

# 三七三醇皂苷对局灶脑缺血再灌注大鼠不同恢复时期脑组织 Nogo-A mRNA 和蛋白表达的影响

张利军 白宇 侯郁青 程记伟 陆蕴菊 张曦华

上海中医药大学附属普陀医院神经内科 (上海 200062)

**【摘要】** 目的: 观察局灶性脑缺血再灌注后 Nogo-A mRNA 和蛋白表达的动态变化, 以及三七三醇皂苷 (PTS) 对其影响。方法: 将健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和药物干预组 (PTS 组), 采用 Longa 线栓法制备大鼠中动脉阻塞与再灌注大鼠短暂局灶性脑缺血模型。药物干预后, 采用 RT-PCR 结合免疫组织化学技术检测大鼠缺血再灌注后不同时期 (3 d, 7 d) 脑组织 Nogo-A mRNA 和蛋白的表达。结果: 模型组 Nogo-A mRNA 和蛋白表达在缺血再灌注损伤后 3 d 时下降, 7 d 时上升。PTS 组在 3 d 时大脑皮层和海马 Nogo-A 表达比模型组低, 但差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 7 d 时 Nogo-A 表达明显低于模型组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。结论: PTS 可使缺血再灌注大鼠的 Nogo-A 表达下降, 这可能是其发挥脑保护作用的机制之一。

**【关键词】** 三七三醇皂苷; Nogo-A mRNA; 脑缺血再灌注; 大鼠

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-861X(2010)01-0059-04

Nogo 蛋白是中枢神经系统髓磷脂中一种抑制轴突生长的蛋白是抑制成年动物中枢神经再生的髓鞘内活性分子<sup>[1]</sup>。Nogo 有 3 种同源异构体, Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C。其中 Nogo-A 广泛存在于中枢神经系统内, 是哺乳动物中枢神经损伤后神经再生障碍的重要原因之一<sup>[2]</sup>。三七三醇皂苷 (PTS) 为三七类新药, 其主要活性成分 Rg1 的含量达 60% 以上, Rg1、R1、Re 三者的含量约达 80%, 已经证实 PTS 对缺血再灌注脑损伤有保护作用<sup>[3]</sup>。但有关 PTS 对大鼠局灶脑缺血再灌注后 Nogo-A mRNA 和蛋白表达影响的研究未见报道。本试验观察 PTS 治疗大鼠局灶脑缺血再灌注 3、7 d 后, 对 Nogo-A mRNA 和蛋白表达及神经功能康复的影响。

## 1 材料与方 法

1.1 动物分组与模型制备 健康雄性 SD 大鼠 72 只, 体质量 (260 ± 10) g, 由中国科学院啮齿类实验

动物中心提供 (合格证号: 0027521)。随机分为假手术组、模型组和药物干预组 (PTS 组), 每组各 24 只。采用 Longa 线栓法阻塞大鼠大脑中动脉, 建立急性局部脑缺血模型<sup>[4]</sup>。用 7% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 60 min 后将尼龙线轻柔拉回致颈外动脉处, 即为再灌注开始。假手术组将尼龙线仅留在颈内动脉而不入颅, 60 min 后将尼龙线拉回致颈外动脉处。

1.2 药物干预与检测指标 PTS, 成都华神集团股份有限公司制药厂提供 (生产批号: 060201)。PTS 组灌胃, PTS 悬浊液, 50 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>; 假手术组与模型组灌胃, 0.9% 氯化钠注射液, 1 ml · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>。每组各 12 只, 造模成功后各组每天灌胃两次, 连续 7d。分别于术后第 3、7 天不同时点从各组随机取出 6 只大鼠, 断头处死大鼠, 在冰上快速剥离缺血侧和健侧大脑皮质和海马, 将分离出的组织分别称重后放入 Epp 管中, 置液氮中迅速冷却后放入 -80℃ 冰箱中保存待行 RT-PCR 检测; 另每组各时点的 6 只大鼠固定取材后, 行免疫组化检测。

1.3 RT-PCR 反应 RT-PCR 半定量检测 mRNA 水平。①取上述样本 1 份, 按常规提取总 RNA, 经紫外分光光度计检测 RNA 的浓度。②反转录: 取组织总 RNA 2 μg, 4 × dNTP (each 10 mmol/L) 1 μl, 六聚体随机引物 (100 μmol/L) 1 μl, 加水至 12 μl, 65℃

[基金项目] 上海中医药大学附属普陀医院科研基金资助项目 (2007J026A)

[作者简介] 张利军, 男, 在读硕士生, 主治医师, 主要从事脑血管病及神经免疫的临床与基础研究。

[通讯作者] 白宇, 主任医师, 硕士生导师。

E-mail: baiyu\_bb@sina.com

5 min,快速插入冰水中,离心,冰上加入  $5 \times$  buffer 4  $\mu$ l、DTT (100 mmol/L) 2  $\mu$ l、RNasin (40 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 25 $^{\circ}$ C 10 min,加入 M-MLVRT 反转录酶(200 U/ $\mu$ l)1  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 50 min, 70 $^{\circ}$ C 15 min(灭活逆转录酶), -20 $^{\circ}$ C 保存。③ PCR 扩增:上游引物: CTC-GAGCCCCAGTGAAAGACGCG; 下游引物: GGT-GTTTCGTCCTTCCACAAGGGCCTGATCCAG。4 \* dNTP(each 2.5 mmol/L) 2  $\mu$ l、10  $\times$  buffer(含镁离子) 4  $\mu$ l、上游引物(5  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ l、下游引物(5  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ l、反转录产物 2  $\mu$ l、Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ l) 0.4  $\mu$ l,加水至 40  $\mu$ l。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min;循环参数:94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,退火 40 s, 55 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。④电泳:取 PCR 产物 25  $\mu$ l 与上样缓冲液 5  $\mu$ l 混匀后,上样于 1.6% 的琼脂糖凝胶中,其中一孔加 DNA marker,80 V 电压,电泳 1 h。紫外灯下观察、电脑照相储存,用 Molecular Analyst<sup>TM</sup> 软件作吸收光度容积定量分析, $\beta$ -actin 为参比对照。

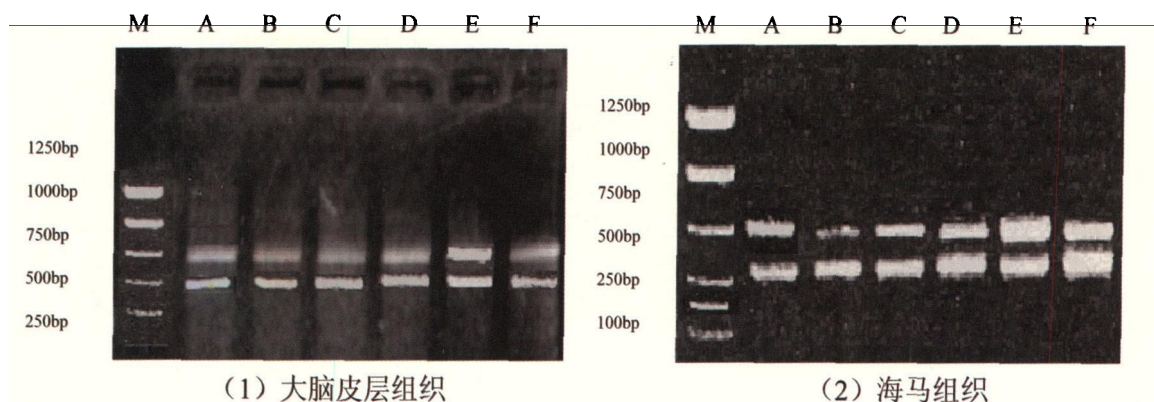
1.4 免疫组化 用 7% 水合氯醛麻醉,经左心室向主动脉插管,并灌注 4 $^{\circ}$ C 含 10 U 肝素的生理盐水 50 ml,然后换用 4 $^{\circ}$ C 40 ml/L 多聚甲醛缓冲液,断头取脑,固定 3 h 后立即冰冻切片,厚度 30  $\mu$ m,石

蜡包埋。兔抗鼠 Nogo-A,使用 SABC 法染色,DAB 显色。检测严格按照说明书操作步骤进行。切片在统一放大倍数( $\times 100$ )下,随机选 10 个视野,输入图像分析系统,记取平均阳性细胞数。

1.5 统计学方法 全部数据均采用 SPSS for Window 11.5 软件包进行统计分析,比较各组 Nogo-A 免疫反应阳性信号值。

## 2 结果

2.1 对脑组织 Nogo-A mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测显示,模型组 Nogo-A mRNA 表达在缺血再灌注损伤后 3 d 时下降,7 d 时上升。模型组第 3 天的大脑皮层和海马 mRNA 表达水平比假手术组第 3 天低,但无统计学差异( $P > 0.05$ );PTS 组第 3 天大脑皮层和海马 mRNA 表达水平比模型组低,无显著差异( $P > 0.05$ )。模型组第 7 天大脑皮层和海马 mRNA 表达水平比假手术组第 7 天组高,两者有显著差异( $P < 0.01$ ),PTS 组第 7 天大脑皮层和海马 mRNA 表达水平比模型组第 7 天低,有显著差异( $P < 0.01$ )。PTS 组第 7 天大脑皮层和海马 mRNA 表达和假手术组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。见图 1。



M: Maker; A: 假手术组 3 d; B: 模型组 3d; C: PTS 组 3 d; D: 假手术组 7 d; E: 模型组 7 d; F: PTS 组 7 d

图 1 各组大脑皮层与海马组织 mRNA 表达

2.2 对脑组织 Nogo-A 蛋白表达的影响 着色强度按切片中细胞着色有无及深浅记分。免疫组化检测显示,Nogo 蛋白定位于神经元胞浆及突起内,多呈棕黄色颗粒状。模型组 3 d,Nogo-A 中等阳性表达(++) ;PTS 组 Nogo-A 中等阳性表达(++),假手术组呈弱阳性表达(+)。模型组 7 d,Nogo-A 呈强阳性表达(+++) ;PTS 组 Nogo-A 呈中阳性表达(++),假手术组呈弱阳性表达(+)。见表 1,图 2。

表 1 不同时间点各组大脑组织免疫组化阳性细胞平均数比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	3 d	7 d
假手术组	6	13.56 $\pm$ 4.21	13.78 $\pm$ 3.89
模型组	6	12.92 $\pm$ 4.15 <sup>▲</sup>	17.62 $\pm$ 4.98 <sup>△△</sup>
PTS 组	6	11.04 $\pm$ 3.67 <sup>△*</sup>	14.14 $\pm$ 3.21 <sup>▲**</sup>

注:与假手术组比较,▲ $P > 0.05$ ,△ $P < 0.05$ ,△△ $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P > 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

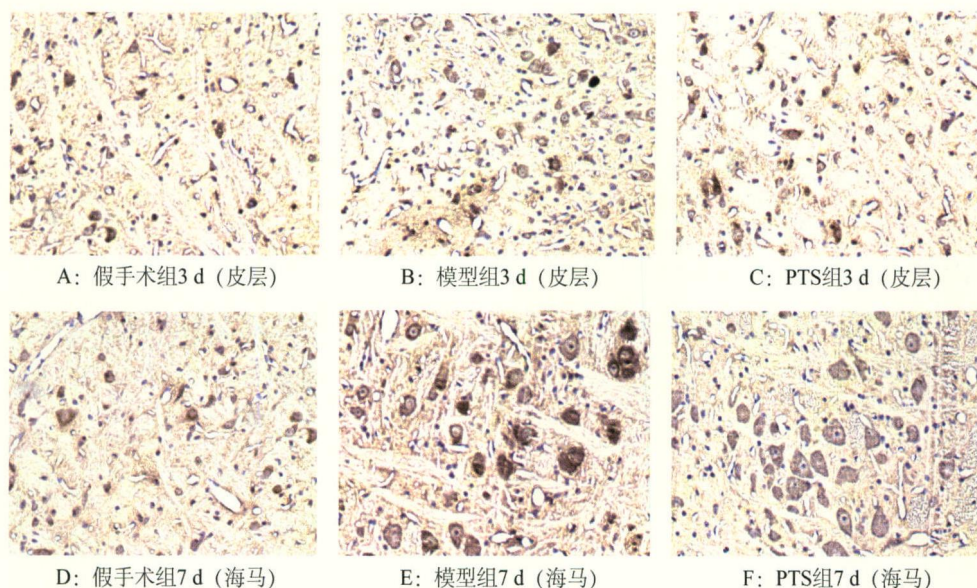


图2 各组脑组织 Nogo-A 蛋白表达(SP 染色, ×200)

### 3 讨论

各种抑制因素的作用是导致脑梗死后神经纤维再生受限的重要原因,是造成中枢神经损伤后遗症的重要因素。目前多数学者认为,如不能有效解除抑制因素的作用,中枢神经再生难以达到有效的康复水平<sup>[5]</sup>。

Chen 等于 2000 年报道了编码神经突起生长抑制因子的基因序列<sup>[1]</sup>,分别命名为 Nogo-A、B、C 蛋白,认为其中 Nogo-A 显示出强烈的神经生长抑制作用。少突胶质细胞表面分离出蛋白分子,获得相应单克隆抗体,其中抗体 IN-1 可明显促进神经生长<sup>[6-7]</sup>。大鼠脊髓横断后使用 IN-1 抗体可使皮质脊髓束纤维再生达 10 ~ 20 mm,明显高于对照组(1 mm),这提示 Nogo-A 主要表达于中枢神经系统,可能位于神经元和形成髓鞘的少突胶质细胞中。Hauben 等<sup>[8]</sup>还研究了 Nogo 的疫苗对 CNS 再生的影响,发现用包有 Nogo-A 在内的髓磷脂相关蛋白免疫动物后,可促进脊髓不完全损伤动物的恢复,这种恢复作用是通过减少损伤后的神经退行性变实现的,并由 T 淋巴细胞介导。最近的一项研究显示,大鼠大脑皮质、海马、脑干、小脑等部位都有 Nogo-A 阳性表达,说明 Nogo-A 在脑内神经元中广泛存在<sup>[9]</sup>。

有研究使用抗 Nogo-A 后所获得的神经纤维再生是有功能性的,并能形成具有功能的突触联系<sup>[7]</sup>,此结果的出现颇具鼓舞意义,但也有动物实验显示,脑创伤后,Nogo-A mRNA 的表达及蛋白合成并不明显升高<sup>[10]</sup>,这可能与动物种类、实验模型以及观察

时间的不同有关。

本试验中,RT-PCR 和免疫组化检测结果显示在大鼠局灶脑缺血再灌注后早期时,Nogo-A mRNA 和蛋白质表达没有上升,而在恢复后期(7 d) Nogo-A mRNA 和蛋白表达却明显增高。提示脑缺血再灌注后随着时间的推移,神经突起生长抑制因子 Nogo-A 逐渐增多。可能是缺血再灌注早期脑组织缺血变性、坏死伴水肿、神经元及神经纤维破裂、溶解,此时各种蛋白质及神经递质的合成均降低,Nogo-A mRNA 和蛋白的表达减少;随着时间的推移,由于神经组织及结缔组织修复的加快,特别是少突胶质细胞的再生,Nogo-A mRNA 和蛋白的表达量升高,对神经纤维生长的抑制加强,这可能是脑梗死后神经功能恢复减慢的重要原因。本研究通过对 PTS 治疗大鼠短暂脑缺血再灌注损伤的观察,证实该药可有效减小 Nogo-A mRNA 和蛋白表达。PTS 可能产生了类似 Nogo 特异性抗体 NI-1 的作用,而抑制 Nogo-A 的表达,从而起到脑保护作用。

三七是传统中药之一,现代药理研究证实其有抗自由基作用,同时还具有抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环及抗炎等作用。有研究显示 PTS 具有增强预缺血诱导的脑缺血耐受作用,并上调 GFAP、bFGF 表达<sup>[11]</sup>。最近发现,PTS 可上调缺血再灌注大鼠的 Nestin 表达、减少 caspase-3 表达、抑制脑缺血再灌注后炎症因子分泌及细胞凋亡、减小脑梗死体积,从而起到脑保护作用<sup>[3,12-13]</sup>。因此推测,PTS 发挥脑保护作用的机制可能与上述众多因素有关。

## 参考文献:

- [1] 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[J]. *Nature*, 2000, 403(6768):434-439.
- [2] Huber AB, Weinmann O, Brösamle C, *et al.* Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9):3353-3367.
- [3] 张利军, 白宇, 侯郁青, 等. 三七醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积及 caspase-3 表达的影响[J]. *中医药导报*, 2007, 13(9):68-70.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Calson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20:84.
- [5] Zeng JS, Li H, Hong H. The synaptic reconstruction and expression of inhibitory protein in the thalamus and striatum after experimental cerebral infarction in rats[J]. *Zhongguo Linchuang kangfu (Chin J Clin Rehabil)*, 2002, 6(17): 2534-2535.
- [6] Jin WL, Liu YY, Ju G, *et al.* Intra-neuronal localization of nogo-A in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 458(1): 1-10.
- [7] Wang KC, Koprivica V, Kim JA, *et al.* Oligodendrocyte myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth [J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 941-944.
- [8] Hauben E, Ibarra A, Mizrahi T, *et al.* Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26): 15173-15178.
- [9] 程希平, 刘惠玲, 宋朝君, 等. Nogo-A 在成年大鼠脑内神经元的分布[J]. *解剖学报*, 2005, 36(5):465-470.
- [10] 刘雁, 石尚金, 董为伟. 脑梗死后自发性高血压大鼠脑内 Nogo-A mRNA 的表达[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(5): 760-762.
- [11] 周俊英, 刘小利, 罗祖明. 三七醇皂苷增进大鼠脑缺血耐受的作用及对 GFAP 和 bFGF 表达的影响[J]. *华西药理学杂志*, 2005, 20(6):489-492.
- [12] 赵红念, 胡晓松, 周东, 等. 三七醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 Nestin 表达的影响[J]. *华西医学*, 2005, 20(2): 297-299.
- [13] 刘宗超, 周官恩, 赵克建, 等. 三七醇皂苷对大鼠脑缺血再灌注脑损伤保护作用的实验研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2007, 24(2):38-40.

编辑:白玉金

收稿日期:2009-10-29

## Effects of PTS on Nogo-A mRNA and Protein Expression in Brain Tissue of Rats with Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion in Different Recovery Periods

ZHANG Li-jun BAI Yu HOU Yu-qing CHENG Ji-wei LU Yun-ju ZHANG Xi-hua

Department of Neurology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

**ABSTRACT Objective:** To investigate the dynamic changes in Nogo-A mRNA and protein expression in brain tissue of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion as well as the effects of PTS (PTS) on it. **Methods:** The male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and drug intervention group (PTS group), and the model of acute reperfusion injury after cerebral ischemia in rats was established by middle cerebral artery occlusion. After drug intervention, the mRNA and protein expression of Nogo-A in the brain tissue was determined by RT-PCR and immunohistochemistry in different periods of reperfusion (3 d, 7 d). **Results:** The mRNA and protein expression of Nogo-A in model group was decreased on the third day and increased significantly on the seventh day; while, in the PTS group, the expression of Nogo-A was decreased on both the third day and seventh day, with the former similar to that of the model group ( $P > 0.05$ ) and the latter significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The PTS can down-regulate the expression of Nogo-A in rats with ischemia-reperfusion injury, which may be one of the mechanisms for its protection to brain.

**KEY WORDS** PTS; Nogo-A mRNA; cerebral ischemia-reperfusion; rat