

· 实验研究 ·

NgR 在新生大鼠少突胶质前体细胞系的表达和缺氧缺血后变化的意义

唐军,姚裕家,钟琳

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 观察 NgR 在新生大鼠少突胶质前体细胞系 (OLPs) 的表达和细胞定位,以及缺氧缺血 (OGD) 损伤后的表达变化,探讨其在 OLPs 损伤后再生抑制中的作用。方法 采用改良振荡分离纯化法体外培养 OLPs,采用其特异性抗体 A2B5、O4 和 O1 作细胞鉴定;用 NgR 抗体检测其在 OLPs 表达。用含连二亚硫酸钠的无糖培养基制作 OLPs OGD 模型,MTT 法检测各组细胞存活率;用免疫荧光法和免疫印迹法观察 NgR 在细胞 OGD 后的变化。结果 OLPs 在分离纯化培养后的第 1、2 和 4 天均表达 NgR,阳性表达位于胞体及突起;细胞 OGD 后 10 min,NgR 表达出现增强,30 min 后明显升高,与对照组比较差异具有显著性 (均 $P < 0.05$);MTT 结果显示,OGD 30 min,细胞存活率较对照组显著降低 ($P < 0.05$)。结论 OLPs 胞体及突起上均表达 NgR;OGD 后 NgR 表达明显增强,细胞存活率显著降低,提示 NgR 可能参与 OGD 后 OLPs 的再生抑制过程。 [中国当代儿科杂志,2007,9(5):445-448]

[关键词] NgR;少突胶质前体细胞;细胞培养;缺氧缺血损伤;再生抑制;新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2007)05-0445-04

NgR expression in oligodendrocyte precursor cells and its changes after oxygen & glucose deprivation in neonatal rats

TANG Jun, YAO Yu-Jia, ZHONG Lin. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Chengdu 610041, China (Yao Y-J, Email: yujiayao9910@126.com)

Abstract; Objective This study examined the NgR expression in oligodendrocyte precursor cells (OLPs) and its changes after oxygen & glucose deprivation (OGD) in order to explore the role of NgR expression in the regeneration of OLPs after OGD in neonatal rats. **Methods** The OLPs from 2-day-old neonatal rats were separated by improved separation and purification through agitation and then cultured in chemically defined medium. OLPs OGD model was prepared using the medium consisting of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and Earle's fluid *in vitro*. Immunofluorescence assay was applied to identify the OLPs with its specific antibodies such as A2B5, O4 and O1. Western blot was used to detect the NgR expression in OLPs 10 and 30 minutes after OGD. The livability rate of cells was detected by MTT. **Results** NgR expression was found in both the cell body and the prominence of purified OLPs. NgR expression in OLPs increased significantly 10 and 30 minutes after OGD compared with that in OLPs without OGD (controls, $P < 0.05$). MTT showed that the livability rate of OLPs at 30 minutes following OGD was significantly lower than that of controls ($65.97 \pm 3.69\%$ vs $97.17 \pm 6.88\%$, $P < 0.05$). **Conclusions** NgR is expressed in both the cell body and the prominence of OLPs. NgR expression increases while cell livability decreases following OGD, suggesting that NgR may play a role in the inhibition of regeneration of OLPs. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (5):445-448]

Key words: NgR; Oligodendrocyte precursor cell; Cell culture; Oxygen & glucose deprivation; Regeneration; Neonatal rats

哺乳动物中枢神经系统 (CNS) 损伤后神经轴突生长受限可能与构成 CNS 轴突的少突胶质细胞 (OL) 能产生很多神经生长抑制因子,如髓鞘相关蛋白 MAG (myelin associated glycoprotein),少突胶质细胞髓鞘糖蛋白 OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein) 和 Nogo 有关,这些神经生长抑制因子通过与其受体结合,激活下游的信号传导系统,抑制神经轴突生长。目前,关于轴突再生抑制的相关机制已成为神

[收稿日期]2007-04-01;[修回日期]2007-06-07
[基金项目]教育部博士点基金项目资助(编号:20050610071)。
[作者简介]唐军,博士,主治医师。主攻方向:新生儿脑损伤。
[通讯作者]姚裕家,教授,博士生导师,四川大学华西第二医院儿科,邮编:610041。

经科学的研究热点。

2001年,Fournier等^[1]运用碱性磷酸酶融合技术首次发现了NgR,即Nogo、MAG和OMgp的共同受体,在抑制CNS损伤后的轴突再生中起着重要作用。过去大部分资料表明NgR广泛分布于CNS中众多神经元,不存在于OL。但最近有研究发现NgR在成年大鼠脊髓白质OL上表达的证据^[2]。但NgR在新生动物脑白质区OLPs的表达及其在细胞缺氧缺血(OGD)后的变化情况至今尚未见报道。本实验通过对体外纯化培养的少突胶质前体细胞系(OLPs)并制作细胞OGD模型观察NgR的表达及变化,探讨NgR在OLPs再生抑制中的作用。

1 材料与方法

1.1 OLPs的体外培养及鉴定

生后2d的新生SD大鼠,无菌条件下取大脑,剔除脑膜及血管。采用改良振荡分离纯化法获取脑组织OLPs^[3,4]。根据培养板中细胞的培养时间及分化程度,分离纯化培养后第1,2,4天终止培养,分别用代表OL不同发育阶段的特异性抗体A2B5、O4和O1对不同时间段的细胞作免疫荧光法鉴定,获取OLPs纯度>90%。

1.2 OLPs缺氧缺血模型制备

在OLPs中对OGD最敏感的是晚期OL前体和未成熟的OL,故选择分离纯化后第2天的细胞制作OGD模型。采用氧清除剂连二亚硫酸钠和无糖培养基造成OGD^[5]。细胞分离纯化培养后第2天,弃去培养液,用无糖培养基洗涤细胞2次,加入含连二亚硫酸钠终浓度为10 mmol/L的无糖培养基分别继续培养10 min和30 min,制作细胞OGD模型。正常对照组不经OGD处理。光镜下观察模型组和对照组细胞在不同时间点形态学变化。

1.3 MTT法检测各组细胞存活率

将OGD 10 min,30 min的96孔板中各组OLPs加入终浓度为5 mg/mL的MTT 20 μ L/孔。37℃ 5% CO₂培养箱中孵育4 h。去培养液,加入DMSO 150 μ L/孔,37℃振荡10 min。以DMSO为空白调零,酶标仪(Bio-Rad公司)测定570 nm波长处各孔的光吸收值(OD)。按下式计算细胞活性:细胞存活率(%)=模型组OD值/正常对照组OD值 $\times$ 100%。

1.4 NgR在正常OLPs及缺氧缺血模型中的表达

1.4.1 免疫荧光法检测NgR在正常OLPs及OGD模型组OLPs的表达 将OLPs分为正常对照组和OGD模型组。根据细胞鉴定的结果,在不同的时间

点终止培养,弃培养液,用多聚甲醛室温固定20 min;10%山羊血清37℃湿盒中封闭45 min;用1:100 NgR兔IgG(H-300)(Santa cruz)为一抗,阴性对照用血清代替一抗;37℃水浴箱中避光孵育1 h;PBS洗涤(5 $\times$ 3 min);50%甘油封片,采图。

荧光显微镜下观察,绿色荧光为阳性表达。随机选取3个视野,计算平均荧光强度,采图。

1.4.2 免疫印迹法检测NgR在正常OLPs及OGD模型组OLPs的表达 将OLPs分为正常对照组、OGD模型10 min和30 min三组,各组细胞经相应处理后,收集细胞,冰浴中放置30 min,14 000 r/min,4℃离心25 min,取上清。BCA测定试剂盒测定各样本蛋白质浓度;用Western blot检测细胞中NgR的表达;在凝胶成像分析系统(美国,BioRad)中测量表达强度;将同次电泳所得的NgR和 β -actin条带灰度值相比,得到各样本组NgR/ β -actin的灰度比值。

1.5 统计学分析

各组数据用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用ANOVA方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光法观察NgR在SD大鼠正常OLPs的表达

结果显示,OLPs分离纯化后第1天,NgR在细胞胞体及突起呈阳性表达,随时间表达逐渐增强,至第2,4天表达明显(图1)。

2.2 OLPs缺氧缺血后形态学变化

倒置相差显微镜下观察发现,正常OLPs形态清晰,胞体呈圆形,胞膜完整,多数有4~5个突起,结构完整。OLPs缺氧缺血10 min,胞体水肿,轴突肿胀;缺氧缺血30 min,胞体水肿、胞膜破裂、轴突肿胀、断裂(图2)。

2.3 免疫荧光法观察NgR在OGD模型中的表达

结果显示:OGD后10 min,NgR在OLPs的胞体呈阳性表达,且较正常对照增强(图3);部分细胞突起近端可见弱阳性表达(图3,A);OGD后30 min,NgR在OLPs的胞体及突起呈强阳性表达(图3,B)。OGD模型各组NgR表达荧光强度较对照明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.4 OGD模型各组细胞存活率

OLPs OGD10 min,细胞存活率下降不明显,OGD30 min,细胞存活率下降为65%左右,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

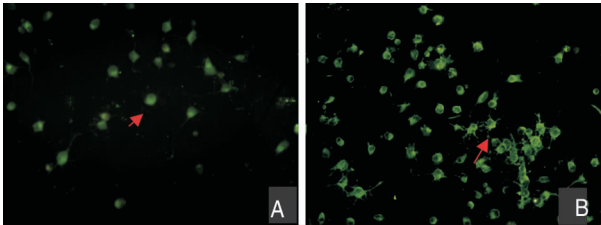


图1 OLPs分离纯化后第1天(A)和第4天(B),NgR在细胞胞体及突起呈阳性表达(红色箭头),且逐日增强。(荧光显微镜×200)

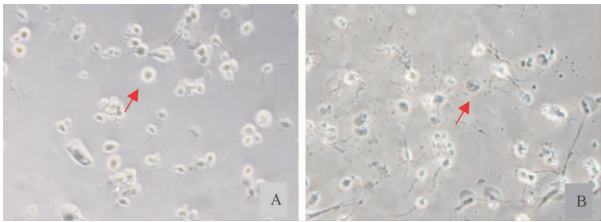


图2 OLPs缺氧缺血10 min(A),胞体水肿,轴突肿胀(红色箭头);缺氧缺血30 min(B),胞体水肿、胞膜破裂、轴突肿胀、断裂(红色箭头)。(光镜×200)

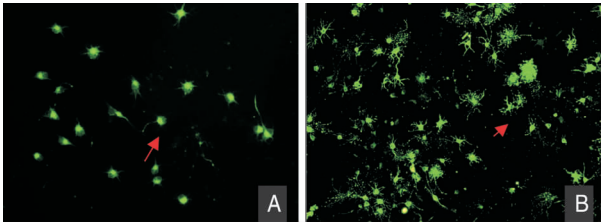


图3 OLPs缺氧缺血10min(A)和30min(B)模型组,NgR表达明显增强(红色箭头)。(荧光显微镜×200)

表1 各组细胞荧光强度及细胞存活率 (n=8, $\bar{x} \pm s$)			
		荧光强度	存活率(%)
10 min	对照组	52 ± 3	101.18 ± 9.00
	OGD	93 ± 12 ^a	92.64 ± 7.61
30min	对照组	51 ± 4	97.17 ± 6.88
	OGD	137 ± 11 ^{a,b}	65.97 ± 3.69 ^a

a 与同时时间点正常对照组比较, $P < 0.05$; b 与 OGD 10 min 组比较, $P < 0.05$

2.5 Western blot 检测 NgR 在 OLPs 缺氧缺血后的表达

2.5.1 正常及 OGD 各组 NgR 的表达情况 正常组及 OGD 各组表达条带见图 4。

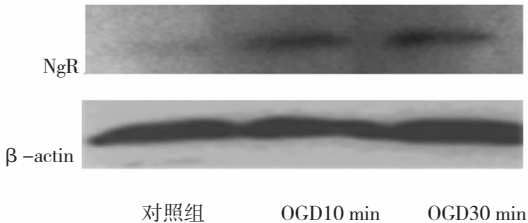


图4 正常及 OGD 各组 NgR 表达条带。正常及 OGD 各组均表达 NgR,OGD10 min,30 min NgR 表达较正常增强。

2.5.2 定量分析结果 OLPs OGD 损伤后 10 min, NgR 表达较正常明显增强,30 min 继续升高,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

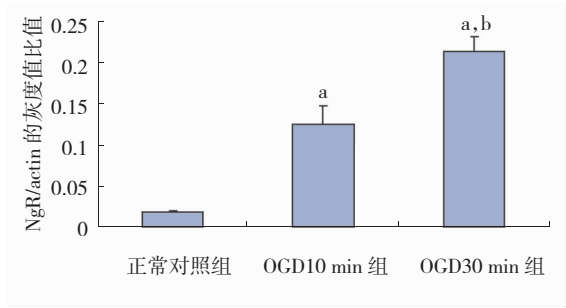


图5 正常与 OGD 各组 NgR/actin 的灰度值比值 a 与对照组比较, $P < 0.05$; b 与 OGD 10 min 组 $P < 0.05$

3 讨论

早产儿脑白质损伤(WMD)是早产儿脑损伤的主要形式,常遗留严重的神经系统后遗症。其病理改变早期主要是脑室区白质的晚期 OL 前体和未成熟 OL (均属于 OLPs) 的凋亡和坏死,病变的后期出现 OL 的缺失、髓鞘形成障碍,脑室周围软化囊腔的形成。因此,了解这类细胞的再生抑制机制,对寻找治疗 WMD 途径,促进损伤区脑白质修复具有重要意义。

Nogo-A、NgR 是最近发现的一种髓鞘源性抑制蛋白及其受体,Nogo-A 的细胞外结构域 Nogo-66 与 NgR 结合,激活 RhoA 信号传导系统,从而表现出 Nogo-A 对中枢神经的抑制活性。过去的研究表明,CNS 的 OL 表达 Nogo-A,但不表达 NgR,那么,脑白质区的 OL 之间是如何实现 Nogo-A 的神经抑制作用目前尚不清楚。

NgR 最先是作为 Nogo-66 的受体被分离克隆。它是一种糖基磷脂酰肌醇(GP I)锚定膜蛋白,通过 GPI 结构固定于细胞膜表面。NgR 在成年人 CNS 中的表达分布与其对神经再生的抑制作用之间是相互对应的。已有的研究表明 NgR 广泛分布于 CNS 的各种神经元中,且定位于细胞膜上,而在心脏和肾脏细胞中低水平表达,其他组织中未见表达,在白质区 OL 中也未检测到 NgRmRNA 的表达^[5-7]。

但最近的研究^[2]提供了 NgR 在体内脊髓胶质细胞表达的证据,并且在电镜水平进一步确定了 NgR 在缝隙连接的定位。还有研究^[8]发现大鼠脊髓来源神经干细胞表达 NgR,表明在出生后脊髓神经发育过程中,自神经干细胞阶段即开始表达 NgR。那么,同属于 CNS 的大脑白质区的 OLPs 是否也表达 NgR? 目前国内外未见报道。

本试验中,在 OLPs 纯化培养后第 1 天,主要是 A2B5 表达阳性的 OL 祖细胞;第 2 天,主要是 O4 和 O1 表达阳性的未成熟 OL;第 4 天,主要是 O1 阳性的未成熟 OL。在 OLPs 发育的不同阶段,我们均检测到了 NgR 在细胞表面及突起的表达,且随着细胞成熟度的增加,NgR 表达的荧光强度逐渐增强。Western blotting 结果显示 OL 前体系呈现 66 kDa 带,同样证明 OLPs 表达 NgR。结果充分说明在以晚期 OL 前体和未成熟 OL 为脑白质主要组成部分的早产儿 CNS 内,NgR 有广泛表达。根据检测结果,随着细胞的成熟度增加,NgR 的表达逐渐增强,由此推测,成熟 OL 应该同样表达 NgR。这与以往报道的 OL 不表达 NgR 的结论并不一致,其原因有待进一步研究。本实验首次提供了 NgR 在少突胶质前体细胞系中表达的证据,而且结果表明 NgR 在 OLPS 的胞体及突起上均有表达。

目前对缺氧缺血性脑损伤发生发展过程中 NgR 蛋白含量变化的研究国内外少有报道。有研究表明,脊髓损伤后,只出现 Nogo-A 中等程度上调,而 NgR 则保持恒定^[9];而另有研究表明,成年大鼠急性缺血损伤在体模型显示,大脑皮层 NgR 蛋白含量在损伤后 6 h 开始升高,24 h 达到峰值,持续升高直至 7 d^[10]。最近我们在对新生动物缺氧缺血脑损伤(HIBD)在体模型的研究中发现,大脑皮层的 NgR mRNA 在 HIBD 后 6 h 开始升高,12 h 达到峰值,24 h 开始下降,但仍为高水平,随即才开始降至正常。

本研究结果显示,OLPs 细胞 OGD 后 10 min,NgR 表达较正常时增强;随着 OGD 时间的延长,NgR 的表达进行性增强。与此同时,OLPs 缺氧缺血后 10 min 即出现胞体水肿,轴突肿胀;OGD30 min,胞体水肿、胞膜破裂、轴突肿胀、断裂;细胞存活率在 OGD30 min 也显著下降。提示在 OGD 后早期 OLPs 即出现细胞

损伤,对 OGD 的敏感性甚至超过在体 HIBD 神经元;持续 OGD,OLPs 的病变更为严重。上述细胞病变与 NgR 在 OLPs 缺氧缺血后细胞内和突起的表达变化趋势一致,提示 NgR 表达增加可能在 OLPs 轴突的生长中具有抑制作用^[10]。但 OGD 后 NgR 表达增加的机制尚不十分清楚,需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Fournier AE, Grandpre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration[J]. *Nature*, 2001, 409(6818):341-346.

[2] 胡泽岚,刘莹莹,金卫林,刘惠玲,鞠躬. Nogo-66 受体在成年大鼠脊髓白质内胶质细胞的分布[J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(16):1444-1448.

[3] 殷红兵,丁爱石,吴卫平,范明. 新生大鼠高纯度少突胶质前体细胞系细胞的培养与鉴定:改良振荡分离纯化法的特点[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(17):36-37.

[4] 唐军,钟琳,姚裕家. SD 大鼠少突胶质前体细胞系的分离、培养及鉴定[J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(23):1657-1658.

[5] 许蜀闽,王培勇,马洪英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(4):359-360.

[6] Hunt D, Mason MR, Campbell G, Coffin R, Anderson PN. Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20(4):537-552.

[7] 谢琳,贺翔鸽,何凤慈. Nogo-66 受体在大鼠神经组织中的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(23):2335-2338.

[8] Josephson A, Trifunovski A, Widmer HR, Widenfalk J, Olson L, Spenger C. Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans[J]. *J Comp Neurol*, 2002, 453(3):292-304.

[9] 王丰,朱悦. 大鼠脊髓来源神经干细胞 NgR 的表达[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(5):472-475.

[10] Wang X, Chun SJ, Treloar H, Vartanian T, Greer CA, Strittmatter SM. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(13):5505-5515.

(本文编辑:吉耕中)