

· 实验研究 ·

高苯丙氨酸对大鼠皮层神经元 Nogo 66 受体的影响

黄成姣, 顾学范, 张拥军, 叶军, 李端, 黄丽素

(上海交通大学医学院附属新华医院; 上海市儿科医学研究所内分泌遗传代谢组, 上海 200092)

[摘要] 目的 该文旨在了解高苯丙氨酸(Phe)对大脑皮层神经元 Nogo 66 受体(NgR)表达的影响,以探讨 NgR 是否参与高 Phe 脑损伤的发病。**方法** 采取体外模拟高 Phe(0.9 mM)环境,原代培养胎龄 16~18 d 的 SD 胎鼠皮层神经元,用免疫荧光方法观察高 Phe 作用 0 h, 12 h, 24 h 之后神经元轴突长度和生长锥塌陷情况,并用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 方法检测高 Phe 作用 0 h, 12 h, 24 h 和 48 h NgR mRNA 和蛋白的表达情况。**结果** ①高 Phe 作用 12 h, 24 h 组神经元轴突长度与对照组相比明显变短(均 $P < 0.05$), 0 h, 12 h 和 24 h 生长锥塌陷比率分别为 $(3.5 \pm 1.5)\%$, $(12.5 \pm 9.7)\%$ 和 $(24.1 \pm 4.5)\%$, 12 h 组和 24 h 组与对照组(0 h 组)相比,生长锥塌陷明显增多($P < 0.01$); ②荧光定量 PCR 检测到高 Phe 作用 12 h, 24 h, 48 h 神经元 NgR mRNA 与 α -tubulin (α -Tub, α 微管蛋白)的相对表达量轻度升高,但 Ct 值差异无显著性; ③Western-blot 检测发现高 Phe 作用 12 h, 24 h 和 48 h 的神经元 NgR 蛋白明显增加, 12 h, 24 h 和 48 h 组的相对比值分别为对照组的 9.0, 9.4, 12.6 倍($P < 0.05$)。**结论** 高 Phe 可使神经元 NgR 受体表达增高,其可能为高 Phe 导致脑损伤神经元生长锥塌陷、突起生长减慢的机制之一。
[中国当代儿科杂志, 2008, 10(2): 211-215]

[关键词] 高苯丙氨酸; 神经元; Nogo 66 受体; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)02-0211-05

Effect of phenylalanine on the Nogo-66 receptor expression in the cortical neurons of rats

HUANG Cheng-Jiao, GU Xue-Fan, ZHANG Yong-Jun, YE Jun, LI Duan, HUANG Li-Su. Department of Endocrinology and Genetic Metabolism, Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (GU X-F, Email: guxuefan@online.sh.cn)

Abstract: Objective This study examined the effect of high concentration of phenylalanine (Phe) on Nogo-66 receptor (NgR) expression in the cortical neurons of rats *in vitro* in order to investigate whether NgR is involved in the etiology of Phe-induced brain damage. **Methods** Neurons from the cerebral cortex of embryonic rats were cultured for 3 days and then were treated with 0.9 mM Phe. After 12, 24 and 48 hrs of Phe treatment, mRNA and protein expression of NgR was detected by real-time PCR and Western blot respectively. Growth cones and growth axons of neurons were detected by immunofluorescence and immunohistochemistry respectively after 12 and 24 hrs of Phe treatment. **Results** The length of growth axons of neurons was significantly shorter after 12 and 24 hrs of Phe treatment compared with the control group without Phe treatment ($P < 0.05$). Growth cones collapse occurred in $12.5 \pm 9.7\%$ and $24.1 \pm 4.5\%$ of neurons respectively after 12 and 24 hrs of Phe treatment but only in $3.5 \pm 1.5\%$ in the control group ($P < 0.01$). The protein level of NgR after 12, 24 and 48 hrs of Phe treatment was up-regulated, with 9.0, 9.4 and 12.6 times as the control. mRNA level of NgR in the Phe treatment group did not differ from control. **Conclusions** High concentration of Phe can induce an increased NgR protein expression in cortical neurons, and the increased NgR expression may contribute to the growth cones collapse and the inhibitory activities of axon regeneration after injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(2): 211-215]

Key words: Phenylalanine; Neuron; Nogo-66 receptor; Rats

近年来研究发现 NogoA-NgR 通路的激活主要抑制外伤后损伤轴突再生、促进生长锥塌陷^[1,2],也

可参与一些非外伤性脑损伤的发病^[3~5]。未治疗的苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)出现的脑损伤也

[收稿日期] 2007-05-08; [修回日期] 2007-07-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(30470678)。

[作者简介] 黄成姣,女,博士,住院医师。主攻方向:儿科内分泌、遗传代谢病。现在湖北省妇幼保健院工作,邮编:430070。

[通讯作者] 顾学范,教授,上海交通大学医学院附属新华医院儿研所,邮编:200092。

为非外伤性脑损伤,其脑主要病理改变为生长锥塌陷,神经突起减少,突触发育不良、脑白质营养障碍等^[6],具体发病机制仍不清楚。NgR 通路激活是否参与高苯丙氨酸(Phe)血症脑损伤的发病呢?目前有关这方面的研究较少,故本文旨在体外模拟高Phe环境,观察神经元突起和生长锥塌陷的情况,以及高Phe对大鼠神经元NgR表达方式的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

孕16~18天Sprague-Dawley大鼠购自中国科学院上海实验动物中心,神经元培养液(购自Gibco公司)为Neurobasal,2% B27,100 U/L青霉素,100 mg/L链霉素,25 mM β 巯基乙醇,0.5 mM 谷氨酰胺组成。Phe(Sigma)浓度为0.9 mM,其余试剂各自见下文。

1.2 方法

1.2.1 神经元单纯培养 乙醚麻醉母鼠,无菌取出胎鼠,在解剖液中用解剖显微镜进行解剖,取出皮层组织,用显微剪将皮层剪碎,0.5~1 mm²。上述组织移入离心管中,静置5 min,弃上清。加2 mL 0.25%胰酶37℃水浴消化,每2 min晃动一次,总共15~25 min,4 mL含10%胰酶培养基终止消化(沿管壁轻轻加入),轻吹大块组织10次左右,见液体浑浊后停止,静置5~10 min,将细胞悬液移入离心管中。重复吹打1~2次。1 000 r/min离心10 min,弃上清。加神经元限定培养液按比例补足液体,轻吹5~10次成细胞悬液,记数按 $1 \sim 1.5 \times 10^7$ /皿(直径9 cm)或 5×10^4 /孔(六孔板)。胚鼠大脑皮层神经元培养24 h后,加入阿糖胞苷(8 μ M)培养3 d,然后换无阿糖胞苷神经元限定培养液培养,再加Phe进行基因和蛋白检测,加Phe 0时组为对照组。神经元培养48 h或者72 h用Tubulin Beta III单克隆抗体和DAPI鉴定其纯度。

1.2.2 免疫细胞荧光检测NgR的定位 神经元培养48~72 h后进行免疫组化。室温下多聚甲醛固定10 min。吸去固定液,PBS漂洗3次。封闭液封闭30 min。兔抗人NgR多克隆抗体(1:1 000,Santa Cruz)和Tubulin Beta III单克隆抗体(1:400,Chemicon)湿腔4℃过夜,PBS漂洗3次,每次5 min。加入羊抗兔生物素-链霉素标记的多克隆抗体(1:100,博士德),室温反应1 h。吸去二抗体反应液后,用HRP标记的链霉素和FITC标记的羊抗小鼠多克隆抗体孵育1 h,漂洗3次,以阴性对照不显

色时终止显色。DAPI染核10 min,荧光显微镜40倍下观察结果。

1.2.3 免疫荧光检测神经元轴突与生长锥塌陷

原代神经元培养36 h后加Phe,作用12 h,24 h后固定显色,加Phe 0时组为对照组。轴突用Tubulin Beta III单克隆抗体(1:400,Chemicon)鉴定、生长锥用Rhodamine Phalloidin染色(1:100,Introvigen),二抗为羊抗小鼠FITC标记的荧光二抗(1:100,博士德)。然后在荧光显微镜镜下40倍放大拍照(轴突测量)或激光共聚焦显微镜拍照(生长锥检测)。

1.2.4 Real-time PCR检测NgR mRNA的表达

神经元培养3 d后,按Phe作用时间分0,12,24和48 h组,加Phe 0 h组为对照组。每个试验每组3~4个培养皿,共3批。总RNA抽提后,鉴定纯度并进行荧光定量PCR扩增。 β -actin(NM_031144)上游引物:AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT GCT,下游引物:TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG A,产物长度为222bp。NgR(NM_053613.1)上游引物:TGT GCT ACA ATG AGC CCA AGG TC,下游引物:ATT CCA GCA TGA CTG GAA GCT。产物长度为152 bp。退火温度为63℃。引物均由生工合成,LightCycle RNA Master SYBR Green I试剂盒为Roche公司产品,实验操作遵从生产厂家说明书。Beta-actin为内参,每组都取阴性对照,每次做双份。

1.2.5 Western blot检测Nogo 66受体蛋白的表达

神经元培养3 d后,按Phe作用时间分0,12,24和48 h组,加Phe 0 h组为对照组。每个试验每组3~4个培养皿,共3批。细胞裂解后,BCA(申能博彩)蛋白定量,蛋白Marker为SeeBlue® Plus2 Prestained Standard(L C5925,Invitrogen),并用 α 微管蛋白(α -Tub)作为内参对照。12%的PAGE分离胶电泳1.5 h,湿转250 mA,1.5 h,TBST洗PVDF膜3次,含脱0.05%脂奶粉TBST封闭37℃ 1 h,TBST洗膜3次加,兔抗人NgR多克隆抗体(1:500)4℃过夜,TBST洗膜3次,加羊抗兔-HRP标记的多克隆抗体(1:1 000)37℃孵育1 h,TBST洗膜3次,化学发光剂显影,拍照。

1.3 统计方法

计量资料采取独立样本 t 检验和卡方检验,以 $P < 0.05$ 差异有显著性。用IMAGE-PLUS 5.1统计轴突长度,用实时荧光定量PCR的相对表达软件工具(REST©,2.0版本)行统计学分析(随机化试验原理)。Western blot结果用Smartscape软件对胶片条带进行灰度分析。将各组中NgR蛋白灰度与各自内参蛋白AT灰度的比值即代表NgR的相对表达量。

2 结果

2.1 神经元 NgR 蛋白的定位

本实验培养的神经元纯度可达到 95% 以上,神

经元用 Tubulin Beta III 鉴定,图 1 中显示为绿色,所有的活细胞用 Rhodamine Phalloidin 鉴定显色,在图 1 中显红色;所有细胞核用 DAPI 显色,图 1 中为蓝色,以下类同(图 1)。免疫组化显示 NgR 蛋白在神经元胞体和突起均有表达(图 2)。

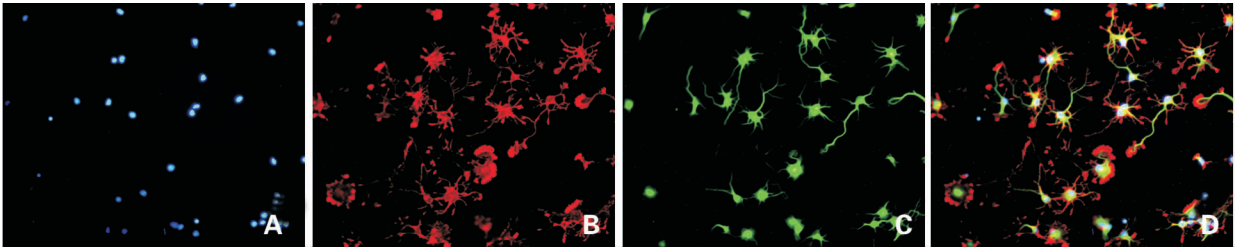


图 1 神经元纯度鉴定(×20 倍) 绿色为 Tubulin Beta III,红色为 Rhoda-mine Phalloidin,蓝色为 DAPI

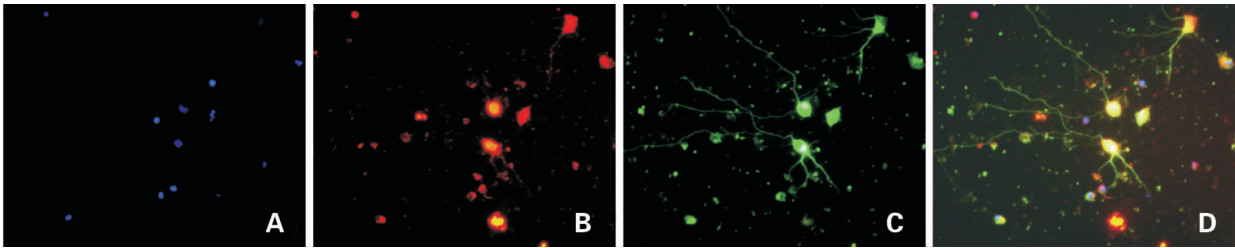


图 2 NgR 定位(×40 倍) 绿色为 Tubulin Beta III,红色为 NgR,蓝色为 DAPI,NgR 可表达于胞体与突起

2.2 高 Phe 作用不同时间神经元神经元生长锥塌陷检测

生长锥用 Rhodamine Phalloidin 鉴定(图 3A 和 3B 红色荧光),生长锥塌陷标准见参考文献^[7]。单纯培养神经元对照组和高 Phe 作用 12 h,24 h 组中的生长锥塌陷所占的分别为(3.5±1.5)%、(12.5±9.7)% 和(24.1±4.5)%,实验组与对照组比较 $P<0.01$,差异有显著性,尤其 24 h 组生长锥塌陷率明显增高(图 3C)。

2.3 高 Phe 作用不同时间神经元轴突的测量

神经元突起用神经元特异性抗体抗 Tubulin Beta III 免疫荧光显色鉴定,图中显示为绿色(图 1),同时对生长锥进行显色定位,两者同时显色,准确性增加。轴突测量具体方法和标准见参考文献^[7]。神经元在 Phe 作用 12h,24 h 进行免疫荧光检测轴突长度,对照组轴突长度 $96.04 \pm 22.57 \mu\text{m}$,加 Phe 12 h 组,轴突长度 $91.28 \pm 23.37 \mu\text{m}$,加 Phe 24 h 组轴突长度 $80.74 \pm 18.99 \mu\text{m}$,实验组轴突生长明显减慢($P<0.05$),尤其是加 Phe 24 h 组(图 4)。

2.4 荧光 PCR 检测结果

Ct 值用 Lightcycler 软件 3.5 版中的二次衍生法(SDM, second derivative methods)确定,结果统计方法见张拥军等^[8]。slopeNgR = -2.8, slope β -actin = -3.4, $E_{\text{NgR}}=2.27$, $E_{\beta\text{-actin}}=1.98$ 。与 β -actin

相比的相对表达量与对照组相比,Phe 作用 12 h,24 h 和 48 h 组分别为 0.97 ± 0.15 , 1.16 ± 0.18 和 1.26 ± 0.20 ,其相对表达量随 Phe 作用时间的延长呈升高趋势,见表 1。

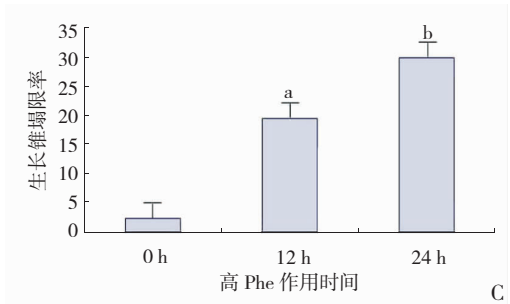
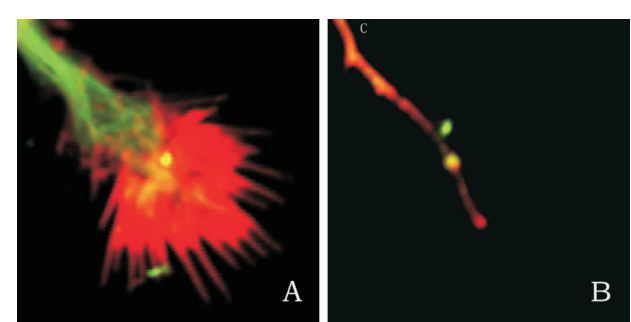


图 3 激光共聚焦纤维镜生长锥荧光检测 A:正常生长锥;B:塌陷生长锥;C:神经元在单培养条件下生长锥塌陷的检测。与对照组相比,a: $P<0.05$;b: $P<0.01$ (4 次实验,每组测量 100 个神经元)。

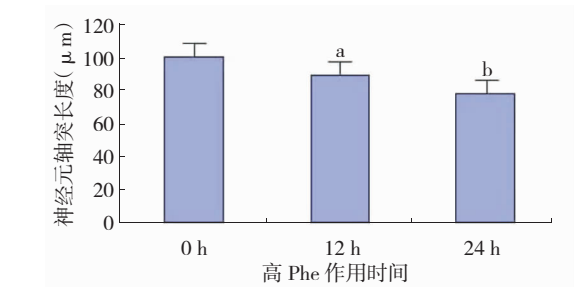


图4 神经元在单纯培养条件下轴突长度的检测(μm)
a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$ (4 次实验, 每组测量 100 个神经元)。

表1 荧光定量 PCR 检测 NgR 和 β -actin 的 Ct 比较			
分组	β -actin	NgR	Relative ratio
对照组	15.57 $\pm$ 0.42	23.80 $\pm$ 1.37	1
加 Phe 12 h	15.60 $\pm$ 0.84	23.84 $\pm$ 1.59	0.97 $\pm$ 0.15
加 Phe 24 h	15.05 $\pm$ 0.42	23.22 $\pm$ 1.11	1.16 $\pm$ 0.18
加 Phe 48 h	15.34 $\pm$ 0.84	23.34 $\pm$ 1.61	1.26 $\pm$ 0.20

2.5 Western blot 结果

由实验结果看出,神经元加苯丙氨酸 0 h,12 h,24 h 和 48 h 组的 NgR 蛋白表达量明显增加。NgR 的灰度除以组中各自的内参照蛋白 α -Tub 后,其相对表达量分别为 1.14,10.34,10.76 和 14.4,12 h,24 h 和 48 h 组分别为 0 h 对照组的 9.0,9.4,12.6 倍(图 5A,B)。

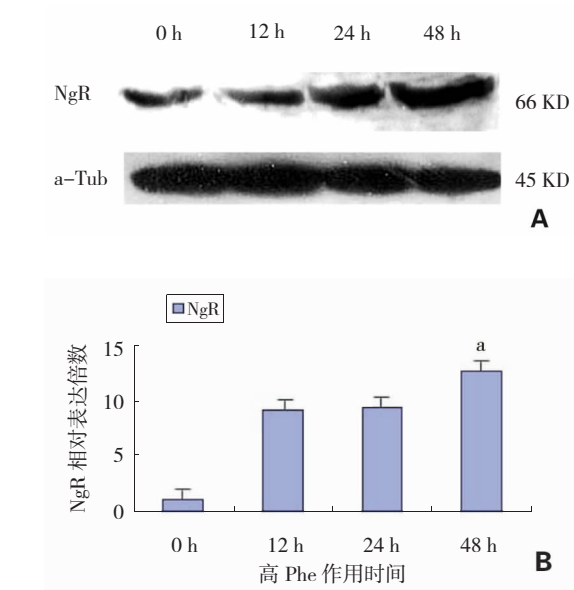


图5 A:单纯培养神经元 NgR 和 α -Tub Western blot 检测结果; B:NgR 和 DM1A 蛋白的相对表达量(a: $P < 0.05$, $n = 4$)。

3 讨论

未治疗的 PKU 患者最重要的并发症是智力落后,母源性苯丙酮尿症(materal phenylketonuria, materal PKU)的患儿^[9]也可出现患儿小头畸形和智力落后,两种病理模型均提示高 Phe 对大脑神经元存在严重的损伤,但其具体机制至今尚不清楚。

NgR 为中枢神经系统神经元轴突生长重要的抑制因子 NogoA 蛋白的受体蛋白,可在大脑、小脑等部位的神经元表达,在星型细胞也有少许表达,主要介导生长椎塌陷和轴突生长抑制,但是最近一些 NgR 基因敲除试验显示 NgR 敲除小鼠其轴突生长并没有收到明显改善^[10],提出一定表达量的 NgR 可能对维持正常轴突也可能存在重要的作用。因此 NgR 在中枢神经系统轴突生长中扮演双重角色。

NgR 主要有三种亚性^[11],其中 NgR1 是重要的轴突生长抑制子 Nogo A^[12]、髓鞘碱性蛋白(MBP)^[13]、少突胶质细胞碱性蛋白(Opg)^[14]的共同受体,主要在中枢神经元表达,与 p75/Lingo-1/TROY^[15~17]复合物。这个受体复合物激活之后,最终信号汇集到 Rho GTPase (Rac1、Cdc42 和 RhoA^[18,19]等,尤其是 RhoA^[20])介导生长椎塌陷和抑制轴突生长(图 2),有关这条通路上的相关抑制干预实验均显示不同程度促生长锥和轴突的生长作用^[21~23]。最初发现 NgR 和其配体 Nogo A 在外伤性脑损伤中起作用,但是近些年研究显示 Nogo A 蛋白亦已在 Alzheimer 病^[3]、自身免疫性脱髓鞘性疾病^[4]、颞叶癫痫^[5]等疾病中异常增高,提示 Nogo A 蛋白和其受体 NgR 也可能参与一些非外伤性脑损伤的发病。张拥军等^[8]用荧光定量 PCR 方法检测不同时间的神经元 GTPase (Rac1、Cdc42 和 RhoA)发现,高 Phe 可使其 NgR 下游信号正调节因子 Cdc42、Rac1 基因表达下调,反调节因子 RhoA 基因表达先升高后下降,提示 NgR 信号通路有可能参与高 Phe 所致的神经元损伤。

本文免疫组化试验显示,体外模拟高浓度(0.9 mM)的 Phe 可使神经元生长椎塌陷随着作用时间延长增加(图 3B),同时使轴突生长减慢,并与作用时间成反向增长,尤其是 Phe 作用 24 h 后更明显,这种结果也提示体外模拟的高 Phe 环境基本成功。Western blot 方法检测出 NgR 蛋白在高 Phe 作用 12 h,24 h 和 48 h 明显增高,表明 NgR 可随着高 Phe 作用时间的增加而表达增高,支持 NgR 可能参与高 Phe 对神经元损伤的发病过程。

值得一提的是,本试验用荧光定量 PCR 证实 NgR mRNA 表达量随高 Phe 作用时间的延长上升趋势基本上不明显,如表 1 所示,12 h,24 h 和 48 h 的相对表达量为 0.97 ± 0.15 , 1.16 ± 0.18 和 1.26 ± 0.20 ,与蛋白的表达不一样。考虑可能的原因:①基因转录跟蛋白表达本身存在差异^[24],②Phe 是生物体内的一种必须氨基酸,本身不是毒物,对细胞的作用可能有其特殊的方式;③调节 NgR mRNA 表达可能需要 OLG 表达的 Nogo A 存在,本实验室在 OLG 与神经元混合培养时 NgR mRNA 表达明显上调(数据尚未发表);④试验误差。但试验 RNA 纯度很高,OD260/280 = 1.8 ~ 2.0 之间,双管之间 Ct 差值 < 0.2,基本上可以不考虑;⑤其他不明机制。

总之,本文证实神经元在体外高 Phe 作用下,NgR 蛋白表达上调,其可能为高 Phe 导致生长锥塌陷、突起生长减慢的可能机制之一。

[参 考 文 献]

[1] Kim JE, Liu BP, Park JH, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury[J]. *Neuron*, 2004, 44(3):439-451.

[2] Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13):5393-5406.

[3] Zhu HY, Guo HF, Hou HL, Liu YJ, Sheng SL, Zhou JN. Increased expression of the Nogo receptor in the hippocampus and its relation to the neuropathology in Alzheimer's disease[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(3):426-434.

[4] Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T. Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005, 64(2):129-138.

[5] Bandtlow CE, Dlaska M, Pirker S, Czech T, Baumgartner C, Sperk G. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(1):195-206.

[6] Huttenlocher PR. The neuropathology of phenylketonuria human and animal studies[J]. *Eur J Pediatr*, 2000, 159(Suppl 2):S102-S106.

[7] Igarashi M, Kozaki S, Terakawa S, Kawano S, Ide C, Komiya Y. Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by Botulinum neurotoxin C1; a t-SNARE is involved in axonal growth[J]. *J Cell Biol*, 1996, 134(1):205-215.

[8] 张拥军,张惠文,顾学范. 高苯丙氨酸对神经元 Rho GTPases 基因体外表达的研究[J]. *中华儿科杂志*, 2005, 43(3):210-211.

[9] Lee PJ, Ridout D, Walter JH, Cockburn F. Maternal phenylketonuria: report from the United Kingdom Registry 1978-97[J]. *Arch Dis Child*, 2005, 90(2):143-146.

[10] Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, et al. Ge-

netic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(4):1205-1210.

[11] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. *Nature*, 2000, 403(6768):434-439.

[12] Schachner M, Bartsch U. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin[J]. *Glia*, 2000, 29(2):154-165.

[13] Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, et al. Oligodendrocyte myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth[J]. *Nature*, 2002, 417(6892):941-944.

[14] Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(3):221-228.

[15] Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp[J]. *Nature*, 2002, 420(6911):74-78.

[16] Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, 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(5):345-351.

[17] Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(23):10368-10376.

[18] Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, et al. Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(1):38-45.

[19] Schweigreiter R, Walmsley AR, Niederost B, Zimmermann DR, Oertle T, Casademunt E, et al. Versican V2 and the central inhibitory domain of Nogo-A inhibit neurite growth via p75NTR/NgR-independent pathways that converge at RhoA[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27(2):163-174.

[20] Ahmed Z, Dent RG, Suggate EL, Barrett LB, Seabright RJ, Berry M, et al. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28(3):509-523.

[21] Borisoff JF, Chan CC, Hiebert GW, Oschipok L, Robertson GS, Zamboni R, et al. Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22(3):405-416.

[22] Fouad K, Klusman I, Schwab ME. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(9):2479-2482.

[23] Hu F, Liu BP, Budel S, Liao J, Chin J, Fournier A, et al. Nogo-A interacts with the Nogo-66 receptor through multiple sites to create an isoformselective subnanomolar agonist[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(22):5298-304.

[24] Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(3):1720-1730.

(本文编辑:吉耕中)