小鼠脊髓损伤后 Nogo-A 的免疫组织化学研究

岳 岩 （解放军第 301 医院医务部，北京 100853）

［摘 要］ **目的** 研究小鼠脊髓损伤后 Nogo-A 的表达情况。**方法** C57 小鼠分为脊髓损伤组、假手术组和正常对照组，每组均在损伤后不同时间点（损伤后 1 h，12 h，24 h）取材，然后行 Nogo-A 免疫组织化学染色。**结果** Nogo-A 明显表达于神经元胞体及其突起形成的神经纤维。随着损伤后存活时间的延长，Nogo-A 阳性细胞数量和免疫反应强度均逐渐升高。**结论** 脊髓损伤后 24 h 内 Nogo-A 在神经元的表达逐渐升高，导致神经再生困难。

［关键词］ 中枢神经系统；免疫组织化学；Nogo-A

［中图分类号］ R651.2 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042（2011）03-0237-02

Immunohistochenistry study on Nogo-A expressions in mice after spinal cord injury

YUE Yan （Department of Medical Administration, 301st Hospital of PLA, Beijing 100853, China）

Abstract: Objective To investigate the Nogo-A expressions in mice after spinal cord injury. **Methods** C57 mice were divided into spinal cord injury group, sham group and control group. Samples were acquired at different time points (1 h, 12 h and 24 h after injury) in each group. Immunohistochemistry was performed in each group. **Results** Nogo-A was obviously expressed in pericaryon and neuron fibers which had neurite formation. The number of positive cells of Nogo-A and intensity of immunoreactions were increased as the survival time prolonged after injury. **Conclusion** The expressions of Nogo-A were increased within 24 h after spinal cord injury, which will induce difficulty in nerve regeneration.

Keywords: central nerve system; immunohistochemistry; Nogo-A

视神经损伤后的再生修复是视觉科学和神经科学的热点和难点。现已知道，中枢神经修复受胶质瘢痕的机械性阻碍、髓鞘源性抑制蛋白[1-3]等诸多因素的影响，导致再生困难，视神经修复与此类似。Nogo-A 是现已发现的髓鞘抑制蛋白之一，对神经元的再生起抑制作用。然而，近来研究表明，用原位杂交技术在正常神经元也发现有 Nogo-A mRNA 的表达[4-5]。Nogo 基因的成功克隆为视神经损伤修复提供了新的切入点，本实验观察了小鼠脊髓损伤后Nogo-A在脊髓不同部位的表达情况，并就其意义进行了初步讨论，旨在为视神经修复研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物分组与脊髓损伤模型的建立

成年 C57 小鼠 25 只，20～25 g，分为脊髓损伤组（$n=15$），假手术组（$n=5$）和正常对照组（$n=5$）。小鼠用 4% 水合氯醛麻醉后，于 T_{12} 处剥除椎骨，暴露脊髓，参照 Allen 打击法施行撞击伤，撞击强度为 5 g×3 cm。分别于损伤后 1 h（$n=5$）、12 h（$n=5$）、24 h（$n=5$）用 4% 多聚甲醛灌注固定后取材，取材部位为脊髓撞击中心及其两端各 3 mm 位置。常规固定、脱水后，冰冻切片机行纵切片，切片厚度 25 μm。假手术组在暴露脊髓后不行撞击伤；对照组小鼠不做任何处理。

1.2 免疫组织化学染色

各时间段切片用 PBS 漂洗后，在 0.3% H_2O_2 中室温孵育 20 min，PBS 漂洗后入正常山羊血清，37 ℃孵育 30 min。然后入一抗（兔抗 Nogo-A，1∶200），37 ℃孵育 1 h 后，4 ℃冰箱过夜。漂洗后入二抗（生物素化山羊抗兔 IgG，1∶200）37 ℃孵育 1 h，三抗（辣根酶标记链霉卵白素，1∶200）37 ℃孵育 1 h，之后硫酸镍铵增强法 DAB 显色。对照试验中，用 PBS 代替一抗。

1.3 切片观察与分析

每组取切片 5 张，用 Image Pro. 5.0 软件分析平均光密度以代表免疫反应强度，Nogo-A 在损伤部位的免疫反应强度表示为：+ + + 强，+ + 中等，+ 弱，- 未检测到表达。同时对阳性细胞进行计数。

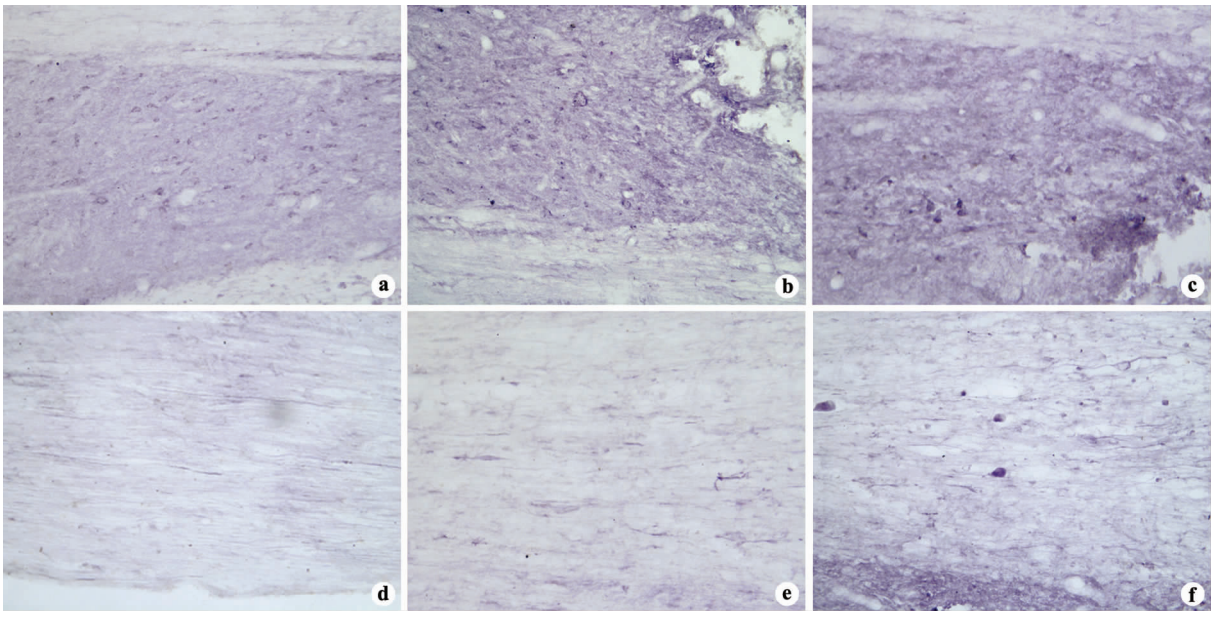
2 结果

2.1 Nogo-A 在脊髓灰质的表达

损伤后 1 h，脊髓灰质损伤部位 Nogo-A 的表达较弱（图 1a）。阳性反应物质主要集中在胞浆。损伤后 12 h，Nogo-A表达明显升高，神经元胞浆呈现中等强度的免疫组化阳性染色，个别细胞突起也可见染色（图 1b）。损伤后 24 h，Nogo-A 表达继续升高，神经元胞浆呈现很强的免疫组化阳性染色，但染色部位仍集中于胞浆，个别突起可见染色（图 1c）。与正常对照和假手术组相比，损伤后 Nogo-A 在脊髓灰质的表达随时间的延长逐渐增强。损伤后不同时间免疫组化强度见表 1。

［作者简介］ 岳 岩（1976－），女，黑龙江省哈尔滨市人，主治医师，主要从事神经损伤修复方面的研究。电话：（010）66736336

［收稿日期］ 2011-03-10 ［修回日期］ 2011-04-06



a:脊髓损伤后 1 h 灰质染色;b:脊髓损伤后 12 h 灰质染色;c 脊髓损伤后 24 h 灰质染色;d:脊髓损伤后 1 h 白质染色;e:脊髓损伤后 12 h 白质染色;f:脊髓损伤后 24 h 白质染色

图 1 小鼠脊髓损伤后不同时间 Nogo-A 免疫组织化学染色(×100)

2.2 Nogo-A 在脊髓白质的表达

损伤后 1 h,脊髓白质损伤部位出现较弱的 Nogo-A 免疫组化染色,染色部位主要集中在神经纤维(图 1d)。损伤后 12 h,Nogo-A 染色强度继续增强,在部分神经纤维一端还有球状膨大出现(图 1e)。损伤后 24 h,Nogo-A 染色进一步增强,阳性染色神经纤维增多,部分纤维增粗,一端呈现球状膨大(图 1f)。同正常对照和假手术组相比,损伤后 Nogo-A 在脊髓白质的表达随时间的延长逐渐增强。损伤后不同时间免疫组化强度见表 1。

表 1 脊髓损伤后不同时间 Nogo-A 的免疫反应强度

部位	1 h		12 h		24 h	
	灰质	白质	灰质	白质	灰质	白质
胞核	-	-	-	-	-	-
胞浆	+	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
突起	+	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +

3 讨论

周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)损伤后能够再生,而 CNS 损伤后却难以再生,这在很大程度上要归因于 CNS 中髓鞘源性抑制蛋白的存在。早在 1988 年,Caroni 等就发现成年哺乳动物的 CNS 与 PNS 存在不同,前者含有一种称为 NI-35/250 的膜蛋白,而该蛋白对轴突再生有很强的抑制作用[6]。2000 年,CNS 再生抑制蛋白 Nogo 的基因被鉴定并克隆[1,5,7]。Nogo 家族包含三种异构体即 Nogo-A, Nogo-B 和 Nogo-C,其中 Nogo-A 被认为就是 NI-35/250。

本实验结果显示,在正常情况下,无论在脊髓的灰质还是白质,Nogo-A 的表达均很弱。但从损伤后 1 h 开始其表达则明显增强,到 24 h(最长观察时间)表达达到高峰。有实验表明在胶质瘢痕形成之前,CNS 的再生抑制效应主要来自于包括 Nogo-A 在内的各种髓鞘抑制蛋白[8]。而本实验也证实,脊髓损伤后 24 h 内,Nogo-A 的表达呈逐渐增强的趋势,提示至少在损伤后 24 h 内,髓鞘抑制蛋白 Nogo-A 在对 CNS 再生的抑制中发挥着重要作用。

作为一种髓鞘抑制蛋白,Nogo-A 本应只在 CNS 的髓鞘形成细胞即少突胶质细胞表达。然而近年来原位杂交发现 Nogo-A mRNA 也表达于成年神经元[4]。本实验中也发现脊髓损伤后,Nogo-A 明显表达于灰质神经元及白质神经纤维。Josephson[9]曾报道 Nogo-A 在发育中的神经元有表达,并且这些神经元轴突的生长并未受到 Nogo-A 的抑制,说明 Nogo-A 在发育中可能具有不同于再生抑制的其他功能,比如对发育神经元轴突的生长起诱导作用。Nogo-A 在正常脊髓神经元中的表达很弱,损伤后无论在少突胶质细胞还是在神经元本身,其表达都明显增强,提示对 CNS 再生起抑制作用的 Nogo-A 不仅来自于少突胶质细胞,也可能来自于神经元自身。另外,Nogo mRNA 也表达于

(下转第 241 页)