正确使用这两种方法,则都会在根面产生细纹。

在使用超声治疗仪进行牙周病的龈下治疗时应注意以下几点:(1)尽可能使用窄而无创伤的工作尖:如根面平整和修整牙骨质时使用金刚砂工作尖,去除菌斑时使用碳纤维工作尖。(2)使用最适合的器械,功率尽可能低(0.4~0.6瓦)。(3)尽可能地保护牙骨质。

新型超声工作尖材料和形状设计上的进步及其使用上的合理记录愈来愈被牙周病学家们所关注。

赛特力公司开发的新型超声龈下工作尖又称MDC系统。M指金属工作尖,如H3、H4L(左)和H4R(右);D指镀金刚石工作尖,如H1L、H2L(左)和H2R(右);C指碳纤维工作尖,如PH系列。赛特力龈下工作尖精细、改良型的尖端,在到达袋底、去除牙石方面都是最有效的,根面出现的粗糙亦最小。临床应用超声系统有新的要求,即把金刚砂工作尖用于根面平整,碳纤维工作尖用于去除龈下菌斑和抛光。

在超声器械治疗牙周袋时,可以用窄工作尖(如H2和H4)处理难以达到的区域。先使用H2工作尖用于牙根面,然后用H4修整而使其完美;在根分叉区,H4右侧和左侧的工作尖由于其精细度成为最适合根分叉形态的器械。如果必要,可使用碳纤维工作尖或气压磨光器进行磨光。每一个工作尖产生不同的振幅,施加的力量越大,器械的效率越低。反之,严格控制功率又显得十分重要:功率越高,器械的创伤性就越大。而器械的创伤性越大,治疗时损失的牙齿硬组织就越多。

总而言之,赛特力公司的新型工作尖提供了一些非常令人感兴趣的前景:易进入根间区域,可去除牙骨质表面的有机沉积物同时尽可能保存正常组织,具有手用器械无法提供的使用上的便利性。

更多产品信息请致电010-646578011/2/3/4或发电子邮件给我们:info@satelec.com.cn。网址:[www.satelec.com.cn](http://www.satelec.com.cn)(法国赛特力—碧兰公司北京办事处)。