文章编号:1000-5404(2005)23-2335-03

论著

Nogo-66受体在大鼠神经组织中的表达

谢 琳[1], 贺翔鸽[1], 何凤慈[2], 马建洲[1], 龙在云[3], 王永堂[3], 刘 媛[3] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]眼科, [2]药剂科, [3]第三研究室, 重庆 400042)

提 要: 目的 观察Nogo-66受体(NgR)蛋白在脑、脊髓、视网膜、视神经及坐骨神经的表达。**方法** 采用免疫荧光组织化学-激光共聚焦显微镜观察9只正常SD大鼠脑、脊髓、视网膜、视神经及坐骨神经中NgR蛋白表达。**结果** 9只大鼠脑、脊髓、视网膜、视神经切片中NgR蛋白均表达阳性,荧光染色位于神经元及其突起。9只大鼠坐骨神经切片中NgR蛋白均表达阴性。**结论** 在大鼠中枢神经系统神经元中NgR广泛分布,而在周围神经坐骨神经则无NgR表达,提示NgR的阳性表达与中枢神经系统再生能力低下密切相关。

关键词: 中枢神经系统;周围神经系统;NgR蛋白;免疫荧光组织化学;激光共聚焦显微镜
中图法分类号: R322.8; R341; R392.11 **文献标识码**: A

Expression of Nogo-66 receptor protein in rat nerve tissue

XIE Lin[1], HE Xiang-ge[1], HE Feng-ci[2], MA Jian-zhou[1], LONG Zai-yun[3], WANG Yong-tang[3], LIU Yuan[3] ([1]Department of Ophthalmology, [2]Department of Pharmaceuticology, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Nogo-66 receptor (NgR) protein in brain, spinal cord, retinal, optic nerve and sciatic nerve. **Methods** Frozen section of brain, spinal cord, retinal, optic nerve and sciatic nerve of 9 rats were made. The immunofluorescence-histochemistry and laser-confocal microscopy were used to observe the expression of NgR protein. **Results** The expression of NgR protein was positive in neuron and axon or dendrite of brain, spinal cord, retinal and optic nerve, and negative in sciatic nerve. **Conclusion** The expression of NgR protein is positive in brain, spinal cord, retinal and optic nerve, which may be related to the poor neuron and axon regeneration in central nervous system.

Key words: central nervous system; peripheral nervous system; Nogo-66 receptor protein; immunofluorescence-histochemistry; laser-confocal microscopy

成年哺乳动物的外周神经系统损伤后可以再生,但中枢神经系统却不同。中枢神经系统损伤后再生失败的主要原因是由于髓磷脂抑制物的存在,如Nogo、MAG、OMgp等,这些抑制因子通过与神经元上的特异性受体复合体相互作用,启动对神经轴突再生的抑制作用,Nogo-66受体(Nogo-66 receptor, NgR)、P75神经生长因子受体以及LINGO-1是组成此受体复合体的3个关键亚单位,而NgR是抑制性蛋白发挥作用的集中点[1]。为了解NgR在大鼠神经系统的分布,我们采用免疫荧光组织化学-激光共聚焦显微镜观察NgR在视网膜、视神经、脑、脊髓以及坐骨神经的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用14~16周龄SD(Sprague-Dawley)大鼠9只,体质量250~280 g,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2 试剂与仪器 兔抗大鼠NgR单克隆抗体购自Santa Cruz生物技术公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术公司,其余分析试剂购自上海华美公司;激光共聚焦显微镜型号为Leica TCSSP-2,冰冻切片机型号为Leica CM1900。

1.2 方法

1.2.1 切片的制备 25%乌拉坦1~1.2 ml(4 ml/kg)大鼠腹腔注射麻醉,开胸行左心室插管,剪开右心房,PBS液(pH

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(2004BB5032)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2004BB5032)

作者简介:谢 琳(1966-),女,重庆市人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事白内障、青光眼视神经保护方面的研究。电话:(023)68757341, E-mail: xielin793@sohu.com

收稿日期:2005-05-13;修回日期:2005-07-21

7.5)灌注至流出液基本清亮为止,然后用预冷的4%多聚甲醛固定液400 ml灌注,先快速灌注200 ml,继之缓慢灌注200 ml,待固定液灌注完毕,分别取双眼球、视神经、全脑组织、腰1~5节段脊髓以及坐骨神经。双眼球和视神经置于4%多聚甲醛4 ℃过夜;全脑组织、腰1~5节段脊髓及坐骨神经用4%多聚甲醛后固定2 h,再将组织置于20%蔗糖磷酸缓冲液4 ℃过夜。组织完全沉底后冰冻切片机连续切片,每5张取1张,片厚40 μm。

1.2.2 免疫荧光组织化学染色 先将切片经0.01 mol/L PBS(pH 7.5)漂洗5 min×3次,浸入1:20正常封闭血清液中,室温下20 min。同前漂洗之后,进行免疫荧光染色:首先将漂片浸入兔抗大鼠NgR单克隆抗体(稀释度1:200),对照组用0.01 mol/L PBS(pH 7.5)代替一抗,4 ℃孵育12 h,然后37 ℃孵育1 h,用0.01 mol/L PBS(pH 7.5)洗涤5 min×3次,接着浸入标记FITC的山羊抗兔IgG(稀释度1:100),37 ℃孵育30 min,0.01 mol/L PBS(pH 7.5)洗涤5 min×3次,直接在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。FITC的激发波长是488 nm。

2 结果

免疫荧光组织化学染色显示:视网膜神经元(图1)及视神经纤维(图2)有NgR的绿色荧光表达,大脑皮质(图3)、海马、延髓、和脊髓的神经元及其突起有NgR的绿色荧光表达,而坐骨神经表达阴性。所有对照组荧光染色阴性。

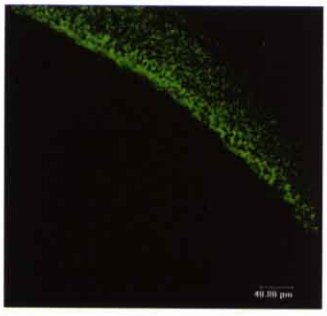


图1 SD大鼠视网膜神经元可见NgR蛋白绿色荧光

Fig 1 Positive NgR protein stained by green fluorescent protein in retinal neuron of SD rats

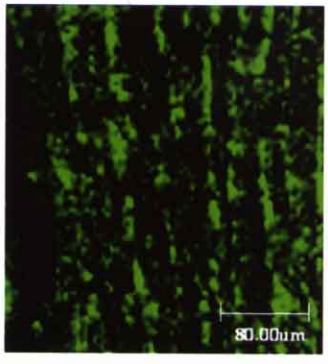


图2 SD大鼠视神经可见NgR蛋白绿色荧光

Fig 2 Positive NgR protein stained by green fluorescent protein in optic nerve of SD rats

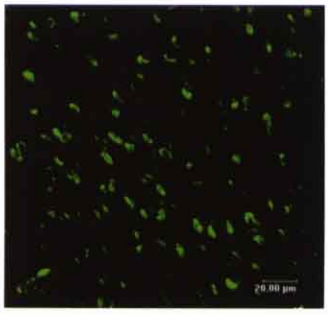


图3 SD大鼠大脑皮质神经元及其突起可见NgR蛋白绿色荧光

Fig 3 Positive NgR protein stained by green fluorescent protein in cerebral cortex neuron and axon of SD rats

3 讨论

髓磷脂抑制物,如髓磷脂相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte-myelin glycoprotein, OMgp)、Nogo等能诱导生长锥塌陷,抑制轴突再生,导致成年哺乳类动物神经系统损伤后早期再生失败。尤其是抑制受损神经再生基因——Nogo基因的发现[2-4],使中枢神经再生的研究有了突破性进展。Nogo有3个异构体(Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C),生化、组化及其他实验表明Nogo基因主要分布于中枢神经系统白质中。GrandPre等[3]的研究发现,Nogo蛋白是一种碳端和氮端在膜内,而66个氨基酸残基在胞膜外形成拓扑结构,在Nogo-A、-B、-C中都可以检测到这一完全独立的且具有抑制活性的结构域-Nogo-66,他们认为正是由于这66个氨基酸残基的存在,才使Nogo-A、-B、-C都具有神经抑制活性。因此,他们把Nogo蛋白3种异构体上这个共同的氨基酸序列命名为Nogo-66。

Fournier等[5]运用碱性磷酸酶融合技术首次发现了NgR。首先,他们构建了AP-Nogo-66融合蛋白,然后将AP-Nogo-66进行cDNA文库筛选,并转染COS细胞,最终得到NgR。NgR蛋白质含473个氨基酸,氨基端有一信号肽,其后为8个富含亮氨酸的重复区,羧基端含丰富的半胱氨酸,与糖基化磷酸肌醇相连,NgR与可溶性Nogo-66具有高度亲和性。他们认为,NgR即是Nogo-66的一种功能性细胞表面受体,存在于中枢神经胶质细胞和部分神经元的Nogo-66与分布于中枢神经元的NgR,通过特异性的配体受体式结合,介导了Nogo-66的中枢神经抑制活性。此外,其余两种髓磷脂抑制物:MAG、Omgp也通过NgR介导中枢神经抑制作用,因此,NgR是中枢神经系统髓磷脂中各种轴突生长抑制性蛋白发挥作用的集中点。

许多研究证明，NgR mRNA 主要表达于成年哺乳类动物中枢神经系统灰质。Josephson 等[6]的研究发现 NgR 分布于神经元胞体和整个轴突中：在成人体内，NgR mRNA 的活性可在新皮质、海马和背根神经节的神经元中被检测到，在成鼠体内，NgR mRNA 可在新皮质、海马、脑干和小脑等神经元中有强烈的表达，而外周神经表达阴性；此外，NgR mRNA 也能在人胚和鼠胚的脊髓和背根神经节中检测到。但是，针对视网膜神经元中 NgR 表达及分布的研究报道很少，Fournier 等[5]为证实 NgR 能够介导 Nogo-66 对轴突生长的抑制，制备了对 Nogo 不敏感的鸡胚胎早期第 7 天（E7）的视网膜神经元模型，该视网膜神经元不表达或很少表达 NgR 蛋白，然而，转染 HSV-NgR 在 E7 视网膜神经节细胞上之后，NgR 的表达增加，视网膜神经节细胞生长锥对 Nogo-66 诱导的塌陷变得敏感。迄今为止，针对成年哺乳类动物的视网膜神经元中 NgR 表达的研究少见报道。

本研究采用冰冻切片和漂片的方法，使组织抗原保存好、抗体易于透过、抗原抗体易于结合；同时在激光共聚焦显微镜下直接观察荧光表达，可以排除焦点以外荧光的干扰，具有图像清晰、特异性高、敏感性强、可精确定位等优点。结果显示，成年大鼠的大脑皮质、海马、延髓和脊髓的神经元及其突起均有 NgR 绿色荧光表达，而坐骨神经无 NgR 荧光表达；本研究同时表明，视网膜神经元及视神经纤维有 NgR 的绿色荧光表达。这一结果提示，NgR 主要在脑、脊髓、视神经、视网膜等中枢神经系统组织中表达，其分布特点与中枢神经系统再生能力低下的特征相符合，进一步证实了 NgR 是介导中枢神经系统髓磷脂中各种轴突生长抑制性因子的关键受体，此研究为中枢神经系统损伤后再生与修复提供了新的药物治疗靶点。

参考文献：

[1] Woolf C J, Bloechlinger S. Neuroscience. It takes more than two to Nogo[J]. Science, 2002, 297(5584): 1132-1134.

[2] Chen M S, Huber A B, van der Haar M E, *et al*. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. Nature, 2000, 403(6768): 434-439.

[3] GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, *et al*. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein[J]. Nature, 2000, 403(6768): 439-444.

[4] Goldberg J L, Barres B A. Nogo in nerve regeneration[J]. Nature, 2000, 403(6768): 369-370.

[5] Fournier A E, GrandPre T, Strittmatter S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration[J]. Nature, 2001, 409(6818): 341-346.

[6] Josephson A, Trifunovski A, Widmer H R, *et al*. Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans[J]. J Comp Neurol, 2002, 453(3): 292-304.

（编辑　龙　亮）

（上接 2334 页）

面患者感染中毒症状进展如此迅速、凶猛，在临床工作中实为少见。分析患者诊疗经过，考虑在阑尾化脓性炎症过程中，阑尾腔内压力持续增高，细菌及其毒素突破肠黏膜屏障进入血循环[2]，激活机体免疫防御系统产生各种血管活性物质，导致患者循环稳定的破坏[1]。同时侵入机体循环的细菌内毒素，亦加重患者全身循环的失衡，甚至出现诱发患者 ARDS 的倾向[4]。治疗体会：①积极补充血容量，维持患者循环稳定，同时注意患者水电解质、酸碱平衡状态的监测与维持。②尽早处理原发病灶，解除导致患者出现感染休克的原发疾病，是改善患者休克状态的关键，必要时可在血管活性药物维持下急诊行剖腹探查术，查明病因，以利于进一步治疗。③有效控制感染，抗生素应用应早期、足量，急性阑尾炎致病菌主要为革兰阴性菌及厌氧菌，应选择具有合适抗菌谱的抗生素。④血管活性药物应用，以维持患者循环状态稳定，同时亦为急诊手术创造了条件，同时注意心、肺、肝、肾等重要脏器的保护。⑤激素的应用，可以减轻机体感染中毒症状，帮助改善机体微循环，同时可稳定机体细胞溶酶体膜[5]，保护机体细胞，但应注意其应用的时机和疗程，有效抗生素控制感染是其应用的前提，在休克状态、中毒症状改善后及时停用。急性阑尾炎是腹部外科常见疾病之一，多数病人症状体征明显，很少引起严重的感染中毒表现。但本例患者仅因急性化脓性阑尾炎即导致严重的感染性休克、出现严重感染中毒症状，实属少见，我们对此例病例进行总结分析，希望能为临床医生对相似病例的诊断治疗提供参考与帮助。

关键词：急性化脓性阑尾炎；感染性休克
中图法分类号：R574.610.6　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 方先定. 老年阑尾炎穿孔伴休克 5 例诊治体会[J]. 实用老年医学, 1999, 13(5): 275.

[2] Radha A, Wales P W, James A, *et al*. Acute appendicitis with fulminant necrotizing fasciitis in a neonate[J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(11): E5-E6.

[3] Chen C H, Lin L C, Lin C F, *et al*. Chromobacterium violaceum bacteremia: a case report[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2003, 36(2): 141-144.

[4] 王来荣. 急性阑尾炎伴中毒性休克的探讨(附 3 例报告)[J]. 河北医学, 1999, 5(3): 65-66.

[5] Nadeni Z, Clark J, Richards C G, *et al*. The causes of fever in children attending hospital in the north of England[J]. J Infect, 2001, 43(4): 221-225.

（编辑　王　红）