

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.11.008

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250721.1433.007\(2025-07-21\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250721.1433.007(2025-07-21))

外源性 Nogo 受体拮抗剂通过影响轴突再生促进脊髓损伤大鼠神经功能恢复的机制研究*

李贺祥^{1,2}, 王春庆^{3△}, 李 青³, 罗 奕², 曾佳学²

(1. 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550025; 2. 六盘水市人民医院骨一科, 贵州六盘水 553001;

3. 贵州医科大学附属医院创伤骨科, 贵阳 550025)

[摘要] **目的** 通过外源性途径给予神经突起生长抑制因子(Nogo)受体拮抗剂 NEP1-40 治疗大鼠脊髓损伤(SCI),探讨 NEP1-40 对神经轴突再生的影响及其在神经修复过程中的作用机制。**方法** SD 大鼠分为假手术组(A组)、损伤组(B组)、损伤+NEP1-40 治疗组(C组),A组仅摘除椎板,不损伤脊髓,B、C组建立钳夹型 SCI 模型,C组在建立 SCI 模型的基础上予以 NEP1-40 治疗,分别在术后 1、3、7、14 d 对 3 组大鼠后肢进行 Basso,Beattie,Bresnahan 运动评定量表(BBB)评分,采用 qPCR 和 Western blot 检测脊髓组织神经轴突和树突再生的特征性标志物生长相关蛋白-43(GAP-43)和微管相关蛋白-2(MAP-2)的基因及蛋白的表达水平变化。采用免疫荧光技术分析 NF-200 和 BrdU 免疫荧光双标,观察并分析其双标阳性细胞数量变化。**结果** A 组术后各个时间点 BBB 评分较术前无明显变化,B、C 组术后 1 d BBB 评分较术前明显降低,术后 3、7、14 d BBB 评分均较术后 1 d 有一定程度的恢复,但均低于 A 组,而 C 组术后 3、7、14 d 的 BBB 评分均高于 B 组($P<0.05$);qPCR、Western blot 结果显示:与术前比较,B、C 组术后 3、7、14 d GAP-43、MAP-2 mRNA 及蛋白表达水平呈先降低后升高趋势,但 C 组术后各个时间点均高于 B 组($P<0.05$)。与术前比较,术后 B、C 组 NogoA mRNA 及蛋白表达水平也是呈先降低后升高趋势,但 C 组术后各时间点(除术后 1 d)均低于 B 组($P<0.05$);免疫荧光结果显示:随着时间推移,BrdU 和 NF-200 双标阳性细胞逐渐增多,其中 C 组术后 14 d BrdU 和 NF-200 双标阳性细胞最多。**结论** NEP1-40 对 SCI 有促进神经修复的作用,为 SCI 修复治疗提供了新的思路。

[关键词] 脊髓损伤;Nogo 受体拮抗剂;生长相关蛋白-43;微管相关蛋白-2

[中图分类号] R602

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2025)11-2522-06

Mechanism study of exogenous Nogo receptor antagonists promote the recovery of neural function in rats with spinal cord injury through affecting axon regeneration*

LI Hexiang^{1,2}, WANG Chunqing^{3△}, LI Qing³, LUO Yi², ZENG Jiaxue²

(1. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China;

2. Department of Orthopedics, Liupanshui People's Hospital, Liupanshui, Guizhou 553001,

China; 3. Department of Trauma and Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the Nogo receptor antagonist NEP1-40, administered via an exogenous route, on axonal regeneration in rats with spinal cord injury (SCI), and to explore its mechanism of action in the process of neural repair. **Methods** SD rats were divided into a sham surgery group (Group A), an injury group (Group B), and an injury + NEP1-40 treatment group (Group C). In Group A, only laminectomy was performed without spinal cord injury. Groups B and C were subjected to a clip-type SCI model. Group C received treatment with NEP1-40 based on the established SCI model. Hindlimb motor function in the three groups was assessed using the BBB score at 1, 3, 7, and 14 days post-surgery. Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot were used to detect changes in gene and protein expression levels of growth-associated protein-43 (GAP-43) and microtubule-associated protein-2 (MAP-2), characteristic markers of axonal and dendritic regeneration. Immunofluorescence was employed to analyze NF-200 and BrdU double-labeling, and changes in the number of double-labeled positive cells were observed and analyzed. **Results** In

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82160249)。△ 通信作者,E-mail:wangchq87@163.com。

group A rats, the BBB scores at various time points after surgery showed no significant change compared with preoperative scores. In groups B and C, the BBB scores on postoperative day 1 were obviously lower than preoperative scores. From days 3 to 14 after surgery, the BBB scores partially recovered compared with postoperative day 1, though they remained lower than those in group A. However, on postoperative days 3, 7, and 14, the BBB scores in group C were higher than those in group B ($P < 0.05$). qPCR and Western blot results showed that compared with preoperative levels, GAP-43 and MAP-2 mRNA and protein expression in groups B and C at postoperative days 3, 7, and 14 showed a trend of first decreasing and then increasing, and the expression in group C was consistently higher than in group B ($P < 0.05$). The expression level of NogoA in group C showed an opposite trend to GAP-43 and MAP-2. Compared with preoperative levels, NogoA mRNA and protein expression in group B rats decreased on postoperative days 1 and 3 ($P < 0.05$) and increased on days 7 and 14 ($P < 0.05$). Compared with preoperative levels, NogoA mRNA and protein expression in groups B and C also showed a trend of first decreasing and then increasing, but in group C, at all postoperative time points except day 1, it was lower than in group B ($P < 0.05$). Immunofluorescence results showed that over time, the number of cells double-labeled with BrdU and NF-200 gradually increased, with the highest number observed in group C on postoperative day 14. **Conclusion** NEP1-40 promotes neurological repair in SCI, providing a new approach for SCI repair treatment.

[Key words] spinal cord injury; Nogo receptor antagonist; growth-associated protein 43; microtubule-associated protein 2

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是脊柱骨折的严重并发症^[1], 目前研究发现 SCI 后脊髓再生和功能恢复困难与轴突有效再生能力减弱密切相关, 这在一定程度上是因为 SCI 后的微环境中存在着不利于轴突生长的抑制因素^[2]。神经突起生长抑制因子 A (neurite outgrowth inhibitor A, NogoA) 是公认的在中枢神经系统损伤后微环境内具有阻碍轴突再生的髓磷脂相关抑制物, 其主要与相关 Nogo-66 受体(Nogo-66 teceptor, NgR) 结合发挥作用^[3-4]。Nogo 受体拮抗剂 NEP1-40 是针对 Nogo-66 氨基酸序列设计的竞争性抑制剂, 能拮抗中枢神经系统抑制因子与 NgR 结合, 起到改善神经轴突生长受限的作用^[5-6]。目前对于 NEP1-40 在促进中枢神经轴突再生方面的作用机制研究尚不完善, 有关 NEP1-40 与 SCI 恢复方面的相关研究尚少。本研究以 SD 大鼠构建 SCI 模型, 运用 qPCR 及 Western blot 等实验方法, 观察 SCI 后神经轴突再生标志物, 如生长相关蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP-43) 和微管相关蛋白-2 (microtublu-associated protein-2, MAP-2) 的表达变化, 以及 NEP1-40 治疗后对其表达的影响, 也通过免疫荧光双标技术观察 SCI 后神经元再生情况, 探索通过改善神经损伤后局部微环境从而有利于突触再生的途径, 为 SCI 的治疗提供理论依据, 也为今后涉及 SCI 方面的研究提供了一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级健康雌性 SD 大鼠(单一性别利于控制试验, 排除交配, 发育等的干扰, 且雌鼠 SCI 后便于行人工排尿、排便)135 只, 3 月龄, 体重 230~250 g, 购自

重庆腾鑫生物技术有限公司, 合格证号: SCXK(辽)2015-0001。NEP1-40(批号 NJP30589)购自上海楚肽生物科技有限公司; cDNA 第一链合成试剂盒(批号 00612871)、qPCR 试剂盒(批号 00576831)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, GAP-43 抗体(批号 GR42490-42)、NogoA 抗体(批号 GR169242-7)、MAP-2 抗体(批号 GR3199818-1)、NF-200 抗体(批号 ab8135)购自美国 Abcam 公司, BrdU 抗体(批号 66241-1-1g)购自武汉三鹰生物技术有限公司, GAP-43、NogoA、MAP-2、GAPDH 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PE-10 导管(批号 235388)购自英国 Smiths Medical 公司。本研究已通过贵州医科大学伦理委员会批准(审批号: 21014095)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组

SD 大鼠随机分为 A、B、C 3 组, A 组: 假手术组($n=15$); B 组: 单纯 SCI 组($n=60$), SCI 术后 1、3、7、14 d 4 个时间点各 15 只; C 组: 损伤后 NEP1-40 治疗组($n=60$), SCI 术后 1、3、7、14 d 4 个时间点各 15 只, 3 组每个时间点用于检测 GAP-43、NogoA、MAP-2 相关基因、蛋白及用于免疫荧光检测各 5 只。

1.2.2 SCI 模型制备及处理

用钳夹法建立 SCI 模型, A 组仅摘除椎板, 不损伤脊髓, 在摘除椎板过程中应避免伤及硬脊膜及血管。B 组建立 SCI 模型, 同时注射 PBS 20 μ L/d, C 组建立 SCI 模型后给予等体积 NEP1-40 13 μ g/d 治疗, 给药时间持续到取标本当天。

1.2.3 运动功能检测

采用 Basso, Beattie, Bresnahan 运动评定量表 (Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale, BBB)对 A、B、C 3 组大鼠造模手术前(术前 1 d)及手术后 1、3、7、14 d 的后肢功能进行评分。

1.2.4 qPCR 检测目的基因 mRNA 表达

取 A、B、C 3 组大鼠不同时间点损伤节段脊髓组织并提取总 RNA,转录为 cDNA,按照下列条件在 ABI ViiA7 型荧光定量 PCR 仪上进行反应:95 ℃变性 5 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 次循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行定量分析,以 GAPDH 为内参,每个样品设 3 个平行样,实验重复 3 次,用于 qPCR 的各基因引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列		
基因	方向	引物序列(5'-3')
MAP-2	正向	AAA GCG GCA CCT CAA CAC
	反向	CTC ACT GGG CAC CAA GAT
GAP-43	正向	GAG GGA GAT GGC TCT GCT AC
	反向	CAC ATC GGC TTG TTT AGG C
Nogo-A	正向	GCT CAG CGG CCG AGA CCC TTT TTG CTC
	反向	GCT TTT AAC TAT GCT GCC CAT T
GAPDH	正向	GGT TGT CTC CTG CGA CTT CA
	反向	TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC

1.2.5 Western blot 检测目的蛋白表达

取 A、B、C 3 组不同时间点损伤节段脊髓组织 100 mg,剪碎组织,用适量 PBS 洗涤 2 次后加入 1 mL RIPA 裂解液裂解。离心提取总蛋白,BCA 测定蛋白浓度,电泳、转膜、封闭,分别加入一抗(MAP-2、GAP-43、NogoA)、二抗,TBST 洗涤后增强型化学发光试剂(enhanced chemilumin escence, ECL)曝光、显影、定影,并用 ImageJ 软件处理图片,分析目标蛋白条带的灰度值,计算目的条带与内参 GAPDH 灰度值的比值表示蛋白表达水平。

1.2.6 HE 染色

分别取 A、B、C 3 组术后 3 d 损伤节段脊髓组织,经不同梯度乙醇脱水、依次放入二甲苯Ⅰ、Ⅱ(5~10 min)使组织变得透明,便于光镜观察。组织再行石蜡包埋、切片(切片厚度 4~6 μm,注意切片过程保证切片完整、连续、无褶皱),将切好的组织片放在载玻片上进行脱蜡处理,最后 HE 染色后观察标本结构特点。

1.2.7 免疫荧光检测

分别取 A、B、C 3 组不同时间点损伤节段脊髓组织经石蜡包埋、切片、脱蜡、梯度乙醇水化、加一抗(NF-200、BrdU)和二抗孵育, PBS 洗 3 次,用防淬灭封片剂封片,盖上盖玻片,避免气泡,于激光共聚焦显微镜下扫描。每组抽取 100 个脊髓切面,记录每个切面上 BrdU 和 NF-200 双标阳性细胞数目。

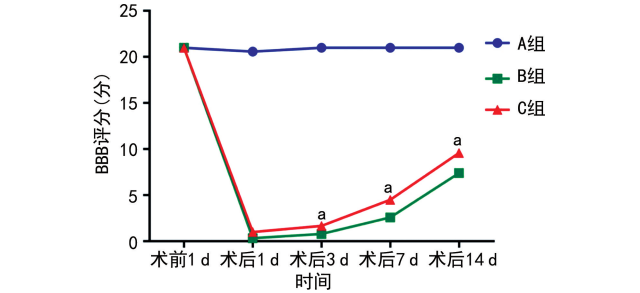
1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠后肢 BBB 评分检测

手术前对大鼠后肢进行 BBB 评分,评分均为 21 分;A 组术后各时间点 BBB 评分均在 21 分左右,提示运动功能正常。B、C 组术后 1 d BBB 评分都在 0 分左右,大鼠双后肢呈拖行状态,几乎完全丧失运动功能,随着时间推移, BBB 评分有所增加,大鼠后肢神经功能逐渐恢复,尤以术后 7~14 d 这一时间段升高的幅度较大,但术后各时间点评分远低于 A 组。C 组术后 3、7、14 d BBB 评分均高于 B 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



^a: $P < 0.05$, 与 B 组比较。

图 1 3 组不同时间后肢 BBB 评分

2.2 大鼠 SCI 早期脊髓组织病理改变

HE 染色结果显示:A 组手术后 3 d 脊髓结构完整,细胞形态正常,分布均匀,细胞膜、细胞核正常,组织间隙正常;B 组术后 3 d 见组织出血、疏松水肿、细胞空泡变性,神经纤维溶解、消失;C 组术后 3 d 脊髓恢复明显,组织水肿、细胞空泡变性减轻,细胞形态恢复,见图 2。

2.3 SCI 大鼠脊髓组织中神经轴突再生标志物 MAP-2、GAP-43、NogoA mRNA 及蛋白的表达水平变化

前期预试验显示 A 组术前、术后各时间点 MAP-2、GAP-43、NogoA mRNA 表达水平无明显变化,因此后续未再检测 A 组数据。qPCR 结果显示,与术前比较,术后 B、C 组 MAP-2、GAP-43 mRNA 表达水平呈先降低后升高趋势,于术后 14 d 达到峰值。与 B 组比较,C 组手术后各时间点 GAP-43、MAP-2 mRNA 表达水平均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与术前比较,B、C 组 NogoA mRNA 表达水平也呈先降低后升高趋势($P < 0.05$)。与 B 组比较,C 组术后各时间点(除术后 1 d)NogoA mRNA 表达水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。GAP-43、MAP-2、NogoA 的蛋白表达水平变化趋势同 mRNA 一致,见图 4。

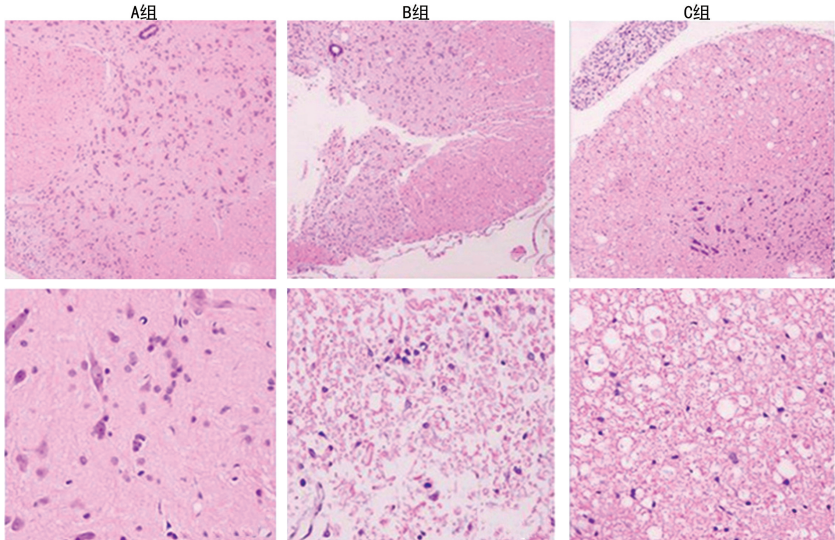


图 2 术后 3 d 脊髓组织病理图 (HE 染色, 100×)

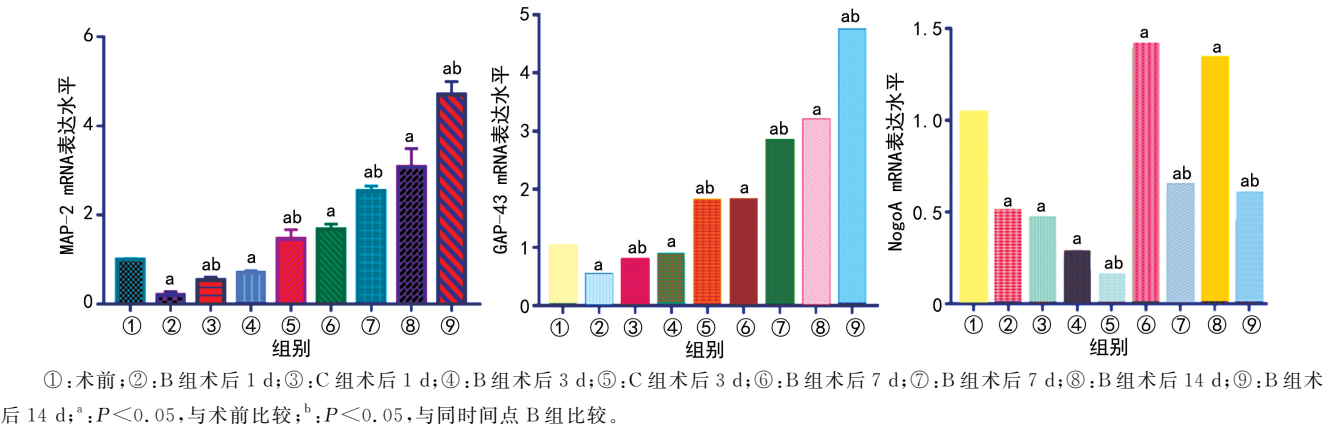


图 3 各组不同时间点脊髓组织 MAP-2、GAP-43、NogoA mRNA 表达水平比较

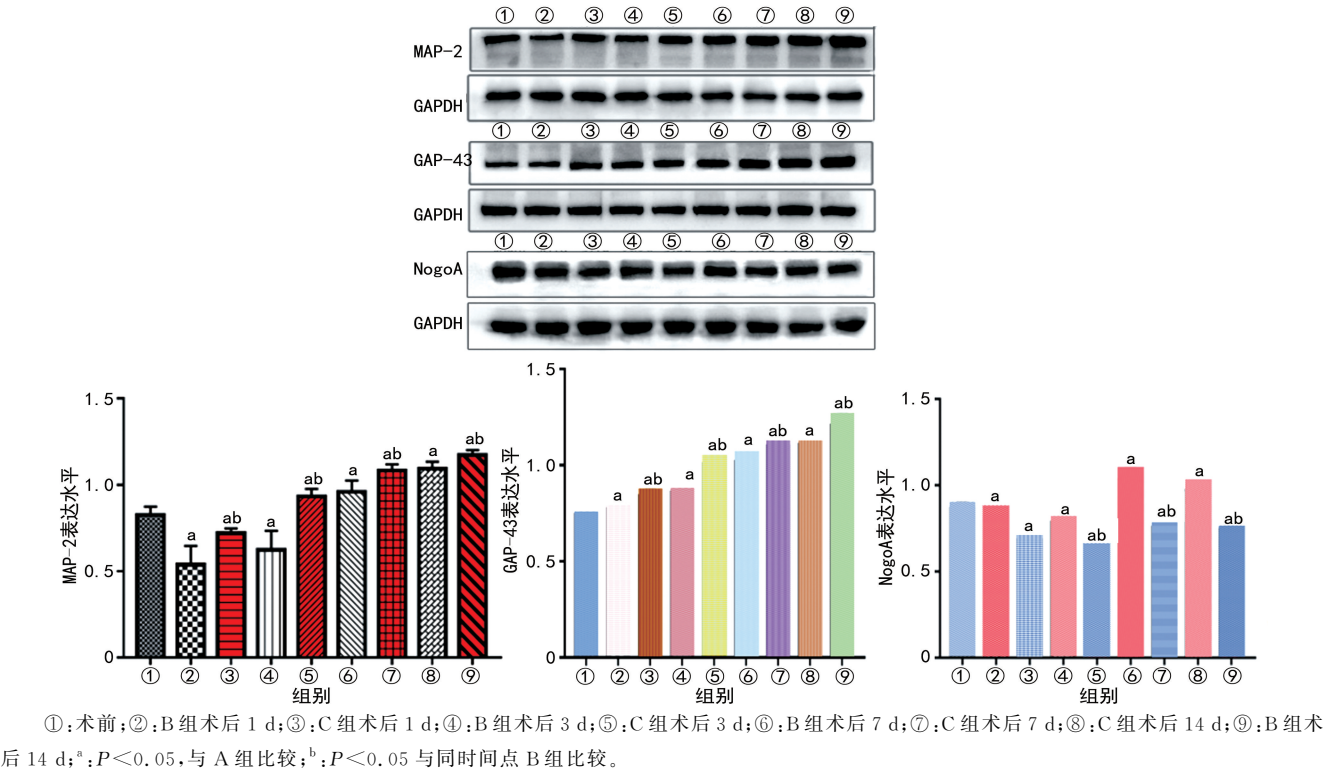
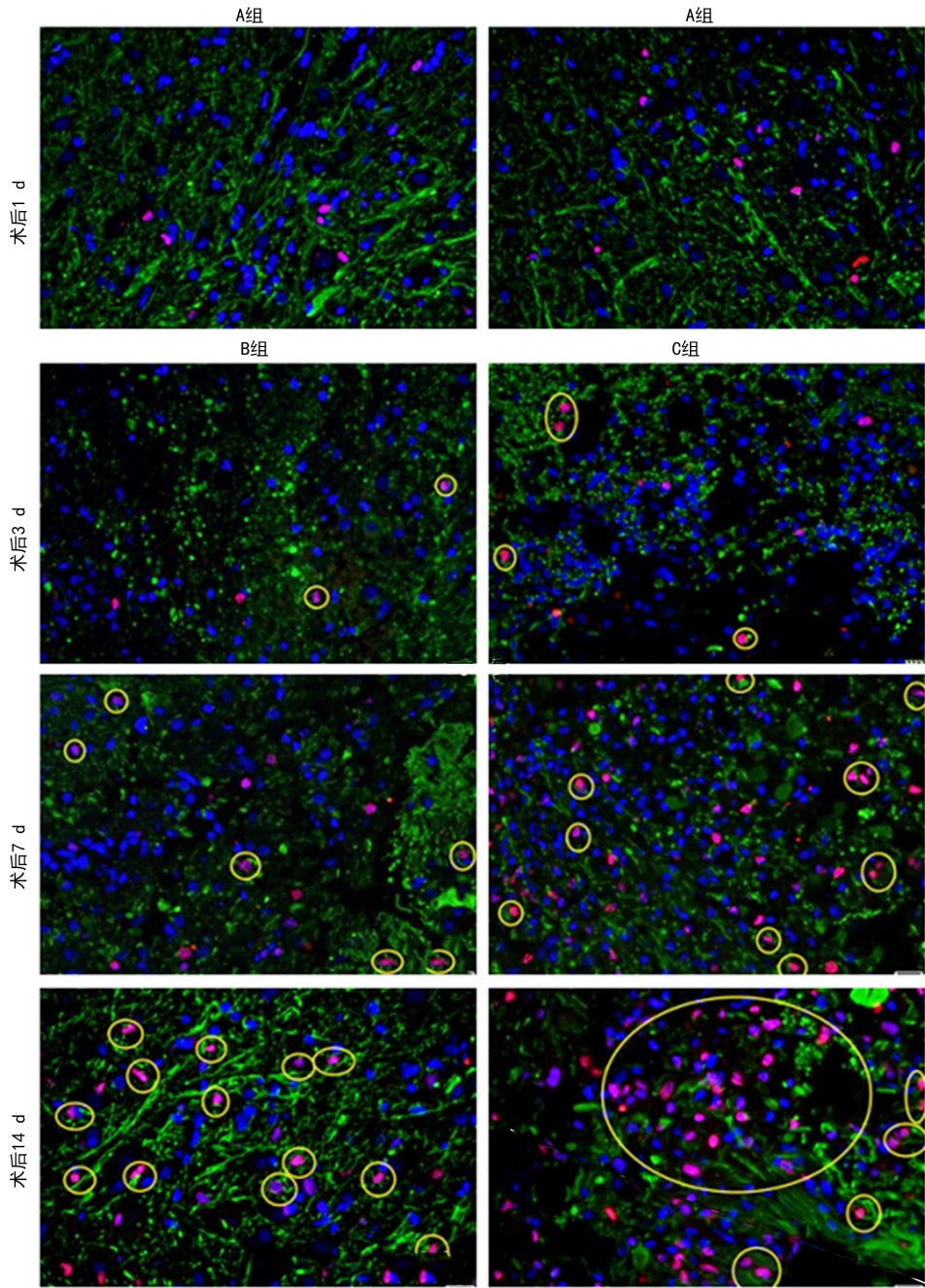


图 4 各组不同时间点脊髓组织 MAP-2、GAP-43、NogoA 的蛋白表达水平比较

2.4 免疫荧光检测 SCI 大鼠脊髓组织神经元特异性标记物 NF-200 和 BrdU 共表达的变化

免疫荧光结果显示:A 组手术后各时间点可见少数 BrdU 和 NF-200 阳性细胞,未见 BrdU 和 NF-200 共表达阳性细胞。术后 3 d,B 组可见较多 BrdU 阳性细胞和 NF-200 阳性细胞,偶尔可见 BrdU 和 NF-200 共表达阳性细胞,C 组较 B 组 BrdU 和 NF-200 共表

达阳性细胞数较 B 组增多。术后 7 d ,B 组可见更多 BrdU 阳性细胞和 NF-200 阳性细胞,也可见 BrdU 和 NF-200 共表达阳性细胞,C 组 BrdU 和 NF-200 共表达阳性细胞亦较 B 组进一步增多;术后 14 d ,B 组可见较多 BrdU 和 NF-200 共同表达阳性细胞,C 组手术后 14 d BrdU 和 NF-200 共表达阳性细胞数较 B 组明显增多,见图 5。



圆圈为 BrdU 和 NF-200 共表达阳性细胞。

图 5 各组不同时间点脊髓组织 BrdU 和 NF-200 的免疫荧光染色(400×)

3 讨 论

SCI 是一种严重的神经系统疾病,因其神经功能恢复困难且治疗效果不佳通常导致永久性神经功能障碍,给患者和家属造成沉重的身心压力及经济负担^[7-8]。目前研究发现 SCI 患者生存质量低下,这与中枢神经系统轴突生长抑制因子密切相关^[9]。SCI

后,如何改善损伤局部微环境,减少胶质瘢痕形成,促进神经元和轴突修复与再生,是治疗 SCI 的关键^[10-11]。MAP-2 是结构性微管相关蛋白家族的成员之一,主要参与神经损伤的修复和重构过程,与轴突的延伸密切相关,在 SCI 的早期,MAP-2 的表达水平增加是影响神经功能恢复的正向性因素之一,它不仅

是一个反映神经元状态的重要标志物,同时也是一个潜在治疗靶点^[12-13]。通过药物、神经营养因子或细胞治疗等手段促进 MAP-2 的表达,可能是未来修复 SCI 的一个重要方向。GAP-43 是一个突触前膜蛋白,是一种神经元特异性蛋白,是神经元生长期的内在决定因子^[14-15],它与神经元外生长、轴突再生、突触可塑性等密切相关,是神经发育和再生的重要因子和神经损伤后再生的标志性蛋白^[16-18]。结合本实验通过注射外源性 NEP1-40 观察其对大鼠 SCI 的影响,证实注射 NEP1-40 后 SCI 大鼠神经再生较单纯 SCI 大鼠明显,结合 BBB 评分结果,证明 NEP1-40 有助于大鼠 SCI 后肢运动功能的恢复^[19]。

本研究通过外源性注射 NEP1-40 途径促进大鼠轴突再生实现了 SCI 后神经及运动功能的恢复,研究特点及优势在于在动物体内实验中,通过 SCI 大鼠模型外源性给予 NEP1-40 治疗,遵循一定生物学特性,其疗效和安全性可望在一定程度上为临床治疗 SCI 及神经系统疾病的相关研究提供新的思路和参考依据,但这种方法存在二次损伤、感染等风险,也面临如何提高损伤局部的药物浓度等问题,且目前 NEP1-40 的作用机制尚不明确,还需要进一步研究、探索三者间作用的性质和功能意义,以及找出更确切的证据证明 NEP1-40 在 SCI 后能够促进神经轴突再生,从而为 SCI 的修复提供新的思路。

参考文献

- [1] 李斌,石岩,黄承,等.胸腰段脊柱骨折合并急性创伤性脊髓损伤患者术后深静脉血栓的危险因素分析[J].中国脊柱脊髓杂志,2022,32(8):713-719.
- [1] MI S, WANG X, GAO J, et al. Implantation with SHED sheet induced with homogenate protein of spinal cord promotes functional recovery from spinal cord injury in rats[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1119639.
- [3] 刘怀存,陈玲,赵妍,等.骨架调控分子 Nogo-A 蛋白的新功能域抑制神经元轴突生长[J].解剖学杂志,2021,44(增刊 1):95.
- [4] JIANG J, YU Y, ZHANG Z, et al. Effects of Nogo-A and its receptor on the repair of sciatic nerve injury in rats[J]. Braz J Med Biol Res, 2021, 54(9): e10842.
- [5] LI S, STRITTMATTER S M. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury[J]. J Neuro Sci, 2003, 23(10): 4219-4227.
- [6] 邹佳,李长清.脑缺血再灌注大鼠 GAP-43 和 RhoA 蛋白表达及 NEP1-40 对其的影响[J].第三军医大学学报,2009,31(12):1177-1180.
- [7] 钟琳兴,魏梁锋.机器学习在脊髓损伤诊治中的

应用进展[J].中华神经外科杂志,2024,40(7):745-748.

- [8] 何宛俞,程乐平.干细胞移植修复脊髓损伤的策略与进展[J].中国组织工程研究,2024,28(19):3090-3096.
- [9] YANG M, JIAN L, FAN W, et al. Axon regeneration after optic nerve injury in rats can be improved via PirB knockdown in the retina[J]. Cell Biosci, 2021, 11(1): 158.
- [10] 朱正桓,邹红军,宋志文,等.脊髓损伤后神经修复过程中的细胞微环境[J].中国组织工程研究,2023,27(1):114-120.
- [11] 谢兴奇,胡伟,屠冠军.骨髓间充质干细胞来源外泌体与硫酸软骨素酶 ABC 联合治疗大鼠脊髓损伤[J].中国组织工程研究,2022,26(1):20-26.
- [12] YANG H, LIANG C, LUO J, et al. Transplantation of Wnt5a-modified bone marrow mesenchymal stem cells promotes recovery after spinal cord injury via the PI3K/AKT pathway[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(12): 10830-10844.
- [13] LI Z, SU H, LIN G, et al. Transplantation of miR-28-5p-modified bmscs promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(4): 2197-2214.
- [14] 孙丹华,徐纪伟,王宁,等.生长分化因子 15 对大鼠脊髓损伤修复的作用及机制[J].中国老年学杂志,2025,45(8):2006-2013.
- [15] 周邦瑜,张磊,李颖,等.雌激素对脊髓损伤大鼠运动功能及 GAP-43 表达的影响[J].海南医学,2023,34(7):919-923.
- [16] ALLEGRA MASCARO A L, CESARE P, SACCONI L, et al. In vivo single branch axotomy induces GAP-43-dependent sprouting and synaptic remodeling in cerebellar cortex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(26): 10824-10829.
- [17] LATCHNEY S E, MASIULIS I, ZACCARIA K J, et al. Developmental and adult GAP-43 deficiency in mice dynamically alters hippocampal neurogenesis and mossy fiber volume[J]. Dev Neurosci, 2014, 36(1): 44-63.
- [18] BIRD C W, GARDINER A S, BOLOGNANI F, et al. KSRP modulation of GAP-43 mRNA stability restricts axonal outgrowth in embryonic hippocampal neurons [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79255.
- [19] 薛冰,席花蕾,姚丽红,等. NEP1-40/PLGA 对大鼠面神经损伤的修复效果研究[J].口腔疾病防治,2025,33(2):110-119.