

研究简报

低亲和性神经营养受体 p75 在人胚胎视网膜中的表达*

丁锦东¹⁾ 黄 炫¹⁾ 胡祥友^{2, 3)} 周逸峰¹⁾ 胡 兵^{1)**}¹⁾中国科学技术大学生命科学学院视觉研究实验室, ²⁾神经退行性疾病实验室, 合肥 230027;³⁾安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230022)

摘要 p75 神经营养受体在视网膜的发育以及再生过程中发挥着重要的作用, 而在人类视网膜中的分布状况尚未被研究. 利用免疫组织化学方法, 在光镜水平下确定了 p75 在人胚胎发育 5、6 和 7 个月的视网膜中的分布情况. 在视网膜神经节细胞层出现最强的 p75 免疫阳性反应, 在其他各层也有较弱的免疫阳性反应. 在胚胎 6、7 月的视网膜中, 主要由 Müller 细胞的终足构成的内界膜上出现了比较强的 p75 表达. p75 在人胚胎视网膜中的分布情况与小鼠视网膜中很类似, 主要表达在 Müller 细胞, 在神经节细胞上也可能有表达.

关键词 p75 神经营养受体, 视网膜, 发育, 人, 免疫组织化学

学科分类号 R329.4

p75 (或 p75NTR) 是一种分子质量为 75 ku 的细胞表面糖蛋白, 可以以相似的低亲和性与神经营养因子 (NGF、BDNF、NT-4、NT-3 等) 结合并发挥作用. 尽管它属于最早被克隆的生长因子受体之一, 但十几年来对于其功能以及细胞内作用途径仍所知甚少. 目前比较为大家接受的观点是, p75 与 Trk 受体共同表达时, 有助于神经营养因子与 Trk 受体的特异性结合, 促进神经细胞的存活与生长; 而 p75 单独表达于细胞表面时, 神经营养因子与之结合会引起细胞凋亡^[1~5]. 在视网膜正常发育过程以及各种因素引起的视网膜损伤情况中, 都发生大量的神经细胞死亡. p75 在这里面发挥了怎样的作用, 一直是人们关注的问题. 目前, p75 在大鼠、鸡等动物的视网膜中发育、成年及再生后的表达情况均有报道, 并且对其可能发挥的作用进行了探讨^[6~10]. 但是, 至今还未见到有关 p75 在人类视网膜中分布情况的详细报道.

1 材料和方法

1.1 材料处理

本实验选取妊娠 5 ($n=4$)、6 ($n=6$) 和 7 个月 ($n=4$) 的人胚胎视网膜共 14 例, 材料来自安徽医科大学第一附属医院人脑库以及组胚教研室. 在引产后 1 h 内取出胎儿眼球, 于角膜处穿洞后立即浸入 4℃ 的固定液 (用 0.1 mol/L 磷酸缓冲

液配制的 4% 多聚甲醛, pH 7.4) 中, 固定 10 天以上. 固定好的眼球依次经含 10%、20%、30% 蔗糖的磷酸缓冲液 (pH 7.4, 4℃) 浸泡沉底, 做旁矢状恒冷箱冰冻切片, 厚度为 14 μm . 切片贴在明胶化的载玻片上, 干燥后于 -20℃ 保存.

1.2 免疫组织化学

切片先用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次, 随后用含 10% 山羊血清、10% 大鼠血清、5% 牛血清白蛋白和 0.2% TritonX-100 的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 在室温下封闭 1 h. 然后施加一抗, 4℃ 下孵育过夜. 一抗为兔抗人 p75 多克隆抗体 (1:100, Promega 公司), 针对 p75 的胞内结构域. PBS 洗涤 3 次后, 施加二抗生物素化山羊抗兔 IgG (1:250, Vector Laboratories), 室温下反应 1 h. PBS 洗涤 3 次. 随后施加 Fluorescein Avidin D (1:2000, Vector Laboratories), 室温下于暗处反应 30 min. PBS 清洗, 终止反应. 待切片干燥后用甘油封片. 用蒸馏水代替一抗, 作为阴性对照.

1.3 图像观察与获取

用 OLYMPUS BX-60 荧光显微镜观察染色结果. 利用 SPOT Jr 图像获取及分析系统将图像采集

* 中国科学院生物科学与技术研究特别支持费 (STZ98-2-09) 和中国科学院青年科学家小组基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0551-3601436, E-mail: bhu@ustc.edu.cn

收稿日期: 2001-10-09, 接受日期: 2001-10-22

入计算机.

2 结 果

p75 免疫组化染色结果见图 1. 从图 1 中可见, p75 免疫阳性在神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 最强. 在外界膜 (outer limiting membrane, OLM) 和成神经细胞层 (neuroblastic layer, NBL) 有比较弱的阳性反应. 在 5 个月大的胚胎

(embryonic 5-month, E5M) 视网膜中, GCL 中的 p75 阳性没有明确的细胞形态, 在 E6M 和 E7M 中出现了明确的细胞形态. p75 的阳性表达围绕着一个细胞形态的空洞, 很可能是神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 或移位的 (displaced) 无长突细胞 (图 1i 中箭头所示). 在 E5M 的视网膜中, 内界膜上没有 p75 表达 (图 1b, c). 而在 E6M 和 E7M 的视网膜中, 内界膜上出现

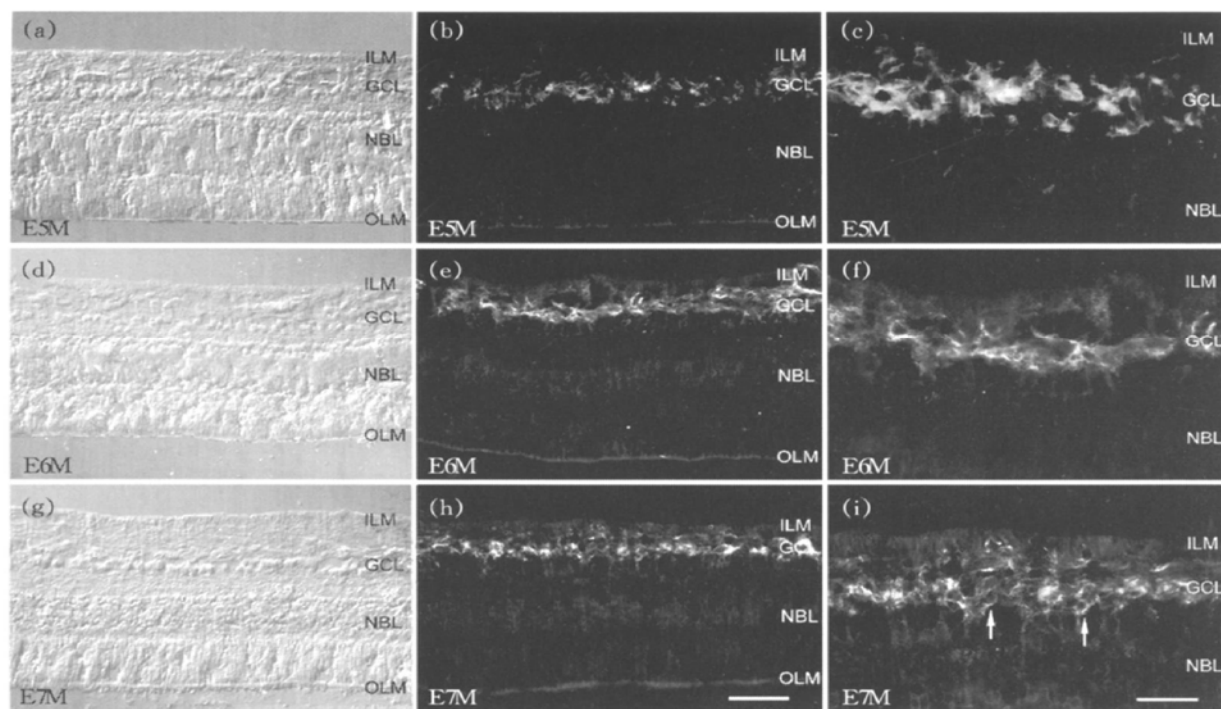


Fig 1 p75 immunoreactivity in human embryonic 5-month (E5M), E6M and E7M retinæ

The most intensive p75 positive reactivity appeared in GCL. The positive staining encircled black holes, presumably the RGCs or displaced amacrine cells (arrows in i). In E6M and E7M retinæ, relative strong p75 immunoreactivity also appeared in ILM. (a), (d) and (g) are differential interference contrast (DIC) images showing the structure of human retina at different embryonic developmental stages respectively. Scale bar= 80 μ m in (h) for (a), (b), (d), (e), (g) and (h); scale bar= 40 μ m in (i) for (c), (f) and (i).

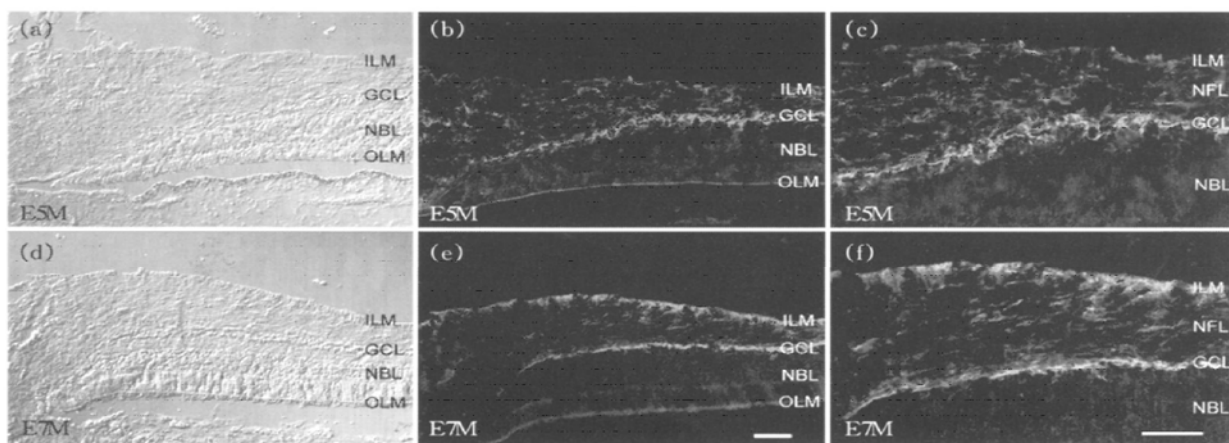


Fig 2 p75 immunopositive staining in retinal tissue near the optic nerve head

Two p75 positive staining layers were apparent in E7M human retina (e and f) and only one p75 positive layer in E5M (b and c). (a) and (d) are DIC images of retinal tissue near the optic nerve head of E5M and E7M, respectively. Scale bar= 100 μ m in (e) for (a), (b), (d) and (e); scale bar= 80 μ m in (f) for (c) and (f).

了 p75 阳性表达 (图 1e, f, h, i). 阴性对照组中未发现任何阳性反应 (未显示). 图 1a, d, g 分别为 E5M, E6M 和 E7M 的视网膜的微分干涉衬 (differential interference contrast, DIC) 显微图像, 显示了人胚胎视网膜在不同发育阶段的层次结构.

为了进一步显示 p75 在 GCL 和 ILM 中的表达情况, 我们观察了视网膜组织中靠近视神经乳头的部分. 在这一区域, 由于大量的神经节细胞轴突汇集, 使得神经纤维层 (nerve fiber layer, NFL) 明显增厚, ILM 与 GCL 分离. 在 E7M 的视网膜上, 可以明显地看到两个很强的 p75 阳性反应层, 分别代表了 ILM 和 GCL (图 2e, f). 这表明在 E7M 时, 内界膜上确实有 p75 表达. 而在 E5M 时, 只有 GCL 有很强的阳性, 另外在 NFL 有零散的 p75 阳性成分 (图 2b, c).

3 讨 论

在视网膜发育过程中会有大量的细胞精简, p75 受体是否参与了这一过程引起了人们的极大兴趣. 在鸡胚胎视网膜中, Frade 等^[9]证明 p75 在 RGCs 上有表达, 而且直接介导了 RGCs 的死亡. 与之相反, 在大鼠视网膜上的一系列细致研究工作中, 我们证明了 p75 在视网膜 Müller 细胞, 而不在 RGCs 上表达, 并且不会直接参与 RGCs 的凋亡^[6~8]. 在人视网膜中, p75 的分布状况至今未见报道. 在本项研究中, 我们运用免疫组织化学方法在光镜水平下观察了 p75 受体的表达情况. 由于材料和方法的限制, 没有应用蛋白质印迹 (western blot) 的方法. p75 在人胚胎视网膜中的分布和在大鼠中的情况非常类似. ILM 由 Müller 细胞的终足构成, 在 ILM 中发现 p75 的阳性表明它确实是在人视网膜的 Müller 细胞上表达. 在 GCL 上, 受到光学显微镜分辨率和人胚胎组织不便于预

先追踪标记 RGCs 的限制, 目前的结果仍不足以完全判定 p75 究竟在 RGCs 还是 Müller 细胞上. 但是, p75 在 GCL 上“围绕黑洞”的表达模式与我们在大鼠中观察到的结果是非常类似的^[7, 8]. 可以说, p75 在紧密包裹着 RGCs 的 Müller 细胞上, 而不在 RGCs 本身表达的可能性很大. 当然, 最终的结果尚有待于进一步深入研究.

致谢 感谢安徽医科大学第一附属医院周江宁教授以及组胚教研室贾友苏教授和陈晓宇老师在提供人胚胎材料过程中给予的热情帮助.

参 考 文 献

- 1 Dechant G, Barde Y-A. Signalling through the neurotrophin receptor p75^{NTR}. *Curr Opin Neurobiol*, 1997, **7** (3): 413~418
- 2 Bothwell M. p75^{NTR}: a receptor after all. *Science*, 1996, **272** (5261): 506~507
- 3 Barker P A. P75^{NTR}: a study in contrast. *Cell Death Differ*. 1998, **5** (5): 346~356
- 4 Carter B D, Lewin G R. Neurotrophins live or let die: does p75^{NTR} decide? *Neuron*, 1997, **18** (2): 187~190
- 5 Barrett G L. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*, 2000, **61** (2): 205~229
- 6 Hu B, Yip H K, So K-F. Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: an immunocytochemical study at light and electron microscopic levels. *Glia*, 1998, **24** (2): 187~197
- 7 Hu B, Yip H K, So K-F. Expression of p75 neurotrophin receptor in the injured and regenerating rat retina. *Neuroreport*, 1999, **10** (6): 1293~1297
- 8 Ding J, Hu B, Tang L S, *et al.* Study of the role of the low-affinity neurotrophin receptor p75 in naturally occurring cell death during development of the rat retina. *Dev Neurosci*, 2001, **23** (6): 390~398
- 9 Frade J M, Rodríguez-Tébar A, Barde Y-A. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*, 1996, **383** (6596): 166~168
- 10 Frade J M, Barde Y-A. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development*, 1999, **126** (4): 683~690

Localization of Low-affinity Neurotrophin Receptor p75 in Human Embryonic Retina*

DING Jin-Dong¹⁾, HUANG Xuan¹⁾, HU Xiang-You^{2, 3)}, ZHOU Yi-Feng¹⁾, HU Bing^{1)**}

(¹⁾ Vision Research Laboratory, (²) Laboratory of Neurodegenerative Disease, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; (³) The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract The low-affinity neurotrophin receptor p75 plays an important role during retina development and regeneration. But its localization in human retina has not been explored till now. The expression of p75 in

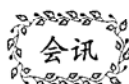
human retinae from embryonic 5 to 7-month old was studied using immunohistochemistry method under light microscopic level. The most intensive p75 immunoreactivity appeared in ganglion cell layer, and weak p75 reactivity also presented in other part of the retina. In the retina of 6 and 7-month old embryos, relative strong p75 immunoreactivity appeared in inner limiting membrane, which is formed by the end-feet of Müller cells. The result indicates that, like in rat retina, p75 mainly localized on Müller cell processes though the possibility of p75 on retinal ganglion cells could not be completely excluded.

Key words p75 neurotrophin receptor, retina, development, human, immunohistochemistry

* This work was supported by grants from Special Support Fee for Biological Science and Technology Research of CAS (STZ98-2-09) and Young Scientist Group Foundation of The Chinese Academy of Sciences.

** Corresponding author. Tel: 86-551-3601436, E-mail: bhu@ustc.edu.cn

Received: October 9, 2001 Accepted: October 22, 2001



BIO CHINA 2002
中国国际生物创新项目成果交易洽谈会
京伦饭店 北京
2002年8月28~31日

生物技术作为现代科技的一个重要组成部分,必将在刚刚起步的 21 世纪得到迅猛发展,生物技术和应用将掀起一场新的工业革命。为进一步加快生物科技成果项目转化的步伐,我们将在 2002 年 8 月 28~31 日在北京京伦饭店举办本次洽谈会。

本次洽谈会集展览、论坛、项目发布、成果交易、新产品演示于一体,涉及生物技术产业及其在农业、医疗、工业与环境等方面,提供的生物科研成果均代表了我国最前沿的生物技术水平。大会将设生物产业洽谈专场、生物技术洽谈专场、生物发展洽谈专场、生物资源洽谈专场、生物信息洽谈专场、药厂 CEO 论坛、投资机构 CEO 论坛...

通过参加此次洽谈会可以深入了解到目前生物技术领域的最新研究成果和投资机会,并有机会和该领域内的专家进行面对面的交流,找到适合自己的投资机会和商机,这无论对于寻找项目或是对具体项目进行融资都是一个很好的途径,并且通过参加此次洽谈会可迅速的提高贵公司(机构)在行业内的知名度。因此,我们诚邀您参加本次洽谈会。

联系电话: 010-51026291, 51026293, 51026290 传真: 010-51026290

E-MAIL: genefax@263.net

http: //www.genefax.com

开户名称: 中国国际生物创新项目成果交易洽谈会

开户行: 广东发展银行北京分行建国路支行

帐号: 78651601046179



中国国际生物创新项目成果交易洽谈会回执单:

姓 名			
电话(手机)		传 真	
单位名称		性 别	
通讯地址		邮 编	
E-mail		参会人数	