

· 基础研究 ·

电刺激对海马表达 Nogo-A 蛋白的影响

熊南翔 赵洪洋 张方成

【摘要】目的 探讨慢性电刺激对大鼠海马表达 Nogo-A 蛋白表达的影响,以了解海马 Nogo-A 蛋白升高与癫痫发生的因果关系。**方法** 70 只大鼠随机分为 5 组,即 4 个电刺激组,1 个假电刺激组,分别电刺激 1,3,6,9 d,对海马进行免疫组织化学染色和蛋白印迹实验,检测海马表达 Nogo-A 蛋白的情况。**结果** 假电刺激组 14 只大鼠行为均无异常;电刺激 1 d 与 3 d 组大鼠亦未发生抽搐;电刺激 6 d 组有 3 只发生抽搐,电刺激 9 d 组在刺激 6 d 时,有 1 只发生抽搐,刺激 9 d 时有 13 只发生抽搐。同时,免疫组织化学实验发现,在电刺激 3,6,9 d 后,海马 Nogo-A 蛋白表达量与假电刺激组相比均有显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其升高趋势呈电刺激时间的依赖性($r = 0.775$),蛋白印迹实验结果基本相同。**结论** 海马 Nogo-A 蛋白表达的量与电刺激的时间呈正相关,而在发生癫痫之前大鼠海马 Nogo-A 蛋白表达已经升高。

【关键词】 海马; Nogo-A; 电刺激; 癫痫

Effects of electric stimulation on Nogo-A expression in hippocampus of rats XIONG Nan-xiang, ZHAO Hong-yang, ZHANG Fang-cheng. Department of Neurosurgery, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】Objective To explore the effects of chronic electrical stimulation (ES) on Nogo-A expression in the hippocampus of rats. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into a control group and 4 experimental groups. The rats in the control group were given sham ES, while those in the experimental groups received 1, 3, 6, or 9 days of ES before being sacrificed for the detection of Nogo-A expression in the hippocampus by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** There was a positive correlation between the level of Nogo-A expression and the duration of ES, as shown by the immunohistochemistry technique. Western blotting showed the same result. **Conclusion** In general, seizure occurred 8 days after electrical stimulation began. Elevated Nogo-A expression in the hippocampus began earlier than seizures in the epilepsy model groups.

【Key words】 Hippocampus; Nogo-A; Electrical stimulation; Epilepsy

Nogo-A 蛋白是中枢神经系统抑制轴突生长的蛋白质,有研究发现 Nogo-A 蛋白在颞叶癫痫患者的海马神经元中表达升高,提示 Nogo-A 蛋白与颞叶癫痫疾病有联系。但是,癫痫发作时神经细胞的异常放电是否为 Nogo-A 蛋白表达升高的原因,还是由于其它原因导致 Nogo-A 蛋白表达升高再引起神经细胞异常放电,目前尚不清楚。因此,本研究采用重复慢性电刺激大鼠右后背海马的方法制作癫痫模型,检测从电刺激开始到发生癫痫之间的不同时段大脑海马中 Nogo-A 蛋白的表达,报道如下。

材料和方法

一、材料

1. 动物和试剂:成年 Wistar 大鼠 70 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,雌雄不拘,体重为 (200 ± 20) g,按照随机分类表分为 5 组,即 4 个电刺激组和 1 个假电刺激组(对照组),每组 14 只;羊抗

Nogo-A 多克隆抗体购自 Santa-Cruz 公司,二抗兔抗羊 IgG 和二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自北京中杉公司,电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)系统购自武汉凌飞公司。

2. 仪器:刺激器型号(SEN-7203, Nihon Kohden, Japan),刺激隔离器(SS120J, Nihon Kohden, Japan)。

二、方法

1. 大鼠脑海马电刺激:参照韩丹等^[1]的方法,将大鼠用异戊巴比妥(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后固定在自制的立体定向仪上,轻轻咬开右侧海马处颅骨,挑开硬脑膜,不锈钢双极铜芯电极丝(直径为 0.1 mm ,间距为 0.1 mm ,阻抗为 $0.2 \sim 0.3 \text{ M}\Omega$)用于施加电刺激,根据大鼠脑立体定位图谱,将不锈钢双极铜芯电极置于右背侧海马 CA1 基树突区,不锈钢双极电极尖端位置:前卤后方 2 mm ,中线旁 2 mm ,深度为硬膜下 2 mm 。动物四肢被缚住以制动,用牙托粉将电极固定于颅骨,刺激电源为(60 Hz , 0.6 mA)交流电,持续时间为 2 s ,每天 1 次,4 个电刺激组大鼠电刺激时间分别为 1,3,6,9 d。

2. 免疫组织化学实验:分别取电刺激海马区 1,3,6,9 d 后的大鼠,每组取 8 只,经腹腔麻醉,灌注固定,灌注

基金项目:国家自然科学基金课题(No. 30471775)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科

液为生理盐水 200 ml、4% 多聚甲醛-磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 500 ml, 打开大鼠颅腔, 剪下大鼠前脑, 浸入上述固定液 24 h 后再浸入 25% 蔗糖溶液中。对视交叉上方前脑标本行连续冠状冰冻切片 (厚 20 μm), 隔 2 张取 1 张, 分 3 套收集。羊抗 Nogo-A 多克隆抗体 (1:200) 4℃ 孵育 48 h, 然后生物素标记的兔抗羊 IgG (1:400) 37℃ 孵育 45 min, 辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 45 min。DAB 显色, 常规脱水、透明、封片。取第 2 套切片做空白对照实验, 以 PBS 代替一抗血清进行免疫组织化学反应。取第 3 套切片做替代实验, 以与一抗血清同浓度的正常兔血清代替一抗血清进行免疫组织化学反应。每例动物随机取切片 3 张, 在 10×20 倍显微镜下, 取海马彩图, 用 HMIAS-2000 图文分析系统进行图像分析, 比较免疫反应平均光密度值。

3. 蛋白印迹实验: 分别取电刺激海马区后 1, 3, 6, 9 d 的大鼠, 每组取 6 只, 腹腔麻醉后手术显微镜下暴露前脑, 切下海马回, 加 5 倍体积预冷的缓冲液 I 冰上匀浆 10 min, 匀浆液 4℃, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 留上清液, 与等体积的缓冲液 II 混合, 100℃ 沸水浴 10 min, 置冰上冷却; 蛋白样品 (15 μg) 进行 8% SDS-PAGE 恒压电泳; 电泳结束后将蛋白恒流 300 mA 转移至聚偏二氯乙烯 (Polyvinylidene chloride, PVDF) 转印膜; 转移后的 PVDF 转印膜进行免疫反应, 加入 5% 的脱脂奶粉中 37℃ 封闭 2 h, 然后依次加入兔抗 Nogo-A 抗体 (1:600) 37℃ 孵育 2 h, 生物素化的羊抗兔 IgG (1:800) 37℃ 孵育 1 h, ECL 法显色, 以上各步骤之间用 PBS 充分洗涤。PVDF 膜常温晾干后拍照并进行图像扫描, 分析各条带的积分光度值。

三、统计学分析

所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学方法比较各组 Nogo-A 蛋白的表达量的差异, 统计方法为单因素方差分析, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析和 Pearson 直线相关分析, 所用统计软件为 SPSS 11.0 软件。

结 果

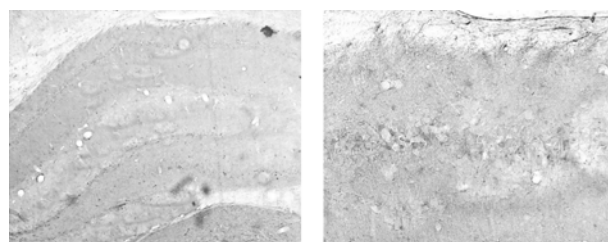
一、电刺激结果

假电刺激组的 14 只大鼠行为均无异常; 电刺激 1 d 和 3 d 组的大鼠亦未发生抽搐; 电刺激 6 d 组有 3 只发生抽搐, 电刺激 9 d 组在刺激 6 d 时有 1 只发生抽搐, 刺激 9 d 时有 13 只发生抽搐。

二、大鼠海马 Nogo-A 蛋白免疫组织化学染色

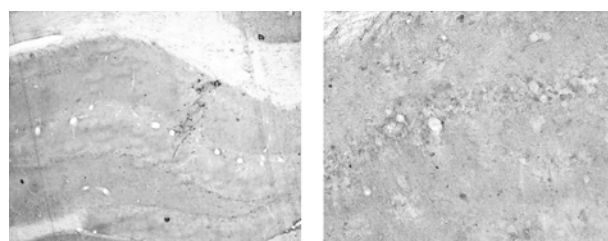
5 组大鼠在海马部位均见呈胞浆和胞核染色的阳性神经元, 高倍镜下呈棕色颗粒状, 阳性神经元在海马的 CA1 区、CA3 区、齿状回均存在, 假电刺激组阳性神经元少, 染色浅 (图 1), 电刺激 1 d 后, 海马区表达 Nogo-A 的阳性神经元未见明显增多 (图 2), 电刺激 3,

6, 9 d 后的试验组阳性神经元明显增多 (图 3~5), 免疫阳性染色较深, 免疫阳性物质位于胞浆和胞核, 各组 Nogo-A 阳性表达的比较见表 1。



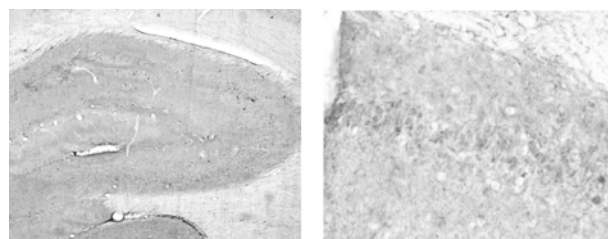
a(免疫组化染色, $\times 40$) b(免疫组化染色, $\times 200$)

图 1 假电刺激组海马 Nogo-A 染色结果



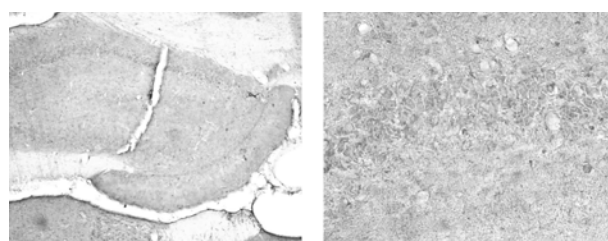
a(免疫组化染色, $\times 40$) b(免疫组化染色, $\times 200$)

图 2 电刺激 1 d 组海马 Nogo-A 染色结果



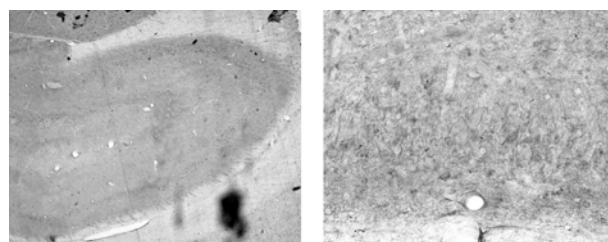
a(免疫组化染色, $\times 40$) b(免疫组化染色, $\times 200$)

图 3 电刺激 3 d 组海马 Nogo-A 染色结果



a(免疫组化染色, $\times 40$) b(免疫组化染色, $\times 200$)

图 4 电刺激 6 d 组海马 Nogo-A 染色结果



a(免疫组化染色, $\times 40$) b(免疫组化染色, $\times 200$)

图 5 电刺激 9 d 组海马 Nogo-A 染色结果

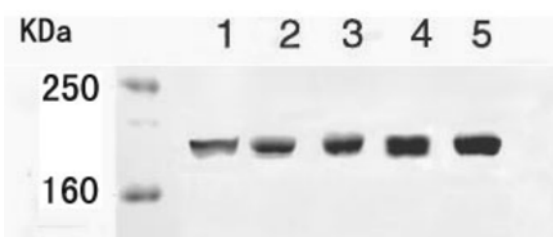
表 1 各组大鼠海马免疫组织化学染色的平均光密度值

组 别	n	Nogo-A 表达 ($\bar{x} \pm s$)	95% 可信区间
假电刺激组	8	20.53 $\pm$ 3.58	17.52 ~ 23.34
电刺激 1 d 组	8	21.20 $\pm$ 2.94	18.07 ~ 23.59
电刺激 3 d 组	8	28.41 $\pm$ 5.56	23.71 ~ 32.55 *
电刺激 6 d 组	8	39.53 $\pm$ 7.18	32.64 ~ 47.78 *
电刺激 9 d 组	8	46.23 $\pm$ 10.15	36.41 ~ 56.18 #

注:电刺激 1 d 组 Nogo-A 表达量与假电刺激组比较, $P > 0.05$; 电刺激 3, 6 d 组与假电刺激组比较, * $P < 0.05$; 电刺激 9 d 组与假电刺激组比较, # $P < 0.01$; Nogo-A 表达量与电刺激时间呈显著正相关($r = 0.775$)

三、蛋白印迹实验结果

不同分子量的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳分离出来, Western blot 显示在相对分子质量 20 000 处, 假电刺激组和电刺激 1, 3, 6, 9 d 组均可见阳性条带(图 6), 鼠源 Nogo-A 蛋白的分子量为 20 000, 表明每组都有 Nogo-A 蛋白的表达, 软件分析各样本蛋白条带的积分光密度值结果见表 2。



注:条带 1 代表假电刺激组海马 Nogo-A 蛋白的表达, 条带 2, 3, 4, 5 分别代表电刺激 1, 3, 6, 9 d 组海马 Nogo-A 蛋白的表达

图 6 各组海马表达 Nogo-A 蛋白的 Western-blot 结果**表 2** 各组大鼠海马 Western blot 结果的积分光度值

组 别	n	Nogo-A 表达 ($\bar{x} \pm s$)	95% 可信区间
假电刺激组	6	48.75 $\pm$ 3.94	45.86 ~ 52.19
电刺激 1 d 组	6	47.77 $\pm$ 5.61	42.42 ~ 52.74
电刺激 3 d 组	6	59.80 $\pm$ 7.18	52.35 ~ 66.15 *
电刺激 6 d 组	6	71.40 $\pm$ 10.55	61.76 ~ 81.04 *
电刺激 9 d 组	6	89.80 $\pm$ 13.79	76.70 ~ 102.41 #

注:电刺激 1 d 组 Nogo-A 表达量与假电刺激组比较, $P > 0.05$; 电刺激 3, 6 d 组与假电刺激组比较, * $P < 0.05$; 电刺激 9 d 组与假电刺激组比较, # $P < 0.01$; Nogo-A 表达量与电刺激时间呈显著正相关($r = 0.812$)

讨 论

Nogo-A 是中枢神经系统中能够抑制外伤后中枢轴突再生的蛋白质, Nogo-A 在正常神经组织中也有表达, 特别是在发育期的神经组织中表达量更高, 探讨该蛋白质的功能是有关 Nogo-A 研究的重点。最近 Meier 等^[2]发现, 海人草酸诱导大鼠发生癫痫后, 海马中的 Nogo-A mRNA 的水平与正常大鼠相比有明显升高。Bandtlow 等^[3]以癫痫患者行手术切下的海马组织为研究对象, 检测海马神经元 Nogo-A 蛋白的表达情况, 发现它的表达

量比正常人高。上述的两个研究结果都是显示癫痫发生后海马组织中 Nogo-A 蛋白或 mRNA 的水平升高, 说明神经元 Nogo-A 的表达与癫痫的发病有密切联系, 但不能表明海马 Nogo-A 的表达与癫痫的发病的因果关系。本实验利用电刺激海马诱导大鼠发生癫痫的模型, 采用免疫组织化学法和 Western blot 方法检测了电刺激开始到发生癫痫的过程中的不同时段 Nogo-A 蛋白的表达情况, 结果显示, 电刺激 1 d 后, Nogo-A 蛋白的表达没有明显变化; 3 d 后开始出现阳性细胞表达率和阳性染色强度的增加, 随着电刺激时间的延长, 海马中 Nogo-A 蛋白的表达水平逐渐升高。这表明, 在电刺激状态下, 从第 3 天开始, 发生癫痫之前, 大鼠海马神经元中 Nogo-A 蛋白的表达量就有升高, 也就是说, 在大鼠还没有发生癫痫时, 海马中的 Nogo-A 蛋白的表达量已经增加, 假电刺激组表达无明显差异, 回归分析结果表明, 电刺激与 Nogo-A 蛋白的表达有密切联系, 两者呈正相关, 所以说, 海马中 Nogo-A 表达的增加是电刺激的结果。

分析 Meier 等^[2]的研究结果, 海人草酸诱导癫痫大鼠海马中的 Nogo-A mRNA 的水平明显升高, 以及 Bandtlow 等^[3]发现癫痫患者海马神经元 Nogo-A 蛋白的表达量比正常人高, 可能是癫痫发作后, 神经细胞异常放电, 细胞在电刺激后反应性表达 Nogo-A 蛋白和 mRNA。

目前还有其它一些有关 Nogo-A 蛋白的功能的研究发现 Nogo-A 与中枢神经形态发育有密切关系。Gianola 等^[4]用抗 Nogo-A 的单克隆抗体作用于 P10 的发育大鼠的皮质内束, 以中和 Nogo-A 蛋白的作用, 发现可使少突胶质细胞成熟延迟, 皮质内束的形态发育也推迟, 说明 Nogo-A 介导的相关机制对轴突联系的发育具有重要的作用。Weiss 等^[5]研究了新生大脑缺氧模型, 该模型的脑轴突连接明显紊乱, 检测少突胶质细胞蛋白表达的情况发现 Nogo-A 蛋白和髓鞘相关糖蛋白表达明显减少; Mingorance 等^[6]和 O'Neill 等^[7]都发现 Nogo-A 与其受体 NgR 在发育的中枢神经中的表达与神经环路连接的发育(neural circuitry)有关; 还有 Wang 等^[8]报道 Nogo-A 和 NgR 在轴突-胶质细胞交界的突触膜上有表达, 暗示它们可能参与突触形成。综上所述, 目前对 Nogo-A 蛋白功能的认识是与轴突的可塑性、发育期神经元之间的联系有关, 但 Nogo-A 具体的功能仍须进一步研究。

参 考 文 献

- 1 韩丹, 张先荣, 唐岳枫, 等. 强直电刺激大鼠海马、中部颞叶新皮质诱发癫痫模型中电振荡与癫痫发生的关系研究. 中国神经科学杂志, 2000, 16: 108-114.
- 2 Meier S, Brauer AU, Heimrich B, et al. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. FASEB J, 2003, 17: 1153-1155.
- 3 Bandtlow CE, Dlaska M, Pirker S, et al. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy. Eur J

- Neurosci, 2004, 20:195-206.
- 4 Gianola S, Savio T, Schwab ME, et al. Cell-autonomous mechanisms and myelin-associated factors contribute to the development of Purkinje axon intracortical plexus in the rat cerebellum. J Neurosci, 2003, 23: 4613-4624.
 - 5 Weiss J, Takizawa B, McGee A, et al. Neonatal hypoxia suppresses oligodendrocyte Nogo-A and increases axonal sprouting in a rodent model for human prematurity. Exp Neurol, 2004, 189:141-149.
 - 6 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, 26:34-49.
 - 7 O'Neill P, Whalley K, Ferretti P. Nogo and Nogo-66 receptor in human and chick; implications for development and regeneration. Dev Dyn, 2004, 231:109-121.
 - 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.
- (修回日期:2006-01-19)
(本文编辑:阮仕衡)

· 短篇论著 ·

腰椎间盘突出症的分期治疗疗效观察

高维亮 拓庆银 侯延丽 任秀琴

腰椎间盘突出症是常见、多发病,我们于 2004 年 1 月至 2005 年 10 月对住院的腰椎间盘突出症患者 60 例采用分期综合治疗,并与采用传统综合治疗的腰椎间盘突出症患者 60 例进行疗效对比观察,现报道如下。

一、资料与方法

1. 临床资料:2004 年 1 月至 2005 年 10 月在我科住院的腰椎间盘突出症患者 120 例,临床表现、CT 或 MRI 检查均符合腰椎间盘突出症的诊断,为适合保守治疗而无手术指征者。将 120 例患者随机分为治疗组和对照组,每组 60 例。治疗组中,男 35 例,女 25 例;年龄为 (42.29 ± 3.24) 岁。对照组中,男 30 例,女 30 例;年龄为 (43.15 ± 4.35) 岁。2 组患者的一般情况比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. 治疗方法:治疗组患者入院后首先给予健康教育,然后根据分期实施不同的治疗方案。(1)急性期,急性起病或慢性发病急性加重入院均属急性期。此期以三维牵引为主,配合药物脱水与卧床休息。三维牵引为患者俯卧位固定于三维牵引床上,根据患者的体重和突出的部位先计算出所给的牵引距离 $(50 \sim 70 \text{ mm})$ 和前屈侧翻角度 $(20^\circ \sim 25^\circ)$,给予患者瞬间 $(3 \sim 5 \text{ s})$ 牵引,然后用手术推车将患者送回病床上卧床休息,并给予 20% 的甘露醇 250 ~ 500 ml 静脉滴注,地塞米松注射液 10 mg 加入小壶,每日 1 次,共 3 ~ 5 d,绝对卧床时间最多不超过 1 周。(2)缓解期,上述治疗 3 ~ 5 d 后,患者急性疼痛明显减轻,进入缓解期,有些患者因慢性病情迁延不愈入院,也按缓解期方法治疗。此期以腰椎牵引与手法按摩为主,配合中药熏蒸、干扰电疗及药物治疗。腰椎牵引取仰卧位,牵引重量为体重的 70%,从小剂量开始逐步增加,每次持续牵引 30 min,然后给予局部手法放松按摩、中药熏蒸和干扰电治疗,治疗结束后用腰围固定腰部,并用复方丹参注射液 20 ml 稀释后静脉滴注、维生素 B₁₂ 注射液 500 μg 加维生素 B₁ 注射液 100 mg 肌肉注射,每日 1 次,共治疗约 2 周。(3)恢复期,经过缓解期的治疗,患者的症状已基本消失,腰椎活动度明显改善,此时进入恢复期,此期治疗以运动疗法为主,腰椎牵引、手法按摩及局部物理因子治疗为辅。运动方法:①患者仰卧于病床上,双腿在空中作蹬自行车 30 次,然后抬起腰部和臀部,并持续数 10 s,反复 10 ~ 20 次;②患者俯卧于病床上,行“胸腹着床式”锻炼,即双手尽量向前上方伸举,双腿尽量向后上方伸举,胸腹部着床并持续数秒,反复 10 ~ 20 次;③向后走,在病区楼道内每日向

后走 30 min。此期治疗约 1 周。

对照组综合应用药物、腰椎牵引、局部手法按摩、中药熏蒸及干扰电疗,具体方法同治疗组,但不给予“三维牵引”,也不进行分期治疗。

3. 疗效评定标准:2 组患者的疗程均为 4 周,于治疗前及疗程结束后按国家中医药管理局《中医病症诊断疗效标准》^[1] 进行疗效评定。治愈——腰腿痛消失,直腿抬高 $> 70^\circ$,恢复正常工作;好转——腰腿痛减轻,腰部功能活动改善;无效——症状体征无改变。

4. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据分析。

二、结果

治疗组治愈 30 例 (50%)、好转 28 例 (47%)、无效 2 例 (3%),有效率为 97%;对照组治愈 15 例 (25%)、好转 30 例 (50%)、无效 15 例 (25%),有效率为 75%,2 组的有效率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

三、讨论

腰椎间盘突出症急性期疼痛的主要原因是神经根受压和无菌性炎症水肿,所以在急性期以“三维牵引”和脱水、抗炎为主,这样可以尽快改变突出物与神经根的位置关系,减轻突出物对脊髓和神经根的刺激和压迫,解除腰部肌肉痉挛,纠正小关节紊乱,有利于神经肌肉组织炎性水肿的吸收,同时脱水治疗与卧床休息可消除神经根周围的炎性水肿,从而改善症状。

在缓解期,调整脊柱的力学平衡成为治疗的重点,故停用药物脱水治疗,改以腰椎牵引与手法按摩为主,局部中药熏蒸、干扰电疗及药物治疗为辅的治疗方法,以解除软组织粘连,调整小关节结构,从而调整腰椎的力学平衡,缓解腰部肌肉痉挛。

恢复期的治疗以加强腰椎稳定性、增强肌肉力量及防止复发作为治疗的重点。进行腰肌训练,加强动力平衡,在一定程度上代偿静力平衡失调对腰椎平衡的影响,从而起到防止复发的作用。另外,此期更应加强对患者的健康教育,使其进一步了解该病症的病因病理过程,以消除焦虑情绪,增强治疗信心,更好地配合治疗,同时纠正生活和工作中的不良姿势,加强出院后主动进行腰肌训练的自觉性,以减少复发。

参 考 文 献

- 1 郁文英. 牵引推拿加功能锻炼治疗腰椎间盘突出症. 颈腰痛杂志, 2005, 26:156.

(收稿日期:2005-12-16)

(本文编辑:松 明)