

# Nogo-66 受体 mRNA 在成年大鼠视神经中的表达及意义

陈春林 叶剑 张巍

**【摘要】** 目的 观察 Nogo-66 受体(NgR)mRNA 在成年大鼠视神经的表达并探讨其意义。 方法 取 8 只成年大鼠视神经及坐骨神经,将拟杂交的组织切片分为 3 组:视神经实验组、坐骨神经对照组、视神经阴性对照组。采用原位杂交技术观察 NgR mRNA 在视神经和坐骨神经中的表达。 结果 大鼠视神经切片中 NgR mRNA 均表达阳性,阳性信号沿视神经长轴排列;所有大鼠坐骨神经切片中 NgR mRNA 的表达均为阴性。 结论 在成年大鼠视神经中 NgR mRNA 广泛表达,而坐骨神经中不表达,提示 NgR 阳性表达及分布与视神经再生能力低下密切相关。

**【关键词】** 视神经/免疫学; 坐骨神经/免疫学; 神经再生; 基因表达

中图分类号:R446.9 R774.6

**Expression and significance of NgR mRNA in adult rats' optic nerve** CHEN Chun-lin, YE Jian, ZHANG Wei. *Ophthalmology Department, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China*

Corresponding author: YE Jian, Email: a68810035@public.cta.cq.cn

**【Abstract】 Objective** To observe and evaluate the expression and significance of Nogo-66 receptor (NgR) mRNA in adult rats' optic nerve. **Methods** Optic and sciatic nerves of 8 adult rats were used to make the sections, which were divided into 3 groups: optic-nerve experimental group, sciatic-nerve control group, and optic-nerve negative control group. In situ hybridization was used to observe the expression of NgR mRNA in optic nerve and sciatic nerve. **Results** The expression of NgR mRNA in the 8 rats was positive in optic nerve and negative in sciatic nerve. The positive signals were arranged along the long axis of optic nerve. **Conclusion** The expression of NgR mRNA is positive in optic nerve while negative in sciatic nerve in adult rats, which suggests that the positive expression and distribution of NgR may be related to the poor regenerate ability of optic nerves.

**【Key words】** Optic nerve/immunology; Sciatic nerve/immunology; Nerve regeneration; Gene expression

近十多年的研究发现,哺乳动物中枢神经损伤后再生困难的一个重要原因是由于其所处的微环境中存在着生长抑制因子,如 Nogo-A 等,它是通过其受体(NgR)来发挥轴突生长抑制作用的<sup>[1]</sup>。NgR 在中枢神经系统中分布广泛,灰质中含量较高,大脑皮层、海马、脑桥、小脑浦肯野细胞也有分布。外周组织中,只有心脏和肾脏有极少量的分布<sup>[1]</sup>。视神经作为中枢神经系统的一部分,其损伤后难以再生是否也因为其中有 NgR 的存在,从而介导了这种抑制作用?为解决这个问题,我们采用原位杂交技术观察了 NgR mRNA 在视神经和坐骨神经的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选用 8~10 周龄 Wistar 大鼠 8 只,体重 200~250 g,雌雄不限,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%戊巴比妥钠 6~8 ml 按 30 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉大鼠。开胸行左心室插管,剪开右心房,生理盐水灌注至流出液基本清亮为止,4%多聚甲醛溶液 150 ml 持续灌注 20 min,室温放置 2 h 后,分别取视神经和坐骨神经置于 4%多聚甲醛溶液内,4℃冰箱固定 8 h,30%蔗糖水溶液中脱水 12 h 后行冰冻切片(厚度 16 μm)。为防止 RNA 酶污染,所有容器和玻片均经高温烘烤或经 0.1%的焦碳酸二乙酯(DEPC)处理,所用的生理盐水、多聚甲醛、蔗糖、蒸馏水、标准柠檬酸盐溶液(SSC)均由 0.1%的 DEPC 处理水配制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270458);全军十五课题项目(01MA175)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科  
通讯作者:叶剑,Email: a68810035@public.cta.cq.cn

## 1.2 NgR mRNA 表达观察

**1.2.1 探针制备** 采用 Vector NTI6.0 程序,从 NgR 基因序列中筛选出特定序列的寡核苷酸探针:5'-ACAACCCCTGGGTGTGTGACTGCAGGGCAC-3',将该段探针序列与 Genbank 中 NgR 基因的序列进行比较,探针序列能与 NgR 基因特异结合。由武汉博士德公司合成上述探针,采用寡核苷酸酶促加尾标记法进行地高辛标记。

**1.2.2 原位杂交实验** 参照文献[2]的方法进行原位杂交实验。将拟杂交的组织切片分为 3 组:视神经实验组、坐骨神经对照组、视神经阴性对照组(不加 NgR 探针,余步骤均相同)。杂交过程如下:(1)杂交前处理:过氧化氢处理冰冻切片 30 min,以灭活内源性过氧化物酶,DEPC 处理蒸馏水洗涤 3 次,每次 2 min;(2)预杂交:38~42℃水浴箱中预杂交 3 h[预杂交液:50%去离子甲酰胺,5 倍 SSC,5 倍 Denhardt 液,2%十二烷基硫酸钠(SDS),1 μg/ml 变性鲑精 DNA];(3)杂交:每张切片加杂交液[杂交液:上述预杂交液中加入 10%硫酸葡聚糖,0.1 mg/ml polyA,5 μg/ml poly(dA)及 1 μg/ml 的地高辛标记的 NgR 寡核苷酸探针]20 μl,盖上硅化的盖玻片,38~42℃杂交 16 h;(4)杂交后洗涤:2 倍 SSC 洗涤 3 次,每次 5 min,1 倍 SSC 洗涤 3 次,每次 5 min,0.5 倍 SSC 洗涤 2 次,每次 15 min;(5)滴加封闭液:37℃下放置 60 min;(6)滴加生物素化鼠抗地高辛:37℃孵育 60 min,0.5 mol/l 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 4 次,每次 5 min;(7)滴加链霉亲和素复合物(SABC):37℃孵育 20 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;(8)滴加生物素化过氧化物酶:37℃孵育 20 min,PBS 洗涤 4 次,每次 5 min;(9)二氨基苯胺(DAB)显色:使用 DAB 显色试剂盒,1 ml 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各一滴,混匀,加至标本上显色约

30 min(显微镜下控制显色时间),充分水洗;(10)酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

**1.2.3 NgR mRNA 阳性的判断标准** 参照博士德公司的 NgR 原位杂交检测试剂盒说明书,采用 DAB(黄色)显色试剂盒,组织切片中染色呈棕黄色者为 NgR mRNA 表达阳性颗粒。

## 2 结果

实验组中 NgR mRNA 表达阳性,视神经可见明显的杂交信号,阳性信号与神经纤维走行一致,沿视神经长轴方向呈串珠样排列(图 1);未加 NgR 探针的视神经阴性对照组中,无明显的杂交信号,仅有少许的非特异性染色(图 2);坐骨神经组中除背景少许的非特异性染色外,也无明显的杂交信号(图 3)。

## 3 讨论

长期以来,中枢神经的再生一直是困扰人们的难题。2000 年,3 个实验室(美国、瑞士、英国)同时报道了抑制神经再生基因——Nogo 基因<sup>[3-5]</sup>。Nogo 基因的成功克隆是发现神经生长抑制因子 10 余年来首次重大突破,给中枢神经再生的研究带来了新的希望。Nogo 基因转录三种蛋白,即 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C, Nogo-A 主要表达于脑、脊髓和视神经,具有强烈的神经再生抑制作用<sup>[6]</sup>。Nogo 是如何发挥其再生抑制作用的呢? 2001 年 Fournier 等<sup>[1]</sup>通过筛选小鼠脑的 cDNA 文库,发现了 Nogo-A 的受体——NgR, GrandPre 等<sup>[7]</sup>用 NgR 的竞争性拮抗剂 NEP1-40,成功地阻断了 Nogo-A 对中枢神经再生的抑制作用。NgR 主要表达于中枢神经元胞体和轴突<sup>[8,9]</sup>, Josephson 等<sup>[9]</sup>通过原位杂交表明:在成年鼠体内, NgR mRNA 活性在新皮质、海马、丘脑核、脑干、小脑



图 1 视神经实验组大鼠视神经切片光学显微镜像。视神经中可见 NgR mRNA 阳性表达 DAB ×100 图 2 视神经阴性对照组大鼠视神经切片光学显微镜像。无 NgR mRNA 阳性表达 DAB ×400 图 3 坐骨神经对照组大鼠视神经切片光学显微镜像。无 NgR mRNA 阳性表达 DAB ×400

Fig. 1 Photograph of light microscope of the section of optic nerve in optic-nerve experimental group. Positive expression of NgR mRNA in optic nerve DAB ×100 Fig. 2 Photograph of light microscope of the section of optic nerve in optic-nerve negative control group. No positive expression of NgR mRNA DAB ×400 Fig. 3 Photograph of light microscope of the section of sciatic nerve in sciatic-nerve control group. No positive expression of NgR mRNA DAB ×400

的颗粒细胞层等神经元中有强烈的表达,那么,视神经作为中枢神经的一部分,其中是否存在 NgR 表达呢?为明确此问题,我们采用相关的特定序列探针,对视神经和坐骨神经进行原位杂交,结果表明,视神经中 NgR mRNA 广泛表达,而坐骨神经中则无表达,这一分布特点与视神经再生能力低下的特征相符合,提示 NgR 介导的抑制途径可能是视神经损伤后难以再生的一个原因,这一推测已被最近发表的文献证实<sup>[10]</sup>。本实验结果证实 NgR mRNA 在视神经组织中表达,这为寻找 NgR 的阻断剂、促进视神经损伤修复提供了实验依据。NgR 在视神经上的广泛存在及其对神经再生抑制作用的证实<sup>[10]</sup>,为新的阻断剂的发现和药物促进视神经再生带来了新的希望。

#### 4 参考文献

- 1 Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration.

- Nature, 2001, 409: 341-346.
- 2 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术. 北京:人民军医出版社, 2003. 177-190.
- 3 Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. Nature, 2000, 403: 434-439.
- 4 GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulin protein. Nature, 2000, 403: 439-444.
- 5 Prinjha R, Moore SE, Vinson M, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. Nature, 2000, 403: 383-384.
- 6 叶剑, 王正国, 朱佩芳. Nogo-A mRNA 在大鼠神经组织中的表达和定位. 中华医学杂志, 2002, 82: 498-500.
- 7 GrandPre T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. Nature, 2002, 417: 547-551.
- 8 Wang X, Chun SJ, Treloar H, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. J Neurosci, 2002, 22: 5505-5515.
- 9 Josephson A, Trifunovski A, Widmer HR. Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. J Comp Neurol, 2002, 53: 292-304.
- 10 Fischer D, He Z, Benowitz LJ. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. J Neurosci, 2004, 24: 1646-1651.

(收稿日期:2004-06-11)

(本文编辑:朱敏)

## 读者·作者·编者

### 中华医学会系列杂志对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计应交待属于前瞻性、回顾性或横断面调查研究;实验设计应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等;临床试验设计应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等。主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用  $M(Q_R)$  表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:对  $P$  值小于或等于检验水准(一般为 0.05)的情况,一律描述为“差异有统计学意义”,同时写明  $P$  的具体数值或相应的不等式;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$  等),应尽可能给出具体的  $P$  值(如: $P=0.238$ );当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 置信区间。

## 广告目次

爱尔康(中国)眼科产品有限公司(封二)  
沈阳市兴齐制药有限责任公司(插页)  
北京诺华制药有限公司(插页)  
扬州亨利医疗器械有限公司(插页)  
蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司(插页)  
北京紫竹药业有限公司(插页)

青岛立康医药有限公司(插页)  
福州福达光电设备有限公司(插页)  
北京欣明仁医疗器械技术有限公司(插页)  
北京高视远望科技有限公司(插页)  
广东众生药业股份有限公司(封三)  
重庆泰克医电仪器产业有限公司(封底)