

Nogo-A 在脊髓损伤大鼠脊髓组织中的动态表达*

杨俊锋¹ 张亚峰¹ 马 勇² 尹 恒¹ 尤武林¹ 王建伟^{1,3}

摘要

目的:观察大鼠脊髓损伤后神经生长抑制因子Nogo-A在脊髓组织中的动态表达变化,探讨Nogo-A蛋白在神经再生过程中的意义和作用。

方法:选用108只SD大鼠随机分成正常组、假手术组和模型组,每组36只,A组不做任何处理,B组咬除T₉-T₁₁棘突及椎板,避免损伤脊髓;C组按照改良Allen法造模。分别于干预后24h、第3天、第7天、第14天处死大鼠,每组9只,以免疫组化及Western Blot检测各组大鼠脊髓组织中Nogo-A蛋白的表达变化,以荧光定量PCR检测Nogo-A mRNA表达变化。

结果:正常组、假手术组各时间点Nogo-A蛋白和mRNA无显著变化($P>0.05$)。模型组在损伤后24h Nogo-A蛋白和mRNA表达较低,3d后下降至最低,7d后迅速上升达到高峰,至14d逐渐下降,但仍高于假手术组;与假手术组比较,模型组在损伤后7d、14d,Nogo-A蛋白和mRNA表达均明显增高,差异均有显著性意义($P<0.05$)。

结论:大鼠脊髓损伤后,Nogo-A蛋白在早期一过性下降后可持续保持高水平表达,可能是造成脊髓损伤后中枢神经系统神经再生困难的重要原因之一。

关键词 脊髓损伤;Nogo-A;神经再生;大鼠;神经生长抑制因子

中图分类号:R651.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-09-0867-05

Dynamic expression of Nogo-A in spinal cord of rats with spinal cord injury/YANG Junfeng, ZHANG Yafeng, MA Yong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(9): 867—871

Abstract

Objective:To observe the dynamic expression of nerve growth inhibiting factor—Nogo-A in spinal cord of rats after spinal cord injury (SCI), and to explore the meaning and function of Nogo-A protein in the course of nerve regeneration.

Method:A total of 108 SD rats were randomly assigned into normal group(A), sham operated group(B) and model group(C), each group 36 rats. The rats in group A were not operated on, group B were bited except T₉—T₁₁ spinous process and lamina, avoiding injury of spinal cord, group C was made according to the modified Allen's method. The rats were all sacrificed on the 24th h, 3rd d, 7th d and 14th d after intervention respectively, each group 9 rats. Nogo-A protein expression changes of spinal cord in rats were detected by immunohistochemistry and Western blot, Nogo-A mRNA expression changes were detected by fluorescence quantitative PCR.

Result:The expressions of Nogo-A protein and mRNA had no significant change in normal group and sham operated group ($P>0.05$). In model group protein and mRNA expressions reduced after 24h of SCI, and dropped to the lowest level after 3d, then rapidly rised to peak after 7d, and gradually declined after 14d, but the expressions of Nogo-A protein and mRNA were still higher than that in sham operated group. Compared with sham operated group, the expressions of Nogo-A protein and mRNA increased significantly on 7d and 14d af-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.09.001

*基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2011180);江苏省2013年度普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ13-0614)

1 无锡市中医医院 南京中医药大学骨伤研究所,无锡,214000; 2 南京中医药大学; 3 通讯作者

作者简介:杨俊锋,男,博士,主治医师; 收稿日期:2014-03-04

ter injury, and the differences had statistical significance ($P<0.05$).

Conclusion: Nogo-A protein expression kept on the high level after transient drop at early stage in spinal cord of rats, which maybe one of the important condition about the difficulty of nerve regeneration in central nervous system after SCI.

Author's address Wuxi Hospital of TCM Institute of Orthopaedics and Traumatology of Nanjing University of Chinese Medicine, Wuxi, 214000

Key word spinal cord injury; Nogo-A; nerve regeneration; rats; nerve growth inhibiting factor

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后神经再生困难目前认为与中枢神经系统内髓磷脂关联抑制蛋白表达增加相关,其中Nogo-A被认为是最主要的神经生长抑制因子^[1-2]。Nogo-A在脊髓损伤后如何动态表达目前仍未完全清楚,探索Nogo-A在脊髓组织内的动态表达规律不仅是进一步研究如何有效降低脊髓组织内Nogo-A表达的前提和基础,而且有利于脊髓损伤后轴突再生治疗^[3-4]。为此,本文采用免疫组化、荧光定量PCR及蛋白质印迹法,通过与正常大鼠脊髓组织对比研究,探讨大鼠脊髓损伤后Nogo-A在中枢神经系统内的动态表达规律,进一步明确Nogo-A蛋白在神经再生过程中的意义和作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠108只,雌性,体重180—220g,由南京中医药大学动物实验中心提供,按5只/笼饲养于南京中医药大学动物实验中心恒温恒湿动物房,自由进食、饮水。

1.2 动物分组

将大鼠随机分成正常组(A组,36只)、假手术组(B组,36只)和模型组(C组,36只)。A组不做任何处理,B组咬除T₉-T₁₁棘突及椎板,避免损伤脊髓;C组按照改良Allen法造模^[5]。

1.3 模型制备

以10%水合氯醛腹腔注射麻醉(剂量为0.3—0.4ml/100g),将大鼠俯卧位固定于手术台上,以T₁₀棘突为中心取背部后正中纵行切口,长约3cm,逐层进入,沿棘突剥离椎旁肌,显露T₉-T₁₁棘突及椎板,仔细咬除T₉-T₁₁全部椎板至椎弓根部,暴露硬脊膜并保持其完整性。采用改良Allen法^[5]25g·cm(10g×2.5cm)垂直打击大鼠T₉-T₁₁节段脊髓,可见大

鼠后肢痉挛性抽搐数次后软瘫。逐层缝合肌肉、筋膜、皮肤。术后每天予以青霉素8万U腹腔注射,保持会阴部干燥,每天两次辅助膀胱排尿,注意防止泌尿道感染、肠梗阻、压疮等并发症。

1.4 标本采集

按照实验分组,每组分别于干预后24h、3d、7d、14d各取9例标本,随机取3例用于免疫组化,3例用于PCR实验,3例用于Western blot测试。

免疫组化实验取材:以10%水合氯醛腹腔注射麻醉(剂量为0.3—0.4ml/100g),经左心室-升主动脉插管,依次用100ml生理盐水和4%多聚甲醛PBS溶液500ml灌注固定2h。以造模损伤区为中心,取出长约1cm的脊髓组织,投入4%多聚甲醛液内继续固定24h,然后以2ml冻存管4℃冰箱保存。

荧光定量PCR及Western blot实验取材:以10%水合氯醛腹腔注射麻醉(剂量为0.3—0.4ml/100g),经左心室-升主动脉插管,依次用100ml生理盐水和PBS溶液500ml灌注固定2h。以造模损伤区为中心,取出长约1cm的脊髓组织放于2ml冻存管液氮中带回,-70℃冰箱保存。

1.5 免疫组化法检测脊髓组织Nogo-A蛋白表达

所取标本依次经梯度乙醇组织脱水、二甲苯透明后,行石蜡包埋,以脊髓直接损伤处为中心冠状位连续行厚约4—5μm的超薄切片,每个样本切片10张,随机取石蜡切片5张按Envision试剂盒行免疫组织化学分析。DAB显色,苏木素复染,以胞浆内淡黄色或棕黄色颗粒染色为阳性表达。每张切片随机选取5个高倍镜视野(×200),各组所选部位相同,以Image-Pro 6.0⁺软件分析平均光密度值(mean density, MD),以5个视野平均光密度的平均值作为该张切片的测量值,分别表示各组Nogo-A蛋白表达量。

1.6 Western blot检测脊髓组织Nogo-A蛋白表达

取各组脊髓样本40mg,加入细胞裂解液200 μ l,冰浴下研磨匀浆裂解30min,4℃下15000r/min离心30min,取上清提取总蛋白,按BCA法蛋白定量并用生理盐水调平使各组总蛋白含量一致,2 $\times$ 上样缓冲液混匀蛋白变性(98℃变性5min),冷却后放入-70℃冰箱备用。制胶时 β -actin采用5%浓缩胶及10%分离胶,Nogo-A采用5%浓缩胶及6%分离胶进行SDS-PAGE凝胶电泳,Trans-blot[®]SD蛋白半干转印仪转印蛋白。5%TBST脱脂奶粉室温封闭2h,1 $\times$ TBST洗膜5次,每次5min,一抗(β -actin:1/1000(美国CST);Nogo-A:1/1000(美国Abcam))4℃孵育过夜。1 $\times$ TBST洗膜5次,每次5min,羊抗兔二抗室温孵育2h(1:5000)。1 $\times$ TBST洗膜5次,每次5min,ECL法显色,Image Quant LAS 4000mini超灵敏化学发光成像仪成像。采用Image-Pro 6.0⁺软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin作为内参蛋白进行校准,采用Nogo-A蛋白条带灰度值/ β -actin条带灰度值的比值表示Nogo-A蛋白的相对表达量。

1.7 荧光定量PCR法检测脊髓组织Nogo-A mRNA表达

-70℃分别取出各组脊髓组织,按每50—100mg组织加入1ml Trizol裂解液,球磨仪研磨匀浆,Trizol法提取总mRNA,严格按照说明书进行。以逆转录(RT法)合成cDNA,再进行PCR扩增:参照GenBank公布的Nogo-A和GAPDH cDNA序列,设计Nogo-A上游引物:5'-GACAGAAATGGGCAG-CATAGT-3',下游引物为5'-CAGAGACAGCAG-CAGGAATAA-3'(扩增产物211bp);GAPDH上游引物:5'-CTGAGCACTCTCCCTCACAATTC-3',下游引物为:5'-GTGCAGCGAACTTTATT-GATGGT-3'(扩增产物102bp)。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成目的基因Nogo-A和GAPDH的引物,反应条件为:95℃预变性30s,95℃变性5s,60℃退火34s,上述变性、退火步骤循环40次。随后继续进行建立溶解曲线的反应:95℃ 15s,

60℃ 1min,95℃ 15s。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法分析Nogo-A基因在脊髓组织中的相对表达量,即以管家基因GAPDH作为内参基因相对定量。

1.8 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件包进行分析,正态分布定量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用单因素方差分析及LSD法两两比较,不满足方差分析条件时采用Wilcoxon秩和检验。取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有显著性意义, $P>0.05$ 为差异无显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠Nogo-A蛋白免疫组化动态表达

正常组、假手术组大鼠脊髓组织在干预后第24小时、第3天、第7天、第14天各时间点Nogo-A表达量均较低,且无显著差异变化($P>0.05$)。模型组Nogo-A表达量与假手术组比较,在第24小时表达量稍高于假手术组,但差异无显著性意义($P>0.05$),第3天时明显下降($P<0.01$),第7天时显著增高并达到高峰($P<0.01$),第14天时有所下降,但仍高于假手术组表达量($P<0.01$),表1、图1。

2.2 各组大鼠Nogo-A蛋白Western blot动态表达

Western blot分析SCI后各组大鼠不同时间点脊髓损伤区Nogo-A蛋白表达变化(见图2)。正常组、假手术组在第24小时、第3天、第7天、第14天各时间点Nogo-A蛋白表达均较为恒定,差异无显著性意义($P>0.05$)。假手术组与正常组于同一时间点比较,Nogo-A蛋白表达差异无显著性意义($P>0.05$)。模型组在各时间点Nogo-A蛋白表达呈一动态变化过程,SCI第24小时后Nogo-A蛋白呈低水平表达,至第3天时表达量最低,之后逐渐表达上调,于第7天时达到高峰,之后逐渐下降,至第14天时仍呈较高水平表达。与假手术组比较,模型组在第24小时、第3天、第7天、第14天各时间点,Nogo-A蛋白表达差异均有显著性意义($P<0.05$),见表2。

2.3 各组大鼠Nogo-A mRNA动态表达

表1 各组大鼠Nogo-A蛋白在脊髓组织中平均光密度表达

($\bar{x}\pm s$,n=5)

组别	24h	第3天	第7天	第14天
正常组	0.0924 $\pm$ 0.0040	0.0943 $\pm$ 0.0017	0.0913 $\pm$ 0.0017	0.0913 $\pm$ 0.0010
假手术组	0.0918 $\pm$ 0.0018	0.0942 $\pm$ 0.0028	0.0919 $\pm$ 0.0017	0.0915 $\pm$ 0.0015
模型组	0.0938 $\pm$ 0.0029	0.0896 $\pm$ 0.0022 ^①	0.0979 $\pm$ 0.0016 ^①	0.0959 $\pm$ 0.0026 ^①

①与假手术组比较 $P<0.01$

正常组脊髓组织中 Nogo-A mRNA 表达量较低,各时间点 Nogo-A mRNA 表达恒定为 1;假手术组各时间点 Nogo-A mRNA 表达量无显著变化($P>0.05$)。模型组在 24h Nogo-A mRNA 表达下降,3d 后下降至最低,7d 后迅速上升达到高峰,至 14d 逐渐下降,但仍高于假手术对照组表达,各时间点与假手术组比较,均存在显著性差异($P<0.01$),见表 3。

3 讨论

中枢神经系统(CNS)内的微环境对受损神经组

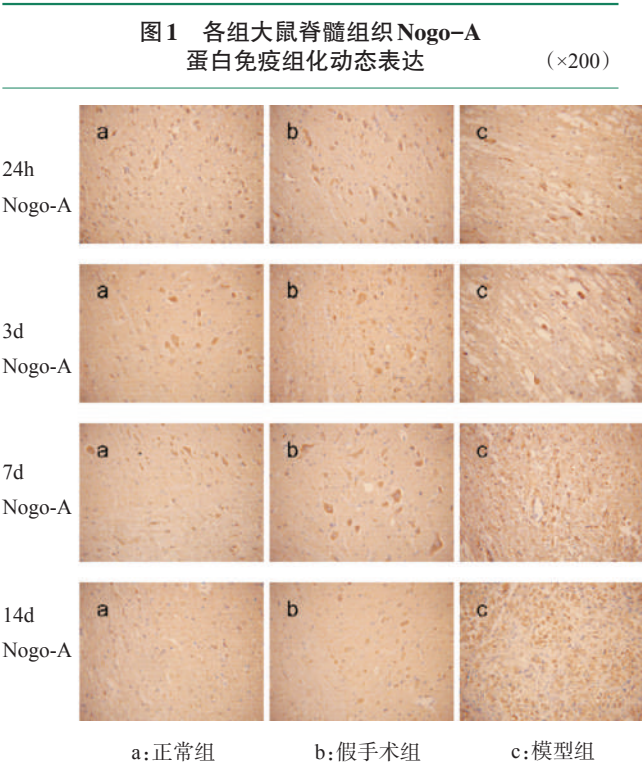


表 2 各组大鼠脊髓组织 Nogo-A 蛋白相对表达水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

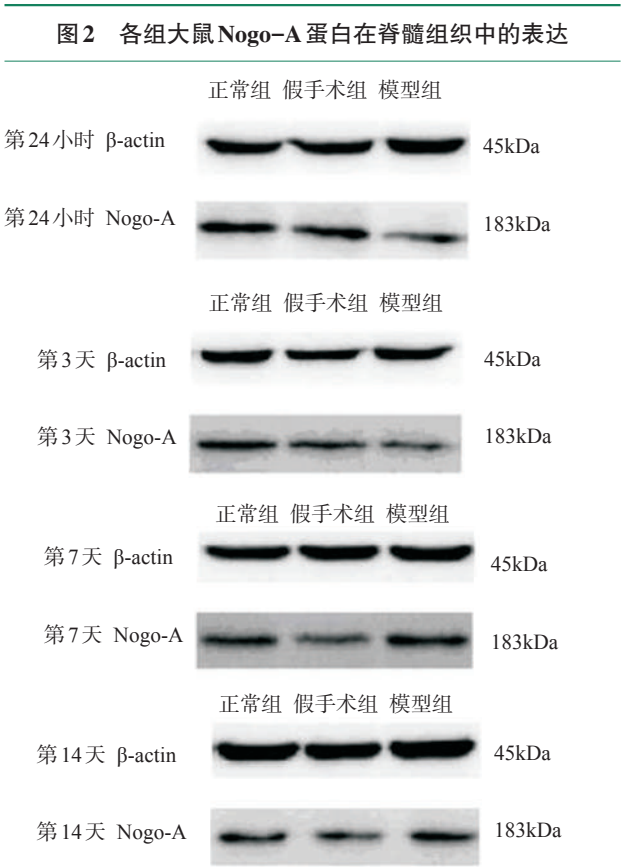
组别	24h	第 3 天	第 7 天	第 14 天
正常组	0.380±0.001	0.370±0.001	0.380±0.001	0.390±0.001
假手术组	0.387±0.005	0.369±0.001	0.370±0.002	0.392±0.003
模型组	0.259±0.002 ^①	0.221±0.006 ^①	0.507±0.004 ^①	0.442±0.001 ^①

①与假手术组比较 $P<0.05$

表 3 各组大鼠 Nogo-A mRNA 在脊髓组织中的动态变化 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	24h	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	1.00±0.03	1.05±0.04	1.07±0.05	1.05±0.05
模型组	0.68±0.01 ^①	0.42±0.02 ^①	1.78±0.08 ^①	1.59±0.02 ^①

①与假手术组比较 $P<0.01$



织的存活和再生至关重要,其中髓磷脂相关轴突生长抑制蛋白被认为起着重要的作用,尤以 Nogo 蛋白作用最为突出^[6-7]。Nogo 分子有 3 种异构体 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C,它们由同一基因表达,是通过不同的启动子或 RNA 剪切方式形成的,其中 Nogo-A 是 Nogo 最主要的形式,在 CNS 中由少突胶质细胞和一些神经元产生,含有抑制区域的一部分存在于少突胶质细胞表面^[8]。脊髓损伤后,少突胶质细胞和髓磷脂释放出细胞内的 Nogo-A 到细胞外基质,抑制轴突再生。目前,Nogo-A 作为重要的神经生长抑制因子已引起国内外学者的关注。

本实验采用免疫组化、荧光定量 PCR 及蛋白质印迹法,与正常组和假手术组对比研究,探讨大鼠脊髓损伤后 Nogo-A 在脊髓损伤区内的动态表达规律。研究发现,正常组、假手术组各时间点 Nogo-A 蛋白和 mRNA 表达均较低且无显著变化($P>0.05$)。而模型组 Nogo-A 蛋白和 mRNA 表达在损伤后体现了明显的波动规律,在受损第 24 小时时,Nogo-A 蛋白和 mRNA 均呈低表达,第 3 天后下降

至最低,第7天后迅速上升并达到高峰,至第14天又逐渐下降,但仍高于假手术组表达水平。其中,与假手术组比较,模型组在损伤后第7天、第14天,Nogo-A蛋白和mRNA表达均明显增高,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。脊髓损伤是大鼠脊髓组织内Nogo-A表达增高的直接原因。大鼠脊髓损伤后Nogo-A表达先抑后扬,第7天达到高峰,持续保持高水平表达,是脊髓损伤治疗干预的重要时间窗口。

目前国内外学者普遍认为Nogo-A通过与受体结合后可启动信号级联,信号传导引起生长锥局部肌动蛋白细胞骨架改变,导致丝状伪足和薄片状伪足收缩,从而改变生长锥的形态和稳定性,使生长锥溃变,从而起到抑制轴突再生的作用^[9-10]。因此,脊髓损伤后Nogo-A的高水平表达可能是造成脊髓损伤后中枢神经系统神经再生困难的重要原因之一。

既往国内外也有Nogo-A在大鼠脊髓组织中表达变化的相关文献报道,但从免疫组化、蛋白质印迹法及荧光定量PCR三个方面进行系统阐述的较少。由于Nogo-A蛋白分子量较高,Western blot转膜较困难,本实验通过反复预实验摸索,Nogo-A转膜条件设置为25V、30min,通过Trans-blot[®]SD蛋白半干转印仪也可以得到较好的效果。

既往相关文献报道^[11-12],Nogo-A在大鼠脊髓组织中的动态变化规律与本文研究结果趋势基本一致,脊髓损伤后均出现了Nogo-A表达的不同程度增高,但Nogo-A表达量增高的时间节点及变化幅度有一定出入。有研究报道^[11],脊髓损伤Nogo-A即刻出现高表达,而本实验早期Nogo-A表达量呈现先抑后扬的动态变化,其变化趋势与王翠芳等^[12]研究结果相仿。早期Nogo-A低水平表达目前考虑可能与脊髓组织急性损伤坏死,蛋白表达量较低相关。而相关文献报道Nogo-A表达量最高峰及变化幅度不一,其主要原因可能与动物种类、造模方式、脊髓受损程度以及实验观察周期有一定相关性,有待进一步观察研究。

参考文献

- [1] Cafferty WB, Duffy P, Huebner E, et al. MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(20):6825—6837.
- [2] Lee JK, Geoffroy CG, Chan AF, et al. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo, MAG and OMgp deficient mice[J]. *Neuron*, 2010, 66(5): 663—670.
- [3] Montani L, Gerrits B, Gehrig P, et al. Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(16):10793—10807.
- [4] Kern F, Stanika RI, Sarg B, et al. Nogo-A couples with Apg-1 through interaction and co-ordinate expression under hypoxic and oxidative stress[J]. *Biochem J*, 2013, 455(Pt 2): 217—227.
- [5] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report[J]. *J Am Med Assoc*, 1911, LVII (11): 878—880.
- [6] Scholze AR, Barres BA. A Nogo signal coordinates the perfect match between myelin and axons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(4): 1003—1004.
- [7] Raiker SJ, Lee H, Baldwin KT, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(37): 12432—12445.
- [8] Chong SY, Rosenberg SS, Fancy SP, et al. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(4): 1299—1304.
- [9] Broggin T, Nitsch R, Savaskan NE. Plasticity-related gene 5 (PRG5) induces filopodia and neurite growth and impedes lysophosphatidic acid- and Nogo-A-mediated axonal retraction [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(4): 521—537.
- [10] Joset A, Dodd DA, Halegoua S. Pincher-generated Nogo-A endosomes mediate growth cone collapse and retrograde signaling[J]. *J Cell Biol*, 2010, 188(2): 271—285.
- [11] Qiang Guo, Shu-Rong Li, Bing-Yin Su. Nogo-A immunoreactivity in injured spinal cord of adult rats[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2005, 21(4): 287—290.
- [12] 王翠芳,毋崇岭,马延超,等. 大鼠脊髓损伤后神经生长抑制因子Nogo-A的表达[J]. *临床骨科杂志*, 2008, 11(6): 572—575.