

## 抗 LINGO-1 抗体可促进小鼠脊髓损伤后运动纤维再生及抑制感觉纤维萎缩

张永杰\*, 左国平, 唐敏峰, 顾 振

(南京医科大学人体解剖学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**观察抗 LINGO-1 抗体对小鼠脊髓损伤后下行运动与上行感觉纤维的保护作用。**方法:**采用 LISA 脊髓损伤造模仪制作小鼠第 9 胸髓背侧切割伤模型(深度 1.1 mm), 术后腹腔注射抗 LINGO-1 抗体, 运用免疫组化与免疫荧光观察在脊髓损伤后, 生物素化葡聚糖胺(BDA)标记的下行皮质脊髓束(CST)轴突和霍乱毒素 B 亚单位(CTB)标记的上行感觉纤维的变化。**结果:**抗 LINGO-1 抗体注射组动物, 可见少量 BDA 阳性纤维长入或越过损伤部位, 且在尾侧白质内前行, 最远可达损伤部位尾侧端 1.5 mm; 同时, 在切口尾侧缘可见较对照组更多的 CTB 阳性纤维, 但未见 CTB 阳性纤维长入或越过损伤切口。接受 IgG 注射的对照组动物, 未发现任何 BDA 或 CTB 阳性纤维长入或越过损伤部位。**结论:**系统注射抗 LINGO-1 抗体可促进小鼠脊髓损伤后 CST 轴突再生, 同时能抑制 CTB 标记的上行感觉纤维萎缩。提示抗 LINGO-1 抗体可作为一种新的药物用于脊髓损伤后促进轴突再生的治疗学研究。

**[关键词]** 脊髓背侧切割伤; 抗 LINGO-1 抗体; 轴突再生

**[中图分类号]** R744.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)12-1629-06

## Anti-LINGO-1 antibody promotes motor axonal regeneration and inhibits sensory axonal dying back after spinal cord injury in mice

ZHANG Yong-jie\*, ZUO Guo-ping, TANG Min-feng, GU Zhen

(Department of Human Anatomy, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To observe the protective effect of anti-LINGO-1 antibody on the motor and sensory axons after mice spinal cord injury (SCI). **Methods:**Anti-LINGO-1 antibody was administrated by intraperitoneal injection to the mice after a precise 1.1 mm depth dorsal laceration on the 9th thoracic spinal segment was generated by LISA (Louisville injury systems apparatus). Immunohistochemistry or immunofluorescence was used to detect the changes of biotin dextran amine (BDA) labeled descending axons and cholera toxin B subunit (CTB) labeled ascending axons. **Results:**In anti-LINGO-1 antibody treated mice, a few BDA positive fibers grew into or beyond the lesion gap, and then, extended to the caudal white matter. The longest one reached the site of 1.5 mm caudal to the lesion epicenter. At the same time, more CTB positive sensory fibers were found at the edge of lesion gap than the control group, but no CTB positive fibers extended into or beyond the lesion gap. In IgG treated control mice, neither BDA nor CTB positive fibers extended into or beyond the lesion gap. **Conclusion:**Systemic injection of the anti-LINGO-1 antibody promotes CST axonal regeneration and limits the dying back of CTB labeled sensory axons. The results indicate that severed CST axons have more robust response to anti-LINGO-1 antibody treatment than CTB labeled sensory axons and suggest that anti-LINGO-1 antibody may serve as a new potential drug for the therapeutic study of SCI.

**[Key words]** dorsal laceration; anti-LINGO-1 antibody; axonal regeneration

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1629-1634]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81100942);江苏省自然科学基金(BK2010539);江苏高校优势学科建设工程资助项目

\*通讯作者, E-mail: zhangyongjie77@163.com

脊髓损伤后, 由于位于脊髓白质的上行和下行传导束受损, 且无法再生, 导致在损伤平面以下的运动和感觉功能缺失, 产生严重的功能障碍<sup>[1]</sup>。所以促进脊髓损伤后轴突再生是改善患者功能的关键<sup>[2]</sup>。

近年来随着对髓鞘源性轴突再生抑制因子及其在轴突上的受体 NgR 研究的深入, LINGO-1 作为 NgR 受体复合物的跨膜组成部分, 引起了人们的关注<sup>[3]</sup>。已有实验证明 LINGO-1 在脊髓损伤后表达上调, 而抑制脊髓损伤动物 LINGO-1 的表达, 可促进红核脊髓束(RST)及皮质脊髓束(CST)等下行运动纤维的轴突再生(regeneration)或芽生(sprouting)<sup>[4]</sup>。但其对上行感觉纤维的作用是否与对下行运动纤维的作用相同, 尚未见详细报道。本实验中, 通过腹腔注射抗 LINGO-1 抗体, 观察小鼠在脊髓背侧切割伤后, 生物素化葡聚糖胺(BDA)标记的下行 CST 轴突和霍乱毒素 B 亚单位(CTB)标记的上行感觉纤维的变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

16 只 3 月龄雌性 C57BL/6 小鼠, 体重约 20 g, 由南京医科大学实验动物中心提供。动物饲养、管理及使用均严格按照南京医科大学实验动物管理规范进行。

小鼠单克隆抗 LINGO-1 抗体 (R&D 公司, 美国), BDA (Molecular Probes 公司, 美国), CTB (Sigma 公司, 美国), 生物素-辣根过氧化物酶试剂盒 (Vectastain Elite ABC kit 公司, 美国), 山羊抗霍乱毒素 B 抗体 (goat anti-CTB, List Biological 公司, 美国), 兔抗胶质纤维酸性蛋白抗体 (rabbit anti-GFAP, DAKO 公司, 丹麦), Texas-Red-结合驴抗山羊 IgG、FITC-结合驴抗兔 IgG (Jackson 公司, 美国), 小鼠脊髓损伤造模仪 (LISA, 由美国 Norton 神经中心 Dr. Shields 馈赠), 微量注射器 (Hamilton 公司, 美国), SR-6N 立体定位仪 (Narishige 公司, 日本), 手术显微镜 (六六视觉公司, 中国), 冰冻切片机、荧光显微镜 (Leica 公司, 德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型制作

参照既往报道<sup>[5]</sup>, 采用 LISA 脊髓损伤造模仪 (图 1A) 制作小鼠第 9 胸髓 (T9) 背侧切割伤模型, 简述如下: 小鼠经 3.5% 水合氯醛 (1.0 ml/100 g) 腹腔注射麻醉, 取俯卧位, 行第 9 胸椎椎板切除术。采用 LISA 脊髓损伤仪振荡切割小鼠背侧脊髓, 深度 1.1 mm (图 1B、C), 缝合肌层与皮肤。手术日记为术后 0 d。

#### 1.2.2 抗 LINGO-1 抗体注射动物

术后动物随机均分为两组, 8 只接受抗 LINGO-1 抗体注射, 8 只接受相应 IgG 对照注射。小鼠每次

经腹腔注射 100  $\mu$ g 抗体或 IgG, 隔日 1 次, 持续到术后 25 d。

#### 1.2.3 BDA 标记 CST 传导束

动物在术后第 22 天接受 BDA 注射, 标记 CST 传导束。小鼠同上麻醉后, 头部固定于立体定位仪。用连接有自制微玻管 (外径 40  $\mu$ m) 的微量注射器吸取 10% BDA 注射到双侧躯体运动皮层 (图 1D)。每侧均有 3 个注射点, 深度距皮层 0.7 mm, 距前囟点坐标为: 外侧 1.0 mm/后 0 mm、外侧 1.0 mm/后 0.5 mm、外侧 1.0 mm/后 1.0 mm, 每个注射点注射 0.4  $\mu$ l BDA (图 1E)。每次注射后微玻管留置 2 min, 以防溢出。

#### 1.2.4 CTB 标记上行感觉传导束

小鼠在术后第 29 天 (处死前 3 d), 双侧坐骨神经注射 1% CTB (每侧 0.5  $\mu$ l), 逆行标记上行感觉传导束 (图 1F)。小鼠同上麻醉后, 分离暴露靠近股骨上段的坐骨神经, 结扎坐骨神经远侧端, 32 号针头朝神经近侧端注射 CTB, 注射后留针 2 min, 以防漏出。CTB 注射 3 d 后, 处死小鼠, 灌注取材。

#### 1.2.5 动物灌注固定、组织取材与切片

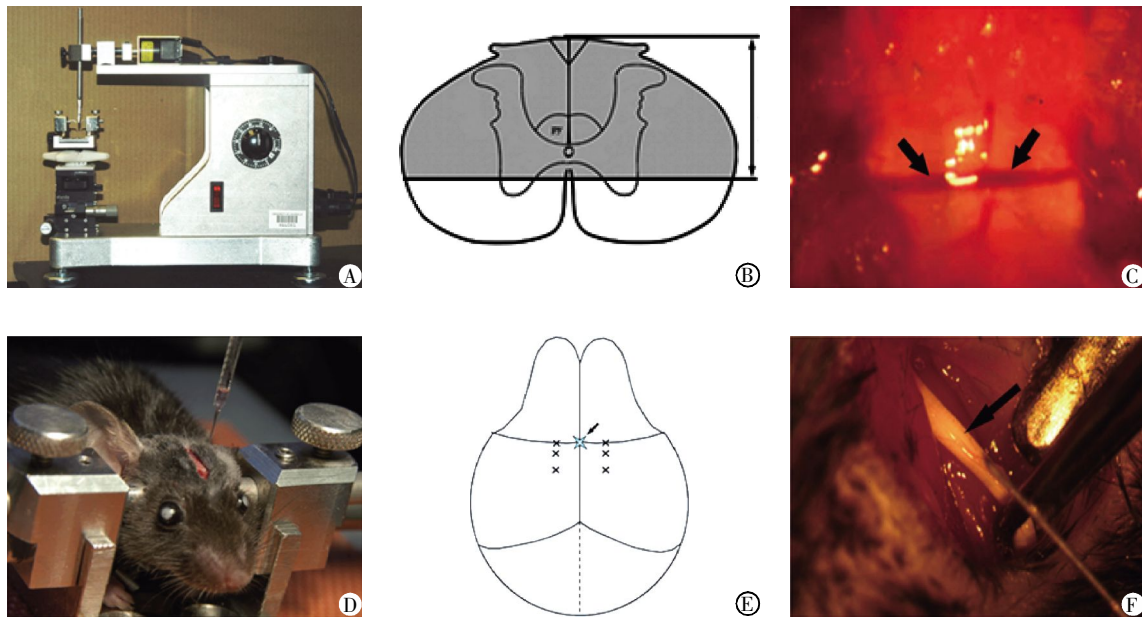
动物于深麻醉下, 经左心室灌注 4% 多聚甲醛 30 ml, 取含损伤部位 T9 节段上下共长 1 cm 组织, 经后固定、梯度蔗糖脱水处理后, 采用 Leica 恒冷切片机行连续矢状冰冻切片, 片厚 16  $\mu$ m。分 2 套贴于载玻片上。

#### 1.2.6 免疫组化及免疫荧光染色

两套切片, 一套用于 BDA 免疫组化染色, 另一套行 CTB 和 GFAP 免疫荧光双染。染色步骤按常规操作进行<sup>[6]</sup>。采用 ABC 法进行 BDA 免疫组织化学染色: 冰冻切片经烤片、漂洗、1.5% 过氧化氢反应 20 min 后, 滴加 Elite ABC 混合液, 室温孵育 30 min, DAB 底物液室温 5~10 min, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。CTB 及 GFAP 免疫荧光染色简述如下: 10% 驴血清封闭, 一抗山羊抗 CTB 抗体 (1:400)、兔抗 GFAP 抗体 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗 Texas-Red-结合驴抗山羊 IgG (1:200)、FITC-结合驴抗兔 IgG (1:150), 室温 2 h, 甘油封片。

#### 1.2.7 组织学分析与纤维计数

计数及图像重建再生的 CST 纤维: 正置显微镜下观察切片, 数码摄像头采集图像, Stereo Investigator 图像分析软件 (MicroBrightField 公司, 美国) 计数 BDA 标记再生的 CST 轴突。简述如下: 利用 Stereo Investigator 软件描绘出脊髓外形及切口, 描绘并计数经过距离切口中心 250、500、750、1 000  $\mu$ m 的 4 条线的轴突数。结果输入 Excel 软件进行统计



A: LISA 脊髓损伤造模仪; B: 脊髓背侧切割深度及范围示意图; C: 箭头示脊髓切口; D: BDA 注射过程; E: BDA 注射点示意图; F: 从坐骨神经注射 CTB, 箭头示坐骨神经。

图 1 小鼠 T9 脊髓背侧切割伤模型的制作及 BDA 与 CTB 标记方法

Figure 1 The mice dorsal laceration model on the 9th thoracic spinal segment and the axonal tracing method of the CTB labeled ascending axons and the BDA labeled descending axons

分析。Neurolucida 软件重建典型切片, 显示经抗 LINGO-1 抗体治疗后 BDA 阳性的 CST 轴突再生情况。

测量 CTB 阳性纤维灰度值: 正置荧光显微镜下观察切片, Image Pro plus 7 软件 (Media Cybernetics 公司, 美国) 对 CTB 阳性纤维进行定量分析。分别测量并累加每一样本距离切口中心尾侧 0~250、251~500、501~750、751~1 000  $\mu\text{m}$  范围内的 CTB 阳性纤维灰度值。

### 1.3 统计学方法

数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异用 Student's *t*-test 或 One-Way ANOVA 进行统计学分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 抗 LINGO-1 抗体注射促进 CST 轴突再生

本实验采用 BDA 顺行追踪标记, 检测抗 LINGO-1 抗体对 CST 轴突再生的影响。DAB 组织化学染色显示, 在 5 只 (62.5%) 接受抗 LINGO-1 抗体注射的小鼠, 可见少量细纤维长入并越过损伤部位, 在尾侧白质内前行, 最远可达损伤部位尾侧 1.5 mm。这些再生的轴突较弯曲, 常具有较多的分叉, 其末端亦可见球状结构 (图 2A~D), 而不像正常轴突般呈线性分布<sup>[7]</sup>。接受 IgG 注射的对照组动物, CST 轴突

均终止于切口嘴侧缘, 很多轴突断端可见由于萎缩而形成的球型结构, 没有任何轴突长入或越过切口, 提示没有轴突再生 (图 2E~G)。

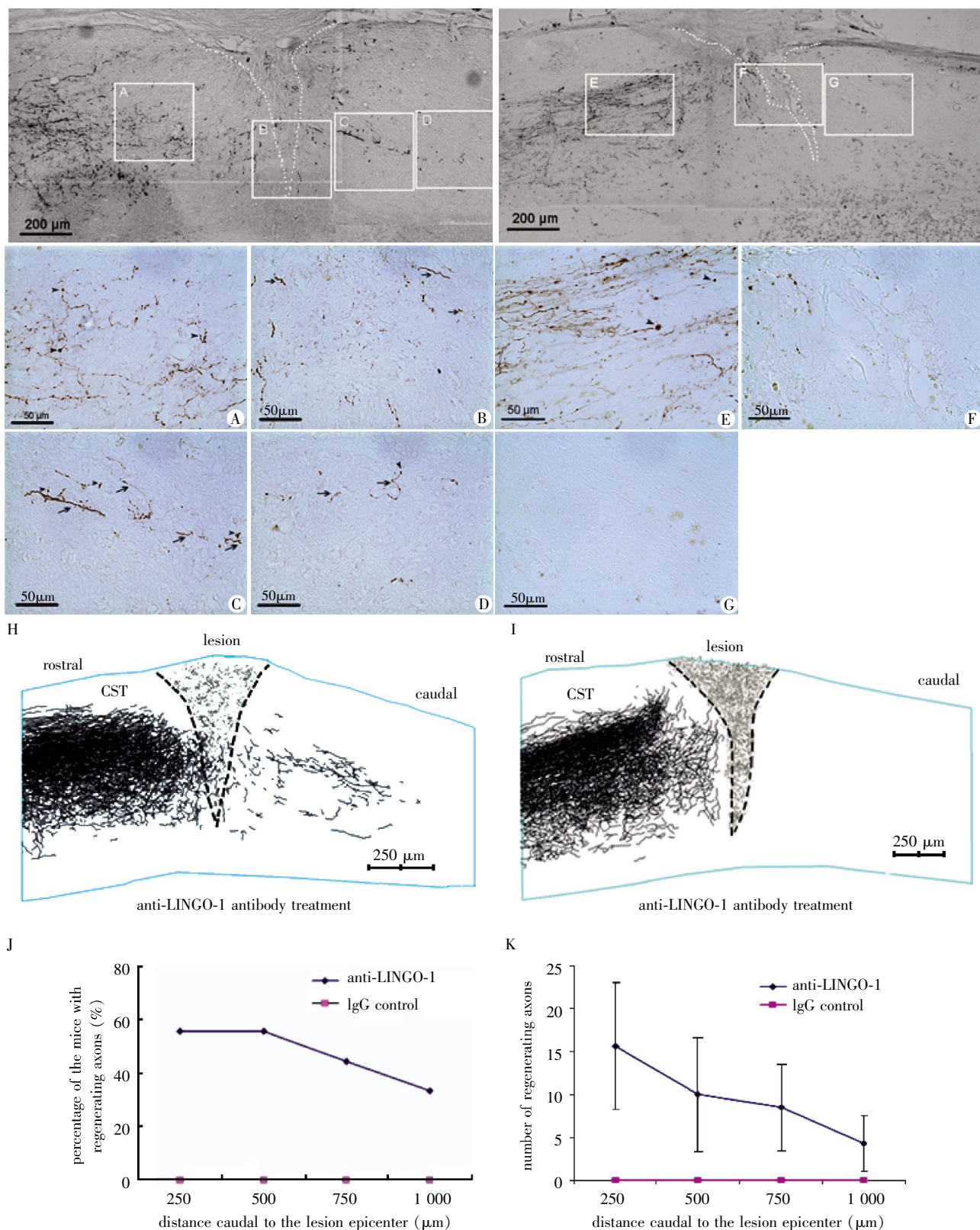
Neurolucida 软件重建图片可见 CST 标记轴突的全貌 (图 2H, I)。仅在部分接受抗 LINGO-1 抗体注射的小鼠可见再生长入损伤尾侧的纤维。再生轴突的计数结果显示在切口尾侧端随着距离的增大, 再生轴突的数目亦相应减少 (图 2J, K)。

### 2.2 抗 LINGO 抗体抑制 CTB 标记的感觉神经萎缩

通过坐骨神经注射 CTB 逆行标记, 检测抗 LINGO-1 抗体对损伤的上行感觉纤维的作用。免疫荧光染色结果显示在两组动物中均没有任何 CTB 标记的上行感觉纤维可长入或越过损伤切口 (图 3A~D), 提示抗 LINGO-1 抗体不能促进 CTB 标记的感觉神经再生或芽生。但在抗 LINGO-1 抗体注射组, 于损伤尾侧缘可见更多的 CTB 标记轴突 (图 3B, D)。Image Pro 软件测量的 CTB 阳性纤维灰度值显示, 在切口尾侧 0~250  $\mu\text{m}$  距离内, 抗 LINGO-1 抗体注射组为  $47\,430.25 \pm 14\,788.34$ , 明显高于 IgG 对照组  $30\,531.88 \pm 10\,268.44$  ( $P < 0.05, n = 8$ )。提示抗 LINGO-1 抗体可抑制 CTB 标记的感觉神经萎缩。

## 3 讨论

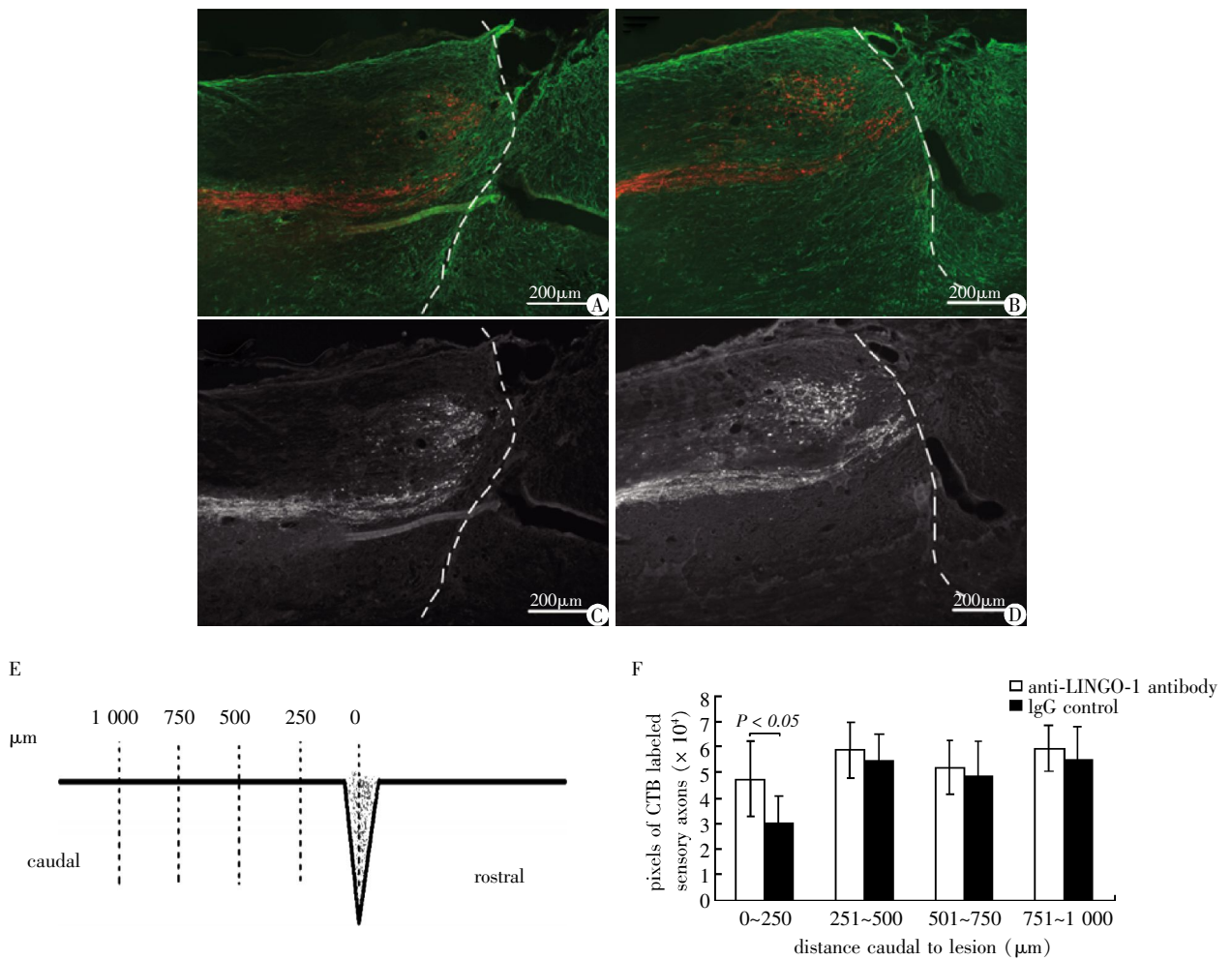
探索脊髓损伤后轴突再生的实验研究, 制作一



A~G 上图方框内相应部位的 BDA 阳性纤维。A~D: 抗 LINGO-1 抗体注射小鼠; E~G: IgG 对照注射小鼠, 箭头指 BDA 阳性纤维; H~I: Neurolucida 软件重建图片示 BDA 阳性纤维; J: 距离切口中心尾端不同距离有再生的 BDA 阳性纤维的小鼠比例; K: 距离切口中心尾端不同距离的 BDA 阳性纤维数目。

图 2 光镜及 Neurolucida 软件重建图片示抗 LINGO-1 抗体和 IgG 对照注射小鼠的 BDA 阳性纤维变化

Figure 2 The differences of the BDA positive fibers in the mice treated with the anti-LINGO-1 antibody or IgG control under the light microscope and the reconstructed image with the Neurolucida software



A,B:免疫荧光染色示 CTB 阳性的上行纤维,绿色为 GFAP 阳性星形胶质细胞,红色为 CTB 阳性纤维;C,D:示采用 Image Pro 软件测量 CTB 阳性纤维灰度值图片;E:在切割尾侧端不同距离进行纤维计数或灰度测量的示意图;F:在切割尾侧端不同距离范围内 CTB 阳性纤维的灰度值。

图 3 荧光显微镜下示抗 LINGO-1 抗体和 IgG 对照注射小鼠 CTB 阳性纤维的变化

Figure 3 The differences of the CTB positive fibers in the mice treated with the anti-LINGO-1 antibody or IgG control under the fluorescence microscope

个合适的脊髓切割模型较为重要。本研究采用装有振荡切片的 LISA 仪器在小鼠 T9 脊髓节段制作背侧切割伤模型,1.1 mm 的深度已超过小鼠胸段脊髓厚度的 2/3,可以保证走行于脊髓后索底部的所有 CST 下行纤维<sup>[8]</sup>和在坐骨神经用 CTB 逆行标记的上行感觉纤维全部被切断,从而在动物模型上保证了实验结果的可靠性<sup>[5]</sup>。

导致成年哺乳动物脊髓损伤后神经无法再生的诸多原因中,髓鞘源性轴突生长抑制因子是制约轴突再生的主要内部环境因素之一<sup>[9]</sup>。髓鞘源性轴突生长抑制因子,包括 MAG、NogoA<sup>[10]</sup>和 OMgp 等<sup>[11]</sup>,通过与分布在轴突生长锥表面的 Nogo 受体(NgR1)复合物结合,产生抑制轴突再生的功能。NgR 复合物由 NgR1/LINGO-1/P75 或 TROY(TAJ)组成。其中,

LINGO-1 是一富含亮氨酸重复序列的跨膜蛋白,可将抑制轴突生长的信号跨膜转导至胞内激活 RhoA 途径,最终抑制轴突再生<sup>[3]</sup>。

已有实验证明抗 LINGO-1 抗体可通过腹腔注射到达脱髓鞘病变的脊髓<sup>[12]</sup>,故在本实验中,也采用这一贴近临床应用且易行的方法。术后选择合适的时间窗进行抗体注射对于实验结果亦很重要,前人研究结果显示 LINGO-1 在脊髓损伤后 1 d 即表达上调<sup>[3]</sup>,所以我们在动物手术后立即开始注射抗体。对于延时注射抗体的疗效,仍有待进一步探讨。

成年小鼠的 CST 轴突在损伤后不能再生。而在 8 只接受抗 LINGO-1 抗体注射的小鼠中,有 5 只可见再生的 CST 纤维,并能长入或越过损伤部位,在尾侧白质内前行,最远可达损伤部位尾侧 1.5 mm。

结果提示抗 LINGO-1 抗体能促进 CST 轴突再生。但对于损伤轴突的可塑性重建,轴突再生只是第一步,紧随其后的髓鞘形成,突触重建<sup>[13]</sup>则更为重要。所以在后续实验中,将进一步观察抗 LINGO-1 抗体能否促进再生的轴突重新形成髓鞘,并重建突触联系。同时继续研究抗 LINGO-1 抗体对于神经元的凋亡、轴突的 RhoA 活性等影响,以进一步揭示抗体的作用机制。

关于脊髓损伤后轴突再生或芽生的区别,已有诸多报道,比较公认的观点是:再生的轴突应来自于切断的神经纤维,且生长进入或跨过损伤局部。而芽生的轴突则来自于未损伤的轴突,且不经损伤局部<sup>[14]</sup>。而本文采用的动物模型可切断所有下行在脊髓背侧索的 CST 纤维,而且免疫组化结果显示在抗 LINGO-1 抗体注射组动物的脊髓切割伤部位及远侧端均发现 BDA 标记的轴突,故认为此类纤维主要为再生的轴突。

虽然抗 LINGO-1 抗体不能促进 CTB 标记的上行感觉纤维再生,但能有效抑制其纤维萎缩。由于不同脊髓传导束的再生能力不同,对于不同营养因子或抑制因子的反应也不一样<sup>[15]</sup>,结合 LINGO-1 在正常动物 CNS 的表达从头侧向尾侧呈递减的趋势,前脑最高、脊髓最低<sup>[3]</sup>,提示抗 LINGO-1 抗体可能对于胞体位于端脑躯体运动皮层的 CST 下行传导束有更好地促进再生的功能。另外,有研究表明脊髓损伤后适当的功能锻炼可部分改善行为学,其机制可能与下行传导通路的重建有关。当脊髓损伤后中枢内一些并行的感觉和运动传导束可能会重建纤维联系<sup>[16]</sup>,而抗 LINGO-1 抗体在促进运动纤维再生的同时也可抑制感觉纤维的萎缩,可能对脊髓损伤后,脊髓损伤节段以下的纤维重建起促进作用,从而改善其功能恢复。后续试验中将进一步观察脊髓损伤小鼠接受抗 LINGO-1 抗体处理后的行为学改变情况。

总之,实验结果显示在小鼠 T9 节段脊髓背侧切割伤后,腹腔注射抗 LINGO-1 抗体,可有效促进 CST 下行纤维的轴突再生,同时抑制 CTB 标记的上行感觉纤维萎缩。

#### [参考文献]

- [1] Simpson LA, Eng JJ, Hsieh JT, et al. The health and life priorities of individuals with spinal cord injury: a systematic review [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(8): 1548-1555
- [2] Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(8): 644-653
- [3] Mi S, Lee X, Shao Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex [J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(3): 221-228
- [4] Mi S, Sandrock A, Miller RH. LINGO-1 and its role in CNS repair [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10): 1971-1978
- [5] Hill RL, Zhang YP, Burke DA, et al. Anatomical and functional outcomes following a precise, graded, dorsal laceration spinal cord injury in C57BL/6 mice [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(1): 1-15
- [6] 李雪甫,王永实,傅玉峰,等. 甲基强的松龙对脊髓损伤后下丘脑室旁核 FOS 和 NOS 表达的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(2): 190-192
- [7] Steward O, Zheng B, Tessier-Lavigne M. False resurrections; distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 459(1): 1-8
- [8] Bregman BS, Kunkel-Bagden E, McAtee M, et al. Extension of the critical period for developmental plasticity of the corticospinal pathway [J]. *J Comp Neurol*, 1989, 282(3): 355-370
- [9] Jaerve A, Muller HW. Chemokines in CNS injury and repair [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(1): 229-248
- [10] 蒲建章,熊南翔,赵洪洋,等. Nogo-A 短发夹样 RNA 真核表达载体的构建 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(12): 1196-1198
- [11] Wang T, Xiong JQ, Ren XB, et al. The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review [J]. *Brain Res Bull*, 2012, 87(6): 499-503
- [12] Mi S, Miller RH, Tang W, et al. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells [J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(3): 304-315
- [13] Rognon S, Schwab M, Schwartz M, et al. Spinal cord injury: time to move? [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(44): 11782-11792
- [14] Tuszynski MH, Steward O. Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS [J]. *Neuron*, 2012, 74(5): 777-791
- [15] Deumens R, Koopmans GC, Joosten EA. Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury [J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 77(1-2): 57-89
- [16] Smith GM, Falone AE, Frank E. Sensory axon regeneration; rebuilding functional connections in the spinal cord [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(3): 156-163

[收稿日期] 2012-06-29