

神经生长因子及其在眼科领域的应用

朱丹丹 陈辉

【摘要】神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是神经营养因子的一种。广泛存在于神经组织和周围靶组织,在神经系统的发生、发育和损伤修复过程中起着重要作用,可促进神经细胞的存活增殖、分化及功能表达。本文就 NGF 的生物学特性、眼组织中表达及对眼病的影响进行综述。

【关键词】神经生长因子; 神经生长因子受体; 眼疾病

神经生长是已阐明其化学结构的一种重要的神经细胞生长调节因子,人们对其研究较为深入,临床应用较为广泛,近年来已进一步用于神经系统和眼部疾病的实验和临床治疗,但关于其生物学特性及临床疗效尚存在争议。

1. NGF 及其受体的生物学特性: 1948 年, Bueker 在鸡胚中初步观察到某种“因子”对神经的生长发育有促进作用,后来 Levi-Montalcini 与 Hamburger 进一步证实了该“因子”的存在,这种因子就是神经生长因子^[1]。NGF 存在于动物体内,主要分布在唾液腺,前列腺、蛇毒及脑内胆碱能神经元分布区,其中以成年雄性小鼠颌下腺最高。小鼠颌下腺 NGF 是 7sNGF 高分子物。7S 的 NGF 由 α 、 β 与 γ 3 种肽链构成,这些肽链以非共价键结合,按 $\alpha_2\beta\gamma_2$ 的比例构成。 α 亚单位的分子量为 26500, γ 亚单位的分子量为 2000,后者具有脂酶活性,可将无活性的 β 亚单位转化为有活性的 β 亚单位。 β 亚单位是 NGF 的活性区,它是由 2 条含有 11 个氨基酸的多肽链组成的二聚体。每个亚单位含有 3 组二硫键。McDonald 等^[2]用 X 线晶体衍射技术发现 NGF 的活性部位 β -NGF 是由六方双椎体形晶体对称结构组成。NGF 的作用需要在靶细胞表面有一个特异的受体,即 NGF 的作用取决于一定数量的受体的存在。首先被发现的 NGF 受体是一个分子量为 75KD,结合位点为低亲和力($KD: 1 \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的糖蛋白,被称为低亲和力受体(LNGFR)或 P75NGFR^[3]。它没有内在催化活性,作用类似于肿瘤坏死因子受体家族成员,一方面,在中枢神经系统正常发育过程中作用类似于一个杀伤因子,下调 trk 信号的调制,激活凋亡来调节细胞数量。另一方面,它协同 NGF 高亲和力受体(HNGFR)救护 NGF 依赖神经

元,而不是诱发凋亡。NGF 另一个由原癌基因 trk 编码的酪氨酸蛋白激酶受体被发现,它是一种分子量为 140KD 的高亲和力受体,称为 TrkA 或 P140TrkA^[4],为 NGF 的优势受体。此外,2 个与 TrkA 同源的受体 TrkB 和 TrkC 也相继被发现。当 NGF 与 TrkA 结合后,通过受体介导的内吞机制,产生内在化,形成由轴膜包绕并保持起生物活性的小泡,经轴突沿微管逆行转运至胞体,由酪氨酸蛋白激酶信使系统和磷酸酰肌醇信使系统的转导使二者在功能上密切联系,相互协调,启动一系列级联反应,对靶细胞的基因表达进行调控,使神经元变大伴生物活动加强,更多地制造结构及酶的蛋白和脂类,合成的产物被运到远侧作为生长轴突的原料,从而促进细胞生长、发育、分化和轴突的生长。

2. NGF 及其受体在眼组织的表达: ① NGF 在眼的分布在眼表,角膜上皮细胞、内皮细胞、基质细胞以及角膜缘干细胞能够合成和分泌 NGF^[5,6]。在眼内,虹膜,睫状体与晶状体在基础状态下均表达 NGF mRNA, NGF 与 TrkA^[7]。其中虹膜表达 NGF 的水平最高,但房水中 NGF 的水平最低。Ghinelli 等^[8]通过实验证实小鼠晶状体上皮细胞表达并合成 NGF 及其受体,通过 ELISA 技术测定小鼠晶状体上皮细胞 NGF 含量为 $54.0 \pm 24.5 \text{ pg/g}$ 。Caminos 等^[9]通过原位杂交及免疫组织化学的方法测定鱼类视网膜的 NGF 发现:除了 Muller 胶质细胞突起,鱼类视网膜从神经纤维层至外界膜都有 NGF 的广泛分布。② NGF 受体在眼的分布在眼表, NGF 受体存在于角膜上皮细胞、内皮细胞、基质细胞、角膜缘干细胞以及结膜上皮细胞表面。Tapas^[10]等通过免疫组织化学测定成人视网膜 TrkA 主要分布在内核层,神经纤维层也有较高表达,但在感光细胞层未曾发现 TrkA 的分布。Harold^[11]发现大鼠视网膜 P75NGFR 主要分布于外界膜,内核层和神经节细胞层也有少量分布。

3. NGF 在眼科应用临床与实验研究: ① NGF

对角膜的影响,许多研究显示NGF在角膜损伤修复过程中起重要作用。Lambiase等^[12]运用免疫组化及RT-PCR等技术,对活体及体外培养的人和鼠的角膜进行研究发现:人角膜上皮损伤后与上皮细胞结合的NGF数量增加,而在鼠角膜上皮损伤后也可发现角膜中NGF水平短暂升高;同时,用抗-NGF抗体抑制NGF活性,则损伤的角膜上皮愈合速度延迟,而给予外源性的NGF则加速上皮的愈合。Bonini等^[13]通过对43位在保守治疗无效后神经营养性角膜炎患者应用NGF治疗发现,所有病人(包括有溃疡和没有溃疡病灶)的上皮缺损得到完全消退,角膜敏感度及视力都得到提高。Coassin等^[14]发现应用NGF能治疗泪腺切除术后狗的浅层点状角膜病变,减轻角膜雾状浑浊,提高角膜敏感度及视觉表面泪液的量及功能。那么NGF通过何种途径来促进角膜损伤修复呢? Kruse等^[15]发现NGF能够促进体外培养的兔角膜上皮细胞以及角膜缘干细胞的有丝分裂,加速其生长与分化。圆锥角膜作为最常见的角膜营养不良性疾病,目前临床上唯一有效治疗方法为角膜移植。但Lambiase等^[16]发现圆锥角膜患者角膜中TrkA表达完全缺失,NGF及P75NGFR的表达下降。故他们推测NGF及其受体水平的变化可能与圆锥角膜的发生有关,为圆锥角膜的治疗提供了新的思路。② NGF对视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells RGCs)的影响为探讨青光眼性视神经损伤及其预防保护机制,常用高眼压动物模型来研究,一些研究者发现NGF对RGCs具有一定保护作用。Lambiase等^[17]在兔眼眼压升高后,眼内应用NGF,可以减少RGCs的丧失;而眼内注射NGF抗体抑制NGF效应,可加重视网膜损害,表明NGF可促进RGCs存活及功能的恢复。Hammes等^[18]发现糖尿病大鼠RGCs和Müller细胞表达p75NGFR增加,用NGF可以阻止其RGCs和Müller细胞的程序性坏死(PCD)以及外周细胞丢失和毛细血管闭塞的发展。Rudzinski等^[19]在大鼠眼压升高后测定NGF及其受体水平都有所上升,但是两者上升水平并不一致,从而推测这种变化可能延缓了RGCs细胞的凋亡。但上述实验并不能确切显示NGF对RGCs的作用机制。也有一些研究者认为NGF对RGCs没有保护作用,Welbel等^[20]发现在大鼠视神经挤压伤后眼内注射NGF并不能促进视神经轴突的生长,也不能对RGCs的变性作用起减缓作用, Cui等^[21]发现新生大鼠在上丘摘除后应用NGF也不能促进RGCs的生存。尽管如此,大部分学者还是认为NGF对RGCs有一定的保护作用。③ NGF与视网膜变性NGF在视网膜变性类疾病中的作用集中于对基因突变小鼠的研究。Lenzi等^[22]对视网膜变性小鼠使用外

源性NGF,发现NGF对小鼠视网膜光感受器细胞有修复作用,并提高了BDNF, beta-FGF, beta-TGF及VEGF等表达,提示NGF可能通过影响其它生物调节因子的产生与释放对变性的视网膜产生影响。然而LaVail等^[23]在小鼠视网膜变性开始时即在小鼠玻璃体内注射各种神经营养因子,发现NGF对各类基因突变小鼠的视网膜并无保护作用。Harold^[11]等发现视网膜变性小鼠的感光细胞中NGF低亲和力受体在内核层,内丛状层,及神经纤维层表达明显较对照组明显升高,从而推测该受体在视网膜变性小鼠的感光细胞死亡中发挥了一定作用。这可能是LaVail等与Lenzi等和Harold等的研究观察起始点不同,也许NGF是在视细胞变性开始之后发挥调控作用,有待进一步研究。④ NGF与增生性玻璃体视网膜病变(PVR) PVR是视网膜脱离手术失败最常见的因素,又是引起视网膜脱离复发的主要原因之一。许多研究证明视网膜色素上皮细胞(RPE)、神经胶质细胞是PVR形成中的主要细胞。在离体培养的人类RPE细胞中加入不同剂量的NGF后发现^[24]NGF在一定剂量范围内可以促进RPE增殖及蛋白质合成。由于视网膜表达NGF,而视网膜神经胶质细胞中有NGF受体分布, Ikeda等^[25]在无血清条件下,培养的视网膜Müller胶质细胞(RMG)细胞数量和细胞核摄取5-溴脱氧尿苷的量对2.5sNGF具有浓度依赖性,与NGF高亲和力受体一致。目前虽无直接证据表明NGF促进PVR患者的RPE增殖,但从以上离体细胞培养结果可以推测NGF在PVR中发挥了一定作用。⑤ NGF与弱视近十几年研究发现,视觉发育的可塑性与多种细胞功能调节因子间存在着联系。有人发现NGF可阻止斜视所造成的视皮层双眼细胞的减少,局部应用NGF可逆转弱视猫视皮层眼优势柱的偏移,改善弱视眼的视功能^[26]。Domenici等^[27]利用电生理的方法也发现NGF能提高弱视眼鼠的视敏度及对比敏感度。⑥ NGF与准分子激光角膜屈光手术 准分子激光角膜屈光术后角膜上皮点状损伤及干眼症状较为常见,一些研究者试用NGF来改善术后视觉质量。Joo等^[28]将NGF用于LASIK术后的病人发现实验组患者的角膜敏感度较对照组恢复好。Lee等^[29]将NGF分别用于LASIK和PRK术后的人眼角膜,发现两种手术引起的角膜敏感度及干眼的症状不同的原因在于术后早期泪液中NGF含量的差异。从以上研究结果可以推测NGF作为一种神经生长刺激因子对PRK和LASIK术后神经再生,角膜敏感度的恢复,视觉质量的恢复发挥着积极作用。

4. NGF的毒性作用:目前对NGF的研究主要集中在其治疗作用上,而对应用NGF是否会引起毒

性反应方面报道较少。从毒理学研究方面尚未见到 NGF 有何严重不良反应。国内曾有作者^[30]在兔眼局部应用不同剂量 NGF, 利用直接检眼镜、光镜及透射电镜等检查手段不仅观察到眼局部应用 NGF 对视网膜有毒性作用, 而且得到了视网膜组织超微结构改变的证实。常规剂量 (30 μ g、60 μ g, 和 100 μ g) 眼局部应用 NGF, 包括球结膜下注射和玻璃体腔内注射、直接眼底镜下、光镜组织病理及超微结构均未发现视网膜异常, 但大剂量 NGF (300 μ g) 玻璃体腔内注射, 透射电镜检查发现视杆、视锥细胞盘膜内有裂隙、感光细胞内段的少部分线粒体嵴有损伤。因此, NGF 眼局部应用应注意剂量。虽然 NGF 的营养功能已被广泛接受, 但有实验发现 NGF 在视网膜发育过程中能激活神经营养因子受体 P75NFR 而引起细胞死亡, 并证实小胶质细胞来源的 NGF 在眼球发育过程中发挥了脱氧剂的作用。在小胶质细胞克隆尚未形成时, 将视网膜组织分离出来, 视网膜组织中检测不到 NGF, 且细胞死亡不明显。Micera 等发现 NGF 在一些常见致盲性疾病如糖尿病、多发性硬化等疾病发生过程中起促进作用, 尤其是多发性硬化病人的视神经中 NGF 明显升高。青光眼动物模型中眼内 NGF 水平也升高。因此, NGF 的临床应用也应谨慎。

综上所述, 对 NGF 的作用机制及临床效应的理解及认识还有待于提高, 但其促进神经元损伤后修复再生的效用对于许多眼病的治疗不失为一个新的研究方向。

参考文献

- Levi-Montalcini R. Nerve growth factor 35 years later. *Science*, 1987, 237: 1154-1162.
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, et al. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature*, 1991, 354:411-414.
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*, 1993, 261:345-348.
- Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci*, 1992, 15:323-331.
- Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, Xiang Z, et al. Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol*, 1997, 27:2295-2301.
- Lambiase A, Mnani L. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41:1063-1069.
- Lambiase A, Bonini S, Manni L, et al. Intraocular production and release of nerve growth factor after iridectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43:2334-2340.
- Ghinelli E, Aloe L, Cortes M, et al. Nerve growth factor (NGF) and lenses: effects of NGF in an in vitro rat model of cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2003, 241:845-851.
- Caminos E, Becker E, Martin-zanca D, et al. Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *Comp. Neurol*, 1999, 404:321-331.
- Nag TC, Wadhwa S. Neurotrophin receptors (Trk A, Trk B, and Trk C) in the developing and adult human retina. *Developmental Brain Research*, 1999, 117:179-189.
- Sheedlo HJ, Srinivasan B, Brun-Zinkernagel AM, et al. Expression of p75 NTR in photoreceptor cells of dystrophic rat retinas. *Molecular Brain Research*, 2002, 103:71-79.
- Lambiase A. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med*, 1998, 338: 1174-1180.
- Bonini S. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*, 2000, 107:1347-1352.
- Coassin M, Lambiase A, Costa N, et al. Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2005, 243:151-155.
- Kruse FE, Tseng SCG. Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34:1963-1976.
- Lambiase A, Merlo D, Mollinari C, et al. Molecular basis for keratoconus: lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102:16795-16800.
- Lambiase A, Aloe L. Nerve growth factor delays retinal degeneration in C3H mic. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1996, 234 (suppl1):96-100.
- Hammes HP, Federoff HJ, Browlee M. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med*, 1995, 1:527-534.
- Rudzinski M, Wong TP, Saragovi HU. Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *Neurobiol*, 2004, 58:341-354.
- Weibel D, Kreutzberg GW, Schwab ME. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve. *Brain Res*, 1995, 679:249-254.
- Cui Q, Harrey AR. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *Neurosci*, 1995, 15:8143-8155.
- Lenzi L, Coassin M, Lambiase A, et al. Effect of exogenous administration of nerve growth factor in the retina of rats with inherited retinitis pigmentosa. *Vision Res*, 2005, 45:1491-1500.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, et al. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39:592-602.
- Li W, Wen J, Jiang D, et al. Effects of nerve growth factor on proliferation and DNA synthesis of cultured human fetal retinal pigment epithelium cells. *Yan Ke Xue Bao*, 2002, 18:45-8,29.
- Ikeda T, Puro DG. Nerve growth factor: a mitogenic signal for retinal Muller glial cells. *Brain Res*, 1994, 649:260-264.
- Gu Q. Involvement of nerve growth factor in visual cortex plasticity. *Rev Neurosci*, 1995, 6:329-351.
- Domenici L. Exogenous supply of nerve growth factor prevents the effects of strabismus in the rat. *Neuroscience*, 1992, 51:19-24.
- Joo MJ, Yuhan KR, Hyon JY, et al. The effect of nerve growth factor on corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122:1338-1341.
- Lee HK, Lee KS, Kim HC, et al. Nerve growth factor concentration and implications in photorefractive keratectomy vs laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol*, 2005, 139:965-971.
- 韦侃侃, 黄爱国, 陈慷, 等. 眼局部应用神经生长因子对视网膜的毒性. *眼科研究*, 2002, 20:293-295.

(收稿时间: 2006-06)