

· 论 著 ·

神经生长因子在小鼠耳蜗中的表达分布及年龄相关性变化*

刘强和,王永宝,王亮亮,黄鑫,刘芳贤,邓铭
(桂林医学院附属医院耳鼻咽喉-头颈外科,广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨神经生长因子(NGF)在小鼠耳蜗中的表达分布与年龄的相关性变化。方法 选取 5、7 月龄的快速老化小鼠亚系 8(SAMP8)作为实验组,而同龄抗快速老化小鼠亚系 1(SAMR1)作为对照组。分别观察其耳蜗中 NGF 免疫组化染色及增龄性变化情况。结果 在小鼠耳蜗中,NGF 在螺旋神经节细胞、内外毛细胞、听神经纤维及血管纹中均有表达,且螺旋神经节细胞及内外毛细胞为主要表达部位。耳蜗螺旋神经节细胞及内外毛细胞 NGF 免疫组化染色平均光密度值:NGF 蛋白在不同月龄快速老化小鼠耳蜗组织中螺旋神经节细胞及毛细胞均有表达,第 5、7 月龄 SAMP8 小鼠耳蜗螺旋神经节细胞及毛细胞中的 NGF 蛋白表达较同龄 SAMR1 小鼠明显降低($P < 0.05$)。结论 NGF 蛋白在小鼠耳蜗中有表达并且表达水平随着小鼠年龄增长而降低,说明 NGF 蛋白可能与维持耳蜗的功能状态有关。

关键词:神经生长因子;耳蜗;螺旋神经节细胞;毛细胞;快速老化小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.24.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)24-2457-02

Distribution and age-related changes of nerve growth factor in the cochlea of mouse*

Liu Qianghe, Wang Yongbao, Wang Liangliang, Huang Xin, Liu Fangxian, Deng Ming

(Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution and the age-related of NGF changes in the cochlea of mouse. **Methods** Distribution in the cochlea and age-related expression of NGF protein in the cochlea spiral ganglion cell and hair cell were studied in SAMP8 mice of 5, 7 months. Normal aging senescence accelerated mouse/resistance 1(SAMR1) mice served as the control groups. **Results** NGF expression was observed in inner and outer hair cell, spiral ganglion cell, auditory nerve fibers and stria vasculari. The optical density of NGF immunohistochemical staining in the mouse, cochlea spiral ganglion cell and hair cell; There were NGF protein expressed in the cochlea of the senescence accelerated mouse throughout the development. Compared with the SAMR1, the SAMP8 at 5, 7 months developed a significant descend ($P < 0.05$). **Conclusion** NGF expresses in the cochlea of mouse and the expression level changes with age. This indicates that NGF protein probably has relationship with maintaining functional status of the cochlea.

Key words: nerve growth factor; cochlea; spiral ganglion cell; hair cell; senescence accelerated mouse

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)作为神经营养因子家族成员之一,其能够促进神经元的存活,作为中枢和周围神经系统的营养底物发挥着重要的支持和营养作用。NGF 不仅能够对正常神经细胞起营养因子的作用,而且还对损伤的神经细胞起到保护和修复作用^[1]。NGF 对神经系统的营养作用主要表现在促进神经细胞的树突发生、伸展及维持其存活进而增加其分布在支配区的密度;促进神经细胞的分化,加快其有丝分裂,使其数目增多。近年研究表明^[2], NGF 与相应受体结合,起到了抑制神经元的凋亡,表明 NGF 对神经细胞的存活起着至关重要的作用。有研究发现神经生长因子在中枢神经系统损伤后的再生也起到了关键作用,其机制在于抑制中枢神经损伤后产生的抑制蛋白^[3]。但是,NGF 在维持听觉感受器功能状态中作用如何,还没有相关研究报道。本实验选用 5、7 月龄的快速老化小鼠亚系 8(senescence accelerated mouse/prone 8, SAMP8),与同龄的正常抗老化小鼠抗快速老化小鼠亚系 1(senescence accelerated mouse/resistance 1, SAMR1)作对照,首先观察 NGF 在小鼠耳蜗中的分布表达情况,在此基础上从耳蜗螺旋神经节细胞和内外毛细胞 NGF 免疫组化染色平均光密度值改变等方面考察了 SAMP8 小鼠及 SAMR1 小

鼠耳蜗螺旋神经节细胞及内外毛细胞 NGF 表达的增龄性变化,旨在探讨耳蜗螺旋神经节细胞及内外毛细胞 NGF 表达水平变化是否与老年性耳聋有关,为临床治疗老年性耳聋提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组 选用雄性 5 月龄和 7 月龄 SAMP8 各 6 只作为实验组;选用同月龄的 SAMR1 各 6 只作为对照组,清洁级,以上动物均购自天津中医药大学第一附属医院实验动物中心。

1.2 耳蜗标本预处理 各组动物依次用生理盐水 15 mL、4% 的多聚甲醛 PBS 固定液(0.1 mol/L, pH7.4, Sigma 公司)15~25 mL 经左心室通过钳夹腹主动脉进行半身灌注处死,断头,游离右侧听泡。解剖显微镜下在同种固定液中打开听泡,蜗尖钻孔,将听泡全部切除,剔除听骨及鼓膜,开放圆窗膜,再置于同种固定液中 4℃ 冰箱保存过夜。第 2 天将标本取出,0.1 mol/L pH7.4 PBS 缓冲液反复冲洗,放入 10% 乙二胺四乙酸(pH7.4)中连续脱钙 7 d。

1.3 中轴位耳蜗石蜡切片制作、免疫组化染色、图像分析 取各组小鼠右侧耳蜗标本充分冲洗、脱水、浸蜡,轴位包埋。轴位

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060083);广西科学研究与技术开发计划基金资助项目(桂科攻 10124001B-56)。

切片,厚度 2 μm ,于低倍光学显微镜下观察控制切片制作。耳蜗石蜡切片的免疫组化染色按即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒使用说明书操作。一抗:兔抗小鼠 NGF 多克隆抗体(货号 HZ46443,美国 Rapidbio 公司),即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物有限公司,货号 SA1021)。耳蜗石蜡切片免疫组化染色方法:(1)中轴位耳蜗石蜡切片脱蜡、水化;(2)3%过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性;(3)采用柠檬酸盐缓冲液高压热修复抗原;(4)山羊血清封闭 30 min,甩去多余液体,不洗;(5)滴加适当稀释的一抗(1:200),37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 左右或 20 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 左右,也可 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBS 洗 2 min \times 3 次;(6)滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min,PBS 冲洗;(7)滴加试剂 SABC,20~37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min,PBS 冲洗;(8)DAB 显色,镜下控制反应时间,一般 3~10 min,蒸馏水洗涤;(9)苏木素轻度复染。脱水,透明,封片。显微镜观察。光学显微镜下观察,数码相机拍照。细胞质内有棕黄色或黄色颗粒或斑片者为 NGF 阳性细胞,用图像分析系统 Image Pro-Plus 6.0 对每一张免疫组织化学切片在 10 \times 4 倍下分别随机选取 3 个视野耳蜗螺旋神经节细胞及内外毛细胞,所选螺旋神经节细胞及内外毛细胞分别于 10 \times 40 倍下测定免疫组化染色平均光密度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。各月龄 SAMP8 和 SAMR1 小鼠耳蜗中轴位切片免疫组化染色平均光密度值用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间均数比较采用单因素的方差分析和独立样本 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NGF 在小鼠耳蜗中的表达分布 在小鼠耳蜗 NGF 免疫组化染色中发现,位于蜗轴附近骨螺旋板内的螺旋神经节细胞、基底膜上的内外毛细胞、由螺旋神经节细胞发出支配毛细胞的听神经纤维及骨壁内侧的血管纹均有阳性表达,且均表达于胞质。但螺旋神经节细胞及内外毛细胞为强阳性表达,听神经纤维及血管纹染色弱阳性。与之形成明显的对比,盖膜、耳蜗骨壁及周围间充质反应呈阴性。

主要形态呈圆形或椭圆形的螺旋神经节细胞,胞质丰富,染色呈明显的棕黄色,而由螺旋神经节细胞发出支配毛细胞的听神经纤维细胞胞质也着色,染色呈浅黄色,其着色程度与螺旋神经节细胞相比有明显的差别。基底膜上的一排内毛细胞及三排外毛细胞有明显着色,其着色程度与螺旋神经节细胞相近。位于膜蜗管外侧壁、骨壁内侧的血管纹也有染色,其染色程度与听神经纤维细胞相似。在相应的阴性对照组中,胞核染色蓝色,胞质为背景色。

2.2 不同月龄小鼠耳蜗内外毛细胞和螺旋神经节细胞中 NGF 分布 耳蜗 SGNs NGF 免疫组化染色,在各组小鼠耳蜗螺旋神经节细胞及内外毛细胞中均可见棕黄色颗粒(DAB 显色)的阳性表达。结果显示,随着快速老化鼠月龄的增加,小鼠耳蜗螺旋神经节细胞和内外毛细胞 NGF 免疫组化平均光密度值水平呈下降趋势,5、7 月龄 SAMP8 耳蜗螺旋神经节细胞和内外毛细胞 NGF 免疫组化平均光密度值水平与 SAMR1 相比明显下降($P<0.05$),见表 1~2 和封 2 图 1~2。

表 1 各组小鼠耳蜗 SGNs NGF 免疫组化平均

光密度值($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	5 月龄	7 月龄
对照组 SAMR1	6	0.420 \pm 0.039	0.342 \pm 0.017*
实验组 SAMP8	6	0.281 \pm 0.005 Δ	0.220 \pm 0.008*#

*: $P<0.01$,与组内 5 月龄比较;#: $P<0.01$,与对照组 7 月龄比较; Δ : $P<0.01$,与对照组 5 月龄比较。

表 2 各组小鼠耳蜗毛细胞 NGF 免疫组化平均光密度值($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	<i>n</i>	5 月龄	7 月龄
对照组 SAMR1	6	0.410 \pm 0.011	0.334 \pm 0.012*
实验组 SAMP8	6	0.291 \pm 0.007 Δ	0.213 \pm 0.009*#

*: $P<0.01$,与组内 5 月龄比较;#: $P<0.01$,与对照组 7 月龄比较; Δ : $P<0.01$,与对照组 5 月龄比较。

3 讨 论

快速老化小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)是日本京都大学 Takeda 等通过对 AKR/J 系小鼠进行筛选得到的品系,可分为两个亚系,即 P 系和 R 系。SAMP8 是 SAMP 的一个亚系,寿命一般为 12~13 个月,SAMP8 鼠在 8 月龄出现明显的学习记忆障碍,是目前公认的比较理想的自然衰老痴呆模型^[4-5]。SAMR1 是 SAMR 的一个亚系,基本表现为正常衰老,可作为 SAMP8 的正常对照。

NGF 作为神经系统的一种必不可少的营养因子,其主要作用于中枢神经系统及周围神经系统,它不仅能够维持神经元的存活、促进神经元的分化,而且在神经元的退化及修复当中起着至关重要的作用^[6]。NGF 作用于神经系统的机制主要通过与其受体结合然后通过介导第二信使反应引起一系列级联反应进而达到生物效应^[7]。研究表明,在周围神经系统中 NGF 主要存在于外周交感神经及感觉神经元中^[8]。感音神经性耳聋作为耳聋的一种,主要是由于内耳中的听觉感受器、传入大脑的神经路径及脑皮质相关区域的损坏而引起的听觉障碍^[9]。最新研究报道 NGF 能够促进起源于神经干细胞的平衡听觉的神经节的分化增殖并能够阻止其凋亡,而这类细胞正是能够分化成为螺旋神经节细胞的细胞^[10]。

随着世界上许多国家开始步入老龄化社会,老年性耳聋作为感音神经性耳聋的一种,已成为影响老年人生活质量的重要因素之一,所以备受社会关注。老年性耳聋严重影响着人类身心健康,造成老年人生活质量的下降,给社会和家庭带来了很大负担。根据流行病学调查显示,老年性耳聋在 55~64 岁人群中发病率为 10.1%,随着年龄的增加在 65~74 岁人群其比例也增加至 26.2%。所以,老年性耳聋的治疗一直受到国内外学者的重视。近年研究表明,老年性耳聋早期病变可能由于突触核蛋白表达的差别而引起听觉传出神经退化^[11]。但也有相关文献报道耳蜗毛细胞和螺旋神经元的减少和退化是老年性耳聋的关键因素^[12-14]。Menardo 等^[15]研究发现,老年性耳聋发生的分子机制主要在于氧化应激、慢性炎症、细胞凋亡以及螺旋神经节细胞内的蛋白质聚集。

本研究发现,NGF 蛋白在小鼠耳蜗组织中广泛表达,其表达也具有一定的时间特异性。5、7 月龄 SAMP8 小鼠耳蜗螺旋神经节细胞和毛细胞 NGF 免疫组化平均光密度值水平和相应月龄的 SAMR1 相比显著下降,5、7 月龄 SAMR1 小鼠 NGF 蛋白平均光密度值相比也有明显下降趋势。耳蜗螺旋神经节细胞和毛细胞中 NGF 蛋白表达水平随着小鼠月龄增加而降低的特点提示,NGF 对于维持耳蜗的听觉功能状态起着重要作用。但是,NGF 在防治老年性耳聋是否能够起到关键作用,以及用何种方法使其在耳蜗组织中发挥有效作用,进而改善和提高老年聋患者的听力,均有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Du ZJ, Wang L, Lei DL, et al. Nerve (下转第 2461 页)

- colorectal cancer with the monoclonal antibody D2-40[J]. *Eur Surg Res*, 2006, 38(5): 438-444.
- [4] Boardman KC, Swartz MA. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis[J]. *Circ Res*, 2003, 92(7): 801-808.
- [5] Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(1): 143-152.
- [6] Tsutsui S, Matsuyama A, Yamamoto M, et al. The Akt expression correlates with the VEGF-A and-C expression as well as the microvessel and lymphatic vessel density in breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(3): 621-630.
- [7] Wu M, Han L, Shi Y, et al. Development and characterization of a novel method for the analysis of gene expression patterns in lymphatic endothelial cells derived from primary breast tissues[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(6): 863-872.
- [8] 周红兵, 张秀忠, 任泽强. 中期因子与血管内皮生长因子 C 在胰腺肿瘤组织中的表达及其意义[J]. *重庆医学*, 2011, 40(17): 1725-1727.
- [9] Ran S, Volk L, Hall K, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer[J]. *Pathophysiology*, 2010, 17(4): 229-251.
- [10] Zhong D, Li Y, Peng Q, et al. Expression of Tiam1 and VEGF-C correlates with lymphangiogenesis in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 689-695.
- [11] Gou HF, Chen XC, Zhu J, et al. Expressions of COX-2 and VEGF-C in gastric cancer; correlations with lymphangiogenesis and prognostic implications[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(4): 14-19.
- [12] Feng Y, Wang W, Hu J, et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D as significant markers for assessment of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(5): 802-812.
- [13] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91(2): 125-132.
- [14] 姚广裕, 曾木圣, 林鹏, 等. 膜型基质金属蛋白酶-1 对乳腺癌细胞浸润能力的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(9): 650-653.
- [15] Nisato RE, Harrison JA, Buser R, et al. Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(1): 11-24.

(收稿日期: 2011-10-22 修回日期: 2012-02-16)

(上接第 2458 页)

- growth factor injected systemically improves the recovery of the inferior alveolar nerve in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 49(7): 557-561.
- [2] Hannila SS, Kawaja MD. Nerve growth factor-mediated collateral sprouting of central sensory axons into deafferented regions of the dorsahorn is enhanced in the absence of the p75 neurotrophin receptor[J]. *J Comp Neuro*, 2005, 486(4): 331-343.
- [3] 黄家俊, 罗华. 神经生长因子促进中枢神经系统损伤后神经再生的作用机制[J]. *医学综述*, 2008, 14(3): 330-332.
- [4] Okuma Y, Nomura Y. Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia; pharmacological, neurochemical and molecular biological approach[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1998, 78(4): 399-404.
- [5] Nomura Y, Okuma Y. Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice[J]. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(2): 111-115.
- [6] Tirassa P, Manni L, Aloe L, et al. Cholecystinin-8 and nerve growth factor: two endogenous molecules working for the upkeep and repair of the nervous system[J]. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2002, 1(5): 495-510.
- [7] 方煌, 罗永湘. 神经生长因子研究近况[J]. *中华手外科杂志*, 1995, 9(Suppl 11): 64-67.
- [8] Yan Q, Johnson EM. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats[J]. *J Neurosci*, 1988, 8(9): 3481-3498.
- [9] Defoumy L, Lallemand F, Malgrange B. Structure and development of cochlear afferent innervation in mammals[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(4): C750-C761.
- [10] Zhang L, Jiang H, Hu Z. Concentration-dependent effect of nerve growth factor on cell fate determination of neural progenitors[J]. *Stem Cell Dev*, 2011, 20(10): 1723-1731.
- [11] Park SN, Back SA, Choung YH, et al. Alpha-synuclein deficiency and efferent nerve degeneration in the mouse cochlea: A possible cause of early-onset presbycusis[J]. *Neurosci Res*, 2011, 71(3): 303-310.
- [12] Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss[J]. *Ageing Res Rev*, 2002, 1(3): 331-343.
- [13] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗螺旋神经元的增龄性变化[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2008, 22(3): 215-221.
- [14] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗毛细胞的增龄性变化[J]. *华夏医学*, 2008, 21(2): 213-215.
- [15] Menardo J, Tang Y, Ladrech S, et al. Oxidative stress, inflammation and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse cochlea[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011: [Epub ahead of print].

(收稿日期: 2011-11-14 修回日期: 2012-02-16)