

神经节苷脂对体外培养一氧化碳损伤少突胶质细胞Nogo-A的影响

王晓虹¹, 王虹², 车菊华⁴, 王苏平¹, 汪涛³, 朱艳玲⁵(大连市中心医院, ¹神经内科, ²综合病房, ³康复病房, 辽宁省大连市 116033; ⁴大连医科大学, 辽宁省大连市 116044; ⁵大连市第三人民医院神经内科, 辽宁省大连市 116033)

文章亮点:

实验在正常氧浓度的情况下, 采用外源性一氧化碳直接处理体外培养少突胶质细胞, 以排除缺氧影响, 观察少突胶质细胞 Nogo-A 在 mRNA 及蛋白质水平表达的变化及单唾液酸四己糖神经节苷脂对其影响。结果发现一氧化碳本身可使少突胶质细胞进入活跃的功能状态, 提高 Nogo-A 的转录和翻译水平; 单唾液酸四己糖神经节苷脂对神经细胞急性一氧化碳损伤的保护作用与抑制少突胶质细胞 Nogo-A 表达有关。

关键词:

干细胞; 培养; 神经节苷脂; 少突胶质细胞; 一氧化碳; Nogo-A; 迟发性脑病

主题词:

一氧化碳中毒; 脑疾病; 少突神经胶质细胞

基金资助:

大连市卫生局 2008 年度科研计划项目

摘要

背景: Nogo-A 蛋白是表达于少突胶质细胞的神经元轴突生长抑制因子, 推测其可能与一氧化碳中毒后迟发性脑病关系密切。单唾液酸四己糖神经节苷脂可改善一氧化碳中毒所致的神经系统损害, 其作用是否与少突胶质细胞上 Nogo-A 蛋白有关目前尚无报道。

目的: 从少突胶质细胞 Nogo-A 的角度探讨神经节苷脂对神经细胞一氧化碳损伤后保护的机制。

方法: 体外培养大鼠视神经少突胶质细胞。实验分为 3 组: 对照组、一氧化碳组、单唾液酸四己糖神经节苷脂组。后两组在含有体积分数 1% 一氧化碳的密室中培养, 单唾液酸四己糖神经节苷脂组预先在培养液中加入 5 mg/L 单唾液酸四己糖神经节苷脂。采用 RT-PCR 及细胞免疫组织化学观察 6, 24, 48 h 少突胶质细胞 Nogo-A mRNA 及其蛋白质的表达。

结果与结论: 一氧化碳组 6, 24 及 48 h 各间点 Nogo-A mRNA 积分吸光度比值、Nogo-A 蛋白质表达的累计吸光度值均显著高于对照组($P < 0.05$); 一氧化碳处理后 24 h, 单唾液酸四己糖神经节苷脂组 Nogo-A mRNA 积分吸光度比值、蛋白质表达的累计吸光度值均显著高于对照组($P < 0.05$), 但低于一氧化碳组($P < 0.05$); Nogo-A mRNA 水平与蛋白质表达具有线性相关性($r = 0.95$)。提示一氧化碳本身可使少突胶质细胞进入活跃的功能状态, 提高 Nogo-A 的转录和翻译水平; Nogo-A 蛋白质表达的增加为其 mRNA 水平提高所致; 单唾液酸四己糖神经节苷脂对神经细胞急性一氧化碳损伤的保护作用与抑制少突胶质细胞 Nogo-A 表达有关。

王晓虹, 王虹, 车菊华, 王苏平, 汪涛, 朱艳玲. 神经节苷脂对体外培养一氧化碳损伤少突胶质细胞 Nogo-A 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(6):945-949.

Ganglioside effect on Nogo-A expression of rat oligodendrocytes *in vitro* after carbon monoxide poisoning

Wang Xiao-hong¹, Wang Hong², Che Ju-hua⁴, Wang Su-ping¹, Wang Tao³, Zhu Yan-ling⁵ (¹Neurology Department, ²Comprehensive Ward, ³Rehabilitation Ward, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China; ⁴Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; ⁵Department of Neurology, the Third People's Hospital of Dalian, Dalian 116033, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Nogo-A protein is speculated to have close relationship to delayed encephalopathy after carbon monoxide poisoning because it is a kind of neurite growth inhibitor expressing in oligodendrocytes.

Monosialotetrahexosylganglioside can improve nerve damage after carbon monoxide poisoning, but no reports is concerned about whether the neuroprotective effect of ganglioside is related to Nogo-A protein.

OBJECTIVE: To investigate the protective mechanism of ganglioside on nerve cells after carbon monoxide poisoning from the perspective of Nogo-A in oligodendrocytes.

METHODS: Rat oligodendrocytes cultured *in vitro* were divided into three groups: control, carbon monoxide and monosialotetrahexosylganglioside groups. Carbon monoxide and monosialotetrahexosylganglioside groups were cultured in an airtight box containing 1% carbon monoxide. 5 mg/L monosialotetrahexosylganglioside was added into the culture medium of monosialotetrahexosylganglioside group in advance. The expression of Nogo-A mRNA and protein at 6, 24, 48 hours were detected by RT-PCR and immunohistochemistry method, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The integrated absorbance values of Nogo-A mRNA and cumulative

王晓虹, 女, 1975 年生, 黑龙江省佳木斯市人, 汉族, 2003 年大连医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事一氧化碳中毒后迟发性脑病和运动障碍疾病等方面的研究。

通讯作者: 王虹, 硕士, 主任医师, 大连市中心医院综合病房, 辽宁省大连市 116033

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.06.022
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)06-00945-05

稿件接受: 2015-01-13

Wang Xiao-hong, Master, Associate chief physician, Neurology Department, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wang Hong, Master, Chief physician, Comprehensive Ward, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China

Accepted: 2015-01-13

absorbance values of Nogo-A protein in the carbon monoxide group at 6, 24 and 48 hours were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). At 24 hours after carbon monoxide treatment, the integrated absorbance value and cumulative absorbance value of Nogo-A were both higher than those in the control group ($P < 0.05$), but lower than those in the carbon monoxide group ($P < 0.05$). The integrated absorbance values of Nogo-A mRNA was significantly associated with the cumulative absorbance values of Nogo-A protein ($r=0.95$). These findings indicate that carbon monoxide can activate oligodendrocytes, and raise the transcription and translation levels of Nogo-A. The increase expression of Nogo-A protein was due to the high level of Nogo-A mRNA. The protective mechanism of ganglioside on nerve cells after carbon monoxide poisoning is related to inhibition of Nogo-A expression in oligodendrocytes.

Subject headings: Carbon Monoxide Poisoning; Brain Diseases; Oligodendroglia

Funding: the Scientific Research Plan of Dalian Health Department in 2008

Wang XH, Wang H, Che JH, Wang SP, Wang T, Zhu YL. Ganglioside effect on Nogo-A expression of rat oligodendrocytes in vitro after carbon monoxide poisoning. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(6):945-949.

0 引言 Introduction

急性一氧化碳中毒是较常见的职业性及生活性中毒, 可造成中枢神经系统损伤。部分患者急性中毒症状消失以后, 经过数天或数周表现正常或接近正常的假愈期, 会出现以痴呆为主的精神、神经症状称为一氧化碳中毒后迟发性脑病, 一氧化碳中毒后迟发性脑病患者颅脑影像学上白质脱髓鞘显著, 有别于其他缺氧性脑病。由于假愈期的存在, 很难早期准确判断一氧化碳中毒后迟发性脑病的发生, 给有效防治带来困难, 给社会、家庭造成很大负担^[1]。

动物实验提示一氧化碳中毒后脑组织存在神经元轴突髓鞘损伤。Nogo-A蛋白是神经元轴突生长抑制因子之一, 主要表达于中枢神经系统的少突胶质细胞, 已经证实Nogo-A可触发神经轴突抑制、生长锥崩溃、阻止神经纤维散布^[2-3]。其受体(Nogo-receptor, NgR)广泛分布于多种神经元上, 胶质细胞间的隙缝连接处, 但少突胶质细胞本身没有NgR分布^[4]。鉴于Nogo-A蛋白及NgR的分布特点, 以及一氧化碳中毒后迟发性脑病患者颅脑影像学上白质脱髓鞘突出, 因此推测Nogo-A蛋白及NgR系统参与急性一氧化碳中毒脑损害, 可能与一氧化碳中毒后迟发性脑病关系密切。

神经节苷脂是含唾液酸的糖神经鞘脂类物质, 是人体细胞膜的组成成分, 在神经系统中含量尤其丰富, 是重要的神经营养因子^[5]。单唾液酸四己糖神经节苷脂是惟一可以透过血脑屏障的一种神经节苷脂^[6]。在临床应用中, 单唾液酸四己糖神经节苷脂可改善一氧化碳中毒所致的神经系统损害^[7], 其作用是否与少突胶质细胞上Nogo-A蛋白有关目前尚无报道。本实验中, 在排除缺氧影响下, 采用外源性一氧化碳直接处理体外培养少突胶质细胞, 观察单唾液酸四己糖神经节苷脂对少突胶质细胞Nogo-A在mRNA及蛋白质水平表达的影响, 探讨单唾液酸四己糖神经节苷脂的神经保护作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2008年9月至2009年9月在大连市中心医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 新生2 d SD大鼠由大连医科大学实验动物中心提供。

神经节苷脂对体外培养大鼠少突胶质细胞一氧化碳损伤后Nogo-A的影响实验试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清(FBS)、亚硝酸钠、谷氨酰胺、甲状腺素、转铁蛋白、单唾液酸四己糖神经节苷脂	美国Sigma公司
DMEM/F12培养液	美国Hyclone公司
Nogo-A抗体冻干粉、髓鞘碱性蛋白(MBP)抗体、SABC试剂盒	武汉博士德生物试剂公司
TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒	大连TaKaRa生物公司
Nogo-A引物	大连TaKaRa生物公司合成
CO ₂ 培养箱	日本SANYO Electric CO.Ltd
倒置相差显微镜	德国LEICA
多标记分析仪	芬兰PERKIN ELME
紫外分光光度计	瑞典Amersham pharmacia Bitech
RT-PCR仪	德国Biomryis
水平电泳仪	美国Bio-rad
凝胶成像系统分析软件	美国Labworks 4.6
CO监测仪	深圳特安电子有限公司EP200-2

实验方法:

视神经少突胶质细胞培养: 取新生2 d SD大鼠视神经, 加入基础培养液(体积分数5%FBS DMEM/F12培养基), 37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中培养, 第4天更换化学限定培养液(含有100 mg/L转铁蛋白、0.4 mg/L甲状腺素、40 μg/L亚硝酸钠、16.2 mg/L腐胺、0.3%谷氨酰胺; 0.62 mg/L黄体酮、0.234 U/mL胰岛素的DMEM/F12培养基)A(含体积分数0.5%FBS)培养。约第10天时, 更换为化学限定培养液B(不含FBS), 第11天时经MBP免疫细胞化学染色证实90%以上为MBP蛋白阳性细胞, 可用于实验。

实验分组: 对照组(control): 无一氧化碳处理; 一氧化碳组: 将细胞置于含体积分数1%CO的密封室内, 监测

表 1 单唾液酸四己糖神经节苷脂组与一氧化碳组 Nogo-A 与 β -actin 积分吸光度比值 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Integrated absorbance values of Nogo-A and β -actin mRNA in the carbon monoxide and monosialotetrahexosylganglioside groups

组别	6 h	24 h	48 h
对照组	0.723 \pm 0.040	0.698 \pm 0.045	0.710 \pm 0.070
一氧化碳组	1.032 \pm 0.015	1.302 \pm 0.009 ^b	0.942 \pm 0.008
单唾液酸四己糖神经节苷脂	0.889 \pm 0.050	1.008 \pm 0.032 ^{ac}	0.847 \pm 0.052

表注: 一氧化碳组各时间点 Nogo-A mRNA 表达均显著高于对照组; 单唾液酸四己糖神经节苷脂组在一氧化碳处理后 24 h Nogo-A mRNA 表达显著高于对照组, 但低于一氧化碳组。与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与一氧化碳组比较, ^c $P < 0.05$ 。

室内一氧化碳浓度为 10 000 ppm。单唾液酸四己糖神经节苷脂组: 预先在培养液中加入 5 mg/L 单唾液酸四己糖神经节苷脂, 余处理同一氧化碳组。3 组均设 6, 24, 48 h 时间点。

RT-PCR 测定 Nogo-A mRNA 表达: 培养终止, 各组培养皿中加入 Trizol 将细胞消化, 常规提取总 RNA。紫外分光光度计进行测定 A_{260}/A_{280} , 计算总 RNA 含量和纯度 > 1.8 ; 琼脂糖凝胶电泳可见完整 18 S、28 S 两条带, 表明总 RNA 完整未降解。取 250 ng 总 RNA 按反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA, 而后加入 Nogo-A、B-actin 上下游引物进行 PCR 反应。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 29 个循环, 后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 凝胶分析系统仪分析 Nogo-A 及 B-actin 的吸光度值(A), 计算 Nogo-A 与 B-actin 积分吸光度的比值, 作为 Nogo-A mRNA 的表达水平。

引物序列: 上游(N1)为 5-GTC CTG CTT GAA ACT GCT-3, 下游(N2)为 5-CTT TCG GTT GCT GAG GTA-3, 长度为 713 bp。B-actin 引物序列: 上游(B1)为 5-ATC ATG TTT GAG ACC TTC A-3, 下游(B2)为 5-CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3, 长度为 318 bp^[8]。

细胞免疫化学观察 Nogo-A 表达: 培养终止, 各组按照 SABC 试剂说明进行原位细胞免疫化学染色。一抗为 1:100 Nogo-A 抗体, 苏木精复染, 乙醇脱水, 50% 无水乙醇、50% 甘油封闭培养皿。在 $\times 200$ 倍显微镜下, 每个培养皿取 4 个视野拍照, 用美国 Imagepro-Plus4.5 软件测定阳性细胞染色的累积吸光度, 计算平均值。

主要观察指标: 一氧化碳处理后 6, 24, 48 h, Nogo-A 与 B-actin 积分吸光度比值及 Nogo-A 蛋白质表达的累计吸光度值。

统计学分析: 实验重复 3 次, 设 2 个平行皿。各组计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS 13.0 统计软件包, 组间比较采用单因素方差分析方差分析和 t 检验; Nogo-A 蛋白质表达变化与其 mRNA 水平的相关性采用 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

表 2 单唾液酸四己糖神经节苷脂组与一氧化碳组 Nogo-A 蛋白质的表达的累计吸光度值 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Cumulative absorbance value of Nogo-A protein in the carbon monoxide and monosialotetrahexosylganglioside groups

组别	6 h	24 h	48 h
对照组	2 801.14 \pm 94.10	2 750.16 \pm 76.01	2 780.16 \pm 94.89
一氧化碳组	4 070.15 \pm 80.12	7 230.50 \pm 63.40 ^a	3 650.10 \pm 89.65
单唾液酸四己糖神经节苷脂组	3 750.15 \pm 80.89	5 115.20 \pm 80.31 ^{ab}	3 350.16 \pm 90.43

表注: 一氧化碳组各时间点 Nogo-A 表达均显著高于对照组, 单唾液酸四己糖神经节苷脂组 24 h Nogo-A 蛋白质显著高于对照组, 但低于一氧化碳组($P < 0.05$)。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与一氧化碳组比较, ^b $P < 0.01$ 。

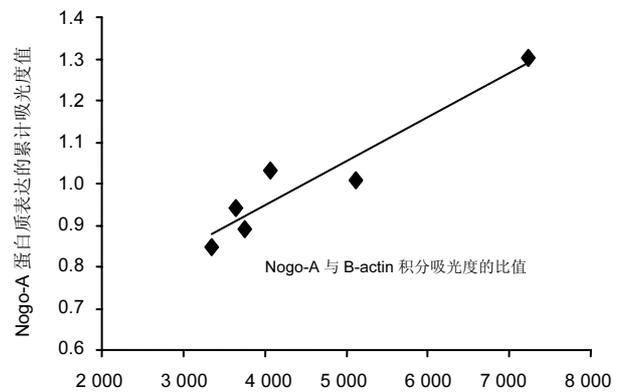


图 1 Nogo-A 蛋白质表达随其 mRNA 变化的散点图

Figure 1 Scatterplot of expression changes of Nogo-A protein with mRNA expression

2 结果 Results

2.1 Nogo-A mRNA 的表达 对照组与一氧化碳组均有 Nogo-A mRNA 表达。对照组各时间点 Nogo-A mRNA 表达无明显变化; 一氧化碳组各时间点 Nogo-A mRNA 表达均高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 一氧化碳处理后 Nogo-A mRNA 在 6 h 左右表达明显升高、24 h 达高峰、48 h 下降, 但仍维持高水平, 各时间点比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。单唾液酸四己糖神经节苷脂组在一氧化碳处理后 6 h 即有升高, 但与对照组及一氧化碳组比较差异无显著性意义; 24 h 达高峰, 高于对照组($P < 0.05$), 但较一氧化碳组低($P < 0.05$), 48 h 下降, 与一氧化碳组及对照组相比差异无显著性意义(见表 1)。

2.2 Nogo-A 蛋白质的表达 对照组与一氧化碳组各时间点均有 Nogo-A 表达。细胞免疫化学染色阳性细胞累积吸光度分析可见对照组各时间点 Nogo-A 蛋白质表达无明显变化, 一氧化碳组各时间点 Nogo-A 表达均高于对照组各时间点, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 单唾液酸四己糖神经节苷脂组 Nogo-A 蛋白质表达较在一氧化碳处理后 6 h 即有升高, 但与对照组及一氧化碳组比较无统计学差异; 24 h 达高峰, 高于对照组($P < 0.05$), 但较一氧化碳组低($P <$

0.05), 48 h下降, 与一氧化碳组及对照组相比差异无显著性意义(见表2)。

2.3 Nogo-A 蛋白质表达与其mRNA水平的相关性 合并一氧化碳组及单唾液酸四己糖神经节苷脂组, Nogo-A 蛋白质表达的累计吸光度值与Nogo-A和B-actin积分吸光度比值间具有明显的线性相关性, r 值为0.95(见图1)。在各自的一氧化碳组与单唾液酸四己糖神经节苷脂组中二者也具有明显的线性相关性, r 值分别为0.99与1.00。

3 讨论 Discussion

少突胶质细胞分布于中枢神经系统的灰质和白质, 白质居多。中枢神经系统髓鞘由成熟少突胶质细胞形成^[9], 当神经元生长锥与成熟少突胶质细胞相遇时, 少突胶质细胞通过丝状伪足与其接触, 迅速持久地诱导生长锥活动停滞和生长锥结构坍塌。中枢神经系统损伤时, 少突胶质细胞前驱细胞(O-2A)迅速聚集在受损伤部位, 这些细胞产生多种轴突生长抑制蛋白以及抑制分子, Nogo-A、MAG、OMgp等^[10], 阻碍中枢神经系统再生^[11], 其中Nogo-A目前被认为是关键因素之一。Nogo-A具有2个抑制性功能结构域, 一个是位于细胞表面的跨膜环状结构域称为Nogo-66, 可与神经元细胞膜表面Nogo-66受体(NgR)结合, 抑制神经元轴突生长; 另一个是较长的氨基端区域(amino-Nogo), amino-Nogo定位于细胞内, 仅在髓鞘破坏后才能发挥作用, 目前尚不清楚amino-Nogo结构域的受体^[12], 但amino-Nogo片段作用更为广泛, 除可阻断神经元轴突生长外, 还抑制非神经细胞的伸展和迁移^[13]。

Thom等^[14]的研究表明, 在一氧化碳中毒后大鼠中枢神经系统MBP表达减少, 提示一氧化碳中毒存在脱髓鞘改变。Wang等^[15]的研究证实, 大鼠少突胶质细胞的数量随着一氧化碳中毒损伤时间的延长而逐渐减少, 且细胞形态发生改变, 细胞突起增生、肥大, 与星形胶质细胞的激活相似。提示在一氧化碳中毒损伤过程中, 神经元轴突髓鞘损伤, 导致少突胶质细胞减少, 但剩余少突胶质细胞则被激活。在体实验由于存在有缺氧因素的影响, 即一氧化碳与血红蛋白结合后阻碍了氧在体内的运输, 而不能直接反应一氧化碳对机体的作用。因此, 在正常氧浓度的情况下, 采用外源性一氧化碳直接处理体外培养少突胶质细胞, 以排除在体实验所存在缺氧的影响。本实验中, 体外一氧化碳处理少突胶质细胞, 6 h左右Nogo-A无论mRNA还是蛋白质表达均明显升高, 24 h达高峰, 48 h虽有所下降, 但仍持续高水平, 证实了一氧化碳本身可使少突胶质细胞进入活跃的功能状态, 提高Nogo-A的转录和翻译水平。由此推测机体在一氧化碳中毒后, 中枢神经系统髓鞘的少突胶质细胞有一部分受到损伤, 另一部分可被激活。受到损伤的少突胶质细胞, 释放细胞内的amino-Nogo抑制神经修复, 被激活的少突胶质细胞则通过增加Nogo-A蛋白质的表达而发挥抑制作用, 进而参与了急性一氧化碳中毒脑损害

及一氧化碳中毒后迟发性脑病的发生。

单唾液酸四己糖神经节苷脂是位于细胞膜表面的一种含唾液酸的糖鞘脂, 主要位于脂质双层的外表面, 在大脑灰质中浓度最高, 每克脑组织约含730 nmol, 主要位于髓鞘、神经元细胞膜和轴突。神经受损后, 外源性单唾液酸四己糖神经节苷脂入血与脂蛋白结合, 可通过血脑屏障进入神经系统, 尤其高度局限于受损病灶区域, 通过多种途径实现神经保护作用, 如嵌合于神经细胞膜中, 参与神经重构; 增强神经生长因子的功能; 参与神经系统与环境的相互作用及神经细胞信号传递过程; 抑制脂质过氧化反应; 减少兴奋性氨基酸的释放; 改善脑供血等^[6]。本实验表明单唾液酸四己糖神经节苷脂可降低一氧化碳诱导的体外培养大鼠少突胶质细胞Nogo-A蛋白质表达, 在单唾液酸四己糖神经节苷脂对重度颅脑损伤, 脑梗死的治疗观察中也得到了类似的结果^[16-17], 提示单唾液酸四己糖神经节苷脂可通过Nogo-A途径减轻神经元损伤。本实验中, 单唾液酸四己糖神经节苷脂干预在一氧化碳处理之前, 与临床中在先治疗在后有所差别。Liu等^[18]的研究发现, 单唾液酸四己糖神经节苷脂脑保护效果与用药起始时间相关, 用药越晚, 效果越差。在校建波等^[7]的观察中, 急性一氧化碳中毒患者早期即给予单唾液酸四己糖神经节苷脂, 可提高治疗总有效率, 降低一氧化碳中毒后迟发性脑病发病率。但Hu等^[19]回顾性分析了46例一氧化碳中毒后迟发性脑病患者的预后因素, 认为使用单唾液酸四己糖神经节苷脂并不能影响一氧化碳中毒后迟发性脑病预后, 王寅旭等^[20]也得出同样的结论。这种结论的差异考虑与Hu及王寅旭等的研究对象均为已为一氧化碳中毒后迟发性脑病有关, 因一氧化碳中毒后迟发性脑病一旦发生, 很难纠正神经系统损伤。因此, 急性一氧化碳中毒后早期应用单唾液酸四己糖神经节苷脂可通过抑制Nogo-A表达降低一氧化碳中毒后迟发性脑病发生率, 预防重于治疗。

遗传信息是由DNA到mRNA, 再到蛋白质的传递过程。mRNA水平升高代表的是启动子或者增强子的激活, 蛋白水平的提高则大多数与功能增强相关。虽然mRNA和蛋白水平是一个相偶联的过程, 但由于基因表达调控的复杂性, 两者没有必然的一致趋势^[21]。但在本实验中, 无论是外源性一氧化碳所导致的损伤, 还是单唾液酸四己糖神经节苷脂的干预, 少突胶质细胞Nogo-A蛋白质的表达与其mRNA水平均具有明显的线性相关关系。少突胶质细胞在一氧化碳的作用下, Nogo-A蛋白质的表达随着其mRNA水平的升高而增强, 提示一氧化碳通过直接或间接的途径激活了Nogo-A mRNA的转录, 进而提高了其蛋白质的表达, 阻碍神经再生。单唾液酸四己糖神经节苷脂则是通过下调Nogo-A mRNA的转录, 而减少Nogo-A蛋白质的表达, 实现神经保护作用。Lin等的研究发现, 外源性的一氧化碳可通过激活蛋白激酶B(Akt)、环鸟苷酸依赖性蛋白激酶(PKG)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径诱导巨噬细胞

环氧酶-2基因表达上调^[22], 与作为机体内第二信使的内源性一氧化碳的调节途径相似^[23-24]。Zhen等^[25]的研究认为外源性的一氧化碳同内源性的一氧化碳一样, 均可以抑制低氧状态下肺动脉平滑肌细胞的增殖。因此, 对于本实验外源性一氧化碳及单唾液酸四己糖神经节苷脂对于Nogo-A基因的调节是否与上述途径有关, 外源性一氧化碳与内源性一氧化碳对于Nogo-A的作用效应是否一致, 还有待于进一步探讨。

致谢: 感谢大连市中心医院中心实验室纪军、张利对细胞培养给予的技术指导。

作者贡献: 车菊华、汪涛、朱艳玲负责实验实施, 王晓虹副主任医师负责实验设计、组织及评估, 所有作者共同参与了论文的写作和修改。第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 神经节苷脂-是含唾液的糖神经鞘脂, 存在于哺乳类动物细胞膜, 神经系统中含量尤其丰富, 是神经细胞膜的组成成分, 在神经发生、生长、分化过程中起必不可少的作用, 对于损伤后的神经修复也非常重要, 具有促进神经再生、促进神经轴突生长和突触形成、恢复神经支配功能; 改善神经传导、促进脑电活动及其他神经电生理指标的恢复; 保护细胞膜、促进细胞膜各种酶活性恢复等作用。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Wu PE, DN Juurlink. Carbon monoxide poisoning. *Cmaj*.2014; 186(8): 611.
- [2] Pernet V, Schwab ME. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell Tissue Res*, 2012. 349(1): 97-104.
- [3] Fu ZZ, Lu H, Jiang JM, et al. Methylprednisolone inhibits Nogo-A protein expression after acute spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2013;8(5): 404-409.
- [4] Saha N, Kolev M, Nikolov DB. Structural features of the Nogo receptor signaling complexes at the neuron/myelin interface. *Neurosci Res*. 2014;87:1-7.
- [5] Wang YD, Liu YG, Liu Q. Ganglioside promotes the bridging of sciatic nerve defects in cryopreserved peripheral nerve allografts. *Neural Regen Res*. 2014;9 (20): 1820-1823.
- [6] Yu RK, Tsai YT, Ariga T. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. *Neurochem Res*.2012;37(6): 1230-1244.
- [7] 校建波, 王立鹤, 付国强. 神经节苷脂在急性一氧化碳中毒早期脑保护治疗中的意义[J]. *临床误诊误治*, 2014,27: 72-74.
- [8] Peng X, Liu S, Ye J, et al. Downregulation of Nogo-A expression of oligodendrocytes in vitro with antisense oligodeoxynucleotides. *Yan Ke Xue Bao*.2003;19(3):195-200.
- [9] Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*.2001;81(2): 871-927.
- [10] Chen ZJ, Ughrin Y, Levine JM. Inhibition of axon growth by oligodendrocyte precursor cells. *Mol Cell Neurosci*.2002;20(1): 125-139.
- [11] 胡建国, 陆佩华, 徐晓明. 少突胶质细胞生物学功能与相关疾病研究进展[J]. *生理科学进展*, 2004,35(1): 39-41.
- [12] Fournier AE, Gould GC, Liu BP, et al. Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci*.2002;22(20):8876-8883.
- [13] Liu BP, Fournier A, GrandPré T, et al. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*.2002;297(5584): 1190-1193.
- [14] Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, et al. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2004;101(37): 13660-13665.
- [15] Wang CY, Li Jinsheng. Expressions of the astrocytes and oligodendrocytes in rat models of delayed neuropathological sequelae after CO poisoning and the effect of hyperbaric oxygen treatment on the two kinds of neuroglia cell. *China Crit Care Med*.2007;27: 615-618.
- [16] 王树兴, 彭龙锋, 曲绍霞, 等. 神经节苷脂对重型颅脑创伤患者血清 Nogo-A 蛋白水平的影响[J]. *山东医药*, 2012, 52(3):71-74.
- [17] Cheatwood JL, Emerick AJ, Schwab ME, et al. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat. *Stroke*. 2008;39(7):2091-2098.
- [18] Liu JR, Ding MP, Wei EQ, et al. GM1 stabilizes expression of NMDA receptor subunit 1 in the ischemic hemisphere of MCAo/reperfusion rat. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005;6(4): 254-258.
- [19] Hu H, Pan X, Wan Y, et al. Factors affecting the prognosis of patients with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning. *Am J Emerg Med*. 2011;29(3):261-264.
- [20] 王寅旭, 王晓明, 陈芳, 等. 急性一氧化碳中毒后迟发性脑病的预后因素分析[J]. *中华脑血管病杂志: 电子版*, 2011,5(6):499-504.
- [21] 周春燕, 贾宏祺. 生物化学[M]. 7版, 北京: 人民卫生出版社. 2008: 332-343
- [22] Lin LC, Ho FM, Yen SJ, et al. Carbon monoxide induces cyclooxygenase-2 expression through MAPKs and PKG in phagocytes. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(12):1520-1525.
- [23] Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, et al. Carbon monoxide: A putative neural messenger. *Science*.1993; 259:381-384.
- [24] Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000; 6: 422-428.
- [25] Zhen G, Xue Z, Zhang Z, et al. Carbon monoxide inhibits proliferation of pulmonary smooth muscle cells under hypoxia. *Chin Med J (Engl)*. 2003;116(12):1804-1809.