



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 92114650.7

[51] Int.Cl⁵

G01N 33 / 50

[43] 公开日 1993 年 6 月 16 日

[22]申请日 92.11.12

[30]优先权

[32]91.11.12 [33]US [31]790,857

[71]申请人 里珍纳龙药品有限公司

地址 美国纽约州

[72]发明人 C·A·阿尔塔 P·迪斯蒂芬诺

S·韦冈 N·叶 C·希曼

R·文蒂米格利亚

R·林赛

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

G01N 33 / 532 A61K 39 / 395

A61K 43 / 00

说明书页数: 59

附图页数: 24

[54]发明名称 基于组织的特定的 NT-3 表达与受体结合的治疗和诊断方法

[57]摘要

本发明提供了一种基于人类 NT-3 表达的医疗及诊断方法,尤其是治疗阿耳茨海默氏病、杭廷顿氏病以及外周神经系统失调或疾病的潜能。本发明还在多巴胺能神经元种群上提供 NT-3 的促存活作用。本发明另外还提供了依靠在中枢及周围神经系统中逆向传输的 NT-3 的能力的医疗及诊断的应用。

< 35 >

权 利 要 求 书

1. 一种用来分析在有神经性疾病的组织中 NT-3 受体分布的方法，该方法包括：

a) 用一种特定结合到 NT-3 受体上的可探测的化合物接触有神经性疾病的组织；和

b) 测定可探测的 NT-3 化合物与有神经性疾病的组织的结合，其中结合表明在有神经性疾病的组织中 NT-3 受体的存在。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中可探测化合物是用放射性同位素、不透 X 射线的化合物、氟或酶作标记的 NT-3。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中可探测的化合物是用放射性同位素、不透 X 射线的化合物、氟或酶作标记的抗体。

4. 根据权利要求 1 的方法，该方法是在体外活检或尸检样品上进行的。

5. 根据权利要求 1 的方法，该方法在体内实施。

6. 一种用来分析有神经性疾病的组织中的 NT-3 表达的方法，该方法包括：

a) 用一种特定结合于 NT-3 的可探测的化合物接触有神经疾病的组织；和

b) 测定可探测的 NT-3 化合物与有神经性疾病的组织的结合，其中结合表示了有神经性疾病的组织的 NT-3 表达。

7. 根据权利要求 6 的方法，其中可探测化合物是一种用放射性同位素、不透 X 射线的化合物、氟或酶作标记的抗体。

8. 根据权利要求 6 的方法，其中该方法在体外活检或尸检

样品上实施。

9. 根据权利要求 6 的方法，该方法在体内实施。

基于组织的特定的 NT-3 表达
与受体结合的治疗和诊断方法

本发明涉及 NGF/BDNF/NT-3/NT-4 基因族的一员——神经营养因子-3 (NT-3) 以及在神经病症的疗法中利用神经营养因子-3 的治疗和诊断方法。

神经营养因子在脊椎动物的神经系统的发育和维持中起着重要的作用，它们支持着神经元的存活和分化。广布的神经元细胞的死亡伴随着中枢神经系统 and 外周神经系统的正常发育，并且显然在调节向一个给定的靶区 (target field) 投射的神经元的数目方面起着决定性的作用 (Berg, D. K., 1982, *Neuronal Development* 297—331; Cowan et. al., 1984, *Science* 225 : 1258—1265)。外周靶组织在发育期间的脱离和移植的研究已经显示了，神经元细胞的死亡是起因于为了限制在其投射区产生的神经营养因子的数量而在神经元之间的竞争。

已经确认的神经营养因子的一族包括 β -神经生长因子 (NGF)、脑衍生 (brain-derived) 神经营养因子 (BDNF)、神经营养因子-3 (NT-3, 也称为海马衍生神经营养因子, HDNF) 和神经营养因子-4 (NT-4)。神经生长因子 (NGF) 是具有最优特性的神经营养因子 (Levi-Montalcini and Angeletti, 1968, *Physiol, Rev.* 48 : 534—569; Thoenen and Barde, 1980, *Physiol Rev.* 60 : 1284—13335)。已经发现雄小鼠下颌腺是一种允许进行提纯的神经生长因子 (NGF) 的丰富的资源并对小鼠的 NGF

的氨基酸顺序进行了分析 (Angelitti, et al. , 1973, *Biochemistry* 12 : 100—115) 以及对小鼠与人的 NGF 的脱氧核糖核酸 (DNA) 顺序进行了分析 (Scott, et al. , 1983, *Nature* 302 : 538—540; Ullrich, et al. , 1983, *Nature* 303 : 821—825)。小鼠的 NGF 与人的 NGF 的比较显示了蛋白质是储存在动物之中的并且为了支持这一点, 同类型的 NGF 的活性已经从几个物种中分离了出来 (Harper and Thoenen, 1981, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21 : 205—229)。接着, 确定了公牛的 NGF 的 DNA 顺序 (Meier, et al. , 1986, *EMBO J.* 5 : 1489—1493), 小鸡的 NGF 的 DNA 顺序 (Meir et al. , 1986, *EMBO J.* 5 : 1489—1493; Ebbendal, et al. , 1986, *EMBO J.* 5 : 1483—1487; Wion, et al. , 1986 *FEBS Letters* 203 : 83—86); 眼镜蛇的 NGF 的 DNA 的顺序 (Selby, et al. , 1987, *J. Neurosci. Res.* 18 : 293—298); 大鼠的 (rat) 的 NGF 的 DNA 顺序 (Whittemore, et al. , 1988, *J. Neurosci. Res.* 20 : 403—410); 豚鼠的 NGF 的 DNA 顺序 (Schwartz, et al. , 1989, *Neurochem.* 52 : 1203—1209)。

首先从猪的脑中分离出了脑衍生神经营养因子 (BDNF) (Barde, et al. , 1982, *EMBO J.* 1 : 549—553), 接着从这个组织无性繁殖了一种互补 DNA (cDNA) (Leibrock, et al. , 1989 *Nature* 341 : 149—152; PCT application number PCT/US90/04915, filed August 29, 1990)。

具有相似于 NGF 和 BDNF 的结构 NT-3 的基因已经从小鼠中分离出来 (Hohn, et al. , 1990, *Nature*, 344 : 339—341), 也从大鼠中分离出来 (Maisonpierre, et al. , 1990, *Science* 247 : 1446—1451; Ernfors, et al. , 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 5454—5458), 并从人体中分离出来 (Rosenthal, et al. ,

1990, *Neuron* 4 : 767—773; PCT Application No. PCT/US90/04916, filed August 29, 1990, Publication No. WO91/03569; Maissonpierre et al. , 1991, *Genomics* 10 : 558—568)。

这三种因子相互之间具有大约 55% 的氨基酸相似性, 并且最大的顺序差别表现在包含代表每一个蛋白质的氨基酸特色的五个区。

所有这三种因子表达在脑中的特定的神经元的组中, 在海马中观察到所有这三种因子的信使核糖核酸 (mRNA) 的含量最高 (Ayer—LeLievre, et al. , 1988, *Science* 240 : 1339—1341; Ernfors, et al. , 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 5454—5458; Ernfors, et al. , 1990, *Neuron* 5 : 511—526; Whetmore, et al. , 1991, *Neurol*, 109 : 141—152; Hofer, et al. , 1990 *EMBO J.*, 9 : 2459—2464, Phillips et al. , 1990, *Science* 250 : 290—294)。通过 Northern 印迹 (blot) 分析或原位杂交获得的 NT-3 的 mRNA 的定位, 展现了一种异质分布, 并在心脏、脾、皮肤、肠、脑、肺、肝和肌肉中具有高的含量 (Hohn, et al. , 1990, *Nature* 344 : 339—341, Ernfors, et al. , 1990, *Neuron* 5 : 511—526; Maissonpierre, et al. , 1990, *Neuron* 5 : 501—509; Maissonpierre, et al. , 1990, *Science* 247 : 1446—1451)。

正如在外植的小鸡的神经节或分离的神经元培养中离体测量的那样, NGF、BDNF 和 NT-3 支持重叠的和单一的神经元群体组的生长。(Hohn, et al. , 1990, *Nature*, 344 : 339—341; Maissonpierre, et al. , 1990, *Science*, 247 : 1446—1451; Ernfors, et al. , 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 5454—5458; Rosenthal, et al. , 1990, *Neuron* 4 : 767—773)。NGF 支持外周交感神经的感觉神经元和神经脊衍生的感觉神经元的发育和维

持 (reviewed in Thoenen and Barde, 1980, *Physiol. Rev.*, 60 : 1284—1325; Levi-Montalcini, 1987, *Science*, 237 : 1154—1162)。已经观察到 BDNF 支持基板感觉神经元和神经脊衍生的感觉神经元的存活 (Hofer and Barde, 1988, *Nature*, 331 : 261—262)。在脑中, 已经显示了 NGF 支持基底前脑胆碱能神经元 (reviewed in Whitemore and Seiger, 1987, *Brain Res.*, 434 : 439—464; Thoenen et al., 1987, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 105 : 145—178; Ebendal, 1989, *Prog. Growth Factor Res.* 1 : 143—159) 并且也已经显示了 BDNF 刺激这些神经元离体时的存活 (Alderson, et al., 1990, *Neuron* 5 : 297—306)。已经观察到 NT-3 支持某些亚组的中枢神经元和外周神经元的生长和存活 (Maisonpierre, et al., 1990, *Neuron* 5 : 501—509; Maisonpierre, et al., 1990, *Science* 247 : 1446—1451; Rosenthal, et al., 1990, *Neuron* 4 : 767—773; Hohn, et al., 1990, *Nature* 344 : 339—341)。

三种蛋白质的作用通过它们与存在于敏感细胞上的特定受体的相互作用被传递。已经确认酪氨酸蛋白质激酶的 trkA、trkB 和 trkC 成员分别是 NGF、BDNF、和 NT-3 的受体 (trkA : Kaplan, et al., 1991, *Nature* 350 : 158—160; Klein, et al., 1991, *Cell* 65 : 189—197); (trkB : Klein, et al., 1989, *EMBO J.* 8 : 3701—3709; Squinto, et al., *Cell* 65 : 885—893); (trkC : Lamballe, et al., 1991, *Cell* 66 : 967—979)。优先地分别用作 NGF、BDNF 和 NT-3 的高亲和性受体的 trk 蛋白质激酶的存在, 表明了对于这三种神经营养因子的高亲和性的结合部位的唯一的但目前尚不知道的脑分布。尽管, 结合于 trkC—转染 3T3 成纤维细胞的 [¹²⁵I] NT-3 是非常特异的并与这些细胞以高和

低的亲和性相结合 (Lamballe, et al., 1991, Cell 66 : 967—979), 但是, 在本发明之前, 尚未获得有关 [¹²⁵I] NT-3 在脑中或在其它哺乳动物的组织中的结合部位的任何信息。

本发明涉及包含有 NT-3 的靶细胞的神经病症的诊断和治疗方法。本发明描述了 NT-3 在活体中的表达形式以及在哺乳动物中对 NT-3 特定的可替位受体的结合部位的组织分布。

本发明部分地是基于已发现的事实, 即, 高结合密度的 NT-3 受体存在于哺乳动物的以下脑切面中: 嗅球的前细胞核、新皮质的第一层、侧嗅束的细胞核、齿状回、海马的 CA1、CA3 和 CA4 以及尾状核。中等至低结合密度的 NT-3 受体存在于: 新皮质横核(accumbens)、脊髓灰质、嗜碱性外侧 (basolateral) 扁桃、脑脚间 细胞核、上丘、中隔和小脑中。本发明还基于对 NT-3 受体——trkC 编码的 mRNA 是表达在纹状体中的这个发现。根据本发明可以诊断或治疗包含呈现高含量的 NT-3 表达和/或中等至高密度的 NT-3 受体的区域的病理症状。

因为纹状体是包含许多神经病症(包括杭廷顿氏舞蹈病)的脑中的一个区, 本发明(尤其是实施例)提供了利用 NT-3、NT-3 分段、NT-3 衍生物、或结合于 NT-3 或 NT-3 受体的抗体来诊断和治疗纹状体的病症的方法。

本发明还进一步基于已发现的事实, 即, NT-3 可由某些感觉神经元以及海马神经元和新纹状体神经元逆行运送。因此, 本发明, 尤其是实施例, 提供了利用 NT-3、NT-3 分段、NT-3 衍生物、或结合于 NT-3 或 NT-3 受体的抗体来诊断和治疗感觉神经元、海马和新纹状体的病症的方法。

在诊断应用中, 例如, NT-3、NT-3 分段、NT-3 衍生物、或特定地结合于 NT-3 受体的抗体, 可以以一个显象诊断记录

的方式被标记和利用，以定位活体内表达 NT-3 受体的细胞和组织。抗-NT-3 (Anti-NT-3) 抗体可以以同样的方式被用来显象结合于这些靶细胞表面的本体的 NT-3。使用这种技术显象的 Abberant 表达图形可以用来分析诊断病理症状。

对于治疗应用，NT-3 组分或抗-NT-3 抗体可以用来加强或阻滞 NT-3 在活体中的靶细胞和组织上的生物效应。根据本发明可以诊断和/或治疗的某些疾病在下面进行了描述。

图 1 表示了结合试验的结合与分离期间结合于水平的大鼠脑切片上的 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 的数量。其中的每个值是从 4 个动物中的每一个切片的每分钟蜕变次数计算的每毫克蛋白质上结合的 NT-3 的平均 fmol 数 (\pm s. e. m. 标准平均误差)。(上图) 在 7 个培养时间结合了 200 微微米 (pM) 的 $[^{125}\text{I}]$ NT-3。300 毫微米 (nM) 的 NT-3 形成不可替位的结合，在培养之后这些切片被洗涤一个小时。NSB 的含义是非特定结合，SB 的含义是特定结合。(下图) 在 3.5 小时之后达到 200 微微米的 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 的平衡结合，被标记的这些切片被清洗 5 秒钟并被置于含有 200 毫微米的 NT-3 的 70 毫升的磷酸缓冲生理盐水中。

图 2. (左图) 表示了结合于水平的脑切片 ($n=4$ 切片/点) 的总的、非特定的、特定的平衡结合。(右图) 表示了左图中的特定结合数据的结合与 B/F 关系曲线。特定的 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 的结合部位的两个群用两个线性函数表示。在表 1 中给出了这些分开的曲线与合成的曲线的亲和性及容量的数值。

图 3 表示了 NT-3 ($\text{IC}_{50}=420\pm 60\text{pM}$; $n\text{H}=1.2\pm 0.26$) 和 BDNF ($\text{IC}_{50}=230\pm 100\text{pM}$, 对于 10—1000pM 范围的 BDNF, $n\text{H}=0.76\pm 0.18$; $\text{IC}_{50}=37\pm 2.9\text{nM}$ 对于 0.2—100nM 范围的 BDNF) 对 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 结合于水平的脑切片的抑制作用，但

只是针对鼠的 NGF 或 CNTF ($IC_{50} > 100nM$)。在每一种浓度情况下 $n=4$ 脑切片/点，标准平均误差 = $\pm 5-20\%$ 。

图 4 显示了 冠状和水平的大鼠脑切片在 300 微微米的 $[^{125}I]$ NT-3 中或在 300 微微米的 $[^{125}I]$ NT-3 与 300 毫微米的 NT-3 中进行培养以与相邻的切片形成不可替位的结合的情形。可以注意到在齿状回、海马的 CA 锥体层、尾状核及表面新皮质中可替位结合的高含量。

图 5 显示了 冠状的成年的猫的脑切片在 300pM 的 $[^{125}I]$ NT-3 中或在 300pM 的 $[^{125}I]$ NT-3 与 300nM 的 NT-3 中进行培养以与相邻的切片形成不可替位的结合的情形。可以注意到图 4 中所显示的从大鼠脑切片观察到的结合的相近性。

图 6 显示了通过基底神经节采集的两个成人的水平的脑切片并培养在如图 4 和图 5 情形的 $[^{125}I]$ NT-3 或 $[^{125}I]$ NT-3 与 300nM 的 NT-3 中的情形。银亮的和高度可替位的标记出现在尾状核、豆状核、新皮质和屏状核中。

图 7 表示了利用分别对 (A) trkA、(B) trkB、(C) trkC 特定的 ^{32}P 标记的探针在海马神经元 (道 A)、海马星形胶质细胞 (道 B) 和成人脑 (道 C) 进行 Northern 印迹分析的情形。trkA = 2.6Kb \times hol 分段，trkB = 1.1Kb Hpa/Sca 片段，trkC = 800bp Eco RI 分段。

图 8 表示了对 NGF、BDNF 和 NT-3 诱导在 C-FOS 上的时程效应 (time-course effect) 进行 Northern 印迹分析的情形。C-FOS = 1.1Kb Pst1 分段，GAPD4 = 1.25Kb P1 分段。

图 9 表示了对大鼠脑中的 trkB 进行 Northern 印迹分析的情形。如图 11 所示的，主要的带 (图中箭头所指处，大约 7.0 至 9.0Kb) 是用扫描密度计进行测量的。

图 10 表示了对大鼠脑中的 *trkC* 的 mRNA 表达进行 Northern 印迹分析的情形。如图 11 所示的，主要的带（图中箭头所指处，大约 15Kb）是用扫描密度计进行测量的。

图 11 表示了在大鼠纹状体的发育中主要的 *trkB* 转录本的数量。它采用了扫描密度计进行了一个星期的照射而获得了一条 Northern 印迹的数据。其量级相对于整个成年大鼠的脑进行了标定。

图 12 表示了在大鼠纹状体的发育中主要的 *trkC* 转录本发数量。它采用了扫描密度计进行了一个星期的照射而获得了一条 Northern 印迹的数据。其量级相对于整个成年大鼠的脑进行了标定。

图 13 表示了由全剂量反应曲线（未示出）确定的 E6、E8 和 E10 鸡胚对 NGF、BDNF 和 NT-3 的最大纤维旁枝（outgrowth）反应的条柱图（直方图）。白框柱 = NGF；斜线柱 = BDNF；黑框柱 = NT-3。每一个条柱表示在 24 小时内记录的每一个数值的平均值（标准平均误差为 ±5 或更多个神经节）。S、L、T 和 C 分别表示骶神经节、腰神经节、胸神经节和颈神经节。NGF 是采用提纯了的小鼠唾腺的 NGF；BDNF 和 NT-3 是采用由 Amgen 公司（从 Dr. James Miller 获得的）生产和同质提纯的人的重组蛋白质。

图 14 显示了来自分别用 NGF、BDNF 或 NT-3 培养了 48 小时后的 E₈ 鸡胚的腰或胸 DRG 神经元的存活情况的剂量—反应曲线。横轴 = 神经营养因子的浓度（毫微克/毫升），竖轴 = 轴突生育细胞的百分比。

图 15 表示了在被神经营养因子-3 分离的小脑离体培养中 C-FOS 表达的剂量相关诱导的情形。

图 16 表示了在被髓衍生神经营养因子分离的小脑离体培养中 C-FOS 表达的剂量相关诱导的情形。

图 17 表示了在被神经生长因子分离的小脑离体培养中 C-FOS 表达的剂量相关诱导的情形。

图 18 表示了 NT-3 对多巴胺神经元离体存活的影响。如前所述制备了 E14 腹中脑培养物。(Hyman, et al., 1991, Nature 351: 230-233)。在 4 个小时的附着期之后, 在添加提纯了的人的重组 NT-3 至指示浓度时培养基被转变到血清游离形成。培养物离体保持 7 天, 然后它们经受 TH 免疫细胞化学处理。NT-3 的每一浓度在三重培养皿中进行了测试。

图 19 表示了 NT-3 对多巴胺离体摄取的影响。培养物如图 18 那样制备。提纯了的人的重组 NT-3 添加至如在图 18 中所描述的培养基发生转变的时刻为止。NT-3 的每一浓度在五重培养皿组中进行了测试。培养物离体保持 7 天, 然后对它们进行高亲和性多巴胺摄取的测量。

图 20 表示了 NT-3 对 GABA 离体摄取的影响。培养物如图 18 那样制备。提纯了的人的重组 NT-3 添加至如前描述的培养基发生转变的时刻为止。NT-3 的每一浓度在五重培养皿组中进行了测试。培养物离体保持 7 天, 然后对它们进行高亲和值 GABA 摄取的测量。

图 21 表示了 NT-3 对 GAD 离体活性的影响。培养物如图 18 那样制备。提纯了的人的重组 NT-3 添加至如前描述的培养基发生转变的时刻为止。NT-3 的每一浓度在五重培养皿组中进行了测试。培养物离体保持 7 天, 然后对它们进行 GAD 活性测量。

图 22 表示了神经营养浓度对大鼠的隔胆碱能神经元的

E17 培养物中的胆碱乙酰转移酶 (CAT) 的活性影响。

图 23 表示了 [¹²⁵I]NT-3 大鼠的右坐骨神经逆行运送的情形。NT-3 可以单独注入或者与 NGF 或 BDNF 一起注入。

图 24 表示 NT-3、BDNF 和 NGF 从受控的与经过吡哆醇处理的大鼠的右坐骨神经逆行运送的情形。

图 25 表示了 NT-3 和 BDNF 在受控的与经过吡哆醇处理的大鼠的 L4-L5 脊髓切片中运送的情形。

本发明提供了在诊断和治疗方法中使用生物活性 NT-3 分子来探测和治疗包含有 NT-3 的靶细胞的神经病症的方法。本发明还提供了利用抗-NT-3 抗体、反义 (antisense) RNA 或核糖酶 (ribozymes) 抑制或中和 NT-3 的活性的方法。

对于诊断应用, NT-3、NT-3 衍生物 (包括生物活性分段)、或结合于 NT-3 受体的抗体 (包括抗-基因型抗体, 即模拟 NT-3), 可以用于显象表达 NT-3 受体的神经元细胞。受体表达的 Abberant 图形可以用来分析诊断病理症状。为此, 结合于 NT-3 受体的 NT-3 组分或抗体可以被连接上一个放射性标记、不透射线的标记、荧光染料、酶、等。这些联接物可以在活体内用于适当地显象记录 (包括但并不限于计算机辅助断层 (CAT) 扫描、X 射线、荧光 X 射线、MRI 或 PET 扫描、等) 来分析活体内 NT-3 受体的组织分布。抗-NT-3 抗体可以类似地用于这种显象诊断记录以显象结合于这些靶细胞表面的本体的 NT-3。这些联接也可以用于鉴别活检或尸检样品中的 NT-3 受体。

对于治疗应用, NT-3、或 NT-3 衍生物 (包括生物活性分段) 可以用来加强其对一个靶组织的生物效应。一般地, 为了治疗和诊断的目的最好使用由相同物种衍生的 NT-3 基因

产物，尽管杂交种 NT-3 在本发明的某些特殊的实施例中可能是有用的。可以以 NT-3 对靶细胞的刺激作用而矫正了紊乱这种方式治疗神经病症。由于希望对 NT-3 进行抑制，因而抗-NT-3 抗体的中和作用来阻滞本体 NT-3 对靶细胞的效应。另一方面，反义 RNA 或核糖酶可以用于抑制或阻滞本体 NT-3 的产生或者使用 NT-3 的肽拮抗物。包括表达 NT-3 受体并响应于 NT-3 的超增生细胞的神经病症可以用这种方式来治疗。例如，这种诊断记录可以用来治疗表达 NT-3 受体并响应于 NT-3 而增生的神经肿瘤。

根据本发明可以治疗表达 NT-3 和/或 NT-3 受体的神经组织的许多病症。包括外周神经，临床测试可以用来确定响应于 NT-3 的应用或 NT-3 的抑制的症状是否有所改善。还包括中枢神经系统或脑，治疗的效能首先可以在一个适当的动物模型系统上进行评估。

根据本发明可以治疗的包括表达 NT-3 和/或 NT-3 受体的神经组织的病症包括但不限于：

- (i) 嗅觉和味觉病症，例如嗅觉缺失和味觉障碍；
- (ii) 影响表面内鼻(enthorhinal)皮层、齿状回和海马的 CA1、CA3 和 CA4 层的疾病，包括但不限于阿耳茨海默氏疾病和由于如同发生在心搏停止的幸存者中那样的球面局部缺血导致的记忆缺损；
- (iii) 影响新皮质的疾病，包括但不限于阿耳茨海默氏疾病和由中风造成的临床缺损以及主要的皮层痴呆病，包括但不限于皮克氏病、皮层基底神经节退化，扩散皮层 Lewy 体病和雅各布——克罗伊茨费尔特综合病，包括包含从其外表面压缩或侵入脑的损害或经过造成的新皮质的表层的病症，包括但并

不限于脑创伤的后果(例如由划破或打伤引起的),硬膜下血肿,硬膜外血肿和肿瘤转移;

(iv) 影响尾状核的疾病,包括但并不限于杭廷顿氏病,舞蹈病棘红细胞增多症,由于产期氧过少以及纹状体黑质的退化和进行性的核上麻痹引起的舞蹈手足徐动症或张力障碍综合征,通常所说的“帕金森氏综合征”;

(v) 在黑质中的多巴胺能和 GABA 能(GABAergic)神经元群体的病症;

(vi) 感觉神经元的病症,特别是在脊髓的颈部和腰部区域的本体感受神经元的病症。

下面的段落将对本发明进行更为详细地描述。

5. 1 NT-3 的制备

根据本发明所使用的 NT-3 可以采用对熟知该领域的技术人员公知的重组 DNA 技术和/或化学合成方法来制备。例如,这些方法在申请号为 PCT/US90/04916 的 PCT 专利申请(公开号为 WO91/03569,申请日为 1990 年 8 月 29 日)中进行了描述,在此将其全文参考引用。

在本发明的一个优选的但并非限制性的实施例中,如下所述,可以由表达重组 NT-3 的真核细胞制备 NT-3。

受调节的培养基可以从一个生物反应器(Charles River)中收集,在这个生物反应器中用表达 NT-3 的真核细胞接种并用蒸馏水以大约 1:25 的比例进行稀释然后被连续地放置在 4℃ 的一个 15 毫升(内径 1.6 厘米)的 S-琼脂糖快速流动(Pharmacia)的交换柱上。在大约 5 天的时间内可以施加大约 10.6 升(稀释的)的总容积。这个交换柱可以用 50 毫升 20 毫克分子的乙基磺酸甲酯(MES)缓冲液(一种吗啉乙烷磺酸溶液,

其 PH 值已经用 NaOH 调到大约 5.8) 进行洗涤,接着用含有 250 毫克分子的氯化钠的相同的 50 毫升溶液进行洗涤,然后再用不含氯化钠的相同的乙基磺酸甲酯 (MES) 缓冲液进行洗涤,直至 280 核矩的吸收率达到基线值为止。然后交换柱可以用 PH 值为 8.5 的 20 毫克分子的 25 毫升二甘氨酸缓冲液进行洗涤,接着用含有 100 毫克分子的氯化钠的 15 毫升的相同的缓冲液进行洗涤。接着交换柱可以用含有 100 毫克分子至 750 毫克分子氯化钠梯度的 150 毫升的 20 毫克分子二甘氨酸缓冲液 (PH 值为 8.5) 进行洗脱。所希望的流动速率可以是大约 2.5 毫升/分钟。洗脱物的吸收率可以在一个灵敏度为全量程 0.2 的吸收单元上在 280 核矩下进行监测。包含重组 NT-3 的馏分可以通过背根神经节 (DRG) 外植体生物检定方法进行鉴定。通过利用 3KD₂Omega 型膜的高压膜超滤作用可以将具有最高特定活性的馏分组合并浓缩至大约 2 毫升。然后被浓缩的样品可以放置在一个 120 毫升 (内径为 1.6 厘米) 的 SephacrylS-100HR 凝胶过滤交换柱 (Pharmacia) 上,这个交换柱用包含 400 毫克分子的氯化钠的 PH 值为 7.6 的 20 毫克分子 N-2 羟乙基哌嗪-N'-2 乙基磺酸 (HEPES) 缓冲液填充和平衡。交换柱可以以大约 0.25 毫升/分钟的速率进行洗脱。可以采集 2 毫升体积的馏分用于在背根神经节外植体生物检定时检定 NT-3 的活性。

本发明也提供了既可以是抗原的也可以是机能活性的 NT-3 分段。机能活性 NT-3 分段包括 NT-3 兴奋剂分段以及 NT-3 拮抗物分段。如果希望补充 NT-3 的活性,可以使用一种兴奋剂分段。如果希望抑制 NT-3 的活性,可以使用一种拮抗物分段。兴奋剂分段最好包括在本体 NT-3 分子中发现的三

种二硫桥中的至少二种和/或能够达到在相同条件下测量的(例如,在一个 DRG 检定中)整体 NT-3 的活性的至少大约百分之三十(最好至少大约百分之五十)。

5. 2 NT-3 抗体的制备

在该领域的各种公知的方法都可以用于制备结合于 NT-3 并中和 NT-3 活性的抗体、结合于 NT-3 受体的抗体、或模拟 NT-3 或其受体的抗基因型抗体。正如在这里使用的,一种中和 NT-3 活性的抗体是指一种在下文描述的 DRG 检定中将本体 NT-3 的活性减少至少大约百分之三十。根据本发明所使用的任何抗体包括但并不限于多克隆的、单克隆的、嵌合的、单链和抗原结合分段 (Fab)。

为了制备抗体,使用在一种佐剂中形成的适当的免疫原(以增加免疫应答)对一种动物宿主进行免疫。这种佐剂包括但并不限于弗罗固德氏佐剂(完全和不完全的)、无机凝胶、例如氢氧化铝、表面活性物质(例如溶血卵磷脂)、普卢兰尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳胶、钥孔螺(keystone limpet)血蓝素、二硝基苯酚、卡介苗和棒状杆菌属小杆菌 (*parvum*)。

可以采用任何通过培养物中的连续的细胞线提供抗体分子的制备的技术来制备单克隆抗体。这些技术包括但并不限于最早由 Kohler 和 Milstein (1975, *Nature*, 256: 495-497) 描述的杂合 (hybridoma) 技术;最近的人的 B 细胞杂合 (hybridoma) 技术 (Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030); EBV 杂合 (hybridoma) 技术 (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96); 嵌合抗体 (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312: 604

—608; Takeda et al. , 1985, Nature 314 : 452—454)。另一方面, 单链抗体 (美国专利 4, 946, 778) 或 Fab 表达库的构成 (Huse et al. , 1989, Science 246 : 1275—1281) 可以使单克隆分段以希望的特性快速并容易地被识别。抗体分段也可以采用公知技术 (例如胃蛋白酶消化和二硫键的减少) 由整个抗体分子产生。

5. 3. 活性成分的配制

如上所述制备的活性成分 (可以包括 NT-3、一种生物活性衍生物或其分段、或一种抗体或抗体分段), 应当制备在一种适当的药物载体中, 以通过任何适当的路径将其引入活体内, 给药路径包括但并不限于注射 (例如, 静脉内注射、腹膜内注射、肌肉注射、皮下注射、神经内注射、神经周注射、脊髓内注射、心室内注射、鞘内注射等), 或者通过经上皮或粘膜 (与) 皮肤衬里 (例如, 口粘膜、直肠和肠粘膜、等) 的吸收将其引入活体内; 或者通过持续释放植入物 (包括一种细胞植入物或组织植入物) 将其引入活体内。

根据投药的方式, 活性成分可以配制在一种液体载体 (例如盐水) 中形成微脂粒、微囊体、聚合物或蜡基和受控释放制剂, 或配制成片、丸或胶囊的形式。

在配制中使用的活性成分的浓度将取决于所需要有效剂量和所使用的投药方式。所使用的剂量应当足以达到使活性成分奏效的循环血浆浓度。例如, 当 NT-3 是活性成分时, 可以使用从大约 1 毫微克/毫升至 10 微克/毫升范围量级的一种循环血清浓度, 最好是从 1 毫微克/毫升至 100 毫微克/毫升。有效剂量可以从由离体或动物模型测试系统获得的剂量——反应曲线外推得知。

5. 4. 神经病症的治疗

正如在这里的工作例子所显示的，NT-3 表达和 NT-3 受体的分布以一种特殊的组织形式存在着。包含这些组织的病理学的神经病症是根据本发明的诊断和治疗的对象。包含有对 NT-3 起反应的神经系统细胞（包括神经细胞以及支持细胞等）的疾病或病症是本发明的方法的目标。例如，高密度的 NT-3 受体存在于：嗅球的前细胞核、新皮质的第一层、侧嗅束的细胞核、齿状回、海马的 CA1、CA3 和 CA4、以及尾状核中。中等至低密度的 NT-3 受体存在于：新皮质横核， 脊髓灰质、嗜碱性外侧 扁桃、脑脚间细胞核、上丘、中隔和小脑中。使用本发明的方法可以诊断和治疗包含这些区域的病症。

其中 NT-3 靶细胞是未被充分代表的或者其中承担 NT-3 受体的细胞受损或处于退化过程的上述组织的神经病症，可以通过引入一种有效剂量的 NT-3、一种 NT-3 衍生物（包括一种生物活性兴奋剂 NT-3 分段）、或一种模拟 NT-3 结合生物效应的抗基因型抗体，来进行治疗。这种治疗将刺激靶细胞的生长或分化或存活。通过抑制本体 NT-3 的效应或产生可以治疗包括表达 NT-3 受体并响应于 NT-3 增生或接受 NT-3 后变成一种不希望的表型的细胞的超增生的神经病症。这可以通过以下方式实现：引入有效剂量的中和抗-NT-3 抗体以抑制 NT-3 的效应；或者给 NT-3 细胞源输送反义 RNA 或核糖酶（ribozymes）以抑制本体 NT-3 的产生；或者引入一种 NT-3 拮抗物。

例如，如果 NT-3 的反应组织已被损或正处于退化过程，那么可以采用增加 NT-3 活性的治疗方法。可以用任何公知方法测定 NT-3 的反应组织是否已经被损。例如，如果神经显象

技术（例如 CAT 扫描、MRI、PET 扫描等）显示了结合于 NT-3 的一个结构损坏的位置，例如如在下文表 2 提出的，那么可以使用增加 NT-3 活性的治疗方法。但是也可以采用其它技术（包括但并不限于活检或基于临床检查或住院、脑电图、肌电图等）确定这样一个结构的损坏。

在响应于 NT-3 的细胞或组织增生或超活性的情况下希望减少 NT-3 的活性。这些情况可能包括肿瘤，例如，在这种肿瘤中 NT-3 可能被以一种 autocrine 环的方式使用，或在癫痫或某些与过度的不随意运动的产生有关的病症。在肿瘤的情况下，可以采用组织和/或细胞培养技术来鉴定 NT-3 受体内的增加、本体 NT-3 或对 NT-3 的反应性；如果确定了这样一种情况，那么将 NT-3 的活性降低。

根据本发明可以治疗的出现在靶组织中的各种疾病或症状在以下的段落中进行描述。

5. 4. 1. 中枢嗅觉路径的病症

一种高结合密度的 NT-3 存在于嗅球的前细胞核、侧嗅束的细胞核与嗅结节中。在嗅觉路径内的 NT-3 表达与结合显示了不仅在嗅觉病症中的治疗应用，而且还在系统发育上类似于舌头的味觉受体的治疗应用。借助于例子，但并非限制性的，应用治疗数量的生物活性 NT-3 分子或可能的抗-NT-3 抗体可以有助于治疗诸如嗅觉缺失（嗅觉的丧失）或味觉障碍（正常味觉的畸变）的这些病症。可以用 NT-3 治疗的嗅觉缺失的例子包括但并不限于头创伤（可能是由神经元的分裂穿过了筛板以及与正常的老化过程相关的并发症所引起的）、多发性硬化、帕金森氏病或一种额叶肿瘤。可以用 NT-3 治疗的味觉障碍的例子包括但并不限于贝耳氏麻痹、家族性自主神经机能异

常和多发性硬化以及发生在嗅觉功能障碍基础上的味觉畸变。

5. 4. 2. 下丘脑和边缘系统的病症

下面描述的例子显示了在表面内鼻 (entorhinal) 皮层的侧、中间和中央部分、齿状回门的颗粒细胞层以及海马的 CA1、CA3 和 CA4 的锥体层中的 NT-3 表达与受体结合。脑的这些不同组织中的 NT-3 表达与结合表明可以对包括并不限于由发生于心搏停止的幸存者中的球面局部缺血造成的记忆缺损进行治疗。另一方面，生物活性 NT-3 分子可以用于治疗阿耳茨海默氏疾病。脑的这个区域早先由 Saper 和 German 论述在疾病的病理学中 (Saper and German 1987, *Neuroscience* 23 : 389—398) 并推测阿耳茨海默氏病开始于脑的这个区域，扩散经过皮层和海马，并逆行影响基底前脑和其它脑干核。

在这里描述的例子显示了 NT-3 对海马组织的效应。一个离体的大鼠的海马培养系统被用来显示海马组织 (a) 表达了 trkB 和 trkC, (b) NT-3 诱导 trkB 和 trkC 的 FOS 表达, (c) NT-3 诱导 FOS 表达和溴磷酸丝 (neurofilament) 蛋白质, (d) 在乙酰胆碱脂酶中产生和增加阳性的和 Calbindin——免疫阳性细胞。由于被诊断具有帕金森氏病、杭廷顿氏病和阿耳茨海默氏病的病人表现为 mRNA 转录本和 calbindin 蛋白质的明显地减少 (Iacopino and Christakes, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 4078—4082) 因此可以使用 NT-3 来增加 calbindin 在这些病人体内的表现度的疗法。

5. 4. 3. 新皮质和新皮质的表面层

下面描述的例子还显示了在新皮质和新皮质的表面层中的 NT-3 表达与结合。可以治疗的发生在许多疾病中的包含新皮质的病症，包括但并不限于阿耳茨海默病的突发患者和主要的

皮质痴呆病，包括但并不限于皮克氏病、皮质基底神经节退化、扩散皮质 Lewy 体病和雅各布——克罗伊茨费尔特病。人类患者的病理学与其它动物模型大不相同之处在于所有皮层显著地受到由阻塞的大脑血管的范围决定的区域分布的影响。在环绕梗塞的区域中有一个区带有时被称作“局部缺血半影”，其中血脑屏障是相对有漏隙的，并且神经元受到致命的局部缺血损伤的威胁，但并未遭受损伤。正是在这个区域一种生物活性 NT-3 或 NT-3 衍生物或 NT-3 肽分段可以起作用而将由打击造成的临床缺损减至最低程度。

新皮质的表面层的一个特殊的治疗目标可能是从其外表面压缩或侵害脑的损伤或过程，包括但并不限于：脑创伤的后果，例如划破或打伤，硬膜下血肿、硬膜外血肿和肿瘤转移。

5. 4. 4. 尾状核

下面描述的例子进一步显示了在尾状核中的 NT-3 表达与受体结合。

NT-3 对尾状核的治疗应用可以用来治疗（借助于例子说明但并非限制性的）抗廷顿氏病、舞蹈病棘红细胞增多症、起因于产期氧过少和纹状体黑质的退化和进行性核上麻痹的舞蹈病手足徐动症张力障碍综合征。

抗廷顿氏病是一种无法治疗的、进行性的、具有 100% 的外显性的显性的遗传病。抗廷顿氏病的特征表现在其前半生，在其生活周期的生殖部分之后结束。抗廷顿氏病的病理学主要包括所谓的尾状核和豆状核的“培养基棘”神经元。注意到在神经系统的其它区域中的退化，包括额皮层、丘脑和深小脑核。这些细胞损失导致了神经递质氨基酸 γ -氨基丁酸以及各种神经肽的数量的减少 (reviewed in Martin, 1984, *Neurology* 34: 1059—

1072)。症状包括行为衰退（精神病学上的障碍包括抑郁、精神分裂症样的精神病以及痴呆；Mayeux, et al., 1986, *Ann. Neurol.* 20: 727—731)、不随意的运动原的运动以及运动原协调的逐渐丧失(包括说话和吞咽能力的最终丧失)。这些疾病都是致命的。目前估计单是在美国就有超过两万名杭廷顿氏病的患者。这个数字尚未包括那些缺乏有用的治疗观点而未接受医疗护理的患者或那些携带着基因但尚未表现症状的患者。杭廷顿氏病的基因已确定于人的染色体 4p 的远端部分 (Gusella, et al., 1983, *Nature* 306: 234—238), 但是疾病的基因的产物的准确性质目前尚无法确定。遗传标记的可获得将使得病人在出现症状之前就可以治疗疾病, 于是使神经营养因子“挽救”退化的或已经退化的神经元的机会达到最优。最近的观察表明确实在杭廷顿氏病中存在纹状体神经元逐渐损失的区域性分布图形; 即, 病变并不是在发病的全部时间内遍布脑的受影响区域无规则地侵袭细胞。因此, 在危险或早期症状期间就进行治疗能够阻止在其径迹中的病程。Carrasco 和 Mukherji 的观察 (1986, *Lancet.* 1: 1388—1389) 表明处在尚未显现疾病的症状的危险期的个体可能已经在尾状核中损失了高达 80% 的细胞并在豆状核中损失了 40%。由于杭廷顿氏病导致的神经退化最显著地是在基底神经节中, 最特殊的纹状体——一个在表现了高含量的 NT-3 转录本和高密度的 NT-3 受体的区域——根据本发明可以使用 NT-3 或一种 NT-3 生物活性衍生物或 NT-3 分段治疗杭廷顿氏病。

舞蹈病棘红细胞增多症是缺乏严重的智力衰退或杭廷顿氏病的行为失调的年轻成人的一种遗传性舞蹈病性综合征。一些病人具有癫痫发作。在尾状核和豆状核中有神经元细胞的损失。

这种病通过其正染色体的隐性遗传、肌肉消瘦、脚弓高和外周血涂片上的棘红细胞增多的红细胞而辨别。目前对于这种病症尚无法治疗。然而，生物活性 NT-3 或一种衍生物或一种 NT-3 肽分段的治疗方法可以有效地阻止在尾状核和豆状核中神经元的损失。

本发明也包括对由产期氧过少引起舞蹈病手足徐动症张力障碍综合征的治疗应用。基底神经节是导致“大脑麻痹”的神经损伤的外周——局部缺血损伤的主要对象。有三种主要的大脑麻痹的临床变型：痉挛性偏瘫、痉挛性双瘫和“先天性两侧手足徐动症”。在前两种综合征中，劳动能力的丧失分别是由于一个或两个下行皮质脊髓束受到中风的损害。“先天性两侧手足徐动症”的症状实际上是由于尾状核和豆状核的内部神经元的局部缺血坏死造成的两侧张力障碍舞蹈病手足徐动症。作为结果产生的瘢痕形成使在病理样品上的这个区域变成斑状。由于在美国大多数的分娩是在医院中进行的，并且人们都认识到大脑局部缺血损坏的危险因素，因此可以实行应急手术。当神经损伤正在进行或刚刚发生时，早先引入的 NT-3 结果可以挽救这种病症中的可能被损害的神经元。

本发明也包括对纹状体黑质退化和进行性核上麻痹 (Steele—Richardson—Olszewski 综合征) 的治疗应用，这些病症是所谓的“帕金森阳性 (Parkinsonplus) 综合症”，它具有帕金森氏病的临床特征，对通常的抗帕金森药疗法不起反应。这种抗药性的原因在于这些药必须作用于其上才能起治疗效果的那些尾状核的神经元已经死亡或退化了。这些病症总共占大多数帕金森氏病诊所的病人的 10% (Stacy and Jankovic, *Neurol. Clin. North America* 2 : 473—487)。因此，生物活性 NT-3 或一种衍生物或

一种 NT-3 肽分段的早期引入表明对治疗是有益的。

5. 4. 5. NT-3 对感觉神经元中的轴突的存活与长出的影响

如下面的例子所示的，NT-3 促进背根神经节培养物的感觉神经元中的轴突的存活和长出。离体的腰或颈神经节的富集培养物相对于离体时间相似的离体髌或胸神经节的富集培养物更易对 NT-3 起反应。这些结果表明 NT-3 可以优先地对大直径、大纤维本体感受神经元（例如那些在腰或颈神经节中发现的神经元）起作用。因此在治疗影响出现在糖尿病患者或针对癌进行化疗的患者或爱滋病治疗[例如，taxol（一种从称为 Taxus 的植物的短叶中提取的具有抗癌作用的药物）、长春新碱、顺铂（cisplatin）——脱氧肌甘（di-deoxyinosine）]中的较大的感觉神经元的外周神经病中可能是有用的。

5. 5. 诊断应用

包括鉴定 NT-3 或 NT-3 受体的许多离体或活体诊断测试可以用于帮助诊断和治疗。例如，可以用在该本领域公知的方法鉴定各种活检或尸检组织中的 NT-3。在这方面，抗-NT-3 抗体免疫分析法可以用来检测 NT-3 蛋白质的表达。这些鉴定包括但并不限于酶联免疫吸附分析法（ELISA）、放射免疫分析法、竞争性或非竞争性免疫分析法、置换免疫分析法、免疫组织学方法等。另一方面，与 NT-3 顺序互补的核苷酸探针可以用于 RNA 杂交方法中原位检测活检或尸检样品中的 NT-3 mRNA 转录本的表达。这些技术可以包括聚合酶链反应（PCR）的使用。NT-3 蛋白质或 mRNA 转录本的组织浓度可能与疾病有关。

另一方面，可以在活检或尸检样品或活体中进行鉴定 NT-

3 受体。为此，例如，通过用一种放射性同位素、一种不透射线的化合物、一种荧光染料、一种酶进行标记可以使 NT-3 或 NT-3 衍生物变形以用于检测。这种联接可以用于显象离体活检或尸检样品中的 NT-3 受体或用于显象活体中的 NT-3 受体。在另一个实施例中，模拟 NT-3 和/或结合于 NT-3 的受体的抗体可以类似地用于显象离体或体内活检或尸检样品中的 NT-3 受体的分布。该领域公知的显象技术（例如，计算机辅助断层扫描、X 射线等）可以用于此目的。受体分布的畸变可能与疾病有关。

5. 5. 1 感觉神经元病症的诊断

正如下面描述的例子所显示的。NT-3 优先地累积在腰和颈神经节中，于是这就提供了一种感觉神经元病症的诊断方法。一个害病的患者的这些神经元的的一个活检样品可以用来确定 NT-3 蛋白质的含量并与从一个正常人身上取得的一个类似的样品中的 NT-3 含量进行比较。NT-3 含量的畸变可能与一种感觉神经元的病症的出现有关。通过一种包括将样品与一种抗-NT-3 抗体接触（因而能产生免疫特异的结合）的方法可以进行 NT-3 蛋白质的含量的实际确定。

5. 5. 2. NT-3 的逆行轴突运送及其诊断和治疗应用

下面的例子描述了在感觉和中枢神经系统神经元中 NT-3 的逆行轴突运送。这种现象可以被鉴定并被用于设计针对感觉神经病症的有效疗法。为此，根据治疗的需要可以给一个病人引入有效数量的一种 NT-3 蛋白质、衍生物或肽因子以支持感觉神经元的存活、生长和/或分化。NT-3 的特定的逆行运送可以用于指示是否神经元正常地或病态地对 NT-3 产生响应。因此，本发明提供了一种诊断涉及外周神经系统的病症的 NT-3

的方法，包括将一种可检测地标记了的 NT-3 蛋白质或肽注入外周神经，确定是否标记了的 NT-3 蛋白质或肽被逆行运送，其中逆行运送的减弱确与对 NT-3 反应性的缺乏有关并指示了与 NT-3 相关的一种外周神经系统的病症的存在。

本发明也提供了一种诊断中枢神经系统的病症的方法。逆行运送的测定可以采用在该领域公知的任何方法，包括但不限于 MRI、计算机辅助断层扫描 (CAT)、或如下面讨论的闪烁扫描。这些方法可以用于鉴定神经系统损害的位置，因为当到达损害处时逆行运送被明显地减弱了。

本发明进一步提供了这种逆行测定的试剂盒，包括在一个容器中的一种可检测地标记了的 NT-3 蛋白质、衍生物或分段。这样的标记可以是一种放射性同位素或在该领域公知的其它标记。

本发明也提供了一种治疗感觉神经元的病症的方法，包括根据这种疗法的需要给患者引入有效数量的如在一个离体培养系统中所显示的能够支持运动原神经元的存活、生长和/或分化的一种 NT-3 蛋白质、衍生物或肽分段。

在离体实施中，包括，但不限于下面描述的那些，有效数量的神经营养因子可以根据一种情况希望地确定并以此为基础，因为来自不同组织源或不同物种的感觉神经元显示对神经营养因子有不同的敏感度。对于任何特定的培养物来说，希望建立一条有关神经营养因子浓度与运动原神经元反应的剂量-反应曲线。为了测定感觉神经元的存活、生长和/或分化，可以采用，例如，活体染料测定存活、象差显微镜检术和/或神经丝染剂测量轴突生长、或有关的测量运动原神经元化合物（例如胆碱乙酰转移酶 (CAT)）的生物活性的技术、或该领域公知的

任何其它方法，将受到一种 NT-3 蛋白质、衍生物或肽分段作用的运动原神经元与未受到一种 NT-3 蛋白质、衍生物或肽分段作用的感觉神经元进行比较。

6. 例子：在大鼠、猫和人脑中的高亲和性结合部位

6. 1. 材料与方法

6. 1. 1. NT-3 的生产与提纯

在上文 5. 1. 节中描述了生产提纯的 NT-3 的优选的方法。NT-3 等分试样可以通过以下方式进行监测：针对蛋白质内容采用氨基酸分析，针对生物活性采用背根神经节 (DRG) 外植体培养系统 (采用 muNGF 作为标准)。

6. 1. 2. NT-3 的碘化作用

采用乳酸过氧化物酶方法将 NT-3 碘化。 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 被标记成 2800—4400cpm/fmol 的特殊的活性 (1872—2876Ci/mmole 的 NT-3) 并以 80—100nM 的浓度贮存在 2—8°C 下。所有的分析在 1—5 天内使用 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 以避免在这段时间之后观察到不可置位的 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 结合的增加。

也可以采用 DRG 鉴定来建立 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 的生物活性，该鉴定显示了它具有与其未标记的对应物至少同样的活性。 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 从被压碎的坐神经至背根神经节的可示教的逆行运送受到未标记的 NT-3 的特殊的阻滞 (Drstefano et al., 1991, Soc. Neurosci. Ab. 17: 1121), 并且在 DRG 鉴定中 NT-3 与 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 的难以区分的效能均表明所使用的放射性碘化的 NT-3 具有生物活性。

6. 1. 3. 大鼠、猫和人脑切片的制备

将雄性 Sprague—Dawley 大鼠 (200—250 克重, Zivic—Miller) 保持在 12:12 小时亮:暗的循环周期和可无限制地吃

到食物和水的环境中，这些大鼠因二氧化碳窒息而死。在死亡的5分钟内，将每一个大鼠的脑冷冻在 -15°C 的异戊烷内并将这些组织用于结合、解离及饱和平衡分析。成列的12微米厚的冠状的和水平的切片从额皮层到髓（质）以0.30—0.50毫米的间隔以迷走神经的背面运动原核为平面进行采集（冠状切片），或经过嗅球、尾状核和小脑进行采集（水平切片）。将这些切片融化安放在明胶涂覆的玻璃显微镜载片上并在 -70°C 下冷冻贮存长达一个月。

一个成年雄性猫的脑被从额皮层至髓被冠状剖开并如对大鼠描述的那样从22个平面采集切片。一个人脑的20微米厚的切片从经过基底神经节和包括尾状核新皮质和相邻的纤维束的平面进行采集。

6. 1. 4. [^{125}I] NT-3 结合鉴定

结合鉴定根据 Richardson 等人的方法进行 (1986, *Neurosci.* 20: 23—36) 并对 [^{125}I] rhNGF 的放射自显影干胶片进行变形 (Altar, et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 281—285)。

在解冻之后，将每一个切片在 22°C 含有0.5毫克分子 MgCl_2 和0.5毫克分子PMSF的PH值为7.4的100毫克分子磷酸缓冲盐水中预保温一个小时。观察这些切片预保温1.3或24小时的等价结合。然后将这些切片置于DMEM组织培养基中进行培育，该培养基中包含有高葡萄糖、10%的热灭活牛犊胎血清（ 70°C 半小时）、25毫克分子HEPES缓冲液、4微克/毫升亮氨酸（leupeptin），0.5毫克分子（BRL, Gaithersburg, MD, 首先溶解到0.1毫克/毫升异丙醇）、0.5毫克分子 MgCl_2 、和10微微克分子至10毫微微克分子 [^{125}I] NT-3（饱和平衡分析）或

基于 26000 二聚分子量的 200—300 微微克分子 [^{125}I] NT-3 (所有其它鉴定)。包含相邻脑切片的显微镜载片培养在添加了 300 毫微微克分子 NT-3 的相同的溶液中以形成可替位的结合。一批浓度的 muNGF、hCNTF、和 BDNF 中的每一个在实验中用来与 [^{125}I] NT-3 结合进行竞争。在培育之后，这些切片在磷酸缓冲液中洗涤半个小时。在不存在过量未标记 NT-3 的情况下，用未标记缓冲液洗涤 3 分钟，10 分钟和 2 小时可以获得等价数量的总的和不可替位的结合。

在一个小时洗涤（结合实验）或 3.5 小时培育（分离实验）后，也可以确定 300 微微克分子的 [^{125}I] NT-3 结合的结合与分离状况。在洗涤之后，这些切片在 4% 多聚甲醛（22℃）中放置 10 分钟，在水（22℃）中清洗 2 秒钟，然后由室温空气气流干燥 5 分钟以内。被标记的切片与 ^{125}I 含放射性标准 (^{125}I -containing radioactivity standards) (Amersham 公司) 在室温下受 ^{125}I 感应胶片 (^{125}I -sensitive film) (Hyperfilm, Amersham 公司) 作用 2 至 5 天。

6. 1. 5. 数据分析

在产生放射自显影之后，用一个剃刀片将水平切片从载片上刮削下来，放入 12×75 毫米的硼硅酸盐玻璃管内，并用一个 γ 射线计数器计数放射性衰变。对在结合与分离实验中使用的 4 个脑进行 K_d 值的动力学测定的计算 (Weiland and Molinoff, 1981, *Life Sci.* 29: 313—330)。由于在 3 个小时的培育之后只有远远少于 10% 的配位体被结合于切片，因此可以在拟第一级的条件下获得平衡分离和结合速率常数。对 4 个脑的每一个进行饱和平衡分析，根据其最符合一条抛物线的原则按照迭代非线性回归分析法计算 K_d 和 B_{\max} 值 (Rodbard and Lewald, 1970, Ac-

ta Endocrinol. 147 : 79—103)。用 Bliss 和 Jameo 方法计算 IC_{50} 值 (1966, Biometrics 22, 573—580)。在单向方差分析之后用 Dunnet' s t—检验进行组间比较的统计分析。

6. 2. 结果

在初步的研究中,发现 40—400 微微克分子浓度的 $[^{125}I]$ NT—3 在大鼠脑的水平切片中最佳地形成一个稠密的异型分布的结合部位群。该结合可以被 70—90% 的 1000 倍的更高浓度的 NT—3 替位,而在更高配位体浓度的情况下可以获得 10—15% 更高含量的非特定结合。因为在尾状核、新皮质和海马中的结合是特别粗壮和可替位的,所以使用包含这些区域的水平切片用 200—300 微微克分子 $[^{125}I]$ NT—3 对其进行随后的定量研究。

结合于并从其在水平切片 ($n=4$ 脑) 中的可替位结合和分离的 $[^{125}I]$ NT—3 以一种连贯的方式遍布脑中的各个区域。在结合时刻结合变化 4—20% (s. e. m.) 而在分离时刻变化 10—25%。在 2 个小时之内 200 微微克分子 $[^{125}I]$ NT—3 的结合都在增加,在 2 小时达到平衡并且在另外约 6 个小时内没有增加结合 (图 1, 顶图)。这些切片的结合速率常数是 $0.0074 \times 10^9 \text{min}^{-1} \text{mol}^{-1}$ 。用 200 微微克分子 $[^{125}I]$ NT—3 培育了 3.5 小时的切片在含有 200 毫微微克分子 NT—3 的缓冲液中洗涤 2 分钟至 18 小时显示出的 $19.4 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$ 速率的特定的 $[^{125}I]$ NT—3 结合的分 (图 1, 下图)。动力学导出的分离与结合速率常数的比 (k_{-1}/k_1 ; Weiland and Molinoff, 1981, Life Sci. 29 : 313—330) 给出了一个平均平衡分离常数 227 ± 28 微微克分子。

用浓度范围从 10 微微克分子至 9 毫微微克分子的 $[^{125}I]$ NT—3 平衡的另外的水平脑切片显示了饱和的可替位的结合,从饱

和等温线 (图 2, 左图) 和 B/F 交互小区段 (图 2, 右图) 可以清楚地看到该结合是双相的。从 10—750 微微克分子的可替位结合的饱和通过非线性回归分析可以获得 K_d 与 B_{max} 值的好的拟合。 K_d 值是 269 ± 64 而结合容量是 $26 \pm 3 \text{ fmol/mg}$ 蛋白质 (表 1)。一个从 0.75—9 毫微微克分子的第二范围的浓度显示了一个展现了一个低亲和性 ($K_d = 2.8 \pm 0.34 \text{ nM}$) 和高容量 ($B_{max} = 170 \pm 14 \text{ fmol/mg}$ 蛋白质) 的部位 (见表 1) 的第二坪的特定结合。从整个 10 微微克分子——9 毫微微克分子范围计算的 B_{max} 值近似地是对于高和低亲和性结合部位 (见表 1) 的单个的 B_{max} 值的一个附加函数。比较起来, $[^{125}\text{I}] \text{ rhNGF}$ 比 $[^{125}\text{I}] \text{ NT-3}$ 结合得更快并分离得更慢, 并且以大约 4 至 10 倍的更高的亲和性结合 (见表 1)。

NT-3 以 IC_{50} 为 420 ± 60 微微克分子 (见图 3) 与 300 微微克分子 $[^{125}\text{I}] \text{ NT-3}$ 竞争一个单结合部位群 ($nH = 1.2 \pm 0.26$)。BDNF 以一种双相方式与大部分 300 微微克分子 $[^{125}\text{I}] \text{ NT-3}$ 进行结合竞争 ($\text{IC}_{50} = 230 \pm 10 \text{ pM}$; $nH = 0.76 \pm 0.13$; 及 $\text{IC}_{50} = 37 \pm 2.9 \text{ nM}$; $nH = 0.94 \pm 0.05$) (见图 3)。比较起来高达 100 毫微微克分子的 CNTF 或 muNGF 的共同培育不能阻止 $[^{125}\text{I}] \text{ NT-3}$ 的结合。

表 1

低和高亲和性的 $[^{125}\text{I}] \text{ NT-3}$ 及 $[^{125}\text{I}] \text{ rhNGF}$ 结合的容量与亲和性

浓度范围

$[^{125}\text{I}] \text{ NT-3}$	K_d	B_{max} (fmol/mg prot)
10—750pM	$269 \text{ pM} \pm 64$	26 ± 3

0.75—10nM	2.8nM ± 0.34**	170 ± 15**
10pM—10nM	3.0nM ± 0.28**	200 ± 6**
[¹²⁵ I]rhNGF*		
(4—294pM)	69pM ± 9.7	9.9 ± 1.8
动力学测定	[¹²⁵ I]NT-3	[¹²⁵ I]rhNGF*
结合 k_1	$0.0074 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	$0.066 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$
分离 k_{-1}	$19.4 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$	$8.9 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$
$K_d (k_{-1}/k_1)$	227 ± 28pM	28 ± 11pM

* 平均值取自 Altar, et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 281—285

如图 4 所示, 大鼠前脑 (n=4/group) 的水平切片培育在有或没有 300nM NT-3 的 10pM 至 10nM 的 [¹²⁵I]NT-3 中以形成非特定结合。K_d 和 B_{max} 值按平均值 ± 标准平均误差的格式计算。

** 对高亲和性 [¹²⁵I]NT-3 结合的学生分布的 t-检验, p < 0.01,

冠状或水平切片的放射自显影均显示了明显与对鼠或人的 [¹²⁵I]NGF 的观察不同的特定 [¹²⁵I]NT-3 结合的图形 (Riopelle, et al., 1987, Neurochem. Res. 12 : 923—928; Richardson, et al., 1986, J. Neurosci 6 : 2312—2321; Ravich and Kreutzberg, 1987, Neurosci. 20 : 23—36; Altar, et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 281—285; Altar et al., 1991, J. Neurosci, 11 : 828—836)。发现在嗅路径 (嗅球的前核、侧嗅束的核)、海马 (齿状回、CA1、CA3 和 CA4)、尾状核及新皮质中有最高含量的结合 (见表 2)。尤其是, 在额、壁、以及带状 (cingulate) 区域

新皮质的第一层被显著地标记。第一层也贯穿内鼻 (entorhinal) 皮质被浓重地标记。中等含量的结合存在于横核 (accumbens)、嗜碱性外侧 (basolateral) 扁桃体、脚间核、脊髓的腹和背角、及上丘中。低含量的特殊的结合存在于侧膝、中隔和小脑中。不可替位的结合在白纤维束中可探测到, 其中白纤维束包括胼胝体、前连合、内囊、内延髓内囊, 或在苍白球中、大多数丘脑核、下丘脑、或在脑桥的其它区域中、髓质、或其它杏仁核中也可探测到。在心室周围 (circumventricular) 器官 (例如脉络丛或室管膜细胞层) 中未发现 [^{125}I] NT-3 的结合部位。在肝、肌肉、肾、胰和心脏中也不存在特定的结合。

表 2

在鼠脑中特定 [^{125}I] NT-3 结合部位的相对分布

高度结合

嗅球的前细胞核

侧嗅束核

表皮内鼻 (entorhinal) 皮层的外侧、中间和内侧部分

齿状回

齿状回门的海马颗粒细胞层的 CA1、CA3、CA4 锥体

层 1. 额、颞、带状皮层

嗅觉结节

中等结合

新皮层 (层 2-6)

细胞横核 (accumbens)

尾状核

嗜碱性外侧扁桃体

脚间核

脊髓灰质

上丘中

低等结合

上膝

中隔

小脑中

不可探测的结合

苍白球

黑质网(reticulata)的部分致密层

内侧丘系

丘脑

内囊

室管膜层

脉络丛

胼胝体

内延髓前连合

心室壁

骨骼肌、肝、肾、胰、心脏

NT-3 结合的相对数量可以从用 300pM [¹²⁵I] NT-3 产生的放射自显影照片的视觉估价中而被估价出。由 300nM NT-3 形成的非特定结合在整个脑切片中表现为一致并只占整个结合

的配位体的总量的 10—20%。这就允许从整个结合图像中估计特定结合的相对数量。

6. 3. 讨论

带有具有生物活性的 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 受体的放射自显影照片已经揭示了：这种配位体以高亲和力以可饱和、可逆且药理学上特定的方式结合到大鼠脑上。在鼠脑、猫脑（见图 5）、及人脑（见图 6）中类似的分布表示：这种异质的脑结合部位仍然被系统发育地保养。这些图显示了本体 NT-3 可作为神经营养因子的脑区域，并且还用来估价神经元特性及 NT-3 治疗对象的离体及在体内的研究提供了基础。因此，将讨论这些部位的动力学、药理学以及定位的研究。

6. 3. 1. 结合到其高亲和力部位的 $[^{125}\text{I}]$ NT-3 的特性

$[^{125}\text{I}]$ NT-3 的可替位的结合占其结合的 60—90%。10—40%不可替位的结合的一致的外形可能代表标记的 NT-3 独立受体与各种各样的组织成分（包括有骨髓的纤维束和非特定的蛋白质结合部位）的联系。然而，纤维素和不同的脑区域都没有结合 $[^{125}\text{I}]$ NT-3，显示了这种配位体对离散部位的区域选择性。在 $[^{125}\text{I}]$ muNGF 与组织切片 (Riopelle, 等人, 1987, *Neurochem, Res.* 2 : 928—928; Richardson, 等人, 1987, *J. Neurosci.* 6 : 2312—2321), 以及培养的细胞 (Landreth 和 Shooter, 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 4751—4755; Meakin 和 Shooter, 1991, *Neuron* 6 : 153—163) 的结合中, 已观察到成比例地更多数量的可替位的结合。在脊髓切片中 (Jakeman, 等人, 1990 年, 摘要, 21 页) 测量到了非特定 $[^{125}\text{I}]$ rnNGF 结合的减少。带有目前使用的附加蛋白质载体的脊髓、哥伦布 (Columbus)、OH 和脑的发育和成形性 (Altar, 等人, 1991,

Proc. Natl. Acad. Sci. 88 : 281—285; Altar, 等人, 1991, J. Neurosci. 11 : 882—836) 都可对这里得到的 NT-3 信号的高特异性有贡献。然而, 在存在未作标记的同种配位体 (80—90%) 的情况下 [¹²⁵I]NT-3 结合比在同样条件下为得到 [¹²⁵I]rhNGF (60—85%; Altar, 等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 281—285; Altar, 等人, 1991, J. Neurosci, 11 : 828—836) 的 [¹²⁵I] NT-3 结合更容易替位。

[¹²⁵I] NT-3 在其与脑切片联合后的替位在不存在未标记的 NT-3 的情况下是最小的, 并在存在 1000 倍额外 NT-3 的情况下替位持续几个小时。这种要求额外的同种配位体以促进高亲和力神经营养配位体分离也已经就 muNGF (Sutter 等人, 1979, J. Biol. Chem. 254 : 5972—5982), rhNGF (Altar, 等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 281—285) 和 BDNF (Rodriguez—Tebar, 等人, 1990, Neuro 4 : 487—492) 作了报导。

[¹²⁵I]NT-3 结合到大鼠脑切片的两个不同的部位上, 这两个部位主要是被 300nMNT-3 分别替位。这个高亲合力部位被严格地赋予特性, 因为其 227—269pM 的亲合力常数接近用于确定结合到大鼠、猫及人脑的 [¹²⁵I] NT-3 的动力学、药理学及分布特性的 200—300pM 的浓度。这个部位被 NT-3 优先且完全地占据。有趣的是, 部分 [¹²⁵I] NT-3 是被等浓度的 BDNF 替位, 而根本不是被均匀的 100nM NGF 或 CNTF 替位。NT-3 和 BDNF 而不是 NGF 的识别 trkB 受体 (Squinto, 等人, 1991, Cell 65 : 885—893; Kaplan, 等人, 1991, Nature 360 : 158—160; Bothwell, 1991, Cell 65 : 915—918) 的能力与关于 [¹²⁵I] NT-3 结合的药理学剖面是一致的。

高和低亲合力 NT-3 结合部位的容量分别是 26 和

170fmol/mg 蛋白质。因此，高亲和力部位的密度至少是 rhNGF (Altar, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 281—285; Altar, 等人, 1991 J. Neurosci. 11 : 828—836) 密度的二倍。对于 [¹²⁵I]BDNF 的高亲和力结合部位, 表现出比对 NGF 或 NT-3 甚至更多并同时更集中地定位。

6. 3. 2. NT-3 结合部位的分布

结合到大鼠脑切片的 [¹²⁵I] NT-3 的局部解剖图与结合到相似切片的 [¹²⁵I] rhNGF 的分布不相似 (Richardson 等人, 1986, J. Neurochem. 6 : 2312—2321; Riopelle 等人, 1987, Neurochem. Res. 12 : 923—928; Ravich 和 RreutzBerg, 1987, Neurosci. 20 : 23—36; Altar 等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 281—285)。例如, 在交叉带、中隔、细胞核上颞基片、第五脑神经细胞核或苍白球中 (Kasa, 1986, Nature 331 : 261—262) 没有显著的胆碱能细胞核被 [¹²⁵I] NT-3 作标记, 然而这些区域却显著地被用 [¹²⁵I] rhNGF 作标记或靠用 192Mab 对 NGF 受体的低亲和力亚单位 (例如, Woolf, 等人, 1989, Neurosci. 30 : 143—152; Pioro 和 Cuello, 1990, Neurosci. 34 : 57—87) 进行免疫染色而被作标记。一些已知含有胆碱能标记的后脑区域缺乏 NGF (Woolf, 等人, 1989, Neurosci, 30 : 143—152) 和 NT-3 结合部位。这些“缺少 NT-3/NGF 的受体”的胆碱能区域包括脑神经细胞核 III 和 IV, 向丘脑、下丘脑、和下丘的脚桥 (pedunculopontine) 或旁臂 (parabrachial) 胆碱能的突出, 和视叶前的木兰细胞胆碱能神经元向腹盖区域的突出。从交叉带向缺乏 NGF 受体的 (Altar 等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 281—285) 梨状皮层、系带和内鼻 (entorhinal) 皮层的胆碱能的突出 (Kasa, 1986, Proc. Neurobiol. 26 : 211—272) 有助

于在这些区域观察到相对紧密的 NT-3 结合。另外，谷氨酸能 (glutamatergic) 或其他的在向海马突出的梨状及内鼻 (entorhinal) 皮层中的神经传导系统可以包含这些 NT-3 结合部位。

在成年小脑中 NT-3 结合部位的相对缺乏与用 [¹²⁵I] NGF (Cohen-Cory, 等人, 1989, *Exp. Neurol.* 105 : 104-109; Altar, 等人, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 281-285) 或者靠对 NGF 受体的免疫学染色 (Pioro 和 Cuello, 1988, *Brain Res.* 455 : 182-186; Pioro 和 Cuello, 1990, *Neurosci.* 34 : 57-87) 对小脑进行密度标记形成了鲜明的对照。由于乳液放射自显影有助于在这个或几个其它区域分析 NT-3 结合部位的存在, 很明显: 在 NGF 结合部位及受体免疫染色相当稠密的成年大鼠小脑和其它区域内 NT-3 受体相对较少。在原位用 trkC 反义探针杂交之后, 小脑的颗粒细胞层也是最稠密标记的脑区域。用 trkC 感觉 cRNA 探针 (Lamballe, 等人, 1991, *Cell* 66 967-979) 产生的强的、残余 trkC 信号或者将 trkC 的信息转译成功能受体的相对减少是两种对于在小脑颗粒细胞层中存在 trkC 反义信息而没有 NT-3 结合的解释。然而, trkC 表达在海马, 新皮质和新纹状体 (Lamballe 等人, 1991, *Cell* 66 : 967-979) 中是非常明确的, 并且这些区域被最稠密地用 [¹²⁵I] NT-3 作标记。很显然, 直接比较 trkC mRNA 与结合到大鼠脑的邻近切片的 [¹²⁵I] NT-3 可以确定这两种标记的相似性。

[¹²⁵I] NT-3 结合的强度在猫脑和人脑切片也是明显的 (分别见图 5 和图 6)。重要的是这些部位的局部解剖图非常类似于在大鼠脑中观察到的图形。结合到大鼠脑的 [¹²⁵I] NT-3 的几个微妙方面, 如表面新皮层的稠密标记和遍及尾状核的均匀结

合，在猫脑或人脑中得以保存。不象大鼠，在猫中结合的异种性多少有些减少，然而这可能仅是由于在遍及较大的猫脑中观察的结合的更平缓变化的一个明显特征。

7. 例子：在大鼠胚胎海马中的神经营养因子的比较效果

从 Sprague-Dawley 大鼠的 E16-E18，或 E20 大鼠胚胎上剖切下海马。组织被绞碎，用 F10 介质 (Gibco) 洗涤二次并且在 37°C 下用 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco) 进行胰蛋白酶化。靠添加含血清介质使胰蛋白酶灭活，该介质由最少量的基本介质 (MEM)，并补充有胎腓肠血清 (FCS, 10%)、谷氨酰胺 (2mM)、青霉素 (25U/ml) 和链霉素 (25 μ g/ml) 构成。靠轻轻粉碎而得到的分离的细胞被收集起来并在低速 (500rpm) 下离心处理 30 秒。离心处理重复两次，然后细胞片重新悬浮在含血清介质内。在外加 10% 胎腓肠血清的 DME 内把海马神经元涂覆在聚鸟氨酸片 (10 μ g/ml) 上。在培养 4 小时之后，当每个相应神经营养因子已添加时，将介质换成加有 1mg/ml BSA 和 N_2 的补充介质 (Bottenstein, 等人, Methods Enzymol. 58: 94-109) 和 1mM 丙酮酸盐的 DME。介质每 3-4 天换一次，重新添加因子。

7. 2. 结果及讨论

对于 trkA、trkB 和 trkC 的 mRNA 含量在这些介质中被检定。如图 7 (A) 所示，尽管在成年脑中有一个可探测的 trkA 信息含量，而在海马神经元和星形细胞中却没有可探测的 trkA mRNA。在海马培养基中 trkB 和 trkC 的 mRNA 含量可与图 7 (B) 和 7 (C) 中在成年脑中所见的相比较，但在星形细胞内却不存在。在这些海马神经元中存在 trkB 和 C，而不存在 trkA 与以下发现很有关系，即这些细胞对 BDNF 和 NT-3 敏感，而对

NGF 不敏感。

检定神经营养因子对引入一个直接原始基因 (*fos*) 的效应 (图 8)。由 BDNF 和 NT-3 引入 *fos* mRNA 在大约 1 小时达到最多, 接着引入 *fos* 蛋白质, 其大约在 2-3 小时达到最多并持续至少 6 小时。大约 40% 的海马细胞表现出对 BDNF 和 NT-3 的 *fos* 响应。BDNF 和 NT-3 对 *fos* 引入的效应不是加性的。所有对 BDNF 和 NT-3 表现出 *fos* 响应的细胞都是神经元。用 *fos* 和 *calbindin* 双染色显示了 *calbindin*-免疫阳性细胞属于以引入 *fos* 作为回答细胞群。

已发现 BDNF 和 NT-3 导致神经丝蛋白质的增加 (50%)。它们还产生一个正 AChE 和 *calbindin*-免疫阳性细胞在数量上的增长。作为对比, NGF 没有明显效应。BDNF 和 NT-3 对于 *calbindin*-免疫阳性细胞数量上的剂量响应的研究表明响应在大约 3ng/ml 时饱和。NT-3 产生一个 *calbindin*-免疫阳性细胞数量的增长, 并伴随一个 *calbindin*-mRNA 含量的增长。推迟 4 天向培养基中添加 NT-3 并没有表现出影响 *calbindin*-免疫阳性细胞数量的增长, 这表明 NT-3 的作用是引入 *calbindin*-免疫显型, 而不是作为存活因子。比较由 BDNF 和 NT-3 产生的 *calbindin*-免疫阳性细胞的增加的发育轮廓。NT-3 的影响对发育早期的海马神经元 (E16-E18) 是相当显著的, 而在发育后期 (E20) 的影响则减小, 同时观察到 BDNF 的逆行效应。如表 3 所概括, 表现为对 BDNF 和 NT-3 产生响应的唯一细胞种群包括 AChE 阳性细胞和 *calbindin* 阳性细胞。就生存而论, 所检验的未表现出对 BDNF 和 NT-3 产生响应其它细胞群包括 GABA 细胞、麦酸胺细胞和生长激素抑制素-免疫阳性细胞。

在被诊断患有帕金森氏病、杭廷顿氏病或阿耳茨海默氏病

的患者的海马内可以观察到 calbindin 信息和蛋白质的含量降低达 60—80% (Iacopino 和 Christakos. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 4078—4082)。另外,最近表明在海马组织的特定区域内 calbindin 的存在肯定与这种神经元对急性发作导致的神经损伤的相应的对抗有关系 (Sloviter. J. Comp. Neurol. 290 : 183—196)。这个例子揭示了 BDNF, 和更大程度上, NT-3 能在海马神经元中引入 calbindin 蛋白质。这种 Ca²⁺—结合能力的增加有重要的生理学意义,即其对避免在挑选中海马神经元/群内细胞的死亡有重要意义。

表 3
海马的神经元

	NGF	BDNF	NT-3
TRKA—			
TRKB+			
TRKC+			
FOS 引入	—	+	+
神经丝	—	+	+
GABA 摄取	—	—	—
GABA 阳性细胞	—	—	—
谷氨酸盐摄取	—	—	—
ACHE 阳性细胞	—	++	+
Calbindin 阳性细胞	—	+	+++
SST 阳性细胞	—	—	—
VIP—IR	—	+	—

8. 例子：神经营养因子对纹状体神经元的效应

为了形成一个关于治疗应用的模型以确定杭廷顿氏病（在上面的 5. 1. 4 节讨论的），人们感兴趣的是，神经营养因子对培养的纹状体神经元的效应。杭廷顿氏病是一种正染色体显性症状，该症状导致反映在识别、运动原控制及情感缺陷方面的进行性神经变性。衰退在基础神经节（尤其在纹状体）是最显著的，基础神经节表现为疾病初起部位。这个例子靠 Northern 印迹分析揭示了在体内和在体外的神经营养因子及其受体的 mRNA 表达的含量。

8. 1. 材料及方法

8. 1. 1. 组织分离及培养

在下面的发育阶段从 Sprague—Dawley 鼠脑上剖切下脑组织：胚胎的 17 天（E17）、生后的 1 天（P1）、7 天、14 天、20 天、和成年。用于体内分析的组织立即在干冰上冷冻。

按如下方式从 E17 鼠脑中制备纹状体神经元培养物：在机械粉碎之后，在无钙和镁的 Hank 氏平衡盐溶液中绞碎纹状体组织和靠用 0. 25% 胰蛋白酶和脱氧核糖核酸酶（0. 2mg/ml）分离纹状体组织。分离的细胞以在 100mm 的培养皿上 8×10^6 个细胞的密度接种，该培养皿事先涂上聚赖氨酸和昆布氨酸（laminin）。在由 Dulbecco 的改性的 Eagle' s 介质及 10% 胎儿腓肠血清（DME—FCS）构成的介质中培养的最初 4 个小时后，该介质被无血清 N2 介质取代（Bottenstein 等人，1979，Meth. Enzymol. 58：94—109）。

按下面的方法从 P1 鼠脑中制备纹状体的和海马的星形细胞培养物：绞碎组织，和通过 0. 25% 胰蛋白酶及脱氧核糖核酸

酶 (0.2 mg/ml) 的处理对组织进行酶分离。在以低速度离心 5 分钟, 并在 300rpm 速度下附加 5 分钟离心以后, 细胞悬浮物靠粉碎来机械地分离。然后使细胞通过一个 Nitex 过滤器滤筒, 并在 DME-FCS 中的 T75 组织培养物烧瓶中以 71,000-个细胞/cm² 的密度接种。在接种后的 1、3、5、7 和 9 天更换介质。在第 7 和 9 天, 摇晃烧瓶以去掉神经元, 巨噬细胞和 02-A 先祖细胞。星形细胞体外的第 10 天(DIV) 通过。

8. 1. 2. 免疫细胞学的染色

免疫细胞化学染色被用来确定星形细胞和神经元培养物的纯度。对于神经胶质纤维酸性蛋白质 (对于星形细胞是特定的) 和神经丝蛋白质 (对于神经元是特定的) 的抗体被用来与其它细胞一型一特定标记结合起来描绘培养物的细胞组成。

8. 1. 3. RNA 分离

所有的 RNA 是靠萃取从纹状体神经元培养物 (在 4DIV)、纹状体星形细胞培养物 (在 28DIV) 和海马星形细胞培养物 (在 28DIV) 中制取的 (Chomczynski 和 Rougeon, 1980, Anal. Biochem. 162 : 156—159)。所有的 RNA 是从纹状体的或整个脑组织样品中靠在 0.3M LiCl/6M 尿素中萃取并接着靠酚/氯仿萃取而制备 (Auffray 和 Rougeon, 1980, Eur. J. Biochem. 107 : 303—314)。RNA (10 μ g/通路) 是靠电泳通过 1% 琼脂糖—甲醛凝胶 (Bothwell 等人, 1990, 在无性繁殖及分析 Eukaryotic 基因的方法, 42—43 页, Jones 和 Bartlett, 波士顿) 接着靠毛细管传送到尼龙薄膜上而被分馏。对 trkB (1.1kb, 跨越胞质内酪氨酸激酶区域) 和 trkC (800bp, 跨越胞质内酪氨酸激酶区域) 的探针被标有 ³²PdCTP 的随机六聚物作标记, 薄膜在 0.5 磷酸钠缓冲剂

(PH7.9)内在 65℃下杂混一整夜,缓冲剂含 1%牛血清白蛋白,7%的 SDS 和 100μg/ml 经声波处理的鲑精液。填料主要在 2×SSC 和 0.1%SDS 中洗涤,然后在 1×SSC 和 0.1%SDS 中洗两次,并暴露于 X 射线胶片一周。转录本含量的定量是靠在 LKB 激光密度测定仪上进行密度测量扫描而完成的。

8. 2. 结果及讨论

检定在大鼠纹状体中的 *trkB* 表达揭示了:可以在胚胎第 17 天的脑中探测到在 E17 和生后的第 1 天之间(见图 9)出现的表达的戏剧性增加。表达的峰值可以在生后第 14 天观察到。*trkB* mRNA 的表达可在培养的 E17 纹状体的神经元(4DIV)中探测到,但在从 P1 纹状体或 P1 海马中制取的星形细胞(28DIV)中探测不到。转录本含量的密度测量(图 11)表明:在 P14 的 *trkB*-mRNA 的表达相对于在整个成年脑的含量提高了 1.15 倍。

早在 E17 时,*TrkC* mRNA 表达在大鼠纹状体中被探测(图 10)。在 P7 和 P20 之间 *trkC* mRNA 的表达达到高峰,这时可探测到相对于整个成年鼠脑转录本含量提高了 1.5—1.9 倍(图 12)。在成年期表达迅速下降。类似于 *trkB* 表达,*trkC* mRNA 在培养的纹状体的神经元(4DIV)中被表达,而没有在纹状体的或海马星形细胞(28DIV)中被表达。

在发育过程中的大鼠纹状体中对于 *trkB* 和 *trkC* 的 mRNA 表达表明:BDNF 和 NT-3 可在纹状体中作为营养因子。

9. 例子: 神经营养因子-3 对存活的影响与轴突长出对位于腰的、颈的、骶骨的和胸的神经节中的脊柱感觉神经元的影响的比较

当作为外植体或分离的富集神经元培养物培养时,小鸡背

根神经节 (DRG) 较大程度或较小程度地对 NGF、BDNF、NT-3、NT-4 和 CNTF 有响应。鸡胚 DRG 神经元在缺乏任何神经营养因子的情况下在放入培养物中 24 小时内死亡。每种上面提到的因子可维持一些范围在 10—60% 的神经元轴突的存活及长出, 这取决于因子、神经元的发育的阶段等等。很明显每一种上面提到的神经营养因子都对 DRG 神经元亚种群具有独特的和重迭的特性, 尽管还没有明显的证据说明哪一种神经营养因子维持哪一种感觉神经元的亚型。这个例子说明了 NT-3、NGF 和 BDNF 的比较特性。

9. 1. 材料和方法

9. 1. 1. 外植体培养物

从处在从 E6 到 E10 的发育阶段的鸡胚中收集 DRG。开始在骶骨区域神经节中从右边到左边沿整个神经元的轴成对地被收集。在每个水平的 5—6 个神经节或骶骨的、腰的、胸的或颈的神经节库被外植在胶原蛋白凝胶基质上 (Lindsay 和 Peter, 1984, *Neuroscience*, 12, 45—51)。在存在或不存在 5mg/ml NGF、BDNF 或 NT-3 的情况下在 F14 介质+5% 马血清中培养神经节。在 24 小时后, 以 0 至 +5 任意等级测定纤维长出的程度, 0 实际上代表无纤维, +5 代表纤维的非常大的光轮 (可见的 NGF 的饱和等级, 在该测定中最有效力的因子)。

9. 1. 2. 分离的富集神经元培养物

从 E8 胚胎中分别收集腰的和胸的神经节, 用 0. 25% 胰蛋白酶分离并去除非神经元的细胞 (Lindsay 等人, 1985, *Develop. Biol.* 112: 319—328)。纯化的神经元以每 35mm 培养皿 8000 个神经元的密度在聚鸟氨酸—昆布氨酸 (laminin) 上接种。细胞在

存在包含有 5% 马血清的 F14 介质存在的情况下被培养。进行 NGF、BDNF 或者 NT-3 的从 1pg 到 10ng 的剂量反应。在 48 小时后，确定在三重培养物上突起生育神经元的数目 (Lindsay 等人, 1985, *Develop. Biol.* 12 : 319—328)。

9. 2. 结果和讨论

如图 13 所示, NGF 对来自 E6、E8 或 E10 DRG 的 DRG 外植物的效应是非常一致的 (不论分节的水平如何) —— 骶骨的、腰的、胸的和颈的神经节表现了相等的高度的反应, 在 NGF 的饱和水平 (图 13 中的空白条柱) 的 4—5 刻度之间。BDNF 的效力比 NGF 小, 在刻痕 2—3 之间, 但 BDNF 的效应沿神经元的轴是均匀的, 骶骨的、腰的、胸的和颈的神经节表现出基本相同的响应。与 NGF 和 BDNF 形成对照, NT-3 的效应依靠 DRG 的分节水平而变化。响应于在 E6 和 E10 之间的所有年龄的 NT-3, 骶骨的和胸的神经节只表现出微弱的纤维长出。腰的和颈的神经节对 NT-3 要敏感得多, 腰神经节是最敏感的, 在 3—4 之间的刻度。与骶骨的和胸的神经节比较 NT-3 在腰的和颈的神经节上的不同效应在研究的所有年龄段都是类似的。

在分离的富集的神经元培养物更精确的状态下, 对于那些可见到带有外植物的神经元可得到类似的结果 (见图 14)。NGF 维持相似百分比 (40—50%) 的腰的或者胸的 DRG 神经元的存活。尽管 BDNF 没有 NGF 有效, BDNF 对腰的或胸的神经元的效应基本相同 —— 维持大约 30% 神经元的存活。相反, NT-3 维持腰 DRG 神经元 (30%) 的存活比维持胸神经元的存活高出 2.5 倍。

腰的和颈的增大的 DRG 包含比骶骨或胸的神经节更多的大直径、大纤维本体感受的感觉神经元。因而, 数据表明: NT

—3 在大直径、大纤维 DRG 神经元上具有选择性的活性。

10. 例子：在用体外小脑中的神经营养因子处理后引入 FOS 营养因子

10. 1. 材料和方法

10. 1. 1. 组织分离和培养

从同步怀孕的成年 Sprague—Dawley 鼠 (Zivic—Miller, PA) 妊娠 16 天 (E16) 时取出小脑，并在冰上剖切，去除周围组织。3—4 只同年龄 (由从牙冠到臀部的长度确定) 的同窝仔的小脑在 35mm 组织培养皿中被绞碎之前，在冷的 Ham 氏 F10 中被混合及漂洗 3 次，Ham 氏 F10 中补充有 25mMHepes 和 L—谷氨酰胺。靠 37℃ 下在 Ham 氏 F10 中把带有 0. 25% 胰蛋白酶 (GIBCO) 的组织培养 15 分钟可得到单细胞悬浮液。然后把细胞悬浮液转移到胰蛋白酶抑制剂溶液中，该溶液中包含生长介质 (见下面) 和 50 μ g/ml 脱氧核糖核酸酶 I 型 (Sigma)。接着在室温进行 5 分钟灭活处理后，细胞在生长介质中被分离，通过让分段反复通过一个巴斯德吸管收缩端，BME (GIBCO) 被补充有 6g/l 葡萄糖 (Sigma)、5% 马血清 (GIBCO)、1% (V/V) N_2 添加剂，(Bottenstein, 1983 在 “Advances in Cell. NeuroBiol. 4 卷, Fedroff 和 Hertz, Academic Press, New York, 页 333—379)、0. 5% (V/V) 谷氨酰胺 (2mM, GIBCO) 和 0. 25% (V/V) 青霉素—链霉素 (分别是 10 μ g/ml 和 10 μ g/ml, GIBCO)。单细胞悬浮液在三次粉碎并接着在 55 \times g 两次离心分离 45 分钟之后被收集。松散的细胞片被混合并被悬浮在生长介质中。细胞的浓度和生存能力分别用血细胞计数器和台盼兰染色来确定。把细胞稀释到大约 10⁶ 个细胞/ml 并放在 24 孔 (Falcon) 培养皿上的生

长介质（见上）中，该皿用聚鸟氨酸（10 μ g/ml, Sigma）和昆布氨酸（laminin）（10 μ g/ml）预涂覆。在沉淀 5—6 小时后把介质换成无血清生长介质（规定的介质）并在 4 天后更换。细胞在 5%CO₂ 加湿环境下在 37℃ 保持 8 天。用于本研究所述实验的沉淀密度是 1500—1600 个细胞/mm²。

10. 1. 2. FOS 免疫组织化学

在培养期结束时用 0. 1—1ng/ml 浓度的 BDNF、NT-3 或 NGF 处理细胞 30—300 分钟。然后细胞在 BME 中再一次被洗涤，并在室温情况下在 PBS 中的 4% 多聚甲醛中固定 30 分钟之前在 BME 中的 2% 的多聚甲醛中预固定 10 分钟。在用 0. 1% 三硝基甲苯进行渗透性处理 10 分钟并在 10% 普通山羊血清（NGS）和 1% BSA 中阻滞 90 分钟之后，细胞用抗-FOS 抗体（致癌基因）在 4℃ 下培养 2 天，该抗体在 PBS 中用 5% NGS 稀释到 1/2000。在 PBS 中洗涤几次后，培养物用生物素基化的山羊-抗-兔 IgG（Vector 实验室，ABC-Elite Kit）在室温下培养 90 分钟，IgG 在 PBS 中用 1% NGS 稀释到 1/1000。ABC 络合物在 PBS 中稀释到 1/200 并培养 40 分钟。作为基质，3, 3-二氨基联苯氢氧化胺（DAB; Sigma）在 0. 2M 乙酸盐/10mM 咪唑/80mM NiSO₄ 缓冲剂中以 0. 3mg/ml 的最后浓度使用。

10. 2. 结果

神经营养因子——3 和 BDNF 在培养物（图 15 和图 16）中以依赖于剂量的方式随时间分别诱发 C-FOS 蛋白质表达。在 150 分钟之后发现了对 C-FOS 蛋白质染色的最大数量的细胞。但是，在用 NGF（见图 17）处理之后，未发现应答。

11. 例子：神经营养因子——3 在 E14 腹中脑培养物中的效应

该例子公开了神经营养因子——3 在维持存在于发育中的黑质内的多巴胺能 (dopaminergic) 和 GABA 神经元群的存活或表现型标记物表达的功效。

11. 1. 材料和方法

11. 1. 1 组织分离和培养

按照 Hyman 等在 1991, *Nature* 350 : 230—233 中描述的方法从 E14 大鼠脑中制备培养物。简单地说, 所有培养物均是从 14 天大的大鼠胚胎 (E14) 切割下的腹中脑制备的。一般使从定时交配的 Spragne Dawley 大鼠获得的 2—3 只同窝大鼠胚胎中取出的组织在 37℃ 下在 F12 介质 (Gibco) 中受胰蛋白酶作用 (0. 125%, Worthington) 20 分钟, 在含有 7. 5% FCS 的生长介质中洗涤之后该组织在低速度下离心 5 分钟, 小片靠研磨分离。在使非扩散的细胞块放置 1—2 分钟后, 将单细胞悬浮液接种到 35—mm 含有生长介质的培养皿 (预涂覆有聚鸟氨酸和昆布氨酸 (laminin)) 中, 细胞密度为 5×10^4 个细胞/cm², 在补充有谷氨酸胺 (2mM), 葡萄糖 (6mg/ml)、青霉素 G (0. 5μg/ml)、链霉素 (5μg/ml) 和 FCS (7. 5%) 的 MEM 介质中培养一整夜, 以使细胞附着之后, 在有和没有 BDNF 存在下将细胞在无血浆的特定介质 (Hyman 等人, 1991, *Nature* 350 : 230—232) 中培养, 不同的是该介质中胰岛素的含量为 20ng/ml。为了使多巴胺能细胞可见, 培养物用 4% 多聚甲醛固定, 充分洗涤, 用 2% 的皂草苷在含有 1. 5% 马血清的索伦逊 (Sorensen' s) 氏缓冲剂中使培养物具有渗透性, 并用抗大鼠 TH (Boehinger—Mannheim) 的小鼠单克隆抗体染色。用一种 Vectastain ABC 试剂盒 (Vector 试

实验室) 使基本的抗体结合可见。

11. 1. 2. GAD 酶活性检验

按照 Rimura 和 Kuriyama (1975, Jpn. J. Pharm. 25: 189-195) 的方法, 通过测定 $^{14}\text{CO}_2$ 从 L- [1- ^{14}C] 谷氨酸中的释放来确定 GAD 的酶活性。在 35mm 培养皿上的细胞用 30 μl 的含有 50mM KH_2PO_4 (PH7. 2) 和 0. 25% TritonX-100 的溶液溶解, 刮削并收集。5 微升的细胞溶解产物用来检验 GAD 的酶活性。在一般检验中, 在 KH_2PO_4 缓冲液 (50mM. PH7. 2) 中, 反应混合物包含 0. 57mM L- [1- ^{14}C] 谷氨酸 (NEN, NEC-715, 52. 6mCi/mmol)、谷氨酸 (3mM)、吡哆醛磷酸盐 (0. 2mM) 和 AET (1mM)。在这些反应条件下, 发现酶反应直到 2. 5 小时都是线性的。培养在 37 $^\circ\text{C}$ 下持续 2 小时, 并通过向反应混合物中注入 25 μl 8N H_2SO_4 终止培养。然后培养继续进行 60 分钟。被释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 用季铵盐碱溶液收集并记数。

11. 1. 3 GABA/DA 摄取检验

对 GABA 和 DA 的同时摄取在下列培养缓冲液中测定: 125mM NaCl 、5mM KCl 、5. 6mM 葡萄糖、1mM CaCl_2 、1. 2mM KH_2PO_4 、1. 2mM MgSO_4 、25mM HEPES、PH 值调到 7. 4 并置于室温下保存。使用的当天, 培养缓冲液加到 100nM pargyline、1mM 抗坏血酸、10nM 氨基氧基乙酸和 2mM β -丙氨酸中, 该缓冲液分成 4 等份, 其中两份加到 5nM 苯托品甲磺酸盐 (BZT) 和 1nM 2, 4-二氨基正丁酸 (DABA) 中, 两等份 (+ 和 - BZT 和 DABA) 加热到 37 $^\circ\text{C}$ 、剩下的 2 份保存在冰箱中。每一个处理组有 5 个 35mm 培养皿, 其中 3 个标以 (-), 2 个标以 (+) 所有培养皿用培养缓冲液洗涤一次, 及用含有 +/- BZT 和 DABA 的热缓冲液洗涤一次, 在 37 $^\circ\text{C}$ 下培养 5 分钟之前在每个培养皿中加入 0.

8ml + / - BZT 和 DABA 缓冲液。接着加入 0.2ml ^3H -DA (最终浓度为 50nM) 和 ^{14}C -GABA (最终浓度为 500nM), 37℃ 下让 ^3H -DA + ^{14}C -GABA 的摄取进行 15 分钟, 然后将培养皿放在冰块上, 培养液被吸出, 用冷培养液 (+ / - BZT 和 DABA) 洗涤三次, 并用冷的标准 PBS 洗涤一次, 每个样品中加入 0.5ml 0.5N NaOH, 且这些样品在室温下培养至少一小时, 每次全部样品中加入 10ml Ultima 金, 且 ^3H 和 ^{14}C , 在 Packard 闪烁计数器的程序 #15 上被记数。

培养物用具有下列组分的培养缓冲液洗涤三次: 100 μM Pargyline, 1mM 抗坏血酸、10 μM 氨基氧基乙酸和 2mM β -丙氨酸。然后在 37℃ 下培养缓冲液中预培养 5 分钟, 在还含有 5 μM 苯托品 (BZT) 和 1mM 2, 4-二氨基-正丁酸 (DABA) 的缓冲液中预培养同样的培养物。然后在 37℃ 下 15 分钟内加进 50nM ^3H -DA 和 500nM ^{14}C -GABA。通过将培养皿放在冰床上并用冰冷的缓冲液冲洗的办法停止对标记物的摄取。样品用 0.5N NaOH 溶解, ^3H 和 ^{14}C 由液体闪烁计数器计数。特定的摄取被定义为在有 BZT 和 DABA (总量) 存在下所测得的摄取值与在无 BZT 和 DABA 存在下测得的摄取值的差。

多巴胺能的标记还通过对酪氨酸羟化酶进行免疫细胞化学染色加以分析 (Hyman 等, 1991, Nature 350: 230-233)。

11. 2 结果和讨论

进行 NT-3 的剂量反应试验以确定在有这种因子存在下培养的细胞在体外 7 天内是否表现出对多巴胺能神经元来说的更强的存活能力 (见图 18)。用 NT-3 处理培养物在体外 7 天后, 引起了大约多巴胺能神经元数量上 2.5 倍的提高 (通过用抗 TH 抗体染色测定)。这种效果在浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下饱和。在浓

度为 25 和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时，这种效果明显减弱。

当在 NT-3 剂量反应试验中高亲合性 ^3H -DA 摄取被测定时，在体外 7 天以 NT-3 处理培养物之后，这种活性大约增加 2 倍（图 19）。这种效果对于以上描述的 TH 免疫细胞染色实验具有相似的剂量反应曲线轮廓。

为了测定用 NT-3 处理培养物后是否对除多巴胺能细胞以外的其它神经元群有影响，进行了估计 GABA 能神经元活性和/或存活能力的试验。在体外 7 天期间，被各种浓度 NT-3 作用的培养物被处理以测定高亲合性 GABA 的摄取和 GAD 活性。

在体外 7 天期间，当在浓度为 20 ng/ml 的培养基中时，NT-3 产生了在 ^3H -GABA 摄取活性方面增加了 2.8 倍的最大效果（图 20）。

当 GAD 酶活性在用不同浓度的 NT-3 作用 7 天的培养物中测量时，对于在 NT-3 浓度为 50 ng/ml 下保存的培养物，获得了 2.3 倍的最大增加（图 21）。

这个例子说明，NT-3 在大鼠胚胎黑质中对多巴胺能和 GABA 能神经元群两者起作用。至于多巴胺能系统，在为测定独立表现型标记活性而进行的实验中，结果显示类似的双重作用，表明 NT-3 具有提高这些神经元存活力的活性。就 GABA 能神经元群来说，在高亲合性 GABA 摄取方面较测定 GAD 活性时观察到的具有更明显的增加。这组数据表明 NT-3 可激发细胞的 GABA 摄取活性（它们的代谢能力的一种量度），而不依赖于对 GAD 活性产生的影响。

12. 例子：神经营养因子-3 在鼠 E17 隔膜胆碱能神经元的 E17 培养物中对胆碱乙酰转移酶（CAT）活性的作用

12. 1. 材料和方法

12. 1. 1. 组织分离和培养

将怀孕 17 天后的 Sprague—Dawley 大鼠的中隔区与周围组织剥离开，吸出组织碎片，用 HamsF—10 洗涤三次，然后转移到 35mm 的组织培养皿中并绞碎。单细胞悬浮液用在 37℃ 下以 0. 25% 胰蛋白酶培养组织 20 分钟的方法制取。室温下在含有 50 μ g/ml 脱氧核糖核酸酶 I 型 (Sigma) 的生长介质 (见下) 中培养 5 分钟使胰蛋白酶失去活性后，反复将碎片通过 Pasture 吸管的收缩端使细胞分离。然后分离的细胞在 500 \times g 下离心 45 秒钟。除去上清液并再次离心。松散的细胞片在生长介质中重新悬浮和结合，细胞产量用血细胞仪测定。最后，细胞接种于涂有聚鸟氨酸 (10 μ g/ml) 和昆布氨酸 (10 μ g/ml) 的 6mm 培养基中。培养 24 小时后，根据细胞排斥台盼兰染色的能力检查细胞的存活力。

用于由神经元和神经胶质组成的培养物的普通培养基 5HS/N₃ 包含：5% (V/V) 马血清 (Gibco)，1% N₃ 添加物 (V/V) (Romin 等，1982, Dev. Brain. Res. 2 : 583—589)、0. 5% (V/V) 谷氨酰胺 (200mM, Gibco) 和 0. 25% (V/V) 的在 Dulbecco' s 改性的 Eagle' s 介质中的青霉素—链霉素 (分别为 10, 000 单位/ml, 10, 000mcg/ml, Gibco)。接种后 5—6 小时，将生长介质换成含有下列组分的 DMEN 制备富集的神经元培养物：1% N₃ 添加物、0. 5% 谷氨酰胺和 0. 25% 青霉素和链霉素。在两种条件下，采用阿糖胞苷的 (1 μ m, 24 小时) 处理被用来限制神经胶质细胞核扩散。

12. 1. 2. 胆碱乙酰转移酶活性试验

用 100 μ l PBS 冲洗细胞 2 次的方法从培养物中除去生长介

质。细胞的溶解可以通过一个冷冻—解冻循环和在 37℃ 下在含有 200mM NaCl 和 0.25% (V/V) TritonX-100 的 PH6.7 的 50mM 的 KH_2PO_4 溶液中培养 15 分钟的方法进行。取出 2 微升细胞溶解物，并按照微—Fonnum 方法 (Fonnum, 1975, *J. Neurochem.* 24: 407—409) 测定 CAT 活性。最终基质组合物由下列成分组成: 0.2mM [^{14}C] 乙酰—CoA (NEN54.4mCi/mmol), 300mM NaCl, 8mM 溴化胆碱, 20mM 乙二胺四乙酸, 和在 50mM NaH_2PO_4 (PH7.4) 缓冲液中的 0.1mM 新斯的明。在这些酶和基质浓度下, 酶促反应在 90—120 分钟内是线性的。在试验期间, 通过加入特定 CAT 活性抑制剂即 N-羟基乙基-4-(1-萘乙烯基) 苯基偶氮二氨基吡啶 (HNP) 来测定对胆碱乙酰转移酶的诱导特性 (White 和 Cavallito, 1970, *J. Neurochem.* 17: 1579—1589)。

12. 2. 结果

在浓度为 100ng/ml 下处理 7 天后, 神经营养因子-3 稍微增加了 CAT 活性的水平 (图 22)。

13. 例子: [^{125}I] NT-3 在感觉神经元中的逆行轴突传送

确定 NT-3 在 NT-3 响应神经元的逆行传送的基本原理源于这样一个研究结果, 即相关的神经营养因子, 神经生长因子 (NGF) 是末梢交感神经元和感觉神经元的靶衍生, 逆向传送的存活因子 (Thoenen 和 Barde, 1980, *Physiolog. Rev.* 60: 1284)。大量逆向传送的外源 NGF 研究 (Hendry 等, 1974, *Brain Res.* 68: 103) 和内源 NGF 研究 (Rorsching 和 Thoenen, 1983, *Neurosci. Lett.* 39: 1) 表明传送是特定的和可饱和的。NT-3 和相关神经营养因子的传送机理的阐明会弄清 (1) NT-3 的引

入途径和 (2) 在再生过程中或病原菌消除过程中可能对 NT-3 作出应答的神经元的特定类别。

13. 1. 材料和方法

13. 1. 1. 动物的处理

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (200—250g) 用水合氯醛和巴比妥的混合物消毒。将右坐骨神经暴露出来, 弄碎离末端 0.3cm 的闭孔肌内腱。两分钟内在弄碎部位用 Hamilton 注射器注入 2 μ l [125 I] NT-3。缝合伤口, 让动物恢复 18 小时。这时弄死大鼠, 从右侧 (同侧的) 和左侧 (对侧的) 取出第四和第五腰的 (L4 和 L5) 背根神经节 (DRG), 浸入 1% SDS 中, 在 γ 计数器上计数 1 分钟。另一组动物割去神经节, 浸入 4% 多聚甲醛中用于进行 DRG 的放射自显影。大量的数据以 L4 加 L5 DRG 中的每分钟次数表示出来并与未注射一侧的 L4、L5 的每分钟次数比较。

13. 1. 2. [125 I] 标记的神经营养因子的制备

6—10 μ g 的纯化 NT-3 用乳酸过氧化物酶方法 (Marchalonis, 1969, Biochem. J. 113: 299—305) 碘化。碘的结合通常为 70—80%, 特定活性范围从 150—200cpm/ μ g, NT-3 在含有磷酸盐缓冲盐水中 0.01% 硫酸鱼精蛋白的 1% 的 BSA 中培养。

13. 2. 结果

实验表明, [125 I] NT-3 从弄碎的成年大鼠的坐骨神经逆向传送到 L4、L5 DRG 中 (图 23), 该传送特殊之处在于 100 倍以上的未标记的 NT-3 能阻止 80%—90% 的传送。有趣的是, 100 倍以上的 BDNF 或 NGF 仅能部分地抑制 NT-3 的传送, 这说明对 NT-3 特定的传送的成分对其它神经营养因子不敏感。

14. 例子：在用维生素 B₆ 处理的大鼠中用 NT-3 逆向轴突传送来监测感觉神经元缺损

14. 1. 材料和方法

14. 1. 1. 动物的处理

每日给予雌性 Sprague Dawley 鼠 (200—250g) 腹膜内注入 800mg/kg 盐酸维生素 B₆，连续 12 天。注射后，用水合氯醛 (170mg/kg) 与戊巴比妥 (35. 2mg/kg) 的混合物将大鼠麻醉。暴露出右侧坐骨神经并将 2 μ l 的 [¹²⁵I] 标记的 NT-3 或 BDNF 或 NGF 在闭孔肌内腱的水平上注入到神经中。缝合伤口并让大鼠恢复 18 小时。这时用断头术杀死大鼠并取出腰部第 4 (L4) 和第 5 (L5) 背根神经节 (DRG)，并放入 4% 多聚甲醛中，还将 L4—L5 脊髓段解剖并在固定剂中计数。把样品置于 γ 计数器中计数 1 分钟并估计每分钟 L4 加 L5 的总数目。

14. 1. 2. [¹²⁵I] 标记的神经营养因子的制备

采用乳酸过氧化物酶的方法来纯化和放射性碘化 NT-3、BDNF 和 NGF。经透析去掉各个制剂中的游离碘。¹²⁵I 标记的神经营养因子的特定活性在 2800—5800cpm/fmol 范围内。按在 E8 小鸡中 DRG 轴突长出测定中的估计，所有 ¹²⁵I 标记的蛋白质中有 90%—99% 具有与其未标记对应物相同的活性。

14. 2. 结果与讨论

图 24 表明，当向对照鼠的右侧坐骨神经注射时，三种标记的神经营养因子均运送到同侧 (右) 而不是对侧 (左)。图 24 也表明，在维生素 B₆ 处理过的鼠中，[¹²⁵I] NT-3 和 [¹²⁵I] BDNF 在 DRG 内的传送分别减少 71% 和 60% ($P < 0. 01$)。而 ¹²⁵I—NGF 在维生素 B₆ 处理的鼠内没有变化。有趣的是，NT-3 和 BDNF 的传送在维生素 B₆ 处理的鼠脊髓中与对照物比较没有

显著变化 (图 25)。

这些结果表明, 神经营养因子的逆向传送的确定可以提供
在末梢神经疾病中潜在的神经衰退机制的诊断线索。看它们是
否被化学地 (如这里的情况)、机械地或遗传学地诱导。

15. 实施例: 中枢神经系统内 [¹²⁵I] -NT-3 的逆向传送

15. 1. 材料和方法

15. 1. 1. 动物的处理

雄性 Sprague-Dawley 鼠用水合氯醛戊巴比妥麻醉并固定在
主体定位 (stereotaxic) 装置上。少量的 [¹²⁵I] 标记的营养因
子 (0. 2—0. 5 μ l) 用硼硅玻璃微量吸管慢慢注入海马或新纹状
体中。将等量的 [¹²⁵I] -NGF 注入对照动物组中以验证在 CNS
内传送方式的特征。将伤口缝合并让动物恢复。大约 24 小时后,
将该动物杀死, 取出大脑, 切除 CNS 的特定区域并用 γ 计数器
计数 1 分钟。在另一试验中, 动物被灌注, 取出大脑, 并为放
射自显影胶片和乳剂切片并制版。海马注射以齿状回/CA4-门
区为中心。纹状体的注射以嘴侧尾状核为中心。

15. 1. 2. [¹²⁵I] -标记的神经营养因子的制备

如前述实施例 14. 1. 2 部分所描述的方法将神经营养因子
-3 放射性碘化。

15. 2. 结果和讨论

正如前面对 NGF 的演示, 涉及微解剖和计数的试验 (表
4) 表明, NT-3 是从海马至中隔/交叉带的神经元逆向传送的,
尽管被传送的 NT-3 计数要成比例地远远小于 NGF。胶片和乳
剂放射自显影实验 (表 5) 表明, 与两种神经营养因子相关联的
标记被很好地定位于中隔和交叉带的木兰细胞神经元上, 和已
知向海马提供胆碱能输入的细胞上。与注射 NT-3 的动物相

比,注射 NGF 的动物中的木兰细胞神经元非常稠密地被标记且数量多。然而,也发现 NT-3 被在中隔/交叉带内被在较小的神经元群所传送。

与被传送的 NGF 相关联的标记全部位于神经元上,这些神经元对乙酰胆碱转移酶 (CAT) 和低亲和力 NGF 受体 (LNGFR) 都有免疫反应,这证明这些细胞为胆碱能的。类似于 NGF, NT-3 也在中隔/交叉带内被较大的胆碱能神经元所传送。然而,传送 NT-3 而不是 NGF 的较小的细胞对上述胆碱能标记是免疫阴性的。这种观察结果表明中隔/交叉带核含有大量对 NT-3 而不是对 NGF 有反应的非胆碱能神经元。

涉及微解剖和计数的试验(表 4)表明 NGF 和 NT-3 两者都是被从纹状体传送至腹中脑,包含黑质的脑部区域。这种观察结果对两种营养因子来说是新的。放射自显影胶片的测定支持上述结论,清楚地表明增加密度的被划定区域覆盖在黑质上。然而,与标记相关联的 NGF 和 NT-3 的分布模式在这种结构内明显不同。在 NGF 被注射的试验中,银粒在表明这一营养因子逆向传送的黑质的网状部上扩散地分布。注射 NT-3 后银粒聚集体附着在部分致密层上的神经细胞体上,表明 NT-3 而不是 NGF 被这些细胞逆向传送,实质上所有传送 NT-3 的细胞对作为部分紧密层的多巴胺能神经元的一种标记的酪氨酸羟化酶均是免疫活性的。

胶片和乳液的放射自显影的测定清楚表明 NGF 和 NT-3 两者都被传送到脑的一些区域,这些区域予先未被怀疑含有对这些营养因子敏感的神经元。

对 NGF 来说,这些新区域显得十分受限制。现在除了上面所说的区域外,我们还发现在海马注射后,NGF 的传送仅限于

下丘脑的上乳头核。

另一方面，NT-3 被传送到鼠前脑的几个别的部位，对 NGF 的这种情况，我们已说明放射性标记的 NT-3 传送到上乳头核。但这里的标记图案更强烈，而 NGF 的图案较浅。此外，NT-3 被传送到许多脑区域，这些区域一点也没有显示出 NGF 的传送。在注入海马齿状回后，在 CA4/门内两边存在很少几个标记的细胞（表 5），注入纹状体后逆向标记细胞在丘脑背部板内的和侧束的（parafasicular）/后部核）也显示出来。

表 4

在特定脑区域中放射性碘化的 NT-3 和 NGF 的计数

<u>海马的注射</u>					
<u>营养因子</u>	<u>HPC(r)</u>	<u>HPC(l)</u>	<u>MS/DB(r)</u>	<u>MS/DB(l)</u>	<u>小脑</u>
NGF					
T-9	401712	1106	2381	1835	136
NT-3					
T-16	739701	557	193	37	14
<u>纹状体的注射</u>					
<u>营养因子</u>	<u>纹状体(r)</u>	<u>纹状体(l)</u>	<u>腹中脑</u> <u>(V. Mes.)</u>	<u>腹中脑</u> <u>(V. Mes.)</u>	<u>小脑</u>
NGF					
T-24	588004	269	2041	94	64
T-25	652932	131	1868	137	35
NT-3					
T-18	909235	67	1398	80	73
T-21	810140	133	1328	50	99

HPC、背侧海马，MS/DB、中隔/Broca 交叉带，V. Mes，腹中脑；r，右侧；l，左侧。所有注射（纹状体和海马）是发生在大脑右侧。在营养因子柱中用 T 预固定的数字是动物号码数字。所有其它数字代表在所演示脑区域中的每分钟次数（cpm）。

表 5

放射性碘化的 NGF 和 NT-3 的逆向神经元的标记

海马注射

脑区域	NGF	NT-3
基础前脑		
中隔	++++	++
交叉带 (v)	++++	++
交叉带 (h)	++	+
基础核 (Nuc.) 后屈束	+	--
海马		
门/CA4	--	++
CA1	--	--
CA2	--	--
CA3	--	±
齿状回	?	?
脑下脚	--	--
门/CA4 (相反)	--	+
其它		
上乳 核	++	+++

上面报导的数据来自 6 个乳剂放射自显影实验。正号代表在一个给定区域标记的细胞的相应数字，“++++”表示许多被标记的细胞，“+”表示很少一些被标记的细胞。负号表示没有观察到被标记的细胞。问号表示难以估计给出其与注射部位的相近性的区域。不同的出版物在此被引用，因而它们全文被收编作为参考。

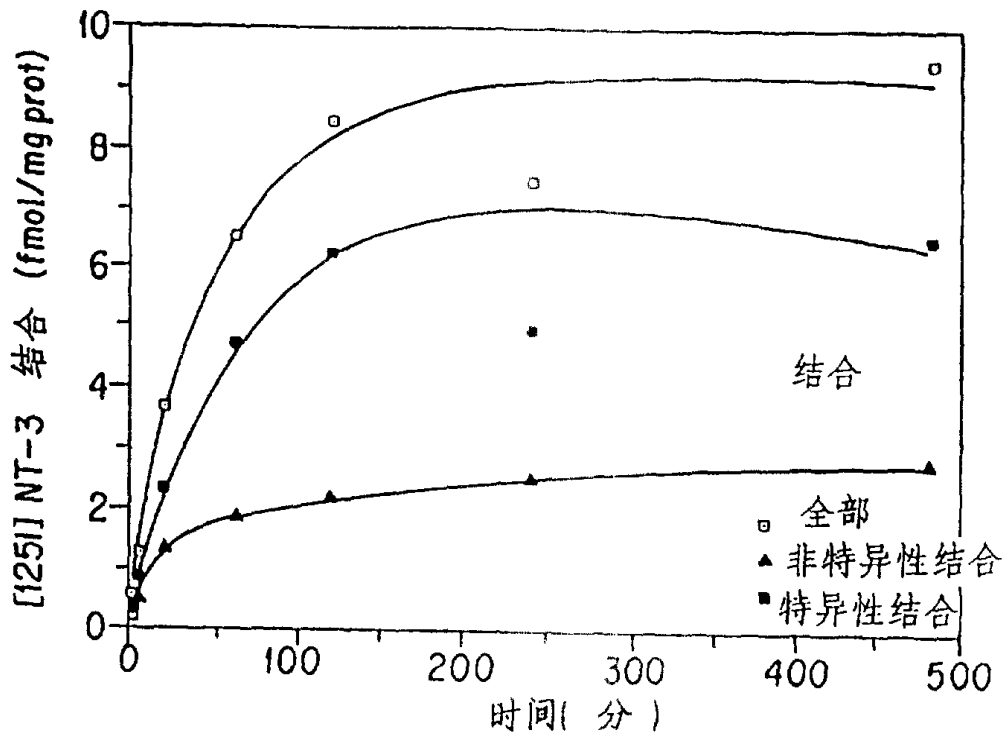


图 1A

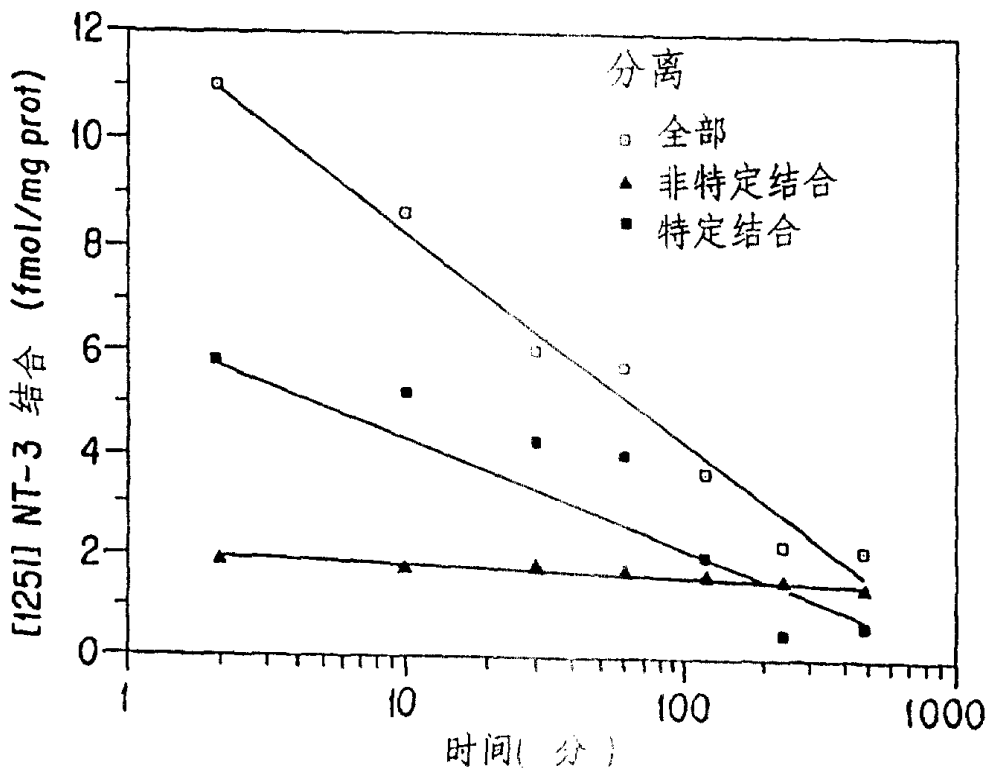


图 1B

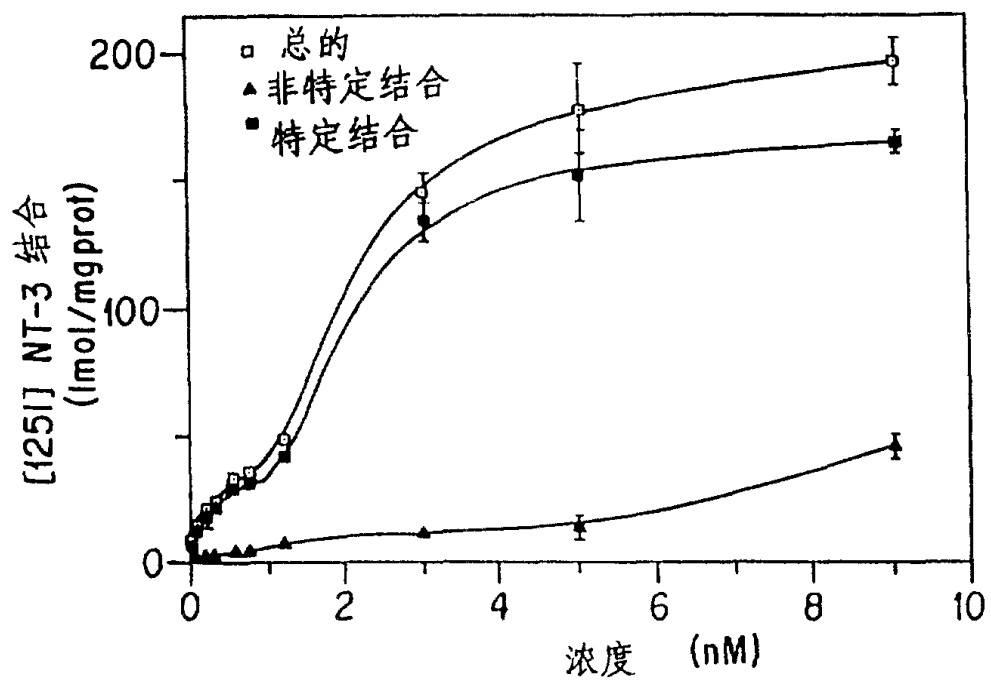


图 2A

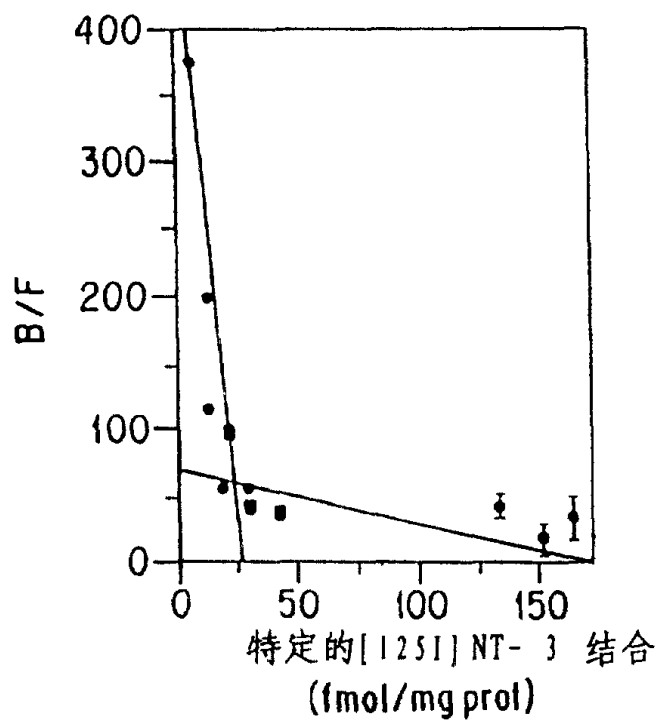


图 2B

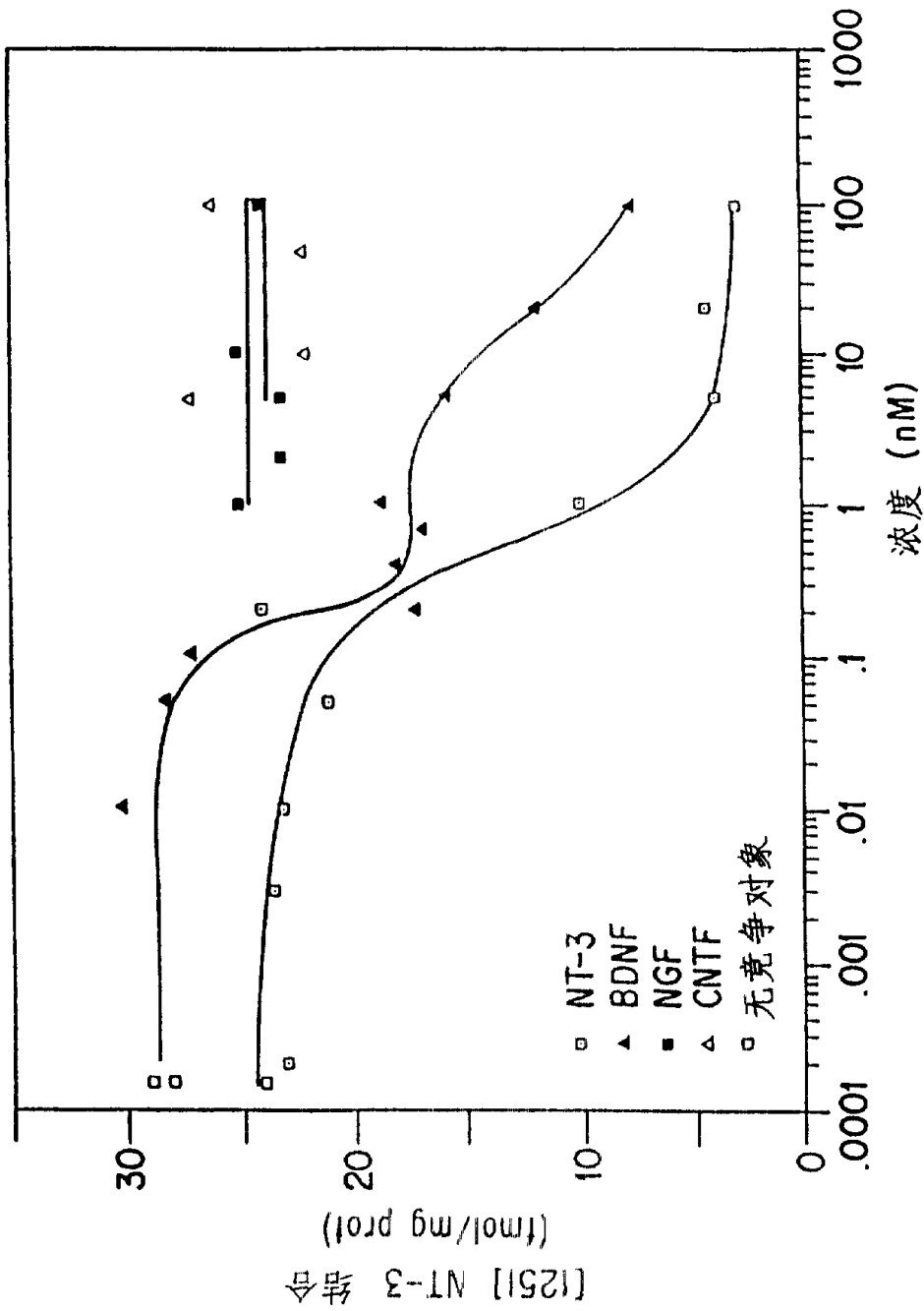


图 3

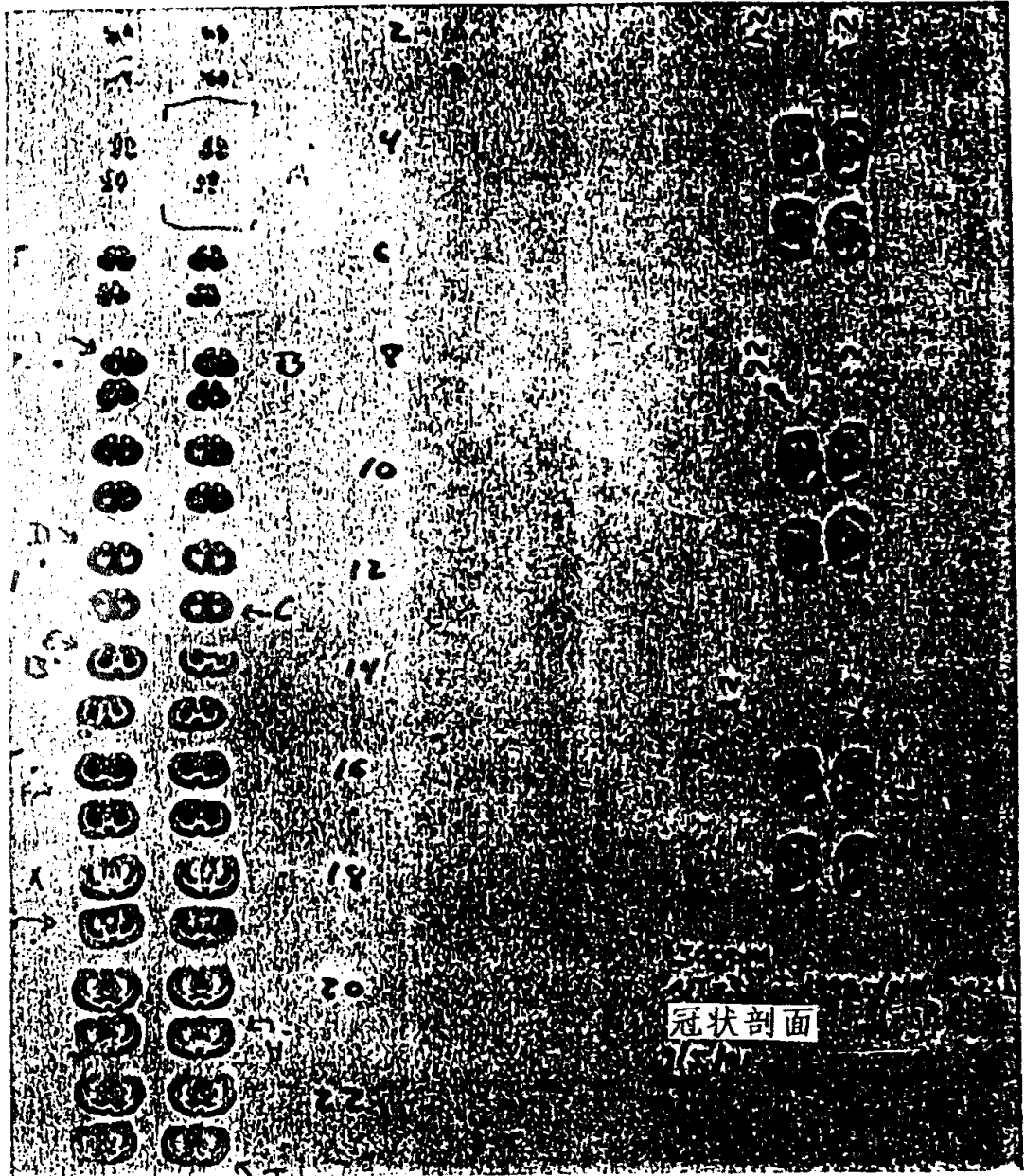
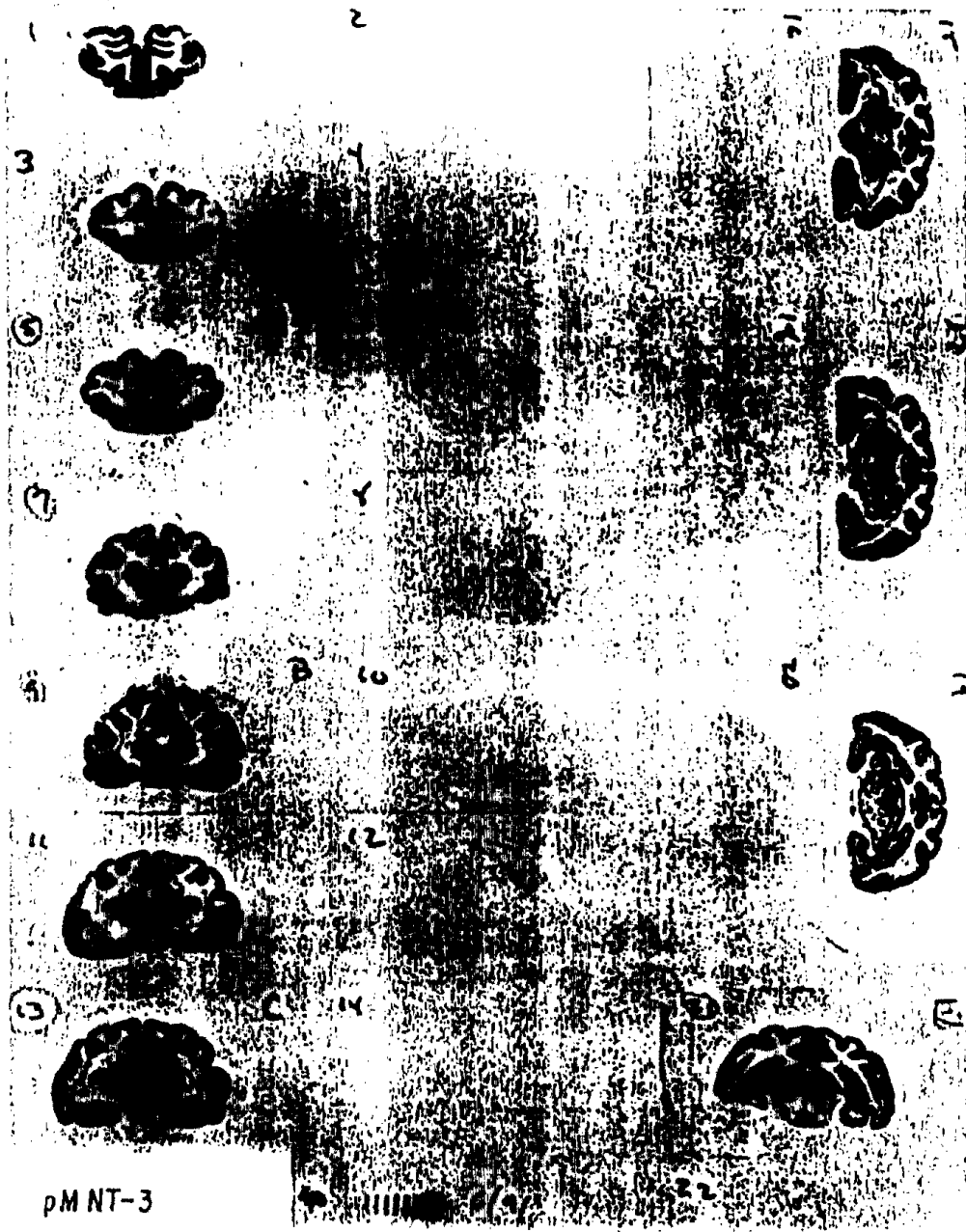


图 4



pM NT-3
nM COLD

图 5

人的尾状核和皮质



图 6A

鼠脑的水平切面



图 6B

人

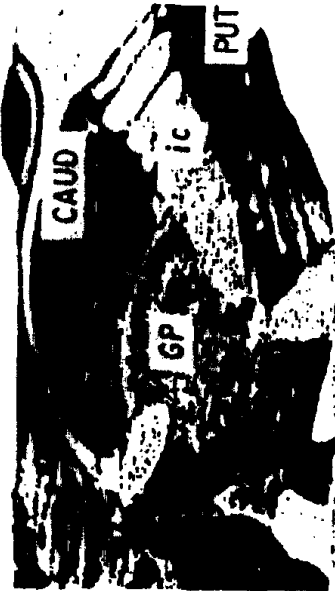
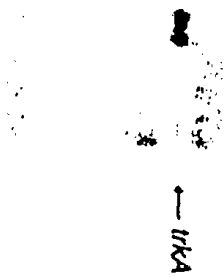


图 6C

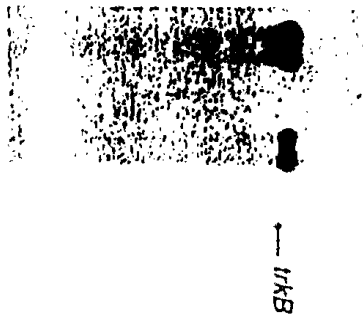


图 6D



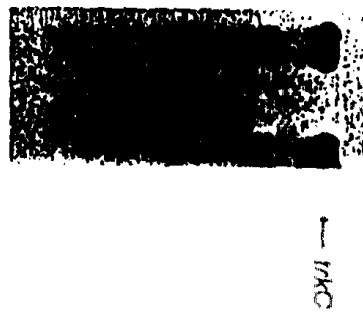
海马神经元
海马星形细胞
成年脑

图 7A



海马神经元
海马星形细胞
成年脑

图 7B



海马神经元
海马星形细胞
成人脑

图 7C

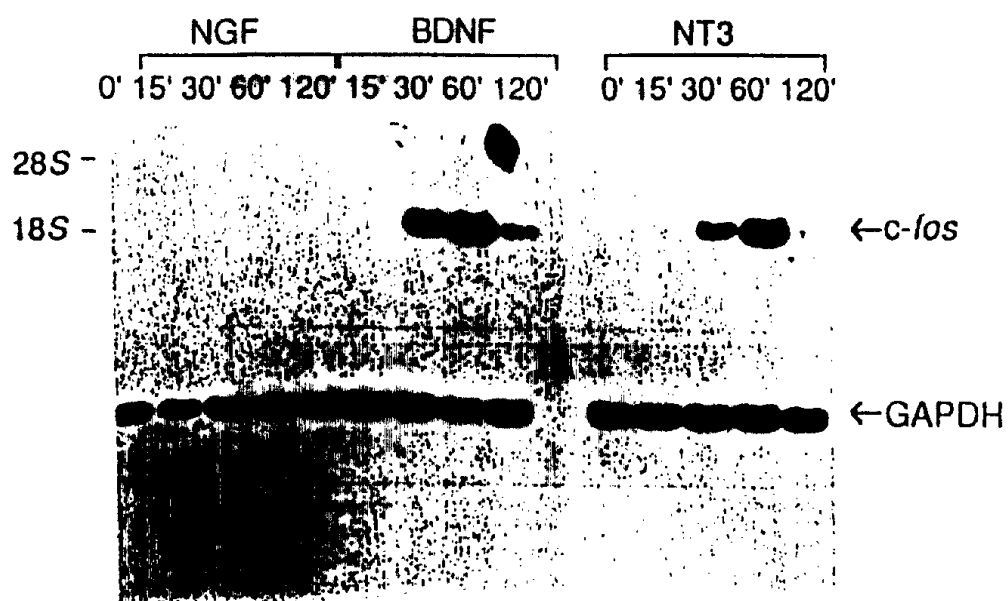


图 8

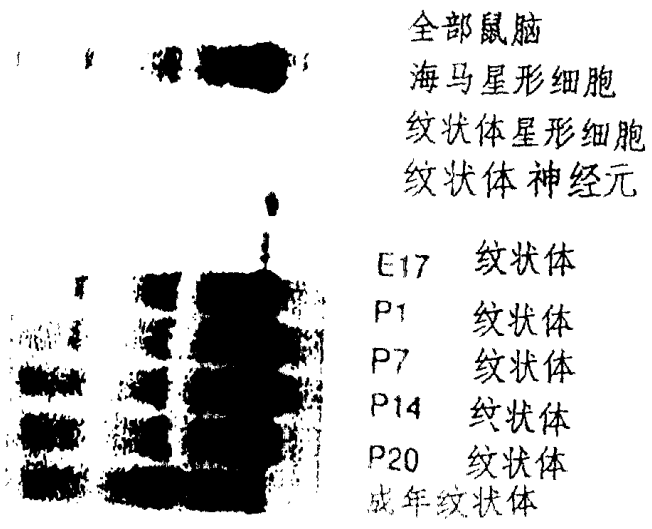


图 9

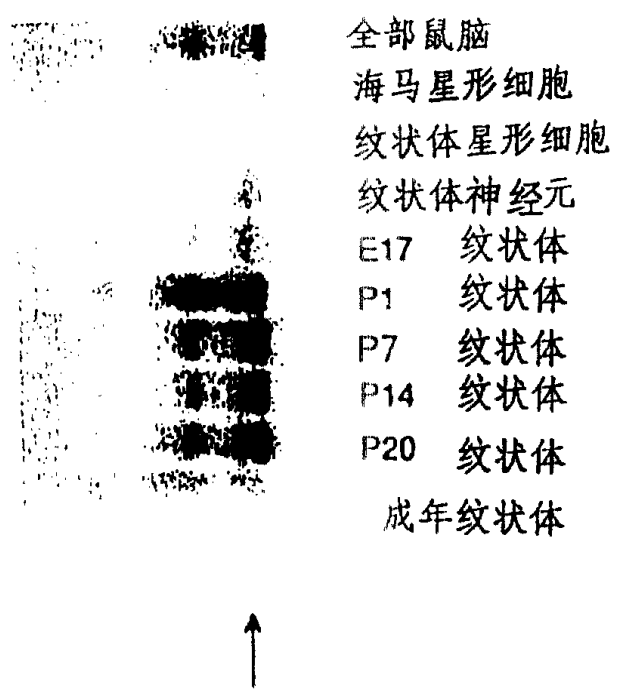


图 10

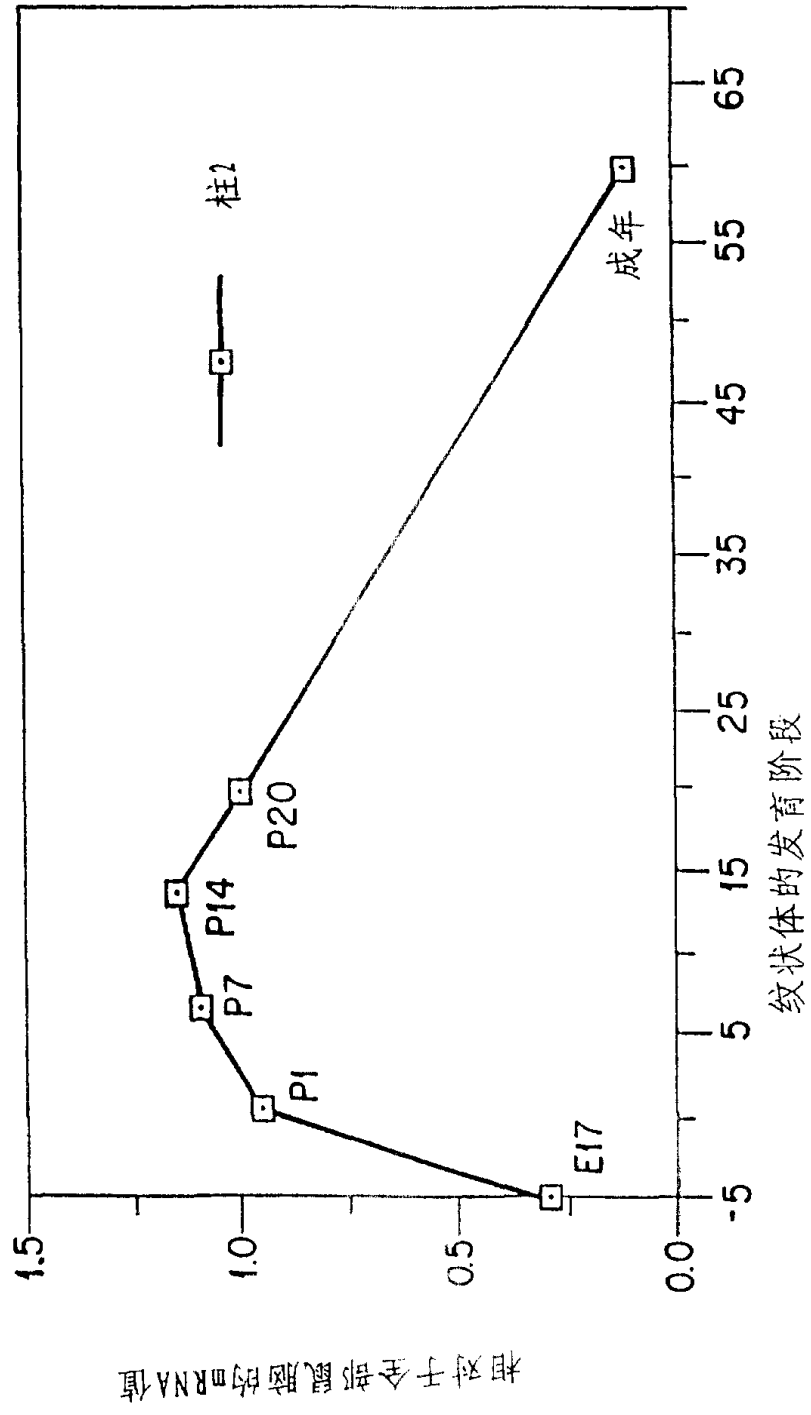


图 11

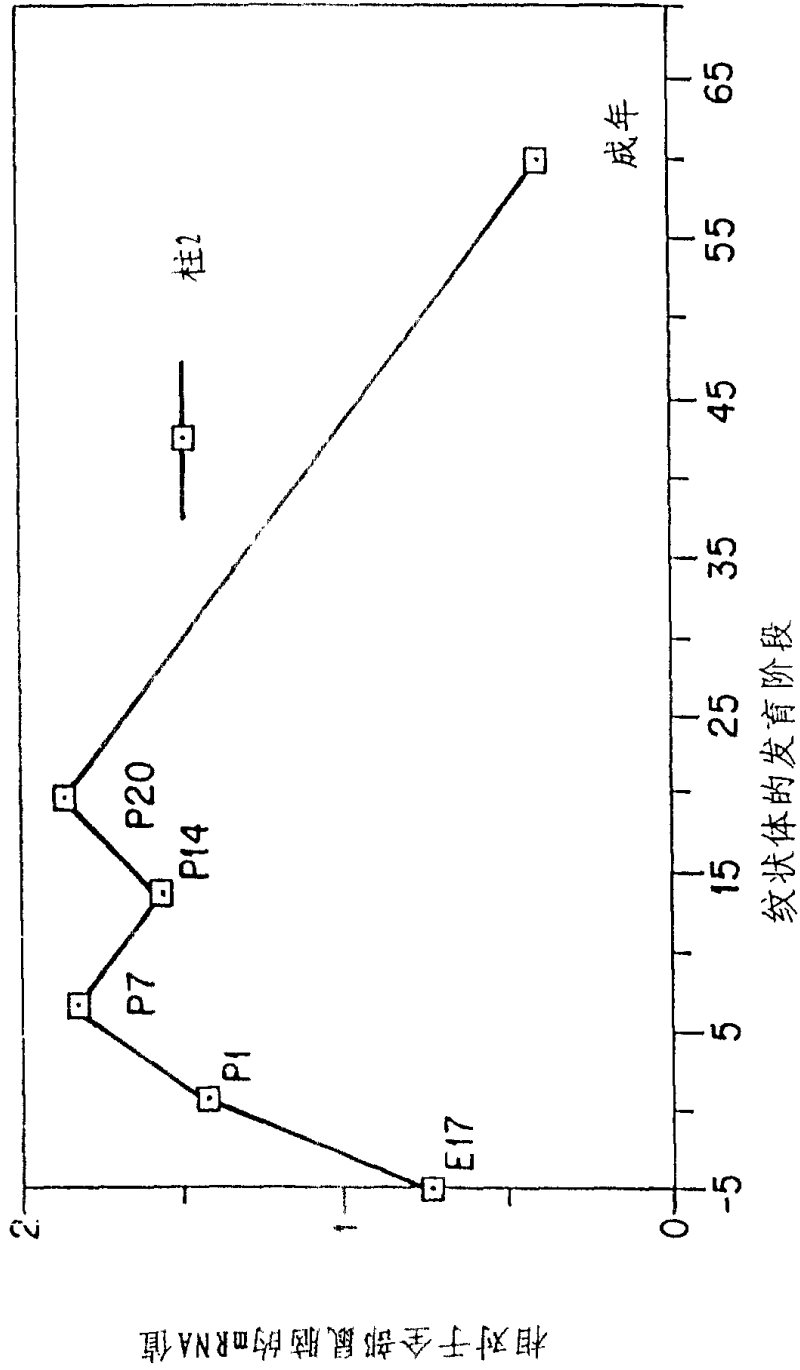


图 12

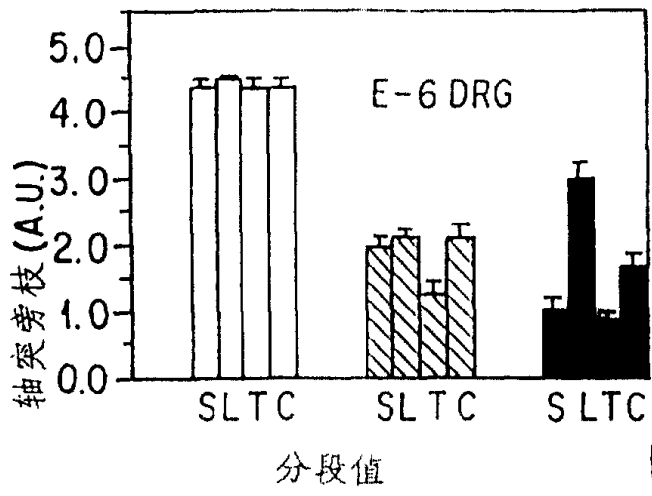


图 13A

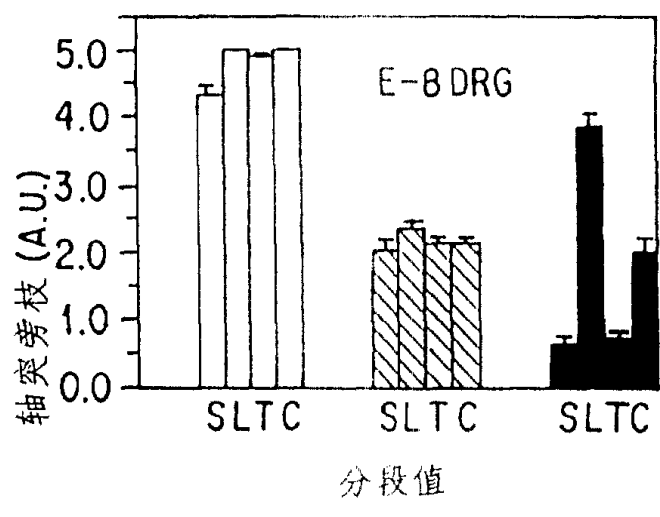


图 13B

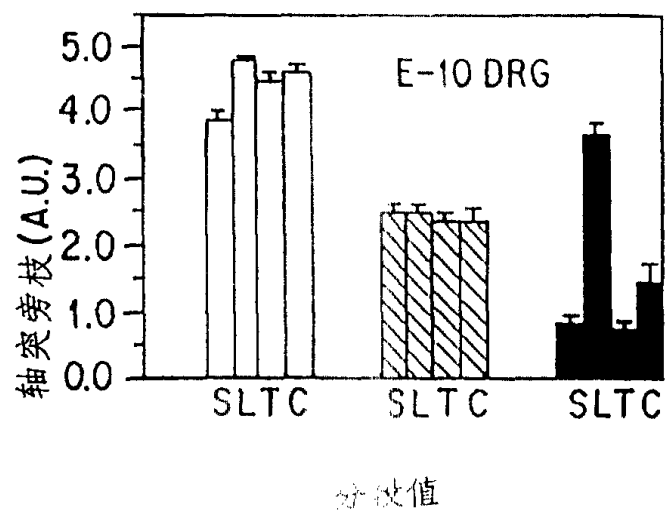


图 13C

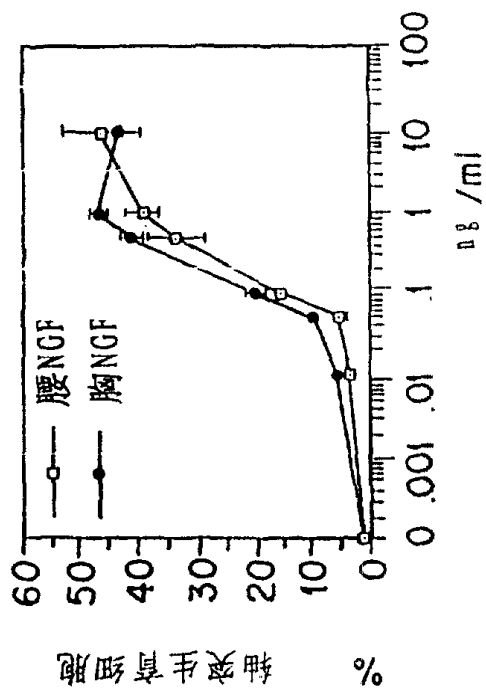


图 14A

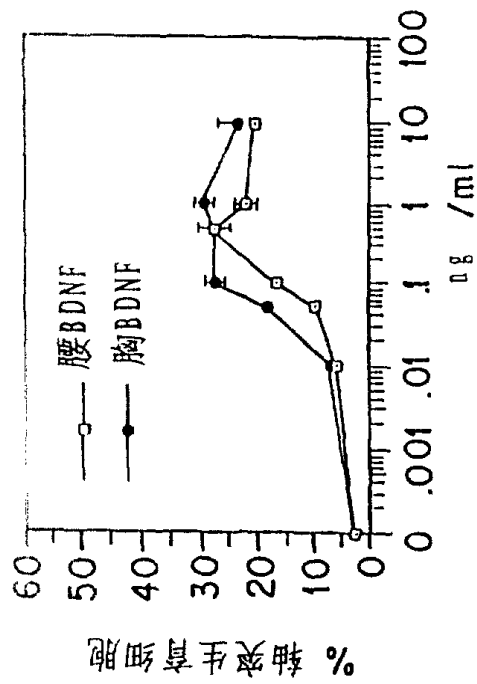


图 14B

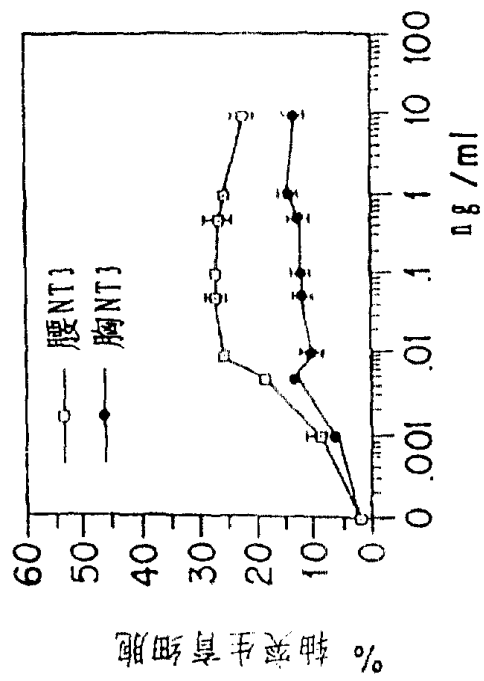


图 14C

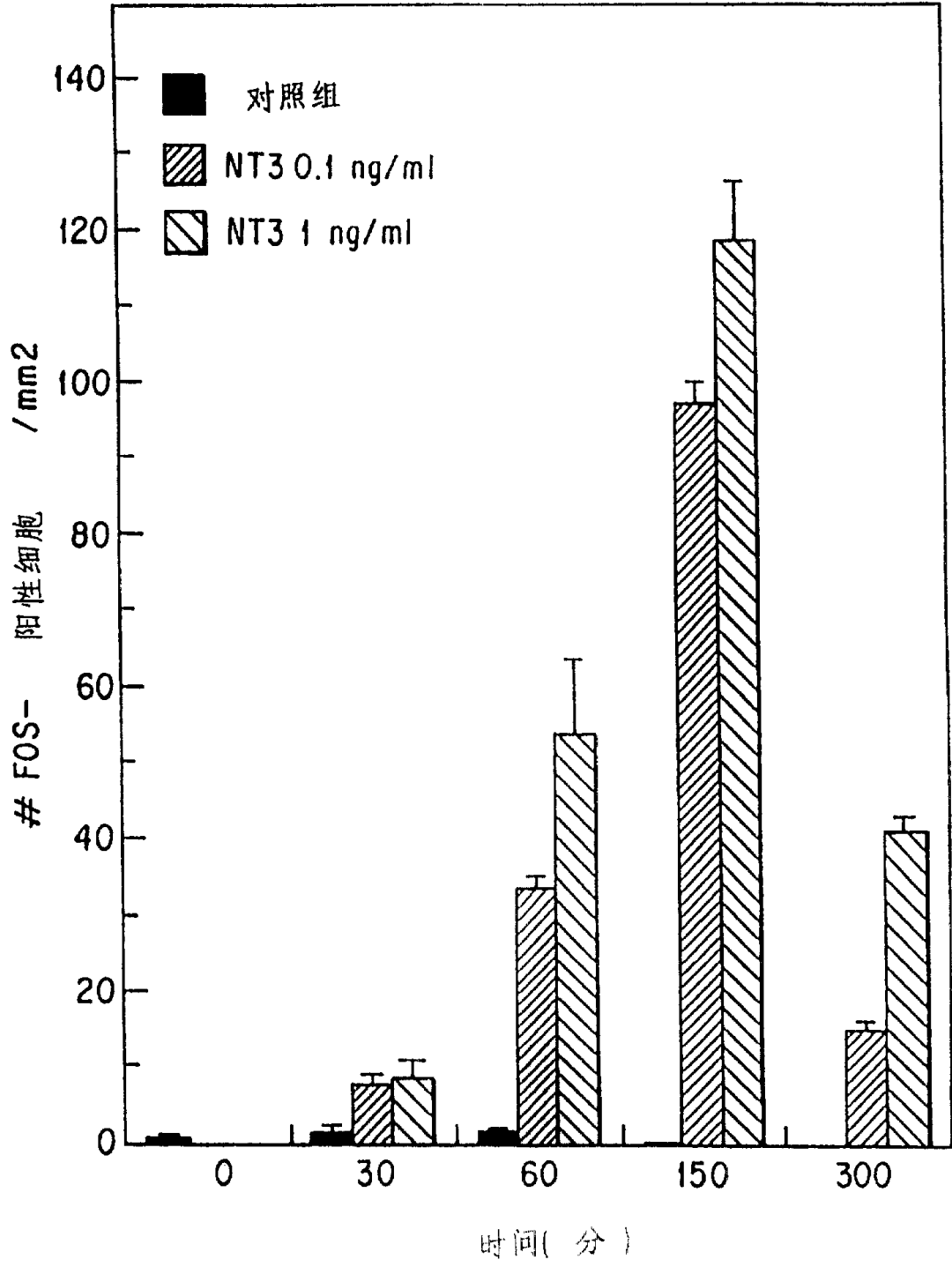


图 15

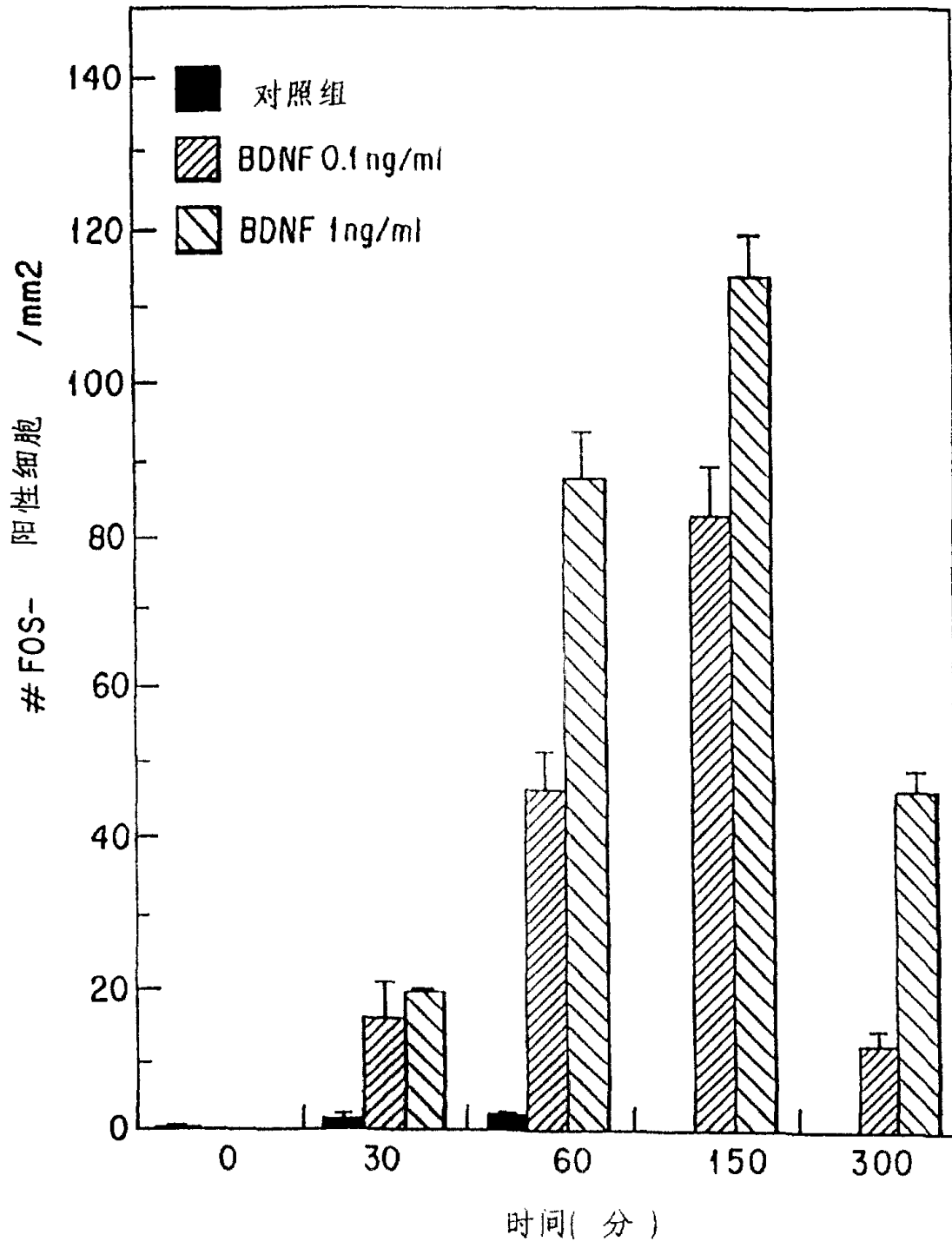


图 16

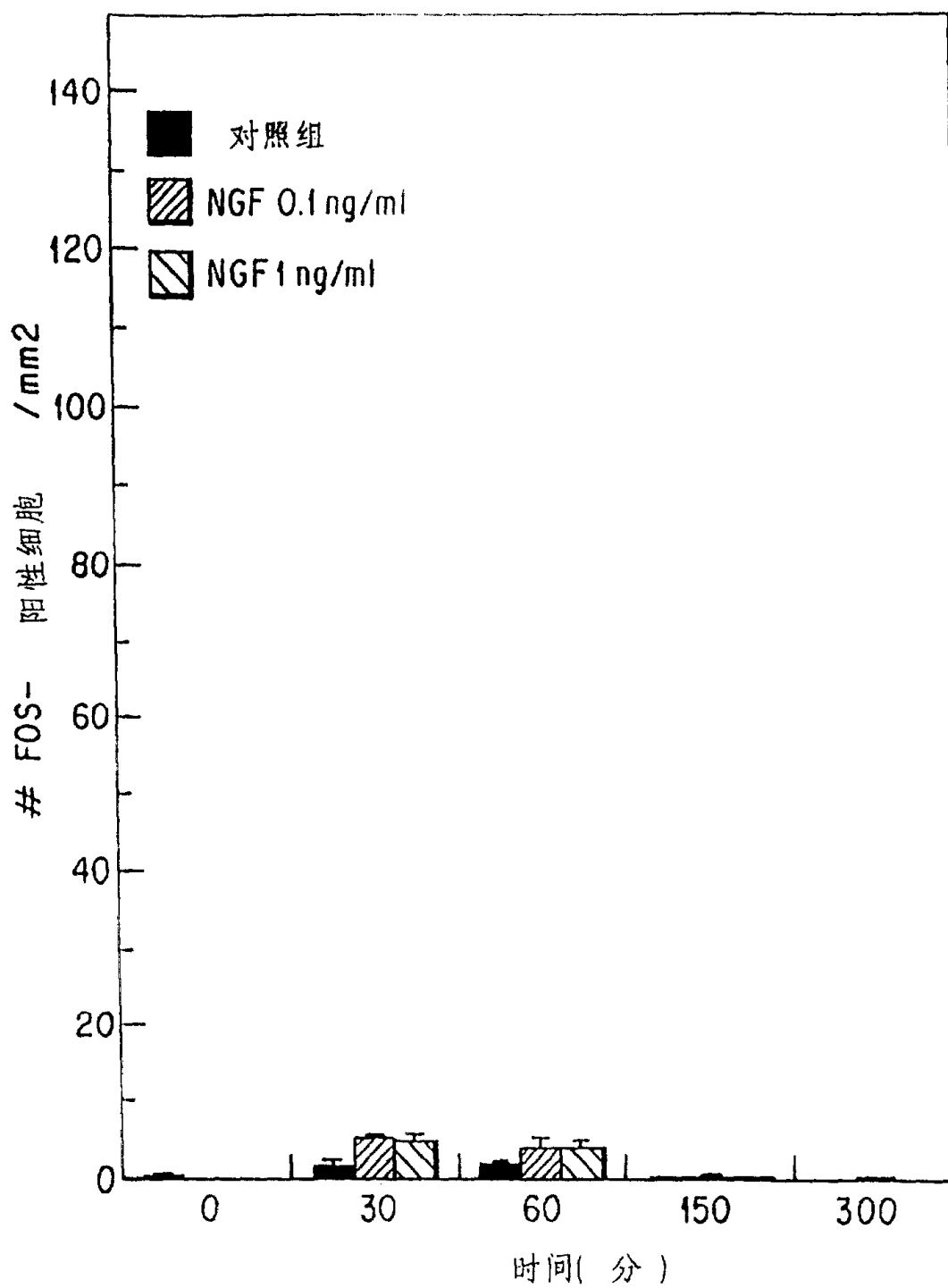


图 17

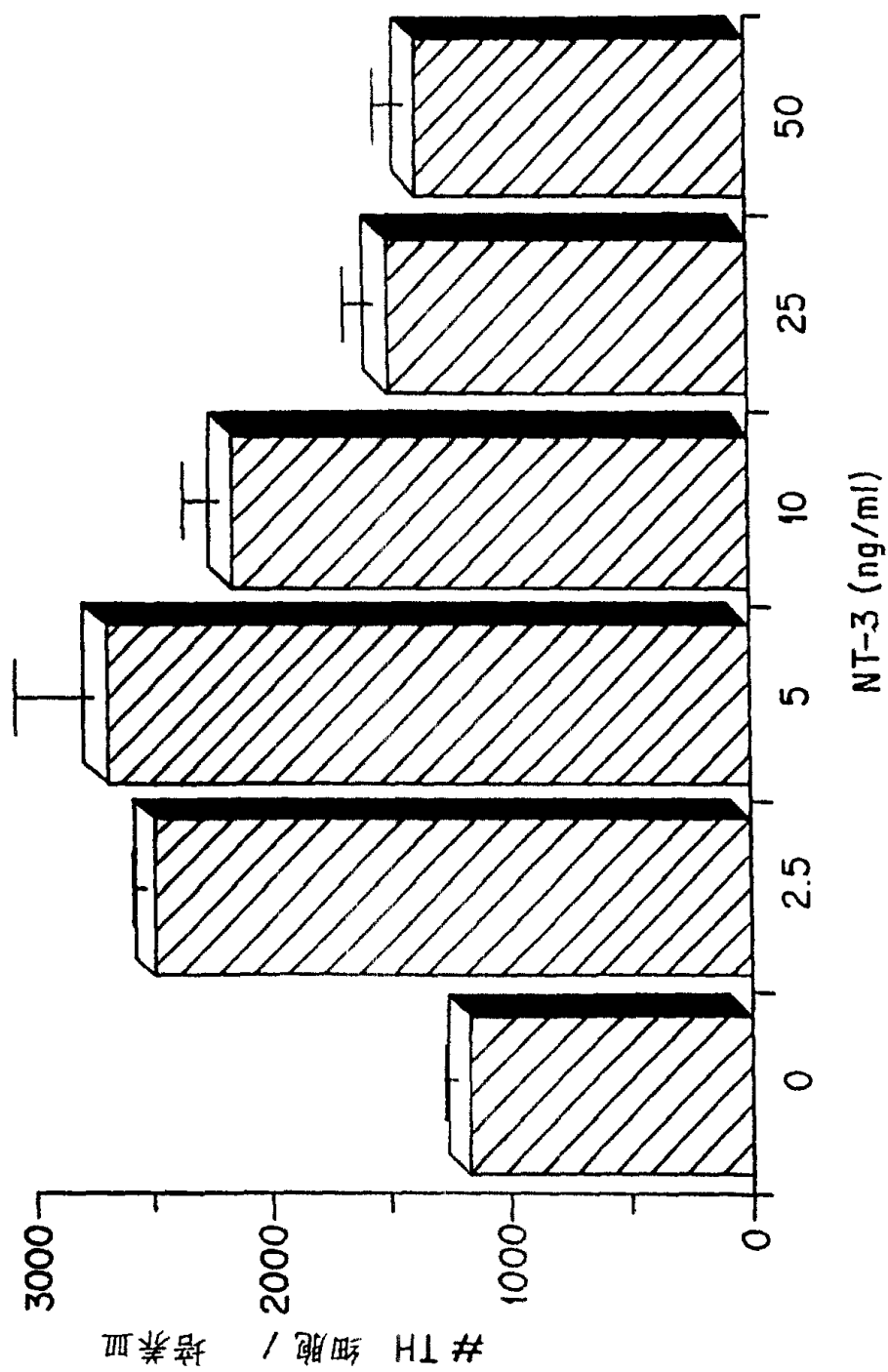


图 18

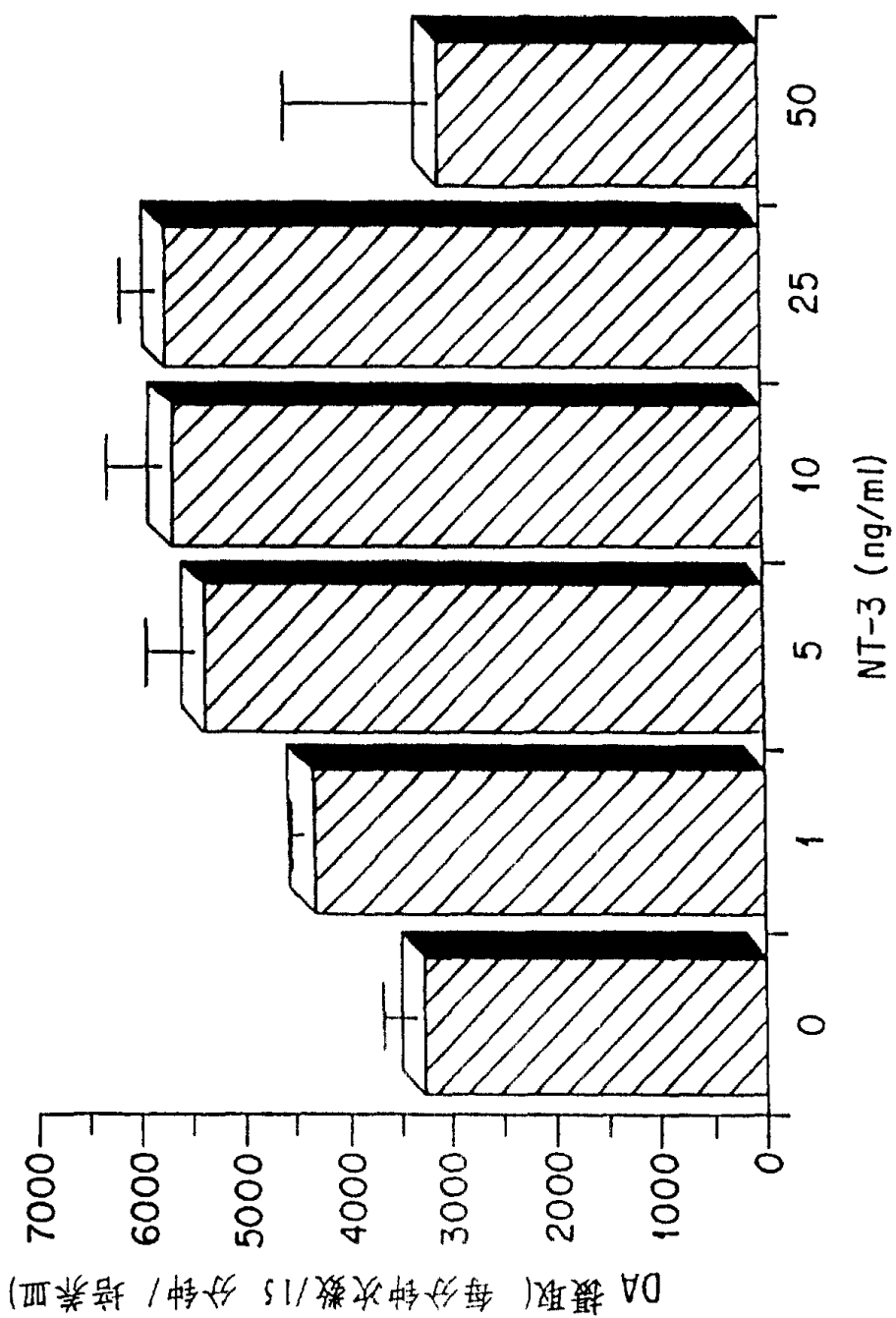


图 19

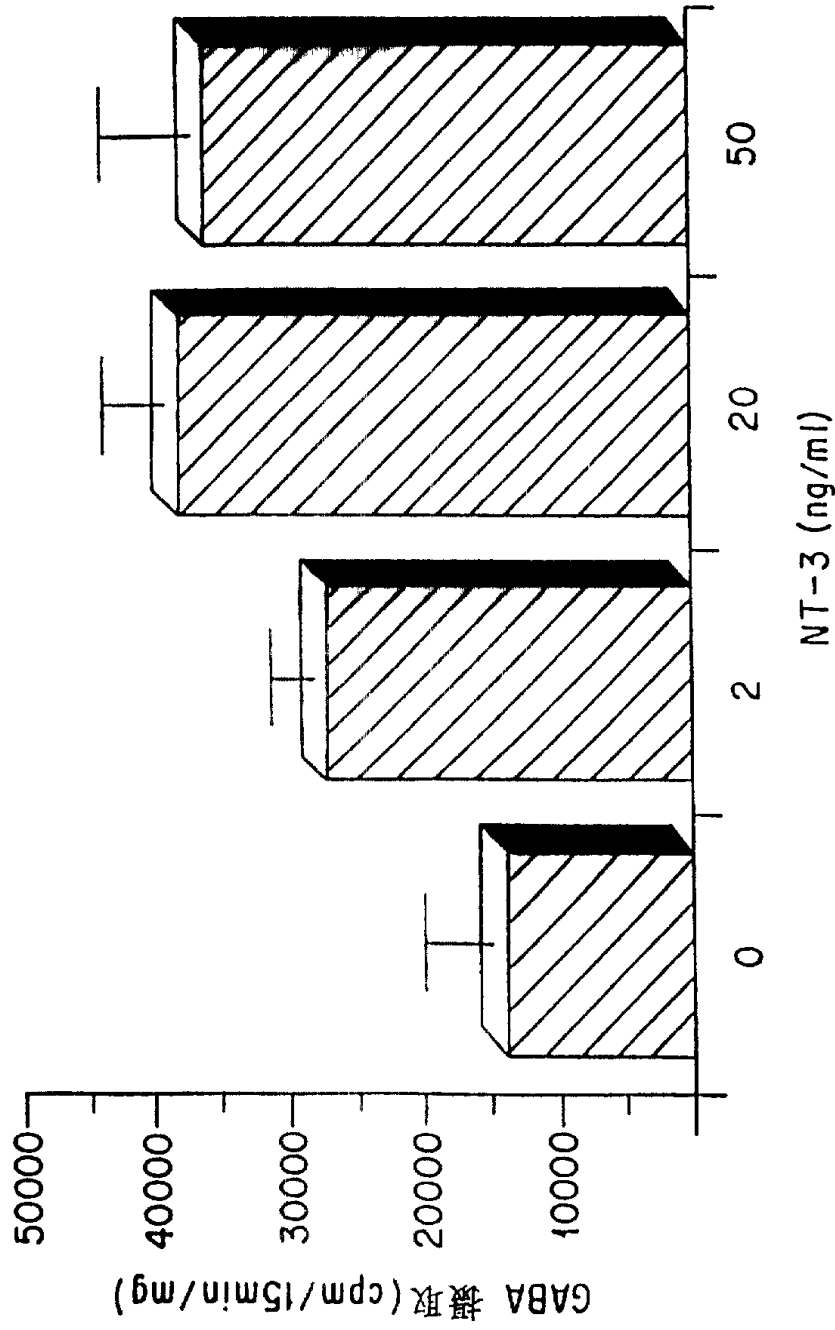


图 20

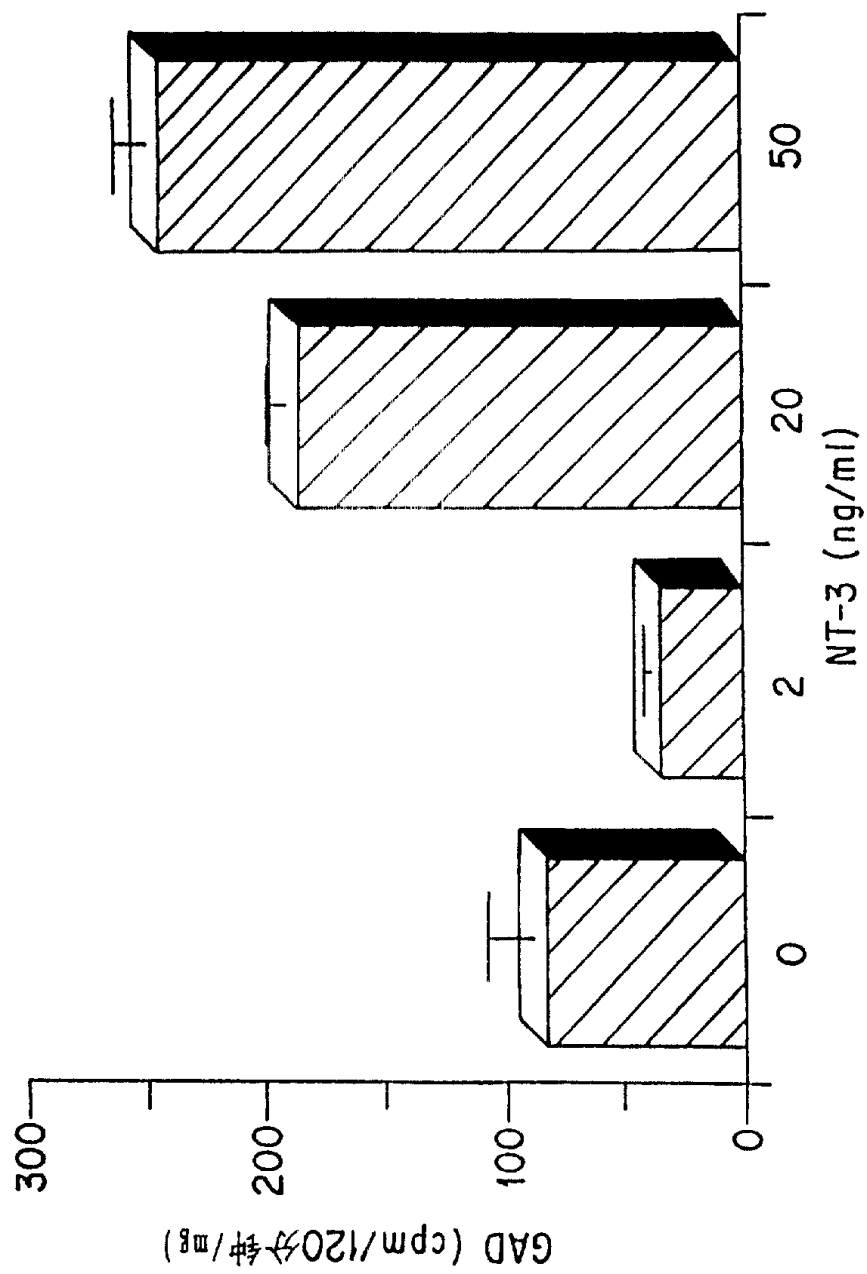


图 21

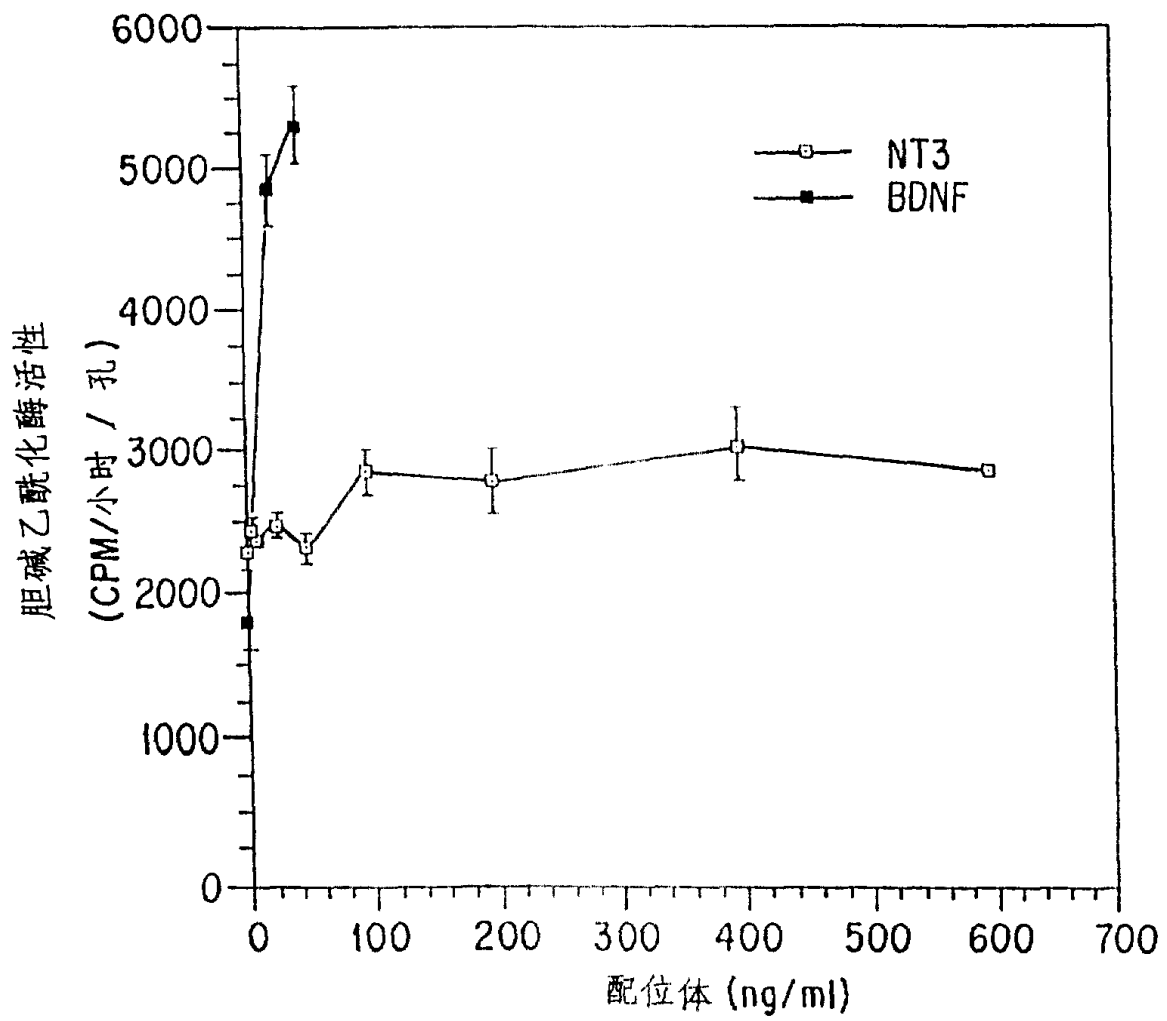


图 22

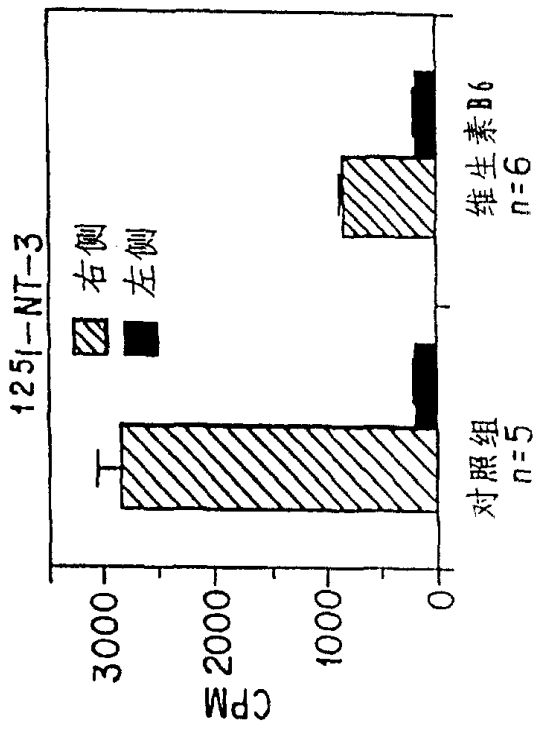


图 24A

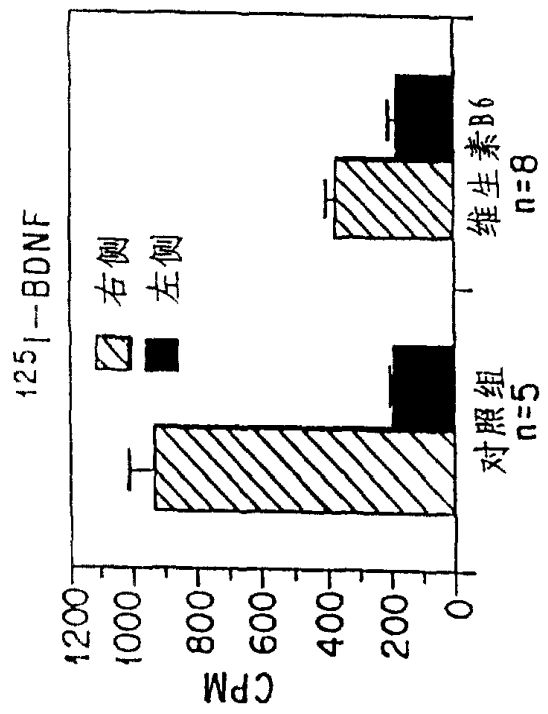


图 24B

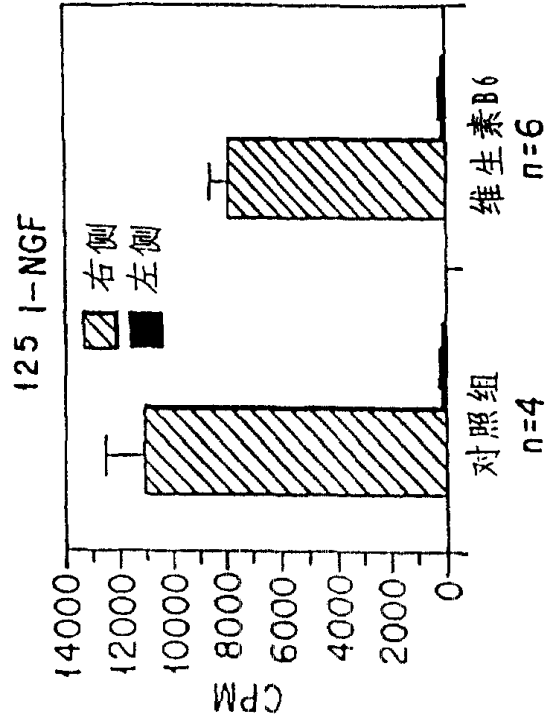


图 24C

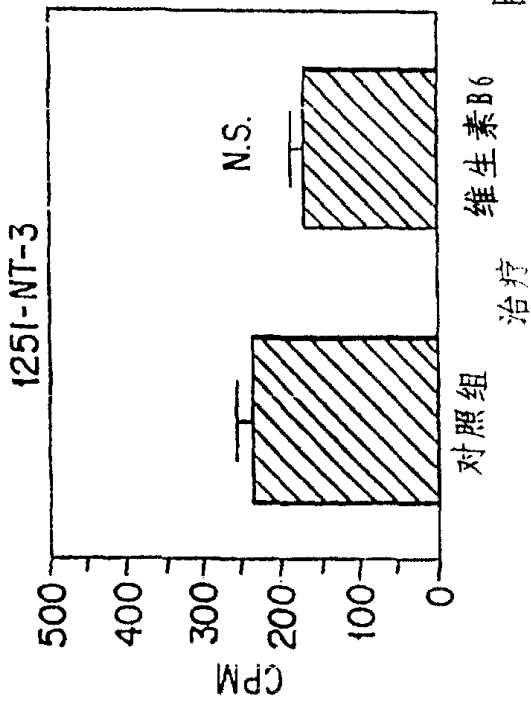


图 25A

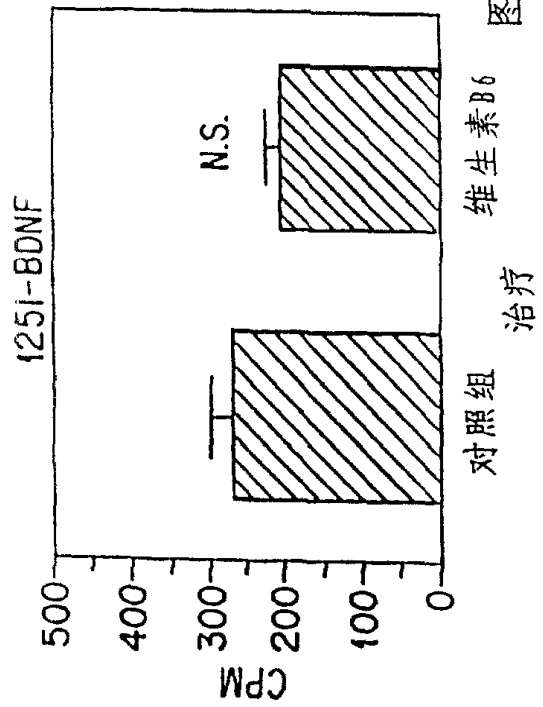


图 25B

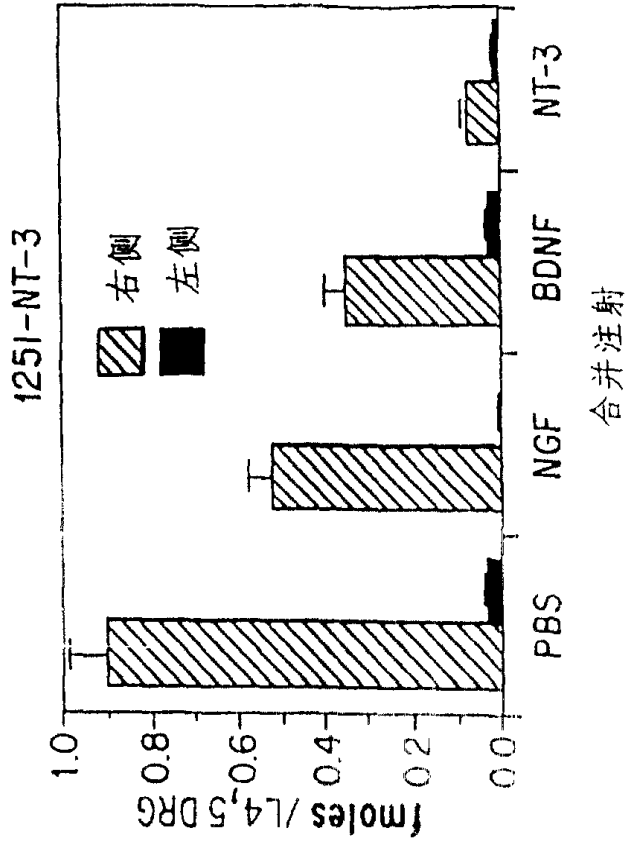


图 23