神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001019

无镁诱导神经元惊厥样放电后 Lingo-1 对轴突的影响

刘丽鸣，蒋　莉，王　玥，何　蓉，陈恒胜，程　莉

（重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地，重庆　400014）

【摘　要】目的：研究惊厥样神经元模型中含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白结构域的 Nogo 受体作用蛋白（LRR and Ig domain containing，Nogo receptor interacting protein，Lingo-1）对神经元轴突的作用。**方法**：（1）培养 10 d 的皮层神经元，经正常细胞外液处理（正常组）或无镁细胞外液处理（无镁组）后用免疫荧光技术检测神经元轴突变化。（2）以上两种不同处理后 6、12、24、48、72 h 5 个时间点，用 qRT-PCR 及 Western blot 检测神经元中 Lingo-1 表达情况。（3）设计 shRNA 慢病毒抑制 Lingo-1 表达，分为正常组、无镁组、无镁+对照 shRNA 组和无镁+Lingo-1shRNA 组 4 组，用免疫荧光技术检测神经元轴突长度。**结果**：（1）正常组神经元轴突粗壮、轴突间网络连接较致密，神经丝蛋白 200（neurofilament proteins 200，NF200）只在突起表达；无镁组神经元轴突纤细、轴突间网络连接稀疏，NF200 在胞体内高表达。（2）各观察时间点上，无镁组 Lingo-1 的表达量均高于正常组（$P<0.05$）。（3）在神经元轴突长度上：无镁组小于正常组（$P=0.000$），无镁+对照 shRNA 组与无镁组无统计学差异，无镁+Lingo-1shRNA 组大于无镁组+对照 shRNA（$P=0.000$）。**结论**：无镁处理后神经元轴突损伤、Lingo-1 表达升高，抑制 Lingo-1 表达后神经元轴突损伤减轻，说明 Lingo-1 可能参与神经元放电后神经元轴突损伤。

【关键词】Lingo-1；皮层神经元；惊厥；轴突损伤；慢病毒感染

【中图分类号】R748　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-02-03

作者介绍：刘丽鸣，Email：291445171@qq.com，研究方向：惊厥性脑损伤。

通信作者：蒋　莉，Email：dr_jiangli@hotmail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81371452）；重庆市科委自然科学基金重点资助项目（编号：cstc2013jjB0031）；教育部博士点基金资助项目（编号：20125503110011）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20160706.1712.022.html（2016-07-06）

[15] Guardiola-Diaz HM，Ishii A，Bansal R. Erk1/2 MAPK and mTOR signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation[J]. Glia，2012，60(3)：476-486.

[16] 李听松，叶园珍，蒋　莉，等. 幼鼠癫痫发生过程中胼胝体内髓鞘变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2013，35(20)：2177-2180.

[17] During MJ，Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain[J]. Lancet，1993，341(8861)：1607-1610.

[18] Davis KA，Nanga RP，Das S，et al. Glutamate imaging(GluCEST) lateralizes epileptic foci in nonlesional temporal lobe epilepsy[J]. Sci Transl Med，2015，7(309)：309ra161.

[19] Kew JN，Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology[J]. Psychopharmacology(Berl)，2005，179(1)：4-29.

[20] Wake H，Lee PR，Fields RD. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials[J]. Science，2011，333(6049)：1647-1651.

[21] Cavaliere F，Urra O，Alberdi E，et al. Oligodendrocyte differentiation from adult multipotent stem cells is modulated by glutamate[J]. Cell Death Dis，2012(3)：e268.

[22] Li C，Xiao L，Liu X，et al. A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination[J]. Glia，2013，61(5)：732-749.

[23] Pitt D，Werner P，Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis[J]. Nat Med，2000，6(1)：67-70.

[24] Gautier HO，Evans KA，Volbracht K，et al. Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors[J]. Nat Commun，2015(6)：8518.

（责任编辑：冉明会）

Effect of Lingo-1 on axon with Mg^{2+}-free-induced neuron seizure-like discharge

Liu Liming, Jiang Li, Wang Yue, He Rong, Chen Hengsheng, Cheng Li

(Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】***Objective***: To study the effects of Lingo-1 on neuron axon with Mg^{2+}-free-induced seizure-like discharge. ***Methods***: (1) Cortical neurons cultured for 10 d were exposed to normal media(normal group) or Mg^{2+}-free media(Mg^{2+}-free group) for 3 h and the morphology changes of neuron axon were observed with immunofluorescence. (2)The mRNA and protein expressions of Lingo-1 were detected by qRT-PCR and Western blot at 6, 12, 24, 48 and 72 h after Mg^{2+}-free or normal media treatment. (2)The expression of Lingo-1 in neuron was inhibited by lentivirus-mediated RNA. Cortical neurons were divided into normal group, Mg^{2+}-free group, Mg^{2+}-free + control shRNA group and Mg^{2+}-free + Lingo-1shRNA group. The morphology changes of neuron axon were observed and the neuron axon length was detected with immunofluorescence. ***Results***: (1)In normal group, neurons axon was thick and in dense network connection. NF200 only expressed in the neurite. In Mg^{2+}-free group, neurons axon was slender and in sparse network connection. NF200 highly expressed in cell body. (2)From 6 h to 72 h, Lingo-1 expression was increased at each point in Mg^{2+}-free group than in normal group($P<0.05$). (3)Mg^{2+}-free group axon length was shorter than that in normal group($P=0.000$). There was no statistical difference in axon length between Mg^{2+}-free group and Mg^{2+}-free+control shRNA group. Axon length was longer in Mg^{2+}-free+ lentivirus group than in Mg^{2+}-free+control shRNA group($P=0.000$). ***Conclusion***: Lingo-1 may be involved in axon injury after Mg^{2+}-free-induced neuron seizure-like discharge.

【Key words】Lingo-1; cortical neuron; seizure; axonal injury; lentivirus infection

惊厥是小儿时期最常见的神经系统急症，且容易出现严重惊厥和惊厥持续状态(status convulsion, SC)。长时程惊厥或 SC 发作后，可造成选择性海马神经元变性、坏死和神经元脱失的脑损伤[1-2]。神经元死亡后其余神经元无法分裂复制代替死亡的神经元，所以有效预防神经元损伤就显得尤为重要。研究表明含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白结构域的 Nogo 受体作用蛋白(LRR and Ig domain containing, Nogo receptor interacting protein, Lingo-1)对神经元存活及突起的生长起到抑制的作用。但在惊厥性脑损伤后 Lingo-1 表达情况及其对神经元的影响目前研究较少，为此，本研究通过建立惊厥样放电神经元体外模型，对惊厥后神经元 Lingo-1 表达变化及 Lingo-1 对轴突生长的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验采用无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级出生 24 h 以内的 SD 大鼠，雌雄不限，实验所用 SD大鼠均购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基(Hyclone SH30023.01B)，DMEM 高糖培养基(Gibco 8115371)，Neurobasal 培养基(Gibco 21103-049)，B27 培养基添加剂(Gibco 1714376)，L-谷氨酰胺(Sigma G8540)，澳洲胎牛血清(Life 10099-141)，EDTA-胰蛋白酶(Gibco 1676922)，兔抗大鼠单克隆抗 NF200 抗体(Millipore 013M4772)，兔抗大鼠单克隆抗 Lingo-1 抗体(Millipore 07-678)，DAPI(Sigma D9542)，山羊抗兔 FITC 抗体(Life 1616933)，NaCl(Sigma V900058)，KCl 2.5(Sigma V900068)，$CaCl_2$(Sigma V900266)，D-glucose(Sigma G7528)，HEPES(Sigma H3375)，甘氨酸(Sigma GB8200)，$MgCl_2$(Sigma V900020)，反转录(TakaRa AK3201)，qRT-PCR 试剂盒(TakaRa A7602-1)，PVDF 膜(Millipore 162-0177)，BCA 法蛋白定量试剂盒(Thermo scientific 23227)，超敏 ECL 化学发光试剂盒(Bio-Rad 170-5061)。

1.1.3 主要试剂配制 L-谷氨酰胺储存液(100×)：2.923 g L-谷氨酰胺加入 100 ml 0.01 mol/L PBS 中，0.22 μm 除菌器过滤，分装后-20 ℃保存；正常细胞外液(mmol/L)：NaCl 145.0、KCl 2.5、$CaCl_2$ 2.0、D-glucose 13.0、HEPES 10.0、甘氨酸 0.001、$MgCl_2$ 1.0，用 5 mmol/L NaOH 调 pH 值为 7.3，渗透压为 280~320 mmol/L，0.22 μm 除菌器过滤；无镁细胞外液(mmol/L)：NaCl 145.0、KCl 2.5、$CaCl_2$ 2.0、D-glucose 13.0、HEPES 10.0、甘氨酸 0.001，用 5 mmol/L NaOH 调 pH 值为 7.3，渗透压为 280~320 mmol/L，0.22 μm 除菌器过滤；接种培养基配制：DMEM/F12 培养基+10%澳洲胎牛血清；无血清培养基配制：Neurobasal 培养基+2% B27+1% L-谷氨酰胺。

1.2 方法

1.2.1 新生鼠大脑皮层神经元的体外分离培养及鉴定 (1)新生鼠大脑皮层神经元原代培养：取 24 h 以内 SD 新生鼠，生物安全柜内钝性分离皮层，取顶叶皮层组织，剔除脑膜，将组织剪成 1 mm^3 小块，0.125% EDTA-胰蛋白酶 37 ℃消化 15 min，200 目不锈钢筛网过滤，滤液以 4 ℃、800 r/min 离心 5 min，用 Count Star 自动计数，用接种培养基以 8×10^5 个/孔种植到多聚赖氨酸处理过的 6 孔培养板中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，4 h 后培养基全量换为无血清培养基，每 3 d无血清培养基半量换液。(2)免疫荧光鉴定新生鼠大脑皮层原代神经元：取培养至 10 d 的正常神经元细胞爬片，用神经元神经丝蛋白(neurofilament protein，NF)200 抗体结合山羊抗兔 CY3 行免疫荧光实验。

1.2.2 膜片钳技术记录皮层神经元动作电位操作步骤 取培养 10 d 皮层神经元，去除培养基，分别用正常细胞外液和无镁细胞外液处理 3 h，后恢复无血清培养基继续培养。3~6 h 后采用 Muticlamp-700B 膜片钳系统进行全细胞模式动作电位记录。用 pCLAMP10.3 软件分析动作电位发放频率，比较 2 组的差别。

1.2.3 免疫荧光标记 NF200 的表达 取正常细胞外液或无镁细胞外液处理后 2~3 d 的细胞爬片，4%多聚甲醛固定，0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，10%牛血清白蛋白及 10% TritonX-100 封闭 15 min，一抗兔抗大鼠 NF200(1:500)4 ℃孵育过夜，0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，二抗山羊抗兔 CY3 抗体(1:500)室温孵育 1 h，0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，DAPI 染核(1:5 000)15 min，再经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，抗荧光淬灭封片液封片，在免疫荧光显微镜下照片[3]。

1.2.4 总 RNA 提取、反转录反应和 qRT-PCR (1)总 RNA 提取：收集两组各时间点细胞，用 Bioteke 试剂盒提取总RNA，紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度和纯度，$A_{260\ nm/280\ nm}$ 比值均在 1.8~2.0 之间。(2)反转录反应：提取两组各时间点总RNA，用 TakaRa 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA，-20 ℃保存。(3)qRT-PCR：使用 SYBR Green PCR 试剂盒(TakaRa)，PCR 反应体系组成为 SYBR Premix EX Taq Ⅱ 12.5 μl、引物 2 μl、cDNA2 μl 和灭菌蒸馏水 8.5 μl，总体积 25 μl，引物序列见表 1。应用 CFX96 Real-Time System 检测 Lingo-1 表达情况。反应条件：95 ℃ 30 s，95 ℃5 s，57.6 ℃ 30 s，共 40 个循环。每组做 3 个复孔。其中 GAPDH 作为“看家基因”监控总 RNA 使用量，以消除不同样本间的加样误差。

表 1 Lingo-1 和 GAPDH 引物序列

Tab.1 Sequences of Lingo-1 and GAPDH

基因	基因序列	温度(℃)	扩增片段长度(bp)
Lingo-1	上游：5'-CCATCAACCCAACAAGACCT -3'	57.6	188
	下游：3'-CCATAGAAACAGCAGCACCA-5'		
GAPDH	上游：5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'	58.5	204
	下游：3'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-5'		

1.2.5 Western blot 测定皮层神经元 Lingo-1 表达 用全蛋白提取试剂盒提取两组各时间点细胞蛋白，BCA 法测定细胞蛋白浓度后行蛋白免疫印迹实验测定 Lingo-1 表达水平，用 Image J 软件分析 2 组各时间点 Lingo-1 级内参的灰度值，Lingo-1 水平用 Lingo-1/β-actin 的比值表示。

1.2.6 慢病毒感染皮层神经元沉默 Lingo-1 表达 分为正常组、对照 shRNA 组和 Lingo-1 shRNA 组 3 组，将携带 Lingo-1 shRNA 的慢病毒(5'-CCTTCGCCTTCATCTCCAA-3')或对照 shRNA 的慢病毒(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3')以 MOI=1(MOI=病毒个数/细胞个数)的浓度感染神经元，病毒孵育 6 h 后恢复正常培养基继续培养；3 d 后用 Western blot 检测 3 组 Lingo-1 的表达。

1.2.7 慢病毒感染后神经元轴突变化 分为正常组、无镁组、无镁+对照 shRNA 组和无镁+Lingo-1shRNA 组 4 组，无镁+Lingo-1shRNA 组和无镁+对照 shRNA 组为慢病毒感染培养至 4 d 神经元，病毒感染后 1 d 对神经元进行无镁细胞外液处理；正常组和无镁组于第 5 天进行处理，处理方法同前；细胞培养至 7 d 时用 NF200 抗体进行免疫荧光检测神经元轴突，NIS-Viewer 软件对进行神经元轴突长度测量。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析，数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组比较采用 LSD-t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐者采用 Turkey 法，方差不齐者采用 Dunnett's T3(3)法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 原代培养新生鼠皮层神经元的鉴定

用神经元特异性 NF200 抗体对培养至第 10 天正常神经元进行免疫荧光，DAPI 标记所用的细胞核，NF200 只标记神经元，对即标记 NF200 又标记 DAPI 的细胞认为是神经元，只标记 DAPI 的细胞认为是胶质细胞，如图 1 所示：NF200 阳性细胞百分比达 90%，说明培养的细胞绝大多数是神经元。



A. 光学显微镜下　　B. 荧光显微镜下(NF200-红色荧光，DAPI-蓝色荧光)

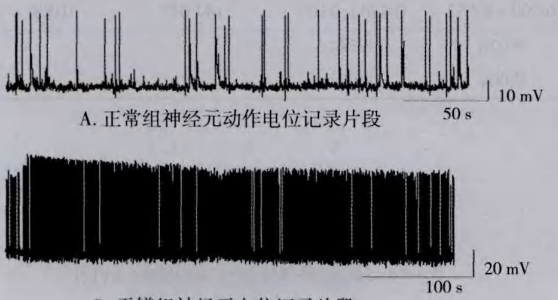
图 1 培养 10 d 皮层神经元照片(200×)

Fig.1 Photographs of 10-day cultured cortical neuron(200×)

2.2 无镁细胞外液处理后神经元放电记录

应用膜片钳技术记录神经元不同处理下动作电位频率情况，每组记录 8 个皮层神经元细胞，图 2 表 2 显示神经元

的记录结果。结果显示：无镁细胞外液处理后神经元放电形式为强直性放电，放电频率（1.35 ± 0.95）Hz 明显高于正常细胞外液处理后神经元动作电位频率（6.23 ± 2.55）Hz，从而确定无镁细胞外液诱导神经元惊厥样放电模型成功建立。



A. 正常组神经元动作电位记录片段

B. 无镁组神经元电位记录片段

图 2 膜片钳记录 2 组神经元动作电位结果

Fig.2 Action potential of neuron in two groups detected by patch-clamp

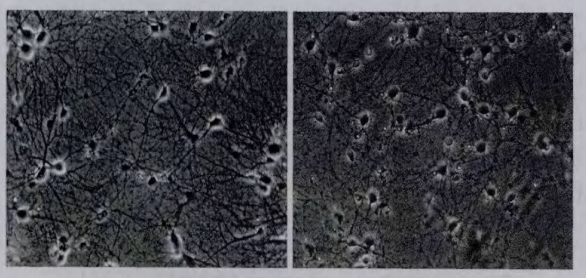
表 2 2 组神经元动作电位频率

Tab.2 Action potential frequency of neuron in two groups

组别	n	频率（Hz）
正常组	8	1.35 ± 0.95
无镁组	8	6.23 ± 2.55
t 值		5.073
P 值		0.000

2.3 神经元轴突变化

2.3.1 光学显微镜下神经元轴突变化 在无镁细胞外液处理神经元 2 d 后，发现轴突有结节样改变、纤细、轴突间网络连接稀疏，细胞背景有碎片（见图 3B）；而同一时间下，正常组神经元轴突光滑、粗壮、轴突间网络连接较致密，细胞背景干净（见图 3A）；说明无镁细胞外液处理后神经元轴突有损伤。



A. 正常组 B. 无镁组

图 3 光学显微镜下神经元轴突形态变化（200×）

Fig.3 Morphological changes of neuron axon under optical microscope（200×）

2.3.2 荧光显微镜下神经元轴突变化 NF200 抗体对无镁处理后 2 d 的神经元轴突进行免疫荧光，结果显示正常组 NF200 只在神经元突起表达，在胞体内很少或无表达；而无镁组 NF200 不仅在神经元突起表达，胞体内也有表达，且在胞体内高表达（见图 4）。

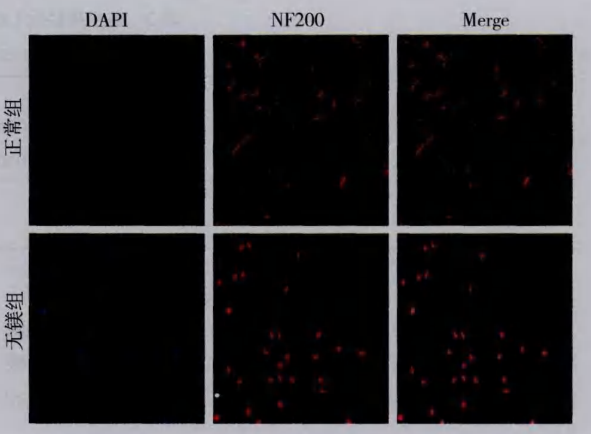
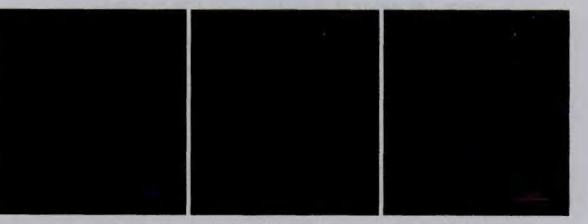


图 4 荧光显微镜下 2 组神经元轴突形态变化（200×）

Fig.4 Morphological changes of neuron axon under fluorescence microscope（200×）

2.4 Lingo-1 在神经元上的表达

2.4.1 免疫荧光鉴定 Lingo-1 在神经元上的表达及分布 用 Lingo-1 抗体对培养 10 d 的神经元进行免疫荧光，结果显示 Lingo-1 在神经元胞内和突起都有表达，证明 Lingo-1 在神经元上有表达（见图 5）。

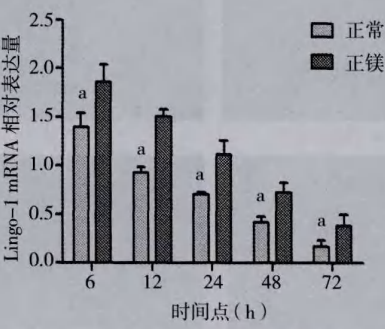


A. DAPI B. Lingo-1 C. Merge

图 5 皮层神经元中 Lingo-1 表达分布（200×）

Fig.5 Distribution of Lingo-1 in cortical neuron（200×）

2.4.2 qRT-PCR 检测 2 组 Lingo-1 mRNA 结果 处理后 6 h 至72 h 各观察时间点上，2 组均存在 Lingo-1 mRNA 表达随观察时间延长而降低的现象（P=0.000），且在各时间点上无镁组 Lingo-1 mRNA 的表达量均高于正常组（P<0.05）（见图6）。



a：同一时间点上 2 组间有统计学差异

图 6 qRT-PCR 检测 Lingo-1 mRNA 的表达

Fig.6 Lingo-1 mRNA expression detected by qRT-PCR

表 3　各组神经元 Lingo-1 表达量灰度值（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3　Lingo-1 protein expression in neuron among the groups（$\bar{x} \pm s$）

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
正常组	1.070 ± 0.096	0.840 ± 0.014	0.640 ± 0.016	0.400 ± 0.020	0.270 ± 0.023	1 066.872	0.000
无镁组	1.370 ± 0.057	0.970 ± 0.071	0.790 ± 0.050	0.590 ± 0.052	0.420 ± 0.021	144.047	0.000
t 值	8.733	2.985	5.035	5.926	8.544		
P 值	0.001	0.041	0.007	0.004	0.001		

2.4.3　Western blot 检测两组 Lingo-1 蛋白结果　处理后 6 h 至 72 h 的各观察时间点上，2 组均存在 Lingo-1 蛋白表达随观察时间延长而降低的现象，但在此观察的各时间点上无镁组 Lingo-1 蛋白的表达量均高于正常组（P<0.05）（见表 3 和图 7）。

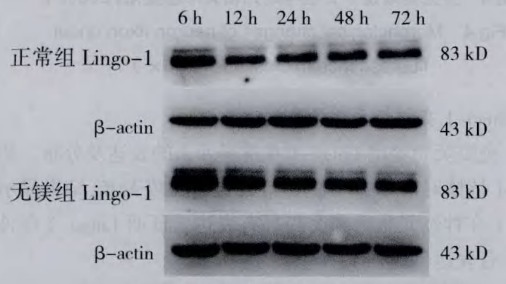


图 7　蛋白免疫印迹检测 Lingo-1 蛋白的表达

Fig.7　Lingo-1 protein expression detected by Western blot

2.5　慢病毒介导的 shRNA 干扰技术沉默神经元中 Lingo-1 基因的表达

2.5.1　Western blot 检测慢病毒介导的 shRNA 对 Lingo-1 基因的抑制效应　预实验中得出以 MOI=1 的病毒量感染神经元效果较好；荧光显微镜下观察神经元表达荧光蛋白来判断慢病毒成功感染神经元，如图 8 所示分别为慢病毒感染神经元后 2、3、4、6 d 的图片。慢病毒感染神经元 3 d 后应用 Western blot 检测显示，正常组与对照 shRNA 组 Lingo-1 表达量无统计学差异，与对照 shRNA 组相比，表达 Lingo-1 shRNA 的慢病毒具显著抑制神经元中 Lingo-1 蛋白的作用（P=0.000）（见图 9）。

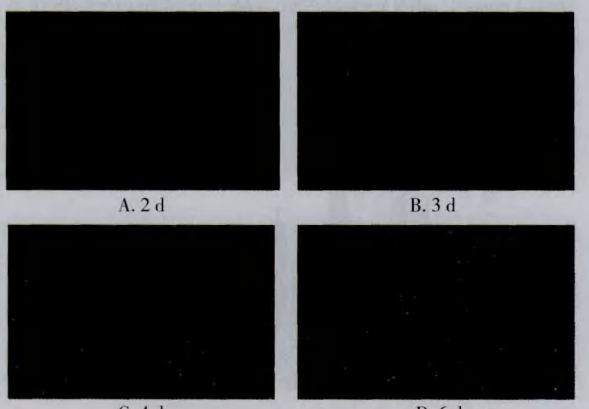
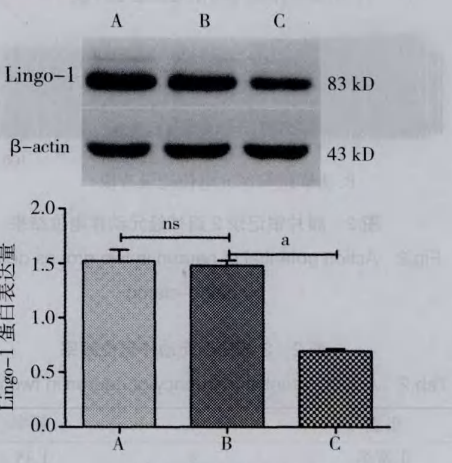


图 8　荧光显微镜下观察慢病毒感染神经元图片

Fig.8　Lentivirus infected neurons observed by inverted fluorescence microscope fluorescence



ns：无统计学差异；a：P=0.000

A：正常组；B：对照 shRNA 组；C：Lingo-1 shRNA 组

图 9　免疫印迹检测慢病毒感染神经元 3 d 后 Lingo-1 的蛋白水平

Fig.9　Lingo-1 detected by Westen blot after lentivirus infecting neurons for 3 days

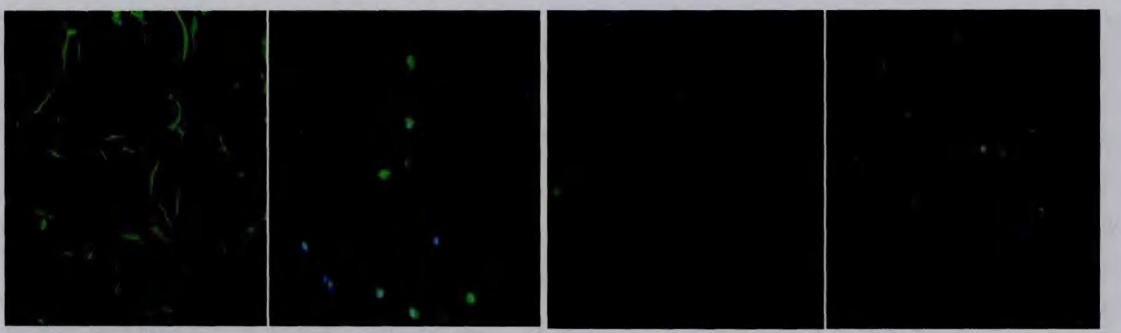
2.5.2　免疫荧光检测慢病毒感染神经元后神经元轴突的变化　选用 NF200 对神经元突起进行标记，依据神经元中树突较多，粗而短，反复分支，逐渐变细，而轴突一般只有 1 条，细长均匀，中途分支较少，从而对各组细胞进行染色观察轴突变化。结果（图 10 和表 4）示：正常组神经元轴突的平均长度明显高于无镁组（P=0.000）说明无镁组神经元轴突受损；而无镁组和无镁+对照 shRNA 组神经元轴突平均长度在统计学上无差异，说明慢病毒本身对神经元轴突没有影响；无镁+Lingo-1 shRNA 组神经轴突平均长度明显高于无镁+对照 shRNA 组（P=0.000），说明抑制 Lingo-1 后促进神经元轴突损伤的恢复。

表 4　各组神经元轴突长度（$\bar{x} \pm s$）

Tab.4　Length of axon among the groups（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	轴突长度（μm）
正常组	18	161.55 ± 33.66
无镁组	18	49.80 ± 17.70[a]
无镁 + 对照 shRNA 组	18	56.62 ± 17.35[b]
无镁 +Lingo-1shRNA 组	18	104.60 ± 9.38[c]
F 值		104.897
P 值		0.000

注：a，与正常组相比，P=0.000；b：与无镁组相比，P=0.808；c：与无镁 + 对照组相比，P=0.000



A. 正常组　B. 无镁组　C. 无镁 + 对照 shRNA 组　D. 无镁 + Lingo-1 shRNA 组

图 10　免疫荧光检测各组神经元轴突长度（200×，NF200- 绿色，DAPI- 蓝色）

Fig.10　the length of axon detected by Immunofluorescence（200×，NF200-green，DAPI-blue）

3　讨　论

婴儿及儿童期惊厥多起源于大脑皮层，因此皮层神经元更适合研究发育中脑的惊厥活动[4-5]。本实验研究采用 Sombati 等人的实验方法[6]，利用无镁细胞外液模拟“惊厥微环境”，对培养 10 d 的皮层神经元经无镁细胞外液处理后，神经元可出现反复自发性惊厥样放电，证明成功建立了惊厥样神经元模型。本研究发现，体外培养 10 d 神经元可形成丰富的网络结构，神经元胞体折光性好，突起粗壮；经无镁细胞外液处理后继续正常培养基培养，神经元之间的网络结构逐渐变得稀疏，单个神经元突起变细且有串珠样改变，说明无镁细胞外液处理后存在神经元及其轴突损伤。NF200 是一种神经丝蛋白，是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成分，在维护神经元的功能和轴浆转运等一系列与脊髓损伤修复相关的病理生理变化中发挥着重要作用[7]。有研究报道，NF200 在正常情况下只存在于轴索中，而胞体不含或很少含有，故正常时 NF200 染色，胞体为阴性。当神经元细胞受到损伤时，在多种诱导因子的作用下，开始大量合成及积存 NF200，以适应神经再生的需要。NF200 积存于胞体内而使胞体着色[8-9]。本研究中也发现类似现象，正常神经元中 NF200 绝大多数表达于突起且突起粗壮，而无镁处理后神经元中胞体内表达大量 NF200，突起较细，这进一步说明无镁细胞外液处理后神经元轴突有损伤。

近十年，Lingo-1 在神经系统疾病中的作用越来越受到关注[10]。Mi 等[11]首先在脑内神经元上发现 Lingo-1，是特异表达于中枢神经系统的一种跨膜蛋白；在大鼠脑内，Lingo-1 在皮层表达水平最高，脊髓表达水平最低，Lingo-1 在出生后 1 d 表达水平达到峰值，此后逐渐减少，至成年期达到稳定水平。本研究也证实了 Lingo-1 在神经元胞体和突起都有表达，正常组不同时间点应用荧光定量 PCR 检测 Lingo-1 mRNA 及蛋白免疫印迹检测 Lingo-1 蛋白，均发现 Lingo-1 表达量随时间增加呈降低趋势，这与文献报道一致。本研究发现，无论在分子水平还是在蛋白水平，无镁组各时间点 Lingo-1 表达量比正常组对应时间点 Lingo-1 表达量高，即无镁细胞外液处理后神经元中 Lingo-1 表达升高。大量体内外实验证实，Lingo-1 与 NgR/p75NTR 或 NgR/TROY 形成三聚体复合物，且 Lingo-1 发挥着决定性的作用[11-14]。该复合物可与轴突生长抑制因子、髓磷脂相关糖蛋白和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白等髓磷脂抑制因子结合并激活 RhoA，使细胞骨架动力学改变引起神经元内的生长锥溃变，从而抑制神经轴突的生长[10,15-16]。本研究中无镁细胞外液处理后神经元轴突损伤，Lingo-1 表达升高，提示 Lingo-1 有可能参与轴突损伤的形成。

神经元及其轴突担负了在结构上构建神经网络，在功能上生成和传递神经信号的作用，轴突损伤会严重影响神经元的正常功能。本研究中无镁细胞外液处理后神经元轴突受损，结合 Lingo-1 表达升高，遂用慢病毒感染神经元抑制 Lingo-1 表达，进一步研究 Lingo-1 与轴突损伤的关系，研究发现无镁组神经元轴突长度显著小于正常组神经元轴突长度，但抑制无镁组神经元中 Lingo-1 的表达后，无镁+Lingo-1shRNA 组神经元轴突长度明显大于无

镁+对照 shRNA 组神经元轴突长度，说明在惊厥样神经元模型中，抑制 Lingo-1 表达后可促进神经元轴突生长。目前国内外也有关于 Lingo-1 可抑制神经元突起生长且抑制 Lingo-1 表达后促进神经元轴突再生及功能恢复的实验报道，Lü 等[17]发现 Lingo-1 多克隆抗血清能显著改善脊髓损伤后增加的神经元存活率，同时对下肢运动功能的恢复有一定程度的帮助。张永杰等[18]研究发现，抗 Lingo-1 抗体不仅能够促进运动纤维的再生，还可有效抑制上行感觉纤维的萎缩，促进损伤脊髓节段以下的纤维重建，从而改善肢体功能。Inoue 等[19]在帕金森疾病研究中发现，动物模型中 Lingo-1 表达升高，应用基因敲除术敲除 Lingo-1 表达后可促进多巴胺神经元存活及减少动物的异常行为，体外研究时通过慢病毒载体运用 RNA 干扰技术下调多巴胺神经元中的 Lingo-1 含量，能促进神经元突起的生长。Ji 等[20]对脊髓损伤的研究中发现，Lingo-1-Fc 拮抗 Lingo-1 的功能后可促进轴突生长及功能恢复。

综上所述，本研究在证实惊厥样神经元轴突损伤及 Lino-1 表达上调的基础上，发现轴突损伤可能与 Lingo-1 的表达上调有关。有效修复神经元轴突损伤可减少神经元丢失，这为惊厥性脑损伤的治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

[1] Lado FA, Laureta EC, Moshe SL. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature[J]. Epileptic Didord, 2002, 4(2): 83-97.

[2] 蒋 莉，蔡方成，李 欣，等. 惊厥持续状态中大鼠脑内神经元死亡的年龄特征[J]. 中华儿科杂志，2002，40(9)：545-549.

[3] Tohda C, Matsumoto N, Zou K, et al. Abeta(25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, a metabolite of protopanaxadiol-type saponins[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(5): 860-868.

[4] Wong M, Yamada KA. Developmental characteristics of epileptiform activity in immature rat neocortex: a comparison of four in vitro seizure models[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 128(2): 113-120.

[5] 曹海燕，姜玉武. 无镁诱导培养的大鼠皮层神经元癫痫样放电[J]. 北京大学学报，2002，34(3)：237-241.

[6] Sombati S, Delorenzo RJ. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture[J]. J Neurophysiol, 1995, 73(4): 1706-1711.

[7] Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al. Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2002, 27(5): 480-486.

[8] Yabe JT, Wang FS, Chylinski T, et al. Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2001, 50(1): 1-12.

[9] Brook GA, Plate D, Franzen R, et al. Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat[J]. Neurosci Res, 1998, 53(1): 51-65.

[10] Andrews JL, Fernandez-Enright F. A decade from discovery to therapy: Lingo-1, the dark horse in neurological and psychiatric disorders [J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2015(56): 97-114.

[11] Mi S, Lee XH, Shao ZH, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptorp75 signaling complex[J]. Nature Neuroscience, 2004, 7(3): 221-228.

[12] Shao Z, Browning JL, Lee X, et al. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration.[J]. Neuron, 2005, 45(3): 353-359.

[13] Park JB, Yiu GS, Wang J, et al. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors[J]. Neuron, 2005, 45(3): 345-351.

[14] Barker PA. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights[J]. Neuron, 2004, 42(4): 529-533.

[15] Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(9): 703-713.

[16] He Z, Koprivica V. The Nogo signaling pathway for regeneration block.[J]. Annual Review of Neuroscience, 2004, 27(27): 341-368.

[17] Lü J, Xu RX, Jiang XD, et al. Passive immunization with Lingo-1 polyclonal antiserum afforded neuron protection and promoted functional recovery in a rat model of spinal cord injury[J]. Neuroimmunomodulation, 2010, 17(4): 270-278.

[18] 张永杰，左国平，唐敏峰，等. 抗 Lingo-1 抗体可促进小鼠脊髓损伤后运动纤维再生及抑制感觉纤维萎缩[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2012，32(12)：1629-1634.

[19] Inoue H, Lin L, Lee XH, et al. Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models[J]. PNAS, 2007, 104(36): 14430-14435.

[20] Ji B, Li M, Wu WT, et al. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury [J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 33(3): 311-320.

（责任编辑：张辉洁）