

LINGO-1 在脊髓神经干细胞向少突胶质细胞分化中的作用研究

赵晨光¹, 许刚², 琚芬¹, 孙玮¹, 袁华¹, 牟翔¹

【摘要】 目的:观察 LRR 结构和免疫球蛋白结构域 Nogo 受体作用蛋白(LINGO-1)在脊髓神经干细胞(SpNSCs)向少突胶质细胞分化过程中的表达特征及其对少突胶质细胞分化成熟的作用。方法:体外培养大鼠脊髓神经干细胞并诱导分化,于分化第3天及第5天进行 LINGO-1 与 A2B5 及 O4 免疫荧光双染色,观察 LINGO-1 的表达特征。体外培养的大鼠脊髓来源神经干细胞分为对照组及干扰组,干扰组通过 LINGO-1 shRNA 慢病毒感染 SpNSCs 下调 LINGO-1 表达,对照组表达 Scramble-shRNA 的慢病毒,通过 LINGO-1 shRNA 慢病毒感染 SpNSCs 下调 LINGO-1 表达,于分化第7天免疫荧光染色检测少突胶质细胞分化情况及髓鞘碱性蛋白(MBP)表达情况。**结果:**LINGO-1 与 A2B5 及 O4 均共表达于分化细胞中。下调 LINGO-1 表达后,成熟少突胶质细胞达到对照组细胞的 3.28 倍,MBP 表达量为对照组的 5.31 倍,且均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论:**LINGO-1 在少突胶质细胞分化过程中持续表达,LINGO-1 负性调控少突胶质细胞分化及成熟。

【关键词】 LINGO-1;脊髓神经干细胞;少突胶质细胞;分化

【中图分类号】 R49 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2017.03.002

Effects of LINGO-1 on oligodendrocyte differentiation of spinal cord-derived neural stem cells Zhao Chenguang, Xu Gang, Ju Fen, et al. Department of Rehabilitation, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xian 710032, China

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of LINGO-1 in the oligodendrocyte differentiation of spinal cord-derived neural stem cells (SpNSCs). **Methods:** SpNSCs were isolated from rat spinal cord and cultured *in vitro*. The expression of LINGO-1 was detected by double immunofluorescence staining of LINGO-1 and A2B5, O4 at 3th and 5th day of differentiation. SpNSCs isolated from rat spinal cord were cultured *in vitro* and divided into RNAi group and control group. The RNAi group was transfected with LINGO-1 shRNA lentiviral vector to down-regulate the expression of LINGO-1, and control group was transfected with lentiviral vector. The oligodendrocyte was examined by immunofluorescence staining and MBP expression was detected using Western blotting at 7th day of differentiation. **Results:** LINGO-1 was co-expressed with A2B5 and O4. After down-regulation of LINGO-1 expression, the number of mature oligodendrocytes was 3.28 fold over the control group, and the expression of MBP was 5.31 fold over the control group ($P < 0.05$ for all). **Conclusion:** LINGO-1 was constantly expressed and had a negative effect on the differentiation of oligodendrocytes.

【Key words】 LINGO-1; spinal cord-derived neural stem cells; oligodendrocyte; differentiation

LRR 结构和免疫球蛋白结构域 Nogo 受体作用蛋白(LRR and Ig Domain Containing, Nogo Receptor Interacting Protein, LINGO-1)是髓鞘源性抑制因子(Myelin-Associated Inhibitory Factors, MAIFs)复合受体中最为重要的组成部分之一^[1]。当脊髓损伤后,Nogo-A、髓磷脂相关糖蛋白(Myelin Associated Glycoprotein, MAG)等髓鞘源性抑制因子大量释放,并通

过与 NgR/P75/LINGO-1 或 NgR/P75/LINGO-1 复合受体结合来介导多种生物效应,在脊髓损伤后的神经修复中扮演了极其重要的角色^[2]。LINGO-1 是由 614 个氨基酸构成的跨膜生物蛋白,由 15 号染色体编码而成,定位于 15q24.3,其可以通过调控 RhoA 途径,终使生长锥塌陷而使轴突再生受阻^[3];也可以参与并下调表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR),从而影响 Akt 通路而调控神经元存活^[4]。瑞典 Frisen 小组研究证实在小鼠室管膜区存在着“静止”状态的神经干细胞(Neural Stem Cells, NSCs),在脊髓损伤等特定因素下被激活从而出现增殖进而分化的现象^[5],本研究旨在观察 LINGO-1 调控脊髓神经干细胞(Spinal Cord Derived Neural Stem

基金项目:国家自然科学基金(81100932);中国博士后科研基金(20100481518);科技部国际合作重点专项基金(2013DFA32610)

收稿日期:2016-11-16

作者单位:1.第四军医大学第一附属医院康复医学科,西安 710032;2.新疆军区总医院全军骨科中心,乌鲁木齐 830000

作者简介:赵晨光(1981-),男,主治医师,主要从事神经损伤的基础与临床研究。

通讯作者:牟翔,Pro. mu@fmmu.edu.cn

Cells, SpNSCs)向少突胶质细胞分化及成熟的生物学作用,为进一步调控其促进脊髓损伤后神经修复带来新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 试验用 Fisher344(10 周龄)大鼠(160~180g)由第四军医大学实验动物中心提供,共 3 只,进行 3 次生物学试验重复。细胞培养用 DMEM/F12、B27 添加剂、N2 添加剂、GlutaMAX 添加剂及胎牛血清等均为 Gibco 公司产品;bFGF 和 EGF 购于 Peprotech 公司,Accutase、Poly-L-Lysine 及 Laminin 购于 Sigma 公司;LINGO-1、A2B5、O4、髓鞘碱性蛋白(Anti-Myelin Basic Protein, MBP),荧光二抗 FITC-conjugated Goat anti-mouse, FITC-conjugated Goat anti-rabbit 及 Texas Red-conjugated Goat anti-mouse IgG 购自 STEMCELL 公司。

1.2 方法 ①成年大鼠 SpNSCs 的分离培养:生长 10 周 Fischer344 大鼠处死后,椎板减压暴露脊髓,取 C₃ 至 T₁₂ 节段脊髓置于预冷的 Hanks 液中,小心用眼科剪剥离硬脊膜,将脊髓剪碎后加入 Accutase 中于 37°C 中消化 30 min,加入 NSCs 培养基终止消化,离心后用 NSCs 培养基重悬,用火焰抛光的巴斯德吸管反复吹打成单细胞悬液并用 40 μ m 滤网过滤后,胎盘蓝计数,按 10⁵/ml 密度植于 NSCs 培养基(DMEM/F12+2%B27+1%N2+20ng/ml EGF+20ng/ml bFGF)中,每 3 天半量换液一次。生长至第 7 天时机械吹打法传代处理。每 7 天传代,大于 3 代后进行实验。② LINGO-1 shRNA 慢病毒表达载体构建及包装由上海吉凯生物基因公司提供。体外培养的大鼠脊髓来源神经干细胞分为对照组及干扰组,干扰组通过 LINGO-1 shRNA 慢病毒感染 SpNSCs 下调 LINGO-1 表达,对照组表达 Scramble-shRNA 的慢病毒,shRNA 插入序列为:Sense5'-TGCTGTAGTCTAGCAGGATGACGATCGTTTTGGCCACTGACTGACGATCGTACTGCTAGACTA-3', Antisense 5'-CCTGTAGTCTAGCAGTACGATCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGATCGTCATCCTGCTAGACTAC-3'。③免疫荧光染色:吸弃培养基用 PBS 清洗 1 次以彻底去除残留的培养基,4%多聚甲醛固定 30min 后用 PBS 清洗 3 次,每次 5min;加入 0.3% Triton X-100 通透 5min, PBS 清洗 2 次。加入稀释好的一抗 4°C 孵育过夜,次日吸弃一抗, PBS 洗 3 次,每次 5min。加入稀释好的荧光二抗 37°C 避光孵育 2h, PBS 洗 3 次,每次 5min,之后滴加 DAPI 封片剂,室温孵育 30min。镜下观察荧光染色的少突胶质细胞形态及数量,并使用

Image-Pro Plus 5.0 软件进行测量分析 A2B5、O4 阳性细胞和 LINGO-1 双染阳性细胞比例。④ Western-blot 蛋白定量检测:分别在分化第 7 天取蛋白,吸弃培养液,用预冷的 PBS 清洗 2 次,以彻底去除残留的培养液。加入预冷的 RIPA 裂解细胞并转移入预冷的离心管中,离心后将上清转移至预冷的离心管中,用 BCA 对提取的蛋白进行定量。取蛋白样品,加入蛋白上样缓冲液, SDS-PAGE 分离蛋白,湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜转移至含有 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液中封闭 1h,加入一抗的稀释液, 4°C 过夜,次日 TBST 洗膜 3 次,每次 10min。将 PVDF 膜放入含稀释二抗的 10cm 皿中,孵育 1h,在增强化学发光反应混合液中反应 2~3min 后,拍片显影,条带灰度采用 Image J 软件进行分析 MBP 蛋白的相对灰度比值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LINGO-1 在少突胶质细胞分化过程中表达情况 分别采用少突胶质细胞标志物 A2B5 及 O4 和 LINGO-1 抗体进行双染色。结果表明在诱导分化后,部分脊髓神经干细胞向少突胶质细胞分化,细胞有双极或三极突起,胞体较规则。LINGO-1 抗体(图 1B、F)和 A2B5 抗体(图 1A)、O4 抗体(图 1E)以及细胞核 Hoechst 染色(图 C、G)显示分别共表达于培养分化细胞中(图 1D、H),说明 LINGO-1 在脊髓神经干细胞分化成为少突胶质细胞的过程中持续表达。

2.2 LINGO-1 促进少突胶质细胞分化成熟 为了进一步了解 LINGO-1 对少突胶质细胞分化成熟的影响,我们在分化第 7 天应用 O4 抗体对神经元进行免疫荧光染色。结果提示 LINGO-1 干扰组的少突胶质细胞(图 2D-F)比对照组(图 2A-C)的数量更多,成熟度更高,主要表现在 LINGO-1 干扰组少突胶质细胞分化更为彻底,细胞突起更长,并且有更多的片状髓鞘结构。定量分析成熟少突胶质细胞比例显示对照组为 5.3%,而 LINGO-1 干扰组则高达 17.4%,是对照组细胞的 3.28 倍,2 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 LINGO-1 对 MBP 蛋白表达的影响 相比对照组, LINGO-1 干扰组的 MBP 表达量明显升高(图 3), MBP 条带采用 Image J 软件进行灰度值分析比较,转化为数值进行量倍比较,进一步半定量分析显示 LINGO-1 干扰组的 MBP 表达量为对照组的 5.31 倍($56.8 \pm 3.3, 0.7 \pm 0.5, P < 0.05$)。

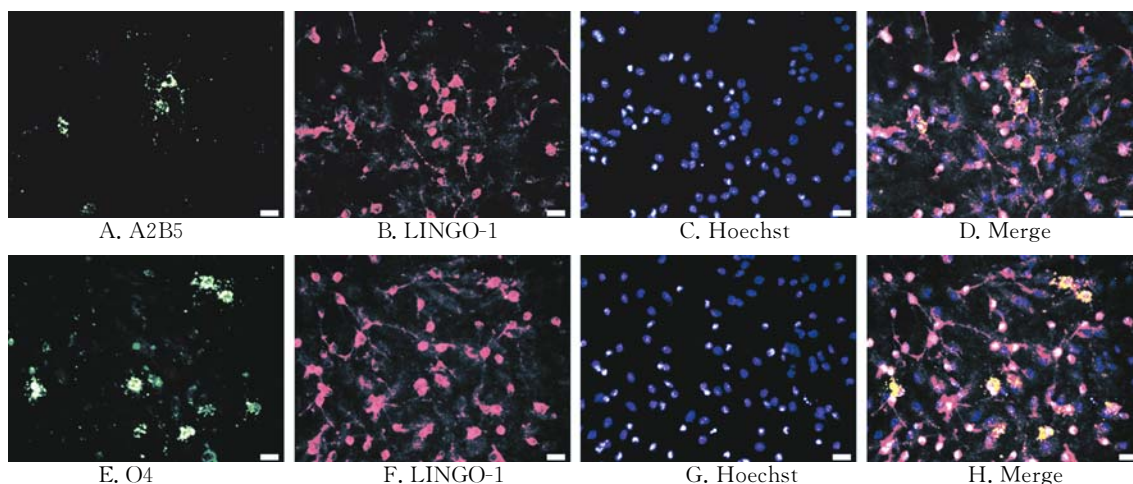


图1 LINGO-1在少突胶质细胞分化过程中表达情况。LINGO-1抗体(B,F)与A2B5抗体(A)、O4抗体(E)以及细胞核Hoechst染色(图C、G)共表达在培养细胞中(D、H)(×40)。

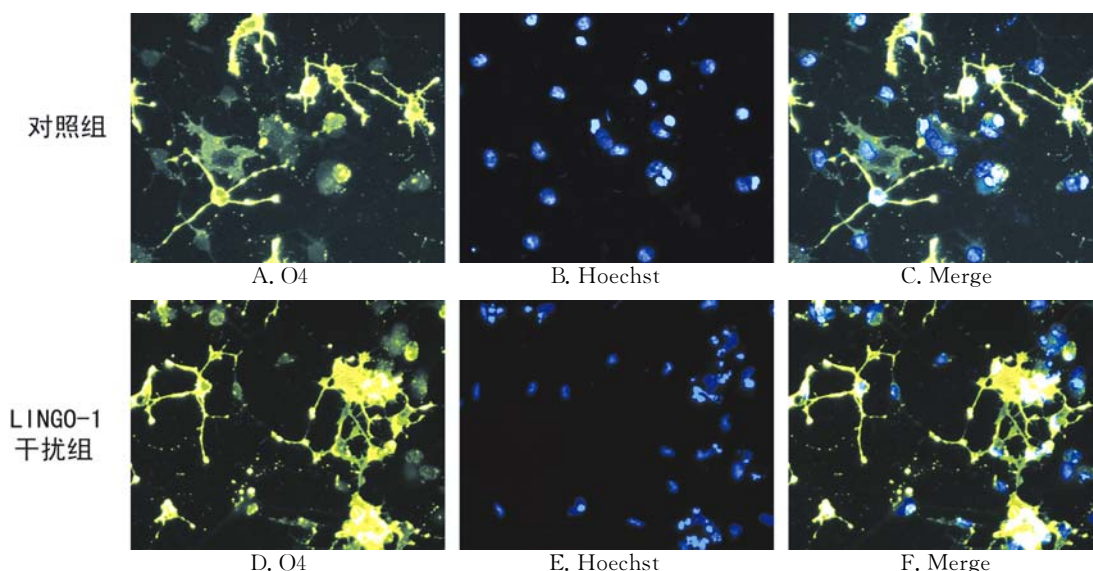


图2 LINGO-1对少突胶质细胞分化成熟的影响:荧光倒置显微镜下观察LINGO-1干扰组(D-F)和对照组(A-C)少突胶质细胞的成熟状况,绿色细胞表示O4阳性细胞(×40)。

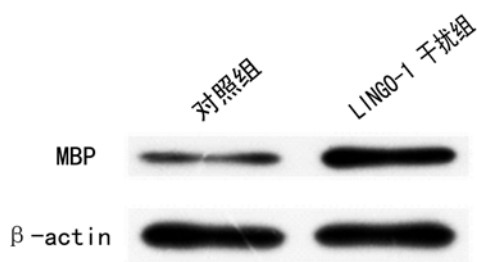


图3 LINGO-1对MBP蛋白表达的影响

3 讨论

本实验中成功从成年大鼠脊髓中提取培养了神经干细胞,诱导分化后利用免疫荧光染色发现LINGO-1分别与A2B5及O4共表达,证实LINGO-1表达于少突胶质细胞成熟的各阶段。然后利用RNAi对LINGO-1的表达进行下调,发现下调LINGO-1的表达可以促进脊髓神经干细胞向少突胶质细胞分化,并同时促

进其成熟,进一步检测成熟少突胶质细胞表达的MBP蛋白时也发现LINGO-1干扰组MBP蛋白表达量明显高于对照组。以上实验结果为脊髓损伤后早期干预促进内源性脊髓神经干细胞向少突胶质细胞分化并促进其成熟提供活体体外证据,也为进一步促进脊髓损伤后神经修复带来希望。

脊髓损伤后大量神经元坏死、神经传导束崩解,少突胶质细胞包裹轴突形成的髓鞘分解,形成大量的髓鞘源性抑制因子(Myelin-Associated Inhibitory Factors, MAIFs),这其中包括Nogo-A、MAG和OMgp为代表抑制因子,其中Nogo-A通过其复合受体之一LINGO-1(LRR and Ig Domain Containing, Nogo Receptor Interacting Protein)介导了多种生物学效应,这包括阻止轴突再生及影响神经元存活^[6-7]。脊髓损伤后位于中央水管周围的具有多种分化潜能的神干干细胞被激活,但是大部分却分化成为星形胶质细胞,所以如何调控其

分化便成为目前神经修复研究的热点问题。

本实验中我们发现分离培养的脊髓神经干细胞经诱导分化后, LINGO-1 分别与少突胶质细胞标志物 A2B5 及 O4 共表达于分化细胞中。A2B5 及 O4 同为少突胶质细胞特异性标志物, 但是二者的表达时间却不尽相同^[8]。A2B5 在少突胶质细胞的早期表达, 即在少突胶质-2 型星形胶质细胞(Oligodendrocyte-Type2 Astrocyte Progenitor, O-2A Progenitor)及成少突胶质细胞中表达, 而 O4 的表达则较为靠后, 分别在成少突胶质细胞、未成熟少突胶质细胞及成熟少突胶质细胞中表达。本实验中发现 LINGO-1 可以分别与以上 2 个标志物分别共表达, 这说明 LINGO-1 在由脊髓神经干细胞分化为成熟少突胶质细胞的整个过程中持续表达, 也提示其可能会在这一过程中持续发挥重要作用。

为了验证 LINGO-1 对少突胶质细胞分化的作用, 我们进一步下调 LINGO-1 的表达, 结果发现干预后少突胶质细胞分化成熟比例有明显提高, 达到 17.4%, 是对照组的 3 倍之多。此外 LINGO-1 干扰组的少突胶质细胞还表现为细胞突起更长, 并且有更多的片状髓鞘结构。Lööv^[9]也检测过 LINGO-1 对皮层来源 NSCs 向少突胶质细胞分化的影响, 其发现下调 LINGO-1 后, 少突胶质细胞分化成熟有轻微的升高, 但是并无统计学意义, 这可能与不同来源的 NSCs 的本身特性有一定关系。

MBP 蛋白是成熟少突胶质细胞中表达的蛋白, 是构成髓鞘的主要成分之一, 其表达量的多少可以间接反映出少突胶质细胞的成熟情况, 试验中 LINGO-1 干扰组的 MBP 表达量明显升高, 为对照组的 5 倍之多, 这与前面的实验结果是一致的, 都反应出 LINGO-1 对 NSCs 向少突胶质细胞分化成熟的负性调控作用。

本研究没有进一步检测 LINGO-1 影响少突胶质细胞成熟后对轴突成髓鞘作用的影响及分化成熟可能

涉及的通路, 这也是本研究下一步所努力的方向。明确 LINGO-1 在脊髓 NSCs 分化过程中在少突胶质细胞中的表达特征及其对少突胶质细胞分化成熟的影响可以使我们更加广泛的了解 LINGO-1 的生物学功能, 也为进一步促进脊髓损伤后神经修复提供可能的作用靶点, 为治疗脊髓损伤带来更多的希望。

【参考文献】

- [1] 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.
- [2] GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein[J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 439-444.
- [3] Ji B, Li M, Wu WT, et al. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 33(3): 311-320.
- [4] Zhao XH, Jin WL, Wu J, et al. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta and up-regulation of LINGO-1 are involved in LINGO-1 antagonist regulated survival of cerebellar granular neurons[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(5): 727-735.
- [5] Sabelström H, Stenudd M, Frisén J. Neural stem cells in the adult spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2014, 260(1): 44-49.
- [6] Mi S, Hu B, Hahm K, et al. LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Nat Med*, 2007, 13(10): 1228-1233.
- [7] Wang F, Zhu Y. The interaction of Nogo-66 receptor with Nogo-P4 inhibits the neuronal differentiation of neural stem cell[J]. *Neuroscience*, 2008, 151(1): 74-81.
- [8] Armstrong R. Isolation and Characterization of Immature Oligodendrocyte Lineage Cells[J]. *Methods*, 1998, 16(3): 282-292.
- [9] Lööv C, Fernqvist M, Walmsley A, et al. Neutralization of LINGO-1 during in vitro differentiation of neural stem cells results in proliferation of immature neurons[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): 29771-29789.

作者·读者·编者

重要启示

从 2015 年 7 月 22 日起, 本刊交纳各项费用(如审稿费、版面费、广告费、订刊费、版权费及发行费等)均改为银行柜台或网银转账汇款(禁止无卡现金存款或支付宝、财付通等转账), 不再通过邮局汇款或现金。本刊银行账户为同济医院对公账号, 具体信息请登录网站 www.zgkfzz.com 首页“汇款要求”查看。

特别提示: 本刊只接受给华中科技大学同济医学院附属同济医院单位转账。目前如有非法机构冒充《中国康复》收取费用, 多以个人名义要求转账, 请作者注意甄别, 谨防上当受骗。