

Nogo-A 和 NgR 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达

杜宁, 张文芳, 鲁建华, 张冬梅

作者单位: (730070) 中国甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院眼科
作者简介: 杜宁, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 张文芳, 女, 博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师,
甘肃省医学会眼科专业委员会主任委员, 研究方向: 眼底病。
zhangwf888@163.com
收稿日期: 2012-03-08 修回日期: 2012-05-04

Expression of Nogo-A and NgR in rat retinal ischemia-reperfusion injury

Ning Du, Wen-Fang Zhang, Jian-Hua Lu, Dong-Mei Zhang

Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

Correspondence to: Wen-Fang Zhang, Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730070, Gansu Province, China. zhangwf888@163.com

Received: 2012-03-08 Accepted: 2012-05-04

Abstract

• **AIM:** To observe the expression of Nogo-A and NgR in rat retinal ischemia-reperfusion (RIR) acute injury and to investigate their significance and correlation.

• **METHODS:** Ninety adult SD rats were randomly divided into normal group (6 rats), experimental group (RIR group, 42 rats) and sham group (42 rats). The experimental group and sham group were subdivided into 0 hour, 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours subgroups according to different time after RIR injury. Six rats were bring into every subgroup. Ligating the rats' single common carotid artery was used to establish animal models of rat retinal ischemia. Pathomorphology was detected by hematoxylin and eosin stain and the expression of Nogo-A and NgR was measured by immunohistochemistry.

• **RESULTS:** Compared with normal group, the expression of Nogo-A and NgR in sham group had no statistically significant difference ($P > 0.05$). Compared with sham group, experimental group had the expression of Nogo-A gradually increased in 12 hours after RIR ($P < 0.05$), peaked in 48 hours ($P < 0.01$), decreased in 72 hours ($P < 0.05$) and reached in normal level in 168 hours ($P > 0.05$); the expression of NgR increased in 6 hours after RIR ($P < 0.05$), peaked in 48 hours ($P < 0.01$), decreased in 72 hours ($P < 0.05$) and reached in normal level in 168 hours ($P > 0.05$). The expression of Nogo-A and NgR in experimental group showed a positive correlation ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Nogo-A and NgR expressed at each time point after RIR as a parabola. NgR expressed prior to Nogo-A. They were all peaked at 48 hours after RIR. The

expression of Nogo-A and NgR closely related to RIR injury, with a collaborative relationship between the two.
• **KEYWORDS:** retina; ischemia-reperfusion; Nogo-A; NgR

Du N, Zhang WF, Lu JH, et al. Expression of Nogo-A and NgR in rat retinal ischemia-reperfusion injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6):1044-1047

摘要

目的: 观察轴突生长抑制因子 Nogo-A 及其受体 NgR 在视网膜缺血再灌注 (retinal ischemia-reperfusion, RIR) 急性损伤中的表达, 研究两者在 RIR 损伤中的作用及相关性。

方法: SD 大鼠 90 只随机分为: 正常对照组 ($n=6$); 假手术组 ($n=42$); RIR 组 ($n=42$), 假手术组及 RIR 组分为再灌注后 0, 6, 12, 24, 48, 72, 168h 亚组, 每组 6 只; 采用结扎单侧颈总动脉的方法制备大鼠 RIR 模型, HE 染色观察组织形态学改变, 免疫组织化学检测 Nogo-A 和 NgR 蛋白的表达。

结果: 假手术组各时间点 Nogo-A 及 NgR 表达与正常组相比无统计学差异 ($P > 0.05$), 实验组大鼠与假手术组相比: Nogo-A 的表达在 12h 开始升高 ($P < 0.05$), 48h 达到高峰 ($P < 0.01$), 72h 下降 ($P < 0.05$), 168h 达到正常基线水平 ($P > 0.05$); NgR 的表达在 6h 即出现上升, 持续至 48h 达到最高峰 ($P < 0.01$), 72h 下降, 168h 达到正常基线水平。实验组大鼠 Nogo-A 与 NgR 的表达呈正相关 ($P < 0.01$)。

结论: Nogo-A 和 NgR 在 RIR 各时间点均有表达, 其表达水平沿时间点呈抛物线形, 在再灌注 48h 时均达到峰值, NgR 先于 Nogo-A 表达, 两者协同作用, 与 RIR 损伤后抑制轴突修复再生有关。

关键词: 视网膜; 缺血再灌注; Nogo-A; NgR

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.09

杜宁, 张文芳, 鲁建华, 等. Nogo-A 和 NgR 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达. 国际眼科杂志 2012;12(6):1044-1047

0 引言

视网膜缺血再灌注 (retinal ischemia-reperfusion, RIR) 损伤常见于视网膜血管阻塞、高眼压疾病, 以及影响视网膜血流量的眼科手术等。其主要损伤的是内层视网膜, 其中最重要的是神经节细胞层及神经纤维层。RIR 损伤后神经节细胞及其轴突所构成的神经纤维层的修复再生困难, 可能是造成 RIR 后损伤组织功能难以恢复的重要原因。目前认为轴突生长抑制因子在此过程中起主要作用。Nogo-A 是最主要的抑制中枢神经系统神经纤维轴突再生的因素, 其通过多位点相互作用激活其受体 NgR, 启动神经细胞内信号转导通路抑制轴突再生^[1]。Nogo-A 对中枢神经系统再生的强烈抑制作用已被众多研究证实。但在 RIR 损伤中的研究, 相关报道却较少。本研究通过观察观

察轴突生长抑制因子 Nogo-A 及其受体 NgR 在 RIR 急性损伤中的表达,以探讨两者在 RIR 损伤中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级成年 SD 大鼠共 90 只(甘肃中医学院动物实验中心提供),雌雄不限,体质量 200 ~ 300g;纳入实验大鼠经裂隙灯及直接检眼镜检查,眼前后节均无明显异常;对动物的筛选及实验过程符合国家技术科学委员会《实验动物管理条例》规定。一抗:兔抗大鼠 Nogo-A 多克隆抗体和兔抗大鼠 NgR 多克隆抗体(美国 Biosynthesis 公司);二抗:生物素标记羊抗兔 IgG。40g/L 多聚甲醛(武汉博士德公司),裂隙灯(德国蔡司)、直接检眼镜(苏州六六公司)、HMIAS-2000 图像分析系统(美国 Cybernetics 公司),免疫组织化学相关仪器设备由甘肃中医学院病理教研室提供。

1.2 方法 SD 大鼠 90 只随机分为 3 组,正常对照组 6 只(不做任何处理直接处死);假手术组(手术后不行单侧颈总动脉结扎)0,6,12,24,48,72,168h 组,每组 6 只;实验组即 RIR 后 0,6,12,24,48,72,168h 组,每组 6 只。实验采用结扎单侧颈总动脉的方法造模^[2],即常规麻醉大鼠后,手术分离出左侧颈总动脉,缝线结扎形成视网膜缺血,1h 后解除结扎缝线形成再灌注,结扎左侧颈总动脉后直接检眼镜下见大鼠左眼底视网膜颜色苍白,视网膜动脉血流完全中断提示造模成功,解除缝线后见视网膜颜色呈橘红色,视网膜动脉血流恢复,提示形成再灌注;用 100g/L 水合氯醛过量麻醉处死大鼠,立即摘取左侧眼球,保留视神经大约 0.5 ~ 1mm,置于 40g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH=7.4)内 4℃ 固定 24h。剪除整个角膜,摘除晶状体,清除玻璃体,流水反复缓慢冲洗标本。依次梯度乙醇脱水和二甲苯透明处理后,常规石蜡包埋。将包埋好的眼球标本,以平行于视神经矢状轴且以其为平面的视网膜连续切片 5 张,厚度约 5 μ m,置于防脱片上,60℃ 温箱烤片过夜。HE 染色,光镜下观察各分组视网膜组织形态学变化。另将切片 70℃ 温箱烤片 2h 备用,脱蜡前再相同条件烤片 15min。切片常规脱蜡,热修复抗原,采用链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶连接法(Streptavidin Peroxidase Method, SP 法)分别检测大鼠 Nogo-A 和 NgR 的定位和表达。染色步骤按照说明书进行,二氨基联苯胺(DAB)显色,脱水、透明、封片。每次染色均做阳性和阴性对照,用 PBS 代替一抗做阴性对照。每张切片随机选取 5 个 400 倍的视野进行观察,采用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统,在视网膜阳性表达区域计算平均吸光度值来定量测定 Nogo-A 和 NgR 的表达。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件包进行数据分析。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各计量资料间首先采用 Levene 检验进行方差齐性分析,然后进行独立样本 *t* 检验。数据间的相关性分析行双变量间 Pearson 双侧检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 RIR 后视网膜组织形态学改变 HE 染色可见,RIR 损伤后 6h 出现视网膜组织水肿,视网膜厚度明显增加,神经纤维层断裂,组织内细胞肿胀变性、核固缩、核溶解,24h 达到高峰,72h 恢复正常水平(图 1)。

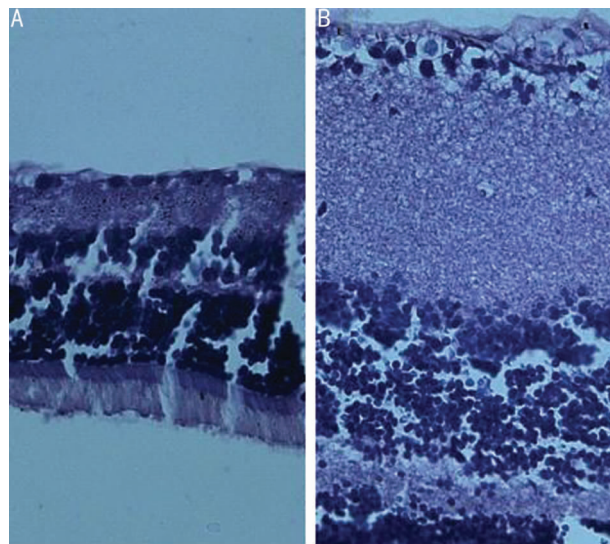


图 1 视网膜组织形态学改变(HE \times 400) A:正常对照组;B:RIR 后 24h 组。

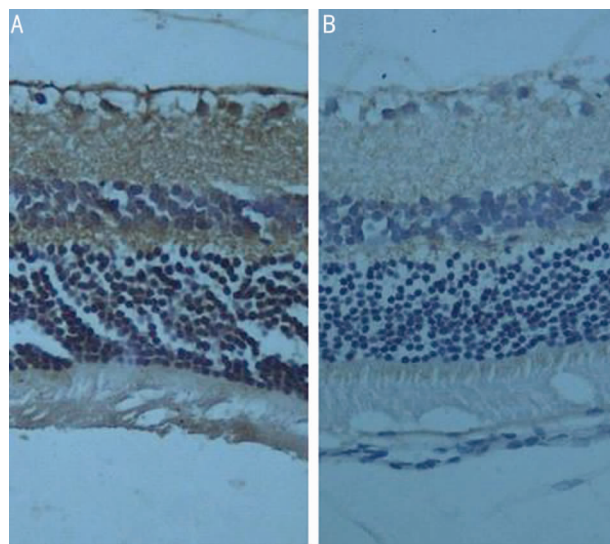


图 2 大鼠视网膜 Nogo-A 和 NgR 在 RIR 48h 的表达(SP \times 400) A:Nogo-A;B:NgR。

2.2 大鼠视网膜 Nogo-A 及 NgR 的表达 在正常对照组、假手术组及实验组均可见 Nogo-A 和 NgR 的表达,主要表达于视网膜节细胞层、丛状层、核层(图 2)。假手术组各时间点 Nogo-A 和 NgR 表达与正常对照组相比无差异($P>0.05$),实验组大鼠与假手术组相比:Nogo-A 的表达在 12h 开始升高($P<0.05$),48h 达到高峰($P<0.01$),72h 下降($P<0.05$),168h 达到正常基线水平($P>0.05$);NgR 的表达在 6h 即出现上升($P<0.05$),持续至 48h 达到最高峰($P<0.01$),72h 下降($P<0.05$),168h 达到正常基线水平($P>0.05$,表 1)。

2.3 大鼠 RIR 后 Nogo-A 和 NgR 表达的相关性 实验组大鼠 Nogo-A 与 NgR 的表达在 0,12,24,48,72,168h 呈完全正相关($P<0.01$),在 6h 相关性差($P<0.05$)。

3 讨论

缺血后及早地再灌注似乎可以挽救缺血损伤的视网膜,然而临床发现,再灌注后损伤加重,甚至造成病程由可逆转变为不可逆、视觉功能恶化、丧失。可能的机制是由于缺血后产生的毒性产物,随着再灌注血流的恢复,使更多的健康组织暴露于这些毒性产物中。除了再灌注后多

表1 术后不同时间各组大鼠 Nogo-A 和 NgR 的表达

术后时间 (h)	Nogo-A		NgR	
	实验组	假手术组	实验组	假手术组
0	0.4960±0.0071	0.4865±0.0064	0.4133±0.0113	0.4088±0.0076
6	0.4982±0.0081	0.4968±0.0062	0.4533±0.0206	0.4053±0.0105
12	0.5475±0.0044	0.5030±0.0459 ^a	0.4745±0.0053	0.4025±0.0026
24	0.5550±0.0141	0.5030±0.0283 ^a	0.4935±0.0049	0.4125±0.0064 ^a
48	0.5837±0.0100	0.5047±0.0208 ^b	0.5163±0.0130	0.4003±0.0072 ^b
72	0.5460±0.0241	0.4893±0.0047 ^a	0.4470±0.0060	0.4003±0.0080 ^a
168	0.4847±0.0031	0.4837±0.0061	0.4060±0.0071	0.3980±0.0127

^aP<0.05 vs 实验组; ^bP<0.01 vs 实验组。

种损伤因素的共同作用,神经节细胞及其轴突的修复再生困难,也是造成 RIR 后损伤组织功能难以恢复的重要原因。影响神经元及轴突再生的主要因素有:成年神经元损伤后自身的再生能力下降^[3]、胶质瘢痕形成^[4]、神经营养因子缺乏以及轴突生长抑制因子的作用^[5]、微环境的改变等,目前认为轴突生长抑制因子起最主要作用。2000 年克隆出 Nogo 基因,其编码的蛋白质 Nogo-A, Nogo-B 和 Nogo-C 是一种髓磷脂相关轴突生长抑制因子^[6]。2001 年发现了 Nogo 受体 NgR^[4],它与 Nogo-A 的细胞外结构域 Nogo-66 结合,使 Nogo-A 发挥抑制轴突再生的作用。Nogo-A 对中枢神经系统再生的强烈抑制作用已被众多研究证实,如应用单克隆抗体 IN-1 结合 Nogo-A,可促进损伤后的中枢神经功能恢复^[7,8]。

本实验证实,在正常成年大鼠的视网膜即有 Nogo-A 和 NgR 的表达,Nogo-A 和 NgR 分布于视网膜节细胞层、丛状层、核层,在细胞内定位于细胞质、内质网、细胞核等部位^[9],在视神经中延长轴串珠样排列。Nogo-A 在新生大鼠神经组织中的分布可能与神经发育进程中的可塑性相关^[10],在正常成年大鼠可能与保持神经系统稳定,限界和防止形成异常联系有关。

通常人体组织在损伤后具备一定的再生修复能力。但是在中枢神经系统,神经元及其轴突损伤后的再生修复却很有限^[11]。研究观察发现,中枢神经系统轴突损伤后,再生轴突发出新芽,迅速崩解。视网膜以及由节细胞轴突所构成的视神经与中枢神经系统关系密切,损伤后同样表现出极其有限的再生能力。RIR 后虽然有众多加重损伤的因素凸显,但是推理再灌注后也同时为节细胞及其轴突的再生提供了氧等条件,传统观点以及以往研究观察也认为视网膜神经元以及轴突损伤后不能再生。直到有实验将周围神经片段植入玻璃体腔,可以促进受损的视网膜节细胞轴突再生,表明节细胞的轴突具有再生潜能^[12]。由节细胞轴突所构成的视网膜神经纤维层是各类缺血性眼病中常见损害部位,如青光眼早期可有神经纤维层的损害,视网膜动、静脉阻塞及糖尿病视网膜病中棉絮斑的出现。本实验中我们发现,在大鼠 RIR 后 6h 即出现视网膜组织的水肿,神经纤维层的断裂,组织细胞肿胀,核固缩。表明在 RIR 损伤后,神经纤维层严重损伤。神经纤维层由节细胞的轴突构成,其修复再生困难,可能是导致 RIR 后视功能损害的重要因素。本实验研究观察到 Nogo-A 在 RIR 损伤后 12h 表达上升,48h 达到高峰,72h 开始下降,168h 达到正常基线水平,表明 Nogo-A 可能在 RIR 损伤中有着重要作用。同样我们发现 NgR 的表达曲线类似于

Nogo-A,NgR 作为 Nogo-A 的受体,两者协同作用,达到 RIR 损伤后抑制节细胞轴突修复再生的目的。

NgR 在再灌注 6h 即开始升高,Nogo-A 在再灌注 12h 才出现升高,考虑为由于 NgR 为三种轴突生长抑制因子 Nogo 蛋白、髓鞘相关糖蛋白(MAG)、少突胶质细胞髓磷脂相关糖蛋白(OMGP)的共同受体^[13],故猜想在 RIR 损伤的早期,亦有其他轴突生长抑制因子参与作用,抑制损伤后节细胞轴突的修复再生。

目前研究认为 Nogo-A 对中枢神经纤维轴突再生的抑制作用与髓鞘相关^[6],Nogo-A 对视神经损伤后抑制视神经的修复再生亦认为与髓鞘有着密切的关系。节细胞轴突在视网膜内无髓鞘,不同于筛板后的视神经。因此,在 RIR 损伤中 Nogo-A 对节细胞轴突再生的抑制机制可能不同于目前研究中的 Nogo-A 对中枢神经及视神经再生抑制机制,需更多的实验进一步研究。

在视网膜的缺血性疾病中,如何做到及早解除缺血,使视网膜尽快恢复血供,又减少 RIR 损伤的发生,在此类疾病的防治中具有重要意义,相关研究如:抗氧化酶、钙离子阻断剂、神经营养因子可以对 RIR 损伤产生保护作用,目前已有神经营养因子药物应用于临床。Nogo 抗体的应用可促进神经结构的重塑及功能的恢复^[7,14],在视网膜神经节细胞处于激活的生长期时中和 NgR 提高视神经的再生能力^[15],诸如此类的研究以及结合本实验,提示对抗 Nogo-A 或 NgR 可能为 RIR 损伤的治疗提供新的方向。

参考文献

- Hu F, Liu BP, Budel S, et al. Nogo-A interacts with the Nogo-66 receptor through multiple sites to create an isoform-selective subnanomolar agonist. *J Neurosci* 2005;25(22):5298-5304
- Zhuhua H, Liangdong L, Xiao L, et al. Effect of 3(′)-daidzein sulfonic sodium on the anti-oxidation of retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Adv Exp Med Biol* 2010;664:585-591
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000;403(6768):439-444
- Fournier AE, Grandpre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 2001;409(6818):341-346
- Liu BP, Fournier A, GrandPre T, et al. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 2002;297(5584):1190-1193
- 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(6768):434-439
- Seymour AB, Andrews EM, Tsai SY, et al. Delayed treatment with

monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(10):1366-1375

8 Papadopoulos CM, Tsai SY, Alsbie T, et al. Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Ann Neurol* 2002;51(4):433-441

9 Xiaolei Y, Rongdi Y, Shuxing J, et al. The expression patterns of Nogo-A and NgR in the neonatal rat visual nervous system. *Neurochem Res* 2009;34(7):1204-1208

10 Mingorance A, Fontana X, Sole M, et al. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci* 2004;26(1):34-49

11 Abdesselem H, Shypitsyna A, Solis GP, et al. No Nogo66- and NgR-

mediated inhibition of regenerating axons in the zebrafish optic nerve. *J Neurosci* 2009;29(49):15489-15498

12 Berry M, Carlile J, Hunter A. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol* 1996;25(2):147-170

13 Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, et al. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002;420(6911):74-78

14 Brenneman MM, Wagner SJ, Cheatwood JL, et al. Nogo-A inhibition induces recovery from neglect in rats. *Behav Brain Res* 2008;187(2):262-272

15 Fischer D, He Z, Benowitz LI. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 2004;24(7):1646-1651

《国际眼科杂志》中文版英文刊名 更改为 International Eye Science

遵照有关专家建议,为了把《国际眼科杂志》中文版和英文版共用的英文刊名彻底分开,经请示新闻出版主管部门同意,自2012年1月起,《国际眼科杂志》中文版英文刊名由原来的 International Journal of Ophthalmology 更改为 International Eye Science (IES),《国际眼科杂志》英文版专用刊名为 International Journal of Ophthalmology (IJO),特此公告。

国际眼科杂志社

2011-12-25