论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1076-04

颞叶内侧癫痫患者颞叶皮层致痫灶中 Nogo-A 信号通路的表达

朱孔江,李 松,徐广振,刘仕勇,安 宁,杨 辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心)

[摘要] **目的** 研究 Nogo-A 及其下游信号通路在 MTLE 患者颞叶皮层的表达,探讨其在癫痫后异常神经环路形成过程中的作用。**方法** 收集本科 MTLE 患者颞叶皮层标本 12 例与正常颞叶皮层标本 12 例,采用 RT-PCR、Western blot、免疫组化方法检测 Nogo-A、NgR、P75(NTR)、Lingo-1、Troy 表达情况。**结果** MTLE 患者颞叶皮层致痫灶中出现神经元丢失、细胞排列结构紊乱、极性消失和胶质增生等病理改变。与正常对照相比,MTLE 患者颞叶皮层 Nogo-A mRNA 和蛋白表达显著降低($P<0.01$),NgR mRNA 和蛋白表达显著升高($P<0.01$);Nogo-A 蛋白在神经元中表达显著升高($P<0.01$),而在胶质细胞中表达显著降低($P<0.01$);NgR、P75(NTR)、Troy、Lingo-1 蛋白主要表达于神经元中,其中前三者表达均显著升高($P<0.05$,$P<0.01$),而 Lingo-1 蛋白表达降低不显著($P>0.05$)。**结论** Nogo-A 及其下游信号通路在 MTLE 患者颞叶皮层中的表达发生改变,提示其非常可能参与了异常神经环路的形成过程。

[关键词] 癫痫;Nogo-A;NgR;P75(NTR);Troy ;Lingo-1
[中图法分类号] R341;R446.8;R742.1 [文献标志码] A

Expression of Nogo-A signaling pathway in temporal lobe cortex from mesial temporal lobe epilepsy patients

Zhu Kongjiang, Li Song, Xu Guangzhen, Liu Shiyong, An Ning, Yang Hui (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of Nogo-A signaling pathway in the temporal lobe from mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) patients and investigate its potential role in the formation of abnormal neural networks after epileptic seizure. **Methods** Twelve tissue samples of temporal lobe from diagnosed intractable MTLE patients during operation and 12 samples of normal temporal lobe due to traumatic wound debridement or tumor craniotomy were collected after informed consent signed and approval of the Ethics Committee of our hospital in our department from June 2011 to June 2012. The expression of Nogo-A, NgR, P75(NTR), Lingo-1 and Troy was detected by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemical assay. **Results** There were such pathological changes in the temporal lobe cortex from MTLE patients as neuron loss, disarranged order, neuron polarity loss, and gliosis. The expression of Nogo-A at mRNA and protein levels in MTLE patients was significantly down-regulated ($P<0.01$), while that of NgR was significantly up-regulated ($P<0.01$) when normal individuals. The Nogo-A protein expression was significantly higher in the neurons ($P<0.01$), but significantly mild in glial cells ($P<0.01$). NgR, P75(NTR), Troy and Lingo-1 proteins were mainly expressed in the neurons, which were significantly up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$) except Lingo-1 down-regulated though not significantly ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of Nogo-A and its downstream signaling pathway is changed in the MTLE patients' temporal lobe cortex, suggesting that it might be involved in the formation of abnormal neuronal networks.

[**Key words**] epilepsy;Nogo-A;NgR;P75(NTR);Troy ;Lingo-1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071043). Corresponding author: Yang Hui, E-mail: 13808390069@163.com

癫痫是大脑神经元突发性异常放电,导致短暂大脑功能障碍的一种慢性疾病。临床较常见的颞叶内侧癫痫(mesial temporal lobe epilepsy, MTLE)是局灶性癫痫的主要类型之一,放电起源于或首先波及颞叶结

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071043)
[通信作者] 杨 辉, E-mail: 13808390069@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130326.0907.002.html(2013-03-26)

构,影像学检查常见海马硬化。癫痫的异常放电可使颞叶皮层的神经环路结构异常重塑,导致兴奋-抑制失衡,形成致痫灶,皮层电极检测可见明确和固定的痫样放电部位。Nogo-A 属于中枢神经髓鞘抑制因子,是主要表达于少突胶质细胞的整合膜蛋白,在某些神经元中也有表达。Nogo-A 与其受体 NgR 结合,在 Lingo-1 和 P75(NTR)/Troy 辅助下,激活 RhoA 信号通路,调控细胞骨架重组[1-2]。近年研究表明,Nogo-A 参与调控神经前体细胞分化迁移[3]、神经突起生长[4-5]和突触可塑性[6-7]。因此我们有理由推测 Nogo-A 可能参与影响 MTLE 癫痫后颞叶皮层致痫灶中神经环路重塑过程,关于 Nogo-A 信号通路与 MTLE 患者颞叶皮层致痫灶的研究较少。我们采用 RT-PCR、Western blot、免疫组化(IHC)方法检测 MTLE 患者颞叶皮层致痫灶中 Nogo-A 及其下游信号通路的表达情况,以初步探讨其在 MTLE 颞叶皮层神经环路重塑中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集本科 2011 年 6 月至 2012 年 6 月明确诊断为药物难治性颞叶癫痫患者标本共 12 例,其中男性 9 例,女性 3 例,年龄 6~43(26.8±11.6)岁,病程 2~36(13.0±9.7)年,发作形式以复杂部分性发作继发全面性发作为主。术前 MRI 示患侧海马区代谢较对侧降低,术中见海马硬化明显者。患者符合手术适应证:①严重影响患者生活的难以控制的癫痫发作;②规律服用 2 种或 2 种以上一线抗癫痫药物,血药浓度监测在正常有效浓度范围内,癫痫发作 1 年以上(至少 1 次/月)仍控制不佳;③头颅 CT 或 MRI 检查排除占位性病变以及其他神经系统疾病;④手术前 1 周经过视频脑电图检查或者放置硬膜下电极,术中用皮层电极进行检测,发现有明确和固定的癫痫放电部位,且能进行手术者;⑤知情同意。正常对照为外伤清创患者或肿瘤开颅手术为扩大视野必须切除的患者的相对正常颞叶组织,共 12 例,其中男性 8 例,女性 4 例,年龄 17~50(28.0±6.2)岁,且符合:①无癫痫病史和家族遗传病史;②病理切片证实脑皮层结构无异常;③知情同意。

1.2 主要试剂及仪器

RNAiso、反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit、PCR 试剂盒 Premix *Taq* 均购自 TaKaRa 公司。RT-PCR 引物由 TaKaRa 公司合成,引物序列和扩增产物长度见表 1。兔抗 Nogo-A、NgR、Lingo-1、Troy 多克隆抗体均购自 Abcam 公司,兔抗 P75(NTR)、GAPDH 单克隆抗体均购自 Cell Signaling 公司,即用型山羊抗兔 SBAC 免疫组化试剂盒、HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自博士德公司。nanodrop2000 微量紫外分光光度计,Bio-Rad1000 型梯度 PCR 仪,Bio-Rad mini-protean 电泳系统,Bio-Rad Western blot 湿转转印系统,Alpha Innotech 凝胶成像系统。

1.3 RT-PCR 检测 Nogo-A 和 NgR mRNA 表达

RNA 提取:切取 -80 ℃冻存颞叶皮层组织约 50 mg,置于液氮中研成粉末状,加入 RNAiso Plus,按操作说明提取 RNA,-80 ℃保存。RNA 反转录成 cDNA:紫外分光光度计测定 RNA 纯度、浓度,按说明书将 1 μg RNA 反转录成 cDNA,反转录条件 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,-80 ℃保存。RT-PCR:按说明书加入 Premix *Taq*、引物、模板,共 20 μL。NgR mRNA 扩增程序:95 ℃ 5 min→(94 ℃ 30 s→46.5 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s)×30→72 ℃ 5 min;Nogo-A、β-actin mRNA 扩增程序:95 ℃ 5 min→(94 ℃ 30 s→55 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s)×25→72 ℃ 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶溶液每 100 毫升加入 1 μL GoldView 混匀凝固,扩增产物上样 6 μL,电泳 150 V 25 min,于凝胶成像系统中紫外光下采集图像。Image Pro Plus 6.0 软件分析目的基因光密度(optical density,OD)值。

表 1 RT-PCR 引物序列和扩增产物长度

目的基因	引物序列	产物长度(bp)
Nogo-A	上游 5′-GGGCTCCTCGGGCTCA-3′	67
	下游 5′-GCGTATCACAGGCTCAGATGC-3′	
NgR	上游 5′-CCAGAGAATCTTCCTGCACG-3′	400
	下游 5′-ACTGGGGATACGGTTGCCAT-3′	
β-actin	上游 5′-GCACCACACCTTCTACAATGAGC-3′	163
	下游 5′-TAGCACAGCCTGGATAGCAACG-3′	

1.4 Western blot 检测 Nogo-A 及其下游信号通路蛋白表达

组织蛋白提取:切取 -80 ℃冻存颞叶皮层组织约 1 cm^3,加入蛋白裂解液,冰浴中匀浆,12 000 r/min 4 ℃离心 5 min,取上清。BCA 法测定蛋白浓度。加入 Loading Buffer,煮沸 5 min 蛋白变性,-80 ℃保存。SDS-PAGE:浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度 Nogo-A 为 6%,其余为 10%。蛋白上样量 40 μg,恒压电泳 90 V 30 min 后改为 120 V 90 min。恒流湿转 300 mA 2 h。5% 奶粉 TBST 溶液室温封闭 2 h。按目的蛋白相对分子质量裁剪 PVDF 膜,一抗(浓度 1∶1 000)4 ℃孵育过夜。TBST 漂洗 3 次×10 min,二抗(浓度 1∶2 500)37 ℃孵育 1.5 h。TBST 漂洗 3 次×10 min,DAB 显色。凝胶成像系统白光拍照,Image Pro Plus 6.0 软件分析各目的条带 OD 值。

1.5 正常对照与 MTLE 患者颞叶皮层 HE 染色病理观察

组织固定、包埋、切片:切取 -80 ℃冻存颞叶皮层组织约 0.5 cm^3,甲醛室温固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋;切片厚 0.6 μm,粘片于防脱载玻片上。常规脱蜡、水化,苏木精浸染5 min,1% 盐酸乙醇分化 3 s,0.5% 氨水返蓝,0.5% 伊红复染 10 s,常规脱水、透明,中性树胶封片。

1.6 IHC 检测 Nogo-A 及其下游信号通路蛋白表达

IHC 染色切片制备同 1.5。常规脱蜡、水化;载玻片浸于 PBS 中,微波加热至沸腾后 20 min 热修复抗原,室温冷却;浸于 3% H_2O_2 PBS 15 min 封闭内源性过氧化物酶;PBS 漂洗 3 次×5 min,5% BSA 封闭 30 min;一抗(浓度 1∶100)4 ℃孵育过夜;PBS 漂洗 3 次×5 min,二抗(山羊抗兔 IgG)室温孵育 1 h;PBS 漂洗 3 次×5 min,三抗(SABC 试剂)室温孵育 1 h;PBS 漂洗 3 次×5 min,DAB 显色 2 min;苏木精复染;常规脱水、透明,中性树胶封片。显微镜观察照相。Image Pro Plus 6.0 软件分析免疫阳性细胞 OD 值。

1.7 统计学分析

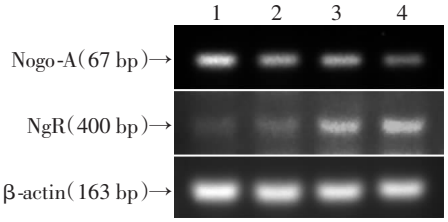
对 RT-PCR 目的基因、Western blot 目的蛋白条带和 IHC 阳性细胞的 OD 值进行归一化处理得相对 OD 值。使用 SPSS

19.0统计软件，独立样本 t 检验比较正常颞叶、MTLE 颞叶两组间的平均相对 OD 值。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 Nogo-A 和 NgR mRNA 表达

RT-PCR 成功扩增出目的基因片段（图1），OD 值统计分析结果显示：与正常对照［Nogo-A、NgR mRNA 分别为（0.63±0.14）、（0.23±0.09）］相比，MTLE 患者颞叶皮层中 Nogo-A mRNA 表达（0.37±0.13）显著下调（$P<0.01$），而 NgR mRNA 表达（0.77±0.14）显著上调（$P<0.01$）。



1～2：正常对照；3～4：MTLE 患者

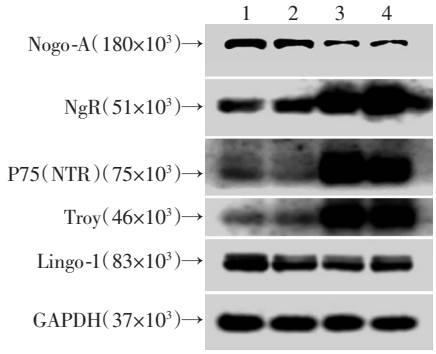
图1 RT-PCR 检测颞叶皮层 Nogo-A、NgR mRNA 的表达

2.2 Western blot 检测 Nogo-A 及其下游信号通路蛋白表达

Western blot 成功检测各目的蛋白条带（图2）。OD 值统计分析结果显示：与正常对照［Nogo-A、NgR、P75（NTR）、Troy、Lingo-1 分别为（0.64±0.13）、（0.35±0.16）、（0.31±0.11）、（0.34±0.09）、（0.56±0.20）］相比，MTLE 患者颞叶皮层中 Nogo-A（0.36±0.15）表达显著降低（$P<0.01$），而 NgR（0.65±0.19）表达显著升高（$P<0.01$），与 RT-PCR 结果相一致；Nogo-A 下游信号通路中，P75（NTR）（0.69±0.14）、Troy（0.66±0.09）表达显著升高（$P<0.01$）；而 Lingo-1（0.44±0.17）表达降低不显著（$P>0.05$）。

2.3 正常对照与 MTLE 患者颞叶皮层 HE 染色病理观察

HE 染色结果显示，与正常对照相比（图3A），MTLE 患者颞叶皮层（图3B）有神经元丢失、细胞排列结构紊乱、极性消失和胶质增生等病理改变。



1～2：正常对照；3～4：MTLE 患者

图2 Western blot 检测颞叶皮层 Nogo-A 及下游信号通路蛋白表达

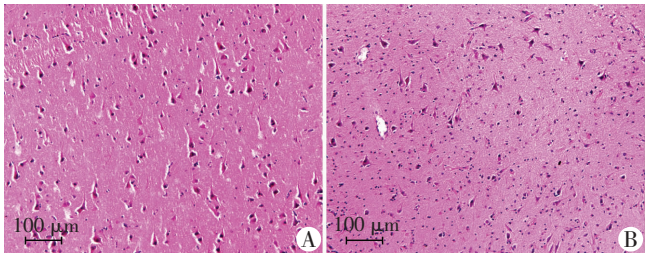
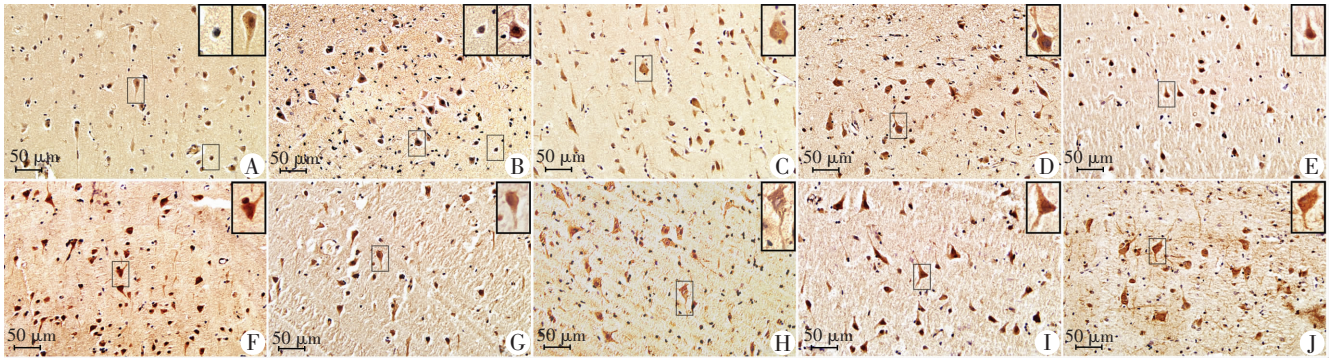


图3 正常颞叶皮层（A）与 MTLE 患者颞叶皮层（B）组织病理学观察 （HE）

2.4 IHC 检测 Nogo-A 及其下游信号通路蛋白表达

按照形态可将免疫染色阳性细胞分为两类：胞体较大、突起丰富的神经元和胞体较小、突起较短的胶质细胞。在正常对照和 MTLT 患者颞叶皮层中，可见 Nogo-A 在胶质细胞和神经元中均有表达，而 NgR、P75（NTR）、Troy、Lingo-1 则主要表达于神经元中（图4）。分别分析统计神经元和胶质细胞免疫染色阳性强度 OD 值，结果显示：与正常颞叶皮层相比［胶质细胞 Nogo-A，神经元 Nogo-A、NgR、P75（NTR）、Troy、Lingo-1 相对 OD 值分别为（0.63±0.14）、（0.40±0.10）、（0.44±0.04）、（0.46±0.05）、（0.47±0.06）、（0.57±0.13）］，MTLE 患者颞叶皮层的胶质细胞中 Nogo-A（0.37±0.09）表达显著降低（$P<0.01$）；神经元中 Nogo-A（0.60±0.10）、NgR（0.56±0.09）、P75（NTR）（0.54±0.06）、Troy（0.53±0.03）表达均显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$），Lingo-1（0.43±0.06）表达降低不显著（$P>0.05$）。



A、B：Nogo-A；C、D：NgR；E、F：P75（NTR）；G、H：Troy；I、J：Lingo-1；A、C、E、G、I：正常颞叶皮层，；B、D、F、H、J：MTLE 患者颞叶皮层
右上角方框为指定区域的局部放大，其中 A、B 分别为胶质细胞和神经元，其他均为神经元，标尺：10 μm

图4 IHC 检测 Nogo-A 及其下游信号通路表达

3 讨论

癫痫影响神经可塑性,如轴突发芽、突触重塑、神经发生等,这些病理变化常伴有异常神经环路的重塑,易化痫样放电的产生与传播[8-9]。细胞骨架影响癫痫发作后的细胞水肿、蛋白转运、神经递质运输、树突变形等过程,参与调控神经可塑性[10]。

Nogo-A 激活 RhoA/ROCK/cofilin 信号通路,解聚细胞骨架结构中的纤维状肌动蛋白(F-actin)。有研究显示:Nogo-A 能够抑制中枢神经系统轴突生长和再生,而中和 Nogo-A 可显著促进轴突的发芽和生长;Nogo-A 降低树突复杂程度,抑制突触传递,限制突触可塑性;Nogo-A 在胚胎时期参与调控神经前体细胞迁移;成年后 Nogo-A 亦影响神经母细胞的迁移;Nogo-A/NgR 通路通过抑制神经干细胞分化来影响神经元新生速度[3-7,11-12]。上述研究表明,Nogo-A 及其下游信号通路参与轴突、树突、树突棘延伸和神经发生过程,影响神经可塑性。

研究表明,Nogo-A 及其下游信号通路与癫痫关系密切,例如:Nogo-A 在颞叶癫痫患者和海人酸癫痫动物模型海马中表达增高[13-14];P75(NTR)在毛果芸香碱诱导大鼠癫痫模型的海马、梨状皮质、内嗅皮质表达增高[15];NgR 下游的 GTP-Rho 在海人酸诱导急性癫痫大鼠大脑中表达增高[16]。Nogo-A 信号通路在癫痫后的表达变化提示其很可能参与 MTLE 颞叶神经重塑过程。

我们对 MTLE 患者颞叶皮层致痫灶的研究显示:致痫灶中发生神经元丢失、细胞排列结构紊乱、极性消失和胶质增生等病理改变;RT-PCR 提示致痫灶中 Nogo-A mRNA 表达显著降低,而 NgR mRNA 显著升高;Western blot 结果显示致痫灶中 Nogo-A 蛋白表达显著降低,NgR、P75(NTR)、Troy 蛋白表达均显著升高,Lingo-1 蛋白表达降低不显著;IHC 显示 Nogo-A 在胶质细胞的表达显著降低,而在神经元的表达则显著升高,NgR、P75(NTR)、Troy 表达均显著升高,Lingo-1 表达降低不显著。3 种方法所得实验结果基本一致,其中部分不同但并不矛盾,例如考虑到在致痫灶中存在神经元丢失以及神经元、胶质细胞数量差异,故虽然 IHC 见 Nogo-A 在神经元表达升高和胶质细胞表达降低,而 Western blot 中二者综合后整体表达降低;再如,在不同方法检测各分子表达差异的显著性并不完全一致,是由于不同方法的敏感性、特异性不同所致。上述结果证实了 Nogo-A 及其下游信号通路在 MTLE 患者颞叶皮层致痫灶中表达发生改变,提示其非常可能参与异常神经环路的形成过程,但因该信号通路中的各个分子变化趋势并不一致,故这种变化对异常神经环路形成的综合效应仍需进一步研究。

目前干预 Nogo-A 信号通路已用于治疗部分神经系统疾病,例如用 NgR 受体拮抗剂 Nep1-40 促进脊髓损伤修复等。涉及神经系统损伤修复过程的影响因素非常复杂,因此采用 Nogo-A 信号通路激动剂或阻断剂来干预异常神经环路形成的时机及效应都不确定,但随着对癫痫发病机制的深入研究,干预 Nogo-A 信号通路可能成为癫痫的治疗靶点。

参考文献:

[1] Schwab J M, Tuli S K, Failli V. The Nogo receptor complex: confining molecules to molecular mechanisms[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(7): 293-297.
[2] Schwab M E. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(12): 799-811.
[3] Mathis C, Schroter A, Thallmair M, *et al*. Nogo-a regulates neural precursor migration in the embryonic mouse cortex[J]. Cereb Cortex, 2010, 20(10): 2380-2390.
[4] Craveiro L M, Hakkoum D, Weinmann O, *et al*. Neutralization of the membrane protein Nogo-A enhances growth and reactive sprouting in established organotypic hippocampal slice cultures[J]. Eur J Neurosci, 2008, 28(9): 1808-1824.
[5] Reilly C E. Nogo-A is the inhibitor of CNS axon regeneration[J]. J Neurol, 2000, 247(3): 239-240.
[6] Delekate A, Zagrebelsky M, Kramer S, *et al*. NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(6): 2569-2574.
[7] Petrinovic M M, Hourez R, Aloy E M, *et al*. Neuronal Nogo-A negatively regulates dendritic morphology and synaptic transmission in the cerebellum[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(3): 1083-1088.
[8] Scharfman H E. Epilepsy as an example of neural plasticity[J]. Neuroscientist, 2002, 8(2): 154-173.
[9] Fang M, Xi Z Q, Wu Y, *et al*. A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis[J]. Med Hypotheses, 2011, 76(6): 871-876.
[10] Engel J Jr, Pedley T A. Epilepsy: A Comprehensive Textbook[M]. 2th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 289-306.
[11] Rolando C, Parolisi R, Boda E, *et al*. Distinct roles of Nogo-a and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult neural stem cell function and neuroblast migration[J]. J Neurosci, 2012, 32(49): 17788-17799.
[12] Pernet V, Schwab M E. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair[J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 97-104.
[13] Bandtlow C E, Dlaska M, Pirker S, *et al*. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy[J]. Eur J Neurosci, 2004, 20(1): 195-206.
[14] Meier S, Brauer A U, Heimrich B, *et al*. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure[J]. FASEB J, 2003, 17(9): 1153-1155.
[15] Roux P P, Colicos M A, Barker P A, *et al*. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure[J]. J Neurosci, 1999, 19(16): 6887-6896.
[16] Dubreuil CI, Marklund N, Deschamps K, *et al*. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats[J]. Exp Neurol, 2006, 198(2): 361-369.

(**收稿**:2013-02-16;**修回**:2013-03-18)
(编辑 王小寒)