

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 00808088.7

[51] Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/203 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 100350970C

[22] 申请日 2000.3.30 [21] 申请号 00808088.7

[30] 优先权

[32] 1999. 3. 31 [33] GB [31] 9907461.9

[86] 国际申请 PCT/GB2000/001211 2000.3.30

[87] 国际公布 WO2000/057900 英 2000.10.5

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.26

[73] 专利权人 牛津生物医学(英国)有限公司

地址 英国牛津

[72] 发明人 M·马登 J·P·T·科科兰

[56] 参考文献

US4808630A 1989.2.28

WO9724116A 1997.7.10

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 68 页 附图 17 页

[54] 发明名称

因子

[57] 摘要

本发明涉及 RAR β 2 和/或其激动剂在引起神经突发育的药物制备中的应用。

1. RAR β 2 在制备用于引起神经突发育的药物中的用途。
2. 权利要求 1 的用途，其中所述 RAR β 2 与其激动剂组合。
3. 权利要求 1 的用途，其中所述的 RAR β 2 呈编码 RAR β 2 的核酸的形式。
4. 权利要求 3 的用途，其中所述 RAR β 2 呈包含 RAR β 2 表达系统的实体形式。
5. 权利要求 4 的用途，其中所述 RAR β 2 表达系统呈能够指导 RAR β 2 表达的核酸构建体的形式。
6. RAR β 2 在制备神经性病症的治疗药物中的用途。
7. 权利要求 6 的用途，其中所述神经性病症包括神经损伤。
8. 权利要求 6 或 7 的用途，其中所述 RAR β 2 与其激动剂组合。
9. 权利要求 8 的用途，其中所述激动剂是 RA 和/或 CD2019。
10. 一种用于引起受治疗者神经突发育的组合，所述组合包含一种能够指导 RAR β 2 表达的核酸构建体和 RAR β 2 激动剂。
11. 权利要求 10 的组合，其中所述激动剂是 RA 和/或 CD2019。
12. 一种药用组合物，所述组合物包含与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合的 RAR β 2；其中所述药用组合物用来引起神经突发育。
13. 根据权利要求 12 的药用组合物，它还包括 RAR β 2 激动剂。
14. 根据权利要求 12 的药用组合物，其中所述的 RAR β 2 呈编码 RAR β 2 的核酸的形式。
15. 根据权利要求 14 的药用组合物，其中所述 RAR β 2 呈包含 RAR β 2 表达系统的实体形式。
16. 根据权利要求 15 的药用组合物，其中所述 RAR β 2 表达系统呈能够指导 RAR β 2 表达的核酸构建体的形式。
17. 一种载体，包含能够指导 RAR β 2 表达的核酸构建体。

18. 根据权利要求 17 的载体，其中的载体是病毒载体。
19. 根据权利要求 17 的载体，其中的载体是逆转录病毒载体。
20. 根据权利要求 17 的载体， 其中的载体是慢病毒载体。

因子

发明领域

本发明涉及与神经突生长有关的因子。

发明背景

例如在神经损伤例如脊髓损伤的情况下，理想的是引起神经突发育，例如神经突向外生长和/或神经突再生。

已知神经生长因子(NGF)刺激某些事件，例如神经突向外生长。然而，NGF 是一种相应高分子量的相对大的分子。此外，NGF 对蛋白酶介导的降解敏感。由于这些考虑和其它考虑，NGF 难以给药。NGF 的制备也相对昂贵。这些是现有技术相关的问题。

发明概述

我们已经意外地发现，通过应用视黄酸受体 $\beta 2$ (RAR $\beta 2$)和/或其激动剂引起神经突发育(例如神经突向外生长和/或神经突再生)是有可能的。

本发明的概述方面

本发明基于这样一个意外发现：通过应用 RAR $\beta 2$ 和/或其激动剂引起神经突发育(例如神经突向外生长和/或神经突再生)是有可能的。

本发明的多个方面利用这一发现。例如，有可能有通过应用本文所解释的 RAR $\beta 2$ 和/或其激动剂引起神经突发育(例如神经突向外生长和/或神经突再生)调节的方法。

本发明的详述方面

一方面，本发明涉及 RAR β 2 和/或其激动剂在引起神经突发育的药物制备方面的应用。

在本发明中，RAR β 2 和/或其激动剂可以被称作药理学活性剂。

神经突是众所周知的由各种神经元细胞类型发育的结构。它们以微观分支或梳样结构或从它们所发源的细胞表面上的形态学突出。神经突向外生长的实例示于附图中以及例如在(Maden 1998-综述文章)中引用的出版物中，并且是本领域众所周知的。

RAR β 2 编码序列(即 RAR β 2 基因)如下文所述使用。通过应用重组 DNA 技术和/或合成技术，可以制备 RAR β 2 基因。例如，采用如该文件实施例一节中所述采用本文详述的引物等制备的 PCR 扩增的基因片段，可以制备 RAR β 2 基因，或可以按照本领域已知的任何其它合适的方法制备 RAR β 2 基因。

另一方面，本发明涉及 RAR β 2 和/或其激动剂在引起神经突发育的药物制备方面的应用，其中所述激动剂是视黄酸(RA)和/或 CD2019。

视黄酸是市售的。CD2019 是一种多环杂 carbonyl 分子，它是一种 RAR β 2 激动剂，具有本文所讨论的并且如(Elmazar 等，(1996) Teratology 第 53 卷第 158-167 页)中所示的结构。

另一方面，本发明涉及 RAR β 2 和/或其激动剂在神经性病症治疗药物制备方面的应用。

另一方面，本发明涉及 RAR β 2 和/或其激动剂在神经性病症治疗药物制备方面的应用，其中所述神经性病症包括神经损伤。

另一方面，本发明涉及一种治疗神经性病症的方法，包括给予药理学有效量的 RAR β 2 受体和/或其激动剂。

另一方面，本发明涉及一种治疗神经性病症的方法，包括给予药理学有效量的 RAR β 2 受体和/或其激动剂，其中所述激动剂是 RA 和/或 CD2019。

另一方面，本发明涉及一种治疗神经性病症的方法，包括给予药理学有效量的 RAR β 2 受体和/或其激动剂，其中通过包括 RAR β 2 表达系统的一个实体给予所述 RAR β 2 受体。

另一方面，本发明涉及一种在受治疗者中引起神经突发育的方法，所述方法包括提供能够指导 RAR β 2 受体的至少一部分表达的核酸构建体，将所述构建体导入所述受治疗者的一种或更多种细胞中，并且任选地给予所述受治疗者一种 RAR β 2 激动剂，例如 RA 和/或 CD2019。

再一方面，本发明涉及一种用于确定一种药物是否能够调节 RAR β 2 信号的测定方法，所述方法包括提供神经细胞，使所述细胞与所述药物接触，并且评价所述 RAR β 2 受体的活性，例如通过检测神经突向外生长来评价。

用于本发明测定方法的神经细胞可以是任何合适的神经细胞系，无论其稳定保持在培养物中，还是直接得自动物的原代细胞。最好所述细胞是如下文所述制备的小鼠胚胎背根神经节(DRG)细胞。

再一方面，本发明涉及一种包括以下步骤的方法：(i)进行上述对于 RAR β 2 信号调节的测定，(ii)鉴定能够调节所述 RAR β 2 信号的一种或更多种药物，以及(iii)制备一定量的那些一种或更多种鉴定的药物。

再一方面，本发明涉及一种包括以下步骤的方法：(i)进行上述对于 RAR β 2 信号调节的测定，(ii)鉴定能够调节所述 RAR β 2 信号的一种或更多种药物，(iii)制备一定量的那些一种或更多种鉴定的药物，以及(iv)制备包含那些一种或更多种所鉴定药物的药用组合物。

再一方面，本发明涉及一种用药物影响 RAR β 2 体内活性的方法，其中所述药物能够调节 RAR β 2 信号，例如在如上所述的体外测定方法中能够调节 RAR β 2 信号。

再一方面，本发明涉及一种药物在治疗神经性病症或神经损伤的药用组合物制备方面的应用，其中所述药物能够调节 RAR β 2 信号，

例如在如上所述的体外测定方法中能够调节 RAR β 2 信号。

再一方面，本发明涉及用一种药物治疗受治疗者的方法，其中所述药物能够调节 RAR β 2 信号，例如在如上所述的体外测定方法中能够调节 RAR β 2 信号。

再一方面，本发明涉及一种药用组合物，其包含与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合的 RAR β 2 和/或其激动剂；其中所述药用组合物用于引起神经突发育。

为了便于查阅，现在在合适的小节标题下讨论本发明的这些方面和其它方面。然而，在每一小节下的内容不一定限于每个特定小节。

优选方面

在一个优选方面，能够将 RAR β 2 的表达定向的核酸构建体的给予将伴随着 RAR β 2 激动剂例如 RA、或最好是 CD2019 (或其模拟物)的给予。

最好是所述激动剂在一定程度下对于 RAR β 2 受体是选择性的。所述激动剂最好不显著影响 RAR α 受体。优选所述激动剂将不显著影响 RAR γ 受体。更优选所述激动剂将不显著影响 RAR α 受体或 RAR γ 受体。甚至更优选所述激动剂表现出对 RAR β 2 受体的高度选择性。

在一个优选方面，能够将 RAR β 2 表达定向的核酸构建体的给予将采用一种载体、优选一种病毒载体、更优选一种反转录病毒载体来完成。在一个高度优选的实施方案中，能够将 RAR β 2 表达定向的核酸构建体的给予采用能够感染非分裂哺乳动物细胞(例如神经细胞)的反转录病毒载体来完成。

优势

本发明具有优势，因为 RAR β 2 和/或其激动剂可以引起对神经细胞发育的调节。

本发明的另一个优势是避免将 NGF 给予受治疗者。

本发明的另一优势是能够在成体神经组织中促进神经突向外生长。

类维生素 A (retinoids)

类维生素 A 是一类由维生素 A 衍生的分子的家族, 包括生物活性代谢物视黄酸(RA)。RA 的细胞效应通过两类受体的作用来介导, 一类是视黄酸受体(RAR), 它们由全反式-RA (*t*RA)和 9-顺式-RA (9-*cis*-RA)两者激活, 另一类是类维生素 A X 受体(RXR), 它们仅由 9-*cis*-RA 激活(Kastner 等, 1994; Kleiwer 等, 1994)。所述受体具有 3 个主要亚型 - α 、 β 和 γ , 其中由于可变剪接和差别启动子用法而有多种同种型(Leid 等)。RAR 通过与 RXR 形成异二聚体而介导基因表达, 而 RXR 可以作为同二聚体或通过与多种孤独受体形成异二聚体而介导基因表达(Mangelsdorf 和 Evans, 1995)。对多种胚胎神经元类型的许多研究已经表明, RA 既可以刺激神经突的数目, 又可以刺激神经突的长度(综述, Maden, 1998), 实际上神经营养蛋白也是如此(Campenot, 1977; Lindsay, 1988; Tuttle 和 Mathew, 1995)。神经营养蛋白是一个生长因子家族, 它们是发育中的外周神经系统中多种初级(primary)感觉神经元的神经元存活所需要的(Snider, 1994)。在 PC12 细胞中由 NGF 诱导的最早期基因之一是孤独受体 NGFI-B (NURR1) (Millbrandt, 1989)。这提示该生长因子和类维生素 A 在发育中的神经元中介导的途径可以相互作用。

这些方面的背景内容已经由 Victor A. McKusick 等在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim> 上提出。已经从该资源中提取了以下信息。

三种视黄酸受体 - α 、 β 和 γ 是核受体超家族成员。视黄酸是在脊椎动物中描述的第一种形态发生素。RARA 和 RARB 基因与分别位于第 17 号染色体和第 3 号染色体上的 2 种密切相关的甲状腺激素受体 THRA 和 THRB 基因的同源性比与核受体家族的任何其它成员的同源

性大。这些研究结果提示, 甲状腺激素受体和视黄酸受体通过由一个自身趋异的共同祖先基因在从该家族类固醇受体组的所述共同祖先进化过程中的相当早期的基因重复、可能是染色体重复进化而来。先前用 HAP 表示的 RARB 基因通过体细胞杂交和原位杂交作图至 3p24。

Benbrook 等(1988)表明在上皮组织中的主要分布, 因此使用命名 RAR (ϵ)。Mattei 等(1988)通过原位杂交, 将 RARB 基因分配至 3p24。采用缺失作图法, de The 等(1990)鉴定出一种位于转录起始上游 59-bp 的 27-bp 片段, 它赋予疱疹病毒胸苷激酶启动子的视黄酸应答性。他们发现, α 受体和 β 受体均通过同一 DNA 序列起作用。Mattei 等(1991)将所述相应的基因分配至小鼠的 14 号染色体的 A 带以及大鼠 15 号染色体上。

Nadeau 等(1992)证实了所述小鼠同系物分配至 14 号染色体的着丝粒部分。

根据存在于特定人肝细胞癌(HCC)中的乙型肝炎病毒(HBV)整合位点与同一肝脏的非肿瘤组织中相应的非占据位点的比较, Dejean 等(1986)发现: HBV 整合将所述病毒序列邻近带有与癌基因 ERBA 和人糖皮质激素受体和雌激素受体基因的推定 DNA 结合结构域都明显相似的肝细胞序列放置。

Dejean 等(1986)提出, 通常是沉默的或在正常肝细胞中以非常低水平转录的该基因, 由于 HBV 整合而表达不当, 因此导致细胞转化。

Dejean 等(1986)借助一组啮齿动物-人类体细胞杂种 DNA, 将该基因定位至 3 号染色体。de The 等(1987)的其它研究表明, HAP 基因产物可能是一种新型配体效应调节蛋白, 其在肝中的不当表达与肝细胞癌发生有关。Brand 等(1988)指出, 称为 HAP (对于 HBV 激活的蛋白)的新型蛋白是一种视黄酸受体。他们将该受体称为 β 型(RARB), 并将其作图至 3p25-p21。

Lotan 等(1995)发现, RARB mRNA 的表达在恶化前口腔损伤中

选择性地丧失, 并且可以通过用异维 A 酸治疗而得到恢复。RARβ mRNA 表达的恢复与临床反应相关。

RARβ、RARγ、RXRβ 和 RXRγ 在纹状体中表达。为了研究这些基因对运动的影响, Kreczel 等(1998)研制出单剔除(knockout)小鼠和双剔除小鼠, 并通过开放场地和转杆试验分析其运动技能。RARβ-当与野生型同窝小鼠(littermate)比较时, RXRβ、RARβ-RXRγ 和 RXRβ-RXRγ 双无效突变体小鼠, 表现出向前运动减少, 而相应的单无效突变体没有表现出所述减少。40% RARβ-RXRβ 无效突变体表现出向后运动。RARβ、RARβ-RXRβ、RARβ-RXRγ 和 RXRβ-RXRγ 小鼠的转杆试验表现受到损害。相反, 即使 RARα 和 RARγ 也在纹状体中表达, 但 RARα、RARγ、RARα-RXRγ 和 RARγ-RXRγ 无效小鼠在运动中没有表现出损害。骨骼肌、外周神经和脊髓的形态学、发育和功能在所有单无效突变体和双无效突变体中均正常, 平衡反射也是如此。这些结果提示 Kreczel 等(1998), RARβ、RXRβ 和 RXRγ 特异性地参与运动行为的控制, 并且 RARβ 与或者 RXRβ 或者 RXRγ 的异二聚体是功能受体单位, 使得 RXRβ 和 RXRγ 在功能上是丰余的。

Kreczel 等(1998)研究了 D1 和 D2 多巴胺受体(D1R 和 D2R)在这些突变体小鼠中的表达, 这两种受体是纹状体中最丰富的多巴胺受体。与野生型对照相比, RARβ-RXRβ、RARβ-RXRγ 和 RXRβ-RXRγ 双无效突变体表现出全纹状体 D1R 和 D2R 转录物分别减少 40%和 30%, 而 RARβ 或 RXRγ 单突变体没有表现出所述减少。

这种减少主要在纹状体的腹中区中, 包括伏隔核(nucleus accumbens)的壳和核心以及尾状核的内侧背(mediodorsal)部分。这种减少不是由 D2R 表达神经元的损失引起的, 注意到凋亡没有增加。纹状体的组织学正常。

Samad 等(1997)对 D2R 启动子中视黄酸效应元件的鉴定导致 Kreczel 等(1998)提出: D2R 和 D2R 表达的减少发生在转录水平上。

RARB-RXRB、RARB-RXRG 和 RXRB-RXRG 双无效突变体没有表现出由可卡因诱导的运动的正常增加，模拟 D1R 无效小鼠的表型。

总而言之，这些结果为 Kreczel 等(1998)指出，类维生素 A 参与多巴胺能 mesolimbic 通路功能的控制，并且提示视黄酸信号的缺陷可以导致神经性病症。

激动剂

本发明的激动剂可以是任何合适的 RAR β 2 激动剂。所述 RAR β 2 激动剂最好能够在反式激活测定中激活 RAR β 2。

所述激动剂可以是有机化合物或其它化学物质。所述激动剂可以是一种氨基酸序列或其化学衍生物或它们的组合。所述药物甚至可以是核苷酸序列 - 它可以是有义序列或反义序列。所述药物甚至可以是一种抗体。

通常，所述激动剂是一种有机化合物。所述有机化合物通常将包含两个或更多个烃基。这里，术语“烃基”是指包含至少 C 和 H 的基团，并且可以任选地包含一个或更多个其它合适的取代基。这类取代基的实例可以包括卤代、烷氧基、硝基、烷基、环基等。除所述取代基可能是一种环基外，取代基的组合可以组合一个环基。如果所述烃基包含一个以上的 C，则那些碳不必是相互连接的。例如，所述碳中的至少两个可以通过合适的元素或基团连接。因此，所述烃基可以含有杂原子。合适的杂原子对于本领域技术人员将是显而易见的，包括例如硫、氮和氧。对于某些应用，最好是所述药物包含至少一个环基。所述环基可以是多环基，例如非稠合多环基。对于某些应用，所述激动剂包含至少一个与另一烃基连接的所述环基。

特异性激动剂

按照本发明的特异性激动剂的一个实例是视黄酸(RA)。视黄酸的两种常见形式(或者全反式视黄酸(tRA)或者 9-顺式-R A)是 RAR β 2 的

激动剂。

CD2019 是一种 RAR β 2 激动剂，其结构如本文所讨论的并且如 (Elmazar 等(1996) Teratology 第 53 卷第 158-167 页) 中所示。在 (Beard 和 Chandraratna 第 194 页; Johnson 等, 1996) 中也讨论了这种激动剂和其它激动剂。CD2019 的结构在附图中作为式 I 显示。

一种替代的 RAR β 2 激动剂在附图中以式 II 显示。

本发明也包括式 I 和/或式 II 的结构式的模拟物或生物等排物。

可按照本发明使用的激动剂最好对于 RAR β 2 具有选择性。

确定 RAR β 2 激动作用的测定

按照本发明的激动剂的实例可以采用确定 RAR β 2 激动作用的测定来鉴定和/或证实。

因此，本发明也包括(i)确定一种候选药物是否能够作为 RAR β 2 激动剂起作用；(ii)如果所述候选药物能够作为 RAR β 2 激动剂起作用，则将所述药物以引起神经突发育的量传递至受治疗者。

测定

任何一种或更多种合适的靶 - 例如氨基酸序列和/或核苷酸序列，均可以用于在多种药物筛选技术的任一种中鉴定能够调节 RAR β 2 的药物。在这样一种试验中使用的靶可以是在溶液中游离的、固定于固相支持体、在细胞表面上带有的、或位于胞内。可以测量靶活性的消除或靶和所述药物之间结合复合体的形成。

本发明的测定可以是一种筛选，藉此可以测试多种药物。一方面，本发明的测定方法是一种高通量筛选法。

用于药物筛选的技术可以基于 1984 年 9 月 13 日公开的 Geysen 的欧洲专利申请 84/03564 中描述的方法。概括地讲，在一种固相基片例如塑料钉或某些其它表面上合成大量不同的小肽试验化合物。使所述肽试验化合物与一种合适的靶或其片段反应，并进行洗涤。然后例

如通过本领域众所周知的适当改变的方法检测结合的实体。也可以将一种纯化靶直接包被在板上，用于药物筛选技术。或者，可以用非中和抗体捕获所述肽，并将其固定至固相支持体上。

本发明也设想了应用竞争性药物筛选测定，其中能够结合一种靶的中和抗体特异性地与试验化合物竞争与靶的结合。

用于筛选的另一种技术可供用于高通量筛选(HTS)对所述物质具有合适结合亲和性的药物，并且基于 WO-A-84/03564 中详述的方法。

预计本发明的测定方法将既适合于试验化合物的小规模筛选，又适合于其大规模筛选，也适用于定量测定。

在一个优选方面，本发明涉及选择性地调节 RAR β 2 的药物的鉴定方法。

在一个优选方面，本发明的测定利用在表面展示 RAR β 2 的细胞。这些细胞可以从具有这类细胞的受治疗者中分离。然而，最好是通过转染细胞使得在转染后那些细胞在其表面上展示 RAR β 2，来制备所述细胞。

可以使用的测定的另一实例描述于 WO-A-9849271 中，它涉及一种无限增殖化人畸胎瘤 CNS 神经元细胞系，该细胞系据说具有高水平的神经元分化，并且可用于测定与 RAR β 2 结合的化合物。

报道基因

在本发明的测定方法(以及筛选)中可以使用种类繁多的报道基因，优选的报道基因提供方便的可检测信号(例如通过光谱学)。作为实例，一种报道基因可以编码一种催化改变光吸收特性的反应的酶。

其它方案包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分类术(FACS)。甚至可以使用一种利用与两种非干扰表位反应的单克隆抗体的两位点基于单克隆的免疫测定。这些测定和其它测定在其它地方描述于 Hampton R 等(1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN)和 Maddox DE 等(1983, J

Exp Med 15 8:121 1).

报道分子的实例包括但不限于(半乳糖苷酶、转化酶、绿荧光蛋白、荧光素酶、氯霉素乙酰转移酶、(葡萄糖醛酸糖苷酶、外切葡聚糖酶和葡萄糖淀粉酶。或者,可以将放射标记或荧光标记物标记的核苷酸掺入新生的转录物中,然后当将转录物与寡核苷酸探针结合时鉴定所述转录物。

作为其它实例,许多公司例如 Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)、Promega (Madison, WI)和 US Biochemical Corp (Cleveland, OH)供应市售试剂盒和测定方法的操作步骤。合适的报道分子或标记包括那些放射性核素、酶、荧光、化学发光或生色剂以及底物、辅因子、抑制剂、磁性粒子等。指出这类标记应用的专利包括 US-A-3817837、US-A-3850752、US-A-3939350、US-A-3996345、US-A-4277437、US-A-4275149 和 US-A-4366241。

宿主细胞

可以将用于本发明-例如用作靶或用于表达靶或用作药用活性剂的多核苷酸导入宿主细胞中。

与本发明相关的术语“宿主细胞”包括包含本发明多核苷酸序列的任何细胞。

这里,可以将多核苷酸导入原核生物细胞或真核生物细胞,例如酵母、昆虫或哺乳动物细胞。

可以用本领域已知的多种技术,例如转染、转化和电穿孔,将本发明的多核苷酸导入合适的宿主细胞中。当要将本发明的多核苷酸给予动物时,几种技术是本领域已知的,例如用重组病毒载体(例如反转录病毒、单纯疱疹病毒和腺病毒)感染以及直接注射核酸和基因枪转化。

因此,本发明的再一实施方案提供用作为本发明靶或表达本发明靶的多核苷酸转化或转染的宿主细胞。最好是所述多核苷酸载于用于

复制或表达将作为所述靶或表达所述靶的多核苷酸的载体中。将筛选与所述载体匹配的所述细胞,所述细胞例如可以是原核生物(例如细菌)细胞、真菌细胞、酵母细胞或植物细胞。

革兰氏阴性菌大肠杆菌广泛用作异源基因表达的宿主。然而,大量的异源蛋白往往在所述细胞中积累。随后从大量大肠杆菌胞内蛋白纯化所需蛋白有时可能是困难的。

与大肠杆菌相反,来自芽孢杆菌属(*Bacillus*)的细菌非常适合作为异源宿主,因为它们能够将蛋白分泌到培养基中。适合作为宿主的其它细菌是来自链霉菌属(*Streptomyces*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的细菌。

根据编码本发明多肽的多核苷酸的性质和/或对于所表达蛋白的进一步加工的需求,最好使用真核生物宿主,例如酵母或其它真菌。一般而言,酵母细胞优于真菌细胞,因为它们更易于操作。然而,某些蛋白或者从酵母细胞分泌差,或者在某些情况下其加工不当(例如在酵母中过度糖基化)。在这些情况下,应该选择一种不同的真菌宿主生物。

本发明范围内合适表达宿主的实例是真菌,例如曲霉属(*Aspergillus*)菌种(例如在 EP-A-0184438 和 EP-A-0284603 中描述的那些菌种)和木霉属(*Trichoderma*)菌种;细菌,例如芽孢杆菌属菌种(例如在 EP-A-0134048 和 EP-A-0253455 中描述的那些菌种)、链霉菌属菌种和假单胞菌属菌种;和酵母,例如克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)菌种(例如在 EP-A-0096430 和 EP-A-0301670 中描述的那些菌种)和酵母属(*Saccharomyces*)菌种。作为实例,典型的表达宿主可以选自黑曲霉(*Aspergillus niger*)、黑曲霉 *tubigenis* 变种(*Aspergillus niger* var. *tubigenis*)、黑曲霉 *awamori* 变种(*Aspergillus niger* var. *awamori*)、刺孢曲霉(*Aspergillus aculeatis*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、*Aspergillus oryzae*、*Trichoderma reesei*、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌

(*Bacillus amyloliquefaciens*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

被广泛修饰的多肽可能需要正确的加工以完成其功能。在那些情况下，需要哺乳动物细胞表达系统(例如 HEK-293、CHO、HeLA)，并且所述多肽或者在胞内表达、在细胞膜上表达，或者如果所述多肽前接合适的前导序列，则被分泌到培养基中。

应用合适的宿主细菌例如酵母、真菌、植物和哺乳动物宿主细胞，可以提供翻译后修饰(例如肉豆蔻酰化、糖基化、截短、脂质化以及酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸的磷酸化)，也可能需要应用合适的宿主来赋予本发明重组表达产物最适生物活性。

生物

与本发明相关的术语“生物”包括可以包含按照本发明的序列和/或从其中获得的产物的任何有机体。有机体的实例可以包括真菌、酵母或植物。

与本发明相关的术语“转基因生物”包括包含按照本发明的靶和/或所获得的产物的任何生物。

宿主细胞/宿主生物的转化

如早先指出的，宿主生物可以是原核生物或真核生物。合适的原核生物宿主的实例包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。本领域大量记载了关于原核生物宿主转化的内容，例如参见 Sambrook 等(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)和 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc..

如果使用原核生物宿主，则所述核苷酸序列可能需要在转化之前进行适当修饰，例如通过除去内含子进行修饰。

在另一实施方案中，所述转基因生物可以是酵母。在该方面，酵

母也已经广泛用作异源基因表达的载体。菌种酿酒酵母有很长的工业应用史，包括其用于异源基因表达。异源基因在酿酒酵母中的表达已经由 Goodey 等(1987, *Yeast Biotechnology*, D R Berry 等编著, 第 401-429 页, Allen and Unwin, London)和 King 等(1989, *Molecular and Cell Biology of Yeasts*, E F Walton 和 G T Yarronton 编著, 第 107-133 页, Blackie, Glasgow)进行了综述。

由于几种原因，酿酒酵母非常适合于异源基因表达。首先，它对于人类是非致病性的，并且它不能产生某些内毒素。其次，它在数个世纪的用于不同目的的商业开发后有长期安全应用史。这导致广泛的公众可接受性。第三，对于该生物体的广泛商业应用和研究已经得到许多关于酿酒酵母的遗传学和生理学以及大规模发酵特性的知识。

E Hinchcliffe E Kenny (1993, “作为异源基因表达载体的酵母”, *Yeasts*, 第 5 卷, Anthony H Rose 和 J Stuart Harrison 编著, 第 2 版, Academic Press Ltd.)给出了关于酿酒酵母中异源基因表达和基因产物分泌的原理的综述。

可利用几种类型的酵母载体，包括整合型载体，该类型载体需要与宿主基因组重组以进行其维持，还包括自主复制型质粒载体。

为了制备转基因酵母属，通过将本发明的核苷酸序列插入设计用于在酵母中表达的构建体中，制备表达构建体。已经研制了几种类型的用于异源表达的构建体。所述构建体含有一个在酵母中有活性的、与本发明核苷酸序列融合的启动子，通常使用一种酵母起源的启动子，例如 GAL1 启动子。通常使用酵母起源的信号序列，例如编码 SUC2 信号肽的序列。在酵母中有活性的终止子位于该表达系统的末端。

关于酵母转化，已经开发几种转化方案。例如，通过按照 Hinnen 等(1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, London, 275, 104); 和 Ito, H 等(1983, *J Bacteriology* 153, 163-168)的所述内容，可以制备按照本发明的转基因酵母属。

可以使用各种选择标记筛选经转化的酵母细胞。在用于转化的标记中有许多营养缺陷型标记(例如 LEU2、HIS4 和 TRP1)和显性抗生素抗性标记(例如氨基糖苷抗生素标记, 例如 G418)。

另一种宿主生物是植物。构建遗传修饰植物的基本原理是在植物基因组中插入遗传信息, 以获得所插入遗传物质的稳定保持。有几种用于插入遗传信息的技术, 两个主要原理是直接导入遗传信息和利用载体系统导入遗传信息。在 Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225)和 Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech 1994 年 3 月/4 月 17-27)的文章中可以找到关于一般技术的综述。关于植物转化的其它内容可以在 EP-A-0449375 中找到。

适用于本发明核苷酸序列的其它宿主包括高等真核生物细胞, 例如昆虫细胞或脊椎动物细胞, 特别是哺乳动物细胞, 包括人细胞, 或来自其它多细胞生物的有核细胞。在最近数年间, 在培养物(组织培养物)中繁殖脊椎动物细胞已经成为一种常规方法。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是上皮或成纤维细胞细胞系, 例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NIH 3T3 细胞、HeLa 细胞或 293T 细胞。

可以将本发明的核苷酸序列稳定地掺入宿主细胞中, 或可以用本领域已知的方法进行瞬时表达。例如, 通过用具有一种选择标记基因的表达载体转染细胞, 然后在对于表达所述标记基因的细胞选择性的条件下培养经转染的细胞, 可以制备稳定转染的哺乳动物细胞。为了制备瞬时转染子, 用报道基因转染哺乳动物细胞以监测转染效率。

为了产生这类稳定转染或瞬时转染的细胞, 所述细胞应该用足量的本发明核苷酸序列转染。本发明核苷酸序列的精确量可以凭经验确定并且对于特定细胞和测定优化。

因此, 本发明也提供一种用待作为靶或待表达所述靶的核苷酸序列转化宿主细胞的方法。用所述核苷酸序列转化的宿主细胞可以在适合表达所编码蛋白的条件下培养。由重组细胞产生的蛋白可以展示在该细胞的表面上。如果需要, 正如本领域技术人员将理解的, 可以设

计具有指导所述编码序列通过特定原核生物或真核生物细胞膜分泌的信号序列的含编码序列的表达载体。其它重组构建可以将所述编码序列与编码有助于纯化可溶性蛋白的多肽结构域的核苷酸序列连接(Kroll DJ 等(1993) DNA Cell Biol 12:441-53)。

受体

此中讨论的 RAR β 2 受体包括所述完整基因产物的模拟物、同源物、片段以及部分或全部的所述完整基因产物。此中讨论的 RAR β 2 最好基本上是指完整的基因产物。

神经性病症

此中所用术语神经性病症可以指任何损伤，无论是机械损伤(例如由于创伤)还是化学诱导的损伤(例如由于神经毒素，或由于或者因设计或者作为副作用而具有免疫抑制剂效应的治疗方案)；任何神经病理学，例如由病毒感染或其它引起的神经病理学；任何变性性疾病或其它神经组织相关的疾病。

神经性病症的实例包括例如帕金森病、老年性痴呆、衰老、运动神经元疾病、精神分裂症以及其它神经和/或神经变性性疾病。其它神经相关病症可以包括青光眼或视神经的其它损害病因、贝尔麻痹或其它形式的局限性麻痹、基于神经的阳痿例如在根治性前列腺切除术后神经创伤引起的阳痿、或其它病。本发明可能有效的其它病症包括糖尿病神经病理学效应、ALS 性神经病、麻风等。

术语神经性病症是指任何神经系统的病症，无论是外周神经系统还是中枢神经系统(CNS)，无论是交感神经系统还是副交感神经系统，或无论是影响一个亚组的不同神经类型还是影响一个超组(superset)的不同神经类型。

目的核苷酸(NOI)

按照本发明, 所述 NOI 序列可以编码一种肽, 该肽可以是药用活性剂, 例如一种 RA 受体(最好是 RAR β 2)或其激动剂。

这类编码 NOI 序列通常可以有效地连接于一个例如在一种或更多种特定细胞类型中能够驱动所述肽表达的合适启动子。

除所述 NOI 或其部分以及本文描述的表达调节元件外, 传递系统可以含有另外的遗传元件, 以有效地表达所述一个或更多个基因或调节所述基因的表达, 所述遗传元件包括启动子/增强子、翻译起始信号、内部核糖体进入位点(IRES)、剪接信号和聚腺苷酸化信号。

所述一个或更多个 NOI 可以处于表达调节元件的表达控制之下, 所述表达调节元件通常是启动子或启动子和增强子。所述增强子和/或启动子可以优先在神经细胞中有活性, 使得所述 NOI 优先在特定的目的细胞中表达, 例如在神经细胞中表达。因此, 所述 NOI 对待治疗个体的任何显著生物学效应或有害效应可以被降低或消除。增强子元件或提供受调节表达的其它元件可以以多个拷贝存在。同样或另外, 增强子和/或启动子可以优先在一种或更多种特定细胞类型中有活性, 所述特定细胞类型诸如神经细胞, 例如有丝分裂后终末分化的非复制型细胞, 例如神经元。

术语“启动子”以本领域通常的意义使用, 例如是 Jacob-Monod 基因表达理论中的 RNA 聚合酶结合位点。

术语“增强子”包括结合于转录起始复合体的其它蛋白组分并因此促进与其相连的启动子所指导的转录起始的一段 DNA 序列。

表达载体

最好将用于本发明方法中的 NOI (例如编码 RAR β 2 或其部分的 NOI)插入有效连接于一个能够为宿主细胞提供所述编码序列表达的控制序列的载体中, 即所述载体是一种表达载体。

定向载体

术语“定向载体”是指能够感染/转染/转导细胞或将在宿主和/或靶细胞中表达的能力限于该宿主生物的某些细胞类型的载体，所述细胞通常是具有共同表型或相似表型的细胞。

传递

用于本发明的传递系统可以是任何合适的传递系统，所述传递系统用于传递所述 NOI 并且供所述 NOI 在体内表达，以产生所述相关的肽(例如 RAR β 2)，这进而提供有效治疗效应。

传递系统可以是病毒传递系统。病毒传递系统包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、反转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体。另一方面，传递系统可以是非病毒传递系统，例如质粒、染色体或人工染色体的 DNA 转染法。这里，转染包括一个采用非病毒载体将基因传递至哺乳动物靶细胞的方法。通常，转染方法包括电穿孔、DNA 基因枪、脂质介导的转染、压缩(compact) DNA 介导的转染、脂质体、免疫脂质体、脂转染试剂、阳离子剂介导的转染、阳离子面式两亲物(cationic facial amphiphile) (CFA) (Nature Biotechnology 1996 14; 556)和它们的组合。

载体的其它实例包括离体传递系统，它们包括但不限于 DNA 转染法，例如电穿孔、DNA 基因枪、脂质介导的转染、压缩 DNA 介导的转染)。

在一个优选方面，所述传递系统是一种载体。

在一个更优选方面，所述传递系统是一种病毒传递系统，有时称为病毒载体。

载体

正如本领域众所周知的，载体是一种允许或促进一种实体从一个环境转移至另一个环境的工具。作为实例，重组 DNA 技术中使用的

某些载体允许实体例如 DNA 区段(例如异源 DNA 区段, 例如异源 cDNA 区段)转移到靶细胞中。任选的是, 所述载体一旦在靶细胞中, 则可以用来在所述细胞中维持所述异源 DNA, 或可以用作 DNA 复制单位。重组 DNA 技术中所用载体的实例包括质粒、染色体、人工染色体或病毒。

术语“载体”包括表达载体和/或转化载体。

术语“表达载体”是指能够在体内或体外/离体表达的构建体。

术语“转化载体”是指能够从一个种类转移至另一个种类的构建体。

病毒载体

在本发明中, 可以采用病毒传递系统(病毒载体)将所述 NOI 导入合适的宿主细胞中。多种病毒技术是本领域已知的, 例如用重组病毒载体例如反转录病毒、单纯疱疹病毒和腺病毒感染。

合适的重组病毒载体包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、反转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、痘病毒载体或细小病毒载体(参见 Kestler 等 1999 Human Gene Ther 10(10):1619-32)。在病毒载体的情况下, 基因传递通常通过病毒感染靶细胞来介导。

反转录病毒载体

反转录病毒的实例包括但不限于: 鼠类白血病病毒(MLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病病毒(EIAV)、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、弗吉纳米肉瘤病毒(FuSV)、莫洛尼鼠类白血病病毒(Mo-MLV)、FBR 鼠类骨肉瘤病毒(FBR MSV)、莫洛尼鼠类肉瘤病毒(Mo-MSV)、艾贝尔逊鼠类白血病病毒(A-MLV)、禽髓细胞瘤病毒-29 (MC29)和禽红细胞性白血病病毒(AEV)。

按照本发明使用的优选载体是重组病毒载体, 特别是重组反转录

病毒载体(RRV), 例如慢病毒载体。

术语“重组病毒载体”(RRV)是指具有足够的反转录病毒遗传信息以在包装组分存在下允许将 RNA 基因组包装到能够感染靶细胞的病毒粒子中的载体。靶细胞的感染包括反转录和整合到靶细胞基因组中。RRV 携带将由所述载体传递到靶细胞的非病毒编码序列。RRV 不能独立地复制, 以在最终的靶细胞中产生感染性反转录病毒粒子。通常所述 RRV 缺乏一个功能性 *gag-pol* 和/或 *env* 基因和/或复制必需的其它基因。

可以在 Coffin 等(“Retroviruses” 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press, 编著: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, 第 758-763 页)中找到详细的反转录病毒表。

非病毒性传递

所述药用活性剂(例如 RAR β 2)可以用非病毒技术给予。

作为实例, 所述药用活性剂可以用肽传递法来传递。肽传递利用得自能够穿过质膜和/或核膜转运的蛋白质的结构域或序列。

通过微注射或采用能够与细胞膜融合的囊泡例如脂质体传递, 可以将目的多肽例如 RAR β 2 直接导入细胞。病毒融合肽也可以用来促进膜融合和传递至所述细胞的胞质。

最好是, 所述 RAR β 2 或其片段可以作为与能够跨越质膜和/或核膜的蛋白的蛋白融合体或缀合物, 而被传递至细胞中。最好是, 所述 RAR β 2 或其片段可以与得自负责转运活性的这种蛋白的结构域或序列融合或缀合。优选的转运结构域和序列包括得自 HIV-1 反式激活蛋白(Tat)、果蝇属(*Drosophila*)触角足同源域蛋白和单纯疱疹病毒-1 VP22 蛋白的结构域和序列。

外源加入的 HIV-1 反式激活蛋白(Tat)可以通过质膜转运, 并达到细胞核以反式激活病毒基因组。已经在 HIV-Tat 的氨基酸 37-72 (Fawell 等, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 664-668)、37-62

(Anderson 等, 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 876-884)和 49-58 (具有基本序列 RKKRRQRRR)中鉴定出转运活性。Vives 等 (1997), *J Biol Chem* 272, 16010-7 鉴定出由氨基酸 48-60 (CGRKKRRQRRRPPQC)组成的序列, 该序列看来对于转运、核定位和细胞基因的反式激活是重要的。果蝇属触角足同源域蛋白的第三个螺旋也已经表现出具有相似的特性(综述, Prochiantz, A., 1999, *Ann N Y Acad Sci*, 886, 172-9)。在触角足中负责转运的结构域已经定位至 16 个氨基酸长的肽, 该肽富含碱性氨基酸, 具有序列 RQIKIWFQNRRMKWKK (Derossi 等, 1994, *J Biol Chem*, 269, 10444-50)。该肽已经用来在培养物中将生物活性物质导向胞质和细胞核 (Theodore 等, 1995, *J. Neurosci* 15, 7158-7167)。单纯疱疹病毒的 VP22 间层蛋白能够在细胞间转运, 其中在一个细胞亚群中表达的 VP22 蛋白传播至该群体的其它细胞(Elliott 和 O'Hare, 1997, *Cell* 88, 223-33)。由 GFP (Elliott 和 O'Hare, 1999, *Gene Ther* 6, 149-51)、胸苷激酶蛋白 (Dilber 等, 1999, *Gene Ther* 6, 12-21)或 p53 (Phelan 等, 1998, *Nat Biotechnol* 16, 440-3)与 VP22 组成的融合蛋白已经以这种方式被靶向细胞。上述结构域或序列的任何一种都可以用来将 RAR β 2 或其片段导向细胞。上述结构域或序列的任何一种或鉴定为具有转运活性的其它结构域或序列, 可以用来将 RAR β 2 或其片段导向细胞。

药用组合物

本发明也提供一种药用组合物, 包括给予治疗有效量的本发明因子(例如 RAR β 2 和/或如本文讨论的其激动剂)和一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂(包括其组合)。

所述药用组合物可以包含两种组分, 其中第一种组分包含 RAR β 2, 而第二种组分包含其激动剂。所述第一种组分和第二种组分可以顺序、同时或一起传递, 甚至可以通过不同的给药途径传递。

所述药用组合物可以在人类医学和兽医学上用于人类或用于动

物，通常将包含一种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂中的任何一种或更多种。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂是药学领域众所周知的，描述于例如 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro 编著, 1985)。可以根据计划的给药途径和标准药学实践，选择药用载体、赋形剂或稀释剂。

所述药用组合物可以包含作为载体、赋形剂或稀释剂的任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂，或除所述载体、赋形剂或稀释剂外，还包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂。

可以在所述药用组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

根据不同的传递系统，有不同的组成和配方需求。作为实例，本发明的药用组合物可以配制成用微量泵传递，或通过粘膜途径传递，例如作为吸入或可食入溶液用的鼻喷雾剂或气雾剂，或通过胃肠外给予，其中所述组合物配制为注射形式，通过例如静脉内、肌内或皮下途径传递。或者，可以设计配方，以通过这两种途径传递。

当所述因子通过胃肠粘膜进行粘膜传递时，它应该能够在通过胃肠道转运期间保持稳定；例如，它应该抗蛋白水解降解、在酸性 pH 下稳定并且抗胆汁的去垢剂效应。

如果合适，可以通过吸入、以栓剂或子宫托形式、通常以洗剂、溶液、乳膏、软膏或粉剂形式、利用皮肤贴剂、以含例如淀粉或乳糖的赋形剂的片剂形式、或在单独的或与赋形剂混合的胶囊或卵状小体 (ovule) 中、或以含调味剂或着色剂的酏剂、溶液或悬浮剂的形式，口服给予所述药用组合物，或可以将所述药用组合物胃肠外注射，例如静脉内、肌内或皮下注射。对于胃肠外给药，所述组合物最好以无菌水溶液形式使用，所述无菌水溶液可以含有其它物质，例如足够的盐或单糖，以使溶液与血液等渗。对于口腔含化给药或舌下给药，所述

组合物可以以常规方式配制的片剂或锭剂给予。

药物组合

本发明的因子可以与一种或更多种其它药学活性物质一起给予。例如，本发明包括用按照本发明的因子和一种或更多种类固醇、止痛药、抗病毒剂或其它药学活性物质同时或顺序治疗。

人们会理解，这些方案包括所述物质的顺序、同时或一起给予。

实施例

本发明现在将仅作为实例来描述，其中参考以下附图：

图 1 (是实施例 1 中所称的图 1) 显示照片。

图 2, (是实施例 1 中所称的图 2) 显示柱状图表和照片。

图 3, (是实施例 2 中所称的图 1) 显示照片。

图 4, (是实施例 2 中所称的图 2) 显示照片。

图 5, (是实施例 2 中所称的图 3) 显示照片。

图 6, (是实施例 2 中所称的图 4) 显示照片。

图 7, (是实施例 2 中所称的图 5) 显示照片。

图 8, (是实施例 2 中所称的图 6) 显示柱状图表。

图 9, (是实施例 3 中所称的图 1) 显示照片。

图 10, (是实施例 3 中所称的图 2) 显示照片。

图 11, (是实施例 3 中所称的图 3) 显示照片。

图 12, (是实施例 3 中所称的图 4) 显示照片。

图 13, (是实施例 3 中所称的图 5) 显示照片。

图 14, (是实施例 3 中所称的图 6) 显示照片。

图 15, (是实施例 3 中所称的图 7) 显示柱状图表。

图 16, (是实施例 3 中所称的图 8) 显示照片。

图 17 显示化学结构式。

所述附图在以下实施例小节中更全面地描述。

实施例 1: 神经突向外生长的刺激

神经生长因子通过视黄酸合成刺激神经突向外生长起作用。

神经生长因子(NGF)刺激来自培养的成体背根神经节(DRG)的神经突向外生长¹。维生素 A 衍生物视黄酸(RA)也诱导来自各种胚胎来源包括 DRG 的神经突向外生长^{2,3}。NGF 和 RA 效应的这种相似性是因为它们都是导致神经突向外生长的同一遗传级联的组分吗? RA 正调节低亲和性和高亲和性 NGF 受体^{3,4}, 并且诱导 NGF 自身的转录⁵, 提示 RA 在该级联中可以位于 NGF 上游。然而, 这里我们指出, 相反, 即 NGF 位于 RA 上游。我们证明, 当在 NGF 和一种抑制参与 RA 合成的酶的化合物存在下培养成体小鼠 DRG 时, 不发生神经突向外生长。相反, 当将 RA 与 NGF 的封闭性抗体一起加入时, 神经突向外生长正常发生。我们进一步证明, NGF 诱导视黄酸合成酶 RALDH-2 和视黄酸受体- β 两者的转录以及所合成 RA 的可检测释放。我们提出, RA 是成体 DRG 神经突再生所需的, 并且 NGF 在 RA 上游起作用以诱导其合成。

RA 的细胞效应是通过与作为激活转录因子的配体的核受体结合而介导的。存在两类受体 - 视黄酸受体(RAR)和类维生素 A X 受体(RXR), 每类有三个亚型: α 、 β 和 γ ^{6,7}。另外, 每个亚型由于可变剪接和差别启动子用法而有多种同种型。RAR 受体通过与 RXR 形成异二聚体而介导基因表达, 而 RXR 可以或者作为同二聚体介导基因表达, 或者通过与孤独受体例如 LXR 形成异二聚体而介导基因表达⁸。核受体 NGFIB 与 RXRs 形成异二聚体⁸, 而通过给予 NGF, NGFIB 在 PC12 细胞中被快速诱导⁹, 这些发现提示 NGF 和 RA 途径之间有另一种机制联系。

虽然显然 RA 在从胚胎 DRG 刺激神经突向外生长方面有作用^{2,3}, 但尚不了解在成体 DRG 中是否发生同样的作用。为了测试这一点, 我们在 NGF (100 ng/ml)或 RA (100 nM)存在下, 在去脂血清中培

养小鼠成体 DRG 达 5 天。在两种情况下, 都发生神经突向外生长(图 1b)。在单独的去脂血清中培养的成体 DRG 中神经突向外生长很少或没有发生(图 1a)。神经突数目的差异是显著的(图 2a; 1, 2 和 3)。重要的是注意到从 RA 或 NGF 处理的成体 DRG 延伸的神经突数目虽然显著高于从未经处理的 DRG 延伸的神经突数目, 但小于用胚胎组织获得的数目。当将 RA 与 NGF 一起加入时, 没有两种处理的加和作用(图 1c), 在 RA、NGF 或 RA 加 NGF 各组之间没有观察到显著差异(图 2a; 2、3 和 4)。虽然可能 NGF 和 RA 的浓度都是各自的饱和浓度, 但缺乏协同作用也暗示 NGF 和 RA 通过同一途径起作用, 以引起神经突向外生长。人们可能想象或者 RA 诱导 NGF 产生⁵, 或者 NGF 通过刺激 RA 合成酶诱导 RA 产生。

为了测试这些假说中的哪一个是最为可能的, 我们在 NGF 和 10 μM 二硫化四乙基秋兰姆存在下培养成体 DRG, 二硫化四乙基秋兰姆是一种化合物, 它通过抑制醛脱氢酶而阻断视黄醛转化为 RA¹⁰。如果 RA 的作用是刺激 NGF 产生, 则二硫化四乙基秋兰姆应该对 NGF 刺激的神经突向外生长没有影响, 而如果 NGF 诱导 RA 合成, 则二硫化四乙基秋兰姆应该抑制向外生长。如图 1d 所示, 加入 10 μM 二硫化四乙基秋兰姆与 NGF, 完全消除了 NGF 诱导的神经突向外生长(显著差异; 图 2a, 2 和 5), 而加入 DMSO (二硫化四乙基秋兰姆的载体) 和 NGF 不影响神经突向外生长(图 2a, 2 和 6)。为了证实二硫化四乙基秋兰姆不影响外植体中的细胞存活, 我们进行了两种类型的拯救。在两种情况下, 外植体均在补充二硫化四乙基秋兰姆的培养基中培养 8 天。在第一种拯救下, 从实验开始时, 将 100 nM RA 加入外植体中; 在第二种拯救下, 在第 4 天加入 RA。在两种情况下, 与在仅补充二硫化四乙基秋兰姆的培养基中培养的培养物相比, 均发生显著增加的神经突向外生长(图 1e、f 和 2b)。这些实验也证实二硫化四乙基秋兰姆对于 RA 合成途径的特异性, 因为 RA 可以拯救所述细胞应答。

二硫化四乙基秋兰姆抑制 NGF 的诱导效应, 而不抑制 RA 的诱

导效应, 这提示 NGF 在导致神经突向外生长的级联中可以位于 RA 之前。为了测试这一点, 我们使用了抗 NGF 的封闭性抗体。在 NGF 和该封闭性抗体存在下, 完全没有神经突向外生长发生(图 1g; 与在仅 NGF 存在下培养的 DRG 相比, 图 1b)。另一方面, 在 NGF 封闭性抗体和 100 nM RA 存在下培养的 DRG (图 1h)显示出与仅用 NGF 所获结果相同的神经突向外生长(图 1b 和 2c)。

如果 NGF 位于 RA 上游, 则它应该在加入 DRG 培养物之后诱导 RA 合成。为了测试这种预测, 我们使用了 F9 受体细胞系, 该细胞系由于用 1.8 kb 与 *lacZ* 基因连接的含视黄酸效应元件(RARE)的小鼠 RAR β 2 基因启动子转染, 而对 RA 的存在特异性应答(Sonneveld, E., van den Brink, C. E., van der Leede, B. J., Maden, M.和 van der Saag, P. T. (1999) 用 mRAR β 2-lacZ 稳定转染的胚胎癌性细胞系: 用于测定活性类维生素 A 水平的灵敏系统. *Exp. Cell. Res.* 第 250 卷第 284-297 页)。在存在 RA 的情况下, 在 β -半乳糖苷酶组织化学染色后可以检测到活化细胞。我们首先消除了这样一种可能性: 由于在 NGF (100 ng/ml) 存在下培养 F9 细胞, NGF 自身激活 F9 细胞, 因此没有高于背景的 F9 细胞的标记。然后, 我们在去脂血清中于三种不同条件下将成体 DRG 培养 5 天: 在缺乏 NGF 的情况下、在存在 NGF 的情况下或在存在 NGF 和 NGF 封闭性抗体的情况下。然后对培养的 DRG 进行超声处理, 并置于 F9 报道细胞上。与未经处理的 DRG 相比, 经 NGF 处理的 DRG 匀浆产生清晰的 RA 信号(图 2d)。当除 NGF 外用封闭性抗体培养所述 DRG 时, 阻止了这种激活(图 2d)。

我们下一步考虑到, 视黄酸合成酶可能由 NGF 诱导。视黄醇通过两步氧化过程转化为一种醛 - 视黄醛, 然后视黄醛被氧化为视黄酸(关于综述, 参见文献 11)。已经表明, 2 型视黄醛脱氢酶(RALDH-2)在发育中的神经系统(包括 DRG)中表达¹²。运用在 RT-PCR, 我们发现 NGF 也在培养的成体 DRG 中强诱导 RALDH-2 (图 2e)。最后, 我们还发现在 NGF 刺激的培养物中正调节 RAR β 受体(图 2e), 这是一种

表明涉及神经突向外生长的现象¹³。

我们的结果表明, RA 可以刺激来自成体神经组织 - DRG 的神经突向外生长。NGF 同样刺激来自该组织的神经突向外生长, 我们已经证明, NGF 通过一种酶 - RALDH-2 诱导 RA 合成而刺激神经突向外生长。在存在或者 NGF 封闭性抗体或 RA 合成抑制剂的情况下, 则 NGF 不能起作用。因此, 在 NGF 诱导神经突向外生长的过程中最为可能的事件顺序是: NGF → RALDH-2 → RA → 神经突向外生长。我们尚未确定 NGF 是否直接负责诱导 RALDH-2, 或者该过程是否需要某些中间蛋白。然而, 由于 NGFIB 是 NGF 诱导的最早的基因之一⁹, 并且其产物可以与 RXRs 形成异二聚体⁸, 因此 NGFIB/RXR 异二聚体可能负责激活 RALDH-2 基因。神经营养蛋白传统上一直被认为是诱导神经再生¹⁴和治疗神经变性疾病¹⁵的潜在的药物, 但其应用的一个主要问题是缺乏传递至损伤位点的有效方式。因为再生性反应需要 RA, 并且 RA 位于 NGF 下游, 那么因为 RA 是可以口服给予的低分子量亲脂性化合物, 所以可以解决传递至所述损伤的问题。因此, RA 在神经学方面可能具有临床用途。

实施例 1 的附图

图 1. 在去脂血清加以下物质存在下培养 5 天(a-d, g, h)或 8 天(e, f)的小鼠成体 DRG 的神经突向外生长: (a) 不加入; (b) NGF, 100 ng/ml; (c) NGF 和 100 nM tRA; (d) NGF 和 10 M 二硫化四乙基秋兰姆; (e) 在第 0 天加入的二硫化四乙基秋兰姆和 tRA; (f) 二硫化四乙基秋兰姆; (g) NGF 和封闭性抗体; (h) NGF 封闭性抗体和 tRA。

图 2 (a-c) 在 cellogen 中培养的成体 DRG 所产生的神经突。(a) 5 天时 NGF、RA 和二硫化四乙基秋兰姆的影响(1, 不加入; 2, NGF, 100 ng/ml; 3, RA, 100 nM; 4, NGF, 100 ng/ml 和 RA, 100 nM; 5, 100 ng/ml NGF 和 10 M 二硫化四乙基秋兰姆; 6, NGF, 100 ng/ml 和 DMSO)。误差范围(error bar), s.e.; $n = 6$, 所有组别。NGF 处理组(2)和其它组别之

间的差异: $*p < 0.01$; $**p < 0.0001$; Student t-检验。(b)用 10 M 二硫化四乙基秋兰姆处理的 DRG 的 RA 拯救(从左至右: 无 RA; 100 nM RA, 第 0 天; 100 nM RA, 第 4 天)。误差范围, s.e.; $n = 6$, 所有组别。与不存在 RA 的培养物的差异: $*p < 0.01$; $**p < 0.0001$; Student t-检验。(c) NGF 封闭性抗体对 5 天 DRG 培养物的影响。左, NGF, 100 ng/ml; 中, NGF 加封闭性抗体; 右, 封闭性抗体加 100 nM RA; $n = 4$ 。与 NGF 加封闭性抗体的差异: $*p < 0.01$; $**p < 0.0001$; Student t-检验。(d)对用或不用 NGF 培养的 DRG 应答的 β -gal 阳性 F9 细胞百分比的增加。左, 不加入; 中, NGF, 100 ng/ml; 右, NGF 与封闭性抗体。由 NGF 处理的 DRG 产生的 β -gal 阳性细胞百分比的差异: $*p < 0.025$, Student t-检验; 对于每组, $n = 9$ 。(e)用或不用 NGF (100 ng/ml)培养 5 天的成体 DRG 中 RALDH-2 酶和 RAR β 表达的 RT-PCR 分析。用 GAPDH 来指示两种样品中 cDNA 的存在。已经描述了应用 F9 报道细胞研究鸡胚中 RA 分布[16]。

实施例 2: 成体神经组织中神经突发育的诱导

此中出乎意料地表明, 视黄酸受体 $\beta 2$ 在小鼠成体脊髓中诱导神经突向外生长。

已经表明神经突向外生长需要视黄酸。最近我们已经证明, 在外周神经再生中的其作用机制是通过激活视黄酸受体 $\beta 2$ 。成体中枢神经系统不能再生。因此, 我们已经研究了在成体脊髓中不能再生是否与视黄酸受体 $\beta 2$ 的表达有关。

结果: 我们在此报道, 在可以再生的小鼠胚胎脊髓中 RAR $\beta 2$ 被正调节到最大程度刺激神经突向外生长的浓度。相反, 在小鼠成体脊髓中, 检测不到 RAR $\beta 2$, RA 也不诱导 RAR $\beta 2$, 在体外没有神经突延伸。当成体脊髓用 RAR $\beta 2$ 转染时, 可以诱导神经突再生。当脊髓用 RAR β 的另一同种型 RAR $\beta 4$ 转染时, 没有神经突向外生长。这表明在神经突再生中受体特异性的重要性。

结论：这些数据提示，成体 CNS 的再生潜力的损失部分由于 RAR β 2 的表达损失引起的，并且是神经元自身固有的。我们建议，用 RAR β 2 进行基因治疗可能导致受损脊髓的功能恢复。

背景：成体中枢神经系统(CNS)中轴突再生的诱导是神经生物学的主要目标。CNS 轴突在正常环境下不能再生已经归因于一种原因或多种原因的组合：神经营养因子的丰度低；缺乏促进生长的分子；存在抑制生长的分子。因此，在 CNS 中再刺激轴突生长的尝试集中在这三种可能性上。当使用外周神经移植物提供许可环境时，在成年大鼠中脊髓和髓神经元将轴突延伸多至 30mm¹。与成纤维细胞生长因子应用联合的相似策略导致后肢功能的部分恢复²。用抗体中和髓鞘质中存在的神经突生长抑制剂，使得轴突比在对照幼鼠中延伸得更长³，并且导致在脊髓损伤后特异性反射和运动功能的恢复⁴。神经营养蛋白-3 和这些抗体的组合成功地诱导皮质脊髓束(CST)轴突的远程再生⁵。嗅成髓鞘细胞(olfactory ensheathing cells)的悬浮液也有效地为大鼠的受损 CST 恢复运动功能⁶。如果神经营养蛋白仅仅用来保持轴突切开的神经元存活⁷，则在诱导再生的这些方法中，正是轴突周围的环境是注意的焦点，而不是神经元自身固有的能力。然而，至少 CNS 再生损失的一部分是神经元自身固有的(4 个参考文献)。这提示不在非再生性成体 CNS 中表达、而在可以再生神经突的发育中的 CNS 中表达的基因的鉴定，可以产生通过基因疗法治疗脊髓损伤的新策略。

我们在此证明，一种这样的基因是 RAR β 2，它由维生素 A 的生物活性代谢物视黄酸(RA)激活。RA 存在于发育中的胚胎和成年动物的各种组织中，尤其是在神经系统中⁸⁻¹³。当缺乏 RA 时，CNS 的发育中的神经元没有使神经突延伸到外周中^{14,15}。相反，当应用于培养的神经元时，RA 诱导更多数目和更长的神经突¹⁶以及能够决定其生长方向¹⁷。RA 在基因转录水平上起作用，因为它们两类核转录因子视黄酸受体(RAR)和类维生素 A X 受体(RXR)的配体^{18,19}。每类类维生素 A 受体有 3 个成员 α 、 β 和 γ ，并且每个成员有数种同种型，这

种多样性可能导致 RA 对细胞的多效性效应。

我们已经一直在研究 RA 对神经元作用的分子机制，已经得出的结论是：这些视黄酸受体之一 - RAR β 2 是神经元中 RA 信号的关键转导物，因为它在 RA 刺激神经突向外生长的情况下被正调节²⁰。因此我们假设：在成体脊髓中这种核受体缺乏或低阈值水平可能导致该组织不能再生轴突突出物。

结果和讨论

RA 在体外对小鼠胚胎脊髓的效应

我们开始通过证实小鼠胚胎脊髓同胚胎 CNS 其它区域一样通过延伸神经突的对 RA 应答^{12,17,21-23}，并且这种行为涉及 RAR β 2 的正调节。从置于 cellogen 基质中并在 10% 去脂血清中培养的小鼠胚胎解剖出 E13.5 脊髓。以 3 种不同浓度(10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M)加入全反式 RA，5 天后该外植体用神经丝抗体染色，并检查神经突的存在。随着 RA 浓度的增加，从培养的脊髓发出的神经突的数目也增加，在 10^{-6} M 下效应最大(图 1C、E、G)。因为 RA 及其前体视黄醇的内源含量高^{9,13}，所以可推测甚至在缺乏 RA 的情况下，所述胚胎脊髓也延伸神经突(图 1A)。实际上，当用二硫化四乙基秋兰姆抑制 RA 的内源合成时，则没有神经突延伸²⁴。为了证明神经突的诱导涉及 RAR β 2 的正调节，在同样范围的 RA 处理中在 5 天后，对培养物进行 RT-PCR。这揭示 RAR β 2 在所用的所有 RA 浓度下，正常地在胚胎脊髓中表达(图 2A，1-5 道)，并且在 1×10^{-6} M RA 处理后被强烈正调节(图 2A，5 道)，而这一浓度产生最大神经突向外生长。

在体外 RA 对小鼠成体脊髓的效应缺乏

我们下一步不用胚胎脊髓，而用 10 月龄成体脊髓进行同样的一系列实验。与胚胎脊髓相反，RA 在所测试的任何浓度下都对神经突向外生长没有影响，并且同未处理的对照一样，这些 RA 处理的成体

脊髓根本不能延伸任何神经突(图 1B、D、F、H)。通过 RT-PCR 检查 RAR β 2 的参与,揭示出对照成体脊髓有很少的这种受体或没有可检测的内源水平的这种受体(图 2B, 1 道),并且与胚胎脊髓不同,对任何浓度的 RA 处理反应时其水平都没有变化(图 2, 2-5 道)。

成体脊髓中神经突的诱导

因此我们假设:这是缺乏 RAR β 2 表达,这可能导致成体脊髓的完全惰性的行为。我们先前观察到,通过延伸神经突而对 RA 应答的成体 DRG 也正调节 RAR β 2²⁴,这一观察证明:所述同样的行为由胚胎神经元和合适的成体神经元诱发,并且增强了 PNS 和 CNS 神经元之间调节行为的差异。为了测试我们的假说,我们用 1 型缺陷型单纯疱疹病毒(HSV-1)载体转染成年(10 月龄)小鼠脊髓段。

进行了 3 种不同的转染,其中两种用作对照。第一种转染,仅用含 lacZ 的载体(pHSVlacZ);第二种转染,用含 RAR β 2 的载体(pHSVRAR β 2);第三种转染,用含另一同种型 RARb 基因 RAR β 4 的载体(pHSVRAR β 4)。后者用作非常准确的转染对照,因为在我们先前的实验中我们在 RA 处理神经元后没有检测到 RAR β 4 同种型²⁰,因此它不参与神经突向外生长。我们首先确保所述转染是成功的,并且相关的受体同种型在培养的脊髓中表达。用合适的构建体对脊髓段转染过夜,并且或者在 3 天后或者在 4 天后进行分析。根据对成体脊髓的 b-半乳糖苷酶染色判断, pHSVlacZ 处理的脊髓表明发生了显著量的转染(图 3B)。RT-PCR 证明,用所述 RAR β 2 载体转染导致 RAR β 2 表达(图 4, 3 道),但 RAR β 4 不表达(图 4, 4 道),而用所述 RAR β 4 载体转染导致 RAR β 4 表达(图 4, 8 道),而 RAR β 2 不表达(图 4, 7 道)。在非转染的脊髓中,既没有检测到 RAR β 2,也没有检测到 RAR β 4(图 4, 2 道和 6 道)。

这些转染对神经突向外生长的效应是明确的。用 pHSVlacZ 转染,不能改变培养的成体脊髓的行为,培养的成体脊髓在神经突向外

生长方面完全保持不反应(图 5A, 12/12 转染)。同样, 用 pHSVRAR β 4 转染在培养的脊髓中没有产生反应, 培养的脊髓保持无作用(图 5C, 12/12 转染)。然而, 用 pHSVRAR β 2 同种型转染, 清楚地产生一种不同的行为, 在培养物中出现许多神经突(图 5B, 8/12 转染)。在 pHSVRAR β 2 脊髓中产生的神经突数目不等, 在 3 和 23 之间。在 pHSVlacZ 转染中, 每个外植体的 lacZ 阳性细胞数目有相当大的变异。这提示神经突数目的变异性可能是由于转染的细胞数目变异而引起的。

这些结果为我们的假说提供了强有力的支持, 我们的假说是: RAR β 2 同种型在应答 RA 而诱导神经突向外生长方面起重要作用, 并且 RAR β 2 同种型可能是在损伤成体 CNS 中不能被正调节的关键组分。我们的假说基于几个涉及或者再生型或者非再生型神经元组织及其对 RA 应答的实验。因此, 小鼠胚胎脊髓、小鼠胚胎 DRG 和小鼠成体 DRG 都通过正调节 RAR β 2 且延伸神经突而对 RA 应答。相反, 小鼠成体脊髓不能正调节 RAR β 2 并且不能延伸神经突。此外, NGF 刺激神经突向外生长, 并且通过正调节 RAR β 2 而起作用²⁴, 而来自小鼠胚胎 DRG 的神经突向外生长可以受 RAR β 激动剂刺激²⁰。

这些结果表明, 当操作神经元本身的基因组时, 再生可以被重新唤醒。这与最近的神经突向外生长的体内诱导相反, 所述神经突向外生长的体内诱导集中在 CNS 环境中存在着的抑制性因子¹⁻⁵。在发育期间, 脊髓再生能力的损失与髓鞘质相关神经突生长抑制分子的出现相关, 并且这些抑制分子中的某些分子被认为是由少突胶质细胞产生的²⁵。我们在我们的培养物中以及在环境已经被操作的培养物中观察到的两种神经突再生是两种不同的神经突再生机制, 或者它们是相关的过程。已经表明 CNS 神经元本身参与髓鞘形成²⁶, 这一事实为后一观点提供了支持。因此这使得我们推测: 在发育期间神经元中 RAR β 2 的存在, 可能调节参与髓鞘形式的基因, 并且通过 RAR β 2 基因的转染, 这一过程在成体 CNS 中重演。

在 RAR β 2 转染的脊髓中观察到的神经突中没有一个延伸超过适当的距离。这提示神经突的延伸可能需要一组不同基因的表达。成体 PNS 中轴突再生, 其中从分枝到延伸生长的转变取决于转录依赖性开关²⁷, 这一证据提供了这可能是事实的证据。另一方面, 在我们的培养基中神经突不能延伸可能是由于这样一个事实引起的: 有可能由于所述转染的瞬时性质而致使在规定时间内 RAR β 2 表达丧失, 并且这没有为延伸的发生提供足够的时间。

然而, 我们提出: 这些初步数据支持 RAR β 2 在成体 CNS 中神经突再生中起作用, 并且用这种转录物的基因疗法联合其它疗法可能在某一天导致受伤脊髓的功能恢复。

方法

培养物. 从或者 E13.5 小鼠或者 10 月龄小鼠解剖出脊髓, 并将其切成约 5 mm 的横切段。将这些横切段培养在 cellogen 基质(ICN flow)中, 所述基质通过将 1 体积的 7.5%碳酸氢钠、1 体积 10x MEM (Gibco) 和 8 份 cellogen (ICN flow)混合而制备。通过滴加 5M NaOH, 将 pH 调至 7.5。每 2 天饲喂外植体。培养基由含有谷氨酰胺(Gibco)、6%葡萄糖、GMS-A (Gibco)、10%去脂血清和全反式 RA (储备液, 1×10^{-5} M, Sigma)的 DMEM-F12 组成。第 5 天, 将它们固定在 4%低聚甲醛中, 并用神经丝抗体 NF200 (Sigma)染色。

RT-PCR 分析. 提取 RNA (trizol, Gibco), 并利用 Pharmacia 试剂盒, 如生产商的说明中所述, 制备 cDNA。所用的引物来自 GAPDH、RAR β 2 和 RAR β 4, (细节根据要求)。对于胚胎脊髓, 进行 25 个循环的 PCR, 而对于成体脊髓, 进行 40 个循环的 PCR。如下进行扩增: 于 95°C 变性 30 秒, 于 55°C 退火 30 秒, 并且于 72°C 延伸 1 分钟。然后将所得产物的 1/5 进行凝胶电泳。

转染. 制备病毒储备液, 并如参考文献 28 中所述方法进行 B 半乳糖苷酶染色。所用的效价是: pHSV RAR β 2, 5×10^{-4} ip/ul,

pHSVRAR β 4, 4×10^{-4} ip/ul, pHSVlacZ 5×10^{-4} ip/ul.

实施例 2 的附图:

图 1 视黄酸对培养的 E13.5 (A, C, E, G)和 10 月龄成体脊髓(B, D, F, H)上神经突向外生长的影响的比较。脊髓段在 10%去脂血清和 RA 存在下 cellogen 中培养 5 天。培养基每 2 天进行更换。A, B, 无 RA; C, D, 1×10^{-8} M RA; E, F, 1×10^{-7} M RA; G, H, 1×10^{-6} M RA.

图 2 RAR β 2 在 E13.5 和 10 月龄成体脊髓中的表达。脊髓段在不同浓度的 RA 存在下培养 5 天, 此后进行 RAR β 2 的 RT-PCR 分析。A. E13.5 (2-5 道)和 B. 10 月龄成体脊髓(2-5 道)。泳道: 1. bluescript/HPA II 大小标记物, 2. 无 RA, 3. 1×10^{-8} M RA, 4. 1×10^{-7} M RA, 5. 1×10^{-6} M RA。GAPDH 的存在用来指示样品中等量的 cDNA。

图 3 用 pHSVlacZ 转染成体脊髓。培养的 10 月龄成体脊髓用 5×10^{-4} ipu/ul pHSVlacZ 转染过夜, 并在 3 天后分析 B 半乳糖苷酶染色。A. 非转染的成体脊髓。B. 用 pHSVlacZ 转染的成体脊髓。

图 4 用或者 pHSVRAR β 2 或 pHSVRAR β 4 转染的成体脊髓。成体脊髓在 cellogen 中培养, 并且或者用 5×10^{-4} ipu/ul pHSVRAR β 2 或者用 4×10^{-4} ipu/ul pHSVRAR β 4 转染过夜。转染后 4 天, 经 RT-PCR 分析用以下转染的成体脊髓中 RAR β 2 (2-4 道)和 RAR β 4 (6-8 道)的表达: 泳道 2、6, 无病毒, 泳道 3、7, pHSVRAR β 2, 泳道 4、8, pHSVRAR β 4。GAPDM 的存在用来指示样品中的等量 cDNA。泳道 1、2, bluescript/HPA II 大小标记物。

图 5 在培养的成体脊髓中或者 pHSVlacZ、pHSVRAR β 2 或者 pHSVRAR β 4 的转染对神经突向外生长的影响。10 月龄脊髓在 cellogen 中培养, 并且或者用 5×10^{-4} ipu/ul pHSVlacZ、 5×10^{-4} ipu/ul pHSVRAR β 2 或者用 4×10^{-4} ipu/ul pHSVRAR β 4 转染过夜, 并且转染后 4 天, 经用 NF200 分析神经突染色。用 A. pHSVlacZ, B. pHSVRAR β 2, C. pHSVRAR β 4 转染的培养的脊髓。

图 6 是每个脊髓外植体的神经突平均数的柱状图表。

实施例 3: 来自小鼠神经节神经元的神经突向外生长

视黄酸受体在来自小鼠胚胎背根神经节不同群体的神经突向外生长中的作用。

根据生存对神经营养蛋白的需求, 可以将背根神经节(DRG)神经元分为至少 3 个类型。我们已经分析了在从胚胎第 13.5 天的小鼠 DRG 中分离的 NGF、NT-3 和 BDNF 依赖性神经元中视黄酸受体(RAR)和类维生素 A X 受体(RXR)的表达。我们证明, 每个神经元群体表达三个 RXR - α 、 β 和 γ 中的每一个。然而, NGF 和 NT-3 依赖性神经元表达 RAR α 、 β 和 γ 中的每个, 而 BDNF 依赖性神经元仅表达 RAR α 和 RAR β 。当将视黄酸加入每个所述类别的神经元中时, 仅 NGF 和 NT-3 依赖性神经元通过延伸神经突的应答, 这种应答涉及 RAR β 2 的正调节。利用受体选择性激动剂证实了这种特异性, 因为仅 RAR β 选择性化合物刺激神经突向外生长。这些结果表明通过 RAR β 2 的 RA 作用在神经突向外生长中的作用。

导入

神经营养蛋白是一个生长因子家族, 它们是发育中的外周神经系统中多种初级感觉神经元的生存所需的(Snider, 1994)。该家族包括神经生长因子(NGF) (Levi-Montalcini, 1987)、神经营养蛋白-3 (NT-3) (Maisonpierre 等, 1990)和脑源神经营养因子(BDNF) (Barde 等, 1982)。它们在受外周神经元支配的靶区域中合成, 并且被认为通过一个逆行机制从所述靶区域转运, 以支持发育中的神经元的存活。神经营养蛋白通过称为 Trk 的受体酪氨酸激酶发挥作用。NGF 特异性地激活 TrkA; BDNF 激活 TrkB, 而 NT-3 激活 TrkC (综述, 参见 Snider, 1994)。导致神经营养蛋白和受体酪氨酸激酶功能丧失实验的表型分析, 已经揭示出, 背根神经节(DRG)神经元可以被分为至少 3 个类型。

其生存需要 NGF 的神经元介导感受伤害(疼痛)和感受热的功能。在外周中,所述轴突终止于皮肤浅层,并且神经支配脊髓浅层(Crowley 等, 1994; Smeyne 等, 1994)。比 NGF 型神经元大得多、在外周中投射至肌梭的主要末端并且延伸一个侧支至脊髓中的运动原库(pool)的本体感受神经元(感觉肢体在空间的位置),其生存依赖于 NT-3 (Ernfors 等, 1994; Farinas 等, 1994; Klein 等, 1994)。BDNF 神经元小至中等大小,并且可以包括某些类别的机械感受器(Klein 等, 1993; Jones 等, 1994)。

除涉及神经元存活的生长因子外,类维生素 A 也执行同样的作用。类维生素 A 是由维生素 A 衍生而来的一类分子家族,包括生物活性代谢物视黄酸(RA)。RA 的细胞效应通过两类受体的作用而介导,所述两类受体是:视黄酸受体(RAR),全反式 RA (*t*RA)和 9-顺式-R A (9-*cis*-RA)均激活它们;和类维生素 A X 受体(RXR),它们仅由 9-*cis*-RA 所激活(Kastner 等, 1994; Kleiwer 等, 1994)。所述受体有三个主要亚类- α 、 β 和 γ ,每个亚类由于可变剪接和差别启动子用法而具有多种同种型(Leid 等, 1992)。RAR 通过与 RXR 形成异二聚体或通过多种孤独受体形成异二聚体介导基因表达,而 RXR 可以作为同二聚体而介导基因表达(Mangelsdorf 和 Evans, 1995)。有趣的是,在 PC12 细胞中由 NGF 诱导的最早的基因之一是孤独受体 NGFI-B (NURR1) (Millbrandt, 1989)。这提示所述生长因子和类维生素 A 介导发育中的神经元可以相互作用的途径。这种相互作用可能对于所述神经元的存活是关键性的,因为已经表明 RA 涉及神经元的存活和分化(Wuarin 和 Sidell, 1991; Quinn 和 De Boni, 1991)。此外,对多种胚胎神经元类型的许多研究已经表明,RA 可以刺激神经突数目和长度(综述,参见 Maden, 1998),实际上,所述神经营养蛋白也可以刺激神经突数目和长度(Campenot, 1977; Lindsay, 1988; Tuttle 和 Mathew, 1995)。最近,我们已经证明,RA 对于成体 DRG 中神经突的再生是关键性的,并且其合成可以受 NGF 调节(Corcoran 和 Maden, 1999)。

在此中所述的研究中, 我们使用 E13.5 小鼠 DRG, 通过查询 RAR 和 RXR 中的哪些在其生存依赖于不同神经营养蛋白的神经元中表达, 进一步研究类维生素 A 介导的途径和所述生长因子途径之间的相互作用的性质。我们证明, 实际上在 NGF、NT-3 和 BDNF 神经元中表达一种不同的类维生素 A 受体分布型, 并且这种分布型在 RA 处理后改变, 这诱导神经突向外生长。具体地说, RAR β 2 在 NGF 神经元和 NT-3 神经元中被正调节, 但在 BDNF 型神经元中不被正调节。利用受体选择性激动剂证实了这一结果, 因为仅 RAR β 激动剂取代 RA 诱导神经突向外生长。这些结果表明通过 RAR β 2 的 RA 作用在神经突向外生长中的作用。

材料和方法

DRG 培养物。 DRG 得自 E13.5 小鼠, 无非神经节组织, 并且将其收集到冰冷的无钙镁磷酸缓冲盐溶液中。为了制备游离的细胞悬浮液, 用 0.05%胰蛋白酶将所述神经节于 15℃处理 15 分钟。通过加入 1%血清终止反应, 并且通过用 23 号针研磨获得单细胞。然后将所述细胞以 1000 g 离心 10 分钟, 并重悬于培养基中。将它们以约 25000 细胞/cm²的密度接种于各孔中, 在所述各孔中已经用 100 μ g/ml 多聚 D 赖氨酸预包被 2 小时。每 2 天饲喂所述培养物。

培养基由含有谷氨酰胺(Gibco)、6%葡萄糖、ITS (Gibco)的 DMEM-F12 组成。所用的生长因子或者是 50ng/ml NGF (7s, Promega)、50ng/ml NT3 (Promega)或者是 50ng/ml BDNF (Promega)。类维生素 A 的使用浓度为 1×10^{-7} M。全反式视黄酸得自 Sigma, 而所述受体激动剂由 CIRD Galderma 合成: CD366 激活 RAR α , CD2019 激活 RAR β , CD437 激活 RAR γ , 而 CD2809 激活所有的 RXR。

RT-PCR 分析。 提取 RNA (trizol, Gibco), 并且利用 Pharmacia 试剂盒, 如生产商的说明中所述, 制备 cDNA。所用的引物得自小鼠 RAR、RXR 和 GAPDH (细节根据要求)。为了鉴定出哪种 RAR/RXR

受体涉及神经突向外生长, 使用半定量 PCR。在每种 RAR 和 RXR 的线性范围内进行扩增, 将其表达水平与 GAPDH 比较。对于 RXR, 进行 28 个循环, 而对于 RAR α 和 RAR γ 进行 25 个循环, 而对于 RAR β 和 GAPDH 进行 22 个循环。如下进行扩增: 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒, 于 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒, 并且于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 分钟。将所得产物的 1/5 进行凝胶电泳, 并且进行吸印。然后将其用合适的 RAR、RXR 或 GAPDH 探测, 以进行归一化。

原位杂交: 细胞用 PBS 洗涤 1 次, 并且在 4% PFA 中固定 30 分钟。然后将其在 PBS-0.05% Tween (PBT) 中洗涤 2 次, 每次 5 分钟。杂交于 55 $^{\circ}\text{C}$ 过夜进行。所述缓冲液由 0.1M Tris-Cl, pH 9.5、0.05M MgCl₂、0.1M NaCl 和 0.1% Tween-20 构成。然后将细胞于 65 $^{\circ}\text{C}$ 顺序在 50% 杂交缓冲液、50% 2x SSC、100% 2x SSC 中洗涤 15 分钟, 最后在 0.2% SSC 中洗涤。然后将它们在 RT 下分别在 75% 0.2X SSC、25% PBT、50% 0.2x SSC、50% PBT、25% 0.2X SSC、75% PBT 和 100% PBT 中洗涤, 每次 5 分钟。将细胞在 2% 绵羊血清的 PBT 溶液中封闭 1 小时, 然后与抗 DIG 抗体一起于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后将细胞在 PBT 中洗涤 8 次, 达 2 小时。通过用 NBT/BCIP, 按照生产商的说明 (Boehringer Mannheim) 进行显色。

免疫组织化学和神经突长度的测量: 细胞用 PBS 洗涤 1 次, 并且在 4% PFA 中固定 30 分钟。然后将其在 PBS-0.05% Tween (PBT) 中洗涤 2 次, 每次 5 分钟。然后将它们在第一抗体 NF200 (sigma) 中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 并且在 PBT 中洗涤 8 次, 达 2 小时。然后于室温应用第二抗体达 2 小时, 然后将细胞再次在 PBT 洗涤 8 次, 达 2 小时。然后将其在含 0.5 mg/ml DAB 和 6% H₂O₂ 的 PBS 中孵育 5 分钟。利用 NIH 图象软件测量神经突的长度。将实验重复 3 次, 每个实验取 3 个随机视野进行分析。每个视野平均有 40 个神经元, 测量给定神经元的最长的神经突分支。

结果

通过原位杂交测定的受体表达

我们首先通过原位杂交研究了所述 RAR 和 RXR 在 E13.5 小鼠 DRG 的原代培养物中的表达。解离的 DRG 神经元在 NGF、NT-3 或 BDNF 存在下无血清培养基中培养 5 天。在无神经营养蛋白的情况下所述细胞死亡。我们发现,所有三种类型的神经元均表达 RXR α (图 1 D, J, P)、RXR β (图 1 E, K, Q)和 RXR γ (图 1 F, L, R)。相比之下,所述 RAR 在所述三种类型的神经元中表现出差别表达。NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元表达 RAR α (图 1 A, G)、RAR β (图 1 B, H)和 RAR γ (图 1 C, I), 而 BDNF 依赖性神经元仅表达 RAR α (图 1 M)和 RAR β (图 1 N)。通过原位杂交在 BDNF 依赖性培养物中不能检测到 RAR γ (图 1 O)。

RA 对神经突向外生长的影响

为了消除 RA 对不同神经元群体的任何营养效应,我们在加有相关神经营养蛋白的无血清培养基中将所述神经元培养 2 天,然后将 1×10^{-7} M RA 加入培养物中达 3 天。对照培养物不加入 RA, 并且仅在神经营养蛋白中维持。在有或无 RA 的情况下培养的神经元数目没有显著差异。这提示 RA 对神经突向外生长有影响, 并且该影响不是由于神经元亚群在所用的不同培养条件下的选择性存活而引起的。为了分析神经突向外生长, 5 天后将培养物固定, 并且用单克隆抗体 NF200 染色。神经突长度通过 NIH 图象软件测量。将该实验重复 3 次。每个实验总共对约 120 个神经元进行计数, 并且测量每个神经元的最长神经突, 从中取每种处理的平均神经突长度。在无 RA 的情况下, BDNF 依赖性神经元(图 2 E 和图 7 C 的柱 1)生长出神经突, 而 NGF 依赖性神经元(图 2 A)和 NT-3 依赖性神经元(图 2 C)表现出有限的神经突向外生长(图 7 A 和 B 的柱 1)。相比之下, 当将 RA 加入培养基中, 在 NGF 依赖性神经元(图 2 B)和 NT-3 依赖性神经元(图 2 D)中神经突的

长度和数目有显著增加, 并且发现当比较所述神经突的长度时, 这种差异是显著性的(图 7 A 和 B, 柱 1 和柱 2)。相反, RA 对 BDNF 依赖性神经元的神经突向外生长没有影响(图 2 F 和图 7 C 的柱 1 和柱 2)。

通过 RT-PCR 测定的受体表达和对 RA 的应答

为了鉴定出所述受体中哪些受体涉及神经突向外生长, 用针对所述 RXR 的引物和个别 RAR 同种型, 如在材料和方法中所述进行半定量 PCR。在用或不用 RA 培养的所述三个类型的神经元中的每种类型中, 在所述 RXR 的表达中没有差异。相反, 在所述 RAR 受体分布型中有变异。所述三个类型神经元的每个类型均表达 RAR α 1 (图 3 A, B, C, 柱 1), 在 NGF 依赖性神经元(图 3 A, 8 道)和 NT-3 依赖性神经元(图 3 B, 8 道)中, 对 RA 应答 RAR α 1 被强正调节, 在 BDNF 依赖性神经元(图 3 C, 8 道)中 RAR α 1 仅被略为正调节。从图 3 中明显看出, 在这些 DRG 神经元中仅 RAR α 1 同种型容易被检测出, 尽管在所述印迹过度暴露时 NT-3 依赖性神经元表达 RAR α 5 和 RAR α 7 同种型, 而 BDNF 依赖性神经元表达 RAR α 6 和 RAR α 7 同种型。

在所述四种可能的 RAR β 同种型中, 仅 RAR β 2 同种型在所有三种类型的神经元中均检测到。与非刺激的培养物相比(图 4 A, B, C, 2 道)相比, 在 NGF 依赖性神经元(图 4 A, 6 道)和 NT-3 依赖性神经元(图 4 B, 6 道)中该同种型被 RA 强正调节, 但在 BDNF 依赖性神经元(图 4 C, 6 道)中该同种型未被正调节。

在 7 种 RAR γ 同种型中, 在所述神经元培养物中仅检测出 RAR γ 1 同种型, 该同种型随后仅在 NGF 依赖性神经元(图 5 A, 1 道和 8 道)和 NT-3 依赖性神经元(图 5 B, 1 道和 8 道)中检测出。在 BDNF 依赖性神经元中通过 RT-PCR 没有检测出 RAR γ 1。

受体选择性类似物和神经突向外生长

以上数据表明, 不是 RAR α 1 就是 RAR β 2 的正调节可能导致在

NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元中观察到的神经突向外生长的增加(图 2 B, D)。更可能是 $RAR\beta2$ 同种型, 因为该受体在 BDNF 依赖性神经元中不被正调节, 并且当用 RA 刺激时神经突向外生长不增加(图 2 F), 而 $RAR\alpha1$ 同种型被正调节, 虽然缺乏对 RA 的神经突应答。为了区别这两种受体, 我们使用已经研制的特异性地激活个别受体的受体选择性合成类维生素 A。CD366 激活 $RAR\alpha$, CD2019 激活 $RAR\beta$, CD437 激活 $RAR\gamma$, 而 CD2809 激活所有 RXR。

在所述 $RAR\alpha$ 激动剂的存在下, 在任何神经元群体中神经突向外生长均没有显著增加(图 6 A, E, I 和图 7 A, B 和 C, 柱 1 和柱 3)。相反, 与未处理的神经元相比, 所述 $RAR\beta$ 激动剂在 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元中显著增加神经突向外生长(图 6 B, F 和图 7 A B, 柱 1 和柱 4), 但所述 $RAR\beta$ 激动剂不影响 BDNF 依赖性神经元中的神经突向外生长(图 6 J 和图 7 C, 柱 1 和柱 4)。当在所述 $RAR\gamma$ 激动剂存在下培养不同神经元群体时, 在 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元中神经突向外生长显著减少(图 6 C, G 和图 7 A B, 柱 1 和柱 5), 而在 BDNF 依赖性神经元中仍发生神经突向外生长(图 6 K 和图 7 C, 柱 1 和柱 5)。当将它们在所述 RXR 激动剂存在下培养时, 在任何所述神经元群体中对神经突向外生长均没有显著影响(图 6 D, H, L 和图 7 A B 和 C, 柱 1 和柱 6)。

因此, 与我们的 RT-PCR 数据相一致, $RAR\beta2$ 是神经突向外生长所需要的。此外, $RAR\gamma$ 可以抑制神经突向外生长。

RAR 之间的相互关系

最后, 我们尝试研究在受体 $RAR\beta2$ 和 $RAR\gamma1$ 之间是否有任何调节性相互作用, 因为这些受体对神经突向外生长具有相反的效应。为了检查这一点, 我们在或者所述 $RAR\gamma$ 激动剂或者所述 $RAR\beta$ 激动剂存在下在无血清培养基中培养 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元, 并且 24 小时后, 通过半定量 RT-PCR 在受体表达水平上查看。

与非刺激的培养物(图 8, 1 道和 4 道)相比, 所述 $RAR\beta$ 激动剂在 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元中都正调节 $RAR\beta2$ 的表达(图 8 B, 3 道和 6 道), 但不影响 $RAR\gamma1$ 的表达(图 7 A, 3 道和 6 道)。然而, 与非刺激的培养物(图 8 B, 1 道和 4 道)相比, 在所述 $RAR\gamma$ 激动剂存在下, 在 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元中 $RAR\beta2$ 均降低(图 8 B, 2 道和 5 道)。所述 $RAR\gamma$ 激动剂对 $RAR\gamma1$ 的水平没有影响(图 8 A, 2 道和 5 道)。因此, $RAR\gamma1$ 可以调节 $RAR\beta2$ 的表达。

实施例 3 的讨论

我们的结果表明, 我们已经分离的三种背根神经节神经元群体(NGF、NT-3 和 BDNF 依赖性的)的每种都表达一组共同的类维生素 A 受体和一组独特的类维生素 A 受体。关于所述 RXR, 它们分别表达 $RXR\alpha$ 、 $RXR\beta$ 和 $RXR\gamma$, 并且这些中没有一种发现直接参与神经突向外生长。相反, 根据用来选择神经元的神经营养蛋白, 所述神经元表达不同的 RAR。对于每个群体共同的主要的 RAR 同种型是 $RAR\alpha1$ 和 $RAR\beta2$ 。另外, NGF 群体和 NT-3 群体表达 $RAR\gamma1$, 而在所分析的时间点 $RAR\gamma1$ 在 BDNF 群体中不表达。

仅 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元通过延伸神经突而对 RA 应答, 而无论 RA 是否存在, BDNF 依赖性神经元都产生神经突。平行的是, 在 RA 加入后 RAR 分布型有变化。在 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元中 $RAR\alpha1$ 和 $RAR\beta2$ 均被强正调节, 而在 BDNF 依赖性神经元中, 仅 $RAR\alpha1$ 被正调节。这表明 $RAR\beta2$ 是诱导神经突向外生长所需的, 并且证实我们使用受体选择性激动剂的这一观察结果。

受体选择性激动剂的开发已经提供了一种非常有价值的工具, 以开始检查个别受体在任何特定生物学过程中的作用。我们在此表明, 仅 $RAR\beta$ 激动剂 CD2019 通过在 NGF 神经元和 NT-3 神经元中诱导神经突向外生长而模拟 RA 的效应, 因此证实我们的 RT-PCR 结果。

我们也观察到,所述 $RAR\gamma$ 激动剂引起 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元的神经突向外生长的减少。在表明这是否与 $RAR\beta 2$ 表达有关的研究中,我们检查了所述 RAR 激动剂是否对受体表达有任何影响。所述 $RAR\beta$ 激动剂正调节 $RAR\beta 2$ 的表达,但对 $RAR\gamma 1$ 的表达没有影响。相比之下,所述 $RAR\gamma$ 激动剂对 $RAR\gamma 1$ 的表达没有影响,但它减量调节 $RAR\beta 2$ 的表达水平,这种现象也是神经突向外生长的前序。这表明所述 $RAR\beta$ 转录物可以被 $RAR\gamma/RXR$ 异二聚体调节。BDNF 依赖性神经元没有对 RA 应答的神经突向外生长的增加,也提示在所研究的胚胎阶段,在该类型的神经元中 $RAR\beta$ 受到的调节可能不同于在 NGF 依赖性神经元和 NT-3 依赖性神经元的 $RAR\beta$ 。

我们的结果表明,正是所述 RAR 途径的激活导致神经突向外生长,因为激活 RXR /孤独受体的 RXR 激动剂对神经突向外生长没有影响,而激活 RAR/RXR 异二聚体的所述 $RAR\beta$ 激动剂增加神经突向外生长的量。这提示,如果 NGF 通过利用例如 NGFI-B 而通过 RXR /孤独受体途径起作用,则在这些胚胎阶段中,这不直接负责神经突向外生长,而是它可能是神经元生存所需要的。有趣的是,在所述成体中,所述差别看来是真实的。NGF 不是神经元生存所需的,但它是神经突向外生长所需的(Lindsay, 1988)。因此,在发育中的神经突和成体再生神经突中,神经突向外生长可能有不同的机制。然而,在发育期间神经突向外生长中,绝对需要 RA。在维生素 A 缺乏的鹌鹑中,神经管不能将神经突延伸到外周中(Maden 等, 1996; Maden 等, 1998)。

这些神经元对 RA 和所述受体激动剂的差别反应对于其发育和/或生存需要类维生素 A 的胚胎组织和成体组织而言,可能具有某些重要性。为了激活不同的 RAR/RXR 和 RXR /孤独受体组合,在所述组织中可能存在不同的类维生素 A。有许多产生 RA 的酶在发育期间表现出局部化的表达(McCaffery 等, 1992; Drager 和 McCaffery, 1995; Godbout 等, 1996; Neiderreither 等, 1997; Ang 和 Duester, 1997), 并且这些酶中每种酶可能产生不同的类维生素 A, 这一事实提供了对这种

观点的某些支持。迄今已经发现几种新型类维生素 A, 例如在肠中发现的 5,6-环氧视黄酸(McCormick 等, 1978)、负责鼠胚胎 F9 细胞分化的生物活性代谢物的 4-氧代-视黄醇(Achkar 等, 1996)和在 B 淋巴细胞中发现的 14-羟基-4,14-倒视黄醇(retinoretinol) (Buck 等, 1991)。

因此, 所述胚胎能够通过合成不同的类维生素 A, 调节神经突向外生长的量。通过激活 RAR β 2/RXR 异二聚体, 可能发生神经突向外生长, 而通过激活 RAR γ /RXR 异二聚体, 可能终止神经突向外生长。另外, 神经突向外生长的量可能受视黄酸量的调节。例如, 在发育中的小鼠脊髓中, 在臂和腰增大过程中有高浓度的类维生素 A (McCaffery 和 Drager, 1994)。这可能是神经突必须通过大距离到达其最终目标的四肢神经支配的固有需要, 而在类维生素 A 浓度较低的胸区, 这类广泛的神经突向外生长可能不需要。

实施例 3 的附图说明

图 1 或者在 NGF、NT-3 或者 BDNF 存在下培养的 E13.5 小鼠胚胎 DRG 神经元的 RAR 和 RXR 的表达。在原位杂交中: **A-F**, NGF 神经元; **G-L**, NT-3 神经元; **M-R**, BDNF 神经元。表达: **A, G, M**, RAR α ; **B, H, N**, RAR β ; **C, I, O**, RAR γ ; **D, J, P**, RXR α ; **E, K, ,** RXR β ; **F, L, R**, RXR γ 。

图 2 RA 对来自 DRG 神经元的神经突向外生长的影响。DRG 神经元在或者 NGF、NT-3 或者 BDNF 存在下培养 2 天, 此时加入 1×10^{-7} M 全反式 RA。然后在总共 5 天后, 用 NF200 抗体检查它们的神经突向外生长。 **A**, NGF; **B**, NGF + 1×10^{-7} M RA; **C**, NT-3; **D**, NT-3 + 1×10^{-7} M; **E**, BDNF; **F**, BDNF + 1×10^{-7} M RA。

图 3 在有或没有 RA 的情况下培养的 DRG 神经元中 RAR α 同种型的表达。DRG 神经元在存在或者 NGF、NT-3 或者 BDNF 的情况下培养 2 天, 然后加入 1×10^{-7} M RA, 随后通过 RT-PCR 分析 RAR α 同种型的存在。对照不加入 RA。 **A**, 对照 NGF 神经元, 1-7 道; NGF

神经元 + 1×10^{-7} M RA, 8-14 道。B, 对照 NT-3 神经元, 1-7 道; NT-3 神经元 + 1×10^{-7} M RA, 8-14 道。C, 对照 BDNF 神经元, 1-7 道; BDNF 神经元 + 1×10^{-7} M RA, 8-14 道。泳道: 1 和 8, RAR α 1; 2 和 9, RAR α 2; 3 和 10, RAR α 3; 4 和 11, RAR α 4; 5 和 12, RAR α 5; 6 和 13, RAR α 6; 7 和 14, RAR α 7。

图 4 在有或没有 RA 的情况下培养的 DRG 神经元中 RAR β 同种型的表达。DRG 神经元在存在或者 NGF、NT-3 或者 BDNF 的情况下培养 2 天, 然后加入 1×10^{-7} M RA, 随后通过 RT-PCR 分析 RAR β 同种型的存在。对照不加入 RA。A, 对照 NGF 神经元, 1-4 道; NGF 神经元 + 1×10^{-7} M RA, 5-8 道。B, 对照 NT-3 神经元, 1-4 道; NT-3 神经元 + 1×10^{-7} M RA, 5-8 道。C, 对照 BDNF 神经元, 1-4 道; BDNF 神经元 + 1×10^{-7} M RA, 5-8 道。泳道: 1 和 5, RAR β 1; 2 和 6, RAR β 2; 3 和 7, RAR β 3; 4 和 8, RAR β 4。

图 5 在有或没有 RA 的情况下培养的 DRG 神经元中 RAR γ 同种型的表达。DRG 神经元在存在或者 NGF、NT-3 或者 BDNF 的情况下培养 2 天, 然后加入 1×10^{-7} M RA, 随后通过 RT-PCR 分析 RAR γ 同种型的存在。对照不加入 RA。A, 对照 NGF 神经元, 1-7 道; NGF 神经元 + 1×10^{-7} M RA, 8-14 道。B, 对照 NT-3 神经元, 1-7 道; NT-3 神经元 + 1×10^{-7} M RA, 8-14 道。泳道: 1 和 8, RAR γ 1; 2 和 9, RAR γ 2; 3 和 10, RAR γ 3; 4 和 11, RAR γ 4; 5 和 12, RAR γ 5; 6 和 13, RAR γ 6; 7 和 14, RAR γ 7。

图 6 RAR 和 RXR 激动剂对来自 DRG 神经元的神经突向外生长的影响。DRG 神经元在或者 NGF、NT-3 或者 BDNF 存在下培养 2 天, 此时将 1×10^{-7} M 的或者 CD366 (RAR α 激动剂)、CD2019 (RAR β 激动剂)、CD437 (RAR γ 激动剂) 或者 CD2809 (泛(pan)-RXR 激动剂) 加入培养基中。5 天时, 培养物的神经突向外生长用 NF200 抗体染色。A-D, NGF 型神经元; E-H, NT-3 型神经元; I-L, BDNF 型神经元。激动剂: RAR α A, E, I; RAR β B, F, J; RAR γ C, G, K; RXR D, H, L。

图7 类维生素 A 激动剂对来自以下的神经突长度的影响: A. NGF 型神经元; B. NT-3 型神经元; C. BDNF 型神经元。柱 1. 无激动剂, 2. RA, 3. RAR α , 4. RAR β , 5. RAR γ , 6. RXR。误差范围 s.e.m., n = 50。*p < 0.01。

图8 RAR γ 激动剂或 RAR β 激动剂对在 NGF 或 NT-3 存在下培养的 DRG 神经元中 RAR γ 1 和 RAR β 2 表达的表达影响。DRG 神经元在无血清培养基存在下培养。2 天后, 将 1×10^{-7} M RAR γ 或 RAR β 激动剂加入培养物中达 24 小时。RT-PCR 分析: A, RAR γ 1; B, NGF 型神经元(1-3 道)和 NT-3 型神经元(4-6 道)中的 RAR β 2 表达。泳道: 1、4 道, 无激动剂; 2、5 道, RAR γ 激动剂; 3、6 道, RAR β 激动剂。

总结

实施例证明: RAR β 2 和/或其激动剂可以用来引起神经突发育。

特别是, 我们表明特别是应用类维生素 A, 通过激活 RAR β 2, 刺激外周神经中神经突的再生。

当外周神经损害时可以发生某些再生, 这与表明不再生的中枢神经系统的神经不同。然而, 外周神经的再生是有限的, 特别是当有创伤性神经损伤时, 在所述损伤中神经组织损失, 使得产生再生中的神经突不能生长跨过的缺口。这种神经再生的延迟可以导致肌肉萎缩, 和导致永久性残废。

对外周神经损伤应答, 产生神经营养蛋白。有一个生长因子家族是多种神经元生存所需的。该家族包括神经生长因子(NGF)、神经营养蛋白-3 (NT-3)和脑源神经营养因子(BDNF)。人们希望神经营养蛋白可以用来治疗外周神经系统(PNS)损伤。然而, 所述结果一直没有得到支持。已经遇到两个主要问题, 首先是传递至所述损伤的问题, 其次是由于不同神经元需要不同的神经营养蛋白, 需要给予所述神经营养蛋白的混合剂以使所有所述神经再生。我们已经研究了神经营养蛋白如何刺激神经突再生。

我们已经发现：维生素 A 衍生物全反式视黄酸(tRA)与 NGF 一样，诱导来自各种胚胎来源包括 PNS 的神经突向外生长。tRA 的细胞效应通过与作为配体激活的转录因子的核受体结合而介导。有两类受体 - 视黄酸受体(RAR)和类维生素 A X 受体(RXR)，每类有 3 个亚型： α 、 β 和 γ 。RAR 受体通过与 RXR 形成异二聚体来介导基因表达，而 RXR 可以或者作为同二聚体或者通过与孤独受体形成异二聚体来介导基因表达。

我们已经发现：仅 RAR β 2 是我们已经培养的所有类型神经元的神经突向外生长所需的。此外，当将小鼠成体 DRG 在 NGF 和一个 tRA 合成抑制剂存在下培养时，不发生神经突向外生长。相反，当将 tRA 与 NGF 的封闭性抗体一起加入时，神经突向外生长如通常一样发生。我们也已经表明，NGF 诱导 tRA 合成酶 RALDH-2 和 RAR β 2 两者的转录以及合成的 tRA 的可检测释放。

我们提出：RAR β 2 的刺激是外周神经系统中神经突再生的固有需求，并且关键是这是位于所述神经营养蛋白的下游。因此，关于外周神经系统，我们要给予可以激活 RAR β 2 受体的类维生素 A，以让神经突再生。

我们已经将我们的观察扩展至中枢神经系统(CNS)。我们已经发现，胚胎脊髓表达 RAR β 2，并且其表达量与神经突向外生长的量相关。相反，成体脊髓不表达 RAR β 2，也不能再生神经突。我们已经表明，通过利用缺陷型 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)载体将 RAR β 2 转染到培养的成体脊髓中，我们已经将通常惰性的脊髓转化为可以延伸神经突的脊髓。因此，我们提出：用 RAR β 2 对损伤的脊髓进行基因治疗将导致功能恢复。

利用类维生素 A 治疗 PNS 损伤应该具有至少 3 个优于应用神经营养蛋白的主要优势。首先，类维生素 A 与神经营养蛋白不同，是亲脂小分子，它们可以容易地给予至损伤部位，因此再生应该以比用神经营养蛋白所达到的快得多的速率发生，这应该导致肌肉萎缩和随后

的麻痹的减少。其次，由于 RAR β 2 的刺激对于我们已经测试的所有神经元的再生是关键性的，仅需要一种类型的类维生素 A 将避开给予神经营养蛋白混合剂的需要。第三，与神经营养蛋白不同，类维生素 A 的合成相对容易。

用 RAR β 2 治疗 CNS 损伤的基因治疗应该导致功能恢复，并因此预防麻痹。

PNS 和 CNS 损伤的发生遍及全世界，不幸的是，这类损伤发生率将要降低是不可能的。在世界范围内，一年每百万人口 1000 个人患有脊髓损伤，10 倍于此数目的人患有某些种类的 PNS 损伤。

另外，在三个其它领域中类维生素 A 可能具有应用价值。在麻风病、糖尿病和 AIDS 中发生神经病(神经突死亡)，这与 PNS 损伤相同。在麻风和糖尿病中，已经表明在两种类型的患者皮肤中，都有导致疼痛感觉丧失的 NGF 的损失和可以导致溃疡发生的炎症。在 AIDS 患者中，感觉神经病是 HIV 感染的最常见的效应之一，已经用 NGF 来治疗这种疾病。

因此，我们提出：RAR β 2 激动剂可以用来治疗 PNS 损伤，包括与麻风病、糖尿病和 AIDS 相关的神经病。采用 RAR β 2 的基因治疗可以用来治疗 CNS 损伤。

总之，我们的结果表明通过 RAR β 2 的 RA 作用在来自某些神经元类别的神经突向外生长中的作用。

因此，本发明包括其中确定视黄酸受体 RAR β 2 表达影响细胞或组织的神经变性疾病的治疗方法。通过用 RAR β 2 受体的激动剂治疗或通过基因治疗，即插入编码该受体的核酸，可以达到这一目的。本发明也可以看作是将这些激动剂用于外周神经损伤和脊髓再生(例如在截瘫的情况下)的治疗药物中。

说明书中提及的所有出版物均通过引用结合到本文中。在不偏离本发明范围和精神情况下，本发明所述方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员是显而易见的。虽然本发明已经结合具体的优选

实施方案进行了描述，但应该理解，要求保护的本发明不应该被过分限制于这类具体实施方案。实际上，对于生物化学、生物技术、化学和相关领域的技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改，将属于以下权利要求书的范围内。例如，用 RAR β 2 拮抗剂的抑制剂取代某些或所有本发明的 RAR β 2 和/或某些或所有本发明的 RAR β 2 激动剂是可能的。

视黄酸一节的参考文献

1. Benbrook, D.; Lernhardt, E.; Pfahl, M.: 一种从肝细胞癌中鉴定的新的视黄酸受体。Nature 333: 669-672, 1988.
2. Brand, N.; Petkovich, M.; Krust, A.; Chambon, P.; de The, H.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A.: 第二种人视黄酸受体的鉴定。Nature 332: 850-853, 1988.
3. Dejean, A.; Bougueleret, L.; Grzeschik, K.-H.; Tiollais, P.: 在肝细胞癌中乙型肝炎病毒DNA整合到与 v-erb-A 基因和类固醇受体基因同源的序列中。Nature 322: 70-72, 1986.
4. de The, H.; del Mar Vivanco-Ruiz, M.; Tiollais, P.; Stunnenberg, H.; Dejean, A.: 视黄酸受体 β 基因中的一种视黄酸效应元件的鉴定。Nature 343: 177-180, 1990.
5. de The, H.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A.: 一种在人肝细胞癌中不当表达的新型类固醇甲状腺激素受体相关基因。Nature 330: 667-670, 1987.
6. Kreczel, W.; Ghyselinck, N.; Samad, T. A.; Dupe, V.; Kastner, P.; Borrelli, E.; Chambon, P.: 类维生素 A 受体突变小鼠中运动和多巴胺信号受损。Science 279: 863-867, 1998.
7. Lotan, R.; Xu, X.-C.; Lippman, S. M.; Ro, J. Y.; Lee, J. S.; Lee, J. J.; Hong, W. K.: 恶化前口腔损伤中视黄酸受体 β 的抑制以及 isotretinoin 对其的正调节。New Eng. J. Med. 332: 1405-1410, 1995.
8. Mattei, M.-G.; de The, H.; Mattei, J.-F.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A.: 人 hap 视黄酸受体 RAR β 基因定位至 3 号染色体的 p24 带上。Hum. Genet. 80: 189-190, 1988.
9. Mattei, M.-G.; Riviere, M.; Krust, A.; Ingvarsson, S.; Vennstrom, B.; Islam, M. Q.; Levan, G.; Kautner, P.; Zelent, A.; Chambon, P.; Szpirer, J.; Szpirer, C.: 在人类、小鼠和大鼠基因组中视黄酸受体(RAR)基因的染色体定位。Genomics 10: 1061-1069, 1991.
10. Nadeau, J. H.; Compton, J. G.; Giguere, V.; Rossant, J.;

Varmuza, S.: 视黄酸受体基因与同源框编码基因和角蛋白编码基因在小鼠 11 号和 15 号染色体的平行进化同源区段上紧密连锁. *Mammalian Genome* 3: 202-208, 1992.

11. Samad, A.; Kreczel, W.; Chambon, P.; Borrelli, E.: 类维生素 A 对多巴胺能途径的调节: 视黄酸受体-类维生素 A X 受体家族的多个成员激活 D2 受体启动子. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 14349-14354, 1997.

实施例 1 的参考文献

1. Lindsay, R. *J. Neurosci.* **8**, 2394-2405 (1988).
2. Quinn, S. D. P.和 De Boni, U. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27A**, 55-62 (1991).
3. Haskell, B. E., Stach, R. W., Werrbach-Perez, K.和 Perez-Polo, J. R. *Cell Tissue Res.* **247**, 67-73 (1987).
4. Rodriguez-Tebar, A.和 Rohrer, H. *Development* **112**, 813-820 (1991).
5. Wion, D., Houlgatte, R., Barbot, N., Barrand, P., Dicou, E.和 Brachet, P. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **149**, 510-514 (1987).
6. Kastner, P., Chambon, P.和 Leid, M. *Vitamin A in Health and Disease* (Blomhoff, R.编著) 189-238 (Dekker, New York, 1994).
7. Kliewer, S. A., Umesono, K., Evans, R. M.和 Mangelsdorf, D. J. *Vitamin A in Health and Disease* (Blomhoff, R.编著) 239-255 (Dekker, New York, 1994).
8. Mangelsdorf, D. J.和 Evans, R. M. *Cell* **83**, 841-850 (1995).
9. Millbrandt, J. *Neuron* **1**, 183-188 (1988).
10. McCaffery, P., Lee, M.-Q., Wagner, M. A., Sladek, N. E.和 Drager, U. *Development* **115**, 371-382 (1992).
11. Duester, G. *Biochemistry* **35**, 12221-12227 (1996).

12. Drager, U. C.和 McCaffery, P. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 第5卷 (Weiner, H.等编著) 185-192 (Plenum, New York, 1995).
13. Plum, L. A.和 Clagett-Dame, M. *Dev. Dynam.* **205**, 52-63 (1996).
14. Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y.-A.和 Schwab, M. E. *Nature* **367**, 170-173 (1994).
15. Schatzl, H. M. *Trends Neurosci.* **18**, 463-464 (1995).
16. Maden, M., Sonneveld, E., van der Saag, P. T.和 Gale, E. *Development* **125**, 4133-4144 (1998).

实施例 2 的参考文献

1. David, S.和 Agayo, A.J. 在成年大鼠中中枢神经系统损伤后轴突延伸到外周神经系统“桥”中。 *Science* **214**, 931-933 (1981).
2. Cheng, H., Cao, Y.和 Olsen, L. 成年截瘫大鼠中的脊髓修复: 后肢功能的部分恢复。 *Science* **273**, 510-513 (1996).
3. Schwab, M.E. CNS 创伤损伤后神经纤维的再生; 进展和问题。 *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **331**, 303-306 (1991).
4. Bregman, B.S.等 抗神经突生长抑制剂抗体介导的脊髓损伤的恢复。 *Nature* **378**, 498-501 (1995).
5. Schnell, L.等, 发育期间和成体脊髓损伤后神经营养蛋白-3 增强皮质脊髓束的萌发。 *Nature* **367**, 170-173 (1994).
6. Li, Y.等, 嗅成髓鞘细胞的移植物对成年大鼠皮质脊髓束的修复。 *Science* **277**, 2000-2002 (1997).
7. Kobayashi, N.R.等, BDNF 和 NT4/5 防止大鼠红核脊髓神经元颈轴突切开术后萎缩, 刺激 GAP-43 和 Tal 微管蛋白 mRNA 表达, 并且促进轴突再生。 *J. Neurosci.* **17**, 9583-9595 (1997).
8. Wagner, M.等, 通过体外报道分子分析检测到的胚胎神经组织

释放类维生素 A 的区域差异。 *Development* **116**, 55-66 (1992)。

9. Horton, C.和 Maden, M. 小鼠胚胎的正常发育和畸形发生期间类维生素 A 的内源分布。 *Dev. Dynam.* **202**, 312-323 (1995)。

10. McCaffery, P.和 Drager, U.C. 发育中的脊髓中视黄酸合成的热点。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7194-7197 (1994)。

11. McCaffery, P.和 Drager, U.C. 胚胎和成年脊椎动物中的视黄酸合成酶。 *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* **5** (H. Weiner 等编著) 第 173-183 页, Plenum Press, New York (1995)。

12. Yamamoto, M.等, 脉络丛对小脑发育的影响: 视黄酸合成的分析。 *Dev. Brain Res.* **93**, 182-190 (1996)。

13. Maden, M.等, 鸡胚中内源视黄酸的分布: 与发育机制有关。 *Development* **125**, 4133-4144 (1998)。

14. Maden, M.等, 维生素 A 缺乏的鹌鹑胚胎有半个后脑和其它神经缺陷。 *Current Biol.* **6**, 417-426 (1996)。

15. Maden, M.等, 维生素 A 在中枢神经系统发育中的作用。 *J. Nutr* **128**, 471S-475S (1998)。

16. Maden, M. 神经发育中的类维生素 A。 *Handbook of Experimental Pharmacology*. (H. Nau 和 W. S. Blaner 编著) Springer-Verlag, Heidelberg (1998) 待发表。

17. Maden, M.等, 作为神经元发育中趋化分子的视黄酸。 *Int. J. Devl. Neurosci.* **16**, 317-322 (1998)。

18. Kastner, P 等, 核视黄酸受体在基因表达调节中的作用。 *Vitamin A in Health and Disease*. (R. Blomhoff 编著) 第 189-238 页. Marcel Dekker Inc., New York (1994)。

19. Kliewer, S.A.等, 类维生素 A X 受体: 多种激素信号途径的调节剂。 *Vitamin A in Health and Disease*. (R. Blomhoff 编著) 第 239-255 页. Marcel Dekker Inc., New York (1994)。

20. Corcoran, J 和 Maden M. (1999), 神经生长因子通过视黄酸合

成起作用, 以刺激神经突向外生长。 *Nat. Neuroscience* **2**, 307-308.

21. Quinn, S.D.P.和 De Boni, U. 体外鼠类背根神经节以及胎鼠和人类脊髓的视黄酸增加神经元的再生。 *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27A**, 55-62 (1991).

22. Wuarin, L.和 Sidell, N. 脊髓神经元对视黄酸诱导的生存和分化的差别敏感性。 *Dev. Biol.* **144**, 429-435 (1991).

23. Ved, H.S.和 Pieringer, R.A. 单独的视黄酸和与甲状腺激素或氢化可的松协作的视黄酸对神经元分化的调节。 *Dev. Neurosci.* **15**, 49-53 (1993).

24. Corcoran, J.和 Maden, M. 神经生长因子通过视黄酸合成起作用, 刺激神经突向外生长。 *Nature Neurosci.* 待发表(1999).

25. Caroni, P.和 Schwab, M.E. 神经突生长抑制剂和少突胶质细胞在大鼠 CNS 中共同分布: 其出现在神经纤维生长之后但在髓鞘形成之前。 *Dev. Biol.* **136**, 287-295 (1989).

26. Notterpek, L.M.和 Rome, L.H., 在 CNS 髓鞘形成中轴膜作用的功能证据。 *Neuron* **13**, 473-485 (1994).

27. Smith, D.S.和 Skene, J.H.P. 转录依赖性开关控制成体神经元不同轴突生长模式的能力。 *J. Neurosci.* **17**, 646-658 (1997).

28. Lim, F., Hartley, D., Starr, P., Song, S., Lang, P., Yu, L., Wang, Y.M.和 Geller, A.I. 缺陷型疱疹衍生质粒载体的应用。 *Meth. Mol. Biol.* **62**, 223-232 (1997).

实施例 3 的参考文献

Achkar, C. C., Dergiuni, F., Blumberg, B., Langston, A., Levin, A.A., Speck, J., Evans, R.M., Bolado, J., Nakanishi, K., Buck, J.和 Gudas, L.J. (1996). 4-氧代视黄醇 - 一种新的天然配体和视黄酸受体的反式激活物。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4879-4884.

Ang, H.L.和 Duester, G. (1997). 原条小鼠胚胎中类维生素 A 信号

的起始: 受体和配体合成代谢酶的时空表达模式。 *Dev. Dynam.* **208**, 536-543.

Barde, Y. -A., Edgar, D.和 Thoenen, H. (1982).从哺乳动物脑中纯化一种新的神经营养因子。 *EMBO J.* **1**, 549-553.

Buck, J., Derguini, F., Levi, E., Nakanishi, K.和 Hammerling, U. (1991), 14-羟基-4,14-倒视黄醇发送胞内信号。 *Science* **254**, 1654-1656.

Campenot, R.B. (1977). 神经生长因子对神经突发育的局部控制。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4516-4519.

Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanini, M.P., Ling, L.H., McMahon, S.B., Shelton, D.L., Levinson, A.D.和 Phillips, H.S. (1994). 缺乏神经生长因子的小鼠表现出围产期感觉丧失, 而交感神经元仍发育基底前脑胆碱能神经元。 *Cell* **76**, 1001-1012.

Corcoran, J 和 Maden M. (1999). 神经生长因子通过视黄酸合成起作用以刺激神经突向外生长。 *Nat. Neuroscience* **2**, 307-308.

Drager, U.C.和 McCafery, P. (1995). 正发育的脊髓中视黄酸的合成。 *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. **5** (H. Weiner 等编著) 185-192 (Plenum Press, New York).

Ernfors, P, Lee, K, Kucera, J.和 Jaenisch, R. (1994). 神经营养蛋白-3 的缺乏导致外周神经系统的缺陷和四肢本体感受传入的丧失。 *Cell* **77**, 503-512.

Farinas, I., Jones, K.R., Backus, C., Wang, X-Y.和 Reichardt, L.F. (1994). 缺乏神经营养蛋白-3 的小鼠中严重的感觉缺陷和交感缺陷。 *Nature* **369**, 658-661.

Godbout, R., Packer, M., Poppema, S.和 Dabbath, L. (1996). 胞质醛脱氢酶在正发育的鸡视网膜中的定位: 原位杂交和免疫组织化学分析。 *Dev. Dynam.* **205**, 319-331.

Jones, K.R, Farlinas, I, Backus, C.和 Reichardt, L.F. (1994). BDNF 基因的定向破坏干扰脑和感觉神经元发育、但不干扰运动神经元的发育。 *Cell* **76**, 989-999.

Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R.J., Lira, S.A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W.D.和 Barbacid, M. (1994). 神经营养蛋白-3 受体基因 *trkC* 的破坏消除了 1a 肌肉传入并导致异常运动。 *Nature* **368**, 249-251.

Klein, R., Smeyne, R.J., Wurst, W., Long, L.K., Auerbach, B.A., Joyner, A.L.和 Barbacid, M. (1993). *trkB* 神经营养蛋白受体基因的定向破坏导致神经系统损伤和新生儿死亡。 *Cell* **75**, 113-122.

Kastner, P., Chambon, P.和 Leid, M. (1994). 核视黄酸受体在基因表达调节中的作用。 *Vitamin A in Health and Disease*. (R. Blomhoff 编著) 第 189-238 页. Marcel Dekker Inc., New York.

Kliwer, S.A., Umesono, K., Evans, R.M.和 Mangelsdorf, D.J. (1994). 类维生素 A X 受体: 多种激素信号途径的调节剂。 *Vitamin A in Health and Disease*. (R. Blomhoff 编著) 第 239-255 页. Marcel Dekker Inc., New York.

Leid, M., Kastner, P.和 Chambon, P. (1992). 在视黄酸信号途径中多重性产生多样性。 *Trends Biol. Sci.* **17**, 427-433.

Levi-Montalcini, R. 神经生长因子: 35 年后。 *Science* **237**, 1154-1164 (1987).

Lindsay, R. (1998) 神经生长因子(NGF, BDNF)增强轴突再生、但不是成体感觉神经元的生存所需的。 *J. Neurosci.* **8**, 2394-2405.

Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I.和 Zile, M. (1996). 维生素 A 缺乏的鹌鹑胚胎有半个后脑和其它神经缺陷。 *Current Biol.* **6**, 417-426.

Maden, M. 神经发育中的类维生素 A。 *Handbook of Experimental Pharmacology*. (H. Nau 和 W.S. Blaner 编著) Springer-Verlag, Heidelberg (1998) 待发表。

Maden, M., Gale, E.和 Zile, E. (1998). 维生素 A 在中枢神经系统发育中的作用。 *J. Nutr* **128**, 471S-475S.

Maden, M., Sonneveld, E., van der Saag, P.T.和 Gale, E. (1998). 鸡胚中内源视黄酸的分布: 与发育机制有关。 *Development* **125**, 待发表。

Mangelsdorf, D.J.和 Evans, R.M. (1995). RXR 异二聚体和孤独受体。 *Cell* **83**, 841-850.

Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M.和 Yancopoulos, G.D. (1990). 神经营养蛋白-3: 一种与 NGF 和 BDNF 相关的神经营养因子。 *Science* **247**, 1446-1451.

McCaffery, P.和 Drager, U.C. (1994). 发育中的脊髓中视黄酸合成的热点。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7194-7197.

McCaffery, P., Lee, M.-O., Wagner, M.A., Sladek, N.E.和 Drager, U. (1992). 视网膜背腹轴中的不对称视黄酸合成。 *Development* **115**, 371-382.

McCormick, A. M., Napoli, J. L., Schnoes, H. K.和 Deluca, H. F. (1978). 视黄酸的一种生物活性代谢物 5,6-环氧视黄酸的分离和鉴定。 *Biochemistry* **17**, 4084-4090.

Millbrandt, J. (1989). 神经生长因子诱导与糖皮质激素受体基因同源的基因。 *Neuron* **1**, 183-188.

Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U.C., Chambon, P.和 Dolle, P. (1997). 小鼠发育期间 2 型视黄醛脱氢酶(RALDH-2)基因的限制表达和视黄酸诱导的减量调节。 *Mech of dev* **62**, 67-68.

Quinn, S.D.P.和 De Boni, U. (1991). 体外鼠类背根神经节以及胎鼠和人类脊髓的视黄酸增加神经元的再生。 *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27A**, 55-62.

Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A.和 Barbacid, M. (1994). 带有被破坏的 trk/NGF 受体基因的小鼠中严重的感觉和交感神经病。 *Nature* **368**, 246-249.

Snider, W.D. (1994). 神经系统发育期间神经营养蛋白的功能: 所述失效告诉我们什么。 *Cell* **77**, 627-638.

Tuttle R.和 Mathew, W.D. (1995). 在提供 CNS 和 PNS 底物选择的生物测定中神经营养蛋白影响 DRG 神经突生长的模式。 *Development* **121**, 1301-1309.

Wuarin, L.和 Sidell, N. (1991). 脊髓神经元对视黄酸诱导的生存和分化的差别敏感性。 *Dev. Biol.* **144**, 429-435.

序列

RAR α 反向链引物: 535 ttagctctctgagcactc 517
RAR α 1 正向链引物 648 tacgccttcttcttcccc 666
RAR α 2 正向链引物 376 ctttataaccagaaccgggc 396
RAR α 3 正向链引物 111 caagtagaagccaggaaagtc 131
RAR α 4 正向链引物 3 ctaagaagacccacacttctg 23
RAR α 5 正向链引物 30 aagtgaggtgaaaactggg 48
RAR α 6 正向链引物 42 ttcacagcctggcataac 59
RAR α 6 正向链引物 24 gagaaggaagtgagccatc 42
RAR β 反向链引物 508 tctctgtgcattcctgcttg 488
RAR β 1 正向链引物 180 tggacacatgactcactacc 199
RAR β 2 正向链引物 598 atgttctgtcagtgagtccc 617
RAR β 3 正向链引物 457 gcatgtcagaggacaactg 475
RAR β 4 正向链引物 21 agcctggaaaatgccatc 38
RAR γ 反向链引物 481 ttacagcttccttgacatgcc 460
RAR γ 1 正向链引物 119 agatgtgagccctagcttc 138
RAR γ 2 正向链引物 73 ttactacgcagagccactgg 92
RAR γ 3 正向链引物 169 ggaagatggaagagggaac 187
RAR γ 4 正向链引物 230 caaatttactgggggttg 248
RAR γ 5 正向链引物 18 ggctggattttgattgaag 37
RAR γ 6 正向链引物 329 ttctgtcctctcactaccttg 350
RAR γ 7 正向链引物 85 cattaccgcgagtcactaac 104

GAPDH

正向引物 37 cgtagacaaaatggtgaagg 56

反向引物 333 gactccacgacatactcagc 314

RALDHII

正向引物 1190 gcttcttcattgaccac 1208

反向引物 1539 cttcacgctcaggtctttac 1519

RXR α

正向引物 745 gcaaggaccggaatgagaac 764

反向引物 994 tctaggggcagctcagaaaag 974

RXR β

正向引物 1910 agaataaaggggtagtgaagg 1930

反向引物 2176 catcaatgtccccacttg 2159

RXR γ

正向引物 713 tgccagtagtagccacgaag 732

反向引物 966 tgagcagttcattccacc 948

<110> King's College London

<120> 因子

<130> 申请号: PCT/GB00/01211

<140>

<141>

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 1

tgtagctctc tgagcactc

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 2

tacgccttct tctttcccc

19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 3

cttttataac cagaaccggg c

21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 4
caagtagaag ccaggaaagt c 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 5
ctaagaagac ccacattct g 21

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 6
aagtgaggtg aaaactggg 19

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 7
ttcacagcct ggcataac 18

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 8

gagaaggaag tgagccatc

19

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 9

tctctgtgca ttctgtctt g

21

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 10

tggacacatg actcactacc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 11

atgttctgtc agtgagtccc

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 12

gcatgtcaga ggacaactg	19
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 13	
agcctggaaa atgccatc	18
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 14	
ttacagcttc cttggacatg cc	22
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 15	
agatgctgag ccctagcttc	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 16	
ttactacgca gagccactgg	20
<210> 17	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 17

ggaagatgga agagggaac

19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 18

caaatttact gggggttg

19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 19

ggctggattt tggattgaag

20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 20

ttctgtcctc tcactacett gg

22

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 21 cattaccgcg agtcactaac	20
<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 22 cgtagacaaa atggtgaagg	20
<210> 23 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 23 gactccacga cataactcagc	20
<210> 24 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 24 gcttcttcat tgacccac	18
<210> 25 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 25 cttcaccgtc aggtctttac	20
<210> 26 <211> 20	

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 26

gcaaggaccg gaatgagaac

20

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 27

tctaggggca gctcagaaaa g

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 28

agaataaagg ggtagtgaag g

21

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 29

catcaatgtc cccacttg

18

<210> 30

<211> 20

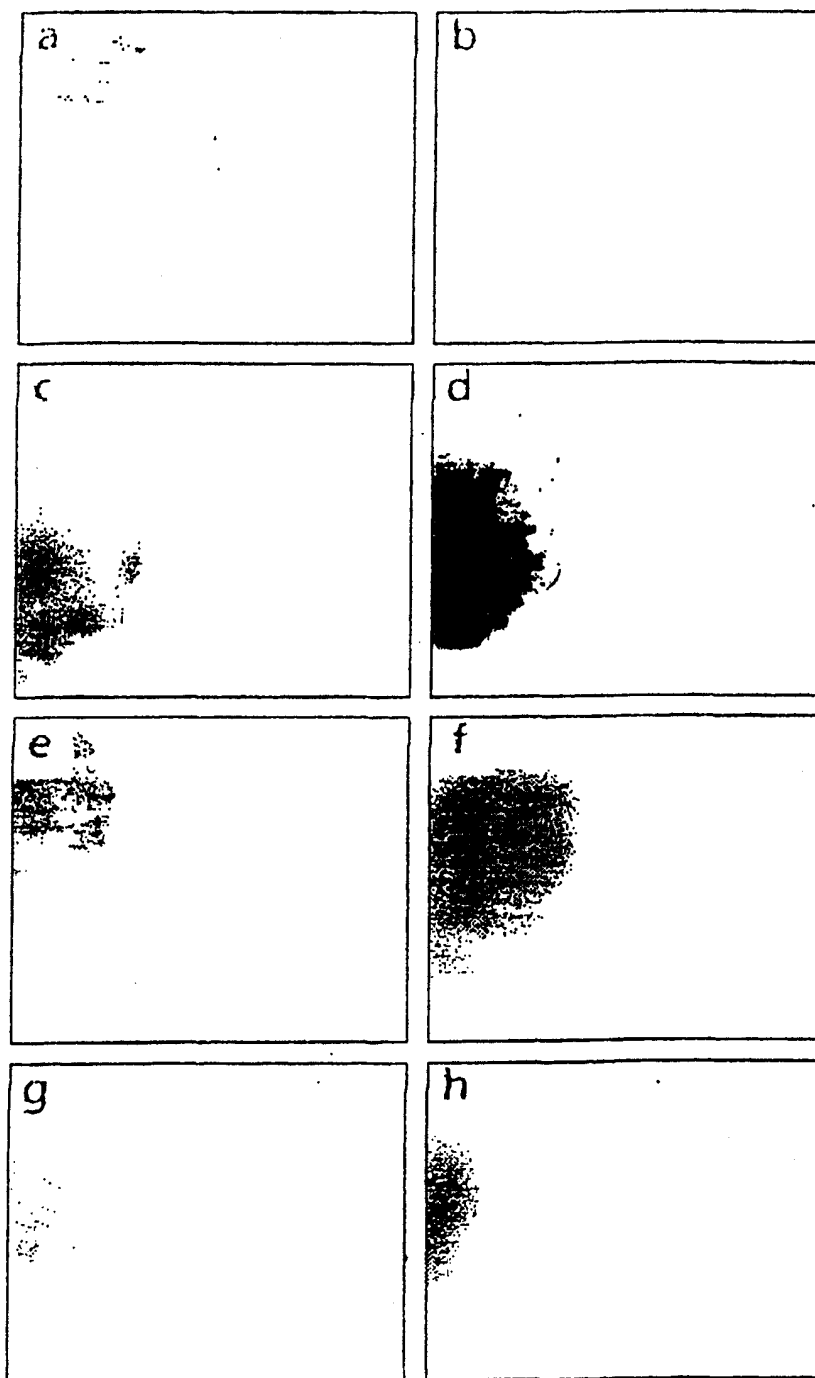
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

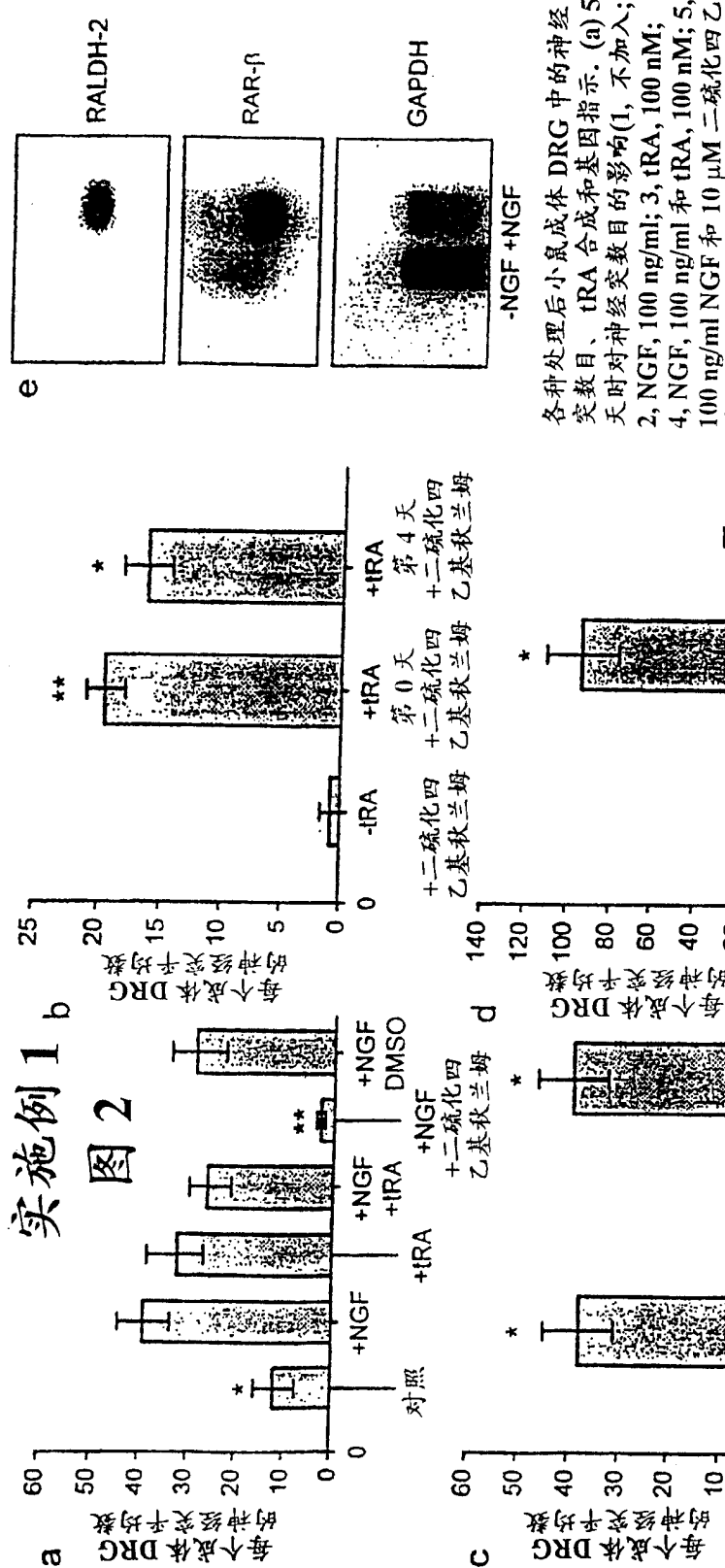
<400> 30	
tgccagtagt agccacgaag	20
<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物	
<400> 31	
tgagcagttc attccaccc	19



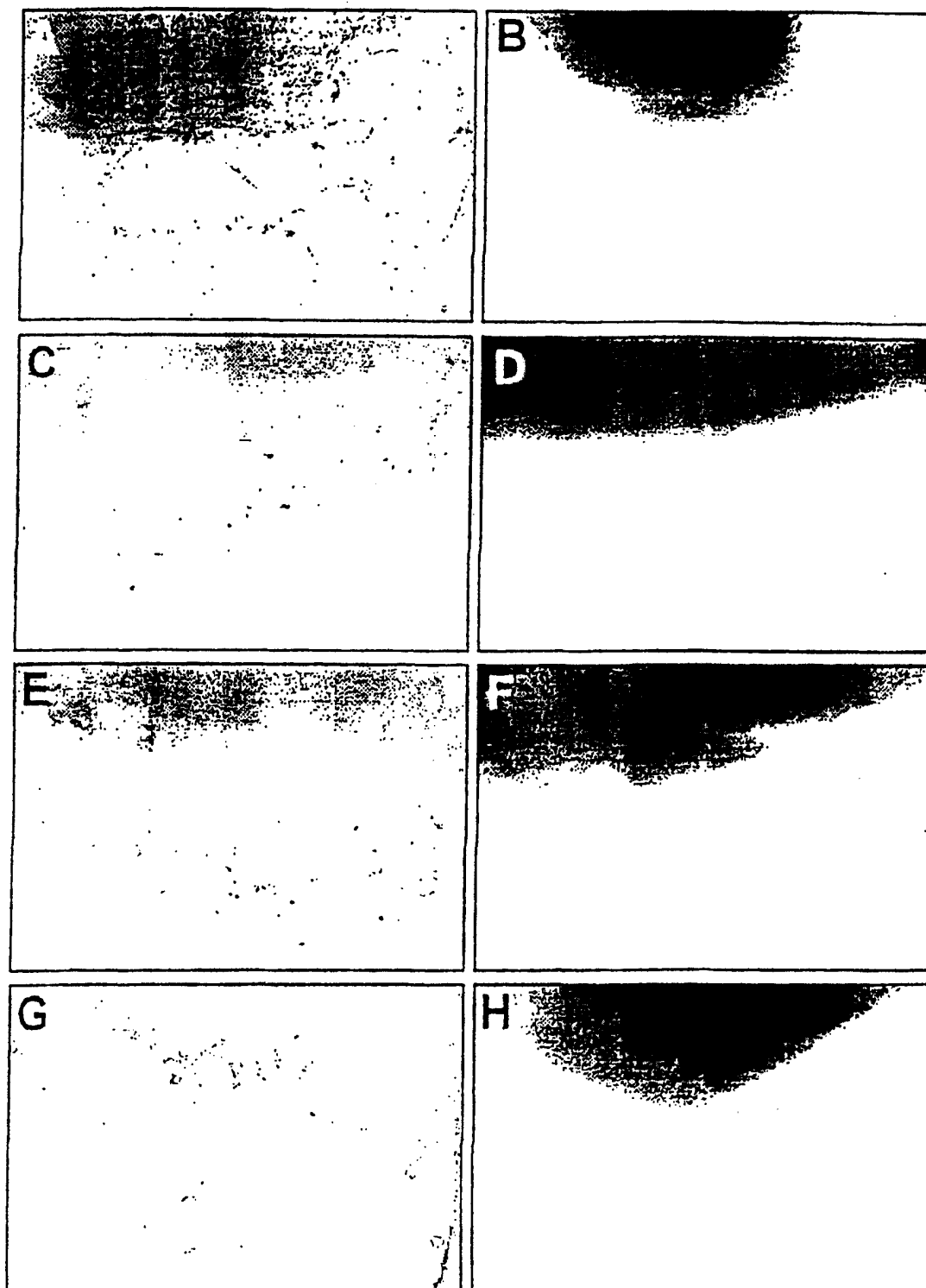
小鼠成体 DRG 中的神经突向外生长. 细胞在去脂血清加以下物质存在下培养 5 天(a-d, g, h) 或 8 天(e, f): (a) 不加入; (b) NGF, 100 ng/ml; (c) NGF 和 100 nM tRA; (d) NGF 和 10 μ M 二硫化四乙基秋兰姆; (e) 在第 0 天加入的二硫化四乙基秋兰姆和 tRA; (f) 二硫化四乙基秋兰姆; (g) NGF 和封闭性抗体; 或(h) NGF 封闭性抗体和 tRA.

实施例 1

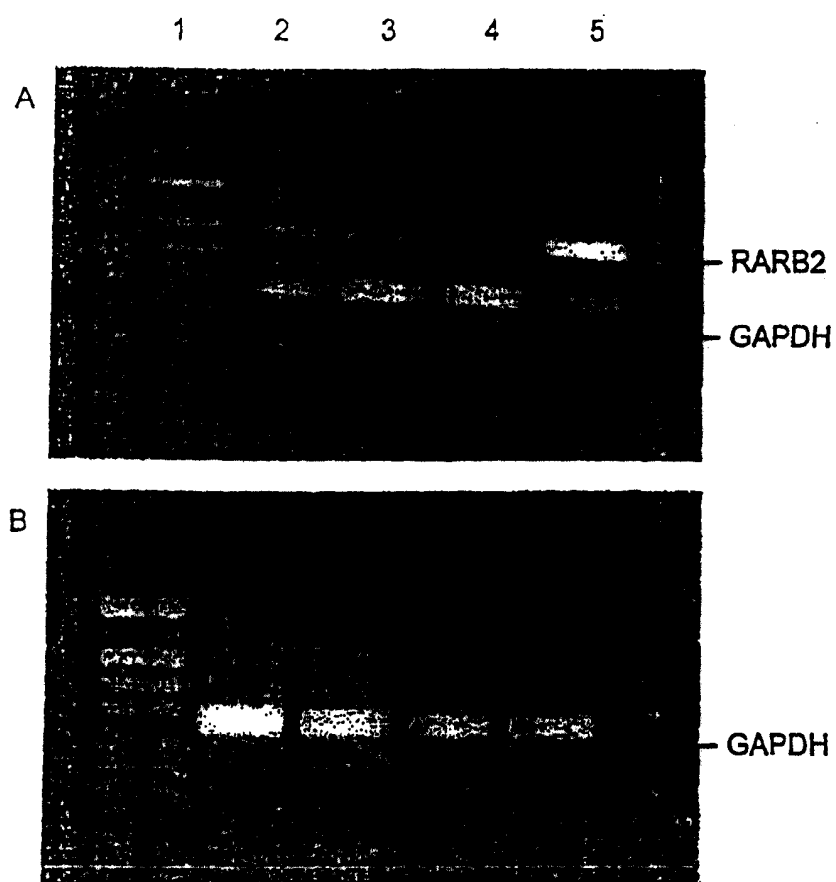
图 1



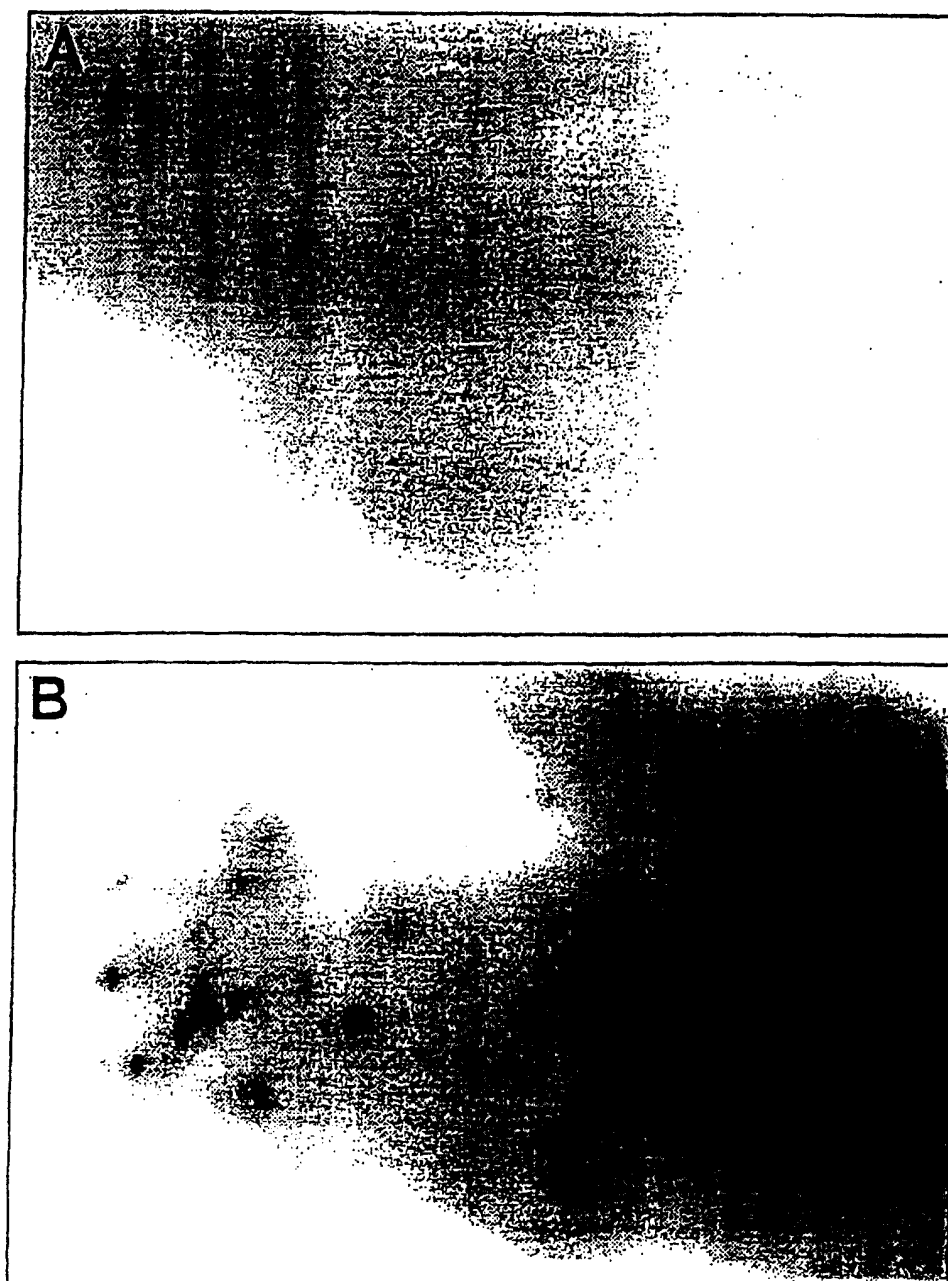
各种处理后小鼠成体 DRG 中的神经突数目、tRA 合成和基因指示。(a) 5 天对神经突数目的影响(1, 不加入; 2, NGF, 100 ng/ml; 3, tRA, 100 nM; 4, NGF, 100 ng/ml 和 tRA, 100 nM; 5, 100 ng/ml NGF 和 10 μ M 二硫化四乙基秋兰姆; 6, NGF, 100 ng/ml 和 DMSO)。误差范围, s.e.; n = 6, 与 NGF 相比, *p < 0.01; **p < 0.0001, Student t-检验。(b) 用 10 μ M 二硫化四乙基秋兰姆处理的 DRG 拯救(从左至右: 无 tRA; 100 nM tRA, 第 0 天; 100 nM tRA, 第 4 天)。误差范围, s.e.; n = 6, 与无 tRA 相比, *p < 0.01; **p < 0.0001; Student t-检验。(c) NGF 封闭性抗体对 5 天 DRG 培养物的影响。左, NGF, 100 ng/ml; 中, NGF 加封闭性抗体; 右, 封闭性抗体加 100 nM tRA。误差范围, s.e.; n = 6, 与 NGF + α -NGF 相比, *p < 0.01; Student t-检验。(d) 培养物 DRG 应答的 β -半乳糖苷酶阳性 F9 细胞百分比的增加。左, 不加入; 中, NGF, 100 ng/ml; 右, NGF 加封闭性抗体。在三个单独的视野中对细胞计数, 将该实验重复 3 次。误差范围, s.e.; n = 9, 与无 tNGF 相比, *p < 0.025, Student t-检验。(e) 用或不用 NGF (100 ng/ml) 培养 5 天的成体 DRG 中 RALDH-2 酶和 RAR β 表达的 RT-PCR 分析。用 GAPDH 来指示两种样品中 cDNA 的存在。



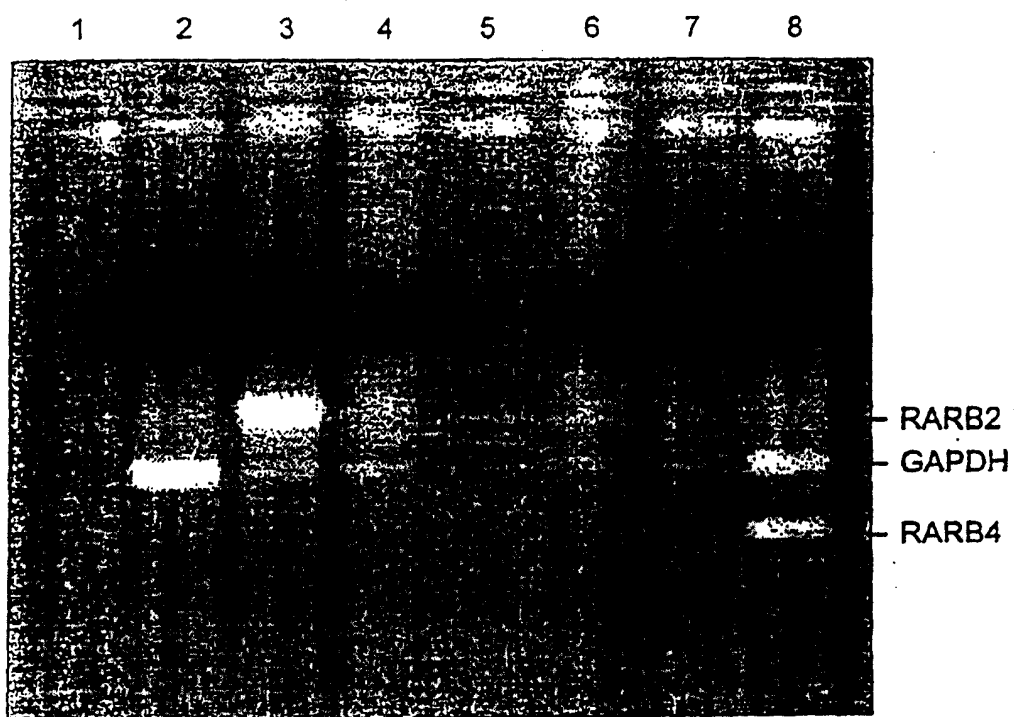
实施例 2
图 1



实施例 2
图 2

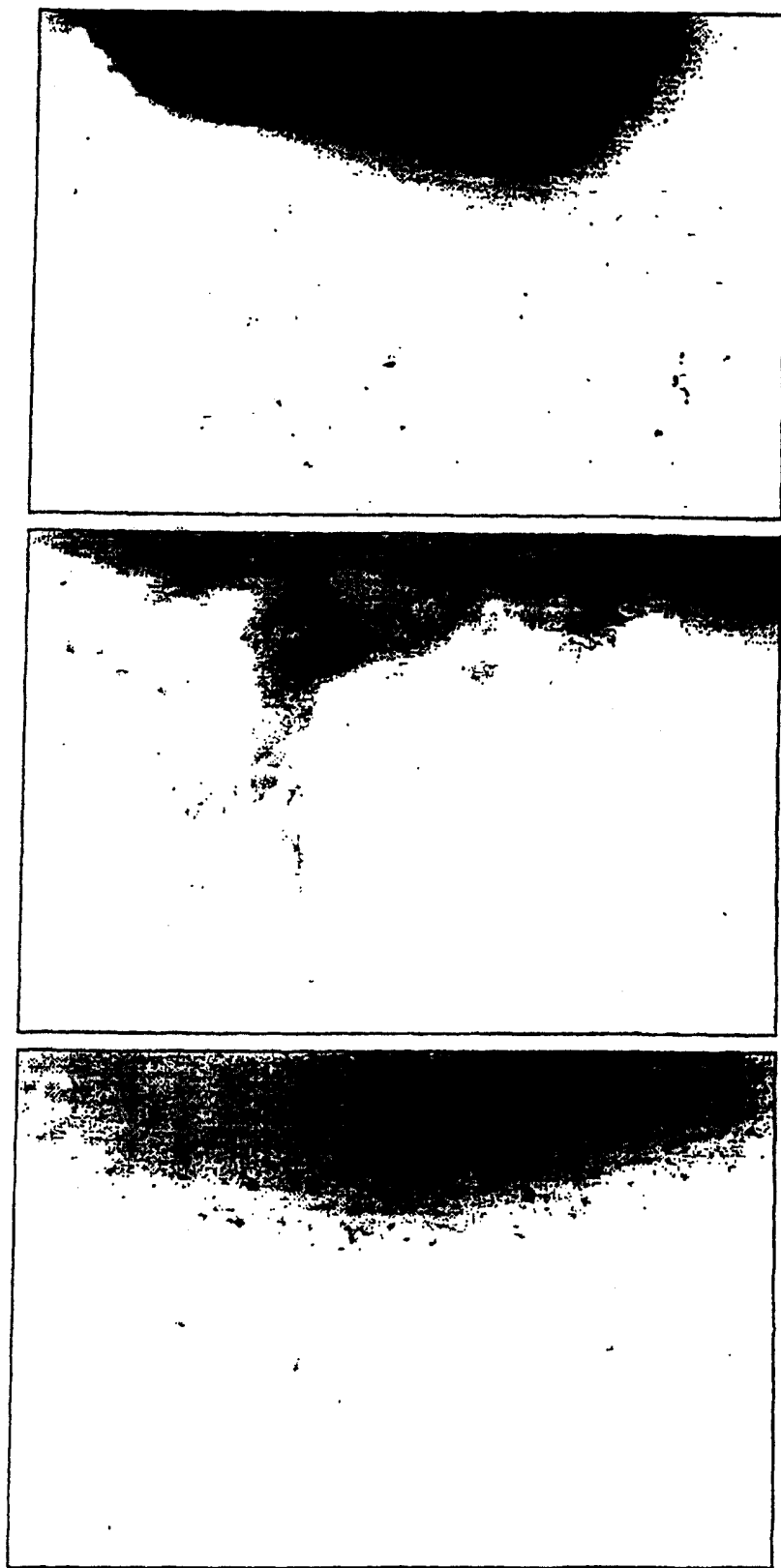


实施例 2
图 3

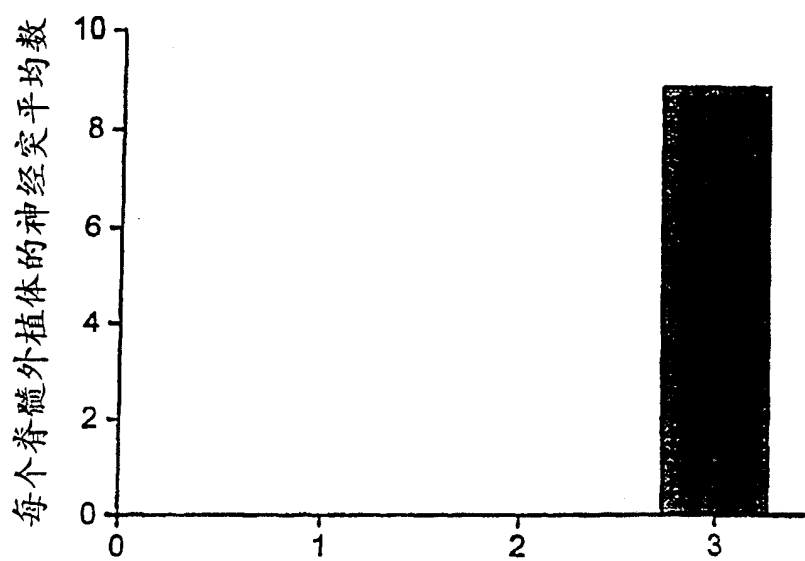


实施例 2

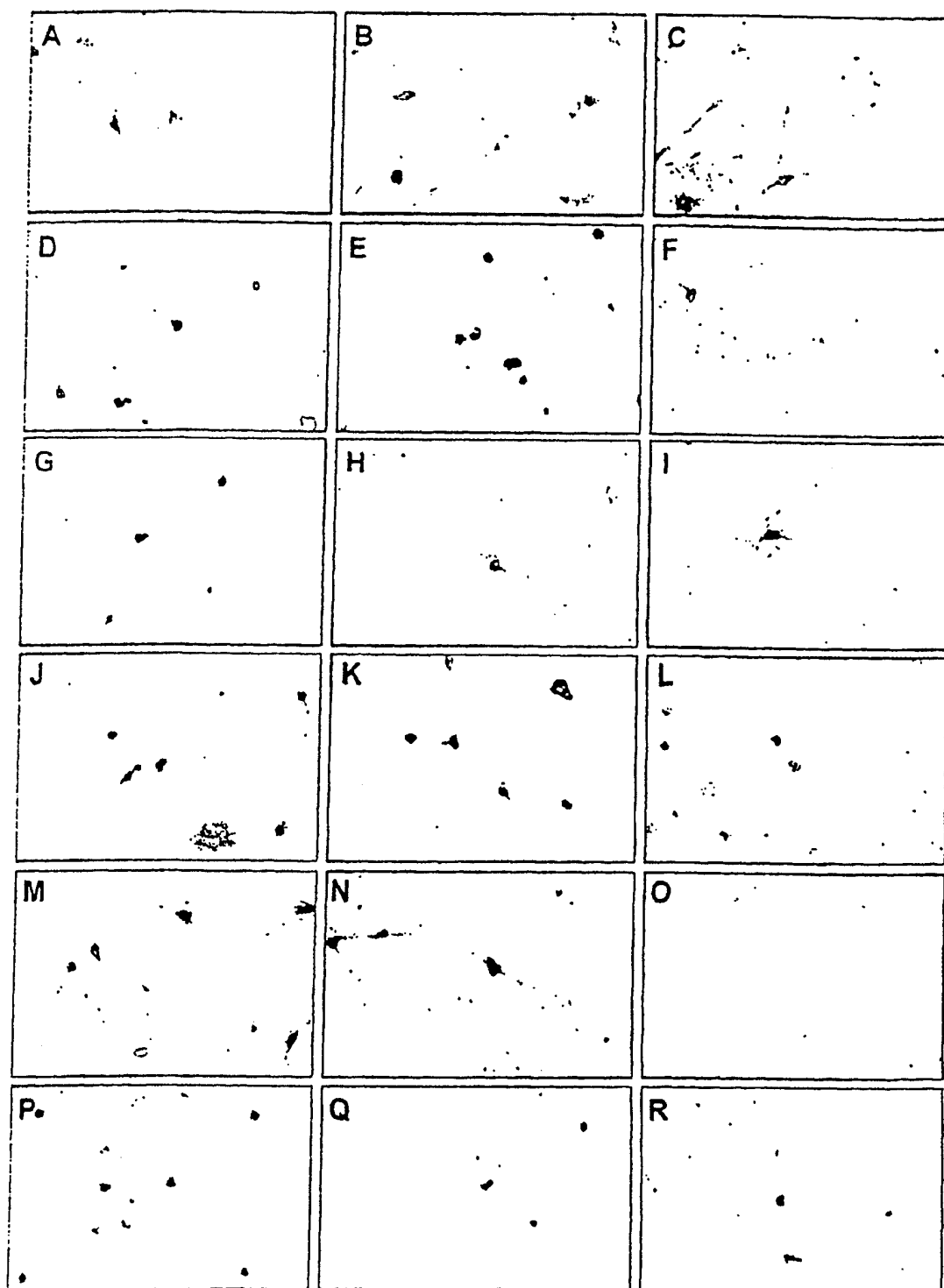
图 4



实施例 2
图 5

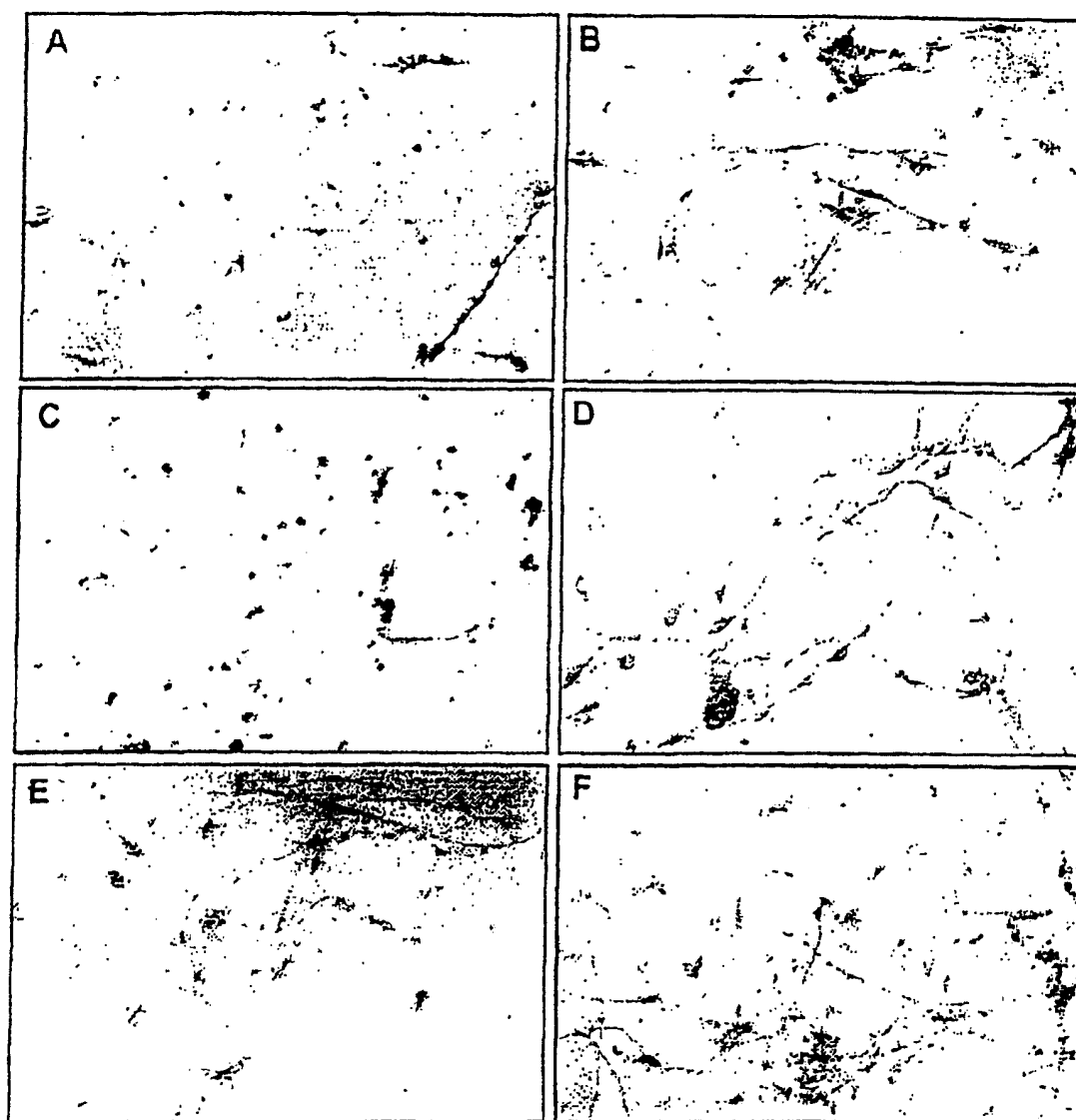


实施例 2
图 6



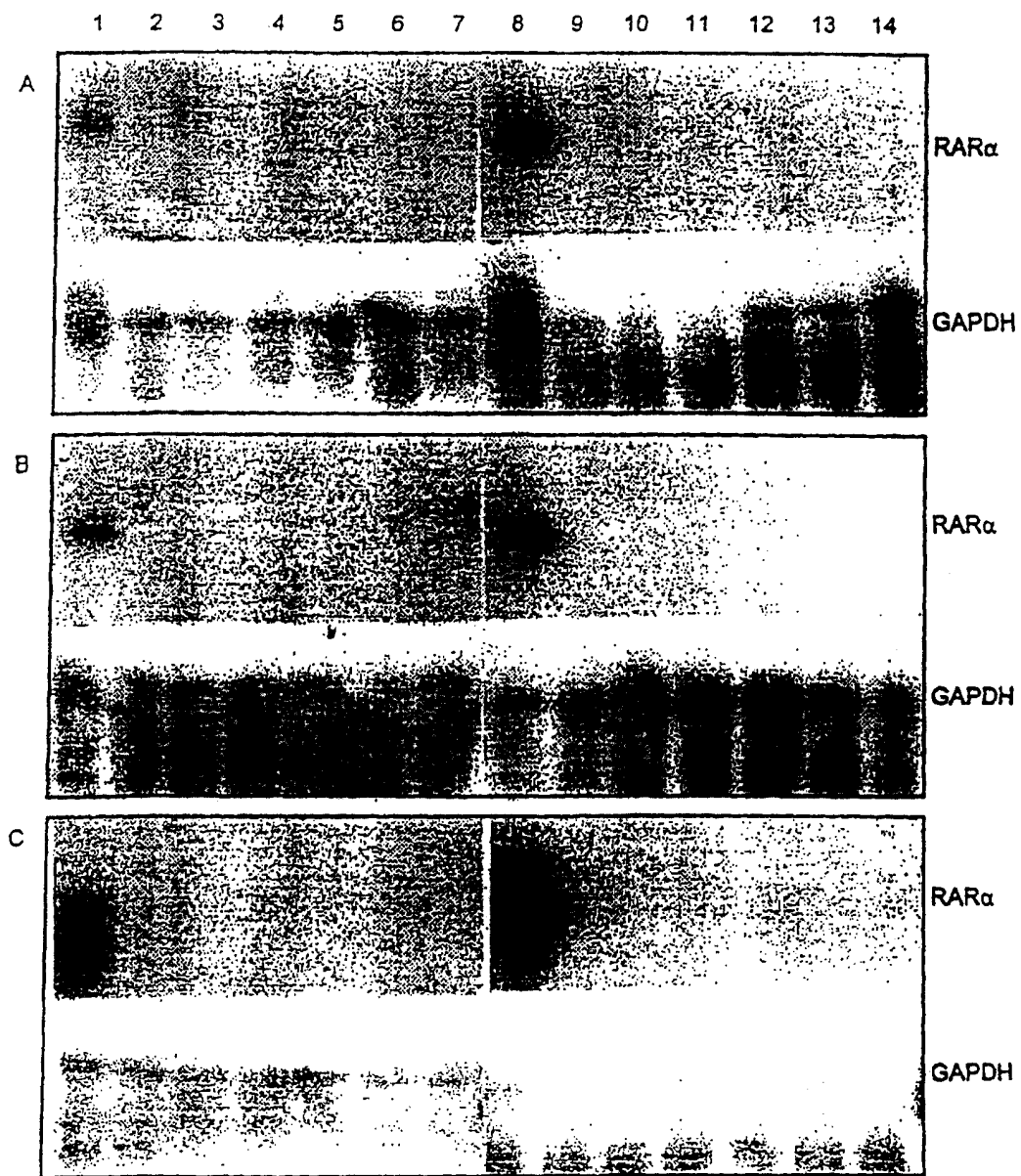
实施例 3

图 1

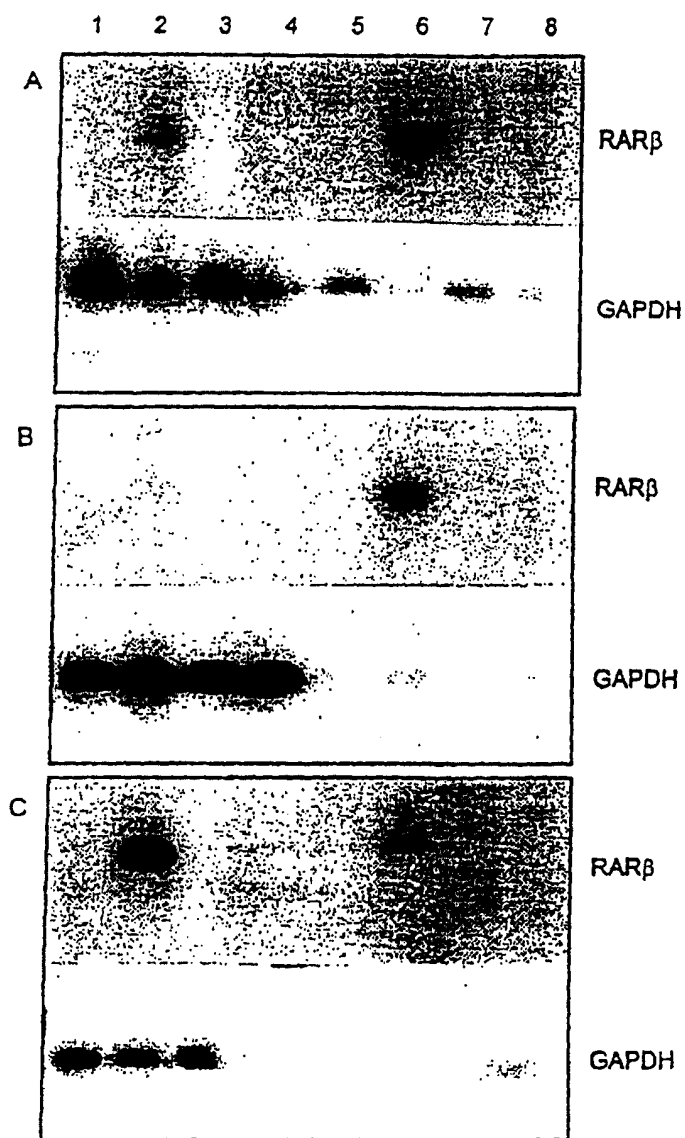


实施例 3

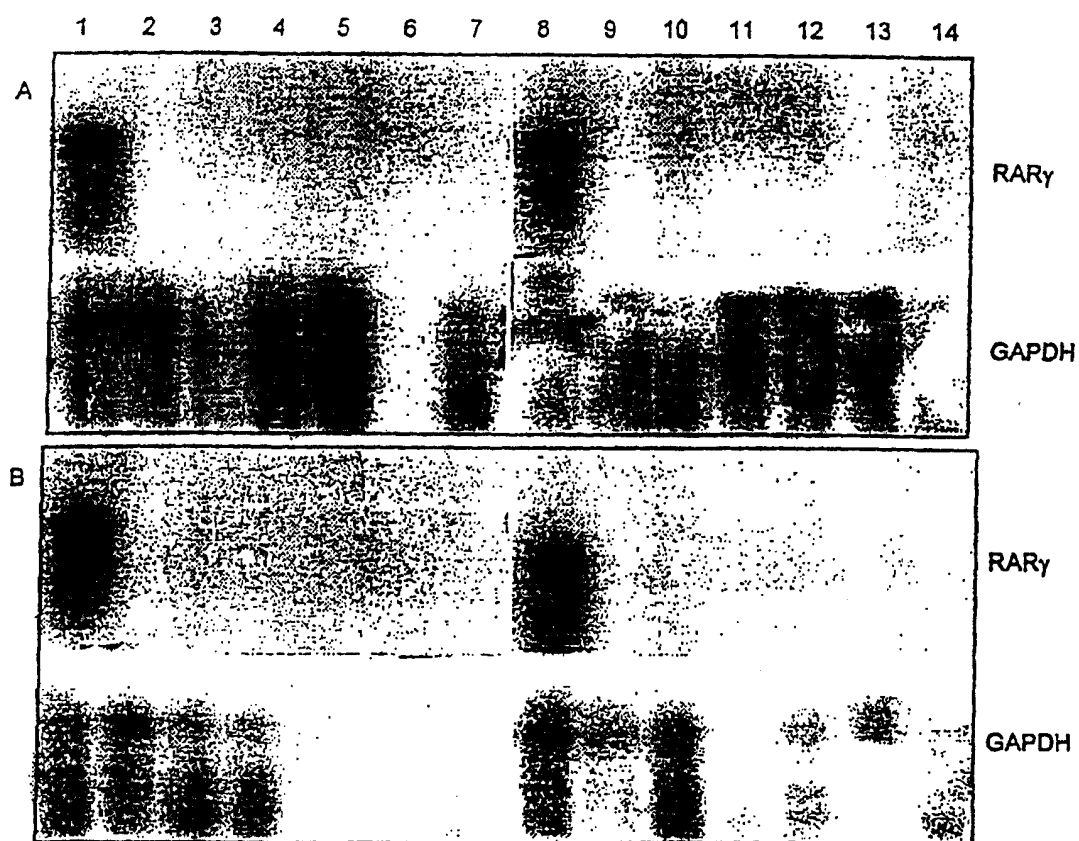
图 2



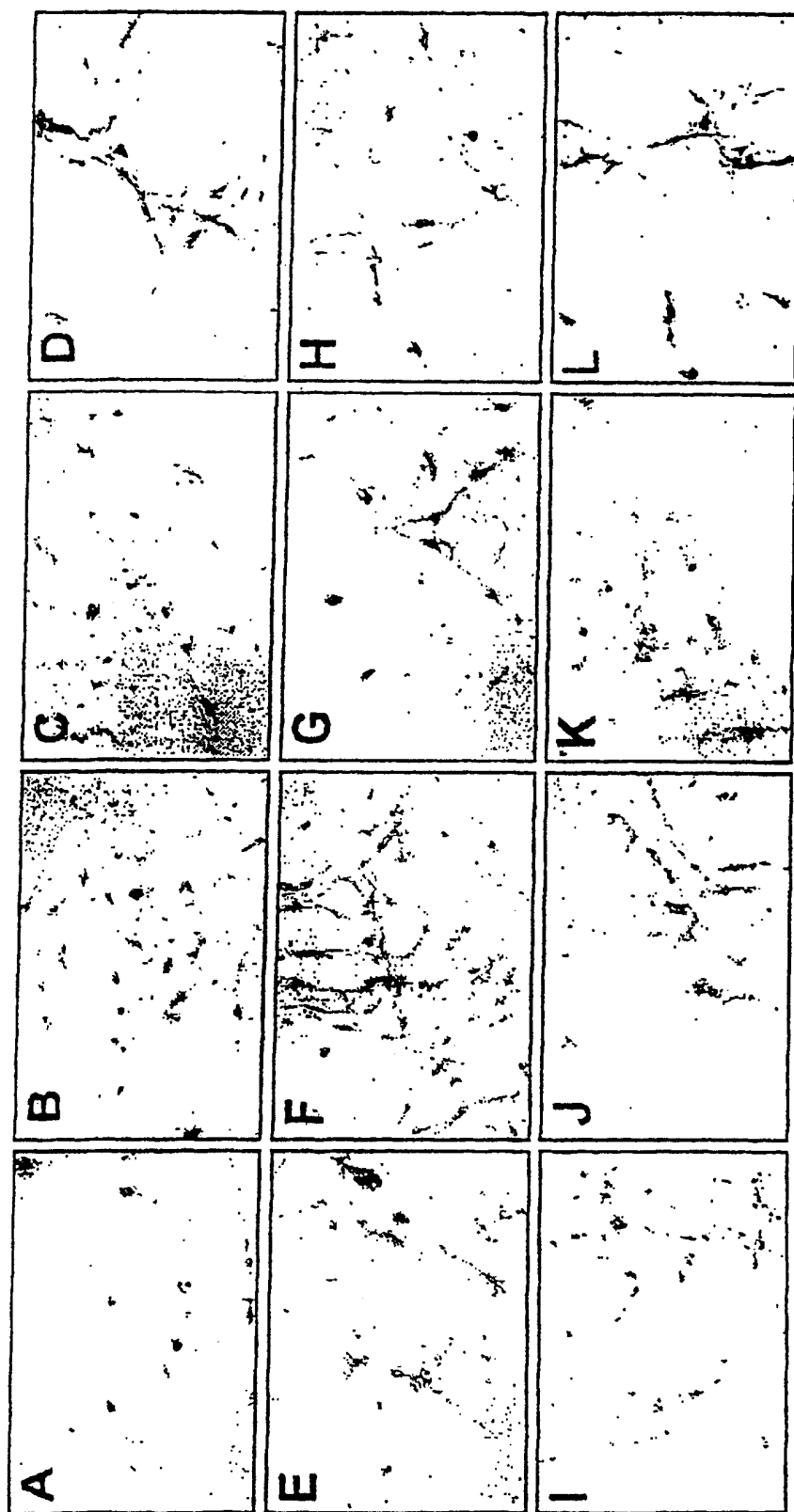
实施例 3
图 3



实施例 3
图 4

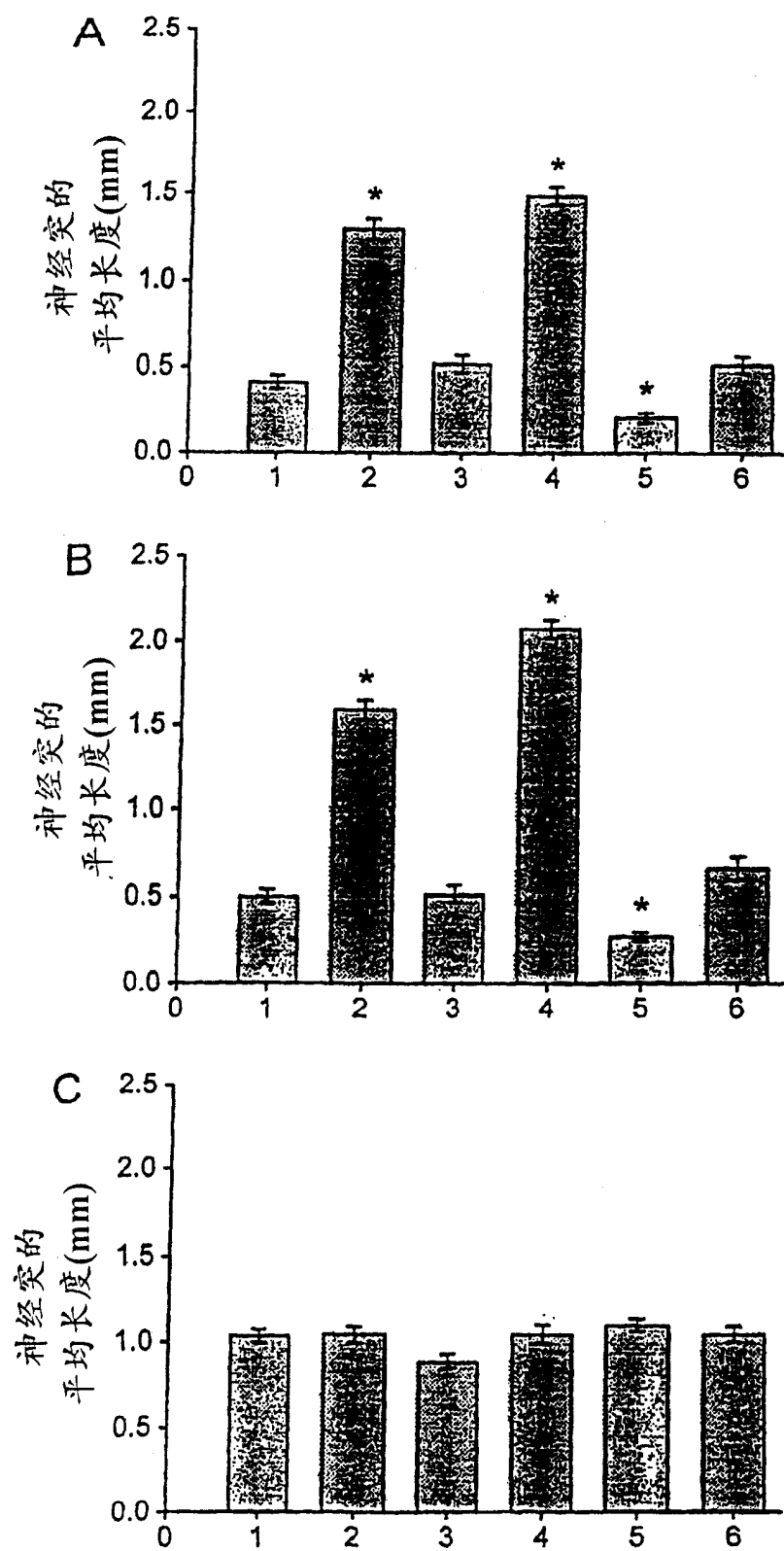


实施例 3
图 5



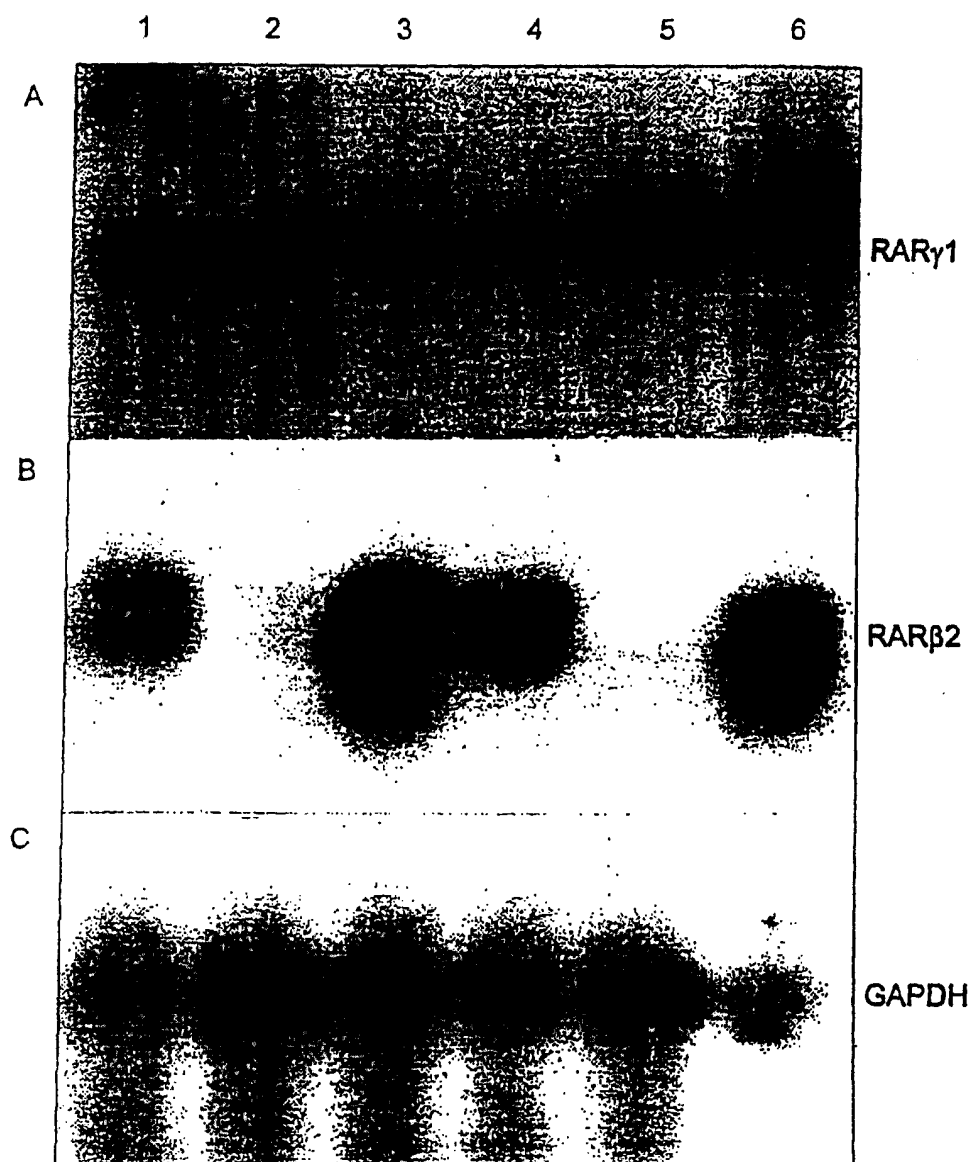
实施例 3

图 6



实施例 3

图 7



实施例 3

图 8

