

内耳发育研究的新进展 ——神经营养素及其受体的调控作用*

胡 兵 陈湘川

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026)

摘要 近年来, 对神经营养因子 (neurotrophic factors) 尤其是神经营养素 (neurotrophins, NTs) 及其功能性受体——酪氨酸激酶受体 TrkA、TrkB、TrkC 的研究进展迅速. 这些因子能够促进神经元的存活、生长、分化以及损伤后的修复. 应用免疫组化、原位杂交和基因敲除小鼠模型等方法研究这些因子及其受体在内耳发育中的调控作用, 可以在细胞、分子水平上提供有关内耳发育机制的新认识. 外源性神经营养素可能在临床治疗失聪上具有潜在的应用价值.

关键词 神经营养因子, 酪氨酸激酶受体, 基因敲除, 内耳

学科分类号 Q437

自 Levi Montalcini 1956 年发现神经生长因子 (NGF) 并因此获得 1986 年的诺贝尔医学奖以来, 该家族中其他成员如脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经营养素-3 (NT-3) 和神经营养素-4/5 (NT-4/5) 等相继被纯化或克隆, 其相应的功能性受体 Trks 也已被克隆并确认. 有关这些因子及其受体的结构和功能等介绍已有一些综述见诸国内期刊^[1,2]. 近年来, 有关内耳的发育分化受神经营养因子调控的报道增多^[3]. 本文综述应用原位杂交和基因敲除小鼠模型等方法研究内耳的神经发育与某些神经营养素及其受体的关系的最新进展.

前庭和耳蜗神经元以及支配内耳的自主神经和传出神经的存活均可能受某些神经营养素及其受体的调节. BDNF^{-/-} 或 TrkB^{-/-} (BDNF 或 TrkB 基因敲除) 的小鼠全部丧失对半规管的神经支配, 并且减少了对耳蜗顶部和中部的外毛细胞的神经支配. NT-3^{-/-} 或 TrkC^{-/-} 小鼠丧失了支配耳蜗底部的螺旋节细胞. BDNF^{-/-}、NT-3^{-/-} 或 TrkB^{-/-}、TrkC^{-/-} 双基因敲除小鼠显示胚胎晚期几乎丧失所有的耳蜗和前庭核^[4], 并且于出生时完全丧失了对内耳的神经支配^[5]. 这两种神经营养素及其受体被证实为内耳传入神经支配正常发育的必要条件^[6].

1 内耳的发育

内耳由内陷增厚的听基板层 (即听泡) 形成, 是胚胎后脑两侧表面和外胚层的一个区域, 其极轴通过内耳周的间叶 (基质) 和后脑的组织间相互作用

而固定. 听神经节细胞由发育中的耳的前腹侧部分形成, 迅速迁移并使其突起伸展至相应的外周 (内耳) 和中枢 (脑干) 的靶位置. 内耳由司平衡的前庭和司听觉的耳蜗组成. 它不仅接受来自前庭和耳蜗 (螺旋) 节细胞的传入神经支配, 还接收中枢的传出神经和颈上神经节的自主神经的支配. 耳传出神经元起源于面运动神经元, 迁移至特定的位置并发出传出神经通过第八对脑神经的前庭根分别支配耳蜗和前庭的感觉上皮细胞. 因此, 内耳接受以下三个不同来源的神经纤维的支配: a. 听基板, 它形成内耳的传入神经元 (前庭和耳蜗节细胞) 以及感觉上皮细胞; b. 脑干基底层, 它形成内耳的传出神经元; c. 神经嵴, 它形成颈上神经节 (内耳的自主神经支配). 很可能存在不同的分子引导或维持这些不同的神经支配.

2 内耳发育与营养因子及受体的调控

对发育和成年的大鼠、小鼠、鸡和蛙的内耳中神经营养素及其受体的分布进行分析, 发现内耳中有 BDNF、NT-3、GDNF 和 FGFs 的表达. 应用离体培养、原位杂交和靶基因敲除等方法研究这些因子对支配内耳的神经纤维的营养和诱向作用, 发现 BDNF 和 NT-3 及其受体 TrkB 和 TrkC 对内耳的传入神经支配的维持必不可少. 而维持内耳传出和自主神经支配的特异性神经营养因子尚未得到证实.

* 中国科学院生物科学与技术研究特别支持费资助 (STE98-2-09).

收稿日期: 1998-05-15, 修回日期: 1998-08-03

2.1 NGF与内耳的发育

小鼠、大鼠和鸡在胚胎发育时,内耳可以释放出一种尚未确认的因子促进神经发育生长并吸引生长中的神经纤维.有人认为这种耳源性因子可能就是NGF,但其他研究并不支持这一假说^[7].在NGF转基因小鼠中证实NGF并非是神经纤维从颈上神经节投射到其靶组织的引导分子. $\text{NGF}^{-/-}$ 小鼠中耳蜗或前庭结构均未见丧失^[8],这与在内耳感觉上皮中应用原位杂交方法未检测到NGF mRNA的结果一致^[9].在感觉上皮以外区域有NGF mRNA存在的报道, $\text{NGF}^{-/-}$ 或 $\text{TrkA}^{-/-}$ 小鼠中颈上神经节丧失且内耳自主神经支配缺失^[8,10],提示NGF可能提供对内耳自主神经支配的营养支持,但此结论尚需进一步的实验证实.

2.2 BDNF和NT-3与内耳的发育

研究表明BDNF、NT-3的mRNA及其受体TrkB和TrkC在内耳感觉上皮和耳蜗、前庭节细胞上均有表达^[7,8,10-13],并且表现出特定的时间-空间分布模式.在新生阶段的耳蜗和前庭感觉上皮中BDNF mRNA持续表达但呈减少趋势^[14].NT-3则呈现出不同的空间上的表达模式,半规管的感觉上皮特异性地缺少NT-3表达. NT-3 mRNA出现的时间大体与BDNF mRNA一致^[11],不仅在感觉毛细胞上存在而且还在其支持细胞上存在^[9,14],到成年后NT-3仅限于在内耳毛细胞上表达^[7].在哺乳类耳蜗中,NT-3 mRNA的表达水平呈现出一种沿耳蜗基底到顶部与成熟相对应的梯度分布.在前庭-耳蜗节细胞中NT-3甚至出现于TrkC之前^[11].BDNF和NT-3的分布在耳蜗内、外毛细胞上表现出相互交叠的模式^[14],故无特定模式选择性地调节某类毛细胞的支配.正如上述神经营养素存在相互交叠表达模式一样,它们相应的受体也有相互交叠模式的表达.同位素标记原位杂交实验显示TrkB和TrkC在早期胚胎的耳蜗和前庭神经节细胞上表达.这两种受体直至新生阶段在大多数节细胞上均有空间、时间上的交叠存在^[9,11,14].

应用基因敲除小鼠模型研究内耳发育,发现 $\text{BDNF}^{-/-}$ 小鼠中前庭核丧失超过80%^[4,15], $\text{NT-3}^{-/-}$ 小鼠中耳蜗核丧失亦超过80%^[4].另外, $\text{NT-3}^{-/-}$ 小鼠亦有前庭核的部分丧失以及 $\text{BDNF}^{-/-}$ 小鼠有耳蜗核的少量丧失^[4].以上结果表明在前庭和耳蜗发育过程中这两种神经营养素的作用总的来说是互补的.

比较 $\text{BDNF}^{+/-}$ (杂合子) 与 $\text{BDNF}^{-/-}$ (纯

合子) 小鼠发现前庭核的存活对BDNF有基因剂量依赖效应^[4],故BDNF对前庭传入核团的维持是必不可少的. $\text{NT-3}^{-/-}$ 小鼠中耳蜗核的丧失基本上发生在占耳蜗核92%~94%的第I类螺旋节细胞上,基底部全部丧失神经支配.比较 $\text{BDNF}^{-/-}$ 和 $\text{NT-3}^{-/-}$ 基因敲除小鼠的耳蜗神经支配模式,发现BDNF对顶部外毛细胞神经支配的维持起重要作用,而NT-3则对基底部影响较大.

TrkB受体亚单位的基因敲除小鼠丧失了所有对半规管上皮的神经支配,而耳蜗核直至出生也未见缺失^[5].在出生后第7天或更老的 $\text{TrkB}^{-/-}$ 小鼠中,第II类传入纤维仅延伸至耳蜗基底部的三排外毛细胞.故 $\text{TrkB}^{-/-}$ 小鼠的耳蜗支配模式完全平行于 $\text{BDNF}^{-/-}$ 中的情况.但有时间上的一点差异 ($\text{TrkB}^{-/-}$ 早于 $\text{BDNF}^{-/-}$ 1天) 和影响强度上的差异 ($\text{TrkB}^{-/-}$ 中耳蜗核丧失两倍于 $\text{BDNF}^{-/-}$),后者可能与TrkB可以结合另一配基(NT-3)有关.

同 $\text{NT-3}^{-/-}$ 基因敲除小鼠一样, $\text{TrkC}^{-/-}$ 小鼠亦丧失大量耳蜗核和少量前庭核. $\text{TrkC}^{-/-}$ 小鼠并无前庭神经支配模式方面的改变,但对耳蜗内、外毛细胞尤其是基底部的神经支配减少^[5].与上述研究不同的是,另有报道称 $\text{TrkC}^{-/-}$ 小鼠中只丧失对内毛细胞的神经支配而不影响对外毛细胞的神经支配,并指出 $\text{TrkB}^{-/-}$ 小鼠仅丧失对外毛细胞的神经支配^[12].

双基因敲除小鼠可直接验证BDNF和NT-3及其受体TrkB和TrkC是维持内耳正常传入神经支配的必要条件. $\text{BDNF}^{-/-}$ 、 $\text{NT-3}^{-/-}$ 或 $\text{TrkB}^{-/-}$ 、 $\text{TrkC}^{-/-}$ 双基因敲除小鼠显示胚胎晚期几乎丧失所有的耳蜗和前庭核^[4],并且于出生时完全丧失了对内耳的神经支配^[5].这些研究清楚地证实BDNF和NT-3以及它们的受体TrkB和TrkC对于内耳传入神经支配的维持至关重要.

2.3 其他神经营养因子与内耳的发育

后脑也具有促进前庭和耳蜗节细胞存活的能力,但是引导其神经纤维到达它们特异的中枢靶位置的分子不明.耳蜗传出神经纤维到达第八对脑神经根的生长调节机制也不清楚.在内耳感觉上皮未检测到NGF和NT-4/5^[9].用原位杂交和PCR分析证实TrkA只在发育的前庭-耳蜗节细胞上短暂表达^[9].在新生大鼠耳周的软骨组织及内、外毛细胞上检测到GDNF mRNA的表达,而成年鼠中GDNF仅在内毛细胞上表达. $\text{NT-4/5}^{-/-}$ 小鼠中耳

蜗或前庭结构均未见丧失^[8]。这与在内耳感觉上皮中应用原位杂交方法未检测到 NT-4/5 mRNA 的结果一致^[9]。在 BDNF^{-/-} 小鼠中, 对小囊和对耳蜗外毛细胞的传出支配仅在传入神经支配以外区域保持^[4]。这提示可能有其他因子调节传出神经支配的保持。由于面运动神经元和内耳传出神经元来自同一胚胎起源, 传出纤维可能由以前报道发现的支持运动神经元的 CNTF^[16] 或 GDNF^[17] 因子所支持。这方面仍有待进一步的研究证实。

3 毛细胞和听神经研究的新证据

听觉发育领域长期未决的一个课题是毛细胞和神经纤维是如何相互作用和相互支持的。早期研究提出毛细胞分化和成熟依赖于传入或传出神经纤维的接触, 类似味蕾系统。但其他一些研究发现毛细胞的初始形成并不依赖于神经纤维的支配^[6]。近来通过分析神经营养素或 Trk 受体的基因敲除小鼠中不同神经纤维模式的丧失, 发现去神经支配并不影响毛细胞早期分化^[4, 5, 12]。最近有研究提出 TrkC^{-/-} 小鼠中耳蜗感觉上皮的厚度有所变化^[12], 而其他报道则证实所有感觉上皮基本上是正常发育的, 即便是在双基因敲除小鼠中 (已丧失对内耳的全部神经支配) 也无异样^[4, 5]。总之, 感觉上皮的初始形成和毛细胞的成熟与神经纤维接触无关。长期去神经支配导致毛细胞去分化的可能性依然存在。如 BDNF^{-/-} 小鼠, 出生后 24 d 的前庭上皮仍未成熟并且以第 II 类前庭毛细胞为主, 这种小鼠缺少第 I 类前庭毛细胞^[4]。

神经纤维支配并不调节毛细胞的形成, 而毛细胞对耳蜗和前庭核的维持不可缺少。已知转录因子 Brrr-3.1 仅在毛细胞上表达, 近来发现 Brrr-3.1^{-/-} 小鼠中毛细胞很难发育正常或出生时无毛细胞存在并且在出生后第二周退化。接着, 耳蜗和前庭核也退化^[18]。这提示毛细胞在听神经纤维的发育中起重要的作用。尚未见 Brrr-3.1^{-/-} 小鼠中退化的毛细胞上有无 BDNF 和 NT-3 表达的报道。

4 展 望

神经营养因子在内耳的发育中起重要的调控作用, 进一步研究这些因子对听觉脑干以至皮层发育的影响将会加深人们对听觉系统发育的分子机制的了解。在这方面已有一些初步的研究报道^[19]。另外, 在成年节细胞上存在神经营养素受体, 提示神经营养素可维持成年耳蜗和前庭节细胞。细胞培养

实验表明神经营养素可以促进培养的前庭节细胞存活^[20]。将 BDNF 或 NT-3 注入内耳受损的毛细胞可以阻止大部分螺旋节细胞的退化^[21, 22]。这表明神经营养素不仅调节正常的内耳发育, 最终还可能为临床提供治疗失聪的新方法。

参 考 文 献

- 1 黄秉仁, 蔡良琬 (Huang B R, Cai L W). 神经生长因子家族及其受体研究进展. 生理科学进展 (Progress in Physiological Science), 1995, **26** (2): 115~120
- 2 何 成, 王成海, 敖世洲 (He C, Wang C H, AO S Z). 神经营养因子. 生命科学 (Life Science), 1996, **8** (5): 32~35
- 3 杜延顺, 刘 钺, 汪若峰 (Du Y S, Liu T, Wang R F). 神经生长因子家族及其受体基因表达与内耳组织发育分化的关系. 国外医学 (耳鼻喉科分册) (Foreign Medical Science), 1996, **20** (4): 207~211
- 4 Ernfors P, van de Water T, Loring J, *et al.* Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. Neuron, 1995, **14** (6): 1153~1164
- 5 Fritsch B, Silos-Santiago I, Smeyne R, *et al.* Reduction and loss of inner ear innervation in trkB and trkC receptor knockout mice: A whole-mount DiI and scanning electron microscopic analysis. Aud Neurosci, 1995, **1** (2): 401~417
- 6 Fritsch B, Silos-Santiago I, Bianchi L M, *et al.* The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. TINS, 1997, **20** (4): 159~164
- 7 Ylikoski J, Pirvola U, Moshnyakov M, *et al.* Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. Hear Res, 1993, **65** (1~2): 69~78
- 8 Farinas I, Reichardt L F. Neurotrophic factors and their receptors: implications of genetic studies. Semin Neurosci, 1996, **8** (1): 133~143
- 9 Schecterson L C, Bothwell M. Neurotrophin and neurotrophin receptor mRNA expression in developing inner ear. Hear Res, 1994, **73** (1): 92~100
- 10 Fagan A M, Zhang H, Landis S, *et al.* TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons *in vivo*. J Neurosci, 1996, **16** (19): 6208~6218
- 11 Pirvola U, Arumae U, Moshnyakov M, *et al.* Coordinated expression and function of neurotrophins and their receptors in the rat inner ear during target innervation. Hear Res, 1994, **75** (1~2): 131~144
- 12 Schimmang T, Minichiello L, Vazquez E, *et al.* Developing inner ear sensory neurons require TrkB and TrkC receptors for innervation of their peripheral targets. Development, 1995, **121** (10): 3381~3391
- 13 Don D M, Newman A N, Micevych P E, *et al.* Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor mRNA in the vestibuloauditory system of the bullfrog. Hear Res, 1997, **114** (1~2): 10~20
- 14 Wheeler E F, Bothwell M, Schecterson L C, *et al.* Expression of BDNF and NT-3 mRNA in hair cells of the organ of Corti: quantitative analysis in developing rats. Hear Res, 1994, **73** (1): 46~56
- 15 Jones K R, Farinas I, Backus C, *et al.* Targeted disruption of the

- BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 1994, **76** (6): 989~999
- 16 DeChiara T M, Vejsada R, Poueymirou W T, *et al.* Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell*, 1995, **83** (2): 313~322
- 17 Sanchez M P, Silos-Santiago I, Frisen J, *et al.* Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, 1996, **382** (6586): 70~73
- 18 Erkman L, McEvelly R J, Luo L, *et al.* Role of transcription factors Brrr 3.1 and Brrr 3.2 in auditory and visual system development. *Nature*, 1996, **381** (6583): 603~606
- 19 Hafidi A, Moore T, Sanes D H. Regional distribution of neurotrophin receptors in the developing auditory brainstem. *J Comp Neurol*, 1996, **367** (3): 454~464
- 20 Zheng J L, Gao W Q. Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *Eur J Neurosci*, 1996, **8** (9): 1897~1905
- 21 Staecker H, Kopke R, Malgrange B, *et al.* NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells. *NeuroReport*, 1996, **7** (4): 889~894
- 22 Miller J M, Chi D H, O'Keeffe L J, *et al.* Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int J Dev Neurosci*, 1997, **15** (4~5): 631~643

New Progresses on the Study of Inner Ear Development: Regulation of Neurotrophins and Their Receptors. HU Bing, CHEN Xiang-Chuan (*School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China*).

Abstract The progresses on the study of neurotrophic factors such as neurotrophins and their functional receptors-tyrosine kinase receptors (Trks-TrkA, TrkB, TrkC) have been made rapidly. These factors can promote neuronal survival, outgrowth, differentiation and repairment of injury. New knowledge on the mechanism of inner ear development has been provided at both molecular and cellular levels by the application of immunohistochemistry, *in situ* hybridization and gene knock-out mice models in the study on the regulation of these neurotrophins and their receptors in the inner ear development. The application of exogenous neurotrophins has great clinical potential for the cure of hearing loss.

Key words neurotrophin, tyrosine kinase receptor, knock-out mice, inner ear

视差检测：简单细胞、复杂细胞及能量模型^{*}

张志磊 葛霁光¹⁾ 郭晓晖

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘要 立体视觉信息的处理在于皮层双眼性细胞的活动。皮层中简单细胞对视差的编码方式被认为有两种：位置差 (position shift) 和相位差 (phase shift)，但简单细胞并不适合作为视差检测器。对一些复杂细胞的视差响应特性的生理研究，发现复杂细胞是一种比较适合视差检测器。模型的研究提出基于这类简单细胞的复杂细胞能量模型，可以很好的检测视差，并可以较好的解释一些生理现象。

关键词 立体视觉，位置差，相位差，能量模型

学科分类号 Q663

1 概述

立体视觉的现象很早就被认识到了，由立体镜提出视差，由随机点图对实验提出视差是立体视觉的唯一机制。大量生理实验的结果也为视差检测提供了生理基础。首先是发现视差敏感的细胞^[1]，接着将视差敏感细胞根据其对视差的响应特性，分为四大类细胞，分别为 near, far, tuned excitatory, tuned inhibitory，覆盖了视差范围^[2]，后来又增加两种，为 tuned far, tuned near^[3]。由此看来，无论

是注视平面 (零视差) 也好，交叉视差也好，非交叉视差也好，都有对应的细胞可以响应，这样，视差信息总是能被检测到，并能被正确编码。这种双眼性视差敏感细胞在许多动物的皮层当中都有发现，说明视差检测是有它的生理基础的。

双眼立体视觉涉及的是双眼信息的处理，是从两个视网膜的投影来在意识中重建空间信息。由于

^{*} 浙江省自然科学基金资助项目 (394115)。

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1998-05-15, 修回日期: 1998-10-06