

伪狂犬病毒在视觉系统跨突触神经示踪中的应用进展

陈中山 叶湘湘 宋艳萍

【摘要】 跨突触神经传导示踪对于研究神经网络以及单个神经元的功能特性和信息交流具有重要意义。伪狂犬病毒(PRV)作为一种嗜神经组织病毒,因其可跨突触传递、高效转染和表达、具备独特感染模式等特点,在研究神经系统功能神经元之间的网络连接中起着重要作用。经过基因重组后的伪狂犬病毒无明显神经毒性,此外不仅继承了原有病毒的特性,同时还可携带荧光标记蛋白,使得对神经环路的标记和显示更加简单和直观。我们就 PRV 应用于视觉传导通路的标记、在非图像视觉传导系统中的应用、视网膜组织和细胞移植后示踪、视神经损伤修复中的应用前景,以及存在的潜在不足,进行了综述和展望。

【关键词】 伪狂犬病毒; 神经示踪; 视觉通路; 突触传导

Progress on application of pseudorabies virus in transsynaptic tracing for visual system

Chen Zhongshan, Ye Xiangxiang, Song Yanping. Eye Center of PLA, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China

Corresponding author: Song Yanping, Email: songyanping@medmail.com.cn

【Abstract】 Transsynaptic tracing is a very important tool for exploring functional properties and information exchange in neural networks and individual neurons. Neurotropic pseudorabies virus (PRV) is characterized as transsynaptic transmission, efficient expression and unique infection pattern, which performed key roles in exploring neural connections. Genetic recombination for PRV made it less neurotoxicity, but maintained original features and expressed fluorescence labeled protein, which made the labeling and demonstration of neural circuits more simple and direct. This paper reviewed and prospected the applications of PRV in tracing for visual system, non-image visual system, retinal transplantation, optic nerve injury repair.

【Key words】 Pseudorabies virus; Neural tracing; Visual pathway; Synaptic transmission

对神经细胞之间形成的网络联系进行示踪是神经科学研究的重点和难点,它对研究神经元的传导功能、神经细胞之间的信息交流、神经网络的构架、神经系统的发育、成熟或者突触联系重建具有重要价值。为此,神经科学家们做了长期探索,从顺行和逆行神经元溃变法,到 Golgi 镀银法,发展到 20 世纪 70 年代轴浆运输成为神经示踪的新方向,包括辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)、荧光金(fluorogold)、固蓝(fast blue)、核黄(nuclear yellow)等荧光染料的应用。然而这些示踪技术最大的局限是它们不能跨突触传递,因此显示的只是单个神经细胞或者最多相邻细胞之间的关系,而不能揭示神经网络的信息。即使某些示踪剂如麦胚凝集素-辣根过氧化物酶(WGA-HRP)可以跨突触传递,但

因其效应浓度极低,亦即跨突触传导之后到达靶细胞的浓度很低,难以清晰示踪。因此,寻找在体条件下能跨突触传递、高效表达、且具备独特感染模式和荧光下可直视的神经示踪剂甚为关键。

病毒的嗜神经性以及能跨突触感染为神经示踪提供了全新的工具。Strack 最先将伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)用于中枢神经系统的研究,发现不仅可感染交感神经系统,且具有跨神经束追踪和自我“复制”能力的特征^[1]。随后众多神经科学家的研究也表明 PRV 可以在中枢和周围神经系统里跨突触传递,如海马^[2]、脊髓^[3]、培养的神经元^[4],从而很好地标记神经网络连接,并且病毒的浓度能保持不衰减,即在靶组织有足够的浓度表达使之能够检测出^[2-4]。另一个非常重要的特点是 PRV 不同于单纯疱疹病毒,它只在相邻的神经元之间传导,而不会被小胶质细胞、星形胶质细胞所吞噬,为此对神经网络的研究更精准^[5-6],同时,在神经元中 PRV 不仅表达于胞体,其突起分支上也有表达^[7]。此外,PRV 对中枢神经系统没有明显的病毒所致的毒副作用,从而保证生物的安

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2014.06.016

基金项目:国家自然科学基金(61378084);湖北省卫生厅青年科技人才项目(QJX2012-23)

作者单位:430070 广州军区武汉总医院全军眼科中心

通信作者:宋艳萍,Email:songyanping@medmail.com.cn

全性^[8-9]。近年来随着神经系统信号传导机制研究的不断深入,加之基因工程技术和分子生物学的发展,利用重组病毒在生物体内表达荧光蛋白的方法使得神经环路的标记更加简单化和直观化。笔者就国内外 PRV 应用于视觉传导、移植重建、损伤修复等的示踪研究作一综述。

1 PRV 对传统视觉传导通路的标记

视网膜光感受器细胞接受光线刺激后转换成视觉信号,经中间神经元双极细胞整合编码后传递至神经节细胞,后者以动作电位的形式将视觉信息经其轴突—视神经投射至上丘和外侧膝状体,随后经视放射投射到大脑距状沟周围的枕叶皮质(视觉中枢),这是视觉信息经整合编码、神经传导、中枢投射,最终形成视觉图像的整个通路,其中任一环节的病变均可导致视觉功能障碍。因此,深入研究视觉传导通路中各个环节的突触连接状态至关重要,而完整清晰地标记这一通路是整个研究的基础。

Card 将野生型和减毒的 PRV 行大鼠玻璃体腔注射,前者可感染前脑内视网膜投射区域的所有神经元,而减毒 PRV 仅感染视网膜神经节细胞中枢投射部位部分功能神经细胞^[10],进一步分析发现 RPV 中编码膜糖蛋白的基因决定了 PVR 对神经元的亲和作用及毒副作用^[10-11],如高热、咳嗽、抽搐、精神萎靡以至死亡,也可导致流产、死胎等。Moore 在小鼠的视皮层注射少量的减毒 PRV-Bartha,此种病毒包含了一个 β -半乳糖苷酶启动子插入片段,经过 2~4 d 的潜伏期,发现 PRV 病毒能够逆行跨神经元感染外侧膝状体(lateral geniculate body, LGN)、丘脑网状核(thalamic reticular nucleus, TRN)和视网膜,并且 PRV 在视网膜中是沿视神经走形分布的^[12]。同样,在猫视皮层的 V1 区注射 PRV 经过相同潜伏期后,对猫组织 LGN 和 TRN 中 PRV 标记的神经元进行 γ -氨基丁酸(GABA)双标,所有的 TRN 神经元都是 GABA⁺,只有部分的 LGN 神经元是 GABA⁺,只有在邻近 LGN 被 PRV 标记的区域的 TRN 神经元会被 PRV 标记,此外,部分 GABA⁺的 LGN 中间神经元也会被 PRV 标记^[12]。Banfield 等^[13]更是将 PRV 注入胎龄 12 d 的鸡眼内,观察到 PRV 在鸡脑发育过程中的神经分布和走向,从而研究视网膜神经元的中枢投射以及大脑神经元的发育特征。跨神经元的感染方式及在感染过程中始终保持感染强度,使得 PRV 成为检测视觉通路的一种有效手段^[12-13]。

2 PRV 在非图像视觉传导系统中的应用

传统观念认为,视网膜节细胞(retinal ganglion cell, RGC)的轴突向中枢主要投射至上丘和外膝体,最终投向视皮层,然而近年的研究表明有少部分神经纤维投射至视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN),参与生物周期与瞳孔光反射的调控^[14]。既往有学者发现 SCN 内血管活性肽免疫反应性的神经元接受来自视网膜神经节细胞的神经输入;同样,国内学者张军等^[15]发现 RGC 轴突同时也与少量的精氨酸血管加压素(Arginine Vasopressin, AVP)神经元形成突触联系。在向玻璃体腔^[16]或前房^[17-18]注射 PRV-Bartha 后,最终能在对侧眼的少量视网膜神经节细胞上检测到 PRV。经过深入研

究,这一通路如下:前房内注射的 RPV 经过同侧的交感神经及副交感神经,到达中枢神经系统,再通过感染视交叉上核,进而传递到对侧眼球的视网膜神经节细胞;玻璃体腔注射的 PRV 通过视神经到达视网膜投射区,包括视交叉上核(SCN)、膝状体间小叶(intergeniculate leaflet, IGL)、前顶盖(pretectum, PT)、外侧终核等,然后通过对侧的 SCN 逆行传输至视网膜,感染视网膜部分神经节细胞。这一通路的研究,使得对非图像视觉系统的认识,以及生物节律的形成和瞳孔光反射通路有了全新的了解。

3 视网膜视神经移植示踪

视网膜是一极为精巧的神经网络组织,携带绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent, EGFP)的 PRV 感染视网膜后可直观地显示视网膜神经元的细胞形态,并可以此分类,此外还可见神经元的突起在视网膜内的伸展层次,以及双极细胞、少量与 RGCs 紧密相邻的无长突细胞和 Müller 细胞等^[19],在激光共焦显微镜下可清楚显示 Müller 细胞突起覆盖的视网膜区域。无长突细胞的染色似乎并非 Müller 细胞释放的 EGFP 颗粒,因为两者在时间和空间上均显示没有关联^[19]。然而,通过对侧眼球内注射 PRV 标记的 RGC 鲜有与双极细胞形成联系的,提示这一传导通路并不是通过传统的双极-神经节细胞通路。

视网膜变性类疾病是严重的致盲性眼病,至今尚无确切有效的治疗方法。已有众多学者尝试进行视网膜组织移植、细胞移植等,然而,供体视网膜组织或细胞是否与宿主视网膜建立了突触联系,是否有信息交流是这一治疗研究的瓶颈,而这又是移植治疗是否成功的重要指标,为此找到能标记供体细胞或组织与受体整合的标记方法至关重要。而应用 PRV 示踪能观察视网膜移植组织的神经细胞突起走形,以及移植细胞在受体组织内的分布,并用以确定移植细胞与受体之间是否能形成突触连接。Seiler 等^[20-21]将胎龄 19 d 的大鼠视网膜组织片移植至视网膜色素变性经典动物模型 RCS 大鼠和快速视网膜变性 S334ter-line-3 大鼠视网膜下腔,移植数月(2.2~9.9 个月)后,可以在上丘记录到视觉刺激反应。PRV-EGFP 或 PRV-BaBlu 注射至上丘中有视觉反应的区域,1~5 d 即可在视网膜中检测到病毒标记,同时可看到不同视网膜细胞的标记物,如蛋白激酶 C(PKC, 双极细胞)、恢复蛋白(recoverin, 感光细胞)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II, 神经节细胞和无长突细胞),以及谷氨酰胺合成酶(GS, Müller 细胞)。注射 1~5 d 后在宿主视网膜和移植视网膜组织中皆可见病毒的表达,提示移植视网膜组织和宿主视网膜产生了解剖上的突触重建。

4 在标记视神经损伤自体修复中的应用前景

外伤、手术、射线、药物、炎症等因素导致的视神经损伤,最终将影响视觉功能向中枢的投射,导致严重的视觉障碍。因此,视觉损伤修复研究既是眼科学,也是神经科学面临的一大难题。既往学者进行过多种尝试,包括骨髓间充质干细胞移植^[22]、嗅鞘细胞移植^[23]、脐带血干细胞移植^[24]、组织移植、基因治疗等^[25],那么视神经,即视网膜神经节细胞的轴突是否

真正能突破损伤部位,到达中枢靶组织是解决这一问题的关键。尽管有多项研究显示,各种治疗方法后可看到视觉功能,如视野、视觉诱发电位等明显改善,而神经节细胞再生轴突的标记,才是最直观最直接的证据。既往有采用免疫组化观察神经节细胞的再生和神经纤维的数量,其不足是不能直接证明 RGCs 是否与中枢神经元形成突触联系;有学者将移植细胞采用荧光标记^[20],但这样的操作是否对细胞本身的功能产生影响尚不明了,以及无法证实功能神经元包括视网膜神经节细胞轴突的再生情况;或者采用脂质示踪剂^[21],麦胚凝集素 WGA/辣根过氧化物酶 HRP,以及霍乱毒素(cholera toxin B)显示神经节细胞轴突的生长^[22],但均需对组织进行处理后行免疫组化染色。PRV-EGFP 具有跨突触传递以及荧光直接标记的双重功能,因此可以肯定其在视神经,以及其他中枢神经再生示踪中具有巨大应用前景。

5 潜在的毒副作用及限制

PRV 属于疱疹病毒科(Herpesviridae)A 型疱疹病毒亚科猪疱疹病毒 1 型(Porcine herpesvirus 1),多种家畜及野生动物可被感染,PRV 是一种高度嗜神经性病毒,感染后可导致动物不同程度的神经症状,包括高热、抽搐、呼吸道症状、以及出现流产、急性脑脊髓炎等。实验所用的是 PRV 减毒株,理论上来说对动物是安全的,但是否存在潜在的神经系统损伤尚存争议^[28-29]。此外,病毒是否影响神经细胞的发育、轴突再生、突触联系、信息传导等,尚待进一步深入研究。

6 小结和展望

携带荧光蛋白的伪狂犬病毒由于其可跨突触传递、无或少神经毒作用、神经内复制增强(即病毒滴度的维持)等特性,是中枢神经系统一种非常好的神经传导和突触示踪剂,并在神经科学得到较为广泛的应用。部分学者在视觉科学也采用这一神经示踪剂,对视觉系统传导通路的研究打开了广阔的思路,但目前尚有很大的空间有待应用,尤其在神经元轴突再生、移植后功能突触重建、神经环路探讨等方面有待深入研究。此外,还存在许多问题值得我们进一步深入探讨,如:PRV 是否感染所有的神经元,以及对胶质细胞的感染性如何?在神经通路中的传递是否直接传递,附近的突触是否也加入到这一传递过程?影响 PRV 传递的因素有哪些?PRV 在功能性神经元连接之间的传递需要什么样的分子机制,有哪些信号通路参与其中?尽管目前常用的伪狂犬病毒是减毒后的病毒载体,也证明对神经系统无明显的神经毒作用,但为安全考虑可否进一步减毒,以及减毒后的 PRV 能否维持快速的跨突触传递特性?PRV 标记的靶神经元电生理功能活性如何,以及如何维持相对正常的电生理功能?这些问题若能得到解决,将会使得 PRV 在视觉系统的应用更加深入和广泛。

参考文献:

[1] Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, et al. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus[J]. Brain Res, 1989, 491: 274-296.
[2] Prasad JA, Chudasama Y. Viral tracing identifies parallel

disynaptic pathways to the hippocampus[J]. J Neurosci, 2013, 33: 8494-8503.
[3] Lee KZ, Lane MA, Dougherty BJ, et al. Intraspinous transplantation and modulation of donor neuron electrophysiological activity[J]. Exp Neurol, 2014, 251: 47-57.
[4] Koyuncu OO, Perlman DH, Enquist LW. Efficient retrograde transport of pseudorabies virus within neurons requires local protein synthesis in axons[J]. Cell Host Microbe, 2013, 13: 54-66.
[5] Tillakaratne NJ, Guu JJ, de Leon RD, et al. Functional recovery of stepping in rats after a complete neonatal spinal cord transection is not due to regrowth across the lesion site[J]. Neuroscience, 2010, 166: 23-33.
[6] Xu L, Ryugo DK, Pongstaporn T, et al. Human neural stem cell grafts in the spinal cord of SOD1 transgenic rats: differentiation and structural integration into the segmental motor circuitry[J]. J Comp Neurol, 2009, 514: 297-309.
[7] van den Pol AN, Ozduman K, Wollmann G, et al. Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatitis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression[J]. J Comp Neurol, 2009, 516: 456-481.
[8] Klingbeil K, Lange E, Teifke JP, et al. Immunization of pigs with an attenuated pseudorabies virus recombinant expressing the hemagglutinin of pandemic swine origin H1N1 influenza A virus[J]. J Gen Virol, 2014, 95: 948-959.
[9] Wei F, Zhai Y, Jin H, et al. Development and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing Sj26GST and SjFABP from Schistosoma japonicum[J]. Vaccine, 2010, 28: 5161-5166.
[10] Card JP, Whealy ME, Robbins AK, et al. Two alpha-herpesvirus strains are transported differentially in the rodent visual system[J]. Neuron, 1991, 6: 957-969.
[11] Enquist LW, Dubin J, Whealy ME, et al. Complementation analysis of pseudorabies virus gE and gI mutants in retinal ganglion cell neurotropism[J]. J Virol, 1994, 68: 5275-5279.
[12] Moore RJ, Vinsant S, McCauley AK, et al. Transneuronal retrograde transport of attenuated pseudorabies viruses within central visual pathways[J]. Vis Neurosci, 2001, 18: 633-640.
[13] Banfield BW, Yap GS, Knapp AC, et al. A chicken embryo eye model for the analysis of alpha-herpesvirus neuronal spread and virulence[J]. J Virol, 1998, 72: 4580-4588.
[14] Hattar S, Liao HW, Takao M, et al. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity[J]. Science, 2002, 295: 1065-1070.
[15] 张军, 欧可群, 吴良芳, 等. 视网膜节细胞投射到视交叉上核 AVP 神经元的研究假狂犬病毒跨神经元追踪结合胶体金免疫电镜双重标记法[J]. 神经解剖学杂志, 1999, 15: 243-246.
[16] Smith BN, Banfield BW, Smeraski CA, et al. Pseudorabies virus expressing enhanced green fluorescent protein: A tool for in vitro electrophysiological analysis of transsynaptically labeled neurons in identified central nervous system circuits[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97: 9264-9269.
[17] Baver SB, Pickard GE, Sollars PJ, et al. Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus[J]. Eur J Neurosci, 2008, 27: 1763-1770.
[18] Sollars PJ, Smeraski CA, Kaufman JD, et al. Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus[J]. Vis Neurosci, 2003,

20:601-610.

[19] Viney TJ, Balint K, Hillier D, et al. Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing[J]. *Curr Biol*, 2007, 17:981-988.

[20] Seiler MJ, Sagdullaev BT, Woch G, et al. Transsynaptic virus tracing from host brain to subretinal transplants[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21:161-172.

[21] Seiler MJ, Thomas BB, Chen Z, et al. Retinal transplants restore visual responses: trans-synaptic tracing from visually responsive sites labels transplant neurons[J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 28:208-220.

[22] Zaverucha-do-Valle C, Gubert F, Bargas-Rega M, et al. Bone marrow mononuclear cells increase retinal ganglion cell survival and axon regeneration in the adult rat[J]. *Cell Transplant*, 2011, 20:391-406.

[23] Plant GW, Harvey AR, Leaver SG, et al. Olfactory ensheathing glia: repairing injury to the mammalian visual system[J]. *Exp Neurol*, 2011, 229:99-108.

[24] Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model[J]. *Exp Neurol*, 2009, 216:439-448.

[25] Harvey AR, Hellstrom M, Rodger J. Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway[J]. *Prog Brain Res*, 2009, 175:151-161.

[26] Wu MM, Fan DG, Tadmori I, et al. Death of axotomized retinal ganglion cells delayed after intraoptic nerve transplantation of olfactory ensheathing cells in adult rats[J]. *Cell Transplant*, 2010, 19:159-166.

[27] Li Y, Sauve Y, Li D, et al. Transplanted olfactory ensheathing cells promote regeneration of cut adult rat optic nerve axons[J]. *J Neurosci*, 2003, 23:7783-7788.

[28] Faurez F, Grasland B, Beven V, et al. The protective immune response against Pseudorabies virus induced by DNA vaccination is impaired if the plasmid harbors a functional Porcine circovirus type 2 rep and origin of replication[J]. *Antiviral Res*, 2012, 96:271-279.

[29] Kim SB, Kim SJ, Lee BM, et al. Oral administration of Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing swine interleukin-18 induces Th1-biased protective immunity against inactivated vaccine of pseudorabies virus[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155:172-182.

(收稿日期:2014-03-12)

(本文编辑:季魏红)

中华眼视光学与视觉科学杂志第一届编辑委员会成员名单

顾问: 杨雄里 陈霖 谢立信 黎晓新 赵家良 赵堪兴 葛坚 姚克

总编辑: 瞿佳

副总编辑 (以姓氏汉语拼音为序):

范先群 刘祖国 吕帆 孙兴怀 王宁利 许迅 杨培增 阴正勤

编委委员 (以姓氏汉语拼音为序):

白继 毕宏生 陈晓明 陈有信 陈跃国 程凌云 崔浩 戴虹 董方田 董晓光 樊映川 范先群
 高前应 顾扬顺 管怀进 郭海科 郝燕生 何伟 何明光 何守志 黄丽娜 黄翊彬 黄振平 惠延年
 贾亚丁 亢晓丽 雷博 李莹 李建军 李筱荣 李毓敏 廖荣丰 刘晓玲 刘奕志 刘祖国 卢奕
 吕帆 马景学 马志中 瞿佳 瞿小妹 沈晔 沈丽君 施明光 史伟云 宋鄂 孙乃学 孙兴怀
 孙旭光 汤欣 唐罗生 唐仕波 汪辉 王薇 王雁 王丽娅 王宁利 王勤美 王雨生 韦企平
 魏锐利 魏世辉 魏文斌 夏晓波 肖利华 谢培英 邢怡桥 徐亮 徐格致 徐国兴 许迅 颜华
 晏晓明 杨培增 杨亚波 杨智宽 叶剑 叶娟 阴正勤 余敏斌 原慧萍 袁援生 袁志兰 曾骏文
 张风 张丰菊 张劲松 张军军 张卯年 张铭志 张清炯 张作明 赵东卿 赵明威 赵培泉 赵云娥
 周翔天 周行涛 朱豫 朱思泉

香港地区及海外编委 (以姓氏英文字母为序):

Jack Holladay(美国) John Marshall(英国) Frank Schaeffel(德国) Frank Thorn(美国) Mark Tso(美国)
 George O. Waring(美国) George Woo(香港) Maurice Yap(香港) Terri L. Young(美国) 何世坤(美国)
 胡诞宁(美国) 蒋百川(美国) 王光霖(美国)

荣誉编委 (以姓氏汉语拼音为序):

陈祖基 褚仁远 方春庭 郭静秋 郭希让 何秀仁 胡聪 蒋幼芹 李镜海 李美玉 李子良 宋慧琴
 孙葆忱 王竞 王思慧 王文吉 吴中耀 徐艳春 张士元 赵红梅

特邀编委 (以姓氏汉语拼音为序):

梁远波 邵立功