

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00810917.6

[43]公开日 2002 年 8 月 21 日

[11]公开号 CN 1365285A

[22]申请日 2000.5.26 [21]申请号 00810917.6

[30]优先权

[32]1999.5.27 [33]FI [31]991197

[86]国际申请 PCT/FI00/00476 2000.5.26

[87]国际公布 WO00/72871 英 2000.12.7

[85]进入国家阶段日期 2002.1.28

[71]申请人 莱森西亚有限公司

地址 芬兰赫尔辛基

[72]发明人 M·萨尔马 A·M·劳里凯宁

J·O·希尔图宁 M·S·埃拉克斯宁

E·M·克林格

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

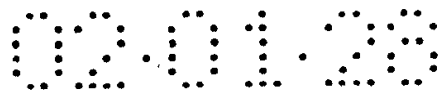
权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图页数 16 页

[54]发明名称 神经营养因子在骨盆神经丛外周神经功能障碍的治疗中的应用

[57]摘要

本发明涉及治疗在骨盆区域患有外周神经功能障碍的病人的方法,上述外周神经功能障碍是由于神经病,糖尿病,急性阴茎损伤,阴茎外科手术,前列腺外科手术,膀胱外科手术或任何其它骨盆外科手术所导致的。本发明公开了神经营养因子,如它们和它们的保守取代变体,在生产医药产品中的应用,上述医药产品作为营养支持被用于治疗患者,例如,上述的功能障碍,包括但不限于勃起功能障碍的病人。神经营养因子包括所述蛋白,编码上述蛋白的核苷酸序列,它们的受体,结合底物和调节因子。

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 一种治疗患有外周神经功能障碍的病人的方法，其特征在于通过单独施用或以任何组合形式施用至少一种神经营养因子或其保守取代的变体，给需要治疗的病人提供作为刺激或抑制营养支持的医药产品。

2. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述神经营养因子包括神经胶质细胞系源的神经营养因子（GDNF）家族相关的化合物或神经营养蛋白，它们的受体，它们的结合底物和 / 或编码上述因子以及其任何功能部分的核苷酸序列。

3. 权利要求 1 中的方法，其特征在于 GDNF 家族相关的化合物包括 neurturin(NTN)，神经胶质细胞源的神经营养因子（GDNF），artemin(ARTN)和 / 或 persephin(PSPN)。

4. 权利要求 1 中的方法，其特征在于神经营养蛋白（NTFs）包括神经因子（NGF），脑源的神经营养因子（BDNF）。神经营养蛋白 - 3（NT-3）和 / 或神经营养蛋白 4 / 5（NT-4 / 5）。

5. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述外周神经功能障碍是由一种疾病导致的，该疾病包括神经病，糖尿病，急性阴茎损伤，阴茎外科手术，前列腺外科手术，膀胱外科手术和 / 或任何其它骨盆外科手术。

6. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述外周神经功能障碍是阴茎勃起功能障碍。

7. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述医药产品是作为刺激的或抑制的营养支持提供给位于骨盆神经丛的阴茎神经分布神经元。

8. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述医药产品是作为刺激的或抑制的营养支持提供给位于腰骶背根神经节的阴茎神经分布神经元。

9. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述骨盆区域的功能障碍是由分布于骨盆神经丛的节前植物性神经元导致的。

10. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述神经营养因子是作为通过肠道途径或胃肠外途径给药的组合物提供的。

11. 权利要求 10 中的方法，其特征在于上述神经营养因子是通过将转化有能够表达上述神经营养因子的核苷酸序列的细胞植入到海

绵体或阴茎干而提供的。

12. 权利要求 11 中的方法，其特征在于上述转化的细胞被包在一层半透膜中制成胶囊。

13. 权利要求 10 中的方法，其特征在于上述神经营养因子是在一个通过重组 DNA 方法产生的载体中提供的，上述载体含有至少一种编码神经营养因子的，能够表达上述因子的核苷酸序列

14. 权利要求 10 中的方法，其特征在于上述神经营养因子是与至少一种供选的，药用上可接受的，与给药途径可兼容的辅助制剂一起提供的。

15. 权利要求 1 中的方法，其特征在于对病人骨盆神经丛或阴茎感觉神经元的营养支持是通过施用一种 Ret, trkA, trkB, trkC 酪氨酸激酶受体的结合底物而提供的。

16. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述营养支持是通过调节 Ret 酪氨酸激酶受体所介导的信号转导所介导的。

17. 权利要求 1 中的方法，其特征在于上述 Ret 酪氨酸激酶受体包括 trkA, trkB, trkC 和 / 或 p75 受体。

18. 单独或者以任何组合形式的一种或多种神经营养因子或其保守取代变体制造医药产品的应用，该医药产品作为刺激的或抑制的营养支持被用于治疗患有外周神经功能障碍的病人。

19. 根据权利要求 18 的应用，其特征在于上述神经营养因子包括神经胶质细胞系源的神经营养因子 (GDNF) 家族相关的化合物或神经营养蛋白，它们的受体，它们的结合底物和 / 或编码上述因子以及其任何功能部分的核苷酸序列。

20. 根据权利要求 18 的应用，其特征在于 GDNF 家族相关的化合物包括 neurturin (NTN)，神经胶质细胞源的神经营养因子 (GDNF)，artemin (ARTN) 和 / 或 persephin (PSPN)。

21. 根据权利要求 18 的应用，其特征在于神经营养蛋白 (NTFs) 包括神经因子 (NGF)，脑源的神经营养因子 (BDNF)，神经营养蛋白 - 3 (NT-3) 和神经营养蛋白 4/5 (NT-4/5)。

22. 根据权利要求 18 的应用，其特征在于上述外周神经功能障碍是由一种疾病导致的，该疾病包括神经病，糖尿病，急性阴茎损伤，阴茎外科手术，前列腺外科手术，膀胱外科手术或任何其它骨盆外科

手术。

23. 根据权利要求 18 的应用, 其特征在于上述药物产品是作为通过肠道途径或胃肠外途径给药的组合物提供的刺激或抑制的营养支持起作用的。

5 24. 根据权利要求 18 的应用, 其特征在于上述药物产品是作为通过将转化有能够表达上述神经营养因子的核苷酸序列的细胞植入到海绵体或阴茎干而提供的刺激或抑制的营养支持起作用的。

25. 根据权利要求 24 的应用, 其特征在于上述转化的细胞被包在一层半透膜中制成胶囊。

10 26. 根据权利要求 18 的应用, 其特征在于上述药物产品是作为在一个通过重组 DNA 方法产生的载体中提供的刺激或抑制的营养支持起作用的, 上述载体含有至少一种编码神经营养因子的核苷酸序列。

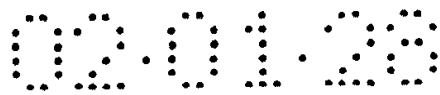
15 27. 根据权利要求 18 的应用, 其特征在于上述营养支持中除了含有上述神经营养因子作为活性成分外还含有至少一种供选的药用上可接受的与给药途径可兼容的辅助制剂。

28. 根据权利要求 18 的应用, 其特征在于上述作为病人的骨盆神经丛或阴茎感觉神经元的刺激或抑制营养支持的医药产品是 Ret, trkA, trkB, trkC 酪氨酸激酶受体以及 p75 受体的一种结合底物。

20 29. 根据权利要求 18 的应用, 其特征在于上述作为刺激或抑制营养支持的医药产品是通过调节 Ret 酪氨酸激酶受体所介导的信号转导所介导的。

30. 根据权利要求 17 的应用, 其特征在于上述 Ret 酪氨酸激酶受体包括 trkA, trkB, trkC 和 / 或 p75。

25 31. 一种神经营养因子或其保守取代变体在治疗在骨盆区域患有外周神经功能障碍的病人的方法中的应用, 上述骨盆区域的外周神经功能障碍是由一种疾病导致的, 该疾病包括神经病, 糖尿病, 急性阴茎损伤, 阴茎外科手术, 前列腺外科手术, 膀胱外科手术和 / 或任何其它骨盆外科手术。



说明书

神经营养因子在骨盆神经丛外周神经功能障碍的治疗中的应用

5 本发明涉及神经营养因子在制造药用产品中的应用，提供刺激的或抑制的营养支持 (trophic supports)，以便在患有外周神经病，植物性神经病，骨盆外科手术，骨盆创伤，阴茎神经分布发育障碍，诱导外周神经病的疾病如糖尿病的病人的骨盆神经丛 (pelvic area) 的外周神经功能障碍。也公开了用于治疗上述功能障碍和疾病的方法。

发明背景

勃起是一种支配性的神经介导的血管作用。在阴茎胀大所需要的平滑肌松弛中，骨盆副交感神经具有重要意义，尽管下腹部的交感神经可能也起一定的作用。在人类阴茎中，分布于阴茎的副交感神经来自骶骨髓，骶骨髓为骨盆神经网络 (pelvic plexus) 的神经节细胞提供输入。骨盆神经网络是参与消除 (eliminative) 和生殖功能的交感神经和副交感神经的一种缔合 (Dail, 1996)。主要骨盆神经节 (MPG) 的勃起诱导神经元通过海绵体神经送出轴突，以便供给阴茎的血管和可勃起组织 (Dial, 1996; Quinlan, 1989)。最近，在几种哺乳动物中已经确认了一氧化氮 (NO) 在供给阴茎动脉和海绵体平滑肌的神经中作为神经介质起着至关重要的作用 (Andersson, 1995)。它扩散到平滑肌中，增加 cGMP 的合成并降低细胞质钙 Ca^{2+} ，从而诱导松弛 (Buj-Bello, 1995)。男人正常的阴茎勃起依赖于完整的神经分布，充分的血液供应和健康的勃起组织 (Andersson, 1995)。因此，神经通路的中断或影响神经肌肉接合的疾病可能导致勃起障碍 (Batra, 1991)。

尽管在外科手术技术上有进步，但是神经原性的阳痿仍然是基本的前列腺，膀胱或直肠外科手术的不期望但却经常遇到的副作用 (Walsh, 1982)。它也是植物性和感觉神经病，例如在糖尿病男人，中常见的症状 (Eardley, 1991)。在临床上需要发现支持阴茎神经的生长和增强其再生的分子。

最近有报道表明在大鼠中生长激素能改善某些阴茎神经的再生 (Jung, 1998)。有人提出这种效应是通过类胰岛素生长因子 I (IGF-I) 介导的, 对于中枢和外周神经系统的许多神经元群落它是一种强有力的神经营养性因子 (Ishii, 1993)。同时基础纤维原细胞生长因子 (FGF-2) 被认为在阴茎勃起的生理学中起作用 (Te, 1994)。有人提出了神经营养性蛋白或它们的小分子模拟物在几种神经系统疾病和损伤中作为潜在疗法的治疗用途 (Hefti, 1997; Skaper, 1998)。但是, 为了使得这样的分子在神经源性阳痿的成功应用成为可能, 需要关于调节阴茎神经元的维持和再生的生理因子的更多知识。

在大鼠中研究 GDNF 和它的受体 mRNA 表达时, 本发明的发明者得到的结果表明 GDNF 与其受体可能在大鼠阴茎的神经分布中具有作用。受到这些发现的鼓舞, 本发明的发明者继续他们的研究计划, 并能够发现神经营养性因子的更广泛的用途。事实上, 根据上述初步的发现, 提供了对以上所讨论的一些问题的解决方法, 即治疗骨盆神经丛的外周神经功能障碍, 包括但不限于勃起功能障碍。

发明概述

本发明的特征在权利要求书中定义。

附图简述

图 1 描述了在阴茎干中 NTN mRNA 的表达。

图 2 描述了 NTN 受体成分的 mRNA 在 MPG 中的表达。

图 3 描述了在成年大鼠的骨盆器官中 NTN mRNA 表达的 Northern 印迹分析。

图 4 描述了 ^{125}I -NTN 从阴茎的干向 MPG 和 DRG 的逆向轴突输送。

图 5 描述了在两侧海绵体神经轴索显微外科手术 (ax) 后或假手术后成年大鼠阴茎中 NTN mRNA 的水平。

图 6 描述了在 $\text{GFR}\alpha 2^{-/-}$ 和野生型小鼠中 NADPH 心肌黄酶的组织化学。

图 7 描述了在阴茎干中 GDNF mRNA 的表达。

图 8 描述了在成年大鼠骨盆器官中 GDNF mRNA 表达的 Northern 印迹分析。

图 9 描述了 ^{125}I -GDNF 逆向输送到成年大鼠 MPG 和不同的 DRGs 的定量和特异性。

图 10 描述了 ^{125}I -GDNF 从阴茎的干向 MPG 和 DRG 的逆向轴突输送。

5 图 11 描述了胚胎第 13 天的鼠三叉神经节在胶原凝胶上 3 天后的神经突生长物。

图 12 描述了 GFR α 3 和 Ret mRNA 在成年大鼠 MPG 以及 GFR α 3 mRNA 在 S1 DRG 中的表达。

10 图 13 描述了 NGF, BDNF 的 RNA 制备和 Northern 杂交, 以及 NT-3 mRNA 在成年大鼠骨盆器官中的表达。

图 14 描述了 ^{125}I -NGF, ^{125}I -BDNF, ^{125}I -NT-3 向成年大鼠 MPG 和不同的 DRGs 逆向输送的定量和特异性。

上述附图将在发明的一般性描述的结束部分详细讨论。

15 发明详述

参考文献

在本申请中参考了许多出版物, 大部分在括号中包括了第一作者的姓以及公开的年份。在发明的一般性描述的末尾提供了这些出版物的完整出处。这些出版物的公开内容在本申请中引入作为参考。

定义

25 在本发明中所使用的术语的意思为它们在生物化学, 药理学, 重组 DNA 技术, 包括转基因动物的生产的领域中通常所具有的意思, 但是所使用的一些术语的意思和它们在通常背景中的意思有所偏离或者有更广泛的意思。因此, 为了避免由于某些术语的意思不清楚造成的不确定性, 下文更详细地定义了在本说明书中和权利要求书中使用的一些术语。

30 术语“神经营养因子”, 包括神经胶质细胞系源的神经营养因子 (GDNF) 家族相关的化合物或神经营养蛋白 (neurotrophins, NTFs), 它们的受体以及它们的结合底物。该定义还包括编码上述因子的核苷酸序列。GDNF-家族相关的化合物包括 neurturin (NTN),

神经胶质细胞源神经营养因子 (GDNF), artemin(ARTN) 和 / 或 persephin(PSPN)。神经营养蛋白 (NTFs) 包括神经因子 (NGF), 大脑源的神经营养因子 (BDNF), 神经营养蛋白 - 3 (NT-3) 和 / 或神经营养蛋白 4 / 5 (NT-4 / 5)。

5 上述“神经营养因子”还包括它们的保守取代的变体或衍生物, 上述变体或衍生物对它们的受体或共同受体的效应基本上与上述神经营养因子相同。上述受体或共同受体包括 Ret 酪氨酸激酶和 GDNF 家族受体 α : s(GFR α s) 和 trk 蛋白酪氨酸激酶受体 (trkA-C) 以及受体 p75。

10 上述“神经营养蛋白 (NTFs)”是调节神经元分化, 成熟和存活的蛋白。NTFs 是神经因子 (NGF), 脑源的神经营养因子 (BDNF), 神经营养蛋白 - 3 (NT-3), 神经营养蛋白 4 / 5 (NT-4 / 5) (Davies, 1994; Sariola 等, 1994)。NTF 特异性地结合并激活 trk 蛋白酪氨酸激酶受体 (Barbacid, 1995)。因此, NGF 激活 trkA, BDNF 和
15 NT-4 / 5 激活 trkB, 并且 NT-3 是 trkC 的配基, 但也是 trkA 和 trkB 的配基, 尽管不那么有效。除了全长的, 催化形式的 trk 受体外, 还存在几种可变剪接的 trk 同功型。全长的, 催化型的 trkB (trkB, TK+) 的 mRNA 被可变剪接为两种截短的形式 (trkB. T1 和 trkB. TS)。除了酪氨酸激酶结构域插入的其它同功型外, 还有人描述了 trkC
20 的四种截短形式。

术语“衍生物或变体”的意思为作为本发明的两种主要类型的“神经营养因子”作用于它们相应受体的信号传递的化合物。“衍生物或变体”包括在氨基酸水平上“基本上同源”的多肽, 它与人类的上述神经营养因子具有的显著相似性或同一性为至少 80%, 优选地 85
25 %, 最为优选地为 90% 以上。术语“神经营养因子和它们的保守取代变体”包括具有上述定义的“神经营养因子”的结构, 性质和功能特征的多肽。因此, 术语“神经营养因子和它们的保守取代变体包括上述文件经营养因子, 其中一个或多个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代。所述神经营养因子的截短的, 复合的或化学取代形式也包括
30 在该术语之内。化学取代形式包括例如低取代程度的烷基化, 酯化醚化或酰胺化形式, 特别是使用小分子, 例如甲基或乙基作为取代基, 只要该取代基不破坏神经营养因子的性质和功能。通过合成, 半合成

的，包括酶和重组 DNA 技术可制备所述多肽的截短的，复合的和/或取代的变体。唯一的另外的先决条件是变体基本上与所述神经营养因子同源并且具有所述神经营养因子的性质和/或表达所述神经营养因子的功能特征。

5 术语“神经营养因子和它们的保守取代变体”覆盖了上文所定义的“神经营养因子”的所有可能的剪接变体。上述“神经营养因子”可以以不同的同功型存在。术语“同功型”指同一蛋白的不同形式，它们来自不同的来源，例如，组织。一种蛋白或多肽的同功型可以由存在于不同种属，例如人源和鼠源的哺乳动物种属，的不同组织中的
10 等位基因表达。在本发明中该术语包括片段，复合物和它们的变体。神经营养因子的同功型可以通过前体蛋白的切割而产生。不同反应，包括不同酶促和非酶促反应，蛋白水解的和非蛋白水解的反应，能够产生上述神经营养因子的截短的，衍生的，复合的形式和它们的保守变体。

15 优选地，当使用能够识别和特异性地结合天然哺乳动物，包括人源和鼠源神经营养因子或上述因子的至少一个特异性部分结合底物时上述所有的“神经营养因子和它们的保守变体”都应该是可识别的。这样的结合底物为，例如，特异性识别或结合神经营养因子的受体包括 $GFR\alpha:s(GFR\alpha1-4)$ ，trk 蛋白酪氨酸激酶受体 (trkA, trkB,
20 trkC) 或其它结合蛋白或肽的抗体或配基，包括上述 $GFR\alpha:s$ 的特异性部分，但总的来说它们能够特异性识别为单独的或任何组合形式中的至少一种神经营养因子的抗体。上述抗体同时包括多克隆和/或单克隆抗体以及它们的片段或衍生物。优选地，所有的结合底物应当识别和结合上述神经营养因子的特异性表位或活性位点。

25 结合底物还包括能够特异性结合上述“神经营养因子”或它们相应的“受体”的小分子。可以用上述“神经营养因子”，它们的异构体以及它们的片段，受体，衍生物，变体和复合物的特异性结构域产生“结合底物”，前提是“这些神经营养因子”，它们的异构体以及它们的片段，受体，衍生物，变体和复合物能够在相应的信号通路中
30 发挥功能。

上述“神经营养因子”作为抗原起作用，并且是能够激发一种抗体对相应的“神经营养因子或其保守变体特异”的特异性应答的抗原

或组合物。上述抗体可以由传统的用于产生多克隆抗体以及单克隆抗体的技术产生。制备单克隆抗体的技术包括杂交瘤技术。可以通过，如，噬菌体呈现技术开放抗体的片段或其它类似结合蛋白的特异性结合肽并通过重组 DNA 技术生产。所有的方法对于本领域的技术人员都是众所周知的并且在实验室手册中有所描述。

在本发明中术语“核酸序列”的意思为任何分离和纯化的编码“神经营养因子”的核苷酸序列或其片段，或那些与哺乳动物，尤其是人源的基本上相似的“核酸序列”，上述核苷酸序列能够编码本发明的神经营养因子。本发明的“核酸序列”编码上文所定义的“神经营养因子”，并且它们可以这样使用或被导入适当的转化或表达载体中。而这些又能够被导入适当的宿主细胞或宿主生物以提供产生神经营养因子蛋白的体外方法，或通过将细胞或细胞系植入到患有上述功能障碍的病人的适当组织中以提供体内的方法。因此，本发明还提供了治疗以上列出的功能障碍或疾病的基因疗法。当上述细胞被植入到病人的适当器官或组织中时能够表达不同水平的神经营养因子。

本发明的“核酸序列”不是它们的天然状态，而是优选地作为瞬时表达的 mRNA 从适当的组织分离和纯化自它们的天然环境。因此，上述 mRNA 在体外被纯化和扩增，以便通过技术手段提供新拷贝，这些新拷贝能够编码上述神经营养因子，其衍生物或变体。

在本发明的上下文中术语“cDNA”的意思为可以通过将翻译自基因组的 DNA 序列的 mRNA 反转录而可得到的 DNA 序列。同样，反义核苷酸序列在本发明的一些应用中是有用的。

术语“反义技术”的意思为处于正确含义的 RNA 信息的相反位。“有义 (In sense)”的意思为当一条 DNA 链的一个拷贝被转录时，DNA 碱基的序列被保留了，但是该序列与初始的密码子完全互补。然后上述以其自身的语言含有来自 DNA 的指令的 mRNA 被翻译成多肽。如果正确完成的话，上述信息被称为处于正确含义。但是，如果存在一个完全互补的 (即反义) RNA 以便与有义 RNA 结合的话，上述有义 RNA 的信息就被取消了。

为了制造互补 RNA，可以从“DNA 的另一条链”制造反义信息，并导入到细胞，或者它可以在反义基因被导入后由细胞转录。当有义 RNA 与其反义 RNA 偶合或杂交时，它不能结合核糖体，并被失活。因

此原始的基因被其自身的反义 RNA 所阻断，而不需要其它基因的参与。作为调节和改造神经营养支持的一种手段，反义技术被包括在内。

术语“编码神经营养因子的核酸序列”的意思为编码神经胶质细胞系源的神经营养因子（GDNF）家族相关的化合物或神经营养蛋白（NTFs），它们的受体以及它们的结合底物的核酸序列。该定义还包括编码上述因子的核苷酸序列。GDNF - 家族相关的化合物包括 neurturin (NTN)，神经胶质细胞源神经营养因子（GDNF），artemin (ARTN) 和 / 或 persephin (PSPN)；神经营养蛋白（NTFs）包括神经因子（NGF），大脑源的神经营养因子（BDNF），神经营养蛋白 - 3（NT-3）和 / 或神经营养蛋白 4 / 5（NT-4 / 5），以及“基本上相同或相似的核酸序列”。上述“核苷酸序列”或它们的互补序列或含有它们的部分的序列，例如，在 3'-末端或 5'-末端截短的片段，以及含有点突变的核苷酸序列在作为探针或引物以制备 DNA 构建体上特别有用，上述 DNA 构建体用于制造含有上述核酸序列的细胞或细胞系。

但是，那些本领域的技术人员明白，可以制备其它能够编码神经营养因子并能够用于它们的生产的核酸序列。编码神经营养因子的核酸序列应该能够在严格条件下杂交（Sambrook, J., 等, 分子克隆、实验手册（Molecular Cloning: A Laboratory Manual），冷泉港, NY: 冷泉港实验室, 1989）

本发明的“核酸序列”与上文所定义的编码神经营养因子的序列应当具有“基本上的相似性”。在此上下文中“基本上的相似性”的意思为上述核苷酸序列满足上文所定义的前提条件，并与上述序列具有显著的相似性，即，至少 60% 的序列同一性，优选地 70%，最为优选地超过 80%。这也是定义保守替换变体的一个合适的标准。密码子的简并性应当被考虑在内。

术语“编码神经营养因子的核酸序列”包括它们截短的或复合的形式，以及上述核酸序列的点突变形式，只要它们编码的氨基酸序列能够具有上述神经营养因子的基本结构特征以及特性和 / 或功能。上述核酸可以这样使用或插入到转化或表达载体或宿主中，上述“核酸序列”能够编码和表达上述“神经营养因子”，上述“神经营养因子

能够被特异性识别上述“神经营养因子”的“结合底物”所识别。

术语“神经营养因子”除了多肽或蛋白外还包括编码“神经营养因子和它们的保守取代变体”的“核酸序列”。它们包括引物，探针，抗体，受体以及结合肽或配基。上述物质在骨盆神经丛的外周神经功能障碍，包括勃起功能障碍，的诊断和治疗以及研究中特别有用。术语“基因组序列”的意思为存在于哺乳动物细胞的细胞核中含有有或无内含子的外显子的“核苷酸序列”。

术语“营养支持”的意思为支持神经的存活和增强神经的再生的物质，化合物或分子。上述物质可以通过激活或提高某些产物的活性或量而支持神经的再生和存活，但是它也可以通过遏止或抑制或阻遏或降低某些化合物的量或活性而改善存活和再生。

术语“医疗治疗 (therapeutic treatment)”包括对需要治疗的人施用组合物进行治疗的方法，上述组合物含有作为活性成分的一种或多种单独的或任何组合形式的神经营养因子，单独的或任何功能组合形式的神经营养因子结合底物，以及编码它们的核酸序列。基因疗法包括引入本发明的上述核酸序列或基因以对骨盆神经丛功能障碍造成的受干扰的基因产物水平进行补偿，即作为其营养支持。施用的“神经营养因子的量”是“有效量”，以便在被治疗的组织中得到有效的但适当的和可测量的效果。优选地，目前利用已知量的神经营养因子或它们相应的结合底物作为标准通过本身已知的免疫检测对“神经营养因子的量”进行测定和筛选。

术语“组合物”的意思为本发明的活性成分，包括神经营养因子，编码神经营养因子的核酸分子，上述神经营养因子的调节因子和/或它们的抗体结合至少一种药用上可接受的辅助物质，该辅助物质与上述活性成分和给药途径可兼容。上述辅助物质包括液体或固体载体以及其它液体或固体添加剂。上述组合物可以与一个注射针和使用说明一起被包括在一个容器，包或分样器中。通过用适当的细胞，载体或其它本身已知的运送系统引入上述核苷酸序列，本发明的核酸序列可以被用于基因疗法。

“植入的细胞”优选地被包在半透性的膜中成胶囊，半透性膜允许活性神经营养因子扩散到需要治疗的病人的适当的组织和/或体液，同时防止病人的免疫系统攻击上述细胞并摧毁或分解它们以及它

们的内容物，载本和编码神经营养因子的核苷酸序列。

在本发明中定义为“神经营养因子”的“核酸序列”，蛋白质，蛋白质同系物，调节因子，受体和它们的抗体可以被用于药物筛选分析，诊断分析，治疗方法，药物基因组学，并用于在临床试验中监测效果。

本发明的“核酸序列”可以被用于提供哺乳动物载体，哺乳动物载体可以被引入到哺乳动物细胞或细胞系中。原核和真核生物细胞的适当的表达系统在 Sambrook 等，1989 中有所描述。上述宿主细胞可以被用于表达本发明的神经营养因子。本发明的上述宿主细胞也可以被用于产生非人类的转基因动物，这些转基因动物可以用于筛选分析，这些筛选分析被设计用来鉴定能够减轻包括勃起功能障碍在内的骨盆神经丛的功能障碍的物质或化合物，药物，医药，等等。上述神经营养因子可以作为单独的实体或以它们的任何组合或作为它们的复合物或混合物使用。在本文中使用时，“神经营养因子应答细胞”包括具有生物活性的能够被至少一种以上列出的神经营养因子调节（例如，激活或抑制）的细胞。

根据细胞的类型，由神经营养因子激发的应答可能不同。Neurturin, GDNF, Persephin, artemin 和/或神经营养蛋白在分布于阴茎的感觉神经中的受体表达和逆向输送暗示这些生长因子可以被用于治疗由于外周神经病，植物性神经病，骨盆外科手术，骨盆损伤，阴茎神经分布的发育性紊乱，诱导外周神经病的疾病，例如糖尿病，引起的骨盆器官的外周神经功能障碍，特别是勃起功能障碍。

发明一般性描述

如在发明背景中所描述的，勃起是一种支配性的神经介导的血管作用。在阴茎胀大所需要的平滑肌松弛中骨盆副交感神经起着重要作用，尽管下腹部交感神经可能也发挥一定的作用。在人类阴茎中，分布于阴茎的副交感神经来自骶骨髓，骶骨髓为骨盆神经网络（pelvic plexus）的神经节细胞提供输入。骨盆神经网络是参与消除（eliminate）和生殖功能的交感神经和副交感神经的一种缔合（Dial, 1996）。在雄性大鼠中，骨盆神经网络两侧的标志为一个单一的大神经节，主要骨盆神经结（MPG），这使得大鼠成为研究勃起的一

种优秀的动物模型 (Quinlan, 1989)。男人正常的阴茎勃起依赖于完整的神经分布, 充分的血液供应和健康的勃起组织 (Andersson, 1995)。因此, 神经通路的中断或影响神经肌肉接合的疾病可能导致勃起障碍 (Batra, 1991)。

5 已知在, 例如感觉, 交感, 肠, 运动和中脑多巴胺能神经元中 NTN 具有促进存活的活性 (Kotzbauer, 1996; Heuckeroth, 1999; Klein, 1997; Horger, 1998)。GDNF 家族成员的生物学作用是通过多成分受体复合物介导的, 该受体复合物由糖基磷脂酰肌醇-(GPI-) 连接的配基结合一个成分, 被称为 GDNF 家族受体 $GFR\alpha 1-4$ 组成, 并且信号转导受体酪氨酸激酶 Ret 已经得到论证 (Airaksinen, 10 1999)。

体外检测的结果表明 NTN 优先与 $GFR\alpha 2$, GDNF 优先与 $GFR\alpha 1$, ARTN 优先与 $GFR\alpha 3$, PSPN 优先与 $GFR\alpha 4$ 配对结合。尽管配基对 $GFR\alpha:s$ 的特异性仍然存在一定的混乱性, 最近的基因缺损研究暗示 GPI- 连接的共同受体和 GDNF 家族成员之间的相互作用存在体内的特异性 (Airaksinen, 1999)。

在 $GFR\alpha 2$ 或 NTN 基因缺损的小鼠之间惊人的表型相似性支持了 $GFR\alpha 2$ 是 NTN 生理上的共同受体这一观点 (Rossi, 1999; Heuckeroth, 1999)。公开的小鼠在副交感神经系统上具有严重的缺陷, 这意味着 NTN 对于某些神经节后的副交感神经元的发育和 / 或维持是必须的。

GDNF 在体外可以与许多 $GFR\alpha / Ret$ 复合物相互作用, (Baloh, 1997; Jing, 1997; Sanicola, 1997; Suvanto, 1997), 虽然最近的基因缺损研究表明在缺损 GDNF 或 $GFR\alpha 1$ 的小鼠中的缺陷相似 (Cacalano, 1998; Enomoto, 1998; Moore, 1996; Pichel, 1996; Sanchez, 1996), 揭示在体内 GDNF 主要通过 $GFR\alpha 1$ 起作用。以上描述的小鼠不能发育出肾脏和肠神经系统, 在出生后几天内死亡, 并在中枢和外周神经系统表现出类似的缺陷。

已知外周神经需要在所支配的靶器官中持续产生神经营养因子 (Davies, 1994; Henderson, 1996)。由于神经营养因子在神经退行性疾病的动物模型中强有力的药理学效果 (Hefti, 1997; Skaper, 1998), 有人提出神经营养因子是治疗受损伤的神经系统的很有希望

的药物。神经营养因子具有在发育中和在成年后防止枯萎和死亡的能力。尽管神经原性的阳萎是一个主要的问题，关于神经营养因子对于阴茎勃起诱导神经元的重要性知道得很少。鉴定阴茎神经营养制剂似乎是可行的，因为它们强有力的神经保护特性可能具有治疗价值。

- 5 GDNF 最初是根据其促进胚胎大鼠腹部中脑多巴胺能神经元存活和分化的能力而分离的(Lin, 1993)。它是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的一个关系疏远的成员，并含有 GDNF 家族以及 neurturin(NTN), (Kotzbauer, 1996), persephin (PSPN), (Milbrandt, 1998), 和 artemin (ARTN), (Baloh, 1998).
- 10 GDNF 维持中枢神经系统的多巴胺能神经元，去甲肾上腺素能神经元和运动神经元 (Arenas, 1995; Henderson, 1995; Lin, 1993; Oppenheim, 1995; Tomac, 1995; Yan, 1995) 以及外周感觉和交感神经元的各种亚群 (Buj-Bello, 1995; Ebendal, 1995; Trupp, 1995)。

- 15 进而，在缺少 GDNF 或 GFR α 3 的小鼠的交感颈上神经节中的缺陷表明 GDNF 的一些生物学效应是通过 GFR α 3, ARTN 优选的配基结合受体，介导的 (Moore 等, 1996; Sanchez 等, 1996; Baloh 等, 1998; Nishino 等, 1999)。

- 20 GFR α 3 mRNA 主要在主要骨盆神经节 (MPG) 的大神经元中表达这一发现是与在成年大鼠 ARTN 可能是某些骨盆肾上腺素能神经元的维持因子这一假说相一致的。在 MPG 中，一个阴茎投射神经元的亚群也表达 GFR α 3 的 mRNA。有趣地，GFR α 3 在大鼠 MPG 中的分布类似于所描述的神肽 Y (NPY) 的分布 (Keast and de Groat, 1989)。但是，共同受体 GFR α 3 和 NPY 是否在同一神经元中表达这一问题仍然
- 25 有待解决。进而值得注意的是 GFR α 3 mRNA 在几乎一半的阴茎感觉神经元中表达，并优先在小的和中等大小的细胞中表达。这意味着 GDNF 和 ARTN, GFR α 1 和 GFR α 3 的主要配基，可能至少部分地影响阴茎感觉神经元的不同种群。进而，GFR α 3 mRNA 在 MPG 和 S1 背根神经节 (DRG) 中的表达暗示在成年大鼠中 ARTN 可能也在骨盆植物性和感觉
- 30 神经元的某些亚群中作为神经营养因子。

因为功能性的副交感神经供给对于阴茎的勃起是必须的，所以研究了 NTN 对阴茎副交感神经元作为神经营养因子的必要性。大鼠被选

作实验动物，因为它具有紧密的主要骨盆神经节（MPG），该骨盆神经节位于前列腺的两侧并且是传出阴茎 NO 能神经的主要来源（Quinlan, 1989; Ding, 1993）。该神经节还含有交感神经和副交感神经元的混合，它们分布到内部的生殖器官，下腹部和尿路。

5 神经营养蛋白（NTFs）是调节神经元分化，成熟和存活的蛋白。目前已经描述的有四种 NTFs：神经因子（NGF），脑源的神经营养因子（BDNF），神经营养蛋白-3（NT-3）和神经营养蛋白 4/5（NT-4/5）（Davies, 1994; Sariola 等, 1994）。NTFs 特异性地结合 trk 蛋白酪氨酸激酶受体并激活它（Barbacid, 1995）。因此，NGF
10 激活 trkA，BDNF 和 NT-4/5 激活 trkB，NT-3 是 trkC 的配基，但也是 trkA 和 trkB 的配基，虽然效率低一些。

除了全长的，催化形式的 trk 受体外，还存在几种可变剪接的 trk 同功型。全长的，催化型的 trkB（trkB, TK+）的 mRNA 被可变剪接为两种截短的同功型（trkB. T1 和 trkB. TS）。除了在酪氨酸
15 激酶结构域插入的其它同功型外，还有人描述了 trkC 的四种截短形式（Barbacid; 1995）。

阴茎是研究 NTFs 的作用的一个有趣的模型，因为它分布着感觉，交感和副交感神经纤维。但是在阴茎神经中的受体（TRKs）的受体分布尚未被研究。只有关于神经营养蛋白的报道是利用 NGF 和从雌性骨
20 盆神经结分离的神经元进行研究的。但是，雄性和雌性之间在骨盆的神经分布有巨大的差异，因此关于雌性的数据不能被推及到雄性。trk 受体在骨盆神经结中的组织定位还是未知的。因为 NTFs 的表达和它们的受体在成年大鼠阴茎中的表达尚未得到系统性的研究，所以进行了所有神经营养蛋白和它们的受体在大鼠阴茎中表达的详细研究。

25 作为阴茎副交感神经元的靶源神经营养因子，对 NTN 的所起的作用进行了研究。提供的数据表明几种 GDNF 家族成员彼此协调以调节阴茎感觉和副交感神经元的功能。为了评估 GDNF 和 NTN 对阴茎神经的作用，通过原位杂交和 Northern 杂交研究了它们在成年大鼠阴茎干中的表达。用免疫细胞化学表征表达 GDNF mRNA 的阴茎细胞。

30 ¹²⁵I-GDNF 或 ¹²⁵I-NTN 被注射到海绵体组织中并研究了它们在感觉和交感阴茎神经中的逆向输送。为了发现 NTN mRNA 在阴茎中的合成是否受到神经元的调控，在海绵体神经轴索显微外科手术术后研究了它

的表达。在 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠中研究了阴茎神经分布以进一步阐明 $GFR\alpha 2$ 介导的信号对于阴茎投射神经元的生理重要性。结果暗示了神经营养蛋白在阴茎感觉和勃起诱导神经元的神经分布 / 维持 / 再生中的作用。

5 Neurturin (NTN) 和神经胶质细胞系源的神经营养因子 (GDNF) 家族的其它神经营养因子, 包括但不限于 artemin 和 persephin, 促进了中枢和外周神经系统的几种种群 of 的神经元, 包括发育中的和成熟的啮齿动物的中脑多巴胺能, 感觉和运动神经元, 的存活。NTN 被鉴定为是阴茎投射 (projecting) 副交感神经元的一种内源性的营养因子。NTN mRNA 在成年大鼠阴茎的阴茎血管和主体 (corpus) 海绵体的平滑肌中, 以及在几种其它骨盆器官中表达。NTN 受体成分 $GFR\alpha 2$ 和 Ret mRNA 遍在地在阴茎副交感神经元中表达。注射了 ^{125}I -NTN 的阴茎在副交感和感觉神经元中的逆向输送确认了 NTN 在该系统中的功能性。在两侧海绵体神经轴索显微外科手术术后阴茎中的 NTN mRNA 水平并未改变。在 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠中背部阴茎和海绵体神经的一氧化氮合酶 (NOS) 的显著降低指出了 $GFR\alpha 2$ 对于阴茎神经分布的生理重要性。

20 有证据表明 GDNF 受体成分 Ret, $GFR\alpha 1$ 和 $GFR\alpha 2$ 在成年大鼠的主要骨盆神经节 (MPG) 和背根神经节 (DRG) 的阴茎神经元中表达。逆向轴突输送被过量的未标记的 GDNF 所抑制, 而过量的细胞色素 c 对输送没有影响, 这意味着输送是通过与位于轴突末端的特异性受体结合而介导的。原位杂交揭示在阴茎干产生了 GDNF 的 mRNA。在白膜和可勃起组织之间边界的几排细胞看到了 GDNF mRNA 的表达。这些细胞被识别波形纤维蛋白和 S100beta 的抗体所识别, 而针对平滑肌 α 肌动蛋白和 PGP 9.5 的抗体未表现出免疫反应性。总之, 这些数据暗示着 NTN 作为阴茎勃起诱导节后神经元的靶源存活因子和 / 或 neuritogenic 因子起作用。这些结果意味着 GDNF 可能作为靶源的神经营养因子在成年大鼠阴茎中起作用。

30 在成年大鼠阴茎和骨盆神经丛中通过放射性原位杂交研究了神经营养蛋白的表达和它们高和低亲和性受体 mRNA 的表达。在阴茎中见到了 NT-3 和 NGF mRNA 转录本。trkC.TK+ 的全长 mRNA 在成年大鼠骨盆神经丛的荧光金标记的阴茎神经分布神经元的亚群中表达, 而

trkA 和 p75 mRNAs 主要在大鼠主要骨盆神经节 (MPG) 的非阴茎的投射神经元中表达。在 MPG 中仅仅通过 Northern 杂交探测到了低水平的 BDNF mRNA, 而没有探测到 trkB 的 mRNA。碘标记的 NGF 被逆向输送到 S1 背根神经节。所有的 trk mRNAs 都在 S1 DRG, 向成年大鼠的
5 阴茎提供传入神经分布的感觉神经节, 中表达。NT-3 mRNA 在成年大鼠阴茎海绵体和 trkC. TK+mRNA 在阴茎神经分布神经元中的表达意味着 NT-3 在阴茎神经元的神经分布和再生中起作用。所有的 trk 受体 mRNAs 在阴茎神经分布 S1 DRG 神经元中的表达也意味着神经营养蛋白在由于糖尿病引起的影响神经元的疾病, 如, 感觉神经病, 的
10 治疗中起作用。

对 GDNF 的黑质-纹状体多巴胺营养活性的表征产生了相当的兴趣, 并且努力寻找具有类似的存活促进活性的同源因子。在证明 NTN 在外周和中枢神经系统中能促进几种神经元种群存活的能力后, NTN 随即被发现。但是, NTN 在骨盆器官中的作用尚未被研究。在此显示了 NTN mRNA 在阴茎平滑肌以及几种其它骨盆器官中表达, 而阴茎神经分布性的主要骨盆神经节 (MPG) 的神经元表达 Ret 和 GFR α 2 的
15 mRNA, 并且能够特异性地吸收和转运 NTN。因此, NTN 似乎在骨盆区域的营养循环中起作用。GFR α 2 和 GFR α 1 在许多 MPG 神经元中的共同表达产生了这种可能性: GDNF 家族的其它成员可能调节这些神经元的
20 功能。类似地, GFR α 2 和 GFR α 1 mRNA 表达的部分重叠也可以广泛地在中枢神经系统 (Trupp; 1998; Sanicola, 1997; Naveilhan, 1998; Widenfalk, 1997; Golden, 1998) 和外周感觉和交感神经节中见到 (Yu, 1998; Bennet, 1998; Baloh. 1997)。尽管如此这样的共表达的生物学功能仍然未被很好地了解。

从轴突远端向神经元细胞体的逆向输送是衡量神经营养因子对一个给定神经元的功能性的一种重要标准。本发明证明了 NTN 在成年大鼠的阴茎投射主要骨盆神经节 (MPG) 神经元的结合, 摄取和逆向轴突输送。这清楚地显示了 NTN 作为一种靶源的营养因子对这些神经元起作用。在, 例如, 黑质-纹状体系统中, 一种类似的营养循环也
25 已经被注意到了, 在纹状体内注射的 GDNF 被后脑的多巴胺神经元逆向输送 (Tomic, 1995)。神经突生长促进活性与未放射性标记的亲体蛋白可比的 ¹²⁵I-NTN 在存在 100 倍过量的细胞色素 c 的情况下被
30

输送,而在存在类似过量 NTN 的情况下不能被输送,这一事实意味着逆向输送是通过与轴突末端的特异性受体的结合介导的。放射性自显影揭示除了 MPG 外, ^{125}I -NTN 在某种程度上被输送到 S1 DRG, 上述 S1 DRG 已知为阴茎提供传入神经 (Dailey, 1989)。在 S1 DRG 中的低水平的放射性可能是由于在 S1 DRG 的阴茎投射神经元中 $\text{GFR}\alpha 2$ mRNA 的表达仅仅为 6%, 而 $\text{GFR}\alpha 1$ 的表达为 57% (数据未出示)。事实上, ^{125}I -GDNF 在阴茎神经元中逆向输送的初步结果提示 GDNF 和 NTN 通常被运送到不同的 DGR 神经元群。这进一步支持了在体内 NTN 的信号是通过与 $\text{GFR}\alpha 2$ 结合而介导的这一观点。

在阴茎平滑肌中神经元-靶接触和 NTN mRNA 表达的同时发生提示神经分布可能调节 NTN 在靶中的产生的可能性。但是海绵体神经的两侧轴索显微外科手术并未明显改变 NTN mRNA 的量, 这提示副交感神经分布并不调节 NTN 在阴茎平滑肌中的表达。这是与在新生和成年动物中进行的几个植物性神经的神经切除术实验的结果是一致的。例如, 在新生大鼠的心脏和成年大鼠的虹膜进行交感神经切除术后 NGF mRNA 的水平保持不变 (Shelton, 1986)。

尽管 NTN mRNA 并未随着轴索显微外科手术而升高, 但是有可能由于缺少逆向输送, NTN 蛋白在靶器官中富集, 如 NGF 在交感神经切除术后心脏和虹膜中富集和在感觉神经轴索显微外科手术术后在皮肤中富集那样 (Shelton, 1986; Harper, 1999)。假设中增加的局部 NTN 可能促进阴茎神经的重新分布, 如所报道的在海绵体神经单侧轴索显微外科手术之后发生的那样, 在上述情况下完整的轴突被暗示向神经被切除的对侧扩张 (Jung, 1998; Carrier, 1995)。但是, 对这一假说的证实还需要更多的实验。

在 $\text{GFR}\alpha 2^{-/-}$ 小鼠的一些但不是所有的副交感神经元中存在缺陷 (Rossi, 1996), 这一最近的发现促进了关于阴茎的 NO 能神经分布是否被该基因的缺损所改变的研究。有人发现 $\text{GFR}\alpha 2$ 缺陷型小鼠在背部神经和下肢阴茎中含 NOS 纤维的数量都显著减少。未来的研究将显示在阴茎中 NO 能纤维密度的降低是由于丧失了神经元还是由于轴突分枝的减少。不管原因是什么, 本发明的数据提供了 $\text{GFR}\alpha 2$ 介导的信号对于阴茎副交感神经元具有功能性作用的证据。考虑到这些, $\text{GFR}\alpha 2^{-/-}$ 小鼠的不育多少有些让人惊奇 (Rossi, 1999)。尽管如此,

本结果并不排除在它们的生殖行为上存在细微的不足。另一方面，通常在基因缺损的小鼠中接管该功能的补偿机制被认为是高度依赖于被缺失的基因。例如，在定位缺失神经元 NOS 基因的小鼠中表现出阴茎内皮 NOS 的表达增加 (Burnett, 1996)。其它 GDNF 家族成员的补偿作用可能另外解释了在 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠中部分存在的阴茎 NO 能神经分布。本结果提示了一种补偿作用，尤其是对 GDNF 的补偿作用，因为它的优选的共同受体 $GFR\alpha 1$ 在超过一半的阴茎 MPG 神经元中表达。由其他神经营养因子介导的支持也是一种合理的可能性。

通过显示 NTN mRNA 在阴茎平滑肌中的表达和 ^{125}I -NTN 从神经末梢向主要骨盆神经节 (MPG) 神经元的细胞体的特异性运送，说明了 NTN 作为营养因子对副交感阴茎神经元所起的作用。此外，上述结果表明在海绵体神经轴索显微外科手术术后阴茎 NTN mRNA 表达未被改变。在 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠中含 NOS 神经纤维的减少指出了 $GFR\alpha 2$ 介导的信号在体内对于副交感阴茎神经元的生理作用。

通过两种独立的方法确认了 GDNF mRNA 在成年大鼠阴茎中的表达。原位杂交显示了 GDNF mRNA 在被膜下细胞层中的显著表达，而 Northern 杂交检测到了大小相应于先前报道的转录本。在 Northern 杂交中，仅仅在成年大鼠阴茎干中见到了 GDNF mRNA，而其它骨盆器官显示没有杂交。这是与 NTN mRNA 在成年大鼠骨盆器官中的广泛表达大不相同的。这些结果提示 GDNF 作为靶源神经营养因子在骨盆区域的作用可能仅仅限于阴茎。但是，因为神经营养因子产生的量通常很少，不能排除 GDNF mRNA 在一些骨盆器官中表达的量低于检测的灵敏度下限的可能性。GDNF 受体成分在副交感和感觉神经元神经分布骨盆器官中的广泛表达支持了上述可能性。

为了阐明表达 GDNF mRNA 的被膜下细胞的功能，使用了几种抗体。当使用针对平滑肌 α 肌动蛋白或 PGP 9.5 的抗体对切片染色时在被膜下区域没有免疫反应性。针对平滑肌 α 肌动蛋白的抗体应当识别平滑肌细胞 (Skall, 1986)，而针对 PGP 9.5 的抗体是一种优秀的泛神经元标志 (Ermisch, 1995; Thompson, 1983)。不能进行染色提示表达 GDNF mRNA 的细胞既不是平滑肌细胞也不是神经元。但是用波形纤维蛋白和 S100beta 抗体得到了清晰的信号。波形纤维蛋白抗体被认为是 mechencymal 细胞的一个标志 (Leader, 1987)，而

有报道表明针对 S100beta 的抗体识别各种类型的细胞, 例如, 神经胶质细胞, 软骨细胞和脂肪细胞(Griffin, 1995; Haimoto, 1987)。对波形纤维蛋白的免疫反应性意味着表达 GDNF mRNA 的细胞是 mechencymal 来源的。先前 Dail 等人(1995)报道在大鼠阴茎中白膜和可勃起组织之间的边界特征为具有明显细胞核的能够被 NADPH - 心肌黄酶中度染色的小细胞(Dial, 1995)。根据类似的定位和观察到的细胞的形态学, 提示这些细胞和那些表达 GDNF mRNA 的细胞是相同的。

在成年大鼠阴茎干中内源性产生的 GDNF 的生理作用仍然有待证明。但是功能受体在感觉和副交感神经中的表达倾向于支持 GDNF 是这些阴茎神经元的靶源神经营养因子这一观点。另一种可能性是 GDNF 在阴茎干中具有局部作用。但是这种想法的可能性较小, 因为原位杂交揭示在阴茎干中没有可检测的 Ret mRNA。在阴茎中其它未知的信号受体的存在也是一种不能被排除的可能性。

逆向输送是一种常见的机制, 通过它靶源的神经营养因子在神经元的细胞体中介导它们的生物学效果。本发明的发现证明了海绵体内注射后具有生物学活性的大鼠重组 GDNF 被感觉和副交感神经元逆向输送。 γ -计数和放射自显影揭示在 S1 DRG 和 MPG 的神经元中都存在放射性。 ^{125}I -GDNF 的输送被过量的未标记 GDNF 阻断, 而不会被过量的细胞色素 c 阻断这一事实提示输送是通过与位于轴突末端的特异性受体结合而被介导的。

GFR α 1 mRNA 在 54% 的阴茎 MPG 神经元中表达, 而 GFR α 2 在 98% 的阴茎 MPG 神经元中表达。相应地, GFR α 1 在 S1 DRG 内的 57% 的阴茎感觉神经元内表达, 而 GFR α 2 仅仅在 6% 的阴茎感觉神经元内表达。关于 ^{125}I -GDNF 在阴茎神经中逆向输送的结果与受体的分布有很好的相关性。与 ^{125}I -NTN 相比, ^{125}I -GDNF 在感觉神经内的输送看起来更有效(放射性自显影后更多的标记细胞的轮廓), 而注射 ^{125}I -GDNF 后在 MPG 中检测到的放射性较少。这些结果支持了 ^{125}I -GDNF 在阴茎神经元内的输送是通过 GFR α 1 介导的想法, 并因此提示只有阴茎神经元的亚群可能对 GDNF 的营养影响产生应答。

逆向输送在神经营养因子的药理学输送上非常重要。这些结果提示 GDNF 在人海绵体内的注射可能导致逆向输送, 并因此对感觉和副

交感神经元施与营养影响。

本发明显示了 GDNF mRNA 在成年大鼠阴茎和阴茎感觉和副交感神经末梢中表达，并且能够结合，吸收和运送注射到阴茎干的 ^{125}I -GDNF。因此根据本发明的结果利用 GDNF 作为对神经原性阳痿的治疗似乎是可行的。

主要骨盆神经节神经元表达 trkC.TK + 的 mRNA，并逆向运送 ^{125}I -NT-3，这提示这些神经元可以对 NT-3 产生应答。所有被研究的 NTFs (NGF, BDNF 和 NT-3) 都被运送到 S1 DRG，提示了对成年大鼠阴茎感觉神经分布的一种营养作用。

这些结果提示 NTN, GDNF 或 NT-3 可以被用于治疗由于海绵体神经功能性障碍造成的阳痿。对骨盆器官 (例如，阴茎，膀胱，前列腺，结肠，直肠，输精管，精囊) 的局部给药，全身给药或增强 NTN, GDNF, NT-3 或任何其它 GFR α 1, GFR α 2, Ret 或 trkC 受体激活结合底物的产生可能增强健康或患病的人类的骨盆神经丛神经元的再生和存活。

NTN, GDNF, NT-3 或任何其它 Ret 或 trkC 受体激活结合底物可能增强骨盆神经丛神经元的再生和支持其存活，因此可以被用于由于外周神经病，植物性神经病，骨盆外科手术，骨盆损伤，阴茎神经分布的发育性疾病，诱导外周神经病的疾病，如糖尿病，引起的人类勃起功能障碍的治疗。

受体表达和 NTN, GDNF, NT-3, NGF 和 BDNF 在阴茎传入 (感觉) 神经的逆向输送提示这些生长因子可以被用于治疗感觉神经病中分布于阴茎和其它骨盆器官的感觉神经元。

因此，已经积累了许多证据，根据这些证据可以总结出本发明涉及骨盆区域的外周神经功能障碍的治疗。根据上述证据，开发了研究甚至是人类的勃起功能障碍的方法，这些方法又提供了治疗骨盆区域这样的外周神经功能障碍的新方法，上述骨盆区域的功能障碍是由于分化紊乱 (differentiating disorders) 和外科手术干预导致的，包括外周神经病，植物性神经病，骨盆外科手术，骨盆损伤，阴茎神经分布的发育障碍，诱导外周神经病的疾病，如糖尿病。

本发明可以说是关于治疗在骨盆区域患有外周神经功能障碍的病人的方法，上述功能障碍包括但不限于勃起功能障碍，由于外周神

经病，植物性神经病，骨盆外科手术，骨盆损伤，阴茎神经分布的发育障碍，诱导外周神经病的疾病，如糖尿病导致的神经营养因子活性 / 表达异常或受抑制造成的。例如，本发明涉及在骨盆区域的外周神经患有以上描述的功能障碍的病人的治疗方法。这些方法包括，例如，全身给药，或对骨盆器官如阴茎，膀胱，前列腺，结肠，直肠，输精管和精囊局部给药。第三种治疗方法是通过基因疗法实现的或通过增强 NTN, GDNF, artemin 或 persephin, NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 或任何其它 GFR α 1, GFR α 2 或 Ret, trkA, trkB, trkC, P75 受体激活结合底物如神经营养因子调节因子的产生达到一定的量以便实现对上述病人或患者的治疗。

在其它实施方案中，本发明涉及治疗患有外周神经功能障碍的病人的方法，上述功能障碍包括但不限于由于外周神经病，植物性神经病，骨盆外科手术，骨盆损伤，阴茎神经分布的发育性疾病，诱导外周神经病的疾病，如糖尿病导致的人勃起功能障碍，上述治疗是通过

对病人施用神经营养因子调节因子以便实现治疗。

在其它实施方案中，本发明涉及治疗患有外周神经功能障碍的病人的方法，上述功能障碍包括但不限于由于外周神经病，植物性神经病，骨盆外科手术，骨盆损伤，阴茎神经分布的发育性疾病，诱导外周神经病的疾病，如糖尿病导致的人勃起功能障碍，上述方法包括对病人施用神经营养因子或与上述神经营养因子介导的信号途径相互作用的化合物，以便实现治疗。与 NTN, GDNF, artemin 或 persephin 以及其它神经营养蛋白受体表达和 / 或阻遏以及向阴茎传入（感觉）神经逆向输送相关的功能障碍，特别是骨盆区域的功能障碍提示这些生长因子可以用于治疗分布于阴茎和其他骨盆器官的感觉神经元。根据本发明，通过对患有疾病的病人施用编码神经营养因子或其部分的核酸序列以便实现治疗，例如，通过功能性地激活相应的基因组基因，也可以治疗感觉神经病。

这些方法通常包括检测化合物或试剂对编码神经营养因子的基因的表达的调节能力，或对神经营养因子活性的调节能力，从而鉴定一种化合物以便治疗相应的功能性障碍。在一个优选的实施方案中，上述方法包括将从患有功能障碍的病人获得的生物样品与能够确定生物样品中所表达的神经营养因子的量和 / 或测定神经营养因子的

活性的化合物或试剂接触，将生物样品的细胞中所表达的神经营养因子的量和 / 或可测量的神经营养因子生物学活性与对照样品进行比较。与参照相比，暴露于上述化合物或试剂的细胞中神经营养因子表达量或神经营养因子活性的改变是对神经营养因子表达和 / 或神经营养因子活性调节的指征。

本发明还涉及鉴定与神经营养因子相互作用（例如，和它结合）的化合物或试剂的方法。这些方法包括以下步骤：将神经营养因子，其片段，或表达神经营养因子的细胞与上述化合物或试剂在允许上述化合物与神经营养因子结合以形成复合物的条件下接触，并检测上述神经营养因子与上述化合物的复合物形成，其中上述化合物结合上述神经营养因子的能力是通过上述化合物在上述复合物中的存在来表征的。

本发明进而涉及调节，例如激活或抑制，神经营养因子与靶分子，例如 NTN、GDNF、artemin、persephin、NGT 或酪氨酸激酶受体 RET 或 trk A、trkB、trkC 或它们的复合物的相互作用的化合物或试剂的鉴定方法。在这些方法中，在激活或抑制化合物或试剂存在的情况下，在允许靶分子与神经营养因子结合以形成复合物的条件下，上述神经营养因子与靶分子接触。与没有上述化合物或试剂存在的情况下形成的复合物的量相比，在神经营养因子和靶分子之间的复合物形成的变化，例如升高或降低，是上述化合物或试剂调节上述神经营养因子的相互作用并作为一种替代的营养支持的能力的指征。

本发明还提供了获得可以用于基因疗法的细胞系的方法，上述细胞系的特征为含有编码功能性神经营养因子的基因组基因，并能够整合上述基因组神经营养因子编码核酸序列，并且通过上述整合功能性地失活了上述基因组基因，或者使得它可以被有条件地失活。

可以通过已经建立的基因导向方法（gene targeting methods）获得含有编码功能性神经营养因子的核酸序列的细胞系。制备能够被整合到基因组基因的、编码一种功能性的或可以功能性失活的或有条件失活的神经营养因子的核酸序列，并插入到具有适当的可选择核酸序列作为标志的导向构建体（targeting construct）中。上述导向构建体或载体可以被插入和转化到患有外周神经功能障碍的病人中。可以用一种能够识别上述作为标志的可筛选核酸序列的探针确认

含有核苷酸序列或其部分的细胞系或克隆，以及确认上述核苷酸序列或其部分向上述宿主细胞或细胞系基因组基因的整合。可以通过以上描述的方法获得的细胞系含有至少一种功能性神经营养因子，并且产生提高或降低水平的作为患有上述功能障碍的病人的营养支持的神经营养因子。神经营养因子的量或上述神经营养因子的调节因子应该是如此的，以便当治疗外周神经功能障碍，包括但不限于勃起功能障碍，时达到适当的可测量的效果。

本发明在以下的实验部分被更详细地描述。实施例不应该被理解为用来限制保护范围，而是用来显示本发明是如何起作用的，本领域的技术人员知道如何利用这些结果以便制造可以用于治疗权利要求中所定义的疾病的产品。

实施例 1

动物

雄性 Wistar 大鼠 (n=16, 10 到 12 周龄) 和成年 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 或野生型小鼠是从 University of Helsinki 的 Viikki Biocenter 的动物房获得的。它们在正常的白天和黑夜循环下喂养，并自由进食和饮水。使用了所有努力以使得动物的痛苦最小，并减小所使用的动物的数量。

实施例 2

逆向跟踪和用于原位杂交的组织的制备

联合使用咪唑安定 (0.8mg/kg)，柠檬酸芬太尼 (0.25mg/kg) 和氟阿尼酮 (8mg/kg) 麻醉大鼠，然后将 10 μ l 的 4% 的 Fluoro-Gold (FG; Fluorochrome) 水溶液注射到海绵体 (corpora cavernosa) 中。10 天后在麻醉中用磷酸盐缓冲液 (PBS; 0.1M 磷酸钠 / 0.14M NaCl / 2.6mM KCl, pH 7.5) (50ml)，随后用溶于 PBS 的新配制的 4% 低聚甲醛 (PFA) (200ml) 通过腕部灌注处死大鼠。解剖 MPG 和 S1 层面 (S1 level) 的背根神经节 DRG 并在室温进行 1.5-2 小时的后固定 (postfix)。从未处理的动物中取出阴茎干，在溶于 PBS 的 4% PFA 中固定 18-36 小时。固定后将所有的样品在 PBS 中漂洗，在硅化的载玻片上进行 7 μ m 的石蜡切片处理。

实施例 3

原位杂交

根据 Wilkinson 和 Green (1990) 的方法改造后对切片进行原位杂交。简言之, 将切片在二甲苯中去石蜡化, 再水化, 在溶于 PBS 的 4% PFA (wt/vol) 中固定, 在 PBS 中漂洗并用蛋白酶 K (20 μ g/ml, Sigma) 处理 5-15 分钟, 用溶于 PBS 的 4% PFA (wt/vol) 进行后固定, 乙酰化, 脱水, 空气干燥并和 cRNA 探针在 52 $^{\circ}$ C 杂交过夜。和没有探针的杂交混合物进行预杂交 (在 52 $^{\circ}$ C 进行 1-1.5 小时)。杂交后, 上述切片在高严格度下漂洗 30 分钟, 用 RNase A (Boehringer Mannheim) 处理, 脱水和空气中干燥。将切片浸没于感光乳剂中 (Kodak, NTB-2) 并曝光 5 星期。然后将切片显影 (Kodak D19 显影剂), 用 Harris 苏木精复染, 并固定到 Permount (Fisher Chemical) 上。用有义方向的探针杂交的相邻的切片被用作阴性对照。

15

实施例 4

影像分析和图的制作

用配备有 Potometrics SenSys CCD 照相机 (Photometrics) 和 Image ProPlus 3.0 软件 (Media Cybernetics) 的 Olympus AX70 Provis 显微镜 (Olympus Optical Co) 对暗场和亮场的影像进行数字化。最终的图是用 Adobe Photoshop 4.0 软件 (Adobe Systems) 制作的。

20

实施例 5

在 FG-标记的神经元中受体 mRNA 表达的定量分析

25

在原位杂交和感光乳剂放射性自显影期间, 在 UV-照明下观察了 FG 标记的 MPG 和 S1 DRG 神经元并进行数字化。通过数字化的影像比较了 FG 标记和原位杂交的信号。在贯穿神经节的每四个切片中的第四片中仅仅对含有清晰可见细胞核的明亮的神经元荧光轮廓进行计数。如果在细胞核邻近区域的颗粒密度高达背景水平的两倍, 则原位杂交信号被认为是阳性的。在四只大鼠的单侧对 FG 标记的神经元中受体 mRNAs 的表达进行定量。

30

实施例 6

RNA 的制备和 Northern 杂交

用硫氰酸胍 - 苯酚 - 氯仿抽提方法从冷冻的样品中分离总 RNA。
 5 (Chomczynski, 1987) (Poly-A) mRNA 是用 Oligotex mRNA Midi
 试剂盒 (Qiagen) 纯化的。纯化后, 在 1.2% 琼脂糖 - 甲醛凝胶上分
 离 (poly-A) mRNA 并转移到尼龙膜上 (Magna, MSI)。转移后通过
 UV 照射固定膜, 预杂交, 并与 ^{32}P 标记的 cDNA 探针在 1M NaCl, 1%
 10 十二烷基硫酸钠, 10% 硫酸右旋糖苷和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 超声处理过的青鱼
 精 DNA 中 65 $^{\circ}\text{C}$ 杂交。两次高严格性洗涤后 (0.1 $\times$ 柠檬酸钠缓冲盐溶
 液 (SSC), 0.5% 十二烷基硫酸钠, 在 55 - 60 $^{\circ}\text{C}$, 15 分钟), 通过
 磷影像仪 (Fuji BAS 1500) 或在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 下通过对 X-光胶片在 -70 $^{\circ}\text{C}$
 曝光 1 到 7 天对上述印迹进行分析。为了比较不同泳道中 mRNA 的相
 对水平, 上述滤膜与甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 探针重新杂交。

15

实施例 7

cDNA 和 cDNA 探针

为了进行原位杂交, 用适当的 RNA 聚合酶 (SP6, T7, Promega)
 生成了单链的反义和有义 cRNA 探针并用 ^{35}S -UTP (Amersham) 进行
 20 标记。DNA 模板为大鼠 GFR α 1 (U79486 的核苷酸 294 - 1039), 大 GFR α 2
 (AF003825 的核苷酸 85 - 257), 小鼠 NTN (U78109 的核苷酸 349
 - 936), 由 Carlos F. Ibanez 博士馈赠, 和大鼠 Ret (U22514 的
 核苷酸 21 - 200)。利用 Prime-a-Gene Labeling System (Promega)
 用 ^{32}P -dCTP 对用于 Northern 杂交的 cDNA 探针进行标记。用于制备
 25 ^{32}P -dCTP 标记的 cDNA 探针的 DNA 模板为小鼠 NTN (和用于原位杂交
 的核苷酸相同) 和 GAPDH (X02231 的核苷酸 137 - 949)。大鼠 GFR α 2,
 Ret 和 GAPDH cDNA 通过 PCR 克隆。用 Pharmacia A. L. F. 自动化 DNA
 测序仪直接测序对克隆的片段的身份 (identity) 进行确认。

实施例 8

^{125}I -标记的 NTN (^{125}I -NTN) 的制备和生物活性测定

通过乳过氧化物酶法 (Marchalonis, 1969) 对大肠杆菌 (E.

coli) (Pepro Tech) 中产生的人重组 NTN 进行放射性碘标记。在终
 体积 50 μ l 中混合以下组分并在室温放置 18 分钟: 1mCi
 Na¹²⁵I(1Ci=37GBq), 10 μ g NTN 蛋白, 0.5U 乳过氧化物酶, 2 μ l 0.03%
 H₂O₂ 和 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH6.0。最初 9 分钟温育后, 另外加入 2 μ l
 5 的 H₂O₂。通过加入 3 倍体积的含有 0.42M NaCl, 0.1M NaI 和 0.1M
 磷酸钠缓冲液, pH7.5, 的缓冲液和 22 μ l 溶于 0.1M 磷酸钠缓冲液,
 pH7.5, 的 2.5% 的 BSA 终止反应。用三氯乙酸沉淀一小份反应混合
 物后计算标记的效率和特异活性。通过使用 NanoSpin Plus 柱 (4000
 MWC0, Gelman Sciences) 分离自由的碘并浓缩 ¹²⁵I-NTN。用 1271
 10 Riagama 计数器 (Wallac) 测量放射性。 ¹²⁵I-NTN 的特异活性为
 44.7 μ Ci/ μ g。生物检测标记的 NTN 对移植到胶原基质的源自 13.5 天
 胚龄小鼠的三叉神经节的神经突生长的刺激, 并用神经丝抗体染色
 (Arumae, 1993; Ebendahl, 1989)。

15 实施例 9

¹²⁵I-NTN 注射和逆向输送

如实施例 2 所描述麻醉大鼠, 此后用 10 μ l 的 Hamilton 注射器
 (1701N) 将单独含有 200ng ¹²⁵I-NTN 或与 20 μ g 未标记的 NTN 或细
 胞色素 c 混合的 ¹²⁵I-NTN 的 5 μ l 溶液注射到两个海绵体中。24 小时
 20 后在深度麻醉下用 PBS(50ml), 随后用溶于 PBS 的 4% 低聚甲醛(PFA)
 (250ml) 通过腕部灌注处死大鼠。灌注后解剖 MPG 和 DRG (层面 L4
 -S2) 并进行 1.5-2 小时的后固定。通过 γ -计数测量神经节的放射
 性。固定后制备低温切片 (10 μ m), 脱水, 浸泡于感光乳剂中, 并曝
 光 2-3 个星期。然后将载玻片显影, 用苏木精复染并固定。

25

实施例 10

海绵体神经轴索显微外科手术术

(Cavernous nerve axotomy)

30 联合使用氯胺酮 (105mg/kg) 和塞拉嗪 (6mg/kg) 麻醉成年大鼠。
 暴露出海绵体神经并在远离 MPG 一端的两侧切断。为了使得神经片段
 重新连接的可能性最小, 将神经片段被横断的两端偏转。在假手术的

大鼠中海绵体神经被辨认出来，但是不切断它。在轴索显微外科手术后的 1, 3, 7 和 14 天处死大鼠。阴茎的干被解剖，冷冻于液氮中并储存于 -70°C 。分离 mRNA 并如实施例 6 所描述进行 Northern 印迹。

5

实施例 11

NADPH 心肌黄酶染色

将小鼠阴茎干在溶于 PBS 的冷 4% PFA 中固定 5 小时。组织在溶于 PBS 的冷 30% 蔗糖中冷冻保护过夜。然后将它们包埋于 Tissue-Tek O.C.T. 化合物 (Sakura) 中，在干冰上冷冻并储存于 -70°C 。制备冷冻切片 ($10\mu\text{m}$) 并粘附到 Super Frost Plus 载玻片 (Menzel-Gläser) 上。经过短时间的空气干燥后用溶于 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 8.0, 的 0.1mM NADPH, 0.2mM 硝基兰四唑和 0.2% Triton X-100 在室温固定 90 分钟。通过用水洗涤终止反应。用基于 Mowiol 的装载介质盖上切片。通过单边计算存在于海绵体中和在整个背部神经中的 3 个随机视野 ($400\times$) 中的 NADPH-阳性的神经纤维数对染色的样式进行评估。

10

15

实施例 12

cDNA 和 cRNA 探针

为了进行原位杂交，用适当的 RNA 聚合酶 (SP6, T7, Promega) 生成了单链的反义和有义 cRNA 探针并用 ^{35}S -UTP (Amersham) 进行标记。使用的 DNA 模板为大鼠 GDNF (L15305 的核苷酸 52-688)。使用 Prime-a-Gene Labeling System (Promega) 用 ^{32}P -dCTP 对用于 Northern 杂交的 cDNA 探针进行标记。用于制备 ^{32}P -dCTP 标记的 cDNA 探针的 DNA 模板为大鼠 GDNF (和用于原位杂交的核苷酸相同) 和大鼠 GAPDH (X02231 的核苷酸 137-949)。

20

25

实施例 13

^{125}I -标记的 GDNF (^{124}I -GDNF) 的制备和生物活性

30

利用 Bolton & Hunter 试剂 (Bolton, 1973) 对通过在杆状病毒感染感染的昆虫细胞中表达基因而产生的大鼠重组 GDNF 进行放射性碘标

记。溶于 20 μ l 0.1M 硼酸缓冲液, pH8.5, 的 GDNF 蛋白被置于 2mCi (1Ci = 37GBq) 干燥的 ^{125} I - 标记的 Bolton - Hunter 试剂中, 反应混合物在 4 $^{\circ}$ C 进行孵育 15 分钟。通过加入 0.5ml 溶于 0.1M 硼酸缓冲液, pH8.5, 的 0.2M 甘氨酸终止反应。通过使用 NanoSpin Plus 柱 (4000 MWC0, Gelman Sciences) 分离自由的碘和甘氨酸交联物并浓缩 ^{125} I - GDNF。用 Wallac 1271 Riagamar γ 计数器 (Wallac) 测量放射性。 ^{125} I - GDNF 的特异活性为 61.3 μ Ci/ μ g。如所描述的那样生物检测标记的 GDNF 对移植到胶原基质的源自 E13-E13.5 小鼠的三叉神经节的神经突生长的刺激 (Arumäe, 1993; Ebendahl, 1989)。

10

实施例 14

^{125} I - GDNF 的注射和感光乳剂放射性自显影

如实施例 2 所描述麻醉大鼠, 此后用配备了 26G 针头的 Hamilton 注射器将单独含有 200ng ^{125} I-GDNF 或与 20 μ g 未标记的 GDNF 或细胞色素 c 混合的 ^{125} I-GDNF 的 5 μ l 溶液注射到阴茎的两个海绵体中。24 小时后在深度麻醉下用磷酸盐缓冲液 PBS (50ml), 随后用溶于 PBS 的 4% PFA (250ml) 通过腕部灌注处死动物。灌注后收集主要骨盆神经节和背根神经节 (层面 L4 - S2) 并进行 1.5-2 小时的后固定。在后固定期间通过 γ - 计数测量神经节的放射性。固定后制备低温切片 (10 μ m), 脱水, 浸泡于感光乳剂中 (Kodak NTB-2), 并曝光 2-3 个星期。然后将载玻片显影 (Kodak D19 显影剂), 用苏木精复染并装载到 Permount 上 (Fisher Chemical)。

15

20

实施例 15

免疫细胞化学

25

30

在冷的新鲜制备的溶于 PBS 的 4% (wt/vol) PFA 中将大鼠阴茎干浸渍固定 17、18 小时。固定后冲洗样品, 并且在 Super Forst Plas 载玻片 (Menzel-Gläser) 上制备 10 μ m 石蜡切片。切片在二甲苯中去石蜡, 再水化, 在 DBS 中与 4% BSA 和 4% triton-X100 室温下温育 1 小时, 然后与抗 S100 β 第一多克隆抗体 (1:5000, Swant), PGP9.5 (1:2000, Affinity) 或抗波形蛋白的小鼠单克隆抗体 (1:20, Amersham) 或平滑肌 α 肌动蛋白 (1:200 Progen) 温育 18 小时。使用二氨基联苯胺作为发色团用抗生物素蛋白 - 生物素 - 过氧化物酶体

系 (Vector Laboratories) 观察染色。最后将切片脱水并封固在 Pormount (Fischer Chemical) 上。

实施例 16

cDNA 和 cRNA 探针

- 5 为了进行原位杂交, 用适当的 RNA 聚合酶 (SP6, T7, Promega, Madison, WI, USA) 生成了单链的反义和有义 cRNA 探针并用 ^{35}S -UTP (Amersham Pharmacia Biotech) 进行标记。DNA 模板为 GFR α 3 (AF184920 的核苷酸 81-489)。

实施例 17

10 cDNA 和 cRNA 探针

- 为了进行原位杂交, 用适当的 RNA 聚合酶 (SP6, T7, Promega) 生成了单链的反义和有义 cRNA 探针并用 ^{35}S -UTP (Amersham) 进行标记。大鼠 NGF, BDNF, NT-3, trkA, trkB.TK+, trkC.TK+和 p75 的探针在先前已有描述 (Arumae 等, 1993; Pirvola 等, 1992; 15 Pirvola 等, 1994; Ylikoski 等, 1993; Hiltunen 等, 1996)。Trk.TK+探针识别所有的四种含 TK 结构域的同功型, 并相应于大鼠 trkC cDNA 序列核苷酸 2308-2552 (Merlio 等, 1992)。BDNF 片段跨越大鼠 BDNF cDNA 序列的核苷酸 517-882 (Maisonpierre 等, 1991) 并且除了属于 proBDNF mRNA 的最初两个核苷酸外定位于成熟的 20 BDNF mRNA。用于制备 ^{32}P -dCTP 标记的 cDNA 探针的 DNA 模板和用于原位杂交的和用于大鼠 GAPDH (X02231 的核苷酸 137-949) 的相同。

实施例 18

25 ^{125}I -标记的 NTFs (^{125}I -NTFs) 的制备和生物活性

- 通过乳过氧化物酶法 (Marchalonis, 1969) 对重组蛋白进行放射性碘标记。用三氯乙酸沉淀一小份反应混合物后计算标记的效率和比活。通过使用 NanoSpin Plus 柱 (4000 MWC0, Gelman Sciences) 分离自由的碘并浓缩 ^{125}I -NTFs。用 1271 Riagramma 计数器 30 (Wallac) 测量放射性。 ^{125}I -NTNs (NGF, NT-3 和 BDNF) 的特异活性为 30-100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。生物检测标记的 NTFs 对移植到胶原基质的源自 9-10 天小鸡的 DRGs 神经突生长的刺激, 如文献所描述的那样 (Arumae,

1993; Ebendal, 1989)。

实施例 19

¹²⁵I - NTFs 注射和逆向输送

5 如实施例 2 所描述麻醉大鼠，此后用 Hamilton 注射器 (1701N) 将单独含有 200ng ¹²⁵I-NTFs (NGF, NT-3 或 BDNF) 或与 20μg 未标记的 NTFs 或细胞色素 c 混合的 ¹²⁵I-NTFs 的 5μl 溶液注射到两个海绵体中。24 小时后在深度麻醉下用 PBS (50ml)，随后用溶于 PBS 的 4% PFA (250ml) 通过腕部灌注处死大鼠。灌注后解剖主要骨盆神经节和背根神经节 (层面 L4-S2) 并进行 1.5-2 小时的后固定。通过 γ- 计数测量神经节的放射性。固定后制备低温切片 (10μm)，脱水，浸泡于感光乳剂中，并曝光 2-3 个星期。然后将载玻片显影，用苏木精复染并装载。

15 结果 1

NTN 在阴茎中的表达，GFRα2, GFRα1 和 Ret 在成年大鼠 MPG 和 DRG 中的表达

20 图 1 中出示的结果表明 NTN mRNA 在阴茎血管和海绵体平滑肌中广泛地表达。同时在动脉和静脉中见到杂交，在尿道的上皮细胞中也见到一定程度的表达。原位杂交表明在阴茎的干没有检测得到 Ret 或 GFRα2 的表达，并且在海绵体中仅仅见到微弱的扩散的 GFRα1 的表达。但是，Northern 杂交表明所有的受体 mRNAs 都在阴茎干中有微弱的表达 (数据未出示)。

25 Ret 和 GFRα2 mRNA 在 MPG 的大多数神经元中表达 (图 2A 和 B)。分别在所有的和 98% 的阴茎投射，即 FG 阳性的，MPG 神经元中见到了表达 (图 2D 和 E)。GFRα1 mRNA 在 54% 的阴茎 MPG 神经元中表达。在 FG 标记的神经元区域存在不表达 GFRα1 mRNA 的小神经元。否则的话 GFRα1 似乎是在整个 MPG 中均匀地表达 (图 2C)。在成年大鼠的 S1 DRG 中 Ret, GFRα1 和 GFRα2 mRNAs 分别在 62%, 57% 和 6% 的阴茎神经元中表达 (数据未出示)。在所有大小的 S1 DRG 细胞中都见到了 Ret mRNA 的表达，而 GFRα1 mRNA 优先地在中等大小和大细胞中表达，GFRα2 mRNA 优先在小的和中等大小的细胞中表达。在

MPG 或 S1 DRG 中没有检测到 NTN mRNA 的表达。

结果 2

NTN 在其它骨盆器官中的表达

5 在所有被研究的骨盆器官中检测到了 0.9kb 的单一 NTN 转录本 (图 3)。在阴茎,膀胱和输精管中见到了最高的表达,而在结肠,前列腺和精囊中的信号较弱。

结果 3

10 在阴茎投射神经元中 ^{125}I -NTN 的逆向输送

^{125}I -NTN (20ng/ml) 在小鼠胚胎三叉神经节诱导了很强的神经突生成 (图 4E), 而在无神经营养因子的神经节的对照培养中没有神经突 (图 4F)。 ^{125}I -NTN 和非放射性的 NTN 在所有的测试浓度 (5 - 20ng/ml, 数据未出示) 中表现出类似的神经原性效力。将 200ng ^{125}I -NTN 注射到两个海绵体中 24 小时后, 放射性自显影揭示了在 MPG 和 S1 DRG 中存在标记 (图 4A 和 C)。尽管放射性自显影的分辨率有限, 银颗粒簇显示标记完全存在于神经细胞体中。为了显示输送的特异性, 同样量的 ^{125}I -NTN 与过量未标记的 NTN 一起注射。这阻断了上述逆向输送, 因为在 MPG 和 DRG 中的放射性很难检测得到, 如果能够检测得到的话 (图 4B, D 和 G)。图 4G 显示注射 ^{125}I -NTN 后只有在神经分布于阴茎的神经节, 即 MPG 和 S1 DRG, 中检测到显著量的放射性。为了排除过量蛋白的阻断效应, ^{125}I -NTN 也与过量的细胞色素 c 一起注射。这增加了 ^{125}I -NTN 的逆向输送, 可能是意味着过量的细胞色素 c 能够抑制 ^{125}I -NTN 与注射器和组织的非特异性结合。

25

结果 4

两侧海绵体神经轴索显微外科手术术后 NTN mRNA 在阴茎中的表达

30 图 5 显示在两侧海绵体神经轴索显微外科手术术后 NTN mRNA 在阴茎中的表达相对无变化。

结果 5

在 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠的阴茎神经中丧失 NADPH 心肌黄酶染色

在对野生型和 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠的阴茎干和阴茎脚的近体侧部分进行组织化学检测时注意到了注意到了一种清晰的 NADPH-阳性神经纤维的独特样式。 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠在背根神经中的 NADPH 阳性纤维很少，而在野生型小鼠中的纤维密度和在大鼠中报道的类似（Jung, 1998）（图 6A, B 和 E）。在供给阴茎脚海绵体血管的神经中染色样式没有明显的差别（图 6C 和 D）。但是在阴茎脚中血管周围区域外 NADPH-阳性纤维显著减少（图 6C, D 和 E）。

结果 6

GDNF mRNA 在成年大鼠阴茎干中的表达

用 ^{35}S 标记的 GDNF 核酸探针杂交后得到的组织切片的放射性自显影图见图 7A。在位于白膜和可勃起组织之间边界的细胞层见到了很强的信号（图 7A, C），而在用有义探针杂交时在切片中没有可探测的信号（图 7B）。苏木精染色揭示表达 GDNF mRNA 的细胞有明显的细胞核（图 7C）。用抗波形纤维蛋白或 S100beta 的抗体对相邻的切片进行染色揭示在这些细胞中存在免疫反应性（图 7D, E），而用抗 PGP 9.5 和平滑肌 α 肌动蛋白的抗体进行染色表明在这些细胞中没有免疫反应性（数据未出示）。

结果 7

GDNF mRNA 在其它骨盆器官中的表

在阴茎中见到了 4.4kb 的单一 GDNF 转录物（图 8）。而在膀胱，输精管，结肠，前列腺或精囊中没有可探测的信号。注射 200ng ^{125}I -GDNF 到两个海绵体后 24 小时阴茎投射神经元中 ^{125}I -GDNF 的逆向输送，放射性自显影揭示在 MPG 和 S1 DRG 中都有标记（图 10A, C）。在感觉神经节中，在中等大小和大的神经元中见到了较高比率的标记，尽管放射自显影的分辨率有限，但银颗粒簇提示标记完全存在于神经细胞体中。为了显示输送的特异性，同样量的 ^{125}I -GDNF 与过量未标记的 GDNF 一起注射。这阻断了向 MPG 和 DRG 的逆向输送（图 10B, D 和图 9）。图 9 显示海绵体内注射 ^{125}I -GDNF 后只有在神经分布于阴茎的神经节，即 MPG 和 S1 DRG，中检测到显著量的放射性。为了

排除过量蛋白的阻断效应, ^{125}I -GDNF 也与过量的细胞色素 c 一起注射。这并未影响 ^{125}I -GDNF 的逆向输送。

结果 8

5 放射标记的 GDNF 的生物学活性

^{125}I -GDNF 和初始的 GDNF (1ng/ml) 在小鼠胚胎三叉神经节中诱导的神经突生长可比 (图 11A 和 B), 而无 GDNF 培养时在对照神经节中没有神经突生长 (图 11C)。在所有的测试浓度 ^{125}I -GDNF 和非放射性的 GDNF 的神经突生长促进活性都相似 (1-20ng/ml, 数据未出示)。

结果 9

NT-3, NGF 和 BDNF mRNA 在成年大鼠阴茎干中的表达

通过原位杂交 (数据未出示) 和 Northern 印迹 (图 13) 在成年大鼠阴茎干见到了 NT-3 和 NGF mRNA 在成年大鼠阴茎中的表达

结果 10

NGF, BDNF, 和 NT-3 在阴茎神经元中的逆向输送

注射到阴茎干后, 所有被研究的蛋白都被输送到支配成年大鼠阴茎的感觉神经节, 这意味着存在功能受体。只有 NT-3 被输送到主要骨盆神经节 (图 14A-C)。

结果 11

25 GFR α 3 mRNA 在 MPG 和 S1 DRG 中的表达

在成年大鼠的 MPG 中, GFR α mRNA 在大多数大的, 即非阴茎投射的短肾上腺素能神经元中表达 (Dial 1996), 但是仅在一些小的, 即胆碱能神经元 (图 12A) 中表达, 而 Ret mRNA 的表达在整个神经节都可以见到 (图 12B)。因此, GFR α 3 mRNA 在 $5.3 \pm 2.6\%$ 的阴茎投射, 即 FG-阳性的, MPG 神经元中表达 (平均值 $\pm$ 标准偏差, 在三只大鼠中单侧定量了 FG-标记的神经元, $n=414$)。在 S1 DRG 内, 在小的和中等大小的细胞中优先看到 GFR α 3 mRNA 的表达 (图 12C),

并在 $45.6 \pm 6.3\%$ 的阴茎投射神经元中检测到了 $GFR\alpha 3$ mRNA 的表达(图 12D, E) (平均值 $\pm$ 标准偏差, 在三只大鼠中单侧定量了 FG-标记的神经元, $n=505$)。

5 附图的详细描述

图 1. NTN mRNA 在阴茎干中的表达。如放射性自显影的暗场图所示, 可以在背部动脉(小箭头), 背部静脉(大箭头)和海绵体的血管和平滑肌(cc)中见到杂交。星号标出尿道, 箭头指向背部神经并且插图代表在海绵体内血管中的杂交。[定标线条: 1mm; 插图, 20 μ m]

图 2. NTN 受体成分的 mRNA 在 MPG 中的表达。(A-C)相邻切片的暗场影像表明 Ret, $GFR\alpha 2$ 和 $GFR\alpha 1$ mRNA 的信号几乎无所不在。(C)点描的圈标出富含阴茎投射神经元的区域。在该区域中 $GFR\alpha 1$ 的信号弱一些。(D和E)箭头指出用 FG(D)和 $GFR\alpha 2$ 探针(E)一起标记的 MPG 神经元。[定标线条: A-C, 150 μ m; D和E, 50 μ m]

图 3. NTN mRNA 在成年大鼠骨盆器官中表达的 Northern 印迹分析。 ^{32}P -标记的 NTN 探针与来自所标明的组织的 mRNA (3 μ g/泳道)的印迹杂交。脑被用作阳性对照。GAPDH 探针的杂交指示上样量。

图 4. ^{125}I -NTN 从阴茎干向 MPG 和 DRG 的逆向轴突输送。(A和C)放射性自显影显示将 ^{125}I -NTN (400ng) 注射到海绵体 24 小时后在 MPG (A) 和 S1 DRG (C) 的神经元细胞体的点状信号。(B和D)过量的未标记的 NTN 阻断了 ^{125}I -NTN 向 MPG (B) 和 S1 DRG (D) 的逆向输送。(E和F) 胎龄 13 天的鼠三叉神经节在存在(E)和不存在(F) 20ng/ml ^{125}I -NTN 的情况下在胶原凝胶上 3 天后神经突的生成。通过抗神经丝染色目测神经突。(G) ^{125}I -NTN 向成年大鼠 MPG 和不同的 DRGs 逆向输送的定量和特异性。 ^{125}I -NTN 被单独注射到阴茎中, 或与 100 倍过量的未标记 NTN 或细胞色素 c 一起注射。结果用每组的 4 只动物的平均值 $\pm$ SEM 来表示, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (利用 Scheffe's 校正的 ANOVA)。[定标线条: A-D, 100 μ m; E和F, 250 μ m]

图 5. 在两侧海绵体神经轴索显微外科手术(ax)或假手术后成年大鼠阴茎中的 NTN mRNA 的水平。Northern 杂交表明 NTN mRNA 的表达并未受到明显影响。对照为来自未处理的大鼠的 mRNA。每个泳

道相应于收集自 5 只大鼠的 mRNA。用 GAPDH 杂交确认了相同的上样量。

图 6 在 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠和野生型小鼠阴茎中的 NADPH 心肌黄酶组织化学。野生型 (A) 和 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠 (B) 的阴茎干近体侧的横切片。在 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠中背部神经 (箭头) 的染色显著降低。(C 和 D) 在阴茎脚神经纤维的染色明显减少, 虽然在血管周围的影响似乎较小。(E) NADPH 心肌黄酶阳性纤维在背部神经和阴茎脚海绵体中的定量。结果用 4 只野生型和 4 只 $GFR\alpha 2^{-/-}$ 小鼠的平均值 $\pm$ SEM 表示。**, $P<0.01$ (双尾斯氏 t-检验呈现不同的偏差) [定标线条: A-D, 100 μ m]

图 7. 在阴茎干中 GDNF mRNA 的表达 (A, C)。可以在白膜和海绵体之间的边界见到杂交。(C) 更高的放大倍数表明白膜下表达 GDNF mRNA 的细胞具有明显的细胞核, 如苏木精染色所揭示。(B) 与有义探针温育的切片的暗场影像显示没有杂交。(D 和 E) 用抗波形纤维蛋白 (D) 或 S100beta (E) 的抗体染色的相邻切片揭示在白膜下细胞中存在免疫反应性。星号标出尿道, 箭头指向背部神经, cc, 海绵体; ta, 白膜。[定标线条: A 和 B, 1mm; C-E, 50 μ m]

图 8 在成年大鼠骨盆器官中 GDNF mRNA 表达的 Northern 印迹分析。一个 ^{32}P -标记的 GDNF 探针与来自所标示的组织的 mRNA 的印迹杂交 (3 μ g/泳道)

图 9 ^{125}I -GDNF 向成年大鼠 MPG 和不同 DRGs 逆向输送的定量和特异性。 ^{125}I -GDNF 被单独注射到阴茎中或者与 100 倍过量的未标记 NTN 或细胞色素 c 一起注射。结果用每组 4 只动物的平均值 $\pm$ SEM 表示。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (利用 Scheffe's 校正的 ANOVA)。

图 10. ^{125}I -GDNF 从阴茎干向 MPG 和 DRG 的逆向轴突输送。(A 和 C) 放射性自显影显示将 ^{125}I -GDNF (400ng) 注射到海绵体 24 小时后在 MPG (A) 和 S1 DRG (C) 的神经元细胞体的点状信号。(B 和 D) 过量的未标记的 GDNF 阻断了 ^{125}I -GDNF 向 MPG (B) 和 S1 DRG (D) 的逆向输送。[定标线条: A-D, 100 μ m]

图 11. (A 和 B) 胚龄 13 天的小鼠三叉神经节在存在 1ng/ml ^{125}I -GDNF (A), GDNF (B) 和不存在神经营养因子 (C) 的情况下在胶原凝胶上 3 天后神经突的生成。通过抗神经丝染色显示神经突。[定

标线条: A - C, 500 μ m]

- 图 12. GFR α 3 和 Ret mRNA 在成年大鼠 MPG, 以及 GFR α 3 mRNA 在 S1 DRG 中的表达。(A, B) 相邻切片的暗场影像显示 GFR α 3 和 Ret 在 MPG 中的明显信号。GFR α 3 信号主要在大的神经元中被见到 (A), 而 Ret 信号在整个神经节中被见到 (B)。在 A 中的插图代表用 GFR α 3 探针杂交的 MPG 切片的亮场影像。箭头指向不表达 GFR α 3 mRNA 的小神经元。(C) 暗场影像显示在 S1 DRG 神经元中的 GFR α 3 信号。(D, E) 小箭头指示 FG (D) 和 GFR α 3 探针 (E) 同时标记的 S1 DRG 神经元。箭头指向一个 FG 标记的神经元 (D), 该神经元不表达 GFR α 3 mRNA (E) [定标线条, (A - C) 250 μ m; (D, E) 50 μ m]

图 13 NGF, BDNF 和 NT-3 mRNA 在成年大鼠骨盆器官中表达的 Northern 印迹分析。³²P 标记的探针与来自所标明组织的 mRNA 的印迹杂交。(3 μ g/泳道)。大脑被用作阳性参照。GAPDH 探针的杂交指示上样量。

- 图 14 ¹²⁵I - NGF, - BDNF 和 NT-3 向成年 MPG 和不同的 DRG 逆向输送的定量和特异性。碘化的神经营养蛋白被单独注射到阴茎, 或者与 100 倍过量的未标记神经营养蛋白或细胞色素一起注射。

参考文献

- Airaksinen, M.S. 等分子细胞神经科学 (Mol Cell Neurosci) 13 (1999) 313-325
- 5 Andersson, K.E. 和 Wagner, G. 生理学综述 (Physiol Rev) 75 (1995) 191-236.
- Arenas, E. 等神经元 (Neuron) 15 (1995) 1465-1473.
- Arumae, U. 等细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 122 (1993) 1053-1065.
- Baloh, R.H. 等神经元 (Neuron) 18 (1997) 793-802.
- 10 Baloh, R.H. 等神经元 (Neuron) 21 (1998) 1291-1302.
- Barbacid, M. 细胞生物学最新动态 (Curr Opin Cell Biol) 7. (1995) 148-155.
- Batra, A.K. & Lue, T.F. (1991) 于阳痿:男性勃起功能障碍的诊断和治疗 (Impotence: Diagnosis and Management of Male Erectile Dysfunction), eds. Kirby, R.S., Carson, C.C., Webster, G.D. (Butterworth Heinemann, London), pp. 19-26.
- 15 Bolton, A.E. 和 Hunter, W.M. 生物化学杂志 (Biochem J) 133 (1973) 529-539.
- Buj-Bello, A. 等神经元 (Neuron) 15 (1995) 821-828.
- 20 Burnett, A.L. 等科学 (Science), 257 (1992) 401-403.
- Burnett, A.L. (1995) Biol. Reprod. 52, 485-489.
- Cacalano, G. 等神经元 (Neuron) 21 (1998) 53-62.
- Canzian, F. 等 (1995) 哺乳动物基因组 (Mamm. Genome) 6, 433-435.
- 25 Chomczynski, P. and Sacchi, N. Ana Biochem 162 (1987) 156-159.
- Dail, W.G. (1993) 于尿殖系统的神经控制 (Nervous Control of the Urogenital System) ed. Maggi, C.A. (Harwood Academic Publishers, Chur), pp. 69-101
- 30 Dail, W.G. Microsc Res Tech 35 (1996) 95-106.
- Dail, W.G. 等细胞组织研究 (Cell Tissue Res) 282 (1995) 109-116.

- Dail, W.G. 等 (1989) *J. Auton. Nerv. Syst.* 28 , 251-257.
- Davies, A.M. *神经生物学杂志 (J Neurobiol)* 25 (1994) 1334-1348.
- de Groat, W.C. 和 Booth, A.M. In C.A. Maggi (Ed.), *尿殖系统的神经控制 (Nervous Control of the Urogenital System)*, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 1993, pp. 467-524.
- 5 Ding, Y. 等 (1993) *神经科学快报 (Neurosci. Lett.)* 164, 187-189.
- Eardley, I.K. In R.S.C.C.W.G.D. Kirby (Ed.), *阳痿: 男性勃起功能障碍的诊断和治疗 (Impotence: Diagnosis and Management of Male Erectile Dysfunction)*, Butterworth Heinemann, 1991
- 10 Ebendal, T. In R.A. Rush (Ed.), *神经生长因子 (Nerve Growth Factors)*, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, UK, 1989, pp. 81-93.
- Ebendal, T. 等 *神经科学杂志 (J Neurosci Res)* 40 (1995) 276-
- 15 284.
- Enomoto, H. 等 *神经元 (Neuron)*, 21 (1998) 317-324.
- Ermisch, B. 和 *临床神经病学 (Schwechheimer, K. Clin Neuropath)* 14 (1995) 130-136.
- Griffin, W.S. 等 *神经化学杂志 (J Neurochem)* 65 (1995) 228-233.
- 20 Golden, J.P. 等 (1998) *3. Comp. Neurol.* 398, 139-150.
- Haimoto, H. et al *Lab Invest* 57 (1987) 489-498.
- Harper, S.J. 等 (1999) *实验神经学 (Exp. Neurol.)* 155, 327-330.
- Hefti, F. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37 (1997) 239-267.
- Henderson, C.E. *神经生物学最新动态 (Curr Opin Neurobiol)* 6
- 25 (1996) 64-70.
- Henderson, C.E. 等 *科学 (Science)*, 266 (1994) 1062-1064.
- Heuckeroth, R.O. 等 *神经元 (Neuron)* 22 (1999) 253-263.
- Hiltunen, J.O. 等 *Circ Res* 79 (1996) 930-939.
- Horger, B.A. 等 (1998) *神经科学杂志 (J. Neurosci.)* 18,
- 30 4929-4937.
- Ishii, D.N. (1993) *于神经营养因子 (Neurotrophic Factors)*, eds. Loughlin, S.E. & Fallon, J.H.

- (Academic Press, London), pp.415-442.
- Jing, S. 等 (1996) 细胞 (Cell) 85, 1113-1124.
- Jing, S. 等 生物化学杂志 (J. Biol Chem) 272 (1997) 33111-33117.
- Jung, G.-W. 等 (1998) 3. Urol. (Baltimore) 160, 1899-1904.
- 5 Keast, J.R. and de Groat, W.C. J Comp Neurol 288 (1989) 3877-400
- Klein, R. 等 (1990). 细胞 (Cell) 61, 647-656.
- Klein, R.D. 等 (1997) 自然 Nature (London) 387, 717-721.
- Klinge, E. & Sjöstrand, N.O. (1994) 于实验药物手册 (Handbook
10 of Experimental Pharmacology), Vol
111, eds. Szekeres, L. & Gy Papp, 3. (Springer, Heidelberg),
pp. 533-573.
- Kotzbauer, P.T. 等自然 (Nature), 384 (1996) 467-470.
- Lamballe, F. 等 (1993) EMBO 杂志 (Journal) 12, 3083-3094.
- 15 Lapchak, P.A. 等实验神经学 (Exp Neurol) 145 (1997) 309-321.
- Leader, M. 等组织病理学 (Histopathology), 11(1987) 63-72.
- Lin, L.F. 等科学 (Science), 260 (1993) 1130-1132.
- Maisonpierre, P.C. 等 (1991). 基因组学 (Genomics) 10, 558-568.
- Marchalonis, J.J. (1969) 生物化学杂志 (Biochem.) J. 113,
20 299-305.
- Merho, J.P. 等 (1992) 神经科学 (Neuroscience) 51, 513-532.
- Middlemas, D.S. et al (1991). 分子细胞生物学 (Mol Cell Biol)
11, 143-153.
- Milbrandt, J. 等神经元 (Neuron), 20 (1998) 245-253.
- 25 Moore, M.W. 等自然 (Nature), 382 (1996) 76-79.
- Naveuhan, P. 等 (1998) 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. A.) 95, 1295-1300.
- Nishino, J. 等神经元 (Neuron) 23 (1999) 725-736
- Oppenheim, R.W. 等自然 (Nature) 373 (1995) 344-346.
- 30 Pichel, J.G. 等定量生物学冷泉港研讨会 (Cold Spring Harbor
Symposia on Quantitative Biology), 61(1996)
445-457.

- Pirvola, U. et al (1994). 听力研究 (Hear Res) 75, 131-144.
- Pirvola, U. 等 (1992). 美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA) 89, 9915-9919.
- Quinlan, D.M. 等 J Urol 141 (1989) 656-661.
- 5 Reeben, M. 等 (1998) 神经科学 (Neuroscience) 83, 151-159.
- Rosenthal, A. (1999) 神经元 (Neuron) 22, 201-203.
- Rossi, J. 等 (1999) 神经元 (Neuron) 22, 243-252.
- Sanchez, M.P. 等自然 (Nature), 382 (1996) 70-73.
- Sanicola, M. 等美国国家科学院院刊 (Proc Nati Acad Sci USA)
- 10 94 (1997) 6238-6243.
- Sariola, H. 等 (1994). 胚胎实验形态学杂志 (J Embryol Exp Morph)
- Shelton, D.L. & Reichardt, L.F. (1986) 细胞生物学杂志 (J. Cell Biol.) 102, 1940-1948.
- 15 Skalli, O. 等 J Cell Biol 103 (1986) 2787-2796.
- Skaper, S.D. 等分子细胞神经科学 (MolCell Neurosci) 12 (1998) 179-193.
- Suvanto, P. 等人类分子遗传学 (Hum Mol Genet) 6 (1997) 1267-1273.
- 20 Te, A.E. 等 (1994) J. Urol. (Baltimore) 152, 2167-2172.
- Thompson, R.J. 等 大脑研究 (Brain Res) 278 (1983) 224-228.
- Tomac, A. 等自然 (Nature) 73 (1995) 335-339.
- Trupp, M. 等细胞生物学杂志 (J Cell Biol) 130 (1995) 137-148.
- Trupp, M. 等 (1998) 分子细胞神经科学 (Mol. Cell. Neurosci.)
- 25 11, 47-63.
- Tso, J.Y. 等. 核酸研究 (Nud Acids Res) 13 (1985) 2485-2502.
- Tsoufas, P. 等 (1993). 神经元 (Neuron) 10, 975-990.
- Valenzuela, D.M. 等 (1993). 神经元 (Neuron) 10, 963-974.
- Ylikoski, J. 等 (1993). 听力研究 (Hear Res) 65, 69-78.
- 30 Yu, T. et al (1998) 神经科学杂志 (J. Neurosci.) 18, 4684-4696.
- Walsh, P.C. 和 Donker, P. J Urol 128 (1982) 492-497.
- Widenfalk, J. 等 (1997) 神经科学杂志 (J. Neurosci.) 17,

8506-8519.

Wilkinson, D.G. 和 Green, J. In A.J. Copp and D.L. Cockroft (Eds.),

植入后哺乳动物胚胎：实际操作规程 (Postimplantation Mammalian
5 Embryos: A Practical Approach), IRL Press., Oxford,
1990, pp. 155-171.

Yan, Q. 等自然 (Nature), 373 (1995) 341-344.

说明书附图

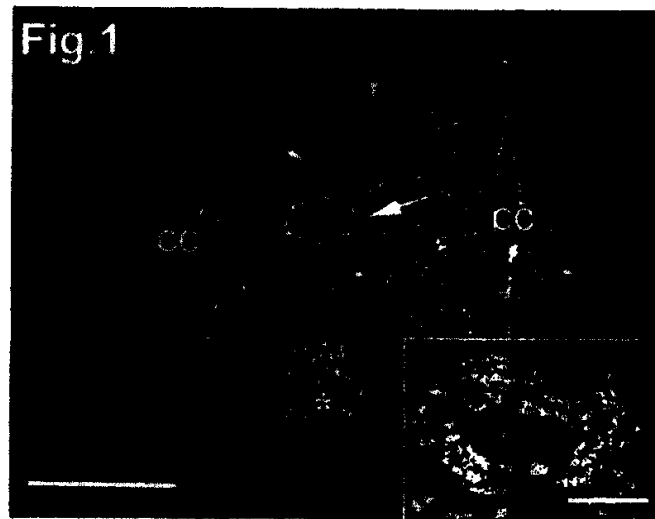


图 1

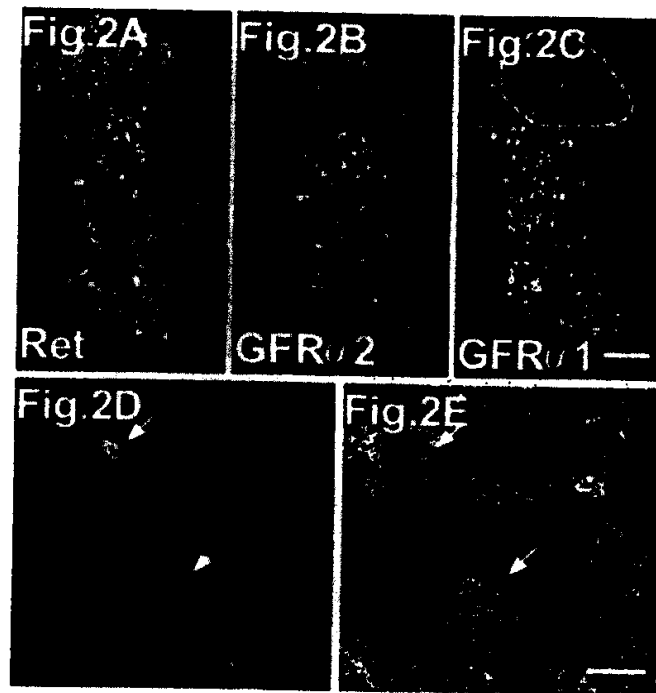


图 2

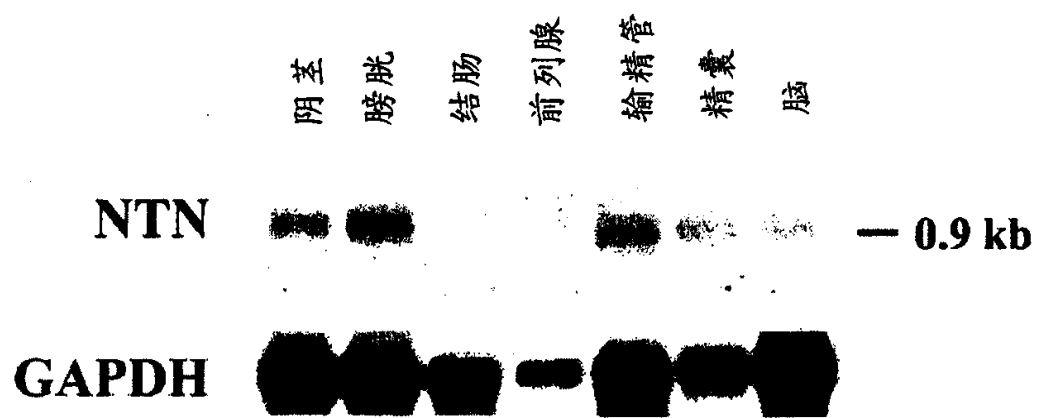


图 3

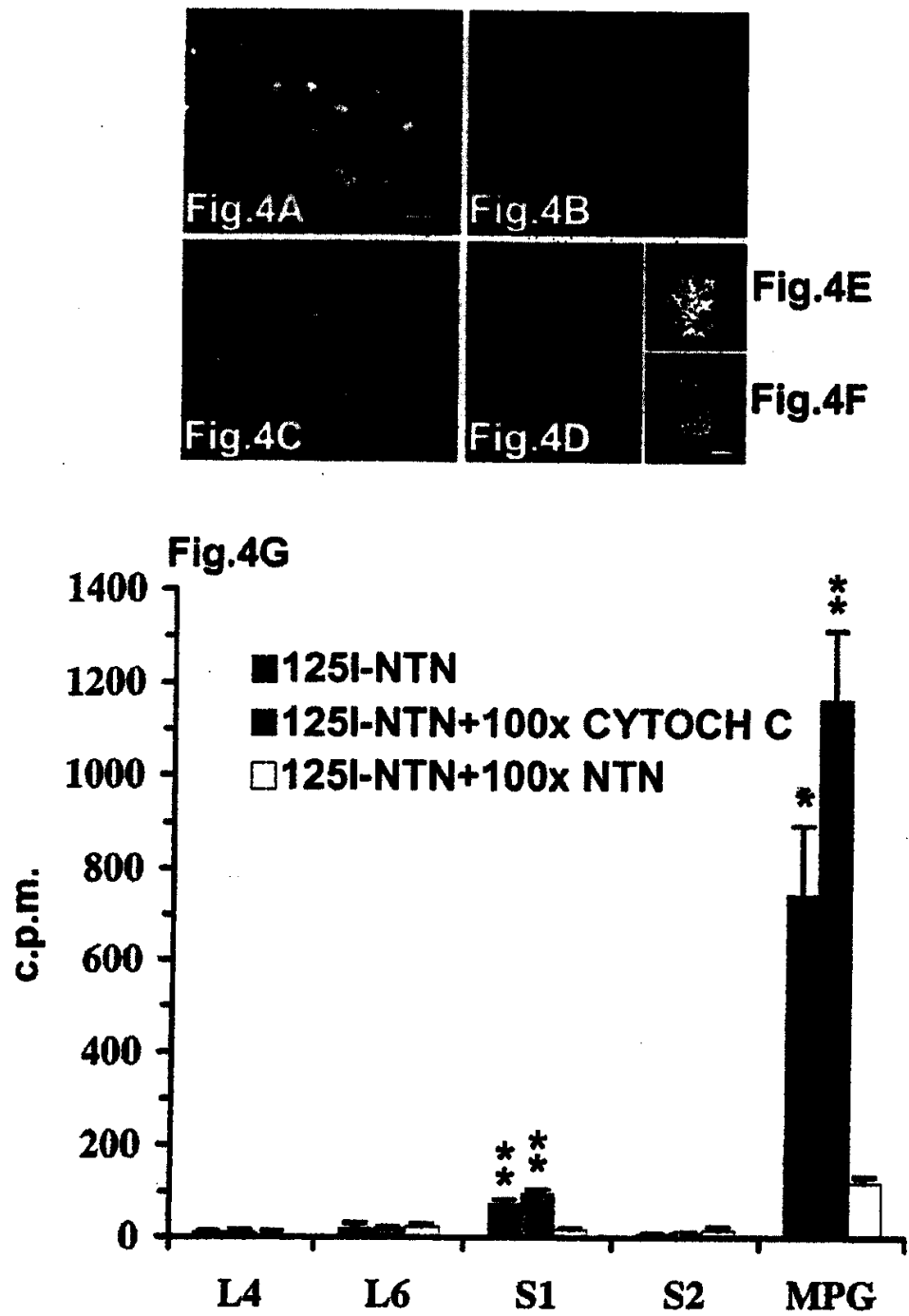


图 4

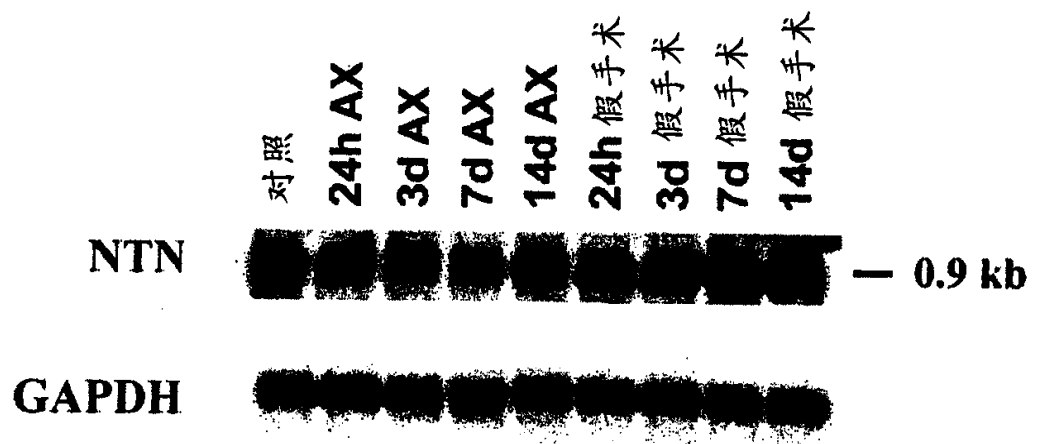


图 5

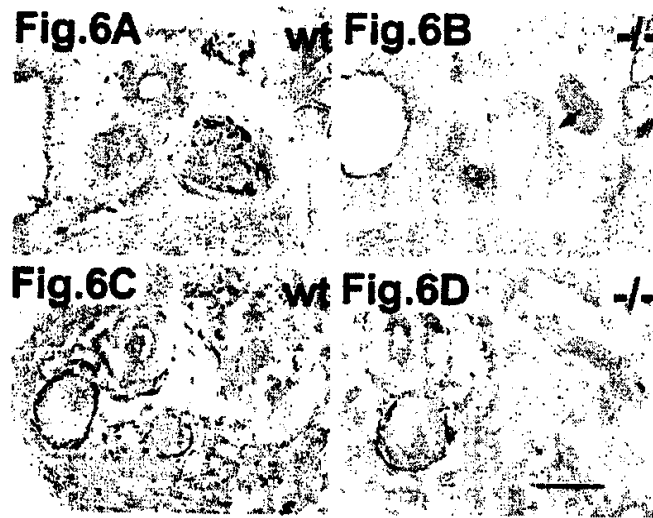


Fig. 6E

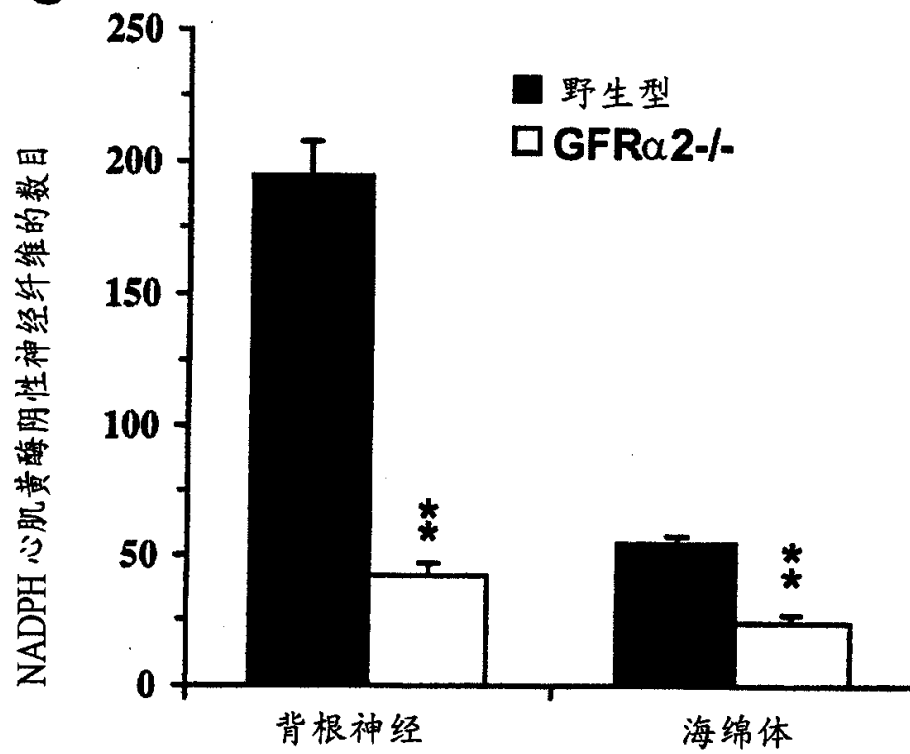


图 6

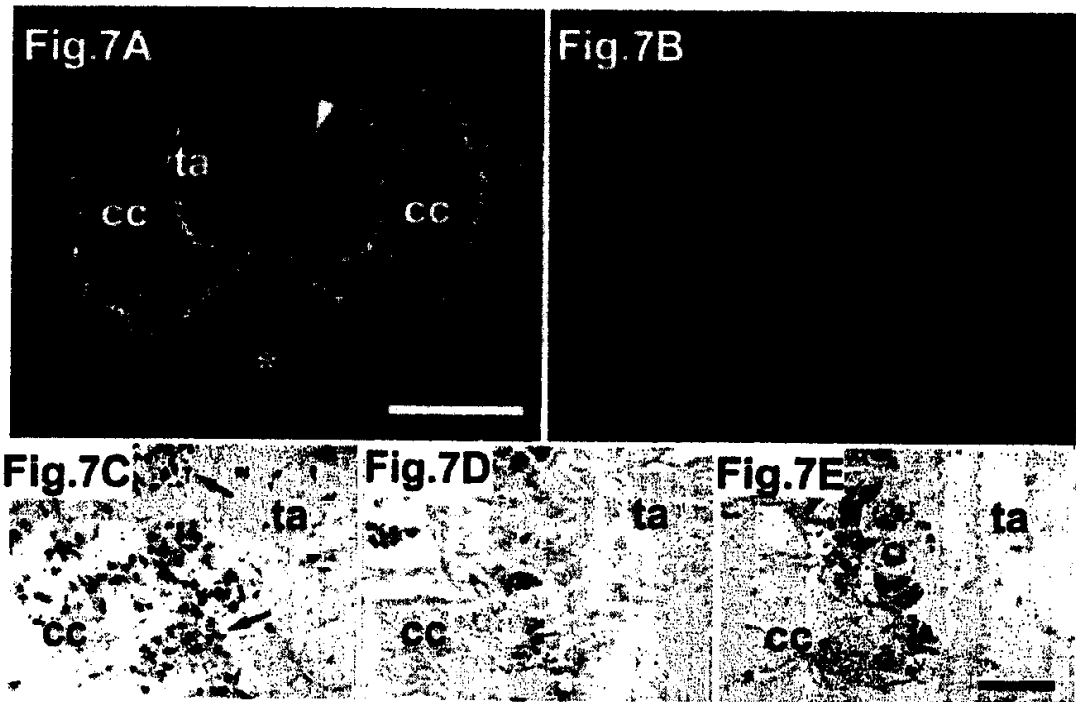


图 7

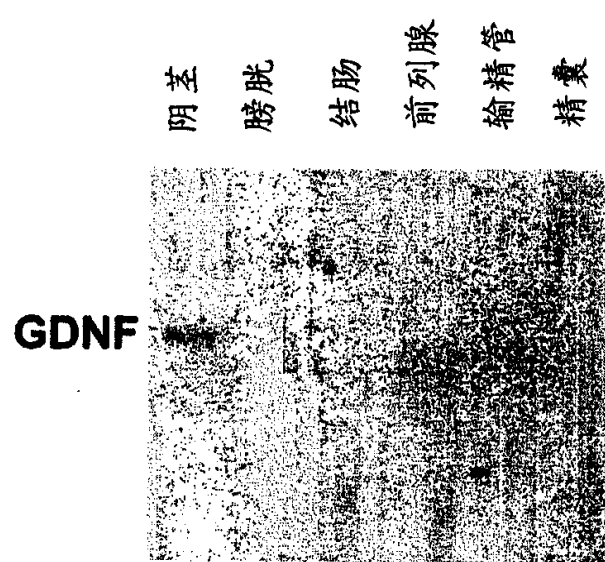


图 8

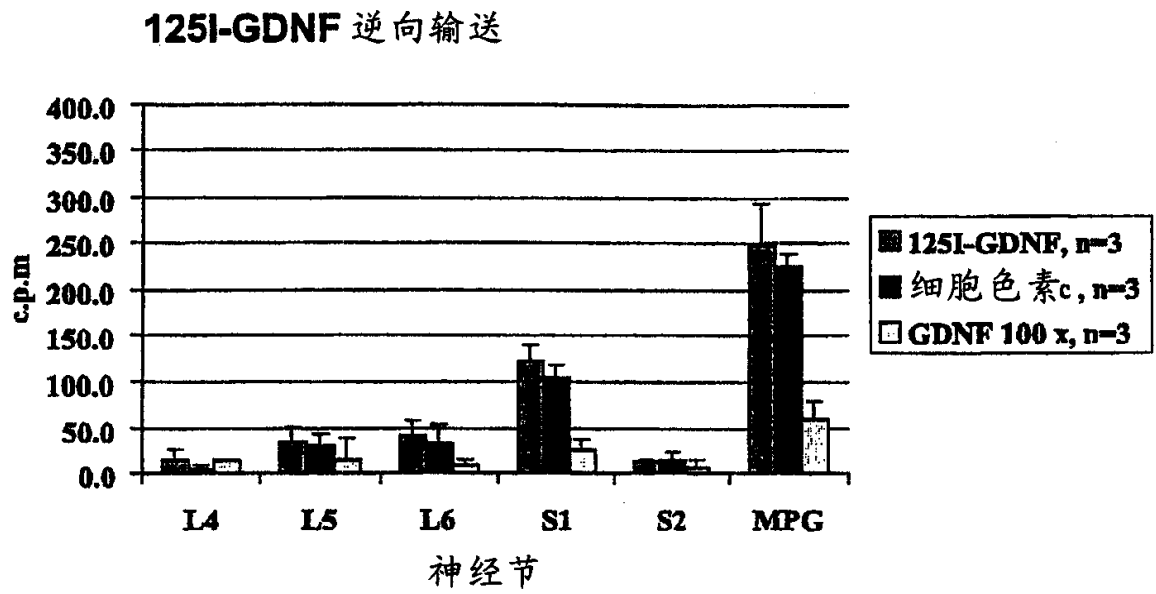


图 9

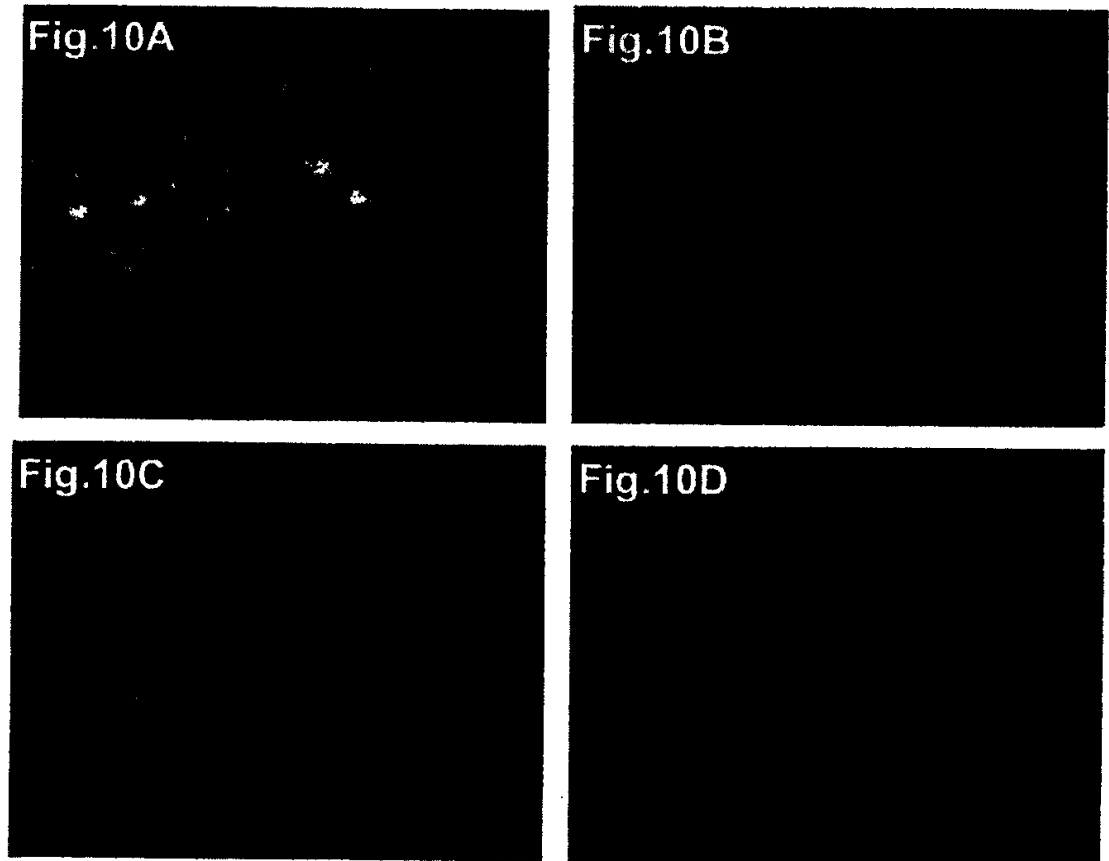


图 10

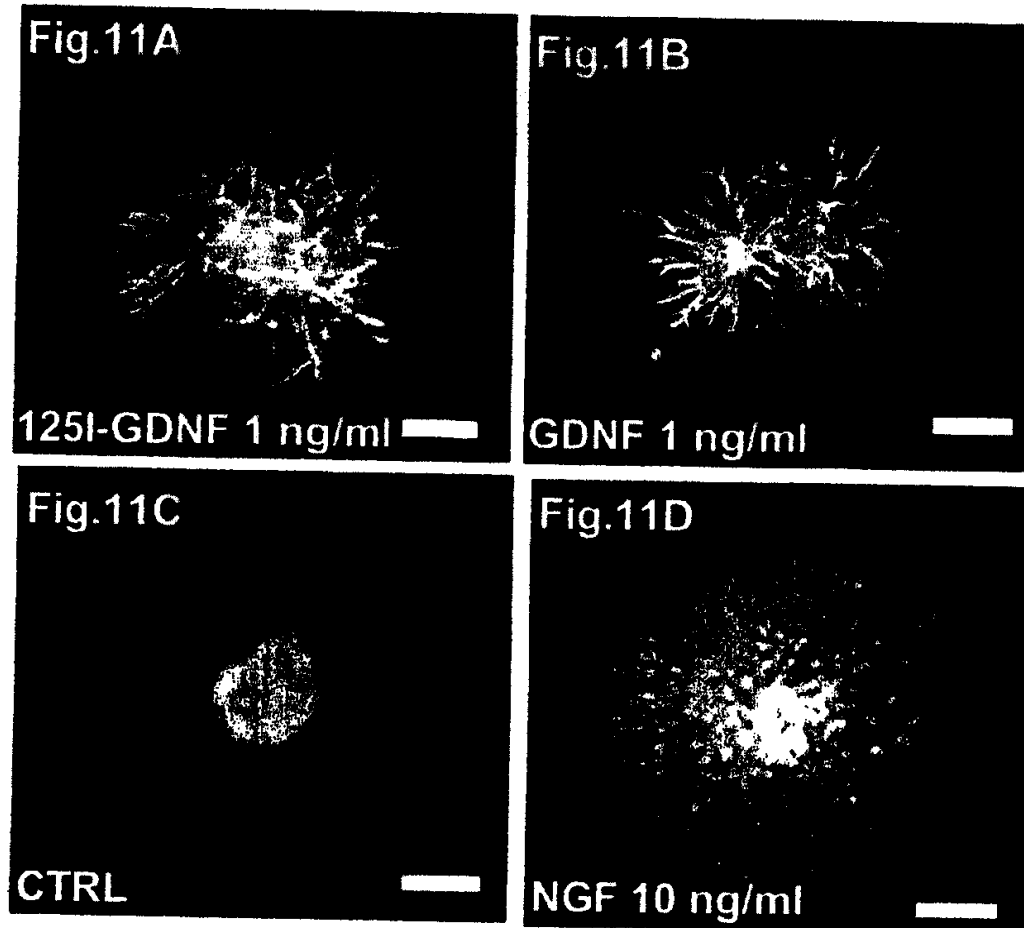


图 11

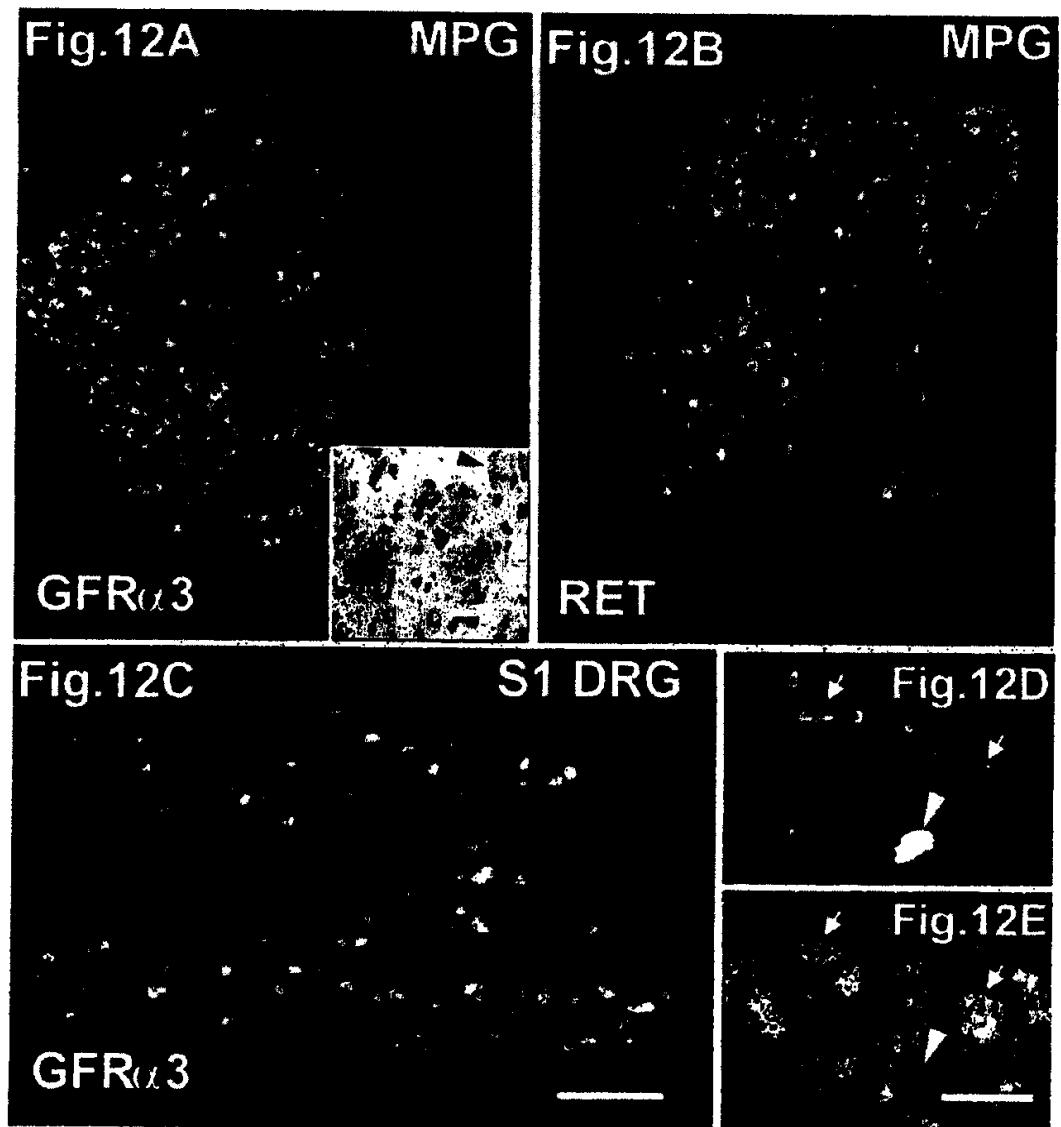


图 12

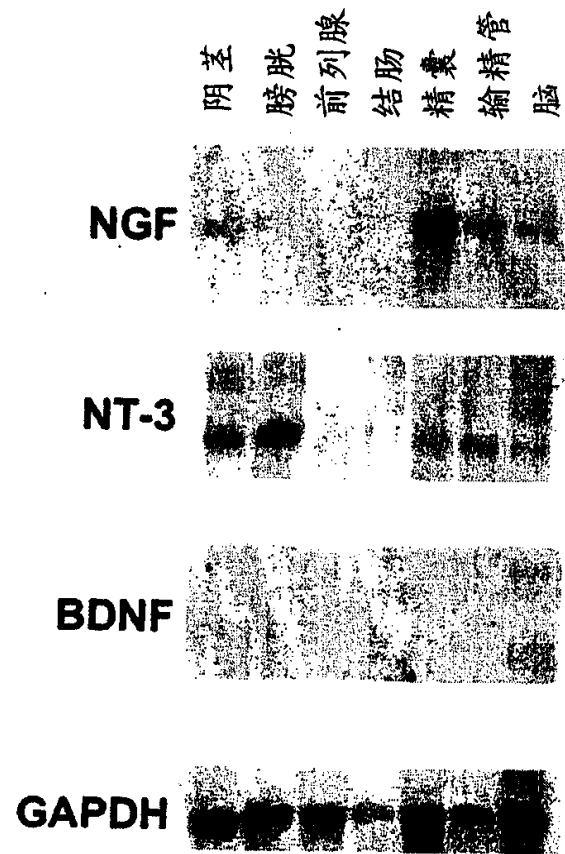


图 13

125I-NGF 逆向输送

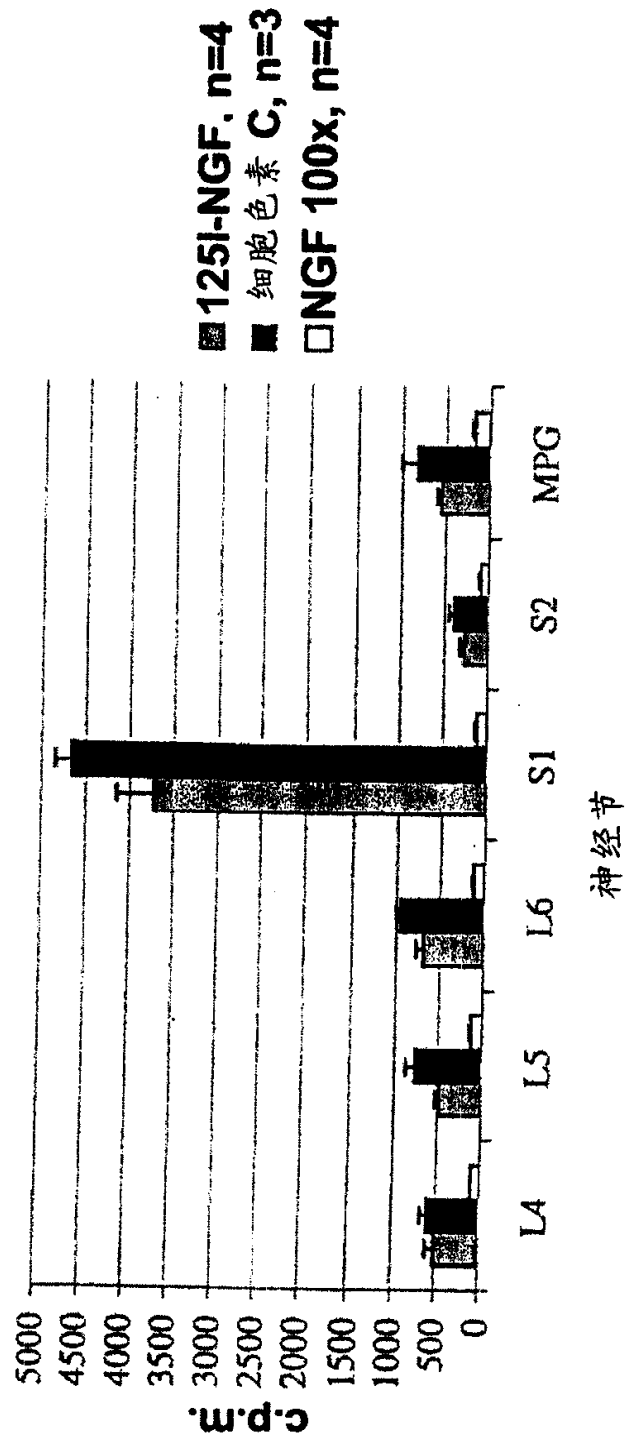


图 14A

125I-NT-3 逆向输送

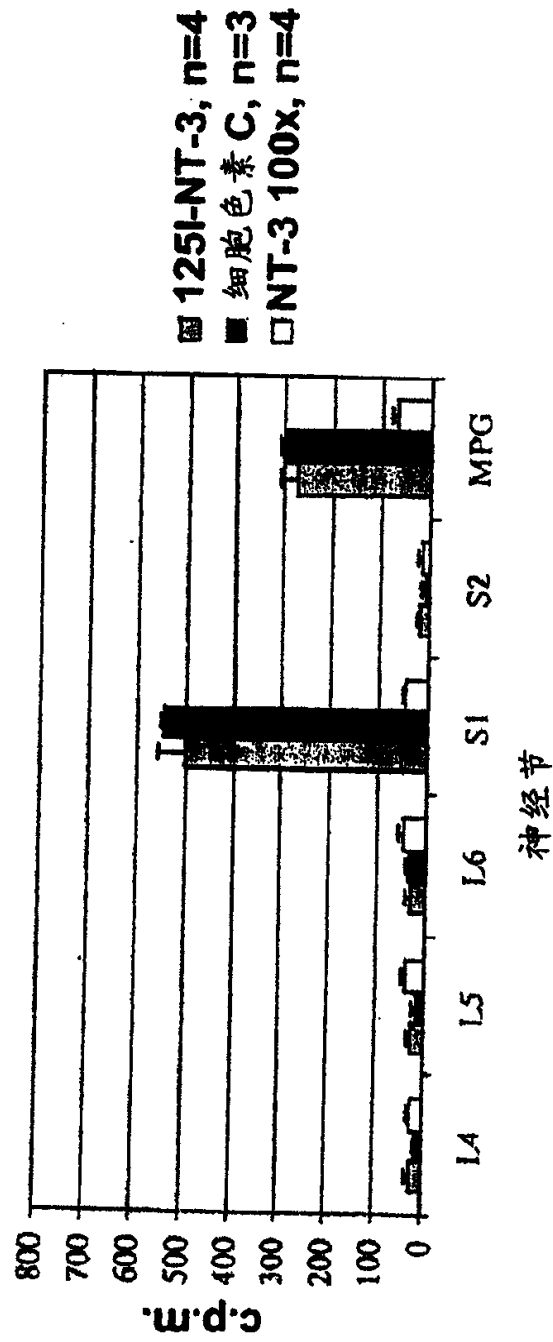


图 14B

125I-BDNF 逆向输送

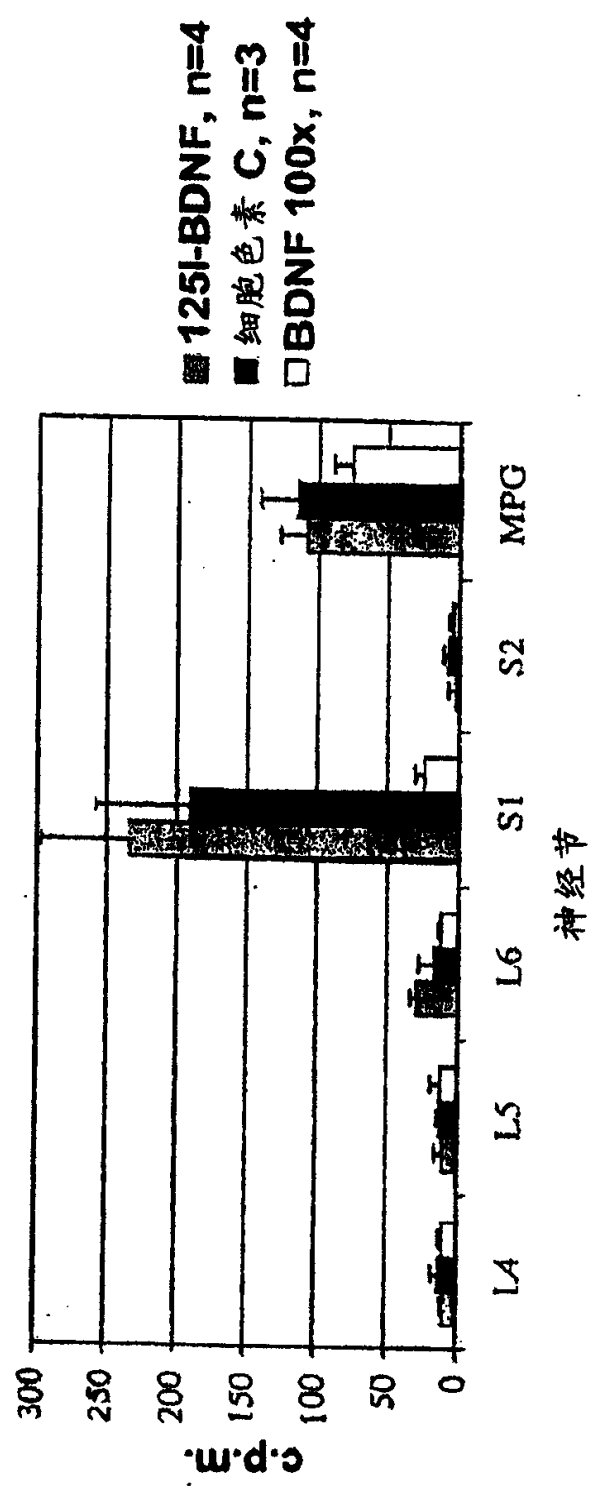


图 14C