



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号

U D C

密 级

博士学位论文

新型可溶性融合蛋白 TAT-PEP 对脑缺血
再灌注损伤的神经保护作用及机制研究

邓 斌

培 养 类 别 全日制

学 号 1282013161

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 麻醉学

研 究 方 向 脑缺血损伤防治措施及机制研究

指 导 教 师 徐礼鲜 教授 (主任医师)

培 养 单 位 口腔医院麻醉科

二〇一六年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

| | |
|--|----|
| 缩略语表 | 5 |
| 中文摘要 | 8 |
| 英文摘要 | 24 |
| 前 言 | 40 |
| 文献回顾 | 42 |
| 正 文 | 56 |
| 第一部分 SD 大鼠 MCAO 模型半暗带内 MAG, OMgp, Nogo-A 及其受体 PirB 长时程表达变化 | 56 |
| 1 材料 | 56 |
| 2 方法 | 59 |
| 3 结果 | 62 |
| 4 讨论 | 64 |
| 5 小结 | 66 |
| 第二部分 抑制 PirB 表达对神经元氧糖剥夺后轴突生长及存活的作用 | 67 |
| 1 材料 | 67 |
| 2 方法 | 69 |
| 3 结果 | 73 |
| 讨论 | 75 |
| 结论 | 77 |
| 实验三 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 的制备、表达、纯化及生物学活性的鉴定 | 78 |
| 1 材料 | 78 |
| 2 方法 | 80 |
| 3 结果 | 86 |
| 4 讨论 | 89 |
| 5 小结 | 91 |

| | |
|--|------------|
| 实验四 TAT-PEP 对 SD 大鼠 MCAO 后脑梗死容积和神经功能的影响..... | 92 |
| 1 材料..... | 92 |
| 2 方法..... | 93 |
| 3 结果..... | 99 |
| 4 讨论..... | 103 |
| 5 小结..... | 105 |
| 实验五 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤后轴突再生、皮质脊髓束和突触可塑性重塑作用及机制研究 | 106 |
| 1 材料..... | 106 |
| 2 方法..... | 108 |
| 3 结果..... | 113 |
| 4 讨论..... | 119 |
| 5 小结..... | 121 |
| 实验六 TAT-PEP 减轻脑缺血再灌注损伤后神经元变性和凋亡的作用及机制研究 | 122 |
| 1 材料..... | 122 |
| 2 方法..... | 124 |
| 3 结果..... | 128 |
| 4 讨论..... | 132 |
| 5 小结..... | 135 |
| 小 结..... | 136 |
| 参考文献..... | 137 |
| 附 录..... | 142 |
| 个人简历和研究成果..... | 150 |
| 致 谢..... | 155 |

缩略语表

| 缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
|----------------|--|-------------------|
| aa | Amino Acid | 氨基酸残基 |
| BDNF | Brain derived neurotrophic factor | 脑源性神经生长因子 |
| BDA | biotinylated dextran amine | 生物素化葡聚糖胺 |
| AD | Alzheimer's disease | 阿尔兹海默病 |
| BSA | Bovine Serum Albumin | 小牛血清白蛋白 |
| NeuN | Neuron specific nuclear protein | 神经元特异性核蛋白 |
| PSD-95 | Postsynaptic density-95 | 突触后致密物-95 |
| CNS | Central nervous system | 中枢神经系统 |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxide | 二甲基亚砷 |
| CREB | cAMP responsive element binding protein | 环腺苷酸响应素结合蛋白 |
| CST | corticospinal tract | 皮质脊髓束 |
| ITIM | immunoreceptor tyrosinebased inhibitory motifs | 基于免疫受体的酪氨酸抑制基序 |
| EA | electroacupuncture | 电针 |
| ER | Endoplasmic reticulum | 内质网 |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase | 胞外信号调控激酶 |
| GFAP | fibrillary acidic protein | 胶质纤维酸性蛋白 |
| HIF-1 α | Hypoxia-inducible factor 1 alpha | 缺氧诱导因子 1 α |
| FBS | Fetal Bovine Serum | 胎牛血清 |
| GST | glutathione S-transferase | 谷胱甘肽S转移酶 |

| | | |
|---------|---|------------------|
| LDH | Lactate Dehydrogenase | 乳酸脱氢酶 |
| KD | Kilo Dalton | 千道尔顿 |
| LINGO | LRR and Ig domain-containing, Nogo Receptor interacting protein | NgR 相互作用蛋白 |
| SPR | urface plasmon resonance | 表面等离子体共振 |
| MAP2 | Microtubule-associated proteins2 | 微管相关蛋白 2 |
| MAG | myelin-associated glycoprotein | 髓鞘相关糖蛋白 |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase | 分裂素活化蛋白激酶 |
| MBP | Myelin Basic Protein | 髓鞘碱性蛋白 |
| NEP1-40 | Nogo-A extracellular peptide residues 1-40 | Nogo-A 胞外肽段 1-40 |
| MTT | 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide | 噻唑蓝 |
| NGF | nerve growth factor | 神经生长因子 |
| NgR | Nogo-66 receptor | Nogo-66 受体 |
| MCAO | middle cerebral arterial occlusion | 大脑中动脉栓塞 |
| OMgp | oligodendrocyte-myelin glycoprotein | 少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白 |
| P75NTR | P75 neurotrophin receptor | P75 神经生长因子低亲和力受体 |
| BCCAO | Bilateral common carotid artery occlusion | 双侧颈总动脉栓塞 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PFA | Paraformaldehyde | 多聚甲醛 |
| PKA | Protein kinaseA | 蛋白激酶 A |
| WB | Western blot | 蛋白免疫印迹 |
| OGD | Oxygen glucose deprivation | 氧糖剥夺 |
| PNS | Peripheral nervous system | 外周神经系统 |

| | | |
|--------|--|--------------|
| PVDF | Polyvinylidene difluoride | 聚偏二氟乙烯 |
| MHCI | class I major histocompatibility complex | 主要组织相容性复合体 I |
| Rho | Rho GTPase | Rho G 蛋白 |
| ROCK | Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 | Rho G 蛋白相关激酶 |
| miRNAs | microRNAs | 微小核糖核酸 |
| RT-PCR | Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction | 反转录-聚合酶链式反应 |
| BBB | blood brain barrier | 血脑屏障 |
| SD | Sprague-Dawley | SD 大鼠 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| mNSS | modified neurological severity scores | 改进的神经缺陷评分 |
| TMD | Transmembrane domain | 跨膜区 |
| NF | neurofilament | 神经丝蛋白 |
| MEP | motor evoked potential | 运动诱发电位 |
| TUNEL | Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling | 原位末端标记法 |
| SYN | Synaptophysin | 突触素 |
| TAT | Transactivator of transcription | 反式转录激活因子 |
| Ngn2 | Neurogenin2 | 神经源素 2 |
| t-PA | Tissue plasminogen activator | 组织型纤溶酶原激活剂 |
| I/R | Ischemia/reperfusion | 缺血/再灌注 |
| MAIs | myelin-associated inhibitory proteins | 髓鞘相关抑制因子 |
| PirB | Paired immunoglobulin-like receptor B | 成对性免疫球蛋白受体 B |

新型可溶性融合蛋白 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制研究

博士研究生：邓斌

导 师：徐礼鲜 教授

辅 导 教 师：王强 副教授

苟兴春 副教授

第四军医大学口腔医院麻醉科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（NO.81070097，81471265，81501207）

第四军医大学博士课题资助项目（NO.2013-D-03）

中文摘要

成对性免疫球蛋白样受体 B（Paired immunoglobulin-like receptor B, PirB），是近年来新发现的髓磷脂相关抑制因子受体，其可能在脑缺血后轴突再生，突触可塑性和神经元存活等方面扮演重要角色，但尚未阐明。同时，基因水平干涉或抑制 PirB 表达很难应用于临床实践；而蛋白质药物虽然可以较好的临床应用，但是因其分子量较大，往往难以通过血脑屏障，影响了其治疗效果。在本研究中，我们首先利用 MCAO 模型，发现从 MCAO 后 3 d 到 28 d 时 MAG, OMgp, Nogo-A 在皮层半暗带内表达显著增加和神经元 PirB 也在皮层半暗带内高表达。体外实验进一步发现，通过 *pirb* RNAi 干涉 PirB 后，可以促进氧糖剥夺后神经元轴突生长和存活。随后，我们制备了新型可溶性融合蛋白 TAT-PEP，其经腹腔注射后可以通过血脑屏障并分布于皮层半暗带内。体外实验表明，其与 MAG, OMgp, Nogo-A 具有较好的亲和力，并可以逆转它们的抑制效应，促进轴突生长。体内实验显示，TAT-PEP 能够减少 MCAO 后脑梗死容积，促进长时程神经功能恢复。研究进一步发现，TAT-PEP 可以

促进轴突再生和皮质脊髓束重塑，加强突触可塑性。体外实验也证实，TAT-PEP 能够促进 OGD 后神经突起长度，减轻生长锥崩溃瓦解，改善突触功能。这些作用的机制可能与 TAT-PEP 通过抑制 PirB 功能，进而影响其下游分子 POSH, RhoA 和 GAP43 的表达有关。我们还发现，TAT-PEP 可以通过减轻缺血再灌注后神经元变性和凋亡，进而发挥神经保护作用，其机制可能与 TAT-PEP 能够影响活化的 Caspase-3 以及 Bax 和 Bcl-2 表达有关。这些发现提示，缺血再灌注损伤后神经元 PirB 呈现高表达，对神经元造成严重损害。TAT-PEP 通过阻碍 MAIs 和 PirB 相互作用，发挥神经保护作用。该研究为缺血性脑卒中的治疗提供了新的靶点和新的策略，为 TAT-PEP 可能的临床应用提供理论依据和实验基础。

第一部分

SD大鼠MCAO模型半暗带内MAG, OMgp, Nogo-A

及其受体PirB长时程表达变化

目的:

1. 明确 SD 大鼠 MCAO 模型半暗带内 MAG, OMgp, Nogo-A 长时程表达情况。
2. 明确 SD 大鼠 MCAO 模型半暗带内 PirB 长时程表达情况。

方法:

健康SD大鼠54只（雄性），体重260~300g。首先，随机分为7组（n=6）：即Before MCAO组，1 d post-MCAO组，3 d post-MCAO组，7 d post-MCAO组，14 d post-MCAO组，21 d post-MCAO组，28 d post-MCAO组。除Before MCAO组实验动物外，其余各组建立MCAO模型。于手术前，和再灌注后第1 d，3 d，7 d，14 d，21 d，28 d处死大鼠，迅速取出缺血皮层半暗带脑组织，Western Blot检测皮层半暗带内MAG, OMgp, Nogo-A和PirB蛋白表达情况。其次，随机分为2组（n=6）：即Sham组和MCAO组，于再灌注后第28 d时处死大鼠，应用免疫荧光组织化学双标记染色方法检测PirB

蛋白表达情况。

结果:

1. 与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 MAG 表达明显增加($p<0.05$)。缺血再灌注后第 1 d 时 MAG 表达略有下调, 但与 before-MCAO 组相比没有统计学意义 ($p>0.05$)。缺血再灌注后第 21 d 时 MAG 表达水平最高, 28 d 时略有下调。与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 OMgp 表达明显增加 ($p<0.05$)。缺血再灌注后第 7 d 时 OMgp 表达下调, 但随着时间的推移其表达水平又继续上调。与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 Nogo-A 表达明显增加 ($p<0.05$)。缺血再灌注后第 28 d 时 Nogo-A 表达水平最高。

2. 与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 时的各组实验动物皮层半暗带内 PirB 蛋白表达明显增加 ($p<0.05$)。缺血再灌注后第 7 d 时 PirB 表达略有下调, 但随着时间的推移其表达水平又继续上调。双重荧光免疫组织化学染色进一步显示, 与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后 28 d 时实验动物皮层半暗带内 NeuN 的荧光密度显著减少 ($p<0.05$), PirB 的荧光密度显著增强 ($p<0.05$), 且与 NeuN 呈现明显的双标记, 提示在缺血再灌注后 28 d 时实验动物皮层半暗带内神经元 PirB 表达显著增加。

结论:

通过制备 SD 大鼠 MCAO 模型, 观察皮层半暗带内 Nogo-A、MAG、OMgp 和 PirB 长时程表达变化。结果显示, 虽然 Nogo-A、MAG、OMgp 和 PirB 在缺血半暗带内各时间点表达水平不尽相同, 但从整个趋势看, 在 MCAO 3 d 后表达都明显高于造模前的水平, 说明它们在脑缺血再灌注损伤的病理生理过程中发挥重要作用。特别是 PirB 的这种表达变化趋势, 将为促进脑缺血损伤后神经元存活, 轴突再生和神经功能恢复提供新的治疗靶点。

第二部分

抑制PirB表达对神经元氧糖剥夺后轴突生长及存活的作用

目的:

1. GPH-PIRB-294 慢病毒系统对氧糖剥夺后神经元 PirB 表达的影响。
2. 干涉 PirB 表达对氧糖剥夺后神经元轴突生长的作用。
3. 干涉 PirB 表达对氧糖剥夺后神经元存活和凋亡的作用。

方法:

1. *pirb* 基因干扰靶点慢病毒包装实验由上海英为信生物科技有限公司提供技术支持和实验指导。SD 大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d), 清洁级, 实验随机分为四组 (n=6): 即 Normal 组, OGD 组, OGD+*control* RNAi 组和 OGD+*pirb* RNAi 组。原代培养的大脑皮层神经元至第 7 d 鉴定后, 行 OGD, 复氧复糖 24 h 后, 转染 GPH-PIRB-294, 在 OGD 复氧复糖 72 h 时, Western blot 分别检测神经元 PirB 表达和 GFP 表达。

2. SD 大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d), 清洁级, 实验随机分为 4 组 (n=6): 即 Normal 组, OGD 组, OGD+*control* RNAi 组和 OGD+*pirb* RNAi 组。原代培养的大脑皮层神经元至第 7 d 鉴定后, 行 OGD, 复氧复糖 24 h 后, 转染 GPH-PIRB-294, 在 OGD 复氧复糖 72 h 时, 免疫荧光细胞化学染色检测神经元轴突长度。

3. SD 大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d), 清洁级, 实验随机分为 4 组 (n=6): 即 Normal 组, OGD 组, OGD+*control* RNAi 组和 OGD+*pirb* RNAi 组。原代培养的大脑皮层神经元至第 7 d 鉴定后, 行 OGD, 复氧复糖 24 h 后, 转染 GPH-PIRB-294, 在 OGD 复氧复糖 72 h 时, MTT 检测神经元活力, TUNEL 染色检测神经元凋亡情况。

结果:

1. Western blot 结果显示, 与 Normal 组相比, OGD 后第 72 h 时, OGD 组和 OGD+*control* RNAi 组神经元 PirB 表达明显增加 ($p < 0.05$)。与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组神经元 PirB 表达明显减少 ($p < 0.05$)。

2. 免疫荧光细胞化学染色结果显示, 与 Normal 组相比, OGD 后第 72 h 时,

OGD 组和 OGD+*control* RNAi 组神经元最长突起即轴突的平均长度明显变短 ($p<0.05$)。与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组神经元神经元轴突长度明显变长 ($p<0.05$)。

3. 在 OGD 后 72 h 时, 应用 MTT 比色法检测神经元细胞活力, 与 Normal 组相比, OGD 组 MTT 相对比色值显著降低 ($P<0.05$), 与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组的 MTT 相对比色值增加 ($P<0.05$)。与 OGD 组相比, OGD+*control* RNAi 组的 MTT 相对比色值没有统计学意义 ($P>0.05$)。在 OGD 后 72 h 时, OGD 组 TUNEL 阳性神经元的细胞数目明显多于 Normal 组 ($P<0.05$), 与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组 TUNEL 阳性神经元的细胞数目明显减少 ($P<0.05$), 与 OGD 组相比, OGD+*control* RNAi 组的 TUNEL 阳性神经元的细胞数目没有统计学意义 ($P>0.05$)。

结论:

在本实验中, 我们成功构建了可以干涉神经元PirB表达的慢病毒系统, 能够抑制 OGD后皮层神经元PirB的表达。研究进一步发现, 抑制OGD后神经元PirB表达, 可以有效促进轴突生长, 增强神经元活力, 减轻神经元凋亡。该部分研究证实了PirB在神经元OGD后的作用及功能, 为脑缺血再灌注损伤的机制研究和防治策略研究提供了有益的理论基础和实验依据。

第三部分

可溶性融合蛋白TAT-PEP的制备、表达、纯化及生物学活性的鉴定

目的:

1. 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 的制备、表达、纯化响。
2. 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 生物学活性的鉴定。

方法:

1. 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 制备由上海金斯瑞科技有限公司提供技术支持和

实验指导。用 GE 公司蛋白纯化系统纯化蛋白，考马斯亮蓝染色及 Western blot 检测纯化后的 TAT-PEP 和 TAT-mPEP。SD 大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d)，清洁级，实验随机分为 5 组，即 Normal 组，TAT-mPEP (100 $\mu\text{g/L}$) 组，TAT-PEP (50 $\mu\text{g/L}$) 组，TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 组，TAT-PEP (200 $\mu\text{g/L}$)。原代培养的皮层神经元给予蛋白处理后 3 d 时，MTT 检测神经元活力；LDH 释放实验检测神经元存活。

2. SD 大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d)，清洁级。将 Nogo-A (AP-Nogo-66, R&D, 300 ng/spot)；MAG (MAG-Fc, R&D, 150 ng/spot)；OMgp (AP-OMgp, R&D, 300 ng/spot) 以 50 $\mu\text{g/well}$ 分别包被于 96 孔板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h，按浓度梯度分别加入 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 μmol TAT-PEP 或者 TAT-mPEP，并设 PBS 对照，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h，随后加入小鼠抗(His)₆ 单克隆抗体及羊抗小鼠 IgG 二抗，ELISA 法检测吸光度 (OD) 值

3. SD 大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d)，清洁级。将 Nogo-A (AP-Nogo-66)，MAG (MAG-Fc)，OMgp (AP-OMgp) (50 ng/well) 分别或混合 (MAIs) 包被 24 孔板的玻片中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h。之后按 50 $\mu\text{g/L}$ ，100 $\mu\text{g/L}$ ，200 $\mu\text{g/L}$ 分别加入 TAT-PEP 或 TAT-mPEP (500 μl)，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h，接种皮层神经元，培养至第 7 d 时免疫荧光细胞化学染色检测神经元最长突起的平均长度。

4. SD 大鼠 66 只 (雄性)，体重 260~300g。随机分为 7 组 (n=6)：即腹腔注射 TAT-PEP 蛋白(250 mg/kg)后 0 h 组，0.5 h 组，2 h 组，12 h 组，24 h 组，48 h 组，72 h 组。各组于蛋白注射后相应时间点处死大鼠，Western Blot 检测 TAT-PEP 在皮层半暗带的蛋白量。随机分为 4 组 (n=6)：即腹腔注射蛋白后 0 h 组，0.5 h 组，12 h 组，24 h 组。各组于蛋白注射后相应时间点处死大鼠，免疫荧光组织化学染色检测 TAT-PEP 在皮层半暗带的分布及蛋白量。

结果:

1. 考马斯亮蓝染色及 Western blot 结果显示，TAT-PEP 的分子量约为 90KDa，TAT-mPEP 的分子量约为 75 KDa，与预期相符合。

2. 各组 MTT 实验相对 OD 值没有统计学差异 ($P>0.05$)，LDH 释放量相对值也没有统计学差异 ($P>0.05$)。

3. ELISA 结果显示，与 TAT-mPEP 组相比，不同浓度 TAT-PEP 与商品化的

Nogo-A (Nogo66) 反应后, 其 OD 值呈现明显的剂量效应关系, 说明 TAT-PEP 与 Nogo-A (Nogo66) 分子有很好的结合能力。有趣的是, 不同浓度 TAT-PEP 与商品化的 MAG, OMgp 反应后, 其 OD 值也呈现明显的剂量效应关系。

4. 与 Normal 组相比, Nogo-A (Nogo66) 组神经元最长突起的平均长度明显缩短 ($P<0.05$), 而 TAT-PEP 组神经元最长突起的平均长度与 Nogo-A (Nogo66) 组相比明显变长 ($P<0.05$), TAT-mPEP 组神经元最长突起的平均长度与 Nogo-A (Nogo66) 组相比没有统计学意义。有实验进一步观察到, 与 Normal 组相比, MAG 组神经元最长突起的平均长度明显缩短 ($P<0.05$), 而 TAT-PEP 组神经元最长突起的平均长度与 MAG 组相比明显变长 ($P<0.05$), TAT-mPEP 组神经元最长突起的平均长度与 MAG 组相比没有统计学意义。有趣的是在 OMgp 组别也观察到类似的现象。

5. MAIs (Nogo66+MAG+OMgp) 组与 Normal 组相比, 神经元最长突起的平均长度明显缩短, TAT-mPEP 组神经元最长突起的平均长度与 MAIs 组相比没有统计学意义。与 MAIs 组相比, 50 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理组后, 神经元最长突起的平均长度明显变长 ($P<0.05$), 100 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组与 50 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组相比, 神经元最长突起的平均长度亦明显变长 ($P<0.05$), 而 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组与 100 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组相比神经元最长突起的平均长度没有统计学意义。

6. 蛋白注射后 12 h 时, 皮层内 TAT-PEP 水平达峰值, 随着时间的推移其量逐渐下降。免疫荧光组织化学染色结果进一步显示, 注射即刻皮层半暗带组织中未检测 TAT-PEP, 注射后 12 h 时, 皮层内 TAT-PEP 水平达峰值, 24 h 时明显减少。

结论:

本部分实验我们通过成功制备含有 TAT 结构和 PirB 胞外端结构的可溶性融合蛋白 TAT-PEP, 证实其能够与 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 结合并逆转他们的抑制效应。该实验还表明 TAT-PEP 腹腔注射后, TAT 结构能够使 TAT-PEP 融合蛋白有效通过血脑屏障, 并且分布于皮层半暗带内。同时, 该实验也明确了蛋白合理时间的给药时间, 即每日腹腔注射该蛋白, 为下一步 TAT-PEP 的功能研究奠定了基础。

第四部分

TAT-PEP对SD大鼠MCAO后脑梗死容积和神经功能的影响

目的:

1. 研究TAT-PEP对局灶性脑缺血损伤后脑梗死容积的作用。
2. 研究TAT-PEP对局灶性脑缺血损伤后神经功能恢复的作用。

方法:

健康SD大鼠54只（雄性），体重260~300g。首先，随机分为3组（n=6）：即Sham组，MCAO组，MCAO+TAT-PEP组。在MCAO后第24 h，48 h和72 h应用Garcia评分量表检测各组神经功能；在第72 h时行TTC染色检测脑梗死容积。其次，随机分为3组（n=6）：即Sham组，MCAO组，MCAO+TAT-PEP组。在MCAO后第3 d，7 d和28 d应用磁共振成像技术检测长时程脑梗死区变化；在MCAO后第7 d，14 d，21 d，28 d时，进行神经功能评分（mNSS）；在MCAO前和MCAO后第2 d，7 d，14 d，21 d，28 d时进行错步，转轴实验；在MCAO前和MCAO后第3 h，7 d，14 d，21 d，28 d时进行肢体放置实验；在MCAO后第28 d时进行运动诱发电位实验。最后，随机分为3组（n=6）：即Sham组，MCAO组，MCAO+TAT-PEP组。在MCAO后第28 d时进行被动回避平台和T迷宫实验。

结果:

1. MCAO 后 24 h 的 Garcia 评分结果显示，与 Sham 组相比，MCAO 组神经功能评分显著降低（ $P<0.05$ ）；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组神经功能评分没有显著差异，无统计学意义（ $P>0.05$ ）。MCAO 后 48 h 和 72 h 的 Garcia 评分结果显示，与 Sham 组相比，MCAO 组神经功能评分显著降低（ $P<0.05$ ）；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组神经功能评分显著提高（ $P<0.05$ ）。TTC 染色结果显示，与 Sham 组相比，MCAO 组实验动物出现明显的脑梗死。MCAO 后 72 h 时，与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组实验动物脑梗死容积明显变小（ $P<0.05$ ）。

2. MCAO 后 7 d，14 d，21 d 和 28 d 时各组的 mNSS 评分结果显示，与 Sham 相

比, MCAO 组各时间点的 mNSS 评分显著增加($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组各时间点的 mNSS 评分显著降低 ($P<0.05$)。MCAO 后 3 d, 7 d 和 28 d 的 T2WI 图像显示, MCAO 组缺血脑侧有明显的高密度影区, 而 TAT-PEP 组缺血脑侧的高密度影区较 MCAO 组有所减少 ($P<0.05$)。

3. 错步分析结果显示, 与 Sham 相比, MCAO 组各时间点的错步次数显著增加 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组在 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 的错步次数显著降低 ($P<0.05$), 而第在 2 d 时与 MCAO 组相比没有统计学差异 ($P>0.05$)。转棒实验结果显示, 与 Sham 相比, MCAO 组各时间点的在转棒上停留的时间显著减少 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组在 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 的在转棒上停留的时间显著增加 ($P<0.05$), 而第在 2 d 时与 MCAO 组相比没有统计学差异 ($P>0.05$)。肢体放置结果显示, 与 Sham 相比, MCAO 组各时间点的肢体放置评分明显降低 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组在 MCAO 后 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 时肢体放置评分明显增加 ($P<0.05$), 在 MCAO 后 2 h 时没有明显差别 ($P>0.05$)。

4. 运动诱发电位 (MEP) 结果显示, 在 MCAO 后 28 d 时, 与 Sham 相比, MCAO 组左前肢体 MEP 的振幅明显降低 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组左前肢体 MEP 的振幅明显增加 ($P<0.05$); 与 Sham 相比, MCAO 组左后肢体 MEP 的振幅明显降低 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组左后肢体 MEP 的振幅明显降低 ($P<0.05$)。

5. 被动回避平台实验结果显示, 在 MCAO 后 28 d 时, 与 Sham 相比, MCAO 组潜伏期时间明显缩短 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组潜伏期明显延长 ($P<0.05$); 与 Sham 相比, MCAO 组错误次数明显增加 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组错误次数明显减少 ($P<0.05$)。空间工作记忆测试结果显示, MCAO 组第一次正确回避所需的平均实验次数与 Sham 组相比显著增加 ($P<0.05$), 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组第一次正确回避所需的平均实验次数显著减少 ($P<0.05$)。参考记忆测试结果显示, MCAO 组平均正确回避次数与 Sham 组相比显著增加 ($P<0.05$), 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组平均正确回避次数显著减少 ($P<0.05$)。

结论:

本部分实验，我们主要通过核磁共振成像技术和多种神经行为学方法，明确了TAT-PEP长时程的神经保护作用，为TAT-PEP的可能的临床应用奠定了实验基础，也为下一步的机制研究提供了丰富线索。

第五部分

TAT-PEP对脑缺血再灌注损伤后轴突再生、皮质脊髓束 和突触可塑性重塑作用及机制研究

目的:

1. 研究TAT-PEP对MCAO后皮质脊髓束重塑的作用。
2. 研究TAT-PEP对MCAO后半暗带内轴突再生的作用。
3. 研究TAT-PEP对MCAO后半暗带内突触可塑性的作用。
4. 研究TAT-PEP对OGD后神经元轴突生长，生长锥瓦解和自发性兴奋性突触后电流的作用。
5. 阐明TAT-PEP上述作用的分子机制。

方法:

健康SD大鼠54只（雄性），体重260~300g。首先，随机分为3组（n=6）：即Sham组，MCAO组，MCAO+TAT-PEP组。在MCAO后28 d时应用BDA神经示踪技术检测TAT-PEP对皮质脊髓束重塑的作用；应用NF200，MAP2，SYN，NeuN免疫荧光组织化学染色检测TAT-PEP对半暗带内神经元轴突，树突及突触可塑性的作用。其次，随机分为3组（n=6）：即Sham组，MCAO组，MCAO+TAT-PEP组。在MCAO后第28 d时，应用Western blot检测TAT-PEP对半暗带内轴突及突触相关蛋白POSH，RhoA，GAP43表达的作用。

SD大鼠孕鼠（E 16.5-18.5 d），清洁级。首先，随机分为3组（n=6）：即Normal组，OGD组和OGD+TAT-PEP组。原代培养的皮层神经元接种24 h后，行OGD。OGD复氧后即刻给予TAT-PEP（100 μg/L）处理，24 h后利用活细胞工作站观察神

神经元轴突生长和分支数量情况。其次，随机分为 3 组 (n=6)：即 Normal 组，OGD 组和 OGD+TAT-PEP 组。原代培养的皮层神经元至第 7 d 时，行 OGD，OGD 复氧后即刻给予 TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 处理，3 d 后利用明场显微镜观察神经元最长神经突起的平均长度和最长神经突起的分支点数量。随机分为 3 组 (n=6)：即 Normal 组，OGD 组和 OGD+TAT-PEP 组。原代培养的皮层神经元至第 7 d 时，行 OGD，OGD 复氧后即刻给予 TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 处理，3 d 后利用小鼠抗 GAP43 单克隆抗体行免疫荧光细胞化学染色观察生长锥情况。再次，随机分为 3 组 (n=6)：即 Normal 组，OGD 组和 OGD+TAT-PEP 组。膜片钳技术检测 TAT-PEP 对离体培养脑片 OGD 后 3 d 时自发性兴奋性突触后电流的作用。最后，随机分为 4 组 (n=6)：即 Normal 组，OGD 组，OGD+TAT-PEP 组和 OGD+*pirb* RNAi 组。原代培养的皮层神经元至第 7 d 时，行 OGD，之后第 3 d 时应用 Western blot 检测 TAT-PEP 对神经元 POSH, RhoA, GAP43 表达的作用

结果：

1. 在 MCAO 后 14 d 时，神经轴突示踪剂由未损伤的皮层处注入。在 MCAO 后 21 d 时，注射区的 BDA 被神经元及轴突摄取，注射区内大脑皮层的神经元锥体细胞及其轴突呈现广泛的 BDA 阳性荧光显影，且存在大量 NeuN 与 BDA 双标记的神经元，说明示踪剂注射成功。在 MCAO 后 28 d 时，被摄取的 BDA 沿着皮质脊髓束长距离顺行传输到颈膨大处。TAT-PEP 治疗组中，检测皮质脊髓束在同侧灰质中的神经纤维密度明显高于 MCAO 组 ($P<0.05$)，其新生轴突横穿中线到达对侧的数量也明显多于 MCAO 组 ($P<0.05$)。

2. 在 MCAO 后 28 d 时的 NF200 与 NeuN 免疫荧光双标记实验显示，MCAO 组半暗带内 NF200 阳性的轴突密度明显低于 Sham 组 ($P<0.05$)，TAT-PEP 治疗组中半暗带内 NF200 阳性的轴突密度则明显高于 MCAO 组 ($P<0.05$)。

3. 在 MCAO 后 28 d 时的 SYN 与 NeuN 免疫荧光双标记实验显示，SYN 表达与神经元胞体周围，MCAO 组半暗带内 SYN 阳性物质密度明显低于 Sham 组 ($P<0.05$)，TAT-PEP 治疗组中半暗带内 SYN 阳性物质密度则明显高于 MCAO 组 ($P<0.05$)。

4. MCAO 组 POSH 和 RhoA 的表达显著高于 Sham 组 ($P<0.05$)，而 GAP43

的表达显著低于 Sham 组。与此相反, TAT-PEP 组 POSH 和 RhoA 的表达显著低于 MCAO 组, 而 GAP43 的表达显著高于 MCAO 组 ($P < 0.05$)。

5. 活细胞工作站观察 TAT-PEP 对神经元轴突生长和分支形成的作用。结果显示, TAT-PEP 组神经元最长突起在单位时间内的生长情况明显优于 OGD 组 ($P < 0.05$), 同时 TAT-PEP 组神经元最长突起上的分支数量明显多于 OGD 组 ($P < 0.05$)。

6. 在 OGD 后 3 d 时, 明场显微镜观察结果显示, OGD 组 TAT-PEP 组神经元最长突起的平均长度显著短于 Normal 组 ($P < 0.05$), 而 TAT-PEP 组神经元最长突起的平均长度则显著高于 Normal 组 ($P < 0.05$), 研究进一步发现 OGD 组 TAT-PEP 组神经元最长突起的分支数量显著少于 Normal 组 ($P < 0.05$), 而 TAT-PEP 组神经元最长突起的分支数量则显著多于 Normal 组 ($P < 0.05$)。

7. 在 OGD 后 3 d 时, Normal 组神经元生长锥崩溃瓦解水平仅为 20%, 而 OGD 组生长锥崩溃瓦解水平则可达到 60%, 显著高于 OGD 组 ($P < 0.05$), TAT-PEP 组生长锥崩溃瓦解水平显著低于 OGD 组 ($P < 0.05$)。

8. 在 OGD 后 3 d 时, OGD 组 sEPSC 振幅低于 Normal 组 ($P < 0.05$), 而 TAT-PEP 则可以增强 sEPSC 振幅 ($P < 0.05$); OGD 组 sEPSC 频率低于 Normal 组 ($P < 0.05$), 而 TAT-PEP 则可以增强 sEPSC 频率 ($P < 0.05$)。

9. OGD 后 3 d 时 Western blot 结果显示, OGD 组 POSH 和 RhoA 的表达显著高于 Normal 组 ($P < 0.05$), 而 GAP43 的表达显著低于 Normal 组。与此相反, OGD+TAT-PEP 组 OGD+pirb RNAi 组 POSH 和 RhoA 的表达显著低于 OGD 组, 而 GAP43 的表达显著高于 OGD 组 ($P < 0.05$)。而 OGD+TAT-PEP 组与 OGD+pirb RNAi 组中神经元 POSH, RhoA 和 GAP43 的表达没有显著差异 ($P > 0.05$)。

结论:

本部分实验通过在体 MCAO 模型和离体 OGD 模型, 利用顺行神经示踪技术、免疫荧光组织化学染色方法, 活细胞工作站及神经电生理等多种方法, 发现并证实 TAT-PEP 可以通过干预 PirB 下游的 POSH/ROCK/GAP43 信号通路, 促进 MCAO 后半暗带内轴突再生, 突触可塑性恢复和皮质脊髓束的重塑, 从而发挥改善神经功能特别是长时程运动、学习及记忆功能, 发挥神经保护作用。该部分研究不仅阐明了 TAT-PEP 发挥神经保护作用的部分机制, 还间接揭示了 PirB 在脑缺血再灌注损伤中

扮演的“不良角色”和作用机制，为缺血性脑中风的治疗提供了新的作用靶点，为TAT-PEP可能的临床应用提供了理论依据和实验基础。

第六部分

TAT-PEP减轻脑缺血再灌注损伤后神经元 变性和凋亡的作用及机制研究

目的:

1. 研究TAT-PEP对OGD后神经元存活及凋亡的作用。
2. 研究TAT-PEP对MCAO后半暗带内神经元存活及凋亡的作用。
3. 研究TAT-PEP对MCAO后半暗带内神经元超微结构的作用。

方法:

SD大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d)，进行皮层神经元原代培养。首先，随机分为6组 (n=6)：即 Normal 组，OGD 组，OGD+TAT-PEP (50 $\mu\text{g/L}$) 组，OGD+TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 组，OGD+TAT-PEP (200 $\mu\text{g/L}$) 组，OGD+TAT-mPEP (100 $\mu\text{g/L}$) 组。MTT 及 LDH 释放实验检测不同浓度 TAT-PEP 对 OGD 后 24 h 时神经元存活的作用。其次，随机分为4组 (n=6)：即 Normal 组，OGD 组，OGD+TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 组和 OGD+mTAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 组。MTT 及 LDH 释放实验检测 TAT-PEP 对 OGD 后 6 h, 24 h, 72 h 时神经元存活的作用。再次，随机分为3组 (n=6)：即 Normal 组，OGD 组和 OGD+TAT-PEP 组。TUNEL 染色及 Western blot 检测 TAT-PEP 对 OGD 后 24 h 时神经元凋亡及凋亡相关蛋白表达的作用。

健康SD大鼠54只 (雄性)，体重260~300g。首先，随机分为3组 (n=6)：即Sham组，MCAO组，MCAO+TAT-PEP组。FJC染色和NeuN免疫荧光组织化学染色检测TAT-PEP对半暗带内神经元存活和变性的作用。其次，随机分为3组 (n=6)：即Sham组，MCAO组，MCAO+TAT-PEP组。在MCAO后3 d时应用TUNEL染色检测TAT-PEP对半暗带内神经元凋亡的作用。再次，随机分为3组 (n=6)：即Sham组，MCAO组，

MCAO+TAT-PEP组。在MCAO后第3 d时，应用电镜技术检测TAT-PEP对半暗带内神经元超微结构的作用。

结果:

1. 在OGD后24 h时，与Normal组相比，OGD组MTT的相对比色值显著降低 ($P < 0.05$)，50 $\mu\text{g/L}$ ，100 $\mu\text{g/L}$ 和200 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理后可以显著提高MTT的相对比色值 ($P < 0.05$)，而OGD+TAT-mPEP组的MTT的相对比色值与OGD组相比没有统计学意义 ($P > 0.05$)。结果进一步显示，与50 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理组相比，100 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理后可以提高MTT的相对比色值 ($P < 0.05$)，而100 $\mu\text{g/L}$ 和200 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理组之间的MTT相对比色值没有统计学意义 ($P > 0.05$)。该结果说明TAT-PEP可以有效增强OGD后神经元活力，并且这种作用具有剂量依赖性。

2. 在OGD后24 h时，与Normal组相比，OGD组LDH释放量的相对值显著升高 ($P < 0.05$)，50 $\mu\text{g/L}$ ，100 $\mu\text{g/L}$ 和200 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理后可以显著降低LDH释放量的相对值 ($P < 0.05$)，而OGD+TAT-mPEP组的LDH释放量的相对值与OGD组相比没有统计学意义 ($P > 0.05$)。结果进一步显示，与50 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理组相比，100 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理后可以降低LDH释放量的相对值 ($P < 0.05$)，而100 $\mu\text{g/L}$ 和200 $\mu\text{g/L}$ 的TAT-PEP处理组之间的LDH释放量的相对值没有统计学意义 ($P > 0.05$)。该结果说明TAT-PEP可以有效减轻OGD后神经元损伤程度，并且这种作用具有剂量依赖性。

3. 在OGD后6 h时，与 Normal组相比，OGD组MTT相对比色值降低 ($P < 0.05$)，LDH释放量相对值增加 ($P < 0.05$)。在OGD后24 h时，与 Normal组相比，OGD组MTT相对比色值显著降低 ($P < 0.05$)，LDH释放量相对值显著增加 ($P < 0.05$)，与OGD组相比，OGD+TAT-PEP组的MTT相对比色值增加 ($P < 0.05$)和LDH释放量相对值降低 ($P < 0.05$)。在OGD后72 h时，与 Normal组相比，OGD组MTT相对比色值显著降低 ($P < 0.05$)，LDH释放量相对值显著增加 ($P < 0.05$)，与OGD组相比，OGD+TAT-PEP组的MTT相对比色值增加 ($P < 0.05$)和LDH释放量相对值降低 ($P < 0.05$)。

4. 在OGD后72 h时，OGD组TUNEL阳性神经元的细胞数目明显多于Normal组 ($P < 0.05$)，与OGD组相比，TAT-PEP组TUNEL阳性神经元的细胞数目明显减少 ($P < 0.05$)。

5. 在OGD后72 h时, OGD组凋亡蛋白Bax表达明显多于Normal组 ($P<0.05$), 与OGD组相比, TAT-PEP组凋亡蛋白Bax表达明显减少 ($P<0.05$)。同时, OGD组抗凋亡蛋白Bcl2表达明显少于Normal组 ($P<0.05$), 与OGD组相比, TAT-PEP组抗凋亡蛋白Bcl2表达明显增加 ($P<0.05$)。研究还发现OGD组活化的Caspase 3水平明显高于Normal组 ($P<0.05$), 与OGD组相比, TAT-PEP组活化的Caspase 3水平明显降低 ($P<0.05$)。

6. MCAO后3 d时, 与Sham组相比, MCAO组半暗带内神经元存活数量显著减少 ($P<0.05$), 而TAT-PEP治疗后能够显著增加神经元存活的数量 ($P<0.05$)。NeuN免疫荧光组化染色结果进一步显示, MCAO后3 d时, 与Sham组相比, MCAO组半暗带内NeuN阳性神经元数量显著减少 ($P<0.05$), 而TAT-PEP治疗后能够显著增加NeuN阳性神经元的数量 ($P<0.05$)。

7. 与Sham组相比, MCAO组半暗带内FJC阳性神经元数量显著增多 ($P<0.05$), 而TAT-PEP治疗后FJC阳性神经元的数量明显减少 ($P<0.05$)。TUNEL染色结果进一步显示, MCAO后3 d时, 与Sham组相比, MCAO组半暗带内TUNEL阳性神经元数量显著增多 ($P<0.05$), 而TAT-PEP治疗后TUNEL阳性神经元的数量明显减少 ($P<0.05$)。

8. MCAO后3 d时结果发现, 与Sham组相比, 神经元超微结构明显变化。具体体现在, 神经元细胞核明显固缩, 染色质降解, 边集, 核膜皱缩、破裂。细胞质中粗面内质网呈囊性变、脱颗粒, 特别是线粒体明显肿大, 呈囊泡状改变, 发生嵴断裂和基粒脱失的改变。而TAT-PEP治疗后可以显著减轻神经元超微结构的变化, 特别是线粒体结构损伤。

结论:

本部分实验通过利用离体 OGD 模型和在体大鼠 MCAO 模型及多种神经科学研究方法, 发现 TAT-PEP 能够加强 OGD 后皮层神经元的存活, 减少 LDH 的释放, 减轻神经元凋亡和损伤; TAT-PEP 能够减轻皮层半暗带内神经元变性和凋亡, 改善其超微结构, 促进神经元存活, 发挥神经保护作用。相关机制可能与其干扰 Nogo-A 等与 PirB 结合, 影响下游信号通路, 从而抑制 Bax 表达, 促进 Bcl-2 表达, 导致线粒

体通透性转换孔开放和 Caspase-3 的激活有关。该实验为阐明 PirB 在缺血再灌注损伤致神经元凋亡的机制研究及 TAT-PEP 的神经保护作用及机制研究提供了理论依据和实验基础，为缺血再灌注损伤的临床治疗提供了新的干预靶点和有效策略。

关键词：脑卒中，成对性免疫球蛋白样受体 B，转录反式激活因子，轴突再生，皮质脊髓束重建，突触可塑性，凋亡

The neuroprotection and mechanisms study of novel soluble fusion protein TAT-PEP against ischemic reperfusion injury

Candidate for master: Deng Bin

Supervisor: Xu lixian

Tutor: Wang Qiang; Gou Xingchun

Department of Anesthesiology, Stomatology Hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: Grant of National Natural Science Foundation of China

(NO.81070097, 81471265, 81501207)

Fourth Military Medical University Foundation

(NO.2013-D-03)

Abstract

Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) has been identified as a new receptor for myelin-associated inhibitory proteins (MAIs), which may play an important role in the axonal regeneration, synaptic plasticity and neuronal survival after stroke. In the clinic, the mutation or silencing of PirB is impractical, and a candidate peptide that binds to MAIs might block their interactions with PirB. However, the delivery of a therapeutic peptide into the brain is hampered by the blood-brain barrier (BBB). Here, we investigated MAG, OMgp, Nogo-A and PirB expression after transient focal cerebral ischemia in rats and found their protein levels were increased in the ischemic penumbra from 3 to 28 d after

reperfusion. Then, the result showed *pirb* RNAi enhanced axon growth and alleviated neuronal injury by inhibiting PirB expression after exposed to OGD *in vitro*. After that, TAT-PEP was generated as a novel soluble fusion protein containing the protein transduction domain (PTD) derived from the HIV transactivator of transcription (TAT) which is able to permeate the BBB when administered systemically. TAT-PEP displayed high affinity for Nogo-A, MAG, or OMgp and ameliorated their inhibitory effect on neurite growth, which also can widely distribute in the penumbra after intraperitoneal injection. Moreover, TAT-PEP treatment attenuated brain infarct volume and promoted long-term neurobehavioral functional recovery. The study further found, TAT-PEP enhanced corticospinal projections, axonal regeneration and synaptic plasticity *in vivo*. TAT-PEP also enhanced neurite growth, alleviated growth cone collapse and improved synaptic function after OGD injury *in vitro*. One possible mechanism was due to interference with the expression of POSH, RhoA, and GAP43 by resisting PirB function. Furthermore, TAT-PEP exerted neuroprotection by alleviating neuronal degeneration and apoptosis after ischemic reperfusion injury. One possible mechanism was due to the effect of TAT-PEP on the expression of cleaved Caspase-3, Bax and Bcl-2. Our findings suggest that PirB overexpression in neuron after suffering ischemic reperfusion injury induced neurons damage. This study also indicated that TAT-PEP may represent a highly efficacious neuroprotective agent displaying therapeutic potential for stroke. Together, the important implication of this study is that blocking the action between MAIs and PirB may represent an attractive therapeutic strategy against stroke in future clinical studies.

Part 1

The Spatio-temporal expression of MAG, OMgp, Nogo-A and PirB in the ischemic penumbra in the long term after stroke

Objective:

1. To study the expression of MAG, OMgp and Nogo-A in the ischemic penumbra in

the long term after stroke.

2. To study the spatio-temporal expression of PirB in the ischemic penumbra in the long term after stroke.

Methods:

Male SD rats weighing 260–280 g. First, the rats were randomly divided into 7 groups (n=6 each): Before MCAO group, MCAO group, 1 d post-MCAO group, 3 d post-MCAO group, 7 d post-MCAO group, 14 d post-MCAO group, 21 d post-MCAO group, 28 d post-MCAO group. The expression of POSH, RhoA and GAP43 in the penumbra were measured at different time points after MCAO by Western blot. Then, the rats were randomly divided into 2 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group. The expression of PirB in the penumbra were measured at 28 d after MCAO by immunofluorescence histochemistry staining.

Results:

1. Western blot analysis showed low expression of the MAG, OMgp and Nogo-A protein in normal brain tissue prior to MCAO. In contrast, MAG, OMgp and Nogo-A expression was significantly increased at 3, 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO ($P<0.05$) in the penumbra. However, compared to the Before-MCAO group, the expression of MAG and Nogo-A at 1 d post-MCAO had no significant difference ($P>0.05$). In contrast, the expression of OMgp at 1 d post-MCAO was more than that in the Before-MCAO group ($P<0.05$).

2. Western blot analysis showed low expression of the PirB protein in normal brain tissue prior to MCAO. In contrast, PirB expression was significantly increased at 1, 3, 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO ($P<0.05$) in the penumbra. We also detected the cellular localization of PirB via double-immunofluorescence staining. The results showed that PirB co-localized with NeuN protein, indicating neuronal localization, in both sham-operated and ischemic brains. In addition, the number of PirB-positive neurons was higher in the MCAO group than in the Sham group at 28 d after reperfusion ($P<0.05$).

Conclusion:

The significant and persistent up-regulation of neuronal PirB expression in the ischemic penumbra indicates that PirB represents a potential target for stroke therapy.

Part 2***pirb* RNAi enhanced axon growth and alleviated neuronal injury by inhibiting PirB expression after exposed to OGD *in vitro*****Objective:**

1. To study the effect of GPH-PIRB-294 on the expression of PirB on neurons after OGD injury.
2. To investigate the effect of *pirb* RNAi on neurite growth after OGD injury.
3. To investigate the effect of *pirb* RNAi on neuronal survival and apoptosis after OGD injury.

Methods:

The generation of GPH-PIRB-294 and lentiviral vector system was performed by Genscript Co. (Nanjing, China). SD rat embryos (E 16.5 d-18.5 d). First, cultured primary cerebral cortical neurons were randomly divided into 4 groups (n=6 each): Normal group, OGD group, OGD+*control* RNAi group and OGD+*pirb* group. At 24 h after OGD, transfect GPH-PIRB-294 into neurons. At 72 h after OGD, the expression of PirB and GFP was tested. Then, the neurons were randomly divided into 4 groups (n=6 each): Normal group, OGD group, OGD+*control* RNAi group and OGD+*pirb* group. At 24 h after OGD, transfect GPH-PIRB-294 into neurons. At 72 h after OGD, the neurites length was measured. Next, the neurons were randomly divided into 4 groups (n=6 each): Normal group, OGD group, OGD+*control* RNAi group and OGD+*pirb* group. At 24 h

after OGD, transfect GPH-PIRB-294 into neurons. At 72 h after OGD, the MTT and TUNEL staining was tested.

Results:

1. At 72 h post-OGD, Western blot analysis revealed that PirB expression in the OGD and *control* RNAi groups was increased compared with that in the uninjured group ($P<0.05$). However, its expression was significantly decreased in the *pirb* RNAi group compared with the OGD and *control* RNAi groups ($P<0.05$).

2. Under normal culture conditions, cortical neurons contained a single long axon *in vitro*. The extension of cultured cortical neuronal axons was significantly reduced at 72 h after exposure to OGD ($P<0.05$). However, the mean axon length in the *pirb* RNAi group was longer than those in the OGD group ($P<0.05$).

3. The survival of cultured neurons was examined at 72 h after transfection. The neuronal structure in the OGD and OGD+*control* RNAi groups was damaged. However, transfection with the *Pirb* RNAi vector prevented this neuronal damage. The cell viability in the OGD and *control* RNAi groups was significantly lower than that of the uninjured group ($P<0.05$) at 72 h after exposure to OGD. However, the cell viability of the *Pirb* RNAi group was higher than that of the OGD and *control* RNAi groups ($P<0.05$). The number of TUNEL-positive cells in the OGD and *control* RNAi groups was significantly higher than that of the Normal group ($P<0.05$) at 72 h after exposure to OGD. In addition, the number of TUNEL-positive cells in the *Pirb* RNAi group was smaller than that of the OGD group ($P<0.05$).

Conclusion:

These results indicated that PirB overexpression in neuron after suffering OGD injury may involve in inducing neurons casualty after OGD injury, inhibited PirB expression may enhance neurite growth rescue the neurons from apoptosis.

Part 3

The preparation of soluble fusion protein TAT-PEP and the identification of its biological activity

Objective:

1. To generate the soluble fusion protein TAT-PEP and TAT-mPEP.
2. To identify and assay biological activity of TAT-PEP

Methods:

The generation of TAT-PEP and TAT-mPEP was performed by Genscript Co. (Nanjing, China). They were identified by Coomassie Blue Staining and Western blot using anti-(His)₆ primary antibody. SD rat embryos (E 16.5 d-18.5 d). First, cultured primary cerebral cortical neurons were randomly divided into 5 groups (n=6 each). At 72 h after TAT-PEP (50 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L) or TAT-mPEP (100 µg/L) treatment, the neuronal viability and damage were assessed using the MTT and LDH assays. Then, ELISA was performed to assess the ability of TAT-PEP to bind to Nogo-A, MAG and OMgp. Next, the ability of TAT-PEP to suppress the inhibitory effect of Nogo-A, MAG, OMgp or MAIs (Nogo-A+MAG+OMgp) on neurite outgrowth was determined.

Male SD rats weighing 260–280 g. The animals were randomly divided into 7 groups (n=6 each): SD rats were subjected to MCAO and received an intraperitoneal injection of TAT-PEP (250 mg/kg) after reperfusion (n=6 each). At 0 h, 0.5 h, 2 h, 12 h, 24 h, 48 h, or 72 h after reperfusion using Western blot to determine the transduction. Animals were randomly divided into 4 groups (n=6 each): The immunofluorescence histochemical staining analysis was performed at 0 h, 0.5 h, 12 h and 24 h after reperfusion to determine the amount of TAT-PEP in the ischemic penumbra after MCAO.

Results:

1. TAT-PEP was effectively produced and purified as confirmed by SDS-PAGE. Moreover, the specificity of TAT-PEP expression was verified by Western blotting using a specific anti-(His)₆ antibody (TAT-PEP, 90 KDa; TAT-mPEP, 75 KDa).

2. We assessed the toxicity of the purified fusion proteins to normal cortical neurons. These two proteins did not affect neuronal viability ($P>0.05$) or LDH release ($P>0.05$) after incubation for 72 h.

3. At each indicate concentration point, the OD450 nm of TAT-PEP was significantly higher than that of TAT-mPEP, indicating that TAT-PEP displayed higher affinity not only for AP-Nogo-66, but also for MAG-Fc and AP-OMgp than TAT-mPEP.

4. Neurite extension was significantly inhibited by Nogo-A, MAG or OMgp ($P<0.05$). In contrast, neurite extension was almost completely rescued by TAT-PEP ($P<0.05$).

5. Neurite extension was significantly inhibited by MAIs ($P<0.05$). In contrast, neurite extension was almost completely rescued by TAT-PEP (50 μ g/L, 100 μ g/L, 200 μ g/L) ($P<0.05$).

6. A high level of TAT-PEP in brain tissue was detected at 30 min after intraperitoneal injection. This elevation peaked at 12 h and persisted for 72 h. At 12 h after intraperitoneal injection, anti-(His)₆ immunofluorescence revealed the peaked expression of AT-PEP in the ischemic penumbra.

Conclusion:

In conclusion, these results suggest that TAT-PEP was generated successfully. The neurite extension can be rescued by TAT-PEP. TAT-PEP can cross the BBB and accumulate in the ischemic region after intraperitoneal injection. we hypothesized that blocking the interaction between Nogo-A, MAG, OMgp and their receptor PirB using TAT-PEP in the ischemic cerebral cortex could attenuate ischemic stroke injury and abolishing the inhibitory activity of PirB could have a more powerful effect than deleting only a subset of its ligands

Part 4

The effect of TAT-PEP on brain infarct volume and long-term neurobehavioral recovery after MCAO injury

Objective:

1. To study the effect of TAT-PEP on brain infarct volume after MCAO.
2. To study the effect of TAT-PEP on neurobehavioral recovery after MCAO.

Methods:

Male SD rats weighing 260–280 g. First, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. The Garcia scores test was performed at 24 h, 48 h and 72 h after reperfusion. The TTC staining was performed at 72 h after reperfusion. Second, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. Diffusion-weighted imaging (DWI) was performed at 3 d post-MCAO. T2-weighted images (T2WI) were collected at 3, 7 and 28 d post-MCAO. The mNSS scores was measured at 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO. The foot-fault and rotarod test were performed at 2, 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO. The limb placement test was performed at 3 h, 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO. The motor evoked potential was performed at 28 d post-MCAO. Third, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. The step-down passive avoidance and T maze tests were performed at 28 d post-MCAO.

Results:

1. The Garcia scores test showed the neurological function scores of MCAO group were lower than that of Sham group at 24, 48 and 72 h after reperfusion ($P<0.05$). In contrast, the neurological function scores of TAT-PEP group were higher than that of MCAO group

at 48 and 72 h after reperfusion ($P<0.05$). The TAT-PEP group displayed a significantly smaller brain infarct volume than the MCAO group by TTC staining ($P<0.05$).

2. The mNSS scores of MCAO group were higher than those of Sham group at 7, 14, 21 and 28 d after reperfusion ($P<0.05$). The scores in the TAT-PEP group were significantly lower than those in the MCAO group at 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO ($P<0.05$). DWI and T2WI analyses showed that the high-intensity volumes were smaller in the TAT-PEP group than in the MCAO group at 3, 7 and 28 d post-MCAO ($P<0.05$).

3. To test the motor integration response capacity, the foot-fault task was used. Compared with the MCAO group, performance on the foot-fault test was significantly better in the TAT-PEP group at 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO ($P<0.05$; Fig. 6C). To evaluate motor function and coordination, the rotarod test was performed. Compared with the Sham group, the time remaining on the rod was shorter in the MCAO group at 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO. However, the motor performance of the TAT-PEP group was increased at 7, 14, 21 and 28 d post-MCAO compared to that of the MCAO group ($P<0.05$). Subsequently, scores on the limb placement test was performed. The recovery of limb function was significantly improved in the TAT-PEP group on 7, 14, 21 and 28 d compared with the MCAO group ($P<0.05$).

4. The results showed a notable reduction in the amplitude of MEPs recorded from the left forelimb and left hindlimb in the MCAO group compared with the Sham group at 28 d post-MCAO ($P<0.05$). In contrast, the TAT-PEP group displayed larger MEP amplitudes in the left forelimb and left hindlimb than the MCAO group ($P<0.05$).

5. The latency on the step-down passive avoidance in the TAT-PEP group was longer than that in the MCAO group ($P<0.05$). The error number on the step-down passive avoidance in the TAT-PEP group was less than that in the MCAO group ($P<0.05$). The T maze test showed the mean trials to first avoidance in the TAT-PEP group was less than that in the MCAO group ($P<0.05$). The mean to criterion in the TAT-PEP group was less than that in the MCAO group ($P<0.05$).

Conclusion:

In conclusion, these data indicate that TAT-PEP treatment is capable of considerably

reducing infarct volume in parallel with enhancing the recovery of neurobehavioral function within 4 weeks after reperfusion.

Part 5

The effect and mechanism of TAT-PEP on axonal regeneration, corticospinal tract reconstruction and synaptic plasticity reconstruction after ischemic reperfusion injury

Objective:

1. To study the effect of TAT-PEP on corticospinal tract reconstruction after MCAO.
2. To study the effect of TAT-PEP on axonal regeneration in the ischemic penumbra after MCAO.
3. To study the effect of TAT-PEP on synaptic plasticity in the ischemic penumbra after MCAO.
4. To study the effect of TAT-PEP on neurite growth, growth cone collapse and spontaneous excitatory post-synaptic current (sEPSCs) after OGD injury.
5. To investigate the mechanism of TAT-PEP on above effects.

Methods:

Male SD rats weighing 260–280 g. First, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. The BDA-positive fibers were examined in the cervical enlargement of the spinal cord at 28 d after MCAO. The expression of NF200, MAP2, SYN and NeuN in the penumbra at 28 d after MCAO by immunofluorescence histochemistry staining. Second, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. The expression of POSH, RhoA and GAP43 in the penumbra were measured at 28 d after MCAO by Western blot.

SD rat embryos (E 16.5 d-18.5 d). The cultured primary cerebral cortical neurons were randomly assigned into different groups. First, neurons were assigned into 3 groups (n=6 each): OGD group, OGD+TAT-PEP group and Normal group. At 24 h after cortical neuronal adherence, the OGD model was used. Then, live cell imaging was performed observe neurites growth at 24 h after exposure to OGD. Second, neurons were assigned into 3 groups (n=6 each): OGD group, OGD+TAT-PEP group and Normal group. At 7 d after cortical neuronal adherence, the OGD model was used. Then the neurites growth and branch points were observed at 3 d after exposure to OGD. Third, neurons were assigned into 3 groups (n=6 each): OGD group, OGD+TAT-PEP group and Normal group. Neurons were assigned into 3 groups (n=6 each): OGD group, OGD+TAT-PEP group and Normal group. The sEPSCs was measured at 3 d after exposure to OGD. At last, neurons were assigned into 4 groups (n=6 each): OGD group, OGD+TAT-PEP group, OGD+*pirb* RNAi group and Normal group. The expression of POSH, RhoA and GAP43 were measured at 3 d after OGD by Western blot.

Results:

1. The axonal tracer BDA was injected into the intact (undamaged hemisphere) motor cortex at 14 d post-MCAO to label descending axons in the intact hemisphere. At 28 d post-MCAO, the Sham group displayed a unilateral CST innervation profile. In the MCAO group, few BDA-labeled, midline-crossing CST axons extended toward the ventral horn of the spinal gray matter on the denervated side of the cervical cord, serving the affected limb. The number of BDA-positive CST axons in the middle or on the left side of the gray matter of the spinal cord (C3-5) in the TAT-PEP group was significantly increased compared with the number in the Sham and MCAO groups ($P<0.05$). TAT-PEP treatment greatly increased the number of such fibers that were observed ipsilateral to the injection site ($P<0.05$).

2. The morphology of the NF-200-immunoreactive neuronal fibers was irregular and fragmented in the MCAO group. Compared with the MCAO group, the mean optical density of the NF-200-positive axons was increased in TAT-PEP group ($P<0.05$).

3. The synapsin were eliminated from injured neurons in the MCAO group ($P<0.05$). Compared with the MCAO group, the amount of SYN was increased in the TAT-PEP group ($P<0.05$).

4. The expression of POSH and RhoA was higher in the MCAO group than that in the Sham group at 28 d post-MCAO ($P<0.05$). The GAP43 levels were decreased in the MCAO group compared to the Sham group at 28 d post-MCAO ($P<0.05$). In contrast, the expression of POSH and RhoA was inhibited by TAT-PEP treatment at 28 d post-MCAO ($P<0.05$). The GAP43 levels were increased in the TAT-PEP group compared to the MCAO group at 28 d post-MCAO ($P<0.05$).

5. Time-lapse imaging showed that the average growth rate of the longest neurite was higher in the TAT-PEP group than in the OGD group ($P<0.05$). Moreover, the number of branching points on the longest neurite in the TAT-PEP group was greater than that in the OGD group ($P<0.05$).

6. The extension and number of branching points of the longest neurite were recorded. The average length of the longest neurite was longer in the TAT-PEP group than that in the OGD group at 7 d after OGD injury ($P<0.05$; Fig. 4D and E), and the number of branching points on the longest neurite in the TAT-PEP group was greater than that in the OGD group at 7 d after OGD injury.

7. The baseline level of growth cone collapse in the normal cultures was approximately 20%. However, the level of growth cone collapse was increased to 60% at 7 d after OGD injury. Blocking PirB function using TAT-PEP clearly reduced growth cone collapse ($P<0.05$).

8. At 3 d after OGD insult, the amplitude and frequency of sEPSCs was significantly decreased in the OGD group than that in the Normal group ($P<0.05$), whereas the amplitude and frequency of sEPSCs was significantly enhanced in the TAT-PEP treatment than that in the OGD group ($P<0.05$).

9. The expression of POSH and RhoA was higher in the OGD group than that in the Normal group at 3 d post-OGD ($P<0.05$). The GAP43 levels were decreased in the OGD group compared to the Normal group ($P<0.05$). In contrast, the expression of POSH and

RhoA was inhibited by TAT-PEP or *pirb* RNAi ($P<0.05$). The GAP43 levels were increased in the TAT-PEP group or *pirb* RNAi group compared to the OGD group ($P<0.05$).

Conclusion:

In conclusion, TAT-PEP enhanced neurite growth, alleviated growth cone collapse and improved synaptic function after OGD injury. Moreover, TAT-PEP promoted long-term neurobehavioral functional recovery may by enhancing axonal regeneration, corticospinal projections and synaptic plasticity associated with mediated interference with the expression of POSH, RhoA, and GAP43 by resisting PirB function. These studies also suggest that by antagonizing PirB function, TAT-PEP may represent an attractive therapeutic strategy against stroke in future studies of translational medicine.

Part 6

TAT-PEP exerted neuroprotection by alleviating neuronal degeneration and apoptosis after ischemic reperfusion injury

Objective:

1. To study the effect of TAT-PEP on neuronal survival and apoptosis after OGD injury.
2. To study the effect of TAT-PEP on neuronal survival and apoptosis in the ischemic penumbra after MCAO.
3. To study the effect of TAT-PEP on neuronal ultrastructure in the ischemic penumbra after MCAO.

Methods:

SD rat embryos (E 16.5 d-18.5 d). The cultured primary cerebral cortical neurons were randomly assigned into different groups. First, neurons were assigned into 6 groups ($n=6$

each): OGD group, OGD+TAT-PEP(50 µg/L) group, OGD+TAT-PEP(100 µg/L) group, OGD+TAT-PEP(200 µg/L) group, OGD+TAT-mPEP(100 µg/L) group and Normal group. The cell viability and LDH release levels were measured at 24 h after exposure to OGD. Second, neurons were assigned into 4 groups (n=6 each): OGD group, OGD+TAT-PEP(100 µg/L) group, OGD+TAT-mPEP(100 µg/L) group and Normal group. The cell viability and LDH release levels were measured at 6 h, 24 h and 72 h after exposure to OGD. Next, neurons were assigned into 3 groups (n=6 each): OGD group, OGD+TAT-PEP group and Normal group. TUNEL staining and Western blotting of cleaved caspase-3, Bcl-2, and Bax were performed at 24 h after exposure to OGD.

Male SD rats weighing 260–280 g. First, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. Nissl, FJC and NeuN staining in the penumbra were measured at 3 d after exposure to MCAO. Second, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. TUNEL staining in the penumbra were measured at 3 d after exposure to MCAO. Third, the rats were randomly divided into 3 groups (n=6 each): Sham group, MCAO group, MCAO+TAT-PEP group. The ultrastructure of neurons in the penumbra were measured by electron microscopy analysis at 3 d after exposure to MCAO.

Results:

1. The cell viability reduced decreased significantly in the OGD group compared to Normal group ($P<0.05$) and LDH release increased significantly in the OGD group compared to Normal group ($P<0.05$) at 24 h after exposed to OGD. In addition, the cell viability in TAT-PEP treatment group was significantly higher than it in the OGD group or TAT-mPEP group at 24 h after exposed to OGD ($P<0.05$).

2. The LDH release in TAT-PEP treatment group was significantly lower than it in the OGD group or TAT-mPEP group at 24 h after exposed to OGD ($P<0.05$). However, the effect of TAT-PEP between 100 µg/L and 200 µg/L had no difference on cell survival ($P>0.05$).

3. In addition, to confirm the protective effect of TAT-PEP, we also observed the

function of TAT-PEP on neurons at different time points after exposed to OGD. The cell viability reduced decreased significantly in the OGD group or TAT-mPEP group compared to the Normal group ($P<0.05$) and LDH release increased significantly in the OGD group or TAT-mPEP group compared to the Normal group at 6 h, 24 h and 72 h ($P<0.05$) after exposed to OGD. However, TAT-PEP treatment increased cell viability and decreased LDH release compared to the OGD group or TAT-mPEP group at 24 h and 72 h ($P<0.05$) after exposed to OGD.

4. Then, assaying for cell apoptosis at 72 h after exposure to OGD, the number of TUNEL-positive cells in the OGD group was more than that in the Normal group ($P<0.05$). In addition, the number of TUNEL-positive cells in TAT-PEP group was fewer than in the OGD group ($P< 0.05$).

5. The expression of cleaved (active) caspase-3, Bcl-2 and Bax was assessed by western blotting at 72 h after OGD. Caspase-3 activity was significantly inhibited in the TAT-PEP group compared with the OGD group ($P<0.05$). Treatment with TAT-PEP increased the level of Bcl-2 protein whereas decreased Bax expression compared with OGD group ($P< 0.05$).

6. At 3 d after MCAO, the Nissl staining and NeuN staining was performed in the ischemic penumbra at 3 d after reperfusion. Compared with the MCAO group, the density of normal neurons in the ischemic penumbra in the TAT-PEP groups increased significantly ($P<0.05$). The number of NeuN-positive neurons was more in the TAT-PEP group than the MCAO group ($P< 0.05$).

7. At 3 d after MCAO, the number of FJC-positive neurons was fewer in the TAT-PEP group than MCAO group ($P< 0.05$). Similarly, the number of TUNEL-positive cells was fewer in the TAT-PEP group than MCAO group ($P< 0.05$).

8. At 3 d after MCAO, the ultrastructure of cortical neurons was characterized by nuclear membrane folds, collapse and blurred boundaries. Additionally, obvious swelling of mitochondria in the cytoplasm was noted, and many mitochondria were spherical in shape. Some mitochondrial cristae were fractured. The damage to the neuronal ultrastructure after TAT-PEP treatment was significantly alleviated, especially in the

mitochondria.

Conclusion:

In conclusion, TAT-PEP attenuated brain damage by alleviating neuronal degeneration and apoptosis by affecting the expression of apoptosis associated protein. Our findings suggest that TAT-PEP may represent a highly efficacious neuroprotective agent displaying therapeutic potential for stroke. Together, the important implication of this study is that antagonizing PirB function may represent an attractive therapeutic strategy against stroke in future clinical studies.

Key words: Stroke, Paired immunoglobulin-like receptor B, Trans-activator of transcription, axonal regeneration, corticospinal tract reconstruction, synaptic plasticity, apoptosis

前 言

缺血性脑卒中（cerebral ischemic stroke）占有所有脑卒中的 80%，是一种常见的具有高发病率、高致残率的中枢系统血管性疾病。特别是其存活者中约 60%-80% 的病人遗留有不同程度的智力障碍、感觉障碍、运动障碍和生活不能自理等神经功能缺陷，给社会和家庭带来沉重的负担。然而，到目前为止，临床对缺血性脑中风还仅仅采取血管再通术、抗凝治疗、组织型纤溶酶原激活剂（t-PA）等治疗，但都收效甚微。因此，如何治疗以促进神经元存活以及神经功能恢复，降低病残率，是一个亟待解决的社会问题，也是富有挑战性的世界性难题。

缺血性脑卒中的病理生理过程较为复杂，其中脑缺血再灌注损伤可以致使大脑缺血缺氧，引起脑组织结构和功能破坏，造成神经元的损伤，轴突再生困难和突触可塑性的下降，影响神经系统回路功能，从而导致神经功能障碍。这其中一个重要原因是因为大脑组织中存在多种髓磷脂抑制因子（MAIs）及其受体。新近研究发现，成对性免疫球蛋白样受体 B（PirB）是 Nogo-A, MAG, OMgp 的共受体。它们的存在可能对脑缺血半暗带内神经元存活、轴突再生和突触可塑性发挥重要作用，但目前还尚未阐明。研究报道，*pirb* 基因敲除的小鼠在 MCAO 后不仅脑梗死容积比野生型的小鼠要小，而且皮质脊髓束的重建也得到加强。这些提示 PirB 不仅可以加重脑缺血再灌注过程中神经元的损伤，而且还能够抑制轴突再生。还有研究表明，PirB 在神经元回路稳定和突触可塑性方面扮演重要角色，对视功能，感觉运动功能等发挥重要作用。新近研究还报道，通过阻碍 PirB 功能，可以促进视神经损伤后神经突触可塑性的恢复，有利于视功能的改善。这些证据提示，PirB 可能是治疗缺血性脑卒中的一个重要作用靶点，阻碍 PirB 及其配体的相互作用进而抑制 PirB 功能的发挥，促进神经功能恢复，这种策略可能会比单独干预某一配体作用更为有效，这将为治疗缺血性脑卒中带来新的希望。

PirB 胞外段主要含有六个免疫球蛋白样结构域。研究发现，Nogo-A 和 MAG 等可以与其胞外段结合，促使 PirB 下游信号通路激活，发挥作用。因此，如果能在蛋白质水平阻碍 Nogo-A, MAG, OMgp 与 PirB 的相互作用，削弱 PirB 功能，将会更有效的促进脑缺血再灌注损伤后神经功能的恢复。但是，生物大分子往往很难通过血

脑屏障分布于脑组织。在我们前期研究和以往报道中显示，转录反式激活因子 TAT 可以帮助生物大分子通过血脑屏障，分布于脑组织中，使其更为有效的发挥作用。

在本研究中，我们将首先利用 MCAO 模型，检测皮层半暗带内 MAG，OMgp，Nogo-A 和 PirB 的长时程表达情况。通过构建 GPH-PIRB-294 慢病毒系统干涉 PirB 表达，观察抑制 PirB 表达对神经元氧糖剥夺后轴突生长及存活的作用。在此基础上，制备新型可溶性融合蛋白 TAT-PEP，并对其生物学活性进行鉴定。通过 MRI 成像技术多种神经行为学方法研究，评价 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤后脑梗死容积和神经功能恢复的作用。通过顺行神经示踪技术、多重免疫荧光组化染色（IFHC）、活细胞工作站、神经电生理、WB 等观察其对脑缺血再灌注损伤后轴突再生、皮质脊髓束和突触可塑性重塑的作用，并阐明相关机制。最后，通过体内外实验进一步分析 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤后神经元变性和凋亡的作用，并探讨相关机制。以期 为脑缺血再灌注损伤后的治疗提供新的靶点和新的策略，为 TAT-PEP 可能的临床应用提供理论依据和实验基础。

文献回顾

1. 缺血性脑卒中的治疗及研究现状

缺血性脑卒中（cerebral ischemic stroke）占有脑卒中的 80%，是一种常见的具有高发病率、高致残率的中枢系统血管性疾病^[1]。其主要是由于脑部供血受阻而导致的脑功能受损，在供血恢复后可进一步引发脑缺血再灌注损伤（Cerebral ischemic reperfusion injury），是继心脏和肿瘤之后的第三大致死性疾病^[2,3]。我国每年新发生脑梗死病人 150 万，由于脑中风的高病率和患病率，以及缺少有效的质量方法，存活者中 60%-80% 的患者伴有不同程度智力、感觉、运动等严重残疾，已逐渐衍变成成为严重的社会问题^[4-7]。虽然对于缺血性脑中风的的治疗已经探索了几十年，到目前为止，临床对缺血性脑中风还仅仅采取血管再通术、抗凝治疗、组织型纤溶酶原激活剂（t-PA）等治疗，以尽早重建损伤区血供，减轻神经损伤。值得一提的是，t-PA 作为唯一被美国 FDA 批准的临床药物，由于其存在治疗时间窗过于狭窄，易导致颅内出血等问题，只能造福不到 5% 的患者^[8,9]。此外，虽然随着抢救水平的提高，死亡率已明显下降，但存活者往往存在运动感觉功能障碍、学习记忆功能减退等病发症，严重影响个人生活质量。因此，如何治疗以促进神经元存活以及神经功能恢复，降低病残率、减轻家庭及社会负担，是一个亟待解决的社会问题，也是富有挑战性的世界性难题。

脑缺血再灌注损伤为脑中风、脑创伤、脑肿瘤等很多疾病的最根本病理生理学基础，如何减轻缺血性脑损伤为近年来神经科学领域的研究热点。**缺血性脑卒中的病理生理过程：**急性脑卒中发生后，在缺血中心区往往引起不可逆的损伤，而在缺血中心区周围，损伤的脑组织是具有一定恢复和修复能力的，这部分可以被“挽救”的脑组织称为缺血半暗带（Ischemic penumbra, IP）。据 Nagasawa 等^[9]报道额叶皮层区 1（frontal cortex area 1, Fr1）和尾壳核室下区（subventricular zone, SVZ）被定义为 MCAO 模型的 IP 区^[11]。Astrup 等^[10]认为 IP 区内脑组织的损害与恢复呈动态变化，具有一定程度的可逆性，是治疗缺血性脑血管病竭力挽救的区域，也成为临床治疗脑卒中的关键区域。

大量动物实验证实，缺血半暗带及脑梗死容积是存在动态变化的^[12]。局灶性脑缺血损伤模型即大脑中动脉栓塞模型（middle cerebral artery occlusion, MCAO)中，再灌注几个小时内脑梗死容积可迅速出现并形成。对于体重为 300 g 大鼠，栓塞 2 h 可以形成 400-450 mm³ 的梗死容积^[13]，栓塞 90 min 可以形成 250-380 mm³ 的梗死容积^[14]，栓塞 60 min 可以形成约 170 mm³ 的梗死容积，这 170 mm³ 的梗死容积内的脑组织（特别是神经元及其轴突）发生不可逆的损伤。与此同时，栓塞 60 min 可以导致梗死区周围约 230 mm³ 的脑组织损伤，这其中的 140 mm³ 的脑组织在 30 min 内会死亡，剩下的 90 mm³ 的脑组织在 60 min 内会死亡。因此，及时而有效的挽救缺血半暗带内的脑组织损伤是缺血性脑卒中治疗的关键^[15]。

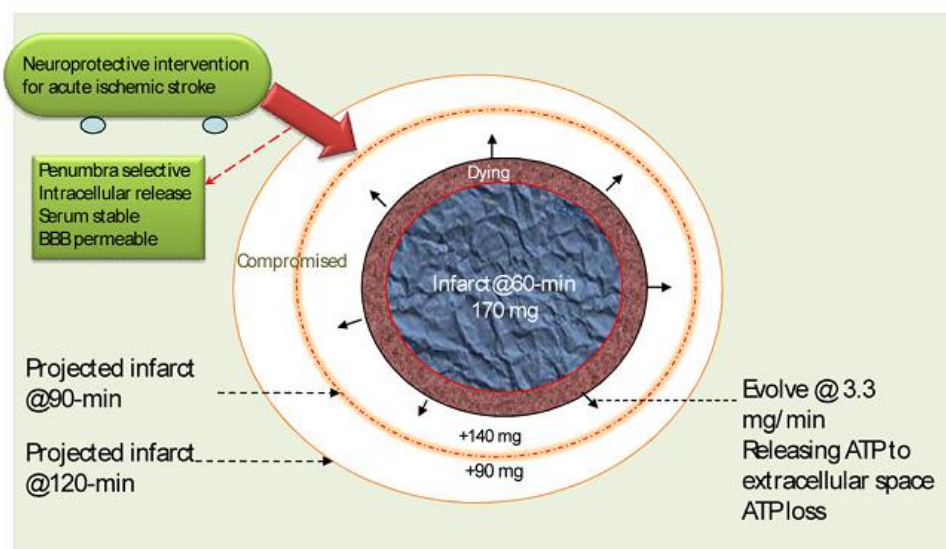


图 0-1 梗死区域扩展及治疗策略。神经保护药物应该及时穿过血脑屏障，渗入到半暗带内，这将有利于急性缺血性脑卒中的治疗。

大量研究已经说明，脑缺血或者是脑外伤后，神经元最易发生损伤。特别是对于缺血性脑卒中来说，神经元对其整个过程来说都非常敏感^[16]。Bolander 等^[17]发现，对于啮齿类动物，当血流量减少至 25ml/100g/minute 时，可以导致大量神经元死亡。对于 MCAO 模型中的缺血中心区，由于缺血缺氧严重，神经细胞损伤速度非常快，往往出现不可逆性坏死；而在半暗带内，由于侧支循环存在，神经细胞损伤较慢，往往以变性和凋亡为主^[18]。研究显示，在半暗带内，促凋亡蛋白 Bax 表达增加，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降，而通过抑制 Bax 表达，上调 Bcl-2 表达，可以有效缓解

神经元凋亡^[19]。研究还表明，通过某些抗凋亡治疗后，可以减轻脑缺血后海马组织神经元的损伤，促进学习，记忆功能的恢复^[20]。还有研究显示，通过抗凋亡措施，促进大脑皮层半暗带内神经元存活，可有效的促进运动、感觉、协调、平衡等神经功能的恢复（文献）。

另一方面，有研究证实，缺血脑卒中发生后可以导致缺血缺氧区域内神经元轴突损伤和突触可塑性的下降。由于神经元轴突对于神经元之间信息的传递，神经功能的执行以及神经可塑性的维持都至关重要，因此减轻脑缺血后轴突损伤，促进轴突再生和皮质脊髓束重建，增强突触可塑性，有助于神经功能的恢复，这对于缺血性脑卒中的治疗具有重要作用^[12, 21]。此外，由于缺血损伤的急性期、亚急性期和慢性期的轴突及突触损伤都会加重临床神经功能缺陷，因此，如果动态的促进神经轴突和突触结构及功能的恢复对脑缺血损伤的治疗及神经功能恢复具有重要意义^[22]。综上所述，挽救脑缺血损伤区的神经元，促进神经轴突的再生和皮质脊髓束重建，增强突触可塑性，已成为治疗缺血性脑血管病的关键环节和物质保证。

2. 脑组织存在多种髓磷脂抑制因子及其受体参与了轴突再生抑制和神经元损伤的病理生理过程

人体的大多数组织在损伤后具有再生和修复能力，但成年哺乳动物中枢神经系统（central nervous system, CNS）损伤后却存在再生与修复困难，在脑缺血性损伤相关疾病、脊髓损伤、以及许多神经病变的情况下，CNS 功能恢复非常有限，并且容易发生肢体运动和感觉障碍等严重影响个人生活质量的病症^[23]。因此，CNS 再生问题一直是医学界和神经科学界在理论研究和临床实践中亟待解决的重大难题（文献，邓斌硕士论文，神经解剖学杂志）。

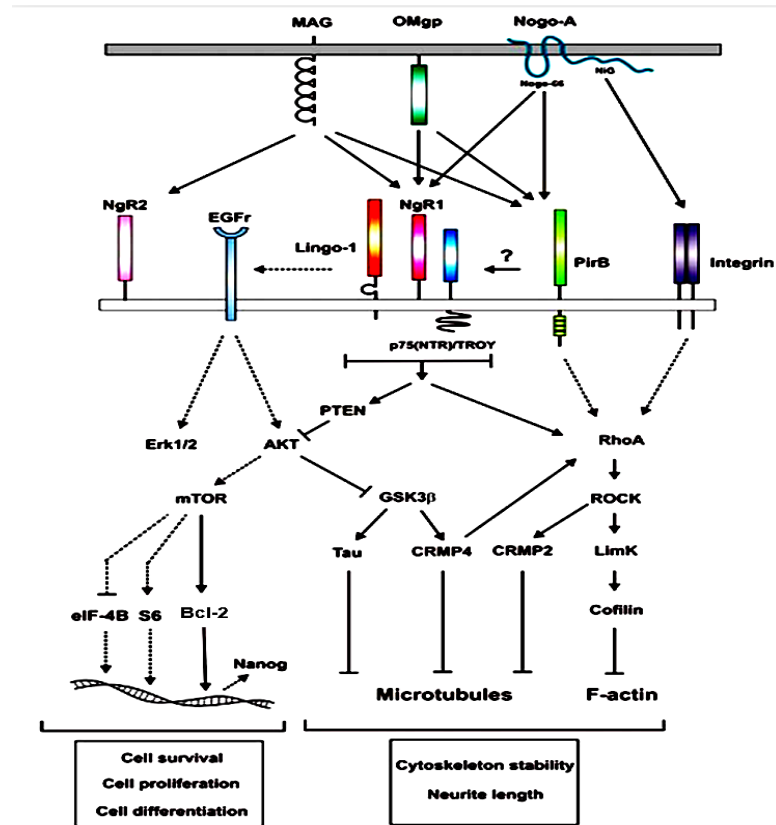


图 0-2 髓磷脂抑制因子作用信号通路示意图

成年哺乳动物 CNS 损伤引起的神经功能障碍难以恢复的主要原因为缺血区大量神经元的死亡和受损神经元轴突的再生能力极为有限。近二十年来的研究已有突破性进展，认为 CNS 损伤难以修复的主要障碍之一是存在髓鞘来源的抑制因子，主要为 Nogo-A、髓磷脂相关糖蛋白(MAG)、少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(OMgp)^[24]。多项研究表明：Nogo-A、MAG、OMgp 等抑制因子，在脑缺氧缺血损伤、脊髓损伤、癫痫疾病、阿尔海默氏病、自身免疫性脱髓鞘疾病、以及 CNS 神经发生过程中扮演着重要的角色^[25, 26]。

TABLE 1. *Reported genetic polymorphisms or differential gene expression of MAIs in patients with neurodegenerative disease*

| MAI | Disease | Reference | Effects |
|--------|---------|-----------|--|
| OMgp | MS | 124 | MAG, MBP, OMgp, and PLP genes do not have a significant genetic effect on susceptibility to MS in multiple affected member families with MS (linkage analysis) |
| MAG | ALS | 114 | No changes in MAG antibodies levels in serum from patients with ALS |
| | MS | 124 | MAG, MBP, OMgp, and PLP genes do not have a significant genetic effect on susceptibility to MS in multiple affected member families with MS (linkage analysis) |
| | MS | 115 | Decreased MAG expression in patients with MS |
| | MS | 116 | No genetic linkage of the MAG gene with MS in Italian population |
| | SZ | 154 | Genetic linkage of the MAG gene with SZ in Chinese population |
| | SZ | 117 | Several genes involved in myelination, including MAG, are down-regulated in SZ |
| | SZ | 155 | No genetic association of the MAG gene with SZ in a Caucasian population |
| | SZ | 118 | In all regions examined, genes expressed after the terminal differentiation of oligodendrocytes (CNP, GALC, MAG, and MOG) tended to have lower levels of mRNA expression in subjects with SZ <i>vs.</i> control subjects |
| Nogo-A | AD | 45 | Increased Nogo-A expression in hippocampal neurons in AD and is associated with β -amyloid deposits in senile plaques |
| | ALS | 119 | Increased Nogo-A expression in both postmortem and biopsy samples from patients diagnosed with ALS |
| | ALS | 41 | Transient overexpression of Nogo-A and NgR1 in motor neurons of ALS mouse model |
| | ALS | 120 | Serum Nogo-A levels are not elevated in patients with ALS |
| | MS | 142 | Nogo-A could be detected in serum and cerebrospinal fluid in patients with MS |
| | MS | 98 | Increased Nogo-A expression in oligodendrocytes in patients with MS |
| | MS | 121 | A soluble fragment of Nogo-A is overexpressed in CSF from patients with MS |
| | MS | 122 | A soluble fragment on Nogo-A is overexpressed in CSF from patients with MS but also in controls (not useful as biomarker) |
| | SZ | 150 | Increased Nogo levels in cortex of patients with SZ |
| | SZ | 151 | Increased Nogo-C levels in cortex of patients with SZ |
| | TLE | 123 | Increased Nogo-A expression in hippocampal neurons of patients with TLE |

CSF, cerebrospinal fluid; TLE, temporal lobe epilepsy.

表 0-1 神经退行性病变病人的 MAIs 基因多态性或 MAIs 不同基因表达

2.1 Nogo-A, MAG 和 OMgp 的表达及功能

2000 年 1 月,《Nature》杂志上发表了 3 篇成功分离出抑制因子 Nogo-A 并克隆了 Nogo 基因的研究成果,其中详细的分析了 Nogo 基因的结构和功能^[27-29]。这被称作是“探索中枢神经系统再生漫长道路中的一个里程碑”。Nogo 基因可产生三种不同蛋白亚型: Nogo-A, Nogo-B 及 Nogo-C。Nogo-A 在主要存在于中枢神经系统的少突胶质细胞和神经元中,在睾丸和心脏中也有少量表达。研究进一步明确,在少突胶质细胞中,Nogo-A 主要表达于细胞体和突起,位于最内层的轴突旁和最外层的髓鞘膜上,这也从形态学上较好解释了 Nogo-A 具有抑制轴突再生、成纤维延伸以及神经结构可塑性的原因^[30]。在脊髓运动神经元,视皮层和感觉运动皮层神经元,海马的椎体细胞和中间神经元,以及背根节等神经元中也表达 Nogo-A^[31-34]。神经元中的 Nogo-A 蛋白定位于胞质的内质网、细胞膜和突触结构上^[32]。另外,由于这些神经元的突触具有高度的可塑性,因此神经元的 Nogo-A 可能在突触的可塑性中具有一定作用。由此可见,Nogo-A 分布的广泛性也预示其除了具有强烈的抑制中枢神经突起生长和成纤维细胞延伸的作用外,在突触可塑性,少突胶质细胞成髓鞘、脱髓鞘中扮演

重要角色（文献，邓斌硕士论文，神经解剖学杂志）。

此外，应用具有治疗作用的 anti-Nogo-A 抗体不仅可以促进脊髓损伤模型中皮质脊髓束和神经功能的恢复，还可以促进脑缺血损伤后神经元重塑和功能恢复(文献)。Cheatwood^[35]等进一步发现，局灶性缺血性再灌注脑损伤后皮层椎体神经元和中间神经元都有 Nogo-A 的表达。在再灌注早期，Nogo-A 表达略有下调，MCAO 后 28 d 时其表达量显著增加，而其在脑白质中的表达则没有明显波动。我们前期研究发现，TAT-NEP1-40（NEP1-40，Nogo 细胞外多肽，1-40 残基）作为 NgR1 竞争性拮抗剂阻断 NgR1 后，可以抑制运动神经的死亡，对神经元具有保护作用；可以减少 MCAO 后脑梗死容积，促进神经功能恢复。这些提示 Nogo-A 在脑缺血再灌注损伤中扮演重要角色。

中枢神经系统另外两种髓磷脂抑制因子即 MAG 和 OMgp 不仅在脊髓组织中表达，在脑组织中也有存在。（**还要加内容!**）Israelsson 等^[36]报道，利用创伤性脑模型（traumatic brain injury, TBI）发现，海马区 Nogo-A 基因表达量在损伤 1 d 后明显增加，MAG 基因的表达量则在损伤后 7 d 时增加，而 OMgp 基因的表达则无明显变化。该研究提示 Nogo-A，MAG 和 OMgp 可能对脑创伤后轴突再生和突触可塑性具有抑制效应。

2.2 髓磷脂抑制因子受体的研究情况

Nogo-66 受体(Nogo-66 receptor, NgR1)是 Nogo-A、MAG 和 OMgp 的共受体。其中轴突再生抑制，生长锥瓦解，维持突触可塑性等方面的扮演角色^[37]。研究显示，干预 NgR1 可以同时逆转 Nogo-A、MAG、OMgp 对轴突生长的抑制作用^[38]。Fournier 等^[39]利用 NgR1 拮抗剂 NEP1-40，可以有效促进轴突再生。应用 NgR1 抗体或 NEP1-40，能够加强神经突起生长，缓解神经细胞凋亡，促进模型动物运动功能恢复^[41]。然而，近年来研究发现：基因敲除 NgR1(-/-)或 RNAi 下调 NgR1 表达，Nogo-66、MAG、OMgp 仍具有较强的抑制轴突生长作用^[42, 43]，而且证实 NgR1 仅对 Nogo-66、MAG、OMgp 导致的急性生长锥崩溃发挥关键作用，而对轴突生长的慢性抑制效应并不明显^[44]。这些研究强烈提示，CNS 中还存在抑制因子其他类型的受体。

以往多项研究表明，脑缺血再灌注损伤或脊髓损伤后，髓鞘或神经元上NogoA、MAG、OMgp表达增加，这些抑制因子与NgR1受体复合物相结合，致使下游的Rho-A/ROCK激酶（ROCK）信号通路活化（图3），顺序激活肌球蛋白轻链激酶

(MLCK) 和球蛋白轻链 (MLC), 导致生长锥的崩溃, 抑制轴突再生^[5,8,14]。2004年, Li S等研究表明, 通过阻断NgR1的功能可以在神经元受损早期减轻Nogo-A对轴突生长的抑制作用^[15]。2010年, Schwab ME发表评论指出, NEP1-40作为NgR1竞争性拮抗剂阻断NgR1后, 可促进轴突生长和调控神经元可塑性, 其主要机制是通过抑制下游Rho-A/Rho激酶 (ROCK) 信号通路而发挥作用^[5]。Walsh FS等通过鞘内注射NEP1-40, 可明显促进脊髓损伤后皮质脊髓束的生长, 促进运动功能的恢复^[14]。进一步研究证实: Nogo-A、MAG和OMgp的共同受体是 NgR1 (图3), 从理论上分析阻断了NgR1就可以同时逆转Nogo-A、MAG、OMgp对轴突生长的抑制作用。然而, 近年来的研究发现: 基因敲除NgR1(-/-)或RNAi下调NgR1表达, Nogo-66、MAG和OMgp仍具有一定的抑制轴突生长作用^[6,9], 而且证实这三种抑制因子作用于NgR1仅对早期轴突生长产生抑制作用, 中晚期抑制效应弱^[6]。这一结果提示CNS损伤后轴突再生障碍很可能还存在其它抑制途径。

2.3 PirB 是新鉴定的髓磷脂抑制因子受体, 以 PirB 为靶点, 对治疗缺血性脑损伤具有重要意义

《Science》, 《Neuron》杂志于 2008 年同时报道了一项重要发现。Atwal 等依赖于文库筛选技术, 发现成对性免疫球蛋白受体 B (paired immunoglobulin-like receptor B, PirB) 是 MAG、Nogo-66、OMgp 另一受体, 它们具有高亲和力结合, 表现出抑制轴突生长的慢性抑制作用^[45, 46]。与 NgR1 相比, PirB 在髓磷脂抑制作用中似乎更为重要, 依据是基因敲除 PirB 后会比起敲除 NgR1 更多的轴突再生, 而且体外轴突再生实验证实, NgR1 在髓磷脂导致的抑制过程中似乎起辅助抑制受体作用, 因为基因敲除 NgR1 能够加强敲除 PirB 对髓磷脂抑制的逆转作用^[46, 47] (邓斌硕士论文)。

PirB 是一种 I 型跨膜糖蛋白, 由胞外六个免疫球蛋白样结构域和胞内四个免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIMs) 的多肽组成^[47]。最早认为 PirB 在 B 细胞、树突状细胞等表面表达较高^[48, 49]。现在研究表明, PirB 也表达于神经元^[23, 50], 主要位于神经元的生长锥, 与突触的形成、稳定有密切的关系^[51]。另外, 通过大鼠大脑低氧缺血模型研究发现, PirB 可以抑制神经元轴突再生^[52]以及在敲除 MHC-1 与 PirB 的转基因小鼠中风模型中发现皮质脊髓束投射与神经元保护都优于对照组^[23]。同时, PirB 在 CNS 的多个区域广泛表达, 对 CNS 突触形成和可塑性以及神经回路的稳定性起着重要作用^[50, 51, 53]。其与学习记忆功能也有密切相关, 在海马中的表达随年龄的增

长而增加^[53]。此外，新近报道显示，PirB 加重脑缺血后的脑损伤，通过敲除 PirB，能够减少脑缺血后梗死容积，促进运动功能的恢复^[23]。还有报道指出，PirB 可以限制发育期大鼠脑缺氧缺血后轴突的再生，并提示可能与 Rho-ROCK 信号相关^[52]。我们前期的研究表明，在 MCAO 模型中，PirB 在损伤区高表达，提示 PirB 受体是治疗脑缺血损失的一个关键靶点^[50]，推测，PirB 的上调极有可能是阻碍脑缺血后中枢神经再生和功能恢复的重要原因。以上提示我们：提示以 PirB 为靶点，阻断 PirB 与其配体分子之间的相互作用，是实现脑缺血模型动物神经元的保护和促进轴突生长有效治疗策略，是研发治疗 CNS 损伤药物的一个新思路，为临床上促进神经功能恢复提供了新的治疗靶点，对治疗缺血性脑损伤具有显著的创新性研究意义。然而，PirB 在脑缺血损伤过程中介导轴突生长抑制和神经元死亡的作用亟待进一步研究，相关的分子机制还不清楚，需深入探讨。

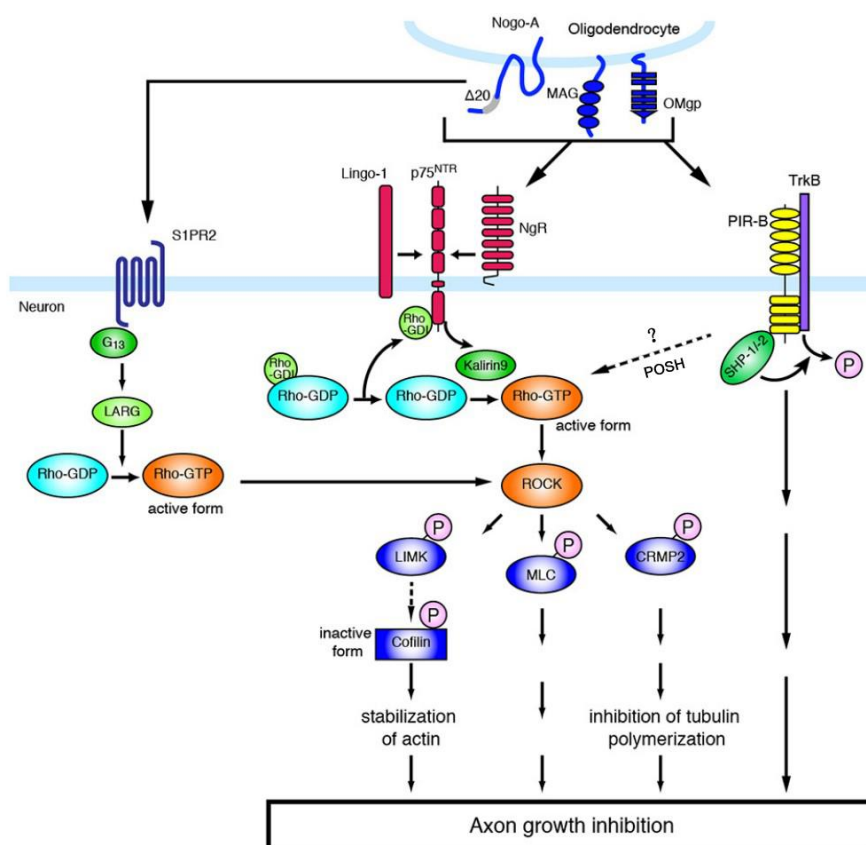


图0-3 Nogo-66、MAG和OMgp与NgR1及PirB结合后活化Rho/ROCK信号通路。
(Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system, 2014)

2.4 PirB 基因及蛋白的表达及分布

PirB 基因 (*pirb*) 定位于 7 号染色体的近端^[54, 55]。而与其直接同源的人 LILRB2 基因则定位于 13 号染色体长臂 13.3-13.4。大鼠的 PirB 基因的胞外段由编码 6 个免疫球样结构域组成。人类由于 LILR 的亚类较多, 故编码 LILR 的基因则长短不一。PirB 蛋白是一种 I 型跨膜糖蛋白, 主要由具有 6 个免疫球样结构域 (Igs) (从 N 端至 C 端, 分别命名为 D1-D6) 的胞外段, 疏水的跨膜段以及具有 3 个基于免疫受体的酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和 1 个基于免疫受体的酪氨酸抑制基序样结构域的胞内段构成^[56, 57]。PirB 的理论分子量 (约 100 KDa) 与实际检测分子量 (约为 130 KDa) 有一定差距, 表明了 PirB 确实具有一定程度的糖基化修饰^[58]。表面等离子体 (SPR) 分析 PirB 胞外段除了可于主要组织相容性复合体 I (MHC I) 结合, 还与 Nogo-A, MAG 等有很好的结合和反应, 信号通过跨膜段传至具有 ITIM 的胞内段, 在胞内募集具有 SHP-1/SHP-2 结构域的接头蛋白, 进而启动下游信号途径, 发挥作用^[59]。

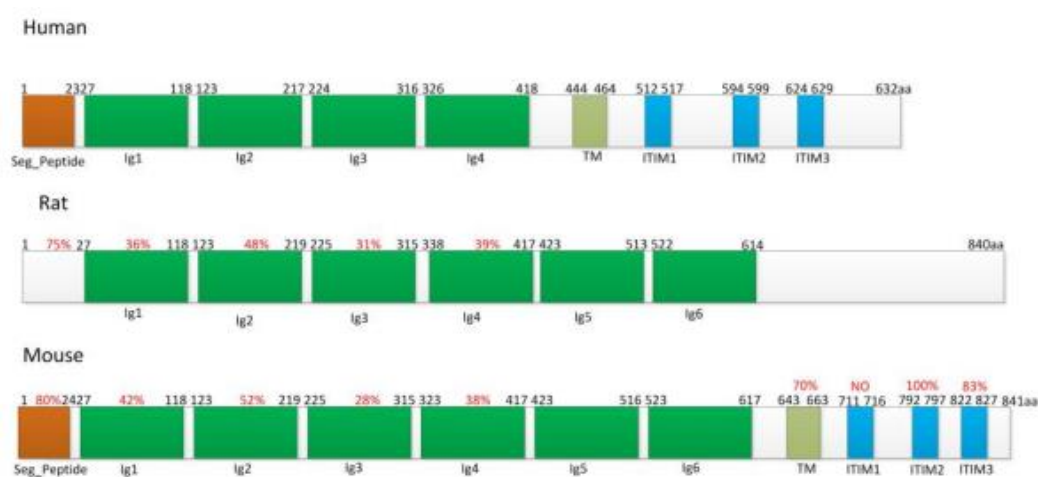


图 0-4 不同种属 PirB 蛋白结构

PirB 不仅可以在免疫系统的 B 细胞、巨噬细胞、树突细胞等表达^[60], 还主要在中枢神经系统中表达。最近的研究发现在, 大脑皮层神经元, 海马神经元和嗅球神经元中都有 PirB 的表达^[57, 61-64], 但在成年脊椎动物的脊髓中却未能发现 PirB 的表达^[63, 64]。研究进一步发现, PirB 在中枢神经系统受到损伤后其表达量显著上调^[50, 57]。脂多糖 (LPS) 诱导 CNS 炎症反应, 发现海马和皮层神经元的 PirB 表达明显增多^[58]。在 MCAO 模型中, 发现再灌注后损伤区 PirB 表达明显增多, 利用 *pirb* 基因敲除的转基因动物 MCAO 模型进一步发现, 与 *pirb* 野生型小鼠相比, 皮层损失区内 PirB

表达明显下调，脑梗死容积也明显较少，这种 PirB 缺失也有利于实验动物神经功能的恢复^[23]。我们新近研究中也证实，C57BL/6 小鼠 MCAO 后，缺血损伤区内 *pirb* mRNA 的含量缺血 2 h 后就开始增加，在缺血 24 h 后达到峰值，并且会一直持续一周的时间。而 PirB 蛋白的表达量也再灌注后 2-7 h 有增加^[50]。然而大鼠 MCAO 模型中，再灌注后半暗带 PirB 的表达情况还鲜有报道，特别是在缺血再灌注后其长时程的表达情况还尚未阐明，这是本课题要重点解决的一个关键科学问题。

2.5 PirB 表达在中枢神经系统中的作用及功能

现有研究表明，在生理条件下，PirB 具有稳固成年动物神经网络和巩固其运动学习的能力^[23]。在病理生理条件下，PirB 对 CNS 轴突再生，突触可塑性维持及神经元存活等方面都扮演“反面角色”^[65]。Atwal 等发现，应用体外 PirB 特异性抗体封闭 Nogo-A 等三种髓磷脂抑制，可以显著促进轴突生长，减轻生长锥崩溃瓦解^[45]。通过 RNAi 干扰技术，下调皮层神经元 PirB 表达，可明显促进神经元氧糖剥夺后轴突生长^[52]，对神经元进行 PirB 抗体处理也有类似作用^[51]。在体研究中，利用视神经损伤模型发现，*pirb* 基因敲除的小鼠其视觉功能得到明显恢复，说明 *pirb* 的缺失有利于损伤后突触可塑性的加强^[66]。Adelson 等^[58]新近研究发现，MCAO 后 *pirb* 基因敲除的小鼠脑梗死容积明显减小，海马神经元损伤明显减轻，皮质脊髓束的重建得到明显加强，突触可塑性得到较好恢复。然而，Adelson 等研究不同，Nakamura 等^[84]报道，*pirb* 基因敲除的小鼠并没有出现较好的皮质脊髓束重建，神经功能也没有得到明显恢复。这可能是由于他们所使用的转基因动物模型及研究手段不同而造成的结果差异。上述研究及分析提示：**PirB 在 CNS 损伤过程中轴突再生，皮质脊髓束和突触可塑性重建，神经存活等多个方面扮演重要角色，但其作用和机制还需要进一步深入探讨和阐明，希望为临床治疗 CNS 损伤，特别是脑缺血再灌注损伤提供新的靶点和理论依据。**

新近研究还发现，PirB 是低聚 A β 的高亲和性受体^[67]。2013 年 9 月 Taeho Kim 进一步的研究发现，PirB 是 A β 低聚物的高亲和受体，参与调节 AD 的突触可塑性^[68]。在 Taeho Kim 的研究中发现 *pirb* 敲除小鼠比野生型小鼠培养的皮层神经元少结合 50% 可溶性低聚 A β ，从而证明 PirB 对低聚 A β 具有极高的亲和力。APP/PS1(*pirb*+/-Tg) 转基因小鼠少年期(P30)海马突触体 cofilin 的丝氨酸磷酸化与正常相比下降了 40%，成年鼠(P200)同样。敲除 PirB 可使 cofilin 恢复至正常水平。培养皮层神经元加入 A β

会一贯性的激活 cofilin (处理 1 小时, 25%磷酸化与野生型相比), 同样导致突触后蛋白 PSD-95 (23%) 的丢失。这些变化在敲除 PirB 的小鼠并不出现。实验表明, PirB 与 β -淀粉样蛋白结合可能触发一连串有害反应, 导致突触破坏。这些新研究结果揭示了 β -淀粉样蛋白和 PirB 相关蛋白之间的直接相互作用, 为探讨新的阿尔茨海默症药物靶点带来了新的曙光, 阻断 A β 与 PirB 的结合可能成为更为有效的增强突触可塑性的方法。A β 与 PirB 的结合后通过什么机制损害突触可塑性, Taeho Kim 认为 PirB 受体可能直接作用于 A β 介导的突触毒性和 cofilin 或蛋白磷酸酶通路: A β 低聚物结合 PirB 可能招募 cofilin 信号组分, 促进肌动蛋白解聚, 导致突触丢失 (PSD-95), 最终导致突触可塑性变化和认知功能障碍。

2.6 PirB 受体导致轴突再生抑制和神经元损伤的作用机制亟待进一步探索和阐明

对于神经抑制因子通过 PirB 受体发挥神经轴突抑制作用的机制还不是十分清楚。以往研究表明, NogoA、MAG、Omgp 与 NgR1 受体复合物结合后, 起到下游的 Rho-A/ROCK 信号途径, 导致生长锥的崩溃, 抑制轴突再生^[25]。同时, 还有研究证实, Rho-A/ROCK 信号通路的抑制, 有利于脑缺血再灌注损伤后模型动物神经功能的恢复。基因水平抑制 NogoA-NgR1 表达或者蛋白水平拮抗其功能, 可以减少 Rho-A/ROCK 活化, 促进 MCAO 后模型动物神经功能的恢复^[69]。由于 PirB 受体与 NogoA、MAG、Omgp 有很强的亲和力, 并且与它们结合后, 导致轴突生长抑制; 还有报道指出, PirB 可以限制发育期大鼠脑缺氧缺血后轴突的生长, 并提示可能与 Rho-ROCK 信号通路相关^[52, 70]。2010 年, Schwab ME 发表评论指出, NEP1-40 作为 NgR1 竞争性拮抗剂阻断 NgR1 后, 可促进轴突生长和调控神经元可塑性, 其主要机制是通过抑制下游 Rho-A/Rho 激酶 (ROCK) 信号通路而发挥作用^[5]。髓磷脂因子是如何通过 PirB 信号通路抑制轴突再生的, 目前还不十分清楚。Taylor J 等证实^[18], 支架蛋白 POSH 通过与肌动-肌球蛋白结合形成抑制复合物, 可以显著抑制轴突生长。Heather M. Dickson 等^[19]进一步研究发现, 来自少突胶质细胞或神经元的 Nogo-A 等髓鞘抑制因子, 可使 POSH 信号通路中 POSH/ Shroom3/ROCK 信号通路活化, 使肌球蛋白 Myosin IIA 表达减少, 导致轴突生长抑制。通过 RNAi 方法, 干涉 Nogo-A, PirB 或 POSH, 可以抑制下游分子 Shroom3/ROCK 的活化, 逆转其轴突生长的抑制作用。Rona G. Giffard 等研究进一步证实 PirB/POSH 信号通路在脑缺血再灌注损伤

中抑制轴突生长的作用^[71]。这些研究提示，POSH/ROCK 信号途径在 PirB 介导的轴突再生抑制作用中具有重要作用。

还有报道显示，NogoA、MAG、Omgp 与 NgR1 受体复合物结合后，亦可激活 PTEN，从而抑制 mTOR 及 mTOR 磷酸化（p-mTOR），抑制细胞的生长及存活。而 mTOR（mammalian target of Rapamycin, mTOR）是一种存在于哺乳动物细胞中的 Ser/Thr 激酶，广泛参与细胞的生存、分化过程，而大量的研究表明，抑制 mTOR 的活性可以诱导细胞的自噬性细胞死亡^[71, 72]。因此，我们推测，mTOR 参与了 PirB 介导的神经元损伤作用。

此外，研究表明脑缺血半暗带内神经元损伤主要与凋亡密不可分，其机制之一是线粒体相关的凋亡蛋白的表达变化和作用^[73]。脑缺血再灌注损伤可影响线粒体结构和功能，导致其释放细胞色素 C，其可与凋亡蛋白结合成“凋亡复合体”，相继激活胱天蛋白酶-9（Caspase-9）和胱天蛋白酶-3（Caspase-3），激活的 Caspase-3 切割 DNA 修复酶，从而导致 DNA 损伤及细胞凋亡（参考文献）。我们前期研究和他人报道证实，NEP1-40、Pep4 阻断 NgR 受体可以抑制运动神经的死亡，对神经元具有保护作用；可以减少 MCAO 后脑梗死容积，促进神经功能恢复。那么，PirB 是否通过上述凋亡信号途径加重缺血再灌注后神经元损伤呢？目前还鲜有报道。

3. 表达 PirB 受体可溶性胞外段来拮抗 PirB 受体的功能，为治疗缺血性脑损伤提供新的治疗手段和潜在的临床应用价值

研究功能分子的手段之一可通过基因水平的处理，来探讨该分子的作用，然而，这种方法不易用于人体疾病的治疗，与临床转化的要求还相距甚远。此外，由于抗体制备较为复杂，且往往只能针对一个或几个抗原表位发挥作用，并不能充分阻断靶分子功能，特别是针对 Nogo-A，MAG 等分子的抗体特异性一直存在争议。因此，通过表达某分子的功能段来制备具有拮抗作用的可溶性蛋白，就显得格外重要，具有显著的应用价值。2008 年《PNAS》报道，利用 Nogo66 的截断肽 NEP1-40、Pep4 阻断 NgR 受体可以抑制运动神经的死亡，对神经元具有保护作用^[74]。我们的前期研究也表明，TAT-NEP1-40 能显著减少大鼠 MCAO 缺血模型脑梗死容积，抑制神经元的凋亡，促进神经突生长，对脑缺血损伤具有保护作用，同时也进一步揭示了 NgR1 的功能^[41, 75]。

SPR 分析配对 PirB 胞外段与配体的结合能力时发现, PirB 胞外段可以与 Nogo-A 和 MAG 结合, 并提示也可以与 OMgp 结合。这为我们通过制备含有 PirB 胞外段的新型融合蛋白, 在蛋白质水平阻碍 PirB 与三种抑制因子的反应提供了坚实的理论基础。本课题组也围绕 PirB 受体的研究, 开展了一系列实验进展, 受 J Drug Target 杂志的邀请撰写了题为《PirB is a novel potential therapeutic target for enhancing axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury in mammals》的 review 已经在线发表。综上所述, 我们认为将 PirB 作为治疗脑损伤后神经再生的靶标具有重要的理论意义, 同时也能为临床研究开辟新的道路。

4. 转录反式激活因子 (TAT) 蛋白转导域为大分子蛋白质药物穿过血脑屏障提供了有效的方法

由于血脑屏障的存在, 蛋白类大分子较难通过, 影响了其在脑组织的分布和作用的发挥, 从而影响了此类药物的研究与发展。蛋白转导技术可以引导生物大分子有效穿过血脑屏障, 其转导效率很高, 不破坏细胞膜和血脑屏障, 而且对宿主细胞几乎没有毒性^[76], 是一种比较成熟和应用广泛的技术。研究已经证明 I 型免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的转录反式激活因子 (Trans-activator of transcription, TAT) 的蛋白转导域, 可以将 15kDa-120 kDa 的不同生物大分子导入细胞^{[79] [80]}。目前, TAT 蛋白转导技术已经成功将 GDNF, Neuroglobin 等功能蛋白转导进入脑组织和神经元^[81, 82]。我们前期研究中也证实, TAT 可以引导生物大分子如 NEP1-40, LBD-NgN2 通过血脑屏障, 分布于缺血损伤区发挥作用, 而对组织和细胞没有损伤^[83]。因此, TAT 融合蛋白系统被认为是一种有效的运载工具, 为蛋白质研究和临床应用带来了新的曙光。

基于以上文献回顾, 我们创新性的提出了以下科学问题:

1. PirB 在皮层半暗带内高表达是脑缺血再灌注损伤后轴突再生困难, 突触可塑性下降及神经元损伤的一个重要原因, 并为脑卒中的临床治疗提供了新的靶点。
2. 含有 PirB 胞外段的新型融合蛋白 TAT-PEP, 可阻碍 Nogo-A, MAG, OMgp 与 PirB 的相互作用, 削弱 PirB 功能, 并为脑卒中的临床治疗提供了新的策略。
3. TAT-PEP 可通过干预 PirB 下游的 POSH/ROCK/GAP43 信号通路, 促进 MCAO 后半暗带内轴突再生, 突触可塑性恢复和皮质脊髓束的重塑, 从而发挥改善神经功

能特别是长时程运动、学习及记忆功能，发挥神经保护作用。

4. TAT-PEP 通过抑制 Bax 表达，促进 Bcl-2 表达，导致线粒体相关的 Caspase-3 的激活，减轻缺血再灌注后神经元凋亡。

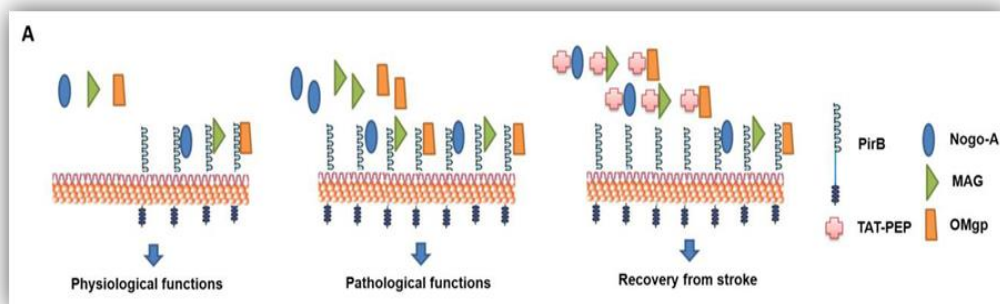


图 0-5 本课题的科学假说图示

基于以上分析，我们拟在已有的基础上，首先明确 Nogo-A，MAG，OMgp 和 PirB 在 MCAO 模型皮层半暗带内长时程的表达变化；通过构建 GPH-PIRB-294 慢病毒系统干涉 PirB 表达，观察抑制 PirB 表达对神经元氧糖剥夺后轴突生长及存活的作用。在此基础上，制备新型可溶性融合蛋白 TAT-PEP，并对其生物学活性进行鉴定。通过 MRI 成像技术多种神经行为学方法研究，评价 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤后脑梗死容积和神经功能恢复的作用。通过顺行神经示踪技术、多重 IFHC、活细胞工作站、神经电生理、WB 等观察 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤后轴突再生、皮质脊髓束和突触可塑性重塑的作用，并阐明相关机制。最后，通过体内外实验进一步分析 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤后神经元变性和凋亡的作用，并探讨相关机制。以期脑缺血再灌注损伤后的治疗提供新的靶点和新的策略，为 TAT-PEP 可能的临床应用提供理论依据和实验基础。

正文

第一部分 SD 大鼠 MCAO 模型半暗带内 MAG, OMgp, Nogo-A 及其受体 PirB 长时程表达变化

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD (Sprague Dawley) 大鼠, 体重约 280 g, 购自第四军医大学实验动物中心。实验过程做到善待实验动物, 饲养、手术、给药处理及取材等环节均严格按照第四军医大学动物实验动物管理相关规定, 并遵守 National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications number 80-23, revised in 1996)。

1.2 主要仪器

1. 脑血流监测仪, Perimed公司, 瑞典
2. 冰冻切片机, Leica公司, 德国
3. 啮齿动物断头器, 上海博通公司, 中国
4. PH计, Beckman Coulter公司, 美国
5. 激光共聚焦荧光显微镜, Olympus公司, 日本
6. Mili-Q50纯水器, Millipore公司, 美国
7. 蛋白电泳仪, BIO-RAD公司, 美国
8. 电泳槽, BIO-RAD公司, 美国
9. 多功能摇床, LAB-LINE公司, 美国
10. 凝胶成像系统, Alpha 公司, 美国

11. 倒置显微镜, Olympus公司, 日本
12. -80℃超低温冰箱, Thermo Forma公司, 美国
13. 制冰机, 三洋电子有限公司, 日本
14. 高压蒸汽消毒锅, 苏州江东, 中国
15. 微量移液器, Eppendorf公司, 德国
16. 低温高速离心机, Heraeus公司, 德国

1.3 主要试剂

1. 兔抗Nogo-A多克隆抗体 (ab62024), Abcam, 美国
2. 兔抗MAG多克隆抗体 (ab203060), Abcam, 美国
3. 兔抗OMgp多克隆抗体 (ab96426), Abcam, 美国
4. 兔抗PirB(LILRB3)多克隆抗体 (ab82627), Abcam, 美国
5. 小鼠抗NeuN单克隆抗体 (ab104224), Abcam, 美国
6. 小鼠抗 β -actin单克隆抗体 (ab8226), Abcam, 美国
7. 羊抗兔FITC, Burlingame, 美国
8. HRP 标记的羊抗小鼠二抗, Pierce Biotechnology, 美国
9. 驴抗小鼠Alexa-594, Molecular Probes, 美国
10. HRP 标记的羊抗兔二抗, Pierce Biotechnology, 美国
11. BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天, 中国
12. 全蛋白提取试剂盒, KeyGEN, 中国
13. SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 碧云天, 中国
14. 戊巴比妥钠, 上海哈灵生物, 中国
15. 预染蛋白 Marker, Fermentas, 美国
16. 发光液, Thermo 公司, 美国
17. 主要试剂配制如下:

2×SDS 凝胶加样缓冲液配制

| | | |
|---|-----------|-------------------|
| { | 100mmol/L | Tris · Cl (Ph6.8) |
| | 200mmol/L | 二硫苏糖醇 (DTT) |
| | 4% | SDS (电泳级) |
| | 0.2% | 溴酚蓝 |
| | 20% | 甘油 |

1×蛋白电泳缓冲液配制

| | | |
|---|----------------|-----------|
| { | 18.8g | 甘氨酸 |
| | 3.02g | Tris-base |
| | 1g | SDS (电泳级) |
| | 加去离子水 至 1000ml | |

1×转移缓冲液配制

| | | |
|---|----------------|-----------|
| { | 2.9g | 甘氨酸 |
| | 5.8g | Tris-base |
| | 0.37g | SDS (电泳级) |
| | 200ml | 甲醇 |
| | 加去离子水 至 1000ml | |

1×TBST

| | | |
|---|----------------------------|-----------|
| { | 8g | Nacl |
| | 0.2g | Kcl |
| | 3g | Tris-base |
| | Tween | 0.5ml |
| | 加去离子水 至 1000ml(调 pH 至 7.4) | |

2 方法

2.1 局灶性脑缺血再灌注模型制作

MCAO 模型操作方法已较为成熟，参考赵昱博士毕业论文(??)，简要过程如下：

- ① 腹腔注射 10g/L 戊巴比妥钠进行麻醉；
- ② SD 大鼠颈部皮肤备皮，常规消毒，在颈部正中线位置纵向剪开约 2 cm 小口，暴露并结扎颈外动脉和颈总动脉。
- ③ 将 3-0 尼龙线栓处理后，插入颈内动脉至有碍感，夹闭该动脉，并固定线栓。
- ④ 大脑中动脉血流阻闭 120 min 后拔出颈内动脉的线栓约 5 mm，恢复血流灌注，之后缝合切口，消毒，放保温箱中待大鼠苏醒。

2.2 动脉血压及脑血流监测

采用股动脉插管监测法，简要过程如下：

- ① 暴露大鼠右腿根部股动脉，并造口，结扎。
- ② 插入肝素已处理的动脉插管。
- ③ 连接着压力换能器。
- ④ 调整插管，观察股动脉波形，判断插管是否成功，记录模型前后动脉血压变化，并进行比较。

接下来，利用检测大脑血流变化，评估 MCAO 模型的制备情况。简要操作如下：

- ① 暴露大鼠头部前凶门点（Bregma 点）和人字缝，标记 Bregma 点。
- ② 距 Bregma 点后 2mm，旁开 2mm 左右的位置通过脑立体定向仪定位，并钻孔标记，固定光纤探头于钻孔点处，监测基础脑血流值。
- ③ MCAO 模型制备成功的标准为：A，阻断血流后，脑血流值不足基础值 20%；再灌注后超过基础值 50%以上。B，左侧肢体疼痛回缩刺激迟钝或消失；C，提鼠尾使其倒悬时，左前肢向前下伸展不利或消失；D，行走时身体向左侧偏倒或向左原地转圈。

2.3 实验动物脑组织取材及蛋白提取、定量

实验分组：Western blot 实验中，实验动物随机分为七组 (n=6)，即 Before MCAO 组，post-MCAO 1 d 组，post-MCAO 3 d 组，post-MCAO 7 d 组，post-MCAO 14 d 组，

post-MCAO 21 d组, post-MCAO 28 d组。

实验动物脑组织取材及蛋白提取、定量方法如下：

① SD 大鼠 MCAO 模型制备成功后，在 MCAO 前，以及再灌注后第 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时分别用啮齿动物断头器进行活体断头，迅速去除颅骨，去除完整大脑，剥离脑膜。

② 选取大脑皮层半暗带组织（如图）。

③ 随后将脑组织进行称重，按 1ml/100mg 比例向匀浆器中加入预冷的蛋白提取液，将脑组织放入其中并进行充分匀浆后，在冰面放置 15 min，至 EP 管中，12000 rpm，4℃ 离心 10 min，小心吸取上清液，即蛋白提取物。-80℃ 冰箱备用。

④ 用 BCA 法测定蛋白提取物的浓度。

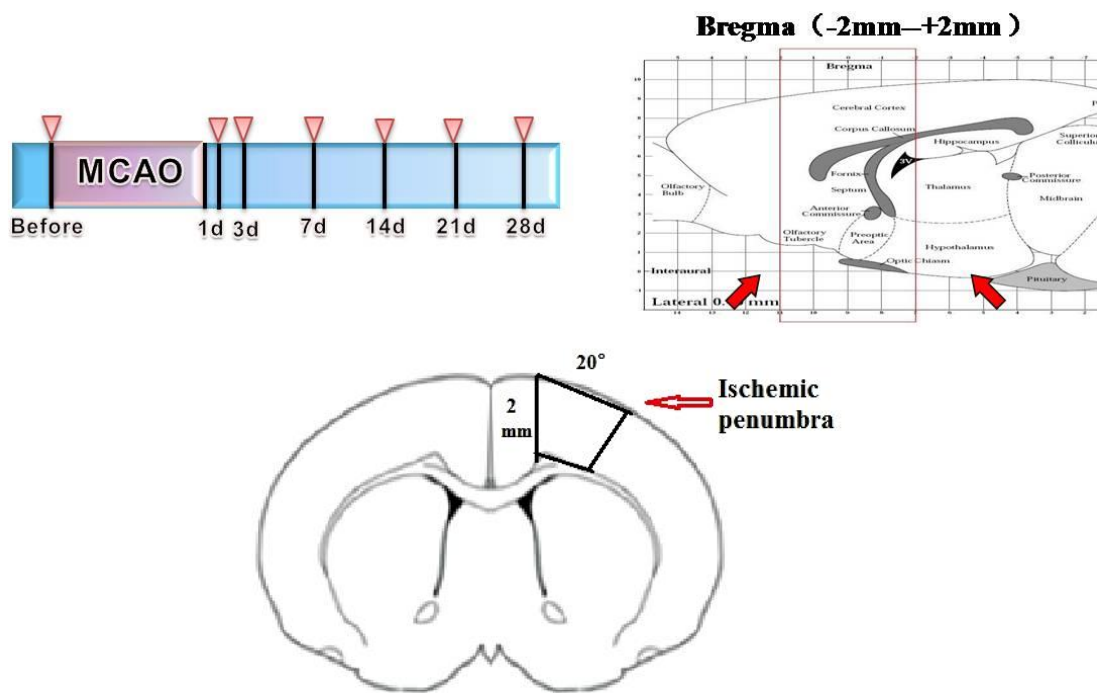


图 1-1 A 为实验取材的不同时间点示意图。B, C 为大脑皮层半暗带组织示意图。距 Bregma 点前后各约 2 mm，共约 4 mm；距冠状面中线旁开 2 mm，并呈 20°角度的楔形组织块。

2.4 Western Blot

① 将每个样品按照 80 μ l 样本加入 20 μ l 5×上样缓冲液 (loading buffer)，充分混

匀，在沸水中煮 10 min 至变性蛋白，并用注射器轻轻吹吸几次，-20℃冰箱备用。

② 根据 Nogo-A, MAG, OMgp, PirB 及 β -actin 分子量，分别配制 6%，8%和 10%SDS-PAGE 凝胶。每个孔道上样量为 50 μ g，并于两侧边缘孔道加入蛋白 Marker，以示标记。120 V 恒压电泳（不同分子量的蛋白电泳时间略有不同）。根据分子量选择湿转（120 min）或者半干转（40 min），之后转至 0.45 μ m 孔径 PVDF 膜上。

③ 转膜后进行封闭室温封闭 1 h，一抗（Nogo-A, 1:1000; MAG, 1:2000; OMgp, 1:2000; PirB, 1:2000; β -actin 1:5000）4℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次（8 min/次）后，入二抗即 HRP 标记的羊抗小鼠二抗（1: 3000）和 HRP 标记的羊抗兔二抗（1: 1000），室温二抗从处理 2 h 后，洗膜（3 次，10 min/次）。

④ ECL 化学发光液发光，并呈像（Alpha Innotech），显影后，对条带灰度进行分析，半定量分析目的蛋白表达情况（目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值）。

2.5 免疫荧光组织化学染色

实验分组：免疫荧光组织化学染色实验中，实验动物随机分为Sham组和MCAO组（n=6）。脑组织灌注固定、取材及冰冻切片的简要方法如下：

① 经 10 g/L 戊巴比妥钠麻醉，暴露心脏，显露升主动脉。

② 经心脏灌注固定。150 ml 温生理盐水快灌，之后用预冷的 4%多聚甲醛（Paraformaldehyde, PFA）400 ml 持续灌注，固定（先 200 ml 快速灌注后改为慢速灌注）。

③ 灌注结束后，剥离颅骨，取出完整大脑，再用 4%PFA 后固定 2 h。换用 20%，30%蔗糖梯度脱水，皮层半暗带取材后，行冰冻切片，厚约 16 μ m，-20℃冰箱备用。

④ 为明确PirB在缺血半暗带组织及细胞的表达情况，行PirB与NeuN（神经元细胞标记物）免疫荧光组织化学双标记染色。具体步骤为：取MCAO后第28 d时的冰冻切片，晾置玻片30 min（室温），用画圈笔圈好组织周围，用0.01M PBS溶液轻轻漂洗切片（5 min每次×3次）后，加入抗原封闭液于湿盒中室温进行封闭1 h（3 ml/L tritonX100+10 g/L胎牛血清白蛋白），弃去封闭液，入一抗（PirB, 1:100; NeuN, 1:5000），4℃过夜，0.01M PBS溶液漂洗（5 min每次×3次），入二抗（羊抗兔FITC, 1:5000; 驴抗小鼠Alexa-594, 1:1000），避光室温孵育2 h，避光漂洗3次，50%甘油

封片后Olympus BX60荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 统计学分析方法

应用 Image-Pro plus 5.1 软件分析。计量资料用均数±标准误 (mean±SM) 表示, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对差异进行统计分析, 使用 SNK (Student-Newman-Keuls) 检验进行组间两两比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.7 实验技术路线图

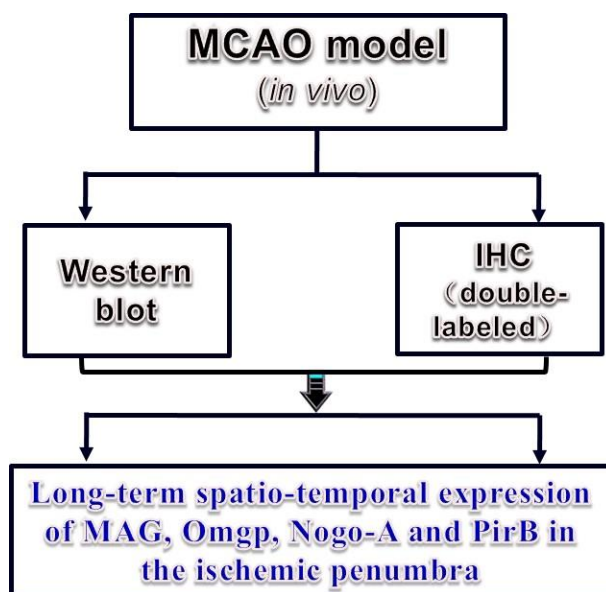


图1-2 本部分技术路线图

3 结果

3.1 MCAO 模型制备过程中的生理学参数

监测结果显示: 阻断血流后, MCAO 组血流值不足基础值的 20%; 再灌注后, MCAO 组血流值超过基础值 60%, 表明 MCAO 模型制备成功。见表 1。

表 1-1 生理学参数 ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | 线栓置入前 | | 线栓置入后 | | 线栓拔出后 | |
|---------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | MAP (mmHg) | CBF (PU) | MAP(mmHg) | CBF (PU) | MAP (mmHg) | CBF (PU) |
| Sham 组 (n=12) | 114.2±6.2 | 238.6±8.5 | 108.5±6.5 | 250.0±7.5 | 115.2±7.8 | 246.2±7.5 |

3.2 MAG, OMgp 及 Nogo-A 在大鼠 MCAO 模型皮层半暗带内的长时程表达变化。

MCAO 模型制备成功后, 利用 Western blot 分析缺血半暗带中内 MAG, OMgp 及 Nogo-A 的长时程表达变化, 结果显示: 与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 MAG 表达明显增加 ($p<0.05$)。缺血再灌注后第 1 d 时 MAG 表达略有下调, 但与 before-MCAO 组相比没有统计学意义 ($p>0.05$)。缺血再灌注后第 21 d 时 MAG 表达水平最高, 28 d 时略有下调。与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 OMgp 表达明显增加 ($p<0.05$)。缺血再灌注后第 7 d 时 OMgp 表达下调, 但随着时间的推移其表达水平又继续上调。与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 Nogo-A 表达明显增加 ($p<0.05$)。缺血再灌注后第 28 d 时 Nogo-A 表达水平最高。这些结果表明, 虽然三种抑制因子在缺血半暗带内各时间点表达水平不尽相同, 但从整个趋势看, 在 MCAO 3 d 后表达都明显高于造模前的水平, 说明这三种抑制因子在脑缺血再灌注损伤的病理生理过程中扮演重要角色。

图1-3 MAG, OMgp, Nogo-A在SD大鼠大脑皮层半暗带内的表达变化 (n=6, 每组)。A, B, D为Western blot检测MAG, OMgp, Nogo-A在MCAO前及MCAO后1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d时SD大鼠皮层半暗带内表达的蛋白条带图。C, E为MAG, OMgp, Nogo-A在MCAO前及MCAO后1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d时SD大鼠皮层半暗带内蛋白表达的线状统计分析图 (* $P<0.05$ vs. before-MCAO组)。

3.3 PirB 在大鼠 MCAO 模型皮层半暗带内的时空表达变化。

MCAO 模型制备成功后, 利用 Western blot 分析缺血半暗带中内 PirB 的时空表达变化, 结果显示: 与 before-MCAO 组相比, 缺血再灌注后第 1 d、3 d、7 d、14 d、

21 d 和 28 d 时的各组实验动物皮层半暗带内 PirB 蛋白表达明显增加 ($p<0.05$)。缺血再灌注后第 7 d 时 PirB 表达略有下调,但随着时间的推移其表达水平又持续上调。双重荧光免疫组化染色显示,与 before-MCAO 组相比,缺血再灌注后 28 d 时实验动物皮层半暗带内 NeuN 的荧光密度显著减少 ($p<0.05$), PirB 荧光密度显著增强 ($p<0.05$),且与 NeuN 呈现双标记,提示在缺血再灌注后 28 d 时实验动物皮层半暗带内神经元 PirB 表达显著增加。上述结果说明,皮层半暗带内神经元 PirB 在脑缺血再灌注损伤后轴突再生、神经元存活和神经功能恢复过程中可能发挥重要作用。

图1-4 PirB在SD大鼠大脑皮层半暗带内的表达变化 (n=6, 每组)。A, B, D为 Western blot检测PirB在MCAO前及MCAO后1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d时SD大鼠皮层半暗带内表达的蛋白条带图。B为PirB在MCAO前及MCAO后1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d时SD大鼠皮层半暗带内蛋白表达的线状统计分析图 (* $P<0.05$ vs. before-MCAO组)。C为MCAO后28 d时皮层半暗带内NeuN (红色)和PirB (绿色)的免疫荧光双标 (黄色)染色,如箭头所示, Bar=50 μm 。D: PirB蛋白表达的半定量统计结果。(* $P<0.05$ vs. before-MCAO组)。E为Nissl染色切片,方框代表观察区域。

4 讨论

脑缺血再灌注损伤为脑中风、脑创伤、脑肿瘤等很多疾病的最根本病理生理学基础,如何减轻缺血性脑损伤为近年来神经科学领域的研究热点。**缺血性脑卒中的病理生理过程:**急性脑卒中发生后,在缺血中心区往往引起不可逆的损伤,而在缺血中心区周围,损伤的脑组织是具有一定恢复和修复能力的,这部分可以被“挽救”的脑组织称为缺血半暗带 (Ischemic penumbra, IP)。据 Nagasawa 等^[9]报道额叶皮层区 1 (frontal cortex area 1, Fr1) 和尾壳核室下区 (subventricular zone, SVZ) 被定义为 MCAO 模型的 IP 区^[11]。Astrup 等^[10]认为 IP 区内脑组织的损害与恢复呈动态变化,具有一定程度的可逆性,是治疗缺血性脑血管病竭力挽救的区域,也成为临床治疗脑卒中的关键区域。

大量动物实验证实，MCAO 模型中，脑梗死容积在再灌注几个小时内迅速形成。对于体重为 300 g 大鼠，栓塞 2 h 可以形成 400-450 mm³ 的梗死容积^[13]，栓塞 90 min 可以形成 250-380 mm³ 的梗死容积^[14]，栓塞 60 min 可以形成约 170 mm³ 的梗死容积，这 170 mm³ 的梗死容积内的脑组织（特别是神经元及其轴突）发生不可逆的损伤。与此同时，栓塞 60 min 可以导致梗死区周围约 230 mm³ 的脑组织损伤，这其中的 140 mm³ 的脑组织在 30 min 内会死亡，剩下的 90 mm³ 的脑组织在 60 min 内会死亡。大量研究已经说明，脑缺血再灌注损伤后神经元非常敏感，最易损伤^[16]。Bolander 等^[17]发现，对于啮齿类动物，当血流量减少至 25ml/100g/minute 时，可以导致大量神经元死亡。本实验中，我们制备的 SD 大鼠 MCAO 模型是通过大脑中动脉血流阻断 120 min 后拔出颈内动脉的线栓。线栓置入后 MCAO 组脑血流值下降超过基础脑血流值 80%，在术后通过行为学观察，确认 MCAO 模型制备成功《? 文献》。该方法在我们前期实验中已经大量应用，能够保证 MCAO 模型制备的成功率。

多项研究表明：Nogo-A、MAG、OMgp 三种因子在脑缺氧缺血损伤、脊髓损伤、癫痫疾病、阿尔海默氏病、自身免疫性脱髓鞘疾病、以及 CNS 神经发生过程中扮演着重要的角色^[25]。然而三种抑制因子在 MCAO 模型后半暗带内的表达情况还尚未阐明。本实验中我们观察到虽然三种抑制因子在缺血半暗带内各时间点表达水平不尽相同，但从整个趋势看，在 MCAO 3 d 后表达都明显高于造模前的水平，说明这三种抑制因子在脑缺血再灌注损伤的病理生理过程中发挥重要作用。

作为 Nogo-A、MAG、OMgp 的共受体 PirB，新近研究发现其在脑缺血再灌注损伤过程中，对神经元的存活，皮质脊髓束生长和突触可塑性方面发挥重要作用，这为临床上促进脑缺血损伤后神经元存活，轴突再生和神经功能恢复提供了一个新的治疗靶点。PirB 蛋白是为 I 型跨膜糖蛋白，主要由 6 个免疫球蛋白样结构域（Igs）（N 端至 C 端，分别命名为 D1-D6）的胞外段，1 个疏水的跨膜段以及 1 个基于免疫受体的酪氨酸抑制基序样结构域和 3 个基于免疫受体的酪氨酸抑制基序（ITIM）的胞内段构成 [24, 32 苟钊]。Atwal 等较先报道了 PirB 在轴突再生方面的作用，并且认为其与 Nogo-A、MAG、OMgp 具有很高的亲和力，能够与其结合，抑制轴突生长（? ?）；在利用转基因动物和脊髓损伤模型的研究中发现，基因敲除 PirB 比敲除 NgR1 更能够逆转长时程的轴突再生障碍，说明 PirB 与 NgR1 相比较，具有更强的抑制效应（? ?）。研究进一步显示，在阿尔海默氏并（Alzheimer's disease, AD）转基因动物

模型中，PirB 的高表达可引起突触可塑性下降，导致学习和记忆功能的缺失。新近研究报道，大鼠大脑中动脉闭塞（MCAO）模型中，大脑损伤（缺血）侧 PirB 的含量明显的高于健侧^[23]。我们课题组新近研究发现，在缺血再灌注过程中，PirB mRNA 的含量缺血 2 h 后就开始增加，在缺血 24 h 后达到峰值，并且会一直持续一周的时间。而 PirB 蛋白的表达量也再灌注后 2-7 h 有增加^[50]。然而大鼠 MCAO 模型中，再灌注后半暗带 PirB 的表达情况还鲜有报道，特别是在缺血再灌注后其长时程的表达情况还尚未阐明，这是本课题要重点解决的一个关键科学问题。

在本实验中，我们利用 Western blot 和免疫荧光组织化学双重染色方法，分析缺血半暗带中 PirB 的时空表达变化。研究发现，在灌注后 1 d, 3 d 时 PirB 表达显著上调，虽然第 7 d 时 PirB 表达略有下降，但随着时间的推移其表达水平又继续上调。双重荧光免疫组织化学染色进一步显示，PirB 与 NeuN 呈现明显的双标记，并且主要表达与神经元的胞浆和包膜上。小鼠 PirB 的分子量理论值为 92 kDa，然而 Western blot 检测却显示其分子量大约为 105 kDa [33 苟钊]。大鼠的 PirB 的分子量理论值为 ??? kDa，然而我们实验中发现其实际分子量大约为 ?? kDa，这种观测值与理论值之间的差异，说明 PirB 具有一定程度的糖基化修饰。此外，研究发现，成年脊椎动物的脊髓中却未能发现 PirB 表达[27, 38, 39]，但近年研究中发现，在中枢神经系统的皮层，海马，小脑和嗅球中则有 PirB 表达 [15, 26, 27, 32, 38]，且 PirB 的表达主要集中在神经元，特别是在中枢神经系统损伤后，其表达量显著上调，这与我们的研究相一致。上述结果说明，皮层半暗带内神经元 PirB 在脑缺血再灌注损伤后轴突再生、神经元存活和神经功能恢复过程中可能发挥重要作用。

5 小结

本部分实验我们通过制备 SD 大鼠 MCAO 模型，观察皮层半暗带内 Nogo-A、MAG、OMgp 和 PirB 长时程表达变化。结果显示，虽然 Nogo-A、MAG、OMgp 和 PirB 在缺血半暗带内各时间点表达水平不尽相同，但从整个趋势看，在 MCAO 3 d 后表达都明显高于造模前的水平，说明它们在脑缺血再灌注损伤的病理生理过程中发挥重要作用。特别是 PirB 的这种表达变化趋势，将为脑卒中的机制研究和防治策略研究提供新的思路和新的靶点，这也将是我们下一部分实验要研究和阐明的内容。

第二部分 抑制 PirB 表达对神经元氧糖剥夺后轴突生长及存活的作用

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠孕鼠 (E 16.5-18.5 d), 体重约 400 g, 购自地点同第一部分, 做到善待实验动物, 饲养、手术、给药处理及取材等环节均严格按照动物实验管理相关规定, 并遵守 National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications number 80-23, revised in 1996)。

1.2 主要仪器

1. CO₂ 恒温细胞培养箱, Hereaus公司, 德国
2. 低氧细胞培养箱, DWS公司, 英国
3. 制冰机, 三洋电子有限公司, 日本
4. 倒置显微镜, Olympus公司, 日本
5. 低温高速离心机, Eppendorf公司, 德国
6. 倒置显微镜, Olympus公司, 日本
7. 微量移液器, Eppendorf公司, 德国
8. 凝胶成像系统, Alpha 公司, 美国
9. Mili-Q50纯水器, Millipore公司, 美国
10. 数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司, 中国
11. 激光共聚焦荧光显微镜, Olympus公司, 日本
12. 倒置显微镜, Olympus公司, 日本
13. 超净工作台, 吴江净化设备总厂, 中国
14. 蛋白电泳仪, BIO-RAD公司, 美国

15. 电泳槽, BIO-RAD公司, 美国
16. 多功能摇床, LAB-LINE公司, 美国
17. PH计, Beckman Coulter公司, 美国
18. 各型培养板及培养皿, CORNING, 美国
19. 离心管, CORNING公司, 美国
20. -80℃超低温冰箱, Thermo Forma公司, 美国
21. 各型玻片, Fisher, 美国
22. 全自动酶标仪, Bio Rad公司, 美国
22. EP管, CORNING公司, 美国
23. 相差显微镜, Nikon公司, 日本
24. 细胞计数板, 南京裕安公司, 中国
25. 实时荧光定量PCR仪, Eppendorf公司, 德国
26. 精密电子天平, Sartorius公司, 美国

1.3 主要试剂

1. 多聚赖氨酸, Sigma公司, 美国
2. Neurobasal, Gibco公司, 美国
3. B27, Gibco公司, 美国
4. DMSO, Sigma公司, 美国
5. 青链霉素混合液(双抗), 美国 Hyclone 公司
6. 谷氨酰胺, 美国 Hyclone 公司
7. DMEM高糖培养基, Gibco公司, 美国
8. D-hanks 溶液, Sigma公司, 美国
9. MTT, Sigma公司, 美国
10. 胎牛血清, Gibco公司, 美国
11. TUNEL试剂盒, Roche公司, 德国
12. 全蛋白提取试剂盒, KeyGEN, 中国
13. 兔抗PirB(LILRB3)多克隆抗体 (ab82627), Abcam, 美国
14. 鸡抗GFP多克隆抗体 (ab13970), Abcam, 美国

15. HRP 标记的羊抗小鼠二抗, Pierce Biotechnology, 美国
16. 小鼠抗 β -actin单克隆抗体 (ab8226), Abcam, 美国
17. 兔抗 β III-tubulin多克隆抗体 (ab18207), Abcam, 美国
18. HRP 标记的羊抗鸡二抗, Pierce Biotechnology, 美国
19. 小鼠抗Tau单克隆抗体 (ab80579), Abcam, 美国
20. 驴抗小鼠Alexa-594, Molecular Probes, 美国
21. HRP 标记的羊抗兔二抗, Pierce Biotechnology, 美国
22. 胰蛋白酶, 沃尔森公司, 中国
23. BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天, 中国
24. 发光液, Thermo 公司, 美国
25. SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 碧云天, 中国
26. Lysis 裂解液, 碧云天, 中国
27. 预染蛋白 Marker, Fermentas, 美国
28. 慢病毒载系统:

慢病毒载体系统 (Tronolab) 该病毒包装系统为四质粒系统, 组成为 pRsv-REV, pMDlg-pRRE, pMD2G, Transfer Vector。其中慢病毒表达质粒 Transfer Vector 能表达绿色荧光蛋白 (GFP)。pRsv-REV, pMDlg-pRRE, pMD2G 含有病毒包装所必须的元件。细胞株为 293T (中科院上海细胞所, 中国), 其为慢病毒的包装细胞, 为贴壁依赖型成上皮样细胞, 生长培养基为 DMEM(含 10% FBS)。贴壁细胞经培养生长增殖形成单层细胞。菌株为大肠杆菌菌株 Stab13 (Invitroge 公司, 美国)。用于扩增慢病毒载体和辅助包装载体质粒。

30. 主要试剂配制: 同前

2. 方法

2.1 皮层神经元原代培养

① 取孕16.5-18.5 d (E 16.5-18.5 d) 的SD大鼠脱臼处死, 进行常规无菌消毒, 取出胎鼠, 分离鼠胚胎。

② 在准备好的D-Hank's溶液（置于冰上）中，用眼科无齿镊将胎鼠断头，仔细剥离，取出大脑组织，于显微镜下用眼科无齿镊剥离出皮层外的包膜，分离出大脑皮层，过D-Hank's液，组织乳糜化。之后胰蛋白酶（0.125%）消化15 min（37℃的正常孵箱中）。

③ 随后，将组织小心用弯头滴管吸出，加入含胎牛血清DMEM液的离心管（15 ml）中，在室温静置5 min中止消化。将离心管置于离心机中，80 rpm离心5 min后，小心弃上清，加入2 ml含胎牛血清DMEM液，反复吹打制组织，成细胞悬液，并用细胞过滤器（100 μm）过滤。再次80 rpm离心5 min后，加入神经元培养基中（Neurobasal A, 2% B27, 1% 谷氨酸和1% 青链霉素合剂）。

④ 根据实验要求以 1×10^6 或 1×10^5 或 5×10^4 cell/ml 的密度接种于L-多聚赖氨酸（50 mg/mL）包被的96孔板，24孔板或6孔板及培养皿中。

⑤ 随后将其置于正常培养箱内常规培养，第7 d进行鉴定，βIII-tubulin阳性神经元占90%以上方可使用。

2.2 神经元离体氧糖剥夺 (Oxygen glucose deprivation, OGD) 模型

① 原代培养的皮层神经元至第7 d 鉴定。

② 更换培养液（无糖无血清），放入低氧恒温培养箱（37℃，5%CO₂，95%N₂）中1 h。

③ 随后小心拿出培养皿或培养瓶，换正常神经元培养液（Neurobasal A, 2% B27, 1% 谷氨酸和1% 青链霉素合剂），置于正常培养箱（5% CO₂, 21% O₂, 37℃）中，培养24 h后进行后续实验。

④ OGD复氧复糖24 h后，转染GPH-PIRB-294，在OGD复氧复糖72 h时，分别检测神经元PirB表达，GFP表达，神经元轴突长度，神经元活力，LDH释放量和凋亡细胞数量。实验随机分为4组（n=6）：即Normal组，OGD组，OGD+control RNAi组和OGD+pirb RNAi组。

2.3 pirb 基因干扰靶点的慢病毒包装

pirb 基因干扰靶点的慢病毒包装和制备实验由上海英为信生物科技有限公司提供技术支持和实验指导。pirb 基因干涉的基因序列为 PirB-294, 5'-AACAAUACAGCGAUUUGCCC-3' [PMCID: PMC2963859]. 对照 shRNA 的序

列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。相关流程如下：

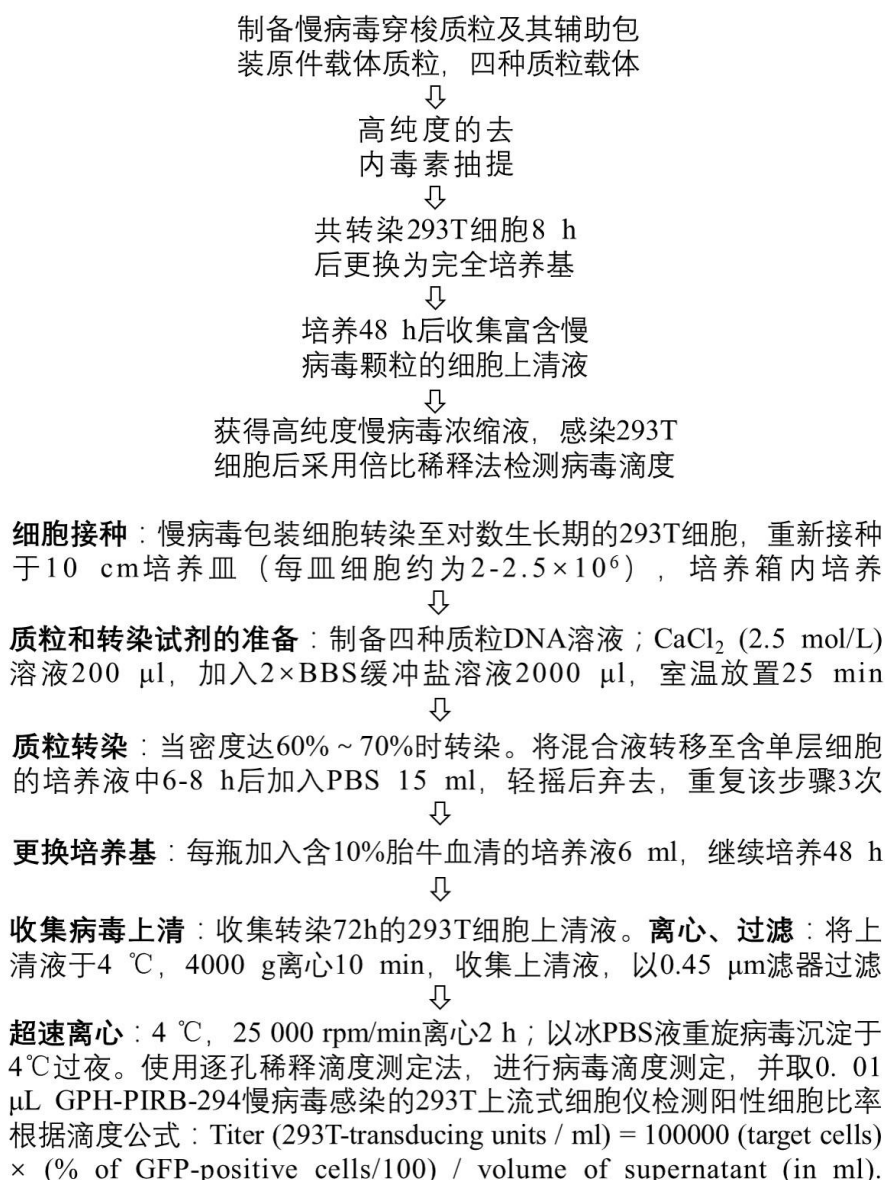


图 2-1 慢病毒包装及滴度检测流程及操作图示

本部分实验中的需要注意：本病毒是没有复制能力的改造病毒，但操作中要严格按照生物二级实验室操作规范，操作时戴好口罩，帽子，并避免皮肤直接与病毒接触。其废弃物带出前需要单独处理，可用过氧乙酸浸泡 30 分钟后丢弃。病毒长期保存（2 周以上，最长可达 12 个月）时，请需置于-80℃冰箱，短期（1 周以内）保存可置于 4℃,尽量避免反复冻融影响病毒活力。

2.4 Western blot

按照实验的时间节点，进行细胞全蛋白提取。方法如下：

① PBS 洗涤 3 次后，加入预冷的 Lysis 裂解液（100 μ l/孔），仔细刮取细胞并将裂解液与细胞充分混合。

② 将悬浊液移入预冷的 EP 管内，冰浴 30 min，4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，12000 rpm。

③ 余下步骤第一部分相关实验。其中一抗（PirB, 1:2000; GFP, 1: 5000; β -Actin; 1:5000）；二抗（HRP 标记的羊抗兔二抗，1: 1000，HRP 标记的羊抗小鼠二抗，1: 3000；HRP 标记的羊抗鸡二抗，1: 500）。

2.5 神经元活力检测

应用 MTT 比色法检测神经元活力。方法如下：

① 将原代培养的皮层神经元以 1×10^5 cell/ml 密度接种于多聚赖氨酸（50 mg/mL）包被的 96 孔板中，OGD 复氧后 72 h 时轻轻去除神经元培养液，加入 MTT 溶液（5mg/ml）至 96 孔板（20 μ L/孔）中，在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 h。

② 吸出上清，加二甲基亚砷溶液（150 μ L/孔），振荡 10 min。

③ 用酶标仪检测各孔的吸光度（OD 值，波长为 570 nm）。重复 3 次。各组 OD 值与 Normal 组 OD 值比值的百分比即为细胞存活率。数据分析时，以 Normal 组神经元的细胞活力为 100%。

2.6 TUNEL 染色方法

① 原代培养的皮层神经元按实验要求处理后，与 OGD 复氧后 72 h 时加入 4% PFA 于室温固定 1 h，0.01M PBS 轻轻漂洗 3 次（5 min/次），之后用 0.3% 过氧化氢处理 10 min。加入 TUNEL 反应混合液 50 μ l，室温避光孵育 1 h，之后应用 DAPI 进行室温衬染 10 min，PBS 漂洗后 50% 甘油封片。由一名不知道分组的观察者在荧光显微镜下观察和记录 TUNEL 阳性神经元的数量及 DAPI 衬染情况。计数方法为：高倍镜($\times 400$)随机选择 6 个视野，计数 TUNEL 阳性细胞和 DAPI 衬染总的细胞。应用 Image-Pro plus 5.1 软件统计分析。

2.7 免疫荧光细胞化学染色

OGD 复氧后 72 h 时加入 4% PFA 于室温固定 1 h，0.01M PBS 轻轻漂洗 3 次（5min/次）。加入小鼠抗 Tau 单克隆抗体（1:1000），4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗后，加二抗：

驴抗小鼠 Alexa-594 (1:1000), 37°C 孵育 1 h (避光)。 PBS 漂洗后, 50% 甘油封片, 荧光共聚焦显微镜观察并记录最长神经突起的长度。

2.8 统计学分析方法

应用 Image-Pro plus 5.1 软件统计分析。统计方法同实验一。

2.9 实验技术路线图

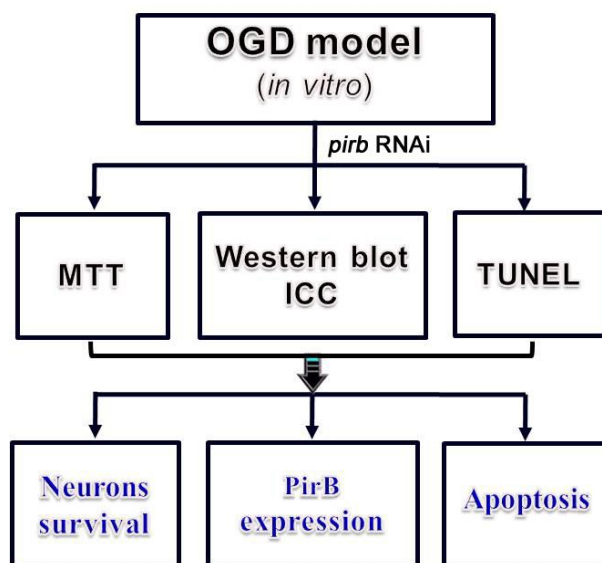


图2-2 本部分技术路线图

3 结果

1. *pirb* 基因干扰 (*pirb* RNAi) 靶点慢病毒系统检测

取 0.01 μ l GPH-PIRB-294 慢病毒感染 293T 细胞 48 h, 荧光显微镜下的观察, 结果显示, 有大量绿色的 293T。说明 GPH-PIRB-294 慢病毒成功感染 293T 细胞。结果进一步显示, GFP 阳性细胞比率为 33.05%, GPH-PIRB-294 滴度为 3.3×10^9 TU/ml。

图 2-3 GPH-PIRB-294 慢病毒检测。A 为 0.01 μ l GPH-PIRB-294 慢病毒感染 293T 细胞 48 小时, 明场显微镜下的观察结果。B 为为 0.01 μ l GPH-PIRB-294 慢病毒感染 293T 细胞 48 小时, 荧光显微镜下的观察结果。转染 GPH-PIRB-294 慢病毒的细胞呈绿色。Bar=100 μ m。C 为 0.01 μ L GPH-PIRB-294 慢病毒感染的 293T 细胞上流式细胞仪检测阳性细胞比率。

2. *pirb* RNAi 抑制氧糖剥夺后神经元 PirB 表达, 促进神经元突起生长

含有 *pirb* shRNA 的慢病毒载体转染至 293T 细胞中, 转染至第 72 h 时, Western blot 结果显示, *control* RNAi 与 *pirb* RNAi 组的 GFP 表达没有统计学差异($P>0.05$); 与 *control* RNAi 组相比, *pirb* RNAi 组的 PirB 表达显著下调($P>0.05$), 说明含有 *pirb* shRNA 的慢病毒载体构建成功, 并且能够显著下调 PirB 表达。

利用体外氧糖剥夺 (OGD) 模型, 观察 *pirb* RNAi 对 OGD 后神经元 PirB 蛋白表达的影响。结果显示, 与 Normal 组相比, OGD 后第 72 h 时, OGD 组和 OGD+*control* RNAi 组神经元 PirB 表达明显增加 ($p<0.05$)。与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组神经元 PirB 表达明显减少 ($p<0.05$)。该结果表明 OGD 后神经元 PirB 表达明显增加, 而 *pirb* RNAi 可以显著抑制神经元 PirB 表达, 并进一步提示 PirB 在神经元缺血再灌注损伤中可能发挥重要作用。

免疫荧光细胞化学染色结果显示, 与 Normal 组相比, OGD 后第 72 h 时, OGD 组和 OGD+*control* RNAi 组神经元最长突起即轴突的平均长度明显变短 ($p<0.05$)。与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组神经元轴突长度明显变长 ($p<0.05$)。该结果表明 *pirb* RNAi 可以显著促进 OGD 后神经元轴突的生长。

图2-4 *pirb* RNAi对氧糖剥夺后神经元PirB表达和轴突生长的作用(n=6, 每组)。A为Western blot检测GPH-PIRB-294慢病毒转染293T细胞第3 d时PirB, GFP及 β -actin表达的条带图。B为神经元OGD后24 h时转染GPH-PIRB-294, 至OGD后第3 d时, Western blot检测PirB, GFP及 β -actin表达的条带图。C为PirB蛋白表达的半定量统计结果 (* $P<0.05$ vs. Normal组; # $P<0.05$ vs. OGD组)。D为GPH-PIRB-294慢病毒转染至神经元OGD后24 h时转染GPH-PIRB-294, 至OGD后第3 d时免疫细胞化学染色观察神经元轴突生长情况。箭头所指为神经元的 longest 神经突起, 可代表轴突。Bar=50 μ m。E 为各组最长神经突起平均长度的统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal组; # $P<0.05$ vs. OGD组)。

3. *pirb* RNAi 能够促进 OGD 后神经元存活, 减轻神经元凋亡

OGD 后第 72 h 时, 光镜观察神经元生长状态, 发现 Normal 组神经元分布均匀, 胞体呈圆形或椭圆形, 有光晕, 并有立体感, 神经元突起伸展, 交织成网状。而 OGD 组神经元生长状体较差, 细胞完整度差, 胞体萎缩或破碎, 神经突起断裂或消失。

给予 *pirb* RNAi 处理后, 神经元生长状态和形态明显好转。在 OGD 后 72 h 时, 应用 MTT 比色法检测神经元细胞活力, 与 Normal 组相比, OGD 组 MTT 相对比色值显著降低 ($P < 0.05$), 与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组的 MTT 相对比色值增加 ($P < 0.05$)。与 OGD 组相比, OGD+*control* RNAi 组的 MTT 相对比色值没有统计学意义 ($P > 0.05$)。利用 TUNEL 染色检测神经元凋亡情况。结果显示, 在 OGD 后 72 h 时, OGD 组 TUNEL 阳性神经元的细胞数目明显多于 Normal 组 ($P < 0.05$), 与 OGD 组相比, OGD+*pirb* RNAi 组 TUNEL 阳性神经元的细胞数目明显减少 ($P < 0.05$), 与 OGD 组相比, OGD+*control* RNAi 组的 TUNEL 阳性神经元的细胞数目没有统计学意义 ($P > 0.05$)。上述结果说明 OGD 后下调 PirB 表达可神经元活力, 减轻神经元凋亡, 促进神经元存活。

图2-5 *pirb* RNAi对氧糖剥夺后神经元存活和凋亡的作用 (n=6, 每组)。A为明场显微镜观察GPH-PIRB-294慢病毒转染293T细胞第3 d时神经元存活状态。B为GPH-PIRB-294慢病毒转染至神经元OGD后24 h时转染GPH-PIRB-294, 至OGD后第3 d时, MTT分析神经元活力的统计图 (* $P < 0.05$ vs. Normal组; # $P < 0.05$ vs. OGD组)。C为GPH-PIRB-294慢病毒转染至神经元OGD后24 h时转染GPH-PIRB-294, 至OGD后第3 d时TUNEL染色观察神经元凋亡情况。红色细胞为TUNEL阳性神经元。Bar=100 μ m。D为各组TUENL阳性神经元的统计图 (* $P < 0.05$ vs. Normal组; # $P < 0.05$ vs. OGD组)。

讨论

第一部分实验发现并证实了 PirB 在 SD 大鼠 MCAO 模型半暗带内长时程的表达变化, 提示 PirB 可能在脑缺血再灌注损伤中扮演重要角色, 然而其确切作用和功能还鲜有报道。在本实验中, 我们成功构建了可以干涉神经元 PirB 表达的慢病毒系统, 其浓度滴度测定结果符合实验需求。慢病毒表达质粒能表达绿色荧光蛋白(GFP), 并且能够降低 PirB 表达, 这在转染 293T 细胞时已经得到证实。在 OGD 实验中, 可以检测到神经元内 GFP 的表达, 同时, 其转染后能够显著降低神经元 PirB 的表达, 说明 GPH-PIRB-294 可以较好的干涉氧糖剥夺后神经元 PirB 的表达。

Atwal等首先证实，PirB是Nogo-A，MAG，OMgp的共受体。Fujita等进一步证实Nogo-A，MAG，OMgp与PirB结合后，能够启动下游的抑制信号，抑制轴突生长和芽生。研究还发现，通过PirB特异性抗体封闭其功能，能够显著促进轴突生长，减轻生长锥的崩溃瓦解。Adelson等新近研究发现，*pirb*基因敲除的小鼠MCAO后，皮质脊髓束纤维和分支的生长得到明显改善，越过中线支配对侧区域的纤维数量明显增多，突触可塑性得到明显改善，模型动物的神经功能也得到恢复。在本部分研究中，我们发现干涉OGD后神经元的PirB表达，能够减轻神经元轴突损伤，促进其生长。体外氧糖剥夺实验中，复氧复糖后，神经元损伤明显加重，PirB表达也明显增多。先前研究发现，OGD后神经元Nogo-A及其受体NgR1表达也会上调，特别是神经元损伤后，Nogo-A及其片段可能从神经元上游离出来，与受体NgR1结合，从而进一步发生抑制效应。从这一角度分析，从神经元上游离出来的Nogo-A及其片段可能也会与PirB结合，从而加重抑制效应，而PirB干涉后，这种抑制作用得到削弱，神经元轴突生长得到改善。

Adelson等研究还发现，*pirb*基因敲除的小鼠脑片在体外进行OGD后，海马区域的神经元损伤程度明显减轻。前期研究中，我们发现，应用NgR1受体拮抗剂NEP1-40干预Nogo-A与NgR1的反应，可以减轻MCAO后脑梗死容积，缓解神经元凋亡，同时体外OGD实验进一步证实干扰Nogo-A与NgR1的反应可以减轻神经元凋亡，抑制凋亡蛋白Bax表达，促进抗凋亡蛋白Bcl2表。在本部分研究中，我们发现干涉OGD后神经元的PirB表达，可以增强神经元活力，减轻神经元的凋亡。那么可以推测，本部分实验中这种结果，可能也是由于干扰了Nogo-A与PirB结合，从而抑制PirB下游信号通路，减轻了神经元的损伤。这也进一步证实PirB在脑缺血再灌注致神经元损伤中发挥重要作用。

此外，在MCAO模型中，半暗带内少突胶质细胞是NogoA、MAG、Omgp另一个主要来源。再灌注损伤后，大量NogoA、MAG、Omgp及其片段从细胞中脱离出来，与NgR1和PirB结合，不仅具有抑制轴突生长的作用，还具有加重神经元损伤的作用。因此，如果能够同时干预NogoA、MAG、Omgp与PirB受体的结合，抑制它们的相互作用，很可能对脑缺血后挽救受损神经元，促进其存活和轴突生长，以及神经功能的恢复具有重要意义。

另一方面，虽然在基因水平可以有效干涉PirB的表达，但是基因水平干预和治疗

因其安全性和有效性问题，一直以来难以较好的临床应用。而抗体药物因研发技术难度高、投资大和周期长等原因难以成新的治疗药物。在我们前期研究及其他研究中发现，多肽和大分子蛋白药物则因其相对容易制备，药效高，副作用低，不易蓄积中毒等特点，已经成为医药研发领域中最活跃，进展最快的部分。因此，能够在多肽或大分子水平同时干扰NogoA、MAG、Omgp与PirB结合，进而抑制PirB抑制轴突生长和加重神经元损伤的效应，将对脑缺血再灌注损伤的机制研究和防治措施研究具有重要意义。

结论

在本实验中，我们成功构建了可以干涉神经元PirB表达的慢病毒系统，能够抑制OGD后皮层神经元PirB的表达。研究进一步发现，抑制OGD后神经元PirB表达，可以有效促进轴突生长，增强神经元活力，减轻神经元凋亡。该部分研究证实了PirB在神经元OGD后的作用及功能，为脑缺血再灌注损伤的机制研究和防治策略研究提供了有益的理论基础和实验依据。

实验三 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 的制备、表达、纯化及生物学活性的鉴定

1 材料

1.1 实验动物

雄性SD大鼠，体重约280 g；SD大鼠孕鼠，体重约400 g，购自地点同第一部分，做到善待实验动物，饲养、手术、给药处理及取材等环节均严格按照动物实验管理相关规定，并遵守National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications number 80-23, revised in 1996)。

1.2 主要仪器

1. CO₂ 恒温细胞培养箱，Hereaus公司，德国
2. 低氧细胞培养箱，DWS公司，英国
3. 制冰机，三洋电子有限公司，日本
4. 倒置显微镜，Olympus公司，日本
5. 低温高速离心机，Eppendorf公司，德国
6. 数显恒温水浴锅，常州国华电器有限公司，中国
7. 微量移液器，Eppendorf公司，德国
8. 超净工作台，吴江净化设备总厂，中国
9. Mili-Q50纯水器，Millipore公司，美国
10. 倒置显微镜，Olympus公司，日本
11. 激光共聚焦荧光显微镜，Olympus公司，日本
12. 凝胶成像系统，Alpha 公司，美国
13. 蛋白电泳仪，BIO-RAD公司，美国
14. 电泳槽，BIO-RAD公司，美国
15. 多功能摇床，LAB-LINE公司，美国
16. PH计，Beckman Coulter公司，美国

17. -80℃超低温冰箱, Thermo Forma公司, 美国

18. 各型玻片, Fisher, 美国

19. 全自动酶标仪, Bio Rad公司, 美国

20. 各型培养板及培养皿, CORNING, 美国

21. 离心管, CORNING公司, 美国

22. EP管, CORNING公司, 美国

23. 相差显微镜, Nikon公司, 日本

24. 细胞计数板, 南京裕安公司, 中国

25. 实时荧光定量PCR仪, Eppendorf公司, 德国

26. 精密电子天平, Sartorius公司, 美国

1.3 主要试剂

1. 多聚赖氨酸, Sigma公司, 美国

2. Neurobasal, Gibco公司, 美国

3. B27, Gibco公司, 美国

4. 胎牛血清, Gibco公司, 美国

5. 青链霉素混合液(双抗), 美国 Hyclone 公司

6. 谷氨酰胺, 美国 Hyclone 公司

7. DMEM高糖培养基, Gibco公司, 美国

8. D-hanks 溶液, Sigma公司, 美国

9. 胰蛋白酶, 沃尔森公司, 中国

10. MTT, Sigma公司, 美国

11. Nogo-A (AP-Nogo-66), MAG (MAG-Fc), OMgp (AP-OMgp), R&D公司, 美国

13. 兔抗 (His)₆多克隆抗体 (ab82627), Abcam, 美国

15. 小鼠抗 β -actin单克隆抗体 (ab8226), Abcam, 美国

16. 兔抗 β III-tubulin多克隆抗体 (ab18207), Abcam, 美国

17. 小鼠抗Tau单克隆抗体 (ab80579), Abcam, 美国

18. 驴抗小鼠FITC, Molecular Probes, 美国

19. HRP 标记的羊抗兔二抗, Pierce Biotechnology, 美国
20. HRP 标记的羊抗小鼠二抗, Pierce Biotechnology, 美国
22. 全蛋白提取试剂盒, KeyGEN, 中国
23. BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天, 中国
24. 预染蛋白 Marker, Fermentas, 美国
25. SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 碧云天, 中国
26. 发光液, Thermo 公司, 美国
27. Lysis 裂解液, 碧云天, 中国
29. 主要试剂配制如下: 同前

2. 方法

2.1 目标基因片段的 DNA 合成

从Genebank数据库中获取鼠源PirB胞外段的cDNA序列, TAT结构域为11个氨基酸, 其碱基序列为: (两端酶切位点分别为Nco I、Xho I)

GAATTCTACGGCCGCAAGAAACGCCGCCAGCGCCGCCGC (TAT序列)

GGCGGTTACGTATCTGACGGGTAGCCTGCCGAAACCGATTCTGCGTGTTCAA
 CCGGATAGCGTTGTGAGCCGCCGCACCAAAGTGACCTTCCTGTGTGAAGAAAC
 CATTGGCGCCAACGAATATCGTCTGTACAAAGATGGTAAACTGTATAAAACCG
 TGACGAAAAACAAACAGAAACCGGAAAATAAAGCTGAATTTAGCTTCTCTAA
 CGTTGATCTGAGCAATGCGGGCCAGTATCGCTGCAGTTACTCCACCCAATATA
 AAAGCTCTGGCTACTCGGACCTGCTGGAAGTGGTGGTTACCGGTCATTATTGG
 ACGCCGAGCCTGCTGGCACAGGCATCACCGGTCGTGACCTCGGGCGGTTATGT
 TACGCTGCAATGTGAAAGCTGGCATAACGATCACAAATTTATTCTGACCGTCG
 AAGGCCCGCAGAACTGAGCTGGACCCAGGACTCTCAATATAATTACAGTAC
 GCGTAAATACCACGCACTGTTTCAGCGTCGGTCCGGTGACCCCGAACCAGCGTT
 GGATCTGCCGCTGTTATTCCTACGATCGTAATCGCCCGTATGTGTGGTCACCGC
 CGTCAGAATCGGTTGAACTGCTGGTCAGCGGCAACCTGCAGAAACCGACCATT
 AAAGCAGAACCAGGTTTCAGTCATCACCTCGAAACGCGCTATGACGATTTGGTG

CCAGGGTAACCTGGACGCGGAAGTGTATTTTCTGCATAACGAAAAATCCCAG
AAAACCCAATCAACCCAGACGCTGCAAGAACCGGGCAACAAGGGTAAATTTT
TCATCCCGTCTGTTACCCTGCAGCACGCCGGCCAATACCGTTGCTATTGTTACG
GCAGTGCAGGTTGGAGCCAGCCGTCTGATACCCTGGAAGTGGTTGTCACGGGT
ATCTATGAATATTACGAACCGCGTCTGAGCGTGCTGCCGTCTCCGGTGGTTAC
CGCGGGCGGTAACATGACGCTGCATTGTGCCTCCGATTTTCCGTATGACAAAT
TCATCCTGACCAAAGAAGATAAAAAATTCGGCAATTCACTGGACACGGAACA
TATCAGTTCCTCAGGCCAGTACCGTGCCCTGTTTATTATCGGTCCGACCACGCC
GACCCACACGGGTGCATTCCGCTGCTATGGTTATTACAAAACGCACCGCAGC
TGTGGAGTGTTCCGTCCGCTCTGCAGCAAATTCTGATCTCAGGTCTGTCGAAA
AAACCGTCTCTGCTGACCCATCAGGGCCACATCCTGGA_cCCGGGTATGACCCT
GACGCTGCAATGTTTCAGTGATATCAACTACGACCGTTTCGCACTGCATAAAG
TGGGCGGTGCTGATATCATGCAGCACTCGAGCCAGCAAACCGACACGGGCTTT
TCTGTCGCCAACTTCACCCTGGGTTATGTGTCTAGTTCCACGGGCGGTCAATAT
CGTTGCTACGGTGCACATAATCTGTCATCGGAATGGAGCGCCAGCTCTGAACC
GCTGGATATTCTGATCACCGGTCAGCTGCCGCTGACGCCGAGCCTGTCTGTCC
AACCGAATCATACCGTGCACCTCGGGTGAAACGGTTAGCCTGCTGTGTTGGAGC
ATGGATTCTGTTGACACCTTTATTCTGAGTAAAGAAGGCTCCGCTCAGCAACC
GCTGCGTCTGAAAAGTAAATCCCATGATCAGCAAAGCCAGGCGGAATTTTCA
ATGTCGGCCGTGACCAGTCACCTGTCCGGCACGTATCGCTGCTACGGTGCGCA
AGACAGTTCCTTCTATCTGCTGTCATCGGCATCTGCTCCGGTGGAACTGACCGT
TAGTGGTCCGATTGAAACGAGCACGCCGCCGACGATGTCCATGCCGCTGG
GTGGTCTGCATATGTAT (PirB胞外段序列: PEP) **GAATTC**。由上海金斯瑞公司
制备目标质粒DNA, 将DNA装载到pUC57载体。

2.2 pTAT-PEP 表达质粒构建

① 原核基因高效快速表达试剂盒(购自冷泉港实验室), 质粒构建采用带有相同的多克隆位点的九种高效表达载体(pLLP-OmpA, pLLP-STII, pMBP-P, pMBP-C, pET-GST, pET-Trx, pET-His, pTrc-CKS, pET-DsbA)为基础, 以9种质粒表达载体相

同酶切位点设计目的序列引物.

- ② 将①质粒用限制性内切酶Nco I、Xho I进行双酶切, 获得粘末端的PEP。
- ③ 用Nco I、Xho I双酶切9种高效表达载体, 获线性载体。
- ④ 将两种酶切产物回收在16℃连接反应2~12 h, 连接产物转化E.coli TOP10F'感受态, 涂布于抗生素LB平板。
- ⑤ 挑选菌落、质粒抽提并经酶切鉴定筛选阳性单克隆, 由金斯瑞公司测序。

2.3 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 的表达及可溶性分析

- ① 将表达载体转化到大肠杆菌, 取单菌落接种于5 ml LB培养液中, 37℃下200 r/min振摇过夜。
- ② 1:100比例接种至10 ml LB培养液中培养2~3 h, 摇至A值达0.6左右, 加入IPTG至终浓度1 mmol/L, 30℃诱导, 在不同时间点(0、1、2、4、6、8 h)收集菌体。
- ③ 4℃下5000r/min离心5min, 以10:1的比例加入超声裂解液破碎细菌, 取诱导表达8 h的细菌沉淀的超声破碎产物, 4℃下15 000r/min离心30 min, 分别收集上清和沉淀, 加入SDS-PAGE电泳上样缓冲液, 取下胶进行考马斯亮蓝染色60 min; 快速脱色90min; 检测融合蛋白的表达。

2.4 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 的 western blot 分析

取诱导表达4 h上清液经SDS-PAGE电泳, 通过半干转法将蛋白转移到PVDF膜, 用0.05%脱脂奶粉封闭1 h, 加入兔抗(His)₆多克隆抗体(1:2000), 4℃过夜, HRP标记的二抗室温孵育1 h, TBST洗膜, ECL显影分析。

2.5 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 的纯化与储存

- ① 用细菌发酵罐大规模发酵, 收集诱导表达4 h细菌沉淀。
- ② 用超声缓冲液重悬菌体, 超声破碎后离心收集上清。
- ③ 用GE公司蛋白纯化系统纯化蛋白, 首次Ni²⁺亲和层析, 然后脱盐处理。④ BCA蛋白定量。
- ⑥ 纯化后的融合蛋白分装后, 在-80℃保存备用。

2.6 对照蛋白即可溶性融合蛋白 TAT-mPEP 的制备

可溶性融合蛋白TAT-mPEP的表达、纯化及储存均参照上述方法, 作为对照蛋

白。（基因序列？）

2.7 MTT 检测神经元活力

方法同前。蛋白处理后3 d时时进行检测。

2.8 LDH 释放实验检测神经元存活

利用乳酸脱氢酶（Lactate Dehydrogenase, LDH）释放实验，检测神经元存活情况。方法如下：

① 将原代培养的皮层神经元以 1×10^5 cell/ml 密度接种于多聚赖氨酸（50 mg/ml）包被的 96 孔板中，蛋白处理后 3 d 时轻轻去除神经元培养液，收集无细胞的培养液；同时将板中的神经元进行消化、收集和离心。

② 加入 100 μ l 工作液 A (使用前 1 h 内配制，为 1: 99 的生物素标记抗体与稀释液)，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。轻轻倒出孔内液体，洗板 3 次后加入 100 μ l 工作液 B，在 37 $^{\circ}$ C 孵箱中放置 1 h。

③ 再次弃孔内液，洗板，加入底物溶液 90 μ l。加入终止液，终止反应。在 450 nm 波长下，用全自动酶联仪检测吸光度 (OD)，计算 LDH 释放率。LDH 释放率 (%) = 上清 LDH / (上清 LDH + 细胞 LDH) \times 100%。

2.9 Western blot 检测半暗带内 TAT-PEP 的蛋白量

MCAO 模型，动脉血压及脑血流监测同实验一部分。在 MCAO 后立刻给予 200 mg/kg TAT-PEP 腹腔注射。并于 MCAO 后 0 h, 0.5 h, 2 h, 12 h, 24 h, 48 h 和 72 h 后进行脑组织取材，半暗带蛋白提取，定量等，方法同实验一部分。转膜后进行封闭室温封闭 1 h，一抗(His)₆, 1:2000; β -actin 1:5000, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次（8 min/次）后，二抗（HRP 标记的羊抗兔二抗，1: 1000 和 HRP 标记的羊抗小鼠二抗，1: 3000）室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次（10 min/次）。使用 ECL 化学发光液发光，并呈像（Alpha Innotech），显影后，对条带灰度进行分析，半定量分析目的蛋白表达情况（目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值）。

2.10 免疫荧光组织化学染色检测半暗带内 TAT-PEP 的蛋白量和分布

MCAO 模型制备，动脉血压及脑血流监测同实验一部分。在 MCAO 后立刻给予 200 mg/kg TAT-PEP 腹腔注射。并于 MCAO 后 0 h, 0.5 h, 12 h, 24 h 后进行脑组织固定，

取材,冰冻切片制作等,方法同实验一部分。冰冻切片室温方式30 min后,用画圈笔圈好组织周围,用0.01M PBS溶液轻轻漂洗切片(5 min每次×3次)后,加入抗原封闭液于湿盒中室温进行封闭1 h(3 ml/L tritonX100+10 g/L胎牛血清白蛋白),弃去封闭液,入一抗(His)₆, 1:1000, 4°C过夜, 0.01M PBS溶液漂洗(5 min每次×3次),入二抗(羊抗兔FITC, 1:5000),避光室温孵育2 h,避光漂洗3次,50%甘油封片后Olympus BX60荧光显微镜下观察并拍照。

2.11 皮层神经元原代培养:

取孕16.5-18.5 d (E 16.5-18.5 d)的SD大鼠脱臼处死,进行常规无菌消毒,取出胎鼠,分离鼠胚胎。其余方法同第二部分。

2.12 ELISA 方法检测 TAT-PEP 与 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 的结合情况

实验方法及步骤如下:

① 将Nogo-A (AP-Nogo-66, R&D, 300 ng/spot); MAG (MAG-Fc, R&D, 150 ng/spot); OMgp (AP-OMgp, R&D, 300 ng/spot)以50 µg/well分别包被于96孔板中,4°C孵育24 h,晾干用PBS (pH 7.4)漂洗3次,每次5 min。

② 加入0.1%的小牛血清,37°C孵育2 h后。

③ 按浓度梯度分别加入0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 µmol TAT-PEP或者TAT-mPEP,并设PBS对照,37°C孵育4 h,用PBS (pH 7.4)漂洗3次以除去游离未结合的融合蛋白,随后加入小鼠抗(His)₆单克隆抗体(1:1000; Abcam)及羊抗小鼠IgG二抗(1:10000; Sigma)。

④ 结合能力检测:再次漂洗后,加入对硝基苯磷酸二钠,六水(P-NPP disodium, 2 mg/ml) AP 缓冲液 (pH 9.6), 37°C孵育15 min,在450 nm波长下,用全自动酶联仪检测吸光度(OD)值。

2.13 轴突生长抑制模型

① 包被:将 Nogo-A (AP-Nogo-66), MAG (MAG-Fc), OMgp (AP-OMgp) (50 ng/well)分别或混合(MAIs)包被24孔板的玻片中,在4°C条件下孵育24 h,晾干后用PBS (pH 7.4)漂洗3次

② 封闭:加入含有0.1%的2.5%的小牛血清(BSA),37°C孵育2 h后,

③ 按50 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L分别加入TAT-PEP或TAT-mPEP(500 µl),

37℃ 孵育 2 h，用 PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次以除去未结合的蛋白。

④ 玻片晾干后，接种皮层神经元，原代培养至第 7 d 时，免疫荧光细胞化学染色检测神经元最长突起的平均长度，方法同实验二部分。

2.14 技术路线

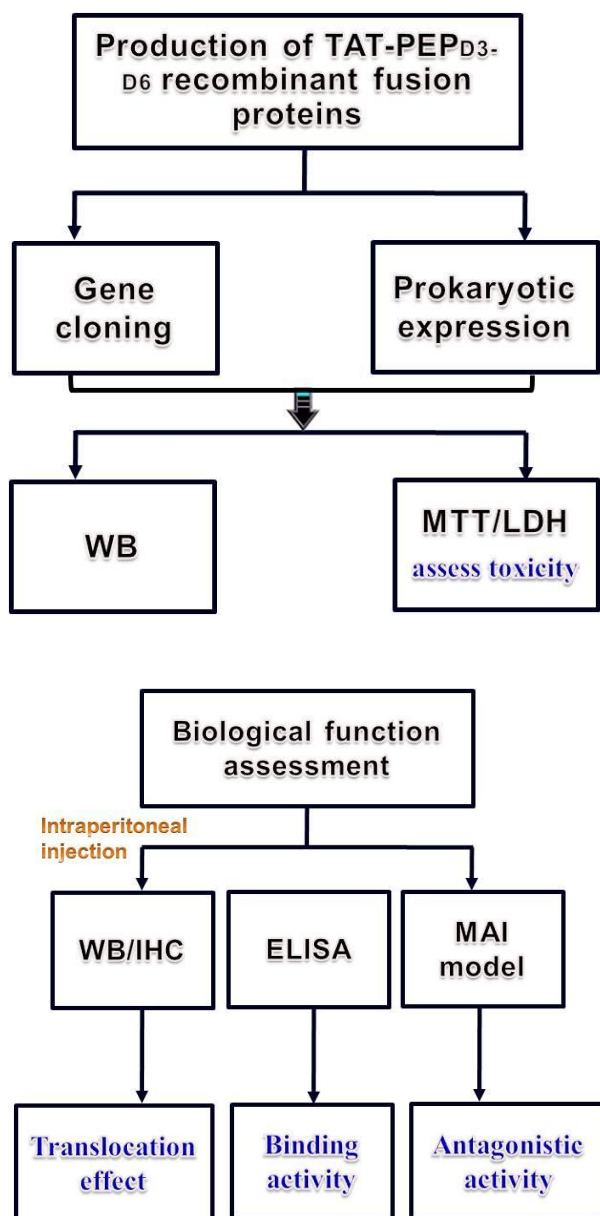


图 3-1 本部分技术路线图

3 结果

3.1 可溶性 TAT-PEP、TAT-mPEP 融合蛋白的制备、表达、纯化及鉴定

健康 SD 大鼠皮层组织 RNA 的提取，PirB 胞外段目的基因片段的扩增，目的片段克隆到不同载体后鉴定和测序，重组质粒的构建及鉴定等均由上海生工有限公司提供支持并帮助完成，结果与预期相一致。

可溶性 TAT-PEP、TAT-mPEP 融合蛋白的表达。取 IPTG 诱导的蛋白上清液行 SDS-PAGE 后，放入考马斯亮蓝染色溶液中进行染色，随后放入脱色液中脱色，脱色完成后可看到经 IPTG 诱导的目的蛋白得到富集。其中 TAT-PEP 的分子量约为 90KDa，TAT-mPEP 的分子量约为 75 KDa，与预期相符合（图?? ?）。该结果说明可溶性 TAT-PEP、TAT-mPEP 融合蛋白表达成功。

可溶性 TAT-PEP、TAT-mPEP 融合蛋白的纯化及鉴定。蛋白交由?? 公司进行纯化。利用 Western blot 进行鉴定。由于表达载体中带有(His)₆ 标签，因此应用抗(His)₆ 的抗体进行鉴定。结果显示，纯化后 TAT-PEP 蛋白条带约为 90 KDa，与预期相符合，而未经诱导的提取物没有相应条带。说明该蛋白制备和纯化成功。

3.2 可溶性 TAT-PEP、TAT-mPEP 融合蛋白对正常状态下离体培养的皮层神经元存活的影响

皮层神经元培养至第 7 d 时，给予分别不同浓度的 TAT-PEP（50 μg/L，100 μg/L 和 200 μg/L）、TAT-mPEP（100 μg/L）处理。处理后第 3 d 时，各组 MTT 实验相对 OD 值没有统计学差异（ $P>0.05$ ），LDH 释放量相对值也没有统计学差异（ $P>0.05$ ）。该结果说明融合蛋白 TAT-PEP、TAT-mPEP 对正常状态下离体培养的皮层神经元的存活没有明显不良作用。

图 3-2 可溶性融合蛋白 TAT-PEP 和 TAT-mPEP 的制备，表达，纯化及鉴定。A 为 pTAT-PEP 表达质粒构建的模式图。B 为可溶性融合蛋白 TAT-PEP 和 TAT-mPEP（对照蛋白）的蛋白结构的模式图。C 为考马斯亮蓝染色检测可溶性融合蛋白 TAT-PEP 和 TAT-mPEP 的表达情况。D 为 Western blot 检测纯化后可溶性融合蛋白 TAT-PEP 与抗(His)₆ 抗体反应情况。E 为 MTT 法检测可溶性融合蛋白 50 μg/L，100 μg/L 和 200 μg/L）、TAT-mPEP（100 μg/L）对正常状态下离体培养的皮层神经元存活

的作用。F 为 ELISA 法检测可溶性融合蛋白 50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$)、TAT-mPEP (100 $\mu\text{g/L}$) 对正常状态下离体培养的皮层神经元 LDH 释放的作用。

3.3 TAT-PEP 与 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 分子结合能力的检测

前期研究发现, 与 Nogo66 与 PirB 胞外段能够很好结合, 并激活 PirB 下游信号通路, 发挥抑制神经元轴突生长的效应, 并且预测 MAG, OMgp 与 PirB 胞外段也能够结合, 发挥抑制效应。本实验的 ELISA 结果显示, 与 TAT-mPEP 组相比, 不同浓度 TAT-PEP 与商品化的 Nogo-A (Nogo66) 反应后, 其 OD 值呈现明显的剂量效应关系, 说明 TAT-PEP 与 Nogo-A (Nogo66) 分子有很好的结合能力。有趣的是, 不同浓度 TAT-PEP 与商品化的 MAG, OMgp 反应后, 其 OD 值也呈现明显的剂量效应关系, 说明 TAT-PEP 与 MAG, OMgp 分子也能够很好结合。该实验证明, TAT-PEP 能够与 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 分子具有很好的结合能力, 这是下一步研究的结构基础。

图 3-3 TAT-PEP 与 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 分子结合能力的检测。A, B, C 为应用 ELISA 方法检测不同浓度 TAT-PEP 分别与商品化的 Nogo-A (Nogo66), MAG 及 OMgp 反应后 OD 值的变化情况。

3.4 TAT-PEP 逆转 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 分子抑制轴突生长的效应

首先, 利用体外轴突生长抑制模型及免疫荧光细胞化学染色观察到, 神经元培养至第 7 d 时, 与 Normal 组相比, Nogo-A (Nogo66) 组神经元最长突起的平均长度明显缩短 ($P < 0.05$), 而 TAT-PEP 组神经元最长突起的平均长度与 Nogo-A (Nogo66) 组相比明显变长 ($P < 0.05$), TAT-mPEP 组神经元最长突起的平均长度与 Nogo-A (Nogo66) 组相比没有统计学意义。有实验进一步观察到, 与 Normal 组相比, MAG 组神经元最长突起的平均长度明显缩短 ($P < 0.05$), 而 TAT-PEP 组神经元最长突起的

平均长度与 MAG 组相比明显变长 ($P<0.05$), TAT-mPEP 组神经元最长突起的平均长度与 MAG 组相比没有统计学意义。有趣的是在 OMgp 组别也观察到类似的现象。由于习惯上把神经元的 longest突起认为是神经元的轴突, 因此上述结果表明, TAT-PEP 能够与 Nogo-A, MAG, OMgp 有效结合后, 减少了它们与神经元上 PirB 结合, 从而逆转其对神经元轴突生长的抑制作用。

图3-4 TAT-PEP分别逆转Nogo-A (Nogo66), MAG和OMgp抑制轴突生长效应的检测 (n=6, 每组)。A, C, E为免疫细胞化学染色观察神经元轴突生长情况。箭头所指为神经元的 longest神经突起, 可代表轴突。Bar=50 μm 。B, D, F为各组 longest神经突起平均长度的统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal组; # $P<0.05$ vs. Nogo-A(Nogo66), MAG或OMgp组)。

接下来进行了剂量效应的检测。神经元培养至第 7 d 时, MAIs (Nogo66+MAG+OMgp)组与 Normal 组相比, 神经元 longest突起的平均长度明显缩短, TAT-mPEP 组神经元 longest突起的平均长度与 MAIs 组相比没有统计学意义。与 MAIs 组相比, 50 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理组后, 神经元 longest突起的平均长度明显变长 ($P<0.05$), 100 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组与 50 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组相比, 神经元 longest突起的平均长度亦明显变长 ($P<0.05$), 而 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组与 100 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 组相比神经元 longest突起的平均长度没有统计学意义。该结果说明, TAT-PEP 能够拮抗 MAIs 的轴突抑制作用, 并呈一定的剂量依赖性, 进一步证实和明确了 TAT-PEP 的生物学活性和功能。

图3-5 TAT-PEP逆转MAIs抑制轴突生长效应的检测 (n=6, 每组)。各组 longest神经突起平均长度的统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal组; # $P<0.05$ vs. MAIs组; \$ $P<0.05$ vs. 50 $\mu\text{g/L}$ 组)。

3.5 TAT-PEP 穿过血脑屏障，分布脑组织的功能鉴定

在 MCAO 后即刻进行 TAT-PEP 腹腔注射。之后于不同时间点应用 Western blot 检测半暗带皮层组织 TAT-PEP 水平，结果显示，蛋白注射后 12 h 时，皮层内 TAT-PEP 水平达峰值，随着时间的推移其量逐渐下降。免疫荧光组织化学染色结果进一步显示，注射即刻皮层半暗带组织中未检测 TAT-PEP，注射后 12 h 时，皮层内 TAT-PEP 水平达峰值，24 h 时明显减少。该结果表明，TAT-PEP 腹腔注射后，TAT 结构能够使 TAT-PEP 融合蛋白有效通过血脑屏障，并且分布于皮层半暗带内。同时，该实验也明确了蛋白合理时间的给药时间，即每日腹腔注射该蛋白。

图 3-6 TAT-PEP 穿过血脑屏障分布脑组织的检测(n=6, 每组)。A 为 Western blot 检测 MCAO 后不同时间点皮层半暗带组织中 TAT-PEP 水平的蛋白条带图。B 为 MCAO 后不同时间点皮层半暗带组织中 TAT-PEP 蛋白量的线状统计分析图。C 为免疫荧光组织化学染色方法检测 MCAO 后不同时间点皮层半暗带组织中 TAT-PEP 蛋白量及分布情况。绿色的为抗(His)₆ 阳性反应物，Bar=50 μm。

4 讨论

在第二部分研究中虽然在基因水平可以有效干涉 PirB 的表达，但是基因水平干预和治疗因其安全性和有效性问题，一直以来难以较好的临床应用。而抗体药物因研发技术难度高、投资大和周期长等原因难以成新的治疗药物。在我们前期研究及其他研究中发现，多肽和大分子蛋白药物则因其相对容易制备，药效高，副作用低，不易蓄积中毒等特点，已经成为医药研发领域中最活跃，进展最快的部分。因此，能够在多肽或大分子水平同时干扰 NogoA、MAG、Omgp 与 PirB 结合，进而促进轴突生长和减轻神经元损伤的效应，将对脑缺血再灌注损伤的机制研究和防治措施研究具有重要意义。

另一方面，CNS 内的细胞及细胞间生理反应的主要调节物质为多肽及蛋白质，因此肽类或蛋白类大分子药物在 CNS 疾病的治疗中具有重要意义，但由于 BBB 和 BSCB 的存在，大于 6 个氨基酸的多肽一般都不能透过这些屏障进入脑组织或脊髓组织，难以达到有效的药物治疗浓度，从而影响了此类药物的研究与发展。

蛋白转导技术是近几年来运用得比较广泛的一种技术，可以将分子量超过100 kDa的蛋白质透过血脑屏障（BBB）或血脊髓屏障（BSCB），转导效率高而且对组织没有损伤，因此蛋白转导技术在神经科学的研究中尤为重要。研究已经证明 I 型免疫缺陷病毒(HIV-1)的转录反式激活因子(TAT)的蛋白转导域，能够将分子量在15-120 kDa的不同生物大分子(如核酸、多肽、蛋白质等) 直接通过BBB，转导的蛋白质均具有生物活性，而且对宿主细胞几乎没有毒性^[24]。目前，TAT蛋白转导技术已经成功将GDNF、Bcl-2、XIAP和Neuroglobin等功能蛋白转导进入脑组织和神经元。特别是在2012年*Sci Transl Med* 杂志的报道指出，应用TAT的结构融合蛋白Tat-NR2B9c，在治疗脑缺血损伤方面的研究已经进入到二期临床^[28]。在前期实验中，我们合成的可溶性重组融合蛋白TAT-NEP1-40，腹腔注射后，可以有效穿过血脑屏障，进入到脑组织中发挥作用，上述研究充分证实TAT融合蛋白系统是一种有效的运载工具，在基础医学研究和临床治疗方面有着广泛的应用前景，更为蛋白质治疗带来了新的曙光，显示出巨大的应用价值^[24,27]，同时为本课题的研究提供了充分的理论依据和实验基础。

表面等离子体（SPR）分析发现，PirB 胞外段与配体 Nogo-A 具有很好结合能力，并且预示 PirB 胞外段与配体 MAG 和 OMgp 也可以结合，从而发挥效应。因此，本部分实验中，我们通过原核表达系统，成功构建了含有 TAT 和 PirB 胞外段（PEP）的可溶性融合蛋白 TAT-PEP 和对照蛋白 TAT-mPEP，并且通过鉴定，与预期相符合。

随后，我们对 TAT-PEP 的生物学活性进行了鉴定。首先证实了 TAT 蛋白转导效能。结果表明，蛋白经腹腔注射后，TAT 结构能够使 TAT-PEP 有效穿过 BBB，并且分布于皮层半暗带内。虽然部分蛋白进入了神经元等细胞内，但这并不影响 TAT-PEP 在神经细胞间的分布。同时，根据脑内蛋白代谢的过程，该实验也明确了 TAT-PEP 合理时间给药时间，即每日腹腔注射该蛋白。其次，我们重点鉴定了 TAT-PEP 与 Nogo-A（Nogo66），MAG，OMgp 分子结合能力。结果显示，TAT-PEP 不仅能够与 Nogo-A（Nogo66）有很好的结合能力，与 MAG，OMgp 分子也具有很好的结合能力。同时，我们还明确了 TAT-PEP 可以逆转 Nogo-A（Nogo66），MAG，OMgp 抑制轴突生长的效应，并且能够拮抗 MAIs 的轴突抑制作用。研究报道，Atwal 等较先报道了 PirB 在轴突再生方面的作用，并且认为其与 Nogo-A、MAG、OMgp 具有很高的亲和力，能够与其结合，抑制轴突生长（??）；在利用转基因动物和脊髓损伤模

型的研究中发现，基因敲除 PirB 能够逆转长时程的轴突再生障碍，说明 PirB 具有更强的抑制效应（??）。Adelson 等新近研究发现，*pirb* 基因敲除的小鼠 MCAO 后，皮质脊髓束纤维和分支的生长得到明显改善，越过中线支配对侧区域的纤维数量明显增多，突触可塑性得到明显改善，模型动物的神经功能也得到恢复（??）。这些研究表明，在脑缺血损伤过程中，Nogo-A、MAG、OMgp 与 PirB 结合后可引起轴突生长抑制等负面效应。并且进一步提示，TAT-PEP 可以同时与三种抑制因子结合，从而影响三种抑制因子与神经元上的 PirB 受体结合，使其难以发挥抑制作用，这为下一步 TAT-PEP 的功能研究奠定了坚实基础。

本实验中我们没有直接阐明 Nogo-A(Nogo66), MAG, OMgp 与 PirB 和 TAT-PEP 结合的具体抗原表位和结合方式，这是由于实验室现有技术水平还难以精确完成，这些不足也为以后研究提供了思路，即可以通过体外合成不同截短体或分子结合靶点分析技术，来分别验证 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 与 PirB 结合的具体抗原表位，制备更为精准的蛋白多肽，从而更有效的拮抗 Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp 与 PirB 之间的结合，为治疗脑缺血损伤新型多肽药物的研发奠定实验和理论依据。

5 小结

本部分实验我们通过成功制备含有TAT结构和PirB胞外端结构的可溶性融合蛋白TAT-PEP，证实其能够与Nogo-A (Nogo66), MAG, OMgp结合并逆转他们的抑制效应。该实验还表明TAT-PEP腹腔注射后，TAT结构能够使TAT-PEP融合蛋白有效通过血脑屏障，并且分布于皮层半暗带内。同时，该实验也明确了蛋白合理时间的给药时间，即每日腹腔注射该蛋白，为下一步TAT-PEP的功能研究奠定了基础。同时，我们提出如下假说：**利用TAT-PEP阻碍Nogo-A, MAG, OMgp与PirB的相互作用，削弱PirB功能，更有效的促进脑缺血再灌注损伤后神经功能的恢复，这种方式可能会优于单独抑制的效果。**

实验四 TAT-PEP 对 SD 大鼠 MCAO 后脑梗死容积和神经功能的影响

1. 材料

1.1 实验动物

雄性SD大鼠，体重约280 g，购自地点同第一部分，做到善待实验动物，饲养、手术、给药处理及取材等环节均严格按照动物实验管理相关规定，并遵守National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications number 80-23, revised in 1996)。

1.2 主要仪器

1. 制冰机，三洋电子有限公司，日本
2. 低温高速离心机，Eppendorf公司，德国
3. 数显恒温水浴锅，常州国华电器有限公司，中国
4. 微量移液器，Eppendorf公司，德国
5. Mili-Q50纯水器，Millipore公司，美国
6. 凝胶成像系统，Alpha 公司，美国
7. 激光共聚焦荧光显微镜，Olympus公司，日本
8. PH计，Beckman Coulter公司，美国
9. 蛋白电泳仪，BIO-RAD公司，美国
10. 多功能摇床，LAB-LINE公司，美国
11. T迷宫实验设备，上海移数信息科技有限公司，中国
12. 电泳槽，BIO-RAD公司，美国
13. -80℃超低温冰箱，Thermo Forma公司，美国
14. 动物MRI，Bruker公司，瑞士
15. 大鼠脑槽，AS-II，美国

16. 大鼠rotarod仪, 7750 Ugo Basile, 意大利
17. 跳台回避实验设备, 上海晟昌有限公司, 中国
18. 不锈钢电极, Viasys Healthcare公司, 美国
19. 皮层诱发电位记录仪, Cadwell Cascade公司, 美国

1.3 主要试剂

1. 全蛋白提取试剂盒, KeyGEN, 中国
2. 小鼠抗 β -actin单克隆抗体 (ab8226), Abcam, 美国
3. 兔抗 β III-tubulin多克隆抗体 (ab18207), Abcam, 美国
4. 小鼠抗Tau单克隆抗体 (ab80579), Abcam, 美国
5. 驴抗小鼠FITC, Molecular Probes, 美国
6. HRP 标记的羊抗兔二抗, Pierce Biotechnology, 美国
7. BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天, 中国
8. 预染蛋白 Marker, Fermentas, 美国
9. SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 碧云天, 中国
10. HRP 标记的羊抗小鼠二抗, Pierce Biotechnology, 美国
11. 发光液, Thermo 公司, 美国
12. Lysis 裂解液, 碧云天, 中国
14. TTC 染液, 碧云天, 中国
15. 主要试剂配制: 同上一部分

2. 方法

2.1 MCAO 模型制备

MCAO模型制备, 动脉血压及脑血流监测同实验一部分。在MCAO后立刻给予200 mg/kgTAT-PEP腹腔注射, 之后每日注射给药, 观察不同时间点TAT-PEP的神经保护作用。本部分实验动物随机分为三组(n=6), 即Sham组, MCAO组, MCAO+TAT-PEP组 (n=6)。检测时均有不知分组情况的人员进行实验。

2.2 脑梗死容积测定

在 MCAO 后第 3 d 时, 应用 TTC 染色检测 TAT-PEP 对脑梗死容积的作用。简要方法如下:

- ① 深麻醉下取出大脑, 冰生理盐水中 10 min。
- ② 放入脑槽, 脑薄片约为 2 mm 厚度 (沿冠状面逐序切)。2% 浓度 2,3,5-氯化三苯四唑 (TTC) 溶液浸泡脑薄片, 位置朝向相同, 在恒温水浴箱中孵育 (37°C, 30 min)。
- ③ 待染色效果合适后 (白色区域为梗死区域, 红色区域为正常脑组织区域), 转入 4% PFA 中固定, 过夜, 24 h 后拍照并分析。应用 Adobe photoshop cs3 图像处理软件, 计算脑梗死容积, 并进行矫正。

$$\text{脑梗死容积百分比} = \frac{\sum(\text{对侧正常脑组织容积} - \text{同侧正常脑组织容积})}{\sum(\text{对侧正常脑组织容积})}$$

2.3 神经功能学 Garcia 评分

MCAO 后 24 h, 48 h 和 72 h 后, 应用 Garcia 评分量表^[130]检测实验动物的神经功能情况。主要检测下表所示内容, 满分为 18 分, 其中每项为 0-3 分, 详见下表。

| 测试内容 | 得分 | | | |
|----------------------|---------|-----------|---------------------|----------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5min 笼内自由活动 | 无活动 | 几乎不能活动 | 能活动, 但活动范围未达到笼内 3 面 | 活动范围至少达到笼内 3 面 |
| 四肢活动对称性 | 左侧肢体无活动 | 左侧肢体可轻微活动 | 左侧肢体可缓慢活动 | 双侧肢体活动对称 |
| 前肢的对称性 (提起尾巴时前肢伸展情况) | 左前肢无法活动 | 左前肢仅能轻微伸展 | 左前肢活动及伸展不如右侧 | 双侧前肢可对称伸展 |
| 金属鼠笼中的攀爬情况 | 无 | 不能攀爬 | 左侧稍弱 | 能正常攀爬 |
| 触摸双侧躯干反应 | 无 | 左侧无反应 | 左侧反应弱 | 反应对称 |
| 触须反应 | 无 | 左侧无反应 | 左侧反应弱 | 反应对称 |

2.4 磁共振 (MRI) 成像技术检测长时程脑梗死区变化

在 MCAO 后第 3 d, 7 d, 28 d 时, 使用 7T 小动物 MRI 成像系统检测 TAT-PEP 对脑梗死容积的作用。简要方法如下:

- ① 大鼠麻醉后, 俯卧位, 头部置入线圈中心。
- ② 以视交叉点为原点, 应用快速采集弛豫增强序列扫描 (沿冠状切面)。具体

参数为回波时间 (TE) 为 60 ms, 重复时间 (TR) 为 3000 ms, 厚度为 0.5 mm, 无间距。视场范围为 2.56 cm × 2.56 cm。获得 T2 加权 (T2WI) 图像, 之后利用软件进行图像分析, 评估脑梗死容积及脑缺血损伤程度。

2.5 mNss 神经功能评分

在 MCAO 后第 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时, 应用神经功能缺损评分 (Modified neurological severity scores, mNSS) 检测 TAT-PEP 对实验动物神经功能的改善。Mnss 评分系统综合了运动, 感觉, 平衡和反射等测试, 该评分系统的记分在 0-18 分之间 (18 分为神经功能缺陷最大值, 0 分为神经功能正常值), 其是评估局灶性脑缺血损伤后实验动物神经功能缺损的最常用的一种方法。简要过程如下:

Modified neurological severity scores (mNSS)

- 一. 运动: 提尾
 - 1 前肢屈曲
 - 1 后肢屈曲
 - 1 30 秒内向垂直轴转动范围超过 10°
- 大鼠放在地板上(0- 3 分)
 - 0 正常行走
 - 1 不能直线行走
 - 2 向瘫痪侧转圈
 - 3 向瘫痪侧倾倒
- 二 感觉
 - 1 定向测试 (视觉和触觉测试)
 - 1 本体感觉测试 (深感觉, 先将爪置于桌子边缘, 然后压爪, 刺激肢体肌肉收缩)
- 三. 平衡木测试 (0-6 分)
 - 0 能在平衡木上保持稳定
 - 1 四肢悬挂在平衡木上
 - 2 仍能挂在平衡木上, 但有一肢体不能抓住
 - 3 挂在平衡木上, 有两个肢体不能抓住或在上面旋转超过 60 秒
 - 4 试图保持平衡但是掉落 (大于 40 秒)
 - 5 试图保持平衡但是掉落 (大于 20 秒)

6 掉落：没有试图保持平衡或紧握平衡木（小于 20 秒）

四. 反射消失或异常活动：

- 1 耳廓反射（刺激外耳道时震动头）
- 1 角膜反射（用棉签刺激角膜眨眼）
- 1 惊吓反射（用手快速轻拍硬纸板，看是否有反应）
- 1 癫痫发作，肌阵挛，肌张力障碍

备注：不能执行任务或反射缺乏评分 1 分，1-6 分轻度损伤，7-12 分中度损伤，13-18 分重度损伤。

2.6 错步分析实验

在 MCAO 前和 MCAO 后第 2 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时，应用错步或称失足（Foot fault）实验，评估 TAT-PEP 对实验动物肢体的运动和协调能力的作用。具体操作如下：

① 自制的网屏，上有网眼（3.5 cm×3.5cm 大小），距离地面约 60 cm 米高。

② MCAO 前，所有实验动物在网屏上接受连续 3 天的适应性训练，让其自由穿过网屏，每天 3 次，每次间隔 10 min。若大鼠会前肢踩空，放入格孔或网眼中，即称为为错步或失足 1 次。

③ 实验动物正式评估在 MCAO 前，作为基础值（baseline），在 MCAO 后最为评估值，每日相同时间、地点操作（硕论，**强制性运动疗法联合法舒地尔对大鼠急性脑**）。

2.7 转轴实验

在 MCAO 前和 MCAO 后第 2 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时，应用转轴实验（rotarod）评估 TAT-PEP 对实验动物身体协调，平衡能力等运动功能改善和神经功能恢复的作用。具体操作如下：

① 测试一般分为两个阶段，MCAO 前进行适应性训练，各组实验动物放在机械滚轴，让其保持平衡且连续的运动，旋转柱起始速度设定为 4 rpm，最大速度设定为 40 rpm，每组测试时间一般设定为 300 s，记录从放在轴上的时间到掉下的时间，作为基础值（baseline），若前 30 s 内实验动物从轴上跌落被计入失足，可重新放回继续测试。

② MCAO 后的测试与上述相同，也记录记录从放在轴上的时间到掉下的时间。实验动物在旋转柱上持续时间即为其所得分值，时间越长代表得分越高值。（受体依赖性 PAF。。。）

2.8 肢体放置实验

在 MCAO 前和 MCAO 后第 3 h, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时，应用肢体放置（Limb placement）实验，评价 TAT-PEP 对实验动物前后肢本体感觉和触觉的作用（**Brain Repair by Hematopoietic Growth Factors in a Rat Model of Stroke**）。具体操作如下：

① 轻轻握住并拿起大鼠，缓缓将其向桌面方向放低至 10 cm 左右，正常表现：实验动物双前肢外伸扑向桌面。

② 轻轻握住并拿起大鼠，使双前肢接触桌缘，托下颌使鼠头朝上抬起约 45°，正常表现：实验动物双前肢仍接触桌缘。

③ 轻轻握住并拿起大鼠，正对桌缘，正常表现：实验动物双前肢伸到桌上。

④ 轻轻握住并拿起大鼠，以侧面移向桌缘，正常表现：实验动物一侧前、后肢伸向桌面。该测试要前、后肢分别记分。

⑤ 大鼠轻轻放在桌边，从后向桌缘轻推，正常表现：实验动物紧抓桌缘。

⑥ 大鼠轻轻放在桌边，从侧面向桌缘轻推，正常表现：实验动物紧抓桌缘。该测试要前、后肢分别记分。

注意，本实验 6 项测试，实际含个 8 分数，总分为 16 分。评分标准：无放置为 0 分；不完全放置或迟疑（>2 秒）为 1 分；迅速正确放置为 2 分。将 6 项测试分数相加所得总分数即为测试结果。

2.9 运动诱发电位

在 MCAO 后第 28 d 时，应用神经电生理检测仪和双极电刺激检测运动诱发电位（motor evoked potential, MEP），评估 TAT-PEP 对实验动物皮层运动去椎体神经元轴突兴奋性的作用。具体方法如下：

① 用神经电生理检测仪进行检测，检测时间点为 MCAO 后第 28 d。

② 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉，把实验动物固定在立体定位仪上。将阳极刺激电极放于大脑右侧运动皮层脑膜表面，阴极电极夹在舌尖。

③ 直流电脉冲刺激，强度为 19.5Ma，波宽 2 ms，频率为 4c/s。

④ 两记录电极垂直于腓肠肌肌腹，地线固定大鼠腰部，分别刺激，检测和记录。

⑤ 大鼠 MEP 直接波为 D 波，呈单个正相波，潜伏期短，反映皮层运动去椎体神经元轴突兴奋性的作用。本实验主要记录该波的波幅。

2.10 被动回避平台试验

在 MCAO 后第 28 d 时，应用被动回避平台实验，评价 TAT-PEP 对实验动物学习和记忆保持能力的作用。原理为：由于大鼠的探索天性，放置平台上时，其立即跳下平台，受到电击后，为了躲避刺激而跳至平台上，如此反复。具体操作如下：

① 将大鼠放置于塑料箱（不通电）中适应 3 min。

② 将大鼠放置于平台上，并给予 40 mV 的电刺激（脉冲式），电击持续 5 min。

③ 间隔 24 h 后，重复试验，记录大鼠第一次跳下平台后四肢均接触金属棒的潜伏期（latency）和大鼠在 5 min 内跳下平台并受到电击的次数（Error number）。

2.11 T 迷宫实验

在 MCAO 后第 28 d 时，应用 T 迷宫实验，评价 TAT-PEP 对实验动物空间工作记忆及参考记忆能力的作用。具体操作如下：

① 空间工作记忆能力测试：先将大鼠放入装置起始端，将闸门打开同时给予干扰，并于 5 s 后立即电击，模型动物首次进入的目标箱视为“错误”。之后持续点击，直至其进入相反的目标箱视为“正确”。随后间歇 35 s，再次开始直至其能正确的一次回避，统计正确次数。

② 参考记忆测试：7 d 后重复上述实验，模型动物能够在连续的 6 次测试中 5 次正确回避，便可终止，统计达到这一标准所需的次数。每次实验后用 75%酒精清理迷宫。

2.12 统计学方法

同上。全运动功能评分采用 Kruskal-Wallis 非参检验，若存在组间差异，以 Mann-Whitney U 检验 Bonferroni 进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示有显著统计学差异。

2.13 技术路线图

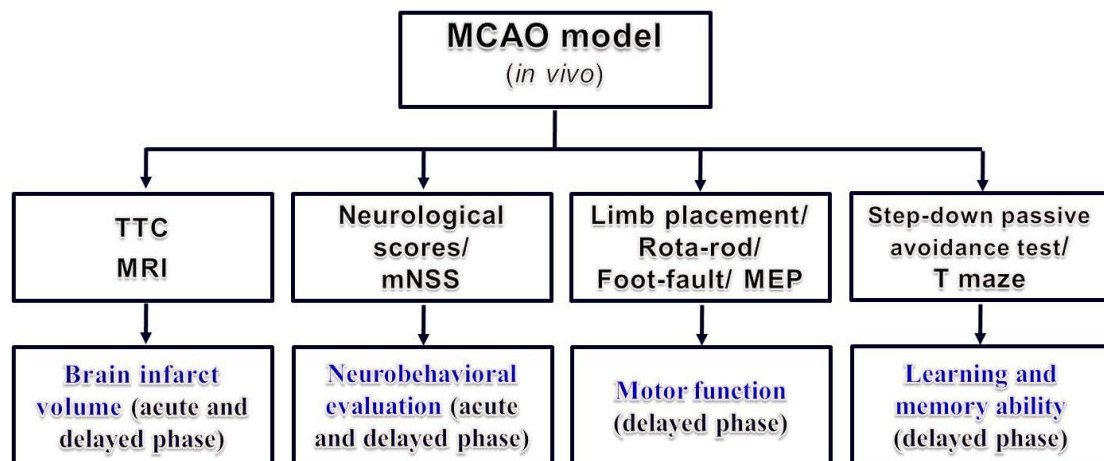


图 4-1 本部分技术路线图

3 结果

3.1 TTC 染色结果

缺血再灌注后 72 h 行 TTC 染色，结果显示，与 Sham 组相比，MCAO 组实验动物出现明显的脑梗死。与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组实验动物脑梗死容积明显变小 ($P < 0.05$) (如图?? 所示)。该结果说明，TAT-PEP 治疗后能够显著减少 MCAO 后实验动物的脑梗死容积，减轻脑损伤。

图 4-2 (加*) TTC 染色检测脑梗死容积 (n=6, 每组)。A 为 MCAO 后 72 h 各组实验动物代表性脑片的 TTC 染色效果图。B 为各组脑梗死容积百分比的统计结果 (* $P < 0.05$ vs. Sham 组; # $P < 0.05$ vs. MCAO 组)。

3.2 神经功能评分结果

缺血再灌注后 24 h 的 Garcia 评分结果显示，与 Sham 组相比，MCAO 组神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$)；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组神经功能评分没有显著差异，无统计学意义 ($P > 0.05$)。缺血再灌注后 48 h 和 72 h 的 Garcia 评分结果显示，与 Sham 组相比，MCAO 组神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$)；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组神经功能评分显著提高 ($P < 0.05$) (如图?? 所示)。该结果表明，TAT-PEP 治疗后能够显著提高 MCAO 后急性期实验动物的神经功能评分，促进神经

功能恢复。

图 4-3 (加*) Garcia 评分检测 MCAO 后 24 h, 48 h, 72 h 时 TAT-PEP 对各组实验动物神经功能的作用 (n=6, 每组) (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.3 磁共振成像结果

利用磁共振弥加权技术动态观察实验动物脑梗死容积的变化情况。如图??, Sham 组实验动物的磁共振 T2 加权图像显示没有明显的高密度影区, 说明脑组织完好, 无脑梗死区 (加 Sham 组图片)。缺血再灌注后 3 d, 7 d 和 28 d 的磁共振 T2 加权图像显示, MCAO 组实验动物的缺血脑侧有明显的高密度影区, 而 TAT-PEP 组实验动物缺血脑侧的高密度影区较 MCAO 组有所减少 ($P<0.05$)。图像处理进一步显示, TAT-PEP 组实验动物缺血脑侧的橙色区域较 MCAO 组明显减少。该结果进一步说明, TAT-PEP 治疗后能够显著减少脑梗死容积, 减轻脑损伤, 且这种作用的发挥具有长时程效应。

图 4-4 (加*) 磁共振成像技术检测 MCAO 后 3 d, 7 d, 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物脑梗死容积的作用 (n=6, 每组)。A 为经图像处理后的 DWI 信号成像结果。B 为 T2WI 信号成像结果。C 为 T2WI 信号成像显示脑梗死容积的统计分析图 (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.4 mNSS 评分结果

如图?? 所示: 缺血再灌注后 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 时, 分别对各组实验动物进行 mNSS 评分。结果显示, 与 Sham 相比, MCAO 组实验动物各时间点的 mNSS 评分显著增加 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组实验动物各时间点的 mNSS 评分显著降低 ($P<0.05$), TAT-PEP 处理后能够显著改善模型动物再灌注后长期的运动, 感觉, 平衡和反射等整体神经功能。

图 4-5 mNSS 评分检测 MCAO 后 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物神经功能的作用 (n=6, 每组) (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.5 错步实验结果

缺血再灌注后 2 d, 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 时, 分别对各组实验动物进行错步分析。结果显示, 与 Sham 相比, MCAO 组实验动物各时间点的错步次数显著增加 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组实验动物在 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 的错步次数显著降低 ($P<0.05$), 而第在 2 d 时与 MCAO 组相比没有统计学差异 ($P>0.05$)。TAT-PEP 处理后能够显著改善模型动物再灌注后长期的肢体运动和协调功能。

图 4-6 错步分析实验检测 MCAO 后 2 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物肢体运动和协调功能的作用 (n=6, 每组) (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.6 转棒实验结果

缺血再灌注后 2 d, 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 时, 分别对各组实验动物进行转棒实验。结果显示, 与 Sham 相比, MCAO 组实验动物各时间点的在转棒上停留的时间显著减少 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组实验动物在 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 的在转棒上停留的时间显著增加 ($P<0.05$), 而第在 2 d 时与 MCAO 组相比没有统计学差异 ($P>0.05$)。TAT-PEP 处理后能够显著改善模型动物再灌注后长期的肢体力量, 运动, 协调和平衡等功能。

图 4-7 转棒实验检测 MCAO 后 2 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物肢体力量, 运动, 协调和平衡等功能的作用 (n=6, 每组) (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.7 肢体放置实验结果

缺血再灌注后 2 h, 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 时, 分别对各组实验动物进行肢体

放置实验。结果显示，与 Sham 相比，MCAO 组实验动物各时间点的肢体放置评分明显降低 ($P<0.05$)；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组实验动物在 MCAO 后 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 时肢体放置评分明显增加 ($P<0.05$)，在 MCAO 后 2 h 时没有明显差别 ($P>0.05$)。该结果说明，TAT-PEP 处理后能够显著改善模型动物再灌注后长期的前后肢体本体感觉和触觉功能。

图 4-8 肢体放置实验检测 MCAO 后 3 h, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物肢体本体感觉和触觉的作用 ($n=6$, 每组) (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.8 运动诱发电位结果

运动诱发电位 (MEP) 结果显示，在 MCAO 后 28 d 时，与 Sham 相比，MCAO 组实验动物左前肢体 MEP 的振幅明显降低 ($P<0.05$)；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组实验动物左前肢体 MEP 的振幅明显增加 ($P<0.05$)；与 Sham 相比，MCAO 组实验动物左后肢体 MEP 的振幅明显降低 ($P<0.05$)；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组实验动物左后肢体 MEP 的振幅明显降低 ($P<0.05$)。该结果说明，TAT-PEP 能够显著改善模型动物再灌注后感觉运动皮层椎体神经元轴突兴奋性及其神经功能；该结果也进一步说明，感觉运动皮层与其支配肢体之间的神经冲动传递功能得到明显改善。

图 4-9 运动诱发电位评估 MCAO 后 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物 MEP 直接波 D 波波幅的作用 ($n=6$, 每组)。A, C 为左前肢和左后肢 MEP (D 波) 波幅图，红色双向箭头表示波幅大小。B, D 为该波波幅的统计图(* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组; FL: forelimb, 前肢; HL: hindlimb, 后肢; Lt: left, 左; Rt: right, 右)。

3.9 被动回避平台实验结果

结果显示，在 MCAO 后 28 d 时，与 Sham 相比，MCAO 组实验动物潜伏期 (latency) 时间明显缩短 ($P<0.05$)；与 MCAO 组相比，TAT-PEP 组实验动物的潜伏期明显延长 ($P<0.05$)；与 Sham 相比，MCAO 组实验动物的错误次数明显增加

($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组实验动物的错误次数明显减少($P<0.05$)。该项神经功能检测结果说明, TAT-PEP 能够显著促进模型动物 MCAO 后短期记忆能力的恢复。

图 4-10 被动回避平台实验检测 MCAO 后 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物短期学习与记忆的巩固和保持能力的作用 (n=6, 每组)。A 为潜伏期的统计分析图; B 为错误次数的统计分析图 (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.10 T 迷宫实验结果

结果显示, MCAO 组实验动物第一次正确回避所需的平均实验次数与 Sham 组相比显著增加($P<0.05$), 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组的次数显著减少($P<0.05$)。MCAO 组实验动物的平均正确回避次数与 Sham 组相比显著增加($P<0.05$), 与 MCAO 组相比, TAT-PEP 组的正确回避次数显著减少($P<0.05$)。该项神经功能检测结果说明, TAT-PEP 能够显著提高模型动物 MCAO 后的空间工作记忆和参考记忆, 进一步证实了 TAT-PEP 对模型动物的长期神经保护作用。

图 4-11 T 迷宫实验检测 MCAO 后 28 d 时 TAT-PEP 对各组实验动物空间工作记忆和参考记忆的作用 (n=6, 每组)。A 为第一次正确回避所需平均次数的统计分析图; B 为平均正确回避次数的统计分析图 (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

4 讨论

本部分实验, 我们主要通过核磁共振成像技术和多种神经行为学方法, 鉴定 TAT-PEP 长时程的神经保护作用。TTC 染色结果证明 TAT-PEP 能够有效减轻 MCAO 后 3 d 时脑梗死容积。Garcia 评分显示 TAT-PEP 能够显著改善 MCAO 后急性期神经功能的恢复, 从行为学上证实了 TAT-PEP 对模型动物 MCAO 后急性期的神经保护作用。但在 MCAO 后 1 d 时的 Garcia 评分结果 MCAO+TAT-PEP 组与 MCAO 组并没有统计学差异, 说明可能此时 TAT-PEP 的作用还没体现出来。Adelson 等研究中发现,

pirb 野生型 (WT) 的小鼠与 *pirb* 敲除 (KO) 的小鼠相比, MCAO 后 1 d 其脑梗死容积没有统计学差异, 这也能也是上述问题的一个原因。接下来, 我们还利用 MRI 成像技术检测了长时程脑梗死溶解的变化, 发现 TAT-PEP 能够显著减少 MCAO 后 3 d, 7 d 和 28 d 时的脑梗死容积。Adelson 等研究也发现, *pirb* KO 的小鼠与 *pirb* WT 的小鼠相比, MCAO 后 7 d 其脑梗死容积显著减少, 这也进一步证实了上述结果。

局灶性脑缺血再灌注损伤后, 感觉运动皮层受损严重, 如果得不到及时治疗, 将会严重影响躯体运动和感觉等神经功能。在本研究中, 我们通过 mNSS 评分发现 TAT-PEP 能够显著改善模型动物再灌注后长期的运动, 感觉, 平衡和反射等整体神经功能; 通过错步实验发现 TAT-PEP 能够显著改善模型动物再灌注后长期的肢体运动和协调功能; 通过转棒实验发现能够显著改善模型动物再灌注后长期的肢体力量, 运动, 协调和平衡等功能; 通过肢体放置实验发现, TAT-PEP 能够显著改善模型动物再灌注后长期的前后肢体本体感觉和触觉功能; 通过运动诱发电位实验 TAT-PEP 能够显著改善模型动物再灌注后感觉运动皮层椎体神经元轴突兴奋性及神经冲动传递的功能。这些神经功能的恢复与脑梗死容积的减轻相一致, 充分证明了 TAT-PEP 的神经保护作用, 并且进一步说明 PirB 在皮层半暗带内的高表达是导致神经功能障碍的一个重要原因。但是 Omoto 等 (Omoto, S., Ueno, M., Mochio, S., Takai, T., and Yamashita, T. (2010).) 研究发现, *pirb* 缺失并不能缓解脑创伤后轴突可塑性和神经功能的恢复, 这可能是由于其选择的模型与本实验中的不同。因为在 Adelson 等^[84]研究中发现, *pirb* KO 的小鼠与 *pirb* WT 的小鼠相比, 神经功能得到了明显的恢复, 这与我们的研究相类似。

此外, 感觉运动皮层除了主管感觉和运动外, 还对学习和记忆有着重要作用。我们通过被动回避平台实验和 T 迷宫实验进一步证实 TAT-PEP 能够显著促进模型动物缺血再灌注后短期记忆的巩固和保持, 改善空间工作记忆和参考记忆。课题组前期研究中发现, TAT-PEP 可以促进全脑再灌注损伤后学习和记忆的恢复, 进一步证明了 TAT-PEP 的神经保护作用。然而, Adelson 等研究不同, Nakamura 等 *pirb* 基因敲除的小鼠并没有出现较好的皮质脊髓束重建, 神经功能也没有得到明显恢复。这可能是由于他们所使用的转基因动物模型及研究手段不同而造成的结果差异。因此, 对于 PirB 在脑缺血损伤中的作用和机制还需要进一步深入探讨和阐明。

以往研究证实, 脑缺血再灌注损伤后, 半暗带内神经元会发生变性、凋亡, 导致神经元数量的下降; 轴突会发生断裂、瓦解, 导致再生困难; 突触可塑性和神经

回路受损，导致神经冲动传递和信息发放、接收的障碍。而 TAT-PEP 究竟是通过何种机制发挥神经保护作用的呢？究竟是单一的机制还是多种机制共同发挥作用呢？这将是接下来研究的重点内容。

5 小结

本部分实验，我们主要通过核磁共振成像技术和多种神经行为学方法，明确了 TAT-PEP 长时程的神经保护作用，为 TAT-PEP 的可能的临床应用奠定了实验基础，也为下一步的机制研究提供了丰富线索。

实验五 TAT-PEP 对脑缺血再灌注损伤后轴突再生、皮质脊髓束和突触可塑性重塑作用及机制研究

1. 材料

1.1 实验动物

雄性SD大鼠，体重约280 g；SD大鼠孕鼠，体重约400 g，购自地点同第一部分，做到善待实验动物，饲养、手术、给药处理及取材等环节均严格按照动物实验管理相关规定，并遵守National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications number 80-23, revised in 1996)。

1.2 主要仪器

1. 脑血流监测仪，Perimed公司，瑞典
2. 冰冻切片机，Leica公司，德国
3. 制冰机，三洋电子有限公司，日本
9. 多功能摇床，LAB-LINE公司，美国
4. 倒置显微镜，Olympus公司，日本
5. 激光共聚焦荧光显微镜，Olympus公司，日本
6. 凝胶成像系统，Alpha 公司，美国
10. Mili-Q50纯水器，Millipore公司，美国
7. 蛋白电泳仪，BIO-RAD公司，美国
8. 电泳槽，BIO-RAD公司，美国
11. PH计，Beckman Coulter公司，美国
13. 啮齿动物断头器，上海博通公司，中国
14. 大鼠脑立体定位注射仪，Narishige公司，日本
15. 微量移液器，Eppendorf公司，德国
12. -80℃超低温冰箱，Thermo Forma公司，美国
16. 低温高速离心机，Heraeus公司，德国

17. CO₂ 恒温细胞培养箱, Hereaus公司, 德国
18. 低氧细胞培养箱, DWS公司, 英国
19. 数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司, 中国
20. 超净工作台, 吴江净化设备总厂, 中国
21. 各型玻片, Fisher, 美国
22. 全自动酶标仪, Bio Rad公司, 美国
23. 各型培养板及培养皿, CORNING, 美国
24. 离心管, CORNING公司, 美国
25. EP管, CORNING公司, 美国
26. 相差显微镜, Nikon公司, 日本
27. 细胞计数板, 南京裕安公司, 中国
29. 精密电子天平, Sartorius公司, 美国

1.3 主要试剂

1. 兔抗NF200多克隆抗体 (ab62024), Abcam公司, 美国
2. 兔抗MAP2单克隆抗体 (ab96426), Abcam公司, 美国
3. 兔抗SYN多克隆抗体 (ab203060), Abcam公司, 美国
4. 小鼠抗NeuN单克隆抗体 (ab104224), Abcam公司, 美国
5. 小鼠抗GAP43单克隆抗体 (???) 公司
6. 兔抗POSH多克隆抗体 (ab203060), Abcam公司, 美国
7. 小鼠抗 β -actin单克隆抗体 (ab8226), Abcam, 美国
8. 小鼠抗RhoA单克隆抗体 (ab104224), Abcam公司, 美国
9. Fluoro-Jade C (FJC) 染料, Chemicon 公司, 美国
10. 羊抗小鼠FITC, Burlingame公司, 美国
11. HRP 标记的羊抗兔二抗, Pierce Biotechnology 公司, 美国
12. 全蛋白提取试剂盒, KeyGEN 公司, 中国
13. SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 碧云天, 中国
14. 戊巴比妥钠, 上海哈灵生物有限公司, 中国
15. 发光液, Thermo 公司, 美国

16. BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天, 中国
17. 多聚赖氨酸, Sigma公司, 美国
18. Neurobasal, Gibco公司, 美国
19. B27, Gibco公司, 美国
20. 预染蛋白 Marker, Fermentas 公司, 美国
21. 胎牛血清, Gibco公司, 美国
22. 青链霉素混合液(双抗), 美国 Hyclone 公司
23. HRP 标记的羊抗小鼠二抗, Pierce Biotechnology 公司, 美国
24. 谷氨酰胺, 美国 Hyclone 公司
25. DMEM高糖培养基, Gibco公司, 美国
26. D-hanks 溶液, Sigma公司, 美国
27. 胰蛋白酶, 沃尔森公司, 中国
28. MTT, Sigma公司, 美国
29. DMSO, Sigma公司, 美国
30. TUNEL试剂盒, Roche公司, 德国
31. Lysis 裂解液, 碧云天, 中国
32. Nissl 染料, 碧云天, 中国
33. 主要试剂配制: 同前

2. 方法

2.1 局灶性脑缺血再灌注模型制作

- ① MCAO 模型制备与实验一部分相同。
- ② 下述实验分组: 实验动物随机分为三组 (n=6), 即Sham组, MCAO组, MCAO+TAT-PEP组 (n=6)。

2.2 BDA 顺行神经示踪方法

应用BDA神经示踪技术检测TAT-PEP对皮质脊髓束重塑的作用。该方法[参照文献方法\[20,38,39\]](#), 具体操作如下:

① 各组实验动物在MCAO造模成功后第14 d, 腹腔注射戊巴比妥钠进行深麻醉, 将其头部固定在脑定位仪上, 四肢同时伸展固定。暴露颅骨结构, 用酒精消毒, 生理盐水将颅骨表面去膜, 擦净。

② 以前囟为中心, 找到大鼠左侧感觉运动皮层区域 (A表示以前囟为中心向前, L则表示以前囟为中心向侧方), 定位四点: A = -1.0 mm, L = +1.0 mm; A = +4.0 mm, L = +1.0 mm; A = -1.0 mm, L = +5.0mm; A = +4.0mm, L = +5.0 mm。用骨钻去骨瓣去除, 制备约 5 mm×4 mm的骨窗, 轻轻显露左侧感觉运动皮层区域。

③ 配置10%的生物素化BDA溶液 (用0.01 mol/L的磷酸盐生理盐水缓冲液配置, Ph为7.3)。用10 μ l 微量进样器吸取BDA溶液, 注射点选择为: 3.8 L/1.2A, 3.4 L/0.7A, 3.4 L/0.2A, 3.6 L/0.3P, 3.4 L/1.3P, 2.2 L/1/3P, 2.2 L/2.3P, 2.2 L/2.8P, and 3.0 L/3.3P。进针深度为0.5, 1, 1.5 mm。每点注射 1 μ l, 总量9 μ l。每点注射时要慢慢注射, 注射后针头停留在针道内10 min, 尽可能减少注射液外露。

④ 注射约3 h后, 将苏醒的实验动物 (SD大鼠) 提尾悬空, 右上肢出现轻微屈曲抱胸动作, 次症状可持续2-4 h 后, 可作为示踪剂成功注入左侧大脑感觉运动皮层区的标准。示踪剂注射完毕后, 用骨蜡密闭伤口。

⑤ 注射后第7 d时 (即MCAO后21 d), 大鼠灌注, 取脑组织做冰冻切片。并行免疫荧光组织化学染色 (NeuN, 1:2000) 观察示踪剂在脑组织分布情况。

⑥ 注射后第14 d时 (即MCAO后28 d), 大鼠灌注, 取脊髓颈膨大 (C3-C5) 节段组织做冰冻切片, 加入生物素-链霉亲和素-FITC (biotin -streptavidin-FITC), 室温避光孵育1 h, 在Olympus BX-60荧光显微镜下观察各组皮质脊髓束轴突及其分支生长和分布情况。

2.3 免疫荧光组织化学染色

在MCAO后第28 d时, 应用NF200, MAP2, SYN, NeuN免疫荧光组织化学染色检测TAT-PEP对半暗带内神经元轴突, 树突及突触可塑性的作用。脑组织灌注, 取材等同第一部分。为明确PirB在缺血半暗带组织及细胞的表达情况, 行PirB与NeuN (神经元细胞标记物) 免疫荧光组织化学双标记染色。具体步骤为: 取MCAO后第28 d时的冰冻切片, 晾置玻片30 min (室温), 用画圈笔圈好组织周围, 用0.01M PBS溶液轻轻漂洗切片 (5 min每次×3次) 后, 加入抗原封闭液于湿盒中室温进行封闭1 h (3

ml/L tritonX100+10 g/L胎牛血清白蛋白)，弃去封闭液，入一抗NF200（1：500），MAP2（1：1000），SYN（1：200），NeuN（1：2000），4℃过夜，0.01M PBS溶液漂洗（5 min每次×3次），入二抗（羊抗小鼠FITC，1:5000），避光室温孵育2 h，避光漂洗3次，50%甘油封片后Olympus BX-60荧光显微镜下观察。

2.4 Western blot 检测 POSH, RhoA, Tau, GAP43 表达

在 MCAO 后第 28 d 时，应用 Western blot 检测 TAT-PEP 对半暗带内轴突及突触相关蛋白 POSH, RhoA, GAP43 表达的作用。取材及蛋白制备方如实验一部。其中一抗 POSH（1：500），RhoA（1：1000），GAP43（1：2000）， β -actin（1：5000）；二抗（HRP 标记的羊抗兔二抗，1：1000，HRP 标记的羊抗小鼠二抗）。

2.5 皮层神经元原代培养：

取孕16.5-18.5 d（E 16.5-18.5 d）的SD大鼠脱臼处死，进行常规无菌消毒，取出胎鼠，分离鼠胚胎。其余方法同第二部分。

2.6 神经元离体氧糖剥夺模型

原代培养的皮层神经元接种 24 h 或至第 7 d 时，小心弃细胞培养液，用 PBS 轻轻漂洗 3 次。其余方法同第二部分。

2.7 观察 TAT-PEP 对 OGD 后神经元轴突的作用

首先利用活细胞工作站观察 TAT-PEP 对 OGD 后神经元轴突的作用，方法如下：

① 将原代培养的皮层神经元以 1×10^4 cell/ml 密度接种于多聚赖氨酸（50 mg/mL）包被的共聚焦培养皿。随机分为 3 组（n=6）：即 Normal 组，OGD 组和 OGD+TAT-PEP 组。

② 原代培养的皮层神经元接种 24 h 后，行 OGD。OGD 复氧后即刻给予 TAT-PEP（100 μ g/L）处理，24 h 后将含有神经元的共聚焦培养皿置于活细胞工作站的小室（其内温度为 37℃，混合其他为 5% CO₂，21% O₂）观察神经元轴突生长和分支数量情况。设置自动记录时间为 t₀，t₁₀，t₂₀，t₃₀，t₄₀ 五个时间点，其中 t₀ 与 t₁₀ 相隔 5000 s。分别统计神经元最长神经突起生长的平均速度和最长神经突起的分支点数量。

其次，利用明场显微镜观察 TAT-PEP 对 OGD 后神经元轴突的作用，方法如下：

① 将原代培养的皮层神经元以 1×10^4 cell/ml 密度接种于多聚赖氨酸（50 mg/mL）包被的共聚焦培养皿。随机分为 3 组（n=6）：即 Normal 组，OGD 组和

OGD+TAT-PEP 组。

② 原代培养的皮层神经元至第 7 d 时,行 OGD,OGD 复氧后即刻给予 TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 处理, 3 d 后将含有神经元的共聚焦培养皿置于明场显微镜下观察并记录神经元最长神经突起的平均长度和最长神经突起的分支点数量。

2.8 观察 TAT-PEP 对 OGD 后神经元生长锥的作用

应用轴突生长相关蛋白 GAP43 的免疫荧光细胞化学染色检测 TAT-PEP 对 OGD 后神经元生长锥的作用。方法如下:

① 将原代培养的皮层神经元以 $1\times 10^4\text{cell/ml}$ 密度接种于多聚赖氨酸 (50 mg/mL) 包被的共聚焦培养皿。随机分为 3 组 ($n=6$): 即 Normal 组, OGD 组和 OGD+TAT-PEP 组。

② 原代培养的皮层神经元至第 7 d 时,行 OGD,OGD 复氧后即刻给予 TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 处理, 3 d 后 4% PFA 于室温固定 1 h, 0.01M PBS 轻轻漂洗 3 次 (5min/次)。加入小鼠抗 GAP43 单克隆抗体 (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 漂洗后, 加二抗: 驴抗小鼠 FITC (1:1000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h (避光)。PBS 漂洗后, 50%甘油封片, Olympus BX-60 荧光共聚焦显微镜观察并记录生长锥情况。

2.9 膜片钳技术检测 TAT-PEP 对 OGD 后神经元兴奋性的影响

① 各组实验动物腹腔注射戊巴比妥钠进行深麻醉后断头, 取出脑组织, 制备冠状脑组织切片, 厚约 350 μm 。

② 脑片用无糖无血清的培养液漂洗, 之后放入无糖的脑组织培养液中, 并置于 10% H_2 , 5% CO_2 , 85% N_2 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 的低氧恒温密闭培养箱中, 培养 30 min, 并实时监测培养箱内的各气体浓度。

③ 随后取出培养皿, 换为正常的脑组织培养液, 置于正常培养箱 (5% CO_2 , 21% O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$) 中, 加入 TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$), 培养 7 d 后进行后续实验, 期间隔天半量换液, 并加入 TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$)。

④ OGD 后第 3 d 时, 于荷包牡丹硷 (10 μM) 中记录自发性兴奋性突触后电流。双头刺激电极放于缘前皮层的侧室, 记录自发性兴奋性突触后电流基础值及频率和波幅 (每间隔 20 s 扫面 10 次)。

2.10 Western blot 检测 POSH, RhoA, GAP43 表达

原代培养的大脑皮层神经元以 5×10^6 cell/ml 的密度接种于 6 孔板上。至第 7 d 时, OGD 复氧后即刻给予 TAT-PEP (100 μ g/L) 处理, 第 3 d 时进行细胞全蛋白提取。方法如下: 余下步骤同实验一。其中一抗 POSH (1: 500), RhoA (1: 1000), Tau (1: 2000), GAP43 (1: 2000), β -actin (1: 5000); 二抗 (HRP 标记的羊抗兔二抗, 1: 1000, HRP 标记的羊抗小鼠二抗)。

2.11 统计学分析方法

应用 Image-Pro plus 5.1 软件统计分析。其余同前述。

2.12 技术路线

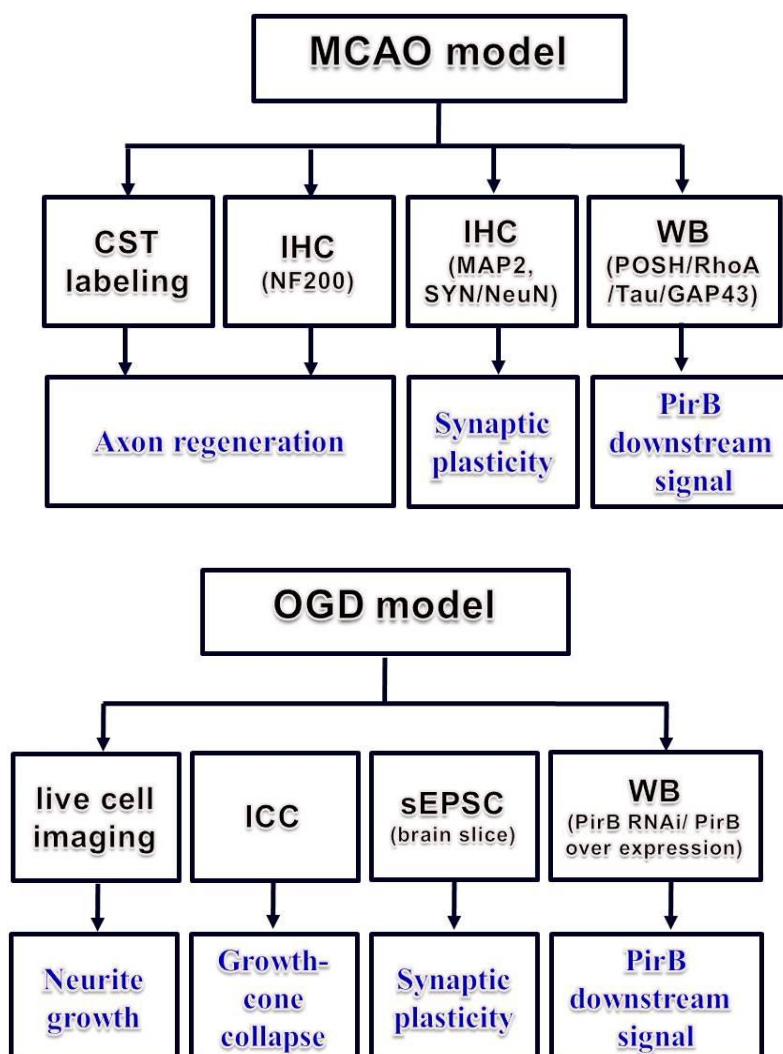


图 5-1 本部分技术路线图

3 结果

3.1 TAT-PEP 促进 MCAO 后皮质脊髓束重建

应用顺行神经示踪技术，评价 TAT-PEP 对模型动物皮质脊髓束轴突生长和侧枝发生的作用。在 MCAO 后 14 d 时，神经轴突示踪剂由未损伤的皮层处注入。在 MCAO 后 21 d 时，注射区的 BDA 被神经元及轴突摄取，注射区内大脑皮层的神经元锥体细胞及其轴突呈现广泛的 BDA 阳性荧光显影，且存在大量 NeuN 与 BDA 双标记的神经元，说明示踪剂注射成功。在 MCAO 后 28 d 时，被摄取的 BDA 沿着皮质脊髓束长距离顺行传输到颈膨大处。结果进一步显示，皮质脊髓束在脊髓颈膨大（C3-C5）节段集中走行在脊髓的后索。生理状态下，皮质脊髓束大部分纤维投射至同侧脊髓前角；MCAO 后，健侧皮质脊髓束发出分支越过脊髓中线支配对侧脊髓前角。TAT-PEP 治疗组中，检测皮质脊髓束在同侧灰质中的纤维密度明显高于 MCAO 组（ $P < 0.05$ ），其新生轴突横穿中线到达对侧的数量也明显多于 MCAO 组（ $P < 0.05$ ）。这些结果提示 TAT-PEP 能够促进模型动物皮质脊髓束轴突的生长和分支的发生，表明 TAT-PEP 可增强脑缺血后皮质脊髓束轴突重塑。

（加 bar）图 5-2 MCAO 后 21 d 时应用免疫荧光组化染色方法检测 BDA 注射区情况。绿色为 c 阳性反应物，红色为 NeuN 阳性神经元，黄色的为两者双标记，如箭头所示。（n=6，每组，Bar=50 μm ）。

图 5-3 应用神经示踪技术和免疫荧光组化染色方法 MCAO 后 28 d 时 TAT-PEP 对皮质脊髓束轴突及分支生长的作用（n=6，每组）。A 为应用 BDA 及 streptavidin-FITC 检测皮质脊髓束轴突及分支生长的免疫荧光组织染色切片。BDA 标记的皮质脊髓束轴突及其分支（绿色）在脊髓灰质腹角，并越过中线到达对侧（去神经支配侧），如箭头所示（Bar=50 μm ）。B 为 BDA 注射并顺行标记皮质脊髓束轴突及分支分布情况

示意图。C 为 BDA 标记的皮质脊髓束轴突及分支在脊髓灰质腹角中越过中线至去神经支配侧的示意图。D 为 BDA 标记的在脊髓灰质腹角中越过中线至去神经支配侧的皮质脊髓束纤维平均密度的统计图 ($^{\#}P<0.05$ vs. MCAO 组)。E 为在脊髓灰质腹角去神经支配侧的纤维数量的统计图 ($^{\#}P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.2 TAT-PEP 促进半暗带内神经元轴突的生长

表达于神经元轴突的神经纤维丝 (NF200) 被认为是最重要的轴突骨架蛋白之一, 其对轴突的生长, 维系及再生具有重要意义(参考文献)。在 MCAO 后 28 d 时的 NF200 与 NeuN 免疫荧光双标记实验显示, MCAO 组半暗带内 NF200 阳性的轴突密度明显低于 Sham 组 ($P<0.05$), 且排列不规则, 而 TAT-PEP 治疗组中半暗带内 NF200 阳性的轴突密度则明显高于 MCAO 组 ($P<0.05$)。该结果表明, TAT-PEP 能够促进模型动物半暗带内神经元轴突的生长。

图5-4 TAT-PEP对MCAO后皮层半暗带内NF200表达的影响。A为免疫荧光组织化学染色检测MCAO后28 d时各组实验动物皮层半暗带内NF200表达情况。NF200(绿色)和NeuN(红色)的免疫荧光双标(黄色)染色, 如箭头所示, Bar=50 μm 。D为MCAO后28 d时各组实验动物皮层半暗带内NF200表达平均密度统计结果 ($^*P<0.05$ vs. Sham group; $^{\#}P<0.05$ vs. MCAO group)。

3.3 TAT-PEP 促进半暗带内神经元树突的生长

MAP2 表达于神经元树突, 对树突的生长和维系具有重要作用, 可以作为神经元树突的标志物之一(参考文献)。在 MCAO 后 28 d 时的 MAP2 免疫荧光染色结果显示, MCAO 组半暗带内 MAP2 阳性的树突密度明显低于 Sham 组 ($P<0.05$), TAT-PEP 治疗组中半暗带内 MAP2 阳性的树突密度则明显高于 MCAO 组 ($P<0.05$)。该结果表明, TAT-PEP 能够促进模型动物半暗带内神经元树突的生长。

图 5-5 TAT-PEP 对 MCAO 后皮层半暗带内 MAP2 表达的影响。A 为免疫荧光组织化学染色检测 MCAO 后 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 MAP2 表达情况。MAP2 (绿色) 免疫荧光染色, 如箭头所示, Bar=50 μm 。D 为 MCAO 后 28 d 时各组实验动物皮层半暗带内 MAP2 表达平均密度统计结果 (* $P<0.05$ vs. Sham group; # $P<0.05$ vs. MCAO group)。

3.4 TAT-PEP 促进半暗带内突触可塑性的恢复

突触素 (Synapsin, SYN) 为突触前囊泡内成分, 其数量的多少可以部分反应突触结构和可塑性的情况 (参考文献)。在 MCAO 后 28 d 时的 SYN 与 NeuN 免疫荧光双标记实验显示, SYN 表达与神经元胞体周围, MCAO 组半暗带内 SYN 阳性物质密度明显低于 Sham 组 ($P<0.05$), TAT-PEP 治疗组中半暗带内 SYN 阳性物质密度则明显高于 MCAO 组 ($P<0.05$)。该结果表明, TAT-PEP 能够促进模型动物半暗带内神经元突触可塑性的恢复。

图5-6 TAT-PEP对MCAO后皮层半暗带内SYN表达的影响。A为免疫荧光组织化学染色检测MCAO后28 d时各组实验动物皮层半暗带内SYN表达情况。SYN (绿色) 和NeuN (红色) 的免疫荧光双标 (黄色) 染色, 如箭头所示, Bar=50 μm 。D为MCAO后28 d时各组实验动物皮层半暗带内SYN表达平均密度统计结果 (* $P<0.05$ vs. Sham group; # $P<0.05$ vs. MCAO group)。

3.5 TAT-PEP 抑制半暗带内 POSH 和 RhoA 的表达, 促进 GAP43 和 Tau 的表达

应用 Western blot 检测 MCAO 后 28 d 时半暗带内 PirB 下游相关分子的表达。POSH (也被称为 SH3rf1), 是一种细胞内多域的支架蛋白, 能够调控轴突生长和突触可塑性 (文献)。RhoA 参与抑制神经元轴突分支形成和加重生长锥的崩溃瓦解 (文献)。GAP43 则是神经元骨架的重要成分, 对神经元轴突出芽, 生长和突触可塑性具有重要作用 (文献)。结果显示, MCAO 组 POSH 和 RhoA 的表达显著高于 Sham 组 ($P<0.05$), 而 GAP43 的表达显著低于 Sham 组。与此相反, TAT-PEP 组 POSH 和

RhoA 的表达显著低于 MCAO 组，而 GAP43 的表达显著高于 MCAO 组 ($P < 0.05$)。上述分子的表达变化可能是 TAT-PEP 促进脑缺血损伤后神经元轴突生长及突触可塑性恢复的分子机制。

图5-7 TAT-PEP对MCAO后28 d时半暗带内POSH, RhoA和GAP43表达的影响 (n=6, 每组)。A为Western blot检测MCAO后28 d时半暗带内POSH, RhoA和GAP43表达的蛋白条带图。B, C, D为POSH, RhoA和GAP43表达的统计图 (* $P < 0.05$ vs. Sham 组, # $P < 0.05$ vs. MCAO组)。

3.6 TAT-PEP 促进 OGD 后神经元轴突生长和分支形成

利用离体氧糖剥夺 (OGD) 模型，首先通过活细胞工作站观察 TAT-PEP 对神经元轴突生长和分支形成的作用。结果显示，在记录过程中，TAT-PEP 组神经元最长突起在单位时间内的生长情况明显优于 OGD 组 ($P < 0.05$)，同时 TAT-PEP 组神经元最长突起上的分支数量明显多于 OGD 组 ($P < 0.05$)。

图 5-8 活细胞工作站观察 TAT-PEP 对 OGD 后神经元轴突生长及分支数量的影响 (n=6, 每组)。A 为 OGD24 h 后利用活细胞工作站观察神经元轴突生长 (如箭头所示) 及分支数量的代表性图片 (Bar=20 μm)。设置自动记录时间为 t0, t10, t20, t30, t40 五个时间点，其中 t0 与 t10 相隔 5000 s。B 为最长神经突起单位时间的平均生长速度统计图 (* $P < 0.05$ vs. Normal 组; # $P < 0.05$ vs. OGD 组)。C 为最长神经突起上分支点数量统计图 (* $P < 0.05$ vs. Normal 组; # $P < 0.05$ vs. OGD 组)。

在 OGD 后 3 d 时，利用明场显微镜观察，OGD 组 TAT-PEP 组神经元最长突起的平均长度显著短于 Normal 组 ($P < 0.05$)，而 TAT-PEP 组神经元最长突起的平均长度则显著高于 Normal 组 ($P < 0.05$)，研究进一步发现 OGD 组 TAT-PEP 组神经元最长突起的分支数量显著少于 Normal 组 ($P < 0.05$)，而 TAT-PEP 组神经元最长突起的分支数量则显著多于 Normal 组 ($P < 0.05$)。由于神经元最长突起一般认为是神经元

轴突，因此上述结果说明，TAP-PEP可以促进 OGD 后神经元轴突生长及分支形成。

图 5-9 明场显微镜观察 TAT-PEP 对 OGD 后神经元轴突生长及分支数量的影响 (n=6, 每组)。A 为 OGD 3 d 后利用明场显微镜观察神经元轴突生长及分支数量的代表性图片 (Bar=50 μm)。B 为最长神经突起的平均长度统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。C 为最长神经突起上分支点数量统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。

3.7 TAT-PEP 对 OGD 后神经元生长锥的作用

结果显示，在 OGD 后 3 d 时，Normal 组神经元生长锥崩溃瓦解水平仅为 20%，而 OGD 组生长锥崩溃瓦解水平则可达到 60%，显著高于 OGD 组 ($P<0.05$)，TAP-PEP 组生长锥崩溃瓦解水平显著低于 OGD 组 ($P<0.05$)，说明 TAP-PEP 有效缓解 OGD 后生长锥的崩溃瓦解。

图 5-10 免疫荧光细胞化学染色检测 TAT-PEP 对 OGD 后神经元生长锥的作用 (n=6, 每组)。A 为 Normal 组神经元生长锥 GAP43 (绿色) 的免疫荧光细胞化学染色图片，如箭头所示，Bar=50 μm 。B 为 A 图中方框的放大图。C, D 分别为 OGD 组和 OGD+TAT-PEP 组的代表性图片，Bar=50 μm 。E 为各组神经元生长锥瓦解率的统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。

3.8 TAT-PEP 促进 OGD 突触可塑性的恢复

利用体外脑片 OGD 模型及神经电生理技术检测 OGD 后 3 d 时神经元自发兴奋性突触后电流 (sEPSC) 振幅和频率的变化情况。结果显示，OGD 组 sEPSC 振幅低于 Normal 组 ($P<0.05$)，而 TAT-PEP 则可以增强 sEPSC 振幅 ($P<0.05$)；OGD 组 sEPSC 频率低于 Normal 组 ($P<0.05$)，而 TAT-PEP 则可以增强 sEPSC 频率 ($P<0.05$)。

该结果说明 TAT-PEP 可以显著改善 OGD 突触可塑性, 进一步证明 TAT-PEP 可以促进神经元缺血再灌注后突触结构和功能的恢复。

图 5-11 TAT-PEP 对 OGD 后神经元自发兴奋性突触后电流 (sEPSC) 振幅和频率的影响 (n=6, 每组)。A 为 OGD 后 3 d 时神经元 sEPSC 振幅和频率的代表性记录结果。B 为各组 sEPSC 振幅统计结果图 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。C 为各组 sEPSC 频率 ν 统计结果图 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。

3.9 TAT-PEP 及 *pirb* RNAi 对 OGD 后神经元 POSH, RhoA 和 GAP43 表达的作用

OGD 后 3 d 时 Western blot 结果显示, OGD 组 POSH 和 RhoA 的表达显著高于 Normal 组 ($P<0.05$), 而 GAP43 的表达显著低于 Normal 组。与此相反, OGD+TAT-PEP 组 OGD+*pirb* RNAi 组 POSH 和 RhoA 的表达显著低于 OGD 组, 而 GAP43 的表达显著高于 OGD 组 ($P<0.05$)。而 OGD+TAT-PEP 组与 OGD+*pirb* RNAi 组中神经元 POSH, RhoA 和 GAP43 的表达没有显著差异 ($P>0.05$)。上述结果进一步阐明抑制缺血再灌注后神经元 PirB 表达, 可减少下游分子 POSH 和 RhoA 的表达, 促进 GAP43 的表达。TAT-PEP 也可减少 OGD 后神经元 POSH 和 RhoA 的表达, 促进 GAP43 的表达, 进一步证实 TAT-PEP 可通过干预 POSH/ROCK/GAP43 信号通路的表达, 促进神经元缺血再灌注损伤后轴突生长及突触可塑性恢复, 从而改善神经功能特别是长时程运动、学习及记忆功能, 发挥神经保护作用。

图5-12 TAT-PEP及*pirb* RNAi对OGD后3 d时神经元POSH, RhoA和GAP43表达的影响 (n=6, 每组)。A为Western blot检测OGD后3 d时神经元POSH, RhoA和GAP43表达的蛋白条带图。B, C, D为POSH, RhoA和GAP43表达的统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal组, # $P<0.05$ vs. OGD组, § $P<0.05$ vs. OGD组)。

4 讨论

本部分实验中，我们主要从 TAT-PEP 对 MCAO 半暗带内神经元轴突再生、皮质脊髓束分支生长和突触可塑性的作用及相关机制进行了深入研究和探讨。

近来研究发现，在脊髓损伤及脑缺血再灌注损伤模型中，PirB 通过抑制轴突再生和突触可塑性，影响神经回路，加重感觉运动功能损伤。特别是脑缺血再灌注损伤后，皮层健侧的神经元可发出轴突，延伸至损伤侧，以使运动和感觉功能得到一定的恢复。研究还发现，在 *pirb* KO 的小鼠模型中，MCAO 后健侧皮质脊髓束内的神经纤维及其分支越过中线到达去神经支配的红核，进而促进运动功能的恢复。在本实验中，我们发现 TAT-PEP 能够促进模型动物皮质脊髓束轴突的生长和分支的发生，使皮质脊髓束轴突得到重塑。此外，在半暗带内我们还发现，TAT-PEP 促进神经元轴突骨架蛋白 NF200 的表达，促进轴突的生长。活细胞工作站进一步发现，TAT-PEP 对 OGD 后神经元轴突生长和分支形成具有促进作用，并且能够有效缓解 OGD 后生长锥的崩溃瓦解，这些结果进一步明确 PirB 对轴突再生和皮质脊髓束的不良效应，可以合理解释 TAT-PEP 对 MCAO 后运动功能的改善作用。这是因为轴突生长和皮质脊髓束的重塑一般发生在 MCAO 后的数天至数周时间，而 PirB 在皮层半暗带内的高表达，并通过与 Nogo-A, MAG, OMgp 的作用，抑制轴突再生，影响皮质脊髓束的重塑，这可能是肢体运动功能的难以恢复的关键所在。而 TAT-PEP 通过减少 Nogo-A, MAG, OMgp 与 PirB 相互作用，从而促进轴突生长，加强皮质脊髓束重塑，有效改善肢体神经功能恢复。正如 Lee 等报道，NgR 拮抗剂 NEP1-40 封闭 NgR 功能，可以显著促进 MCAO 后动物的神经功能（?），本研究也是在蛋白质水平对 Nogo-A, MAG, OMgp 与 PirB 的结合和作用进行干扰，从而促进轴突生长和皮质脊髓束重塑，改善运动功能。

此外，我们还观察了 TAT-PEP 对 MCAO 后突触可塑性的作用。Wang 等报道，脑缺血再灌注损伤可以严重影响突触可塑性。McGee 等报道，敲出 Nogo 或 NgR 的小鼠，其视皮层的突触可塑性得到明显恢复。还有研究证实，在视神经损伤模型中，PirB 通过影响突触可塑性，导致视觉功能障碍。Adelson 等研究进一步发现，*pirb* KO 小鼠 MCAO 后，半暗带内突触可塑性得到明显改善，动物的运动功能得到明显改善。这些结果说明，PirB 影响 MCAO 后感觉运动及学习记忆功能恢复另一重要原因是其

可导致突触可塑性的下降。在本实验中，TAT-PEP 能够促进模型动物半暗带内成熟神经元树突的标志物 MAP2 的表达和突触素 SYN 的表达，提示 TAT-PEP 可以促进神经元树突的生长和突触可塑性的恢复。体外脑片 OGD 模型中，TAT-PEP 能够增强自发兴奋性突触后电流振幅和频率，提示其可以显著改善 OGD 后突触可塑性，促进神经元缺血再灌注后突触结构和功能的恢复。这些结果可以解释 TAT-PEP 能够改善 MCAO 后动物的运动、感觉、学习记忆和神经冲动传递功能。并且进一步提示 PirB 在抑制突触可塑性，损害神经功能方面的扮演的“不良角色”。

我们还对 PirB 下游信号通路和 TAT-PEP 的作用机制进行了研究和探讨。以往多项研究表明，脑缺血再灌注损伤或脊髓损伤后，髓鞘或神经元上 NogoA、MAG、OMgp 表达增加，这些抑制因子与 NgR1 受体复合物相结合，致使下游的 Rho-A/ROCK 激酶（ROCK）信号通路活化，顺序激活肌球蛋白轻链激酶（MLCK）和球蛋白轻链（MLC），导致生长锥的崩溃，抑制轴突再生^[5,8,14]。2004 年，Li S 等研究表明，通过阻断 NgR1 的功能可以在神经元受损早期减轻 Nogo-A 对轴突生长的抑制作用^[15]。2010 年，Schwab ME 发表评论指出，NEP1-40 作为 NgR1 竞争性拮抗剂阻断 NgR1 后，可促进轴突生长和调控神经元可塑性，其主要机制是通过抑制下游 Rho-A/Rho 激酶（ROCK）信号通路而发挥作用^[5]。髓磷脂因子是如何通过 PirB 信号通路抑制轴突再生的，目前还不十分清楚。Taylor J 等证实^[18]，支架蛋白 POSH 通过与肌动-肌球蛋白结合形成抑制复合物，可以显著抑制轴突生长。Heather M. Dickson 等^[19]进一步研究发现，来自少突胶质细胞或神经元的 Nogo-A 等髓鞘抑制因子，可使 POSH 信号通路中 POSH/Shroom3/ROCK 信号通路活化，使肌球蛋白 Myosin IIA 表达减少，导致轴突生长抑制。通过 RNAi 方法，干涉 Nogo-A，PirB 或 POSH，可以抑制下游分子 Shroom3/ROCK 的活化，逆转其轴突生长的抑制作用。Rona G. Giffard 等研究进一步证实 PirB/POSH 信号通路在脑缺血再灌注损伤中抑制轴突生长的作用^[7]。本研究发现，抑制缺血再灌注后神经元 PirB 表达，可减少下游分子 POSH 和 RhoA 的表达，促进 GAP43 的表达。TAT-PEP 也可减少 OGD 后神经元 POSH 和 RhoA 的表达，促进 GAP43 的表达，进一步证实 TAT-PEP 可通过干预 POSH/ROCK/GAP43 信号通路的表达，促进神经元缺血再灌注损伤后轴突生长及突触可塑性恢复，从而改善神经功能特别是长时程运动、学习及记忆功能，发挥神经保护作用。

5 小结

本部分实验通过在体 MCAO 模型和离体 OGD 模型，利用顺行神经示踪技术、免疫荧光组织化学染色方法，活细胞工作站及神经电生理等多种方法，发现并证实 TAT-PEP 可以通过干预 PirB 下游的 POSH/ROCK/GAP43 信号通路，促进 MCAO 后半暗带内轴突再生，突触可塑性恢复和皮质脊髓束的重塑，从而发挥改善神经功能特别是长时程运动、学习及记忆功能，发挥神经保护作用。该部分研究不仅阐明了 TAT-PEP 发挥神经保护作用的部分机制，还间接揭示了 PirB 在脑缺血再灌注损伤中扮演的“不良角色”和作用机制，为缺血性脑中风的治疗提供了新的作用靶点，为 TAT-PEP 可能的临床应用提供了理论依据和实验基础。

实验六 TAT-PEP 减轻脑缺血再灌注损伤后神经元变性和凋亡的作用及机制研究

1. 材料

1.1 实验动物

雄性SD大鼠，体重约280 g；SD大鼠孕鼠，体重约400 g，购自地点同第一部分，做到善待实验动物，饲养、手术、给药处理及取材等环节均严格按照动物实验管理相关规定，并遵守National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications number 80-23, revised in 1996)。

1.2 主要仪器

1. 脑血流监测仪，Perimed公司，瑞典
2. 冰冻切片机，Leica公司，德国
3. 激光共聚焦荧光显微镜，Olympus公司，日本
4. PH计，Beckman Coulter公司，美国
5. 制冰机，三洋电子有限公司，日本
6. 凝胶成像系统，Alpha 公司，美国
7. 多功能摇床，LAB-LINE公司，美国
8. 倒置显微镜，Olympus公司，日本
9. Mili-Q50纯水器，Millipore公司，美国
10. -80℃超低温冰箱，Thermo Forma公司，美国
11. 啮齿动物断头器，上海博通公司，中国
12. 高压蒸汽消毒锅，苏州江东，中国
13. 微量移液器，Eppendorf公司，德国
14. 低温高速离心机，Heraeus公司，德国
15. 蛋白电泳仪，BIO-RAD公司，美国
16. CO₂ 恒温细胞培养箱，Heraeus公司，德国

17. 低氧细胞培养箱, DWS公司, 英国
18. 电泳槽, BIO-RAD公司, 美国
19. 数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司, 中国
20. 超净工作台, 吴江净化设备总厂, 中国
21. 各型玻片, Fisher, 美国
22. 全自动酶标仪, Bio Rad公司, 美国
23. 各型培养板及培养皿, CORNING, 美国
24. 离心管, CORNING公司, 美国
25. EP管, CORNING公司, 美国
26. 相差显微镜, Nikon公司, 日本
27. 细胞计数板, 南京裕安公司, 中国
28. 精密电子天平, Sartorius公司, 美国

1.3 主要试剂

1. 兔抗Bcl2多克隆抗体 (ab62024), Abcam, 美国
2. 兔抗Bax多克隆抗体 (ab203060), Abcam, 美国
3. 兔抗活化的Caspase3多克隆抗体 (ab96426), Abcam, 美国
4. 小鼠抗NeuN单克隆抗体 (ab104224), Abcam, 美国
5. 小鼠抗 β -actin单克隆抗体 (ab8226), Abcam, 美国
6. 羊抗小鼠FITC, Burlingame, 美国
7. HRP 标记的羊抗兔二抗, Pierce Biotechnology, 美国
8. HRP 标记的羊抗小鼠二抗, Pierce Biotechnology, 美国
9. 全蛋白提取试剂盒, KeyGEN, 中国
10. BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天, 中国
11. 预染蛋白 Marker, Fermentas, 美国
12. SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 碧云天, 中国
13. 多聚赖氨酸, Sigma公司, 美国
14. 戊巴比妥钠, 上海哈灵生物, 中国
15. 发光液, Thermo 公司, 美国

16. Neurobasal, Gibco公司, 美国
17. 青链霉素混合液(双抗), 美国 Hyclone 公司
18. 谷氨酰胺, 美国 Hyclone 公司
19. B27, Gibco公司, 美国
20. DMEM高糖培养基, Gibco公司, 美国
21. D-hanks 溶液, Sigma公司, 美国
22. 胰蛋白酶, 沃尔森公司, 中国
23. 胎牛血清, Gibco公司, 美国
24. MTT, Sigma公司, 美国
25. DMSO, Sigma公司, 美国
26. TUNEL试剂盒, Roche公司, 德国
27. Lysis 裂解液, 碧云天, 中国
28. Nissl 染料, 碧云天, 中国
29. Fluoro-Jade C (FJC) 染料, Chemicon 公司, 美国
30. 主要试剂配制: 电镜固定液: 0.05%戊二醛 + 4%多聚甲醛。其余同前

2. 方法

2.1 皮层神经元原代培养

① 取孕16.5-18.5 d (E 16.5-18.5 d) 的SD大鼠脱臼处死, 进行常规无菌消毒, 取出胎鼠, 分离鼠胚胎。其余方法同第二部分。

② 根据实验要求以 1×10^6 或 1×10^5 或 5×10^4 cell/ml 的密度接种于L-多聚赖氨酸 (50 mg/mL) 包被的96孔板, 24孔板或6孔板及培养皿中。

③ 第7 d进行鉴定, β III-tubulin阳性神经元占90%以上方可使用。

2.2 神经元离体氧糖剥夺模型

原代培养的皮层神经元至第7 d 鉴定后, 小心弃细胞培养液, 用 PBS 轻轻漂洗 3 次, 至后行 OGD。方法同上部分实验。实验分组情况如下:

① MTT 及 LDH 释放实验检测不同浓度 TAT-PEP 对 OGD 后 24 h 时神经元存活

的作用：随机分为六组（n=6），即 Normal 组，OGD 组，OGD+mTAT-PEP（100 μg/L）组，OGD+TAT-PEP（50 μg/L）组，OGD+TAT-PEP（100 μg/L）组，OGD+TAT-PEP（200 μg/L）组。

② MTT 及 LDH 释放实验检测 OGD 后（6 h，24 h，72 h）TAT-PEP 对神经元存活的作用：随机分为六组（n=6），即 Normal 组，OGD 组，OGD+mTAT-PEP（100 μg/L）组，OGD+TAT-PEP（100 μg/L）组。

③ TUNEL 染色检测 TAT-PEP 对 OGD 后 72 h 时神经元凋亡的作用：随机分为六组（n=6），即 Normal 组，OGD 组，OGD+TAT-PEP 组。

④ Western blot 检测 TAT-PEP 对 OGD 后 72 h 时神经元凋亡相关蛋白表达的作用：随机分为六组（n=6），即 Normal 组，OGD 组，OGD+TAT-PEP 组。

2.3 神经元活力检测

应用 MTT 比色法检测神经元活力。方法见第二部分

2.4 神经元存活检测

利用乳酸脱氢酶（Lactate Dehydrogenase, LDH）释放实验，检测神经元存活情况。方法见第三部分。

2.5 TUNEL 染色方法

在 OGD 复氧后 24 h 时行 TUNEL 染色，检测神经元凋亡情况。方法见第二部分。

2.6 Western blot 检测 Bax, Bcl2, Caspase3 表达

在 OGD 复氧后 24 h 时搜集细胞蛋白，行 Western blot。步骤同第四部分。其中一抗（Bax, 1:1000; Bcl2, 1: 2000; 活化的 Caspase3, 1: 1000; β-Actin; 1:5000）；二抗（HRP 标记的羊抗兔二抗, 1: 1000, HRP 标记的羊抗小鼠二抗）。

2.7 局灶性脑缺血再灌注模型制作

① MCAO 模型制备与第一部分相同。

② 下述实验分组：实验动物随机分为三组（n=6），即 Sham 组，MCAO 组，MCAO+TAT-PEP 组（n=6）。

2.8 Nissl 染色

在MCAO后第3 d时，应用Nissl染色检测TAT-PEP对半暗带内神经元存活的作用。具体方法如下：

- ① 冰冻切片室温放置1 h晾干，画圈笔画圈，0.01M PBS轻轻漂洗3次（5 min/次）。
- ② 加入Nissl染料（要提前过滤），37℃孵育20 min后，纯水轻轻洗去染色液。
- ③ 依此经过85%、95%、100%的酒精10 s，二甲苯透明（2min，2次），中性树脂封片，显微镜明场观察并记录。

2.9 FJC 染色

在MCAO后第3 d时，应用FJC染色检测TAT-PEP对半暗带内变性神经元数量的作用。具体方法如下：

- ① 冰冻切片室温放置1 h晾干，画圈笔画圈，0.01M PBS轻轻漂洗3次（5 min/次）。
- ② 将切片放入含1%的氢氧化钠和80%的无水乙醇混合液中浸泡5 min。
- ③ 之后浸泡于70%的无水乙醇中，水化2 min，去离子水轻轻冲洗3次（5 min/次）。
- ④ 0.06%高锰酸钾孵育 10 min（室温摇床），蒸馏水漂洗5 min（摇床）。
- ⑤ 配制0.0001%的FJC染液，并按照 1：1000的比例加入醋酸。
- ⑥ 滴加FJC染液后，37℃恒温避光孵育30 min，去离子水再次轻轻漂洗3次（1 min/次）。
- ⑦ 室温避光晾干，无水乙醇脱水2 min，二甲苯透明3次（2 min/次），中性树脂封片。由不知实验分组的人员通过Olympus BX51荧光显微镜(激发光波长为450-490 nm)观察，采集图像并记录FJC阳性细胞计数（FJC阳性细胞为绿色）。

2.10 免疫荧光组织化学染色

在MCAO后第3 d时，应用NeuN免疫荧光组织化学染色检测TAT-PEP对半暗带内存活神经元数量的作用。具体方法同第一部分。其中入一抗（NeuN，1:5000），4℃过夜，0.01M PBS溶液漂洗（5 min每次×3次），入二抗（羊抗小鼠FITC，1:5000），避光室温孵育2 h，避光漂洗3次，50%甘油封片后荧光显微镜下观察并拍照。设立阴性对照（部分脑片一抗用PBS替代），排除假阳性信号可能。

2.11 TUNEL 染色

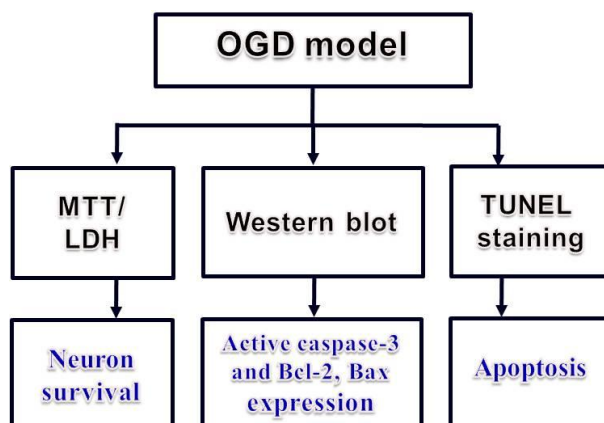
在MCAO后第3 d时，应用TUNEL染色检测TAT-PEP对半暗带内凋亡神经元数量的作用。具体方法如下：

- ① 固定后的脑组织放入含有30%的酒精中浸泡，石蜡包埋并切片，厚度为3 μm 。
- ② 将石蜡切片用二甲苯脱蜡5 min(2 min/次)。
- ③ 脱蜡后用画圈笔画圈，滴加蛋白激酶K细胞通透液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min后，0.01M PBS轻轻漂洗3次（5 min/次）。
- ④ 加入50 μl DNaseI溶液，室温10 min。玻片清洗晾干后，加入Tunel混合液。37 $^{\circ}\text{C}$ ，1 h。再次PBS清洗。
- ⑤ 加入30 μl POD终止反应，再次PBS清洗。滴入DAB显色液，常温，10 min，再次PBS清洗。滴加苏木素30 s，纯水下轻轻清洗。梯度脱水，二甲苯透明5min（2次），中性树脂封片，明场显微镜观察并统计Tunel阳性细胞数目（Tunel阳性细胞为棕黑色）。

2.12 电镜实验

实验动物用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)经腹腔麻醉，用含4%PFA和0.05%戊二醛溶液常规灌注固定，在立体定位仪上定位取材，后固定2 h，振动切片机做冠状切片，片厚50 μm 。放入含30%蔗糖的PBS溶液浸泡2 h沉底，梯度酒精和丙酮脱水，组织包埋块做超薄切片，片厚60-70nm，将透明的连续切片捞取至有支持膜的铜网上，在电镜下观察神经元超微结构。

2.13 技术路线



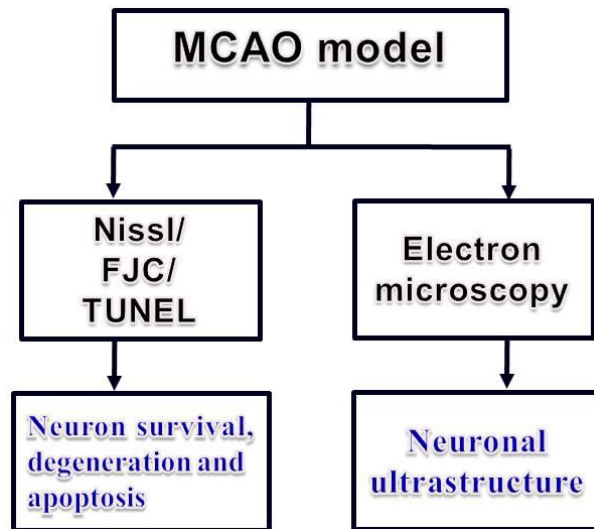


图6-1 本部分技术路线图

3 结果

3.1 TAT-PEP 促进 OGD 后神经元的存活

在体外 OGD 模型中，首先观察不同浓度的 TAT-PEP 对神经元活力及存活的作用。在 OGD 后 24 h 时，应用 MTT 比色法检测神经元细胞活力，实验结果显示，与 Normal 组相比，OGD 组 MTT 的相对比色值显著降低 ($P < 0.05$)，50 $\mu\text{g/L}$ ，100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理后可以显著提高 MTT 的相对比色值 ($P < 0.05$)，而 OGD+TAT-mPEP 组的 MTT 的相对比色值与 OGD 组相比没有统计学意义 ($P > 0.05$)。结果进一步显示，与 50 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理组相比，100 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理后可以提高 MTT 的相对比色值 ($P < 0.05$)，而 100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理组之间的 MTT 相对比色值没有统计学意义 ($P > 0.05$)。该结果说明 TAT-PEP 可以有效增强 OGD 后神经元活力，并且这种作用具有剂量依赖性。

在 OGD 后 24 h 时，通过细胞乳酸脱氢酶释放程度评估神经元存活情况，结果显示，与 Normal 组相比，OGD 组 LDH 释放量的相对值显著升高 ($P < 0.05$)，50 $\mu\text{g/L}$ ，100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理后可以显著降低 LDH 释放量的相对值 ($P < 0.05$)，而 OGD+TAT-mPEP 组的 LDH 释放量的相对值与 OGD 组相比没有统计学意义 ($P > 0.05$)。结果进一步显示，与 50 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理组相比，100 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理后可以降低 LDH 释放量的相对值 ($P < 0.05$)，而 100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TAT-PEP 处理组之间的 LDH 释放量的相对值没有统计学意义 ($P > 0.05$)。该结果

说明 TAT-PEP 可以有效减轻 OGD 后神经元损伤程度，并且这种作用具有剂量依赖性。上述结果证实 TAT-PEP 可以有效提高 OGD 后神经元活力，减轻神经元损伤，促进神经元存活，这种保护效应呈现一定的浓度依赖性。

接下来，我们检测了 OGD 后不同时间点 100 $\mu\text{g/L}$ TAT-PEP 对神经元活力及乳酸脱氢酶释放的影响。结果显示，在 OGD 后 6 h 时，与 Normal 组相比，OGD 组 MTT 相对比色值降低 ($P<0.05$)，LDH 释放量相对值增加 ($P<0.05$)，与 OGD 组相比，OGD+TAT-PEP 组和 OGD+TAT-mPEP 组的 MTT 相对比色值 ($P>0.05$) 和 LDH 释放量相对值 ($P>0.05$) 没有统计学意义。在 OGD 后 24 h 时，与 Normal 组相比，OGD 组 MTT 相对比色值显著降低 ($P<0.05$)，LDH 释放量相对值显著增加 ($P<0.05$)，与 OGD 组相比，OGD+TAT-PEP 组的 MTT 相对比色值增加 ($P<0.05$) 和 LDH 释放量相对值降低 ($P<0.05$)。与 OGD 组相比，OGD+TAT-mPEP 组的 MTT 相对比色值 ($P>0.05$) 和 LDH 释放量相对值 ($P>0.05$) 没有统计学意义。在 OGD 后 72 h 时，与 Normal 组相比，OGD 组 MTT 相对比色值显著降低 ($P<0.05$)，LDH 释放量相对值显著增加 ($P<0.05$)，与 OGD 组相比，OGD+TAT-PEP 组的 MTT 相对比色值增加 ($P<0.05$) 和 LDH 释放量相对值降低 ($P<0.05$)。与 OGD 组相比，OGD+TAT-mPEP 组的 MTT 相对比色值 ($P>0.05$) 和 LDH 释放量相对值 ($P>0.05$) 没有统计学意义。在 OGD 后 72 h 后，光镜观察神经元生长状态，发现 OGD 组神经元细胞完整度差，胞体萎缩或破碎，神经突起断裂或消失，而 TAT-PEP 处理后，能够明显改善神经元生长状态。上述结果说明在 OGD 后 24 h 和 72 h 时，100 $\mu\text{g/L}$ TAT-PEP 能够显著增强神经元活力，减轻神经元损伤，促进神经元存活。

图 6-2 TAT-PEP 对神经元活力及存活的作用 ($n=6$ ，每组)。A 为 MTT 实验检测不同浓度的 TAT-PEP 对神经元活力的作用 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。B 为 LDH 释放实验检测不同浓度的 TAT-PEP 对神经元存活的作用 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。C 为 MTT 实验检测 OGD 后不同时间点 100 $\mu\text{g/L}$ TAT-PEP 对神经元活力的作用 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。D 为 LDH 释放实验检测 OGD 后不同时间点 100 $\mu\text{g/L}$ TAT-PEP 对神经元存活的作用 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。E 为明场显微镜观察 TAT-PEP (100 $\mu\text{g/L}$) 对 OGD 后 72 h 时神经元存活状态的影响。

3.2 TAT-PEP 减轻 OGD 后神经元凋亡

利用 TUNEL 染色检测神经元凋亡情况。结果显示, 在 OGD 后 24 h 时, OGD 组 TUNEL 阳性神经元的细胞数目明显多于 Normal 组 ($P<0.05$), 与 OGD 组相比, TAT-PEP 组 TUNEL 阳性神经元的细胞数目明显减少 ($P<0.05$)。该结果说明, TAT-PEP 能够减少 OGD 后凋亡神经元的数量。

图 6-3 TAT-PEP 对神经元凋亡的作用($n=6$, 每组)。A 为 TUNEL 染色检测 OGD 后 72 h 时 TAT-PEP 对神经元凋亡的作用。绿色细胞为 TUNEL 阳性神经元。蓝色代表 DAPI 衬染的细胞核。Bar=100 μm 。B 为各组 TUNEL 阳性神经元的统计图(* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。

Western blot 结果进一步显示, 在 OGD 后 24 h 时, OGD 组凋亡蛋白 Bax 表达明显多于 Normal 组 ($P<0.05$), 与 OGD 组相比, TAT-PEP 组凋亡蛋白 Bax 表达明显减少 ($P<0.05$)。同时, OGD 组抗凋亡蛋白 Bcl2 表达明显少于 Normal 组 ($P<0.05$), 与 OGD 组相比, TAT-PEP 组抗凋亡蛋白 Bcl2 表达明显增加 ($P<0.05$)。研究还发现 OGD 组活化的 Caspase 3 水平明显高于 Normal 组 ($P<0.05$), 与 OGD 组相比, TAT-PEP 组活化的 Caspase 3 水平明显降低 ($P<0.05$)。该结果说明, TAT-PEP 通过抑制 Bax 表达, 促进 Bcl2 表达, 从而抑制 Caspase 3 活化, 减轻 OGD 后神经元凋亡, 发挥保护作用的。

图 6-4 TAT-PEP 对神经元凋亡相关蛋白表达的作用($n=6$, 每组)。A, C 为 Western blot 检测 OGD 后 72 h 时各组神经元 Bax, Bcl2 和 Cleaved Caspase 表达的蛋白条带图。B, D, E 为 OGD 后 72 h 时各组神经元 Bax, Bcl2, Cleaved Caspase 表达统计图 (* $P<0.05$ vs. Normal 组; # $P<0.05$ vs. OGD 组)。

3.3 TAT-PEP 减轻 MCAO 后半暗带内神经元的变性和凋亡，促进神经元存活

Nissl 染色表明，MCAO 后 3 d 时，与 Sham 组相比，MCAO 组半暗带内神经元存活数量显著减少 ($P<0.05$)，而 TAT-PEP 治疗后能够显著增加神经元存活的数量 ($P<0.05$)。NeuN 免疫荧光组化染色结果进一步显示，MCAO 后 3 d 时，与 Sham 组相比，MCAO 组半暗带内 NeuN 阳性神经元数量显著减少 ($P<0.05$)，而 TAT-PEP 治疗后能够显著增加 NeuN 阳性神经元的数量 ($P<0.05$)。该结果表明，TAT-PEP 能够有效促进 MCAO 后半暗带内神经元的存活。

图 6-5 TAT-PEP 对半暗带内神经元存活的作用 (n=6, 每组)。A 为 Nissl 染色检测 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内存活神经元的数量。B 为 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内存活神经元数量的统计图 (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。C 为免疫荧光组织化学染色检测 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内 NeuN 阳性神经元 (绿色) 的数量 (Bar=50 μm)。D 为 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内 NeuN 阳性神经元数量的统计图 (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组, Bar=50 μm)。

FJC 染色结果显示，MCAO 后 3 d 时，与 Sham 组相比，MCAO 组半暗带内 FJC 阳性神经元数量显著增多 ($P<0.05$)，而 TAT-PEP 治疗后 FJC 阳性神经元的数量明显减少 ($P<0.05$)。TUNEL 染色结果进一步显示，MCAO 后 3 d 时，与 Sham 组相比，MCAO 组半暗带内 TUNEL 阳性神经元数量显著增多 ($P<0.05$)，而 TAT-PEP 治疗后 TUNEL 阳性神经元的数量明显减少 ($P<0.05$)。上述结果说明，TAT-PEP 通过减少变性和凋亡的神经元数量，减轻神经元损伤，促进神经元存活，这可能是 TAT-PEP 能够减少脑梗死容积，发挥神经保护作用的一个重要原因。

图 6-6 TAT-PEP 对半暗带内神经元变性和凋亡的影响 (n=6, 每组)。A 为 FJC 染色检测 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内变性神经元的数量。FJC 标记的变性神经元为绿色 (Bar=50 μm)。B 为 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内变性神经元数量的统计图 (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。C 为 TUNEL 染色检测 MCAO 后 3 d 时各组半暗带凋亡神经元的数量。TUNEL 阳性神经元为棕黑色 (Bar=50 μm)。D 为 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内 TUNEL 阳性神经元数量的统计图 (* $P<0.05$ vs. Sham 组; # $P<0.05$ vs. MCAO 组)。

3.4 TAT-PEP 缓解 MCAO 后半暗带内神经元的超微结构破坏

为了进一步证实 TAT-PEP 对局灶性脑缺血损伤后半暗带内神经元存活的保护作用, 阐明相关机制, 我们通过电镜观察神经元超微结构的变化。MCAO 后 3 d 时结果发现, 与 Sham 组相比, 神经元超微结构明显变化。具体体现在, 神经元细胞核明显固缩, 染色质降解, 边集, 核膜皱缩、破裂。细胞质中粗面内质网呈囊性变、脱颗粒, 特别是线粒体明显肿大, 呈囊泡状改变, 发生嵴断裂和基粒脱失的改变。而 TAT-PEP 治疗后可以显著减轻神经元超微结构的变化, 特别是线粒体结构损伤。该结果提示, 这可能是 TAT-PEP 发挥神经元保护作用的另一个潜在机制, 需要在下一步实验中进行深入研究和探讨。

图 6-7 TAT-PEP 对半暗带内神经元超微结构的影响 (n=6, 每组)。电镜观察 MCAO 后 3 d 时各组半暗带内神经元的超微结构。箭头所指为线粒体。(Bar=2 μm)。

4 讨论

尽管由于急性脑卒中, 脑创伤, 围术期脑损伤等防治技术的进步及护理水平的提

高，使其病死率得到一定程度的控制，但是其存活者中，约 60%~80% 会遗留不同程度的智力障碍、感觉障碍、语言障碍、运动障碍、交流障碍等神经功能缺陷，严重影响患者生存质量，导致的沉重家庭负担，已成为严重的社会问题。因此，如何有效治疗上述疾病，促进神经功能恢复，降低病残率，减轻家庭及社会负担，仍是一个亟待解决的世界性难题。

特别是缺血性脑卒中，其发病过程中往往伴随着复杂的病理生理过程，会导致发病后长时间的神经功能缺失。这种神经功能障碍是由于缺血再灌注损伤造成感觉运动皮层结构和功能的破坏。在第四部分的脑梗死容积实验中，我们发现在脑缺血再灌注损伤的急性期、亚急性期及慢性期，感觉运动皮层发生不同程度的损伤。同时，实验动物的运动、协调、平衡、反射等神经功能也发生严重缺陷，这些结果与以往研究报道相一致。

神经元是中枢神经系统结构和功能的基本单位。其对缺血缺氧非常敏感，容易发生变性、坏死和凋亡，这在以往实验中已经得到大量证实。自 1981 年 Astrup 将局灶性脑缺血中心坏死区以外可逆性损害部分定义为缺血半暗带（IP）以来，临床上已将 IP 作为治疗缺血性脑血管病竭力挽救的区域^[16,17]。这是因为 IP 区发展至不可逆性损伤的速度较慢，需要数小时甚至 1 d，神经元死亡以凋亡为主。研究还证实脑缺血再灌注时，在缺血核心区凋亡和坏死的比率大约为 1: 9，而半暗带区比率为 1: 6。因此，如何减轻半暗带内神经元的损伤，促进神经元存活，是有效改善脑缺血再灌注损伤后神经功能的关键所在。

我们在新近研究发现，小鼠脑缺血再灌注损伤模型中 PirB 的 mRNA 和蛋白水平在缺血损伤区呈现高表达状态，提示其可能在脑缺血再灌注损伤的病理过程中扮演重要角色。??? 等发现，在大鼠 MCAO 模型中，损伤半球内 PirB 表达量显著多于健侧半球或假手术组。Adelson 等通过 *pirb* 敲除的转基因小鼠 MCAO 模型和离体脑片的 OGD 模型发现，*pirb* 敲除的转基因小鼠在脑缺血再灌注损伤后脑梗死容积明显减少，运动皮层的损伤明显减轻；离体脑片的海马神经元死亡明显减少，这进一步证实 PirB 在脑缺血再灌注后神经元损伤过程中发挥重要作用。

在第一部分实验中，我们通过大鼠 MCAO 模型发现 PirB 在半暗带内呈现长时程的高表达状态，并且发现 PirB 表达在神经元的胞浆及包膜上。这种持续而显著的高表达现象提示 PirB 可能是治疗脑缺血再灌注损伤的一个潜在的重要靶点。在本部分

实验中，我们通过大鼠 MCAO 模型，并给予 TAT-PEP 干预后发现，TAT-PEP 能够显著减少感觉运动皮层半暗带内变性和凋亡神经元的数量，改善神经元的超微结构，有效促进神经元的存活。这可能是 TAT-PEP 有效减少脑梗死容积，促进神经功能恢复，发挥神经保护作用的一个重要原因。在本课题组前期研究中，通过利用小鼠全脑缺血再灌注模型即 BCCAO 模型及 TAT-PEP 干预，证实 TAT-PEP 能够显著减少海马缺血区神经元的变性和凋亡，促进神经元的存活。同时，通过多种神经行为学实验证实，TAT-PEP 还可以有效促进模型动物自主运动功能的恢复，改善学习和记忆功能。这些研究提示 TAT-PEP 能够发挥长时程的神经保护作用，这种保护神经作用的另一机制可能是其能够减轻脑缺血损伤区神经元的变性和凋亡。

脑缺血再灌注损伤涉及多种复杂的病理生理过程和多种细胞相互作用，为了进一步明确 TAT-PEP 的神经保护和机制，我们进行原代神经元培养，利用离体 OGD 模型，是研究问题更加具体化。结果发现，TAT-PEP 可以显著增强 OGD 后神经元活力，减少 LDH 释放，减轻神经元损伤；可以减少 OGD 后凋亡神经元的数量，抑制凋亡蛋白 Bax 的表达，促进抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达，激活的 Caspase-3。以往研究显示，（孙主任国科金 2012）脑缺血半暗带神经元的损伤主要通过凋亡机制加以调控。缺血半暗带神经元凋亡的机制之一是由于[13]脑缺血后谷氨酸在细胞外积聚，使电压依赖 Ca^{2+} 通道开放，细胞质基质中钙超载，激活了钙激活酶，使 Bid 裂解为 tBid。tBid 与线粒体膜上的凋亡蛋白如 Bad 和 Bax 相互作用，导致线粒体通透性转换孔开放，释放细胞色素 C 或细胞凋亡因子。细胞色素 C 与细胞凋亡蛋白激活因子-1（Apaf-1）及促胱天蛋白酶-9（procaspase-9）结合成“凋亡复合体”，相继激活胱天蛋白酶-9（Caspase-9）和胱天蛋白酶-3（Caspase-3），激活的 Caspase-3 切割 DNA 修复酶，从而导致 DNA 损伤及细胞凋亡。但是，本研究中尚未直接阐明在脑缺血再灌注损伤后，PirB 是如何发挥作用调控 Bax, Bcl-2 表达，从而激活 Caspase-3，引起细胞凋亡的。虽然我们在神经元超微结构中观察到半暗带内神经元细胞核和线粒体在脑缺血再灌注损伤后发生明显损伤，可能是由于 PirB 影响 Bax, Bcl-2 表达，导致线粒体通透性转换孔开放，从而激活 Caspase-3，但是具体的机制过程和信号通路仍需要进一步证实。研究表明，干扰 NgR1 与 Nogo-A 的结合可以有效抑制 Bax 表达，促进 Bcl-2 表达，从而激活 Caspase-3。（再加一点）。虽然在本实验中未直接说明 Nogo-A 等与 PirB 结合后可以影响 Bax, Bcl-2 的表达，但已间接证明可能存在这种机制。而

TAT-PEP 是否干扰 Nogo-A 与 PirB 的信号通路，从而影响 Bax, Bcl-2 和活化的 Caspase-3 表达，发挥神经保护作用，还需要深入研究。

另一方面，新近研究发现主要组织相容性复合体-I (major histocompatibility class I, MHC I)也是 PirB 的配体之一。其可以与神经元 PirB 结合，影响神经元突触的可塑性。Shatz 等报道，MHC I 能够限制正常脑组织的突触可塑性；Needleman 等发现，MCAO 后缺血区内神经元 MHC I 表达显著增多；Adelson 等发现，MCAO 后 KbdB 敲除的转基因小鼠脑梗死容积明显减少，OGD 后海马神经元损伤明显减轻，其在 *pirb* 敲除的转基因小鼠模型中也发现了类似的现象。我们在本实验中并未检测 TAT-PEP 能否与 KbdB 结合从而干扰 KbdB 与 PirB 的结合，这在下一步实验中还需要明确和研究。

5 小结

本部分实验通过利用离体 OGD 模型和在体大鼠 MCAO 模型及多种神经科学研究方法，发现 TAT-PEP 能够加强 OGD 后皮层神经元的存活，减少 LDH 的释放，减轻神经元凋亡和损伤；TAT-PEP 能够减轻皮层半暗带内神经元变性和凋亡，改善其超微结构，促进神经元存活，发挥神经保护作用。相关机制可能与其干扰 Nogo-A 等与 PirB 结合，影响下游信号通路，从而抑制 Bax 表达，促进 Bcl-2 表达，导致线粒体通透性转换孔开放和 Caspase-3 的激活有关。该实验为阐明 PirB 在缺血再灌注损伤致神经元凋亡的机制研究及 TAT-PEP 的神经保护作用及机制研究提供了理论依据和实验基础，为缺血再灌注损伤的临床治疗提供了新的干预靶点和有效策略。

小 结

在本研究中,我们首先利用 MCAO 模型,发现从 MCAO 后 3 d 到 28 d 时 MAG, OMgp, Nogo-A 在皮层半暗带内表达显著增加和神经元 PirB 也在皮层半暗带内高表达。体外实验进一步发现,通过 *pirb* RNAi 干涉 PirB 后,可以促进氧糖剥夺后神经元轴突生长和存活。随后,我们制备了新型可溶性融合蛋白 TAT-PEP,其经腹腔注射后可以通过血脑屏障并分布于皮层半暗带内。体外实验表明,其与 MAG, OMgp, Nogo-A 具有较好的亲和力,并可以逆转它们的抑制效应,促进轴突生长。体内实验显示, TAT-PEP 能够减少 MCAO 后脑梗死容积,促进长时程神经功能恢复。研究进一步发现, TAT-PEP 可以促进轴突再生和皮质脊髓束重塑,加强突触可塑性。体外实验也证实, TAT-PEP 能够促进 OGD 后神经突起长度,减轻生长锥崩溃瓦解,改善突触功能。这些作用的机制可能与 TAT-PEP 通过抑制 PirB 功能,进而影响其下游分子 POSH, RhoA 和 GAP43 的表达有关。我们还发现, TAT-PEP 可以通过减轻缺血再灌注后神经元变性和凋亡,进而发挥神经保护作用,其机制可能与 TAT-PEP 能够影响活化的 Caspase-3 以及 Bax 和 Bcl-2 表达有关。这些发现提示,缺血再灌注损伤后神经元 PirB 呈现高表达,对神经元造成严重损害。TAT-PEP 通过阻碍 MAIs 和 PirB 相互作用,发挥神经保护作用。该研究为缺血性脑卒中的治疗提供了新的靶点和新的策略,为 TAT-PEP 可能的临床应用提供理论依据和实验基础。

参考文献

- [1] Dirnagl U, Endres M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes[J]. *Stroke*, 2014, 45(5):1510-1518.
- [2] Liu S, Levine SR, Winn HR. Targeting ischemic penumbra Part II: selective drug delivery using liposome technologies[J]. *J Exp Stroke Transl Med*, 2011, 4(1):16-23.
- [3] Liu S, Levine SR, Winn HR. Targeting ischemic penumbra: part I - from pathophysiology to therapeutic strategy[J]. *J Exp Stroke Transl Med*, 2010, 3(1):47-55.
- [4] Szeder V, Torbey MT. Prevention and treatment of perioperative stroke[J]. *Neurologist*, 2008, 14(1):30-36.
- [5] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2013, 127(1):e6-e245.
- [6] Hu D, Sun Y. Epidemiology, risk factors for stroke, and management of atrial fibrillation in China[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(10):865-868.
- [7] Liu M, Wu B, Wang WZ et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies[J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(5):456-464.
- [8] Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA et al. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century[J]. *Lancet Neurol*, 2003, 2(1):43-53.
- [9] Alberts MJ, Naidech AM. tPA and warfarin: time to move forward[J]. *Neurology*, 2013, 80(6):514-515.
- [10] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. *Stroke*, 1989, 20(8):1037-1043.
- [11] Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra[J]. *Stroke*, 1981, 12(6):723-725.
- [12] Saver JL. Time is brain--quantified[J]. *Stroke*, 2006, 37(1):263-266.
- [13] Greco R, Amantea D, Blandini F et al. Neuroprotective effect of nitroglycerin in a rodent model of ischemic stroke: evaluation of Bcl-2 expression[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2007, 82:423-435.
- [14] Eschenfelder CC, Krug R, Yusofi AF et al. Neuroprotection by oxygen in acute transient focal cerebral ischemia is dose dependent and shows superiority of hyperbaric oxygenation[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 25(3):193-201.
- [15] Han JL, Blank T, Schwab S et al. Inhibited glutamate release by granulocyte-colony stimulating factor after experimental stroke[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 432(3):167-169.
- [16] Walberer M, Rueger MA. The macrosphere model-an embolic stroke model for studying the pathophysiology of focal cerebral ischemia in a translational approach[J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(9):123.
- [17] Bolander HG, Persson L, Hillered L et al. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(7):930-937.
- [18] Sun M, Deng B, Zhao X et al. Isoflurane preconditioning provides neuroprotection against stroke by regulating the expression of the TLR4 signalling pathway to alleviate microglial activation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:11445.

- [19] Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(19):11401-11404.
- [20] Zhao Y, Deng B, Li Y et al. Electroacupuncture Pretreatment Attenuates Cerebral Ischemic Injury via Notch Pathway-Mediated Up-Regulation of Hypoxia Inducible Factor-1alpha in Rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015.
- [21] Holt CE, Schuman EM. The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons[J]. *Neuron*, 2013, 80(3):648-657.
- [22] Hinman JD. The back and forth of axonal injury and repair after stroke[J]. *Curr Opin Neurol*, 2014, 27(6):615-623.
- [23] Adelson JD, Barreto GE, Xu L et al. Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB[J]. *Neuron*, 2012, 73(6):1100-1107.
- [24] Llorens F, Gil V, Del RJ. Emerging functions of myelin-associated proteins during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration[J]. *FASEB J*, 2011, 25(2):463-475.
- [25] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12):799-811.
- [26] Llorens F, Gil V, Del RJ. Emerging functions of myelin-associated proteins during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration[J]. *FASEB J*, 2011, 25(2):463-475.
- [27] Prinjha R, Moore SE, Vinson M et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans[J]. *Nature*, 2000, 403(6768):383-384.
- [28] GrandPre 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.
- [29] Tessier-Lavigne M, Goodman CS. Perspectives: neurobiology. Regeneration in the Nogo zone[J]. *Science*, 2000, 287(5454):813-814.
- [30] Huber AB, Weinmann O, Brosamle C et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9):3553-3567.
- [31] Erratum and Addendum. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. Retraction of a retraction[J]. *FASEB J*, 2013, 27(8):3409-3411.
- [32] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12):799-811.
- [33] Hunt D, Coffin RS, Prinjha RK et al. Nogo-A expression in the intact and injured nervous system[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(4):1083-1102.
- [34] Meier S, Brauer AU, Heimrich B et al. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure[J]. *FASEB J*, 2003, 17(9):1153-1155.
- [35] Cheatwood JL, Emerick AJ, Schwab ME et al. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat[J]. *Stroke*, 2008, 39(7):2091-2098.
- [36] Israelsson C, Flygt J, Astrand E et al. Altered expression of myelin-associated inhibitors and their receptors after traumatic brain injury in the mouse[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2014, 32(5):717-731.
- [37] Hunt D, Mason MR, Campbell G et al. Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20(4):537-552.
- [38] Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R et al. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp[J]. *Nature*, 2002, 420(6911):74-78.
- [39] Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of

- axonal regeneration[J]. *Nature*, 2001, 409(6818):341-346.
- [40] Wang Q, Gou X, Jin W et al. TAT-mediated protein transduction of Nogo extracellular peptide 1-40 and its biological activity[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(1):97-108.
- [41] Chivatakarn O, Kaneko S, He Z et al. The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(27):7117-7124.
- [42] Zheng B, Atwal J, Ho C et al. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(4):1205-1210.
- [43] Williams G, Wood A, Williams EJ et al. Ganglioside inhibition of neurite outgrowth requires Nogo receptor function: identification of interaction sites and development of novel antagonists[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(24):16641-16652.
- [44] Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J et al. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration[J]. *Science*, 2008, 322(5903):967-970.
- [45] Filbin MT. PirB, a second receptor for the myelin inhibitors of axonal regeneration Nogo66, MAG, and OMgp: implications for regeneration in vivo[J]. *Neuron*, 2008, 60(5):740-742.
- [46] Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J et al. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration[J]. *Science*, 2008, 322(5903):967-970.
- [47] Ho LH, Uehara T, Chen CC et al. Constitutive tyrosine phosphorylation of the inhibitory paired Ig-like receptor PIR-B[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(26):15086-15090.
- [48] Garay PA, McAllister AK. Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders[J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2010, 2:136.
- [49] Gou X, Zhang Q, Xu N et al. Spatio-temporal expression of paired immunoglobulin-like receptor-B in the adult mouse brain after focal cerebral ischaemia[J]. *Brain Inj*, 2013, 27(11):1311-1315.
- [50] Wang H, Xiong Y, Mu D. PirB restricts neuronal regeneration in developing rat brain following hypoxia-ischemia[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(2):339-344.
- [51] Dickson HM, Zurawski J, Zhang H et al. POSH is an intracellular signal transducer for the axon outgrowth inhibitor Nogo66[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(40):13319-13325.
- [52] VanGuilder SH, Van Kirk CA, Bixler GV et al. Neuroglial expression of the MHCI pathway and PirB receptor is upregulated in the hippocampus with advanced aging[J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 48(1):111-126.
- [53] Kubagawa H, Burrows PD, Cooper MD. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(10):5261-5266.
- [54] Yamashita Y, Fukuta D, Tsuji A et al. Genomic structures and chromosomal location of p91, a novel murine regulatory receptor family[J]. *J Biochem*, 1998, 123(2):358-368.
- [55] Takai T. Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition[J]. *Immunology*, 2005, 115(4):433-440.
- [56] Nakamura Y, Fujita Y, Ueno M et al. Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(3):1876-1883.
- [57] Deng XH, Ai WM, Lei DL et al. Lipopolysaccharide induces paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) expression, synaptic alteration, and learning-memory deficit in rats[J]. *Neuroscience*, 2012, 209:161-170.

- [58] Matsushita H, Endo S, Kobayashi E et al. Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHCI) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(29):25739-25747.
- [59] Lebbink RJ, de Ruiter T, Verbrugge A et al. The mouse homologue of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is an inhibitory receptor that recruits Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-2, but not SHP-1[J]. *J Immunol*, 2004, 172(9):5535-5543.
- [60] Akbik F, Cafferty WB, Strittmatter SM. Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity[J]. *Exp Neurol*, 2012, 235(1):43-52.
- [61] Syken J, Grandpre T, Kanold PO et al. PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex[J]. *Science*, 2006, 313(5794):1795-1800.
- [62] Omoto S, Ueno M, Mochio S et al. Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal plasticity or functional recovery after traumatic brain injury[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(39):13045-13052.
- [63] Raiker SJ, Lee H, Baldwin KT et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(37):12432-12445.
- [64] Shatz CJ. MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity[J]. *Neuron*, 2009, 64(1):40-45.
- [65] Datwani A, McConnell MJ, Kanold PO et al. Classical MHCI molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity[J]. *Neuron*, 2009, 64(4):463-470.
- [66] Nakamura Y, Fujita Y, Ueno M et al. Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(3):1876-1883.
- [67] Xia M, Cheng X, Yi R et al. The Binding Receptors of Abeta: an Alternative Therapeutic Target for Alzheimer's Disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2014.
- [68] Kim T, Vidal GS, Djuricic M et al. Human LirB2 is a beta-amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model[J]. *Science*, 2013, 341(6152):1399-1404.
- [69] Wiessner C, Bareyre FM, Allegrini PR et al. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(2):154-165.
- [70] Fujita Y, Endo S, Takai T et al. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity[J]. *EMBO J*, 2011, 30(7):1389-1401.
- [71] Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D. Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(2):314-324.
- [72] Park KK, Liu K, Hu Y et al. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway[J]. *Science*, 2008, 322(5903):963-966.
- [73] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2009, 40(5):e331-e339.
- [74] Dupuis L, Pehar M, Cassina P et al. Nogo receptor antagonizes p75NTR-dependent motor neuron death[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(2):740-745.
- [75] Wang Q, Gou X, Xiong L et al. Trans-activator of transcription-mediated delivery of NEP1-40 protein into brain has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemic injury via inhibition of neuronal apoptosis[J]. *Anesthesiology*, 2008, 108(6):1071-1080.
- [76] Cook DJ, Teves L, Tymianski M. A translational paradigm for the preclinical evaluation of the stroke neuroprotectant Tat-NR2B9c in gyrencephalic nonhuman primates[J]. *Sci Transl Med*, 2012,

4(154):133r-154r.

- [77] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(25):16010-16017.
- [78] Ruben S, Perkins A, Purcell R et al. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein[J]. *J Virol*, 1989, 63(1):1-8.
- [79] Kilic U, Kilic E, Dietz GP et al. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice[J]. *Stroke*, 2003, 34(5):1304-1310.
- [80] Kilic U, Kilic E, Dietz GP et al. The TAT protein transduction domain enhances the neuroprotective effect of glial-cell-line-derived neurotrophic factor after optic nerve transection[J]. *Neurodegener Dis*, 2004, 1(1):44-49.
- [81] Deng B, Gou X, Chen H et al. Targeted delivery of neurogenin-2 protein in the treatment for cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(34):8786-8797.

附 录

发表 SCI 论文首页

Biomaterials 34 (2013) 8786–8797



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials



Targeted delivery of Neurogenin-2 protein in the treatment for cerebral ischemia-reperfusion injury



Bin Deng^{a,1}, Xingchun Gou^{a,b,1}, Hai Chen^{a,1}, Liya Li^c, Haixing Zhong^c, Hao Xu^a, Fengliang Jiang^b, Zhijing Zhao^{d,**}, Qiang Wang^{c,**}, Lixian Xu^{a,*}

^a Department of Anesthesiology, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

^b The Lab of Cell Biology & Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

^c Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

^d Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2013

Accepted 21 July 2013

Available online 12 August 2013

Keywords:

Stroke

Neurogenin-2

Trans-activator of transcription domain

Laminin-binding domain

Targeted delivery

Apoptosis

ABSTRACT

Neurogenin-2 (Ngn2), as a proneural gene that promotes the survival and differentiation of neural precursor cells, is an attractive candidate for therapy against cerebral ischemia-reperfusion injury. However, the delivery approach limits its clinical application. To deliver Ngn2 protein into the cerebral ischemic region and exert a therapeutic effect on injured neurons after ischemia, we here reported that the fusion protein TAT-LBD-Ngn2 was constructed by fusing a transactivator of transcription (TAT) domain and a laminin-binding domain (LBD) to Ngn2. TAT-LBD-Ngn2 promoted the outgrowth of neuronal neurite, increased the survival rate and alleviated apoptosis of hippocampal neurons exposed to oxygen glucose deprivation *in vitro*. Furthermore, a focal cerebral ischemia model in C57BL/6 mice showed that TAT-LBD-Ngn2 efficiently crossed the blood brain barrier, aggregated in the ischemic zone and was consistently incorporated into neurons. Moreover, TAT-LBD-Ngn2 transduced into brains attenuated neuronal degeneration and apoptosis in the ischemic zone. TAT-LBD-Ngn2 treatment resulted in a reduction of infarct volume that was associated with a parallel improvement in neurological functional outcomes after reperfusion. In conclusion, the targeted delivery of TAT-LBD-Ngn2 into the ischemic zone attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury through the inhibition of neuronal degeneration and apoptosis, suggesting that TAT-LBD-Ngn2 is a promising target candidate for the treatment of ischemic stroke.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stroke remains a vexing public health problem. Stroke is currently the second leading cause of death in the Western world and causes 10% of deaths worldwide. Stroke, which disables 75% of its survivors, is also the leading cause of adult disability in the United States and Europe [1]. However, limited advances have been made in developing therapies to counter the deleterious effects of ischemic stroke, with the only available treatment being thrombolysis with tissue plasminogen activator (tPA) [2]. Unfortunately, due to the narrow therapeutic window (<4.5 h) and safety concerns, less than 5% of all patients are treated with tPA. Thus, the

development of treatment strategies for cerebral ischemic injury is a high priority.

Neurogenin-2 (Ngn2), a gene encoding a basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor located on chromosome 3, regulates signaling pathways that identity and specify neuronal fate in the central nervous system [3,4]. Many studies have demonstrated that Ngn2 can promote neuronal differentiation, subtype specification, maturation and integration in different regions of the brain [5–8]. Moreover, transplanting Ngn2-transduced neural precursor cells (NPCs) enhanced neuronal yield and donor cell survival [9], and the transitory expression of Ngn2 in embryonic progenitors is sufficient to stimulate axonal sprouting and improve motor recovery after severe spinal cord injury [10]. These results suggest that Ngn2 may be an attractive candidate for the treatment of neurological disease. However, the functions of Ngn2 were investigated only in neurons that were transiently transfected with Ngn2 gene *in vitro* [9,11].

A popular treatment strategy involves gene therapy, but its use in the clinic is hampered by barriers to gene transfection and

* Corresponding author. Tel.: +86 29 84776123; fax: +86 29 84771262.

** Corresponding authors.

E-mail addresses: wangqiang@fmmu.edu.cn (Q. Wang), xlx116@fmmu.edu.cn (L. Xu).

¹ These authors contributed equally to this work.

Neuroprotective Effects of Sevoflurane against Electromagnetic Pulse-Induced Brain Injury through Inhibition of Neuronal Oxidative Stress and Apoptosis

Bin Deng^{1,3}, Hao Xu^{2,3}, Jin Zhang^{1,3}, Jin Wang⁴, Li-Chun Han⁵, Li-Ya Li⁶, Guang-Li Wu⁷, Yan-Ning Hou³, Guo-Zhen Guo⁴, Qiang Wang^{6*}, Han-Fei Sang^{3,6*}, Li-Xian Xu^{1*}

1 State Key Laboratory of Military Stomatology, Department of Anesthesiology, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, China, **2** Department of Anatomy, Histology and Embryology, K. K. Leung Brain Research Centre, the Fourth Military Medical University, Xi'an, China, **3** Department of Clinical Pharmacology, Bethune International Peace Hospital of People's Liberation Army, Shijiazhuang, China, **4** Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an, China, **5** Department of Anesthesiology, Shanxi Tumor Hospital, Xi'an, China, **6** Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, China, **7** Department of Nephrology, Bethune International Peace Hospital of People's Liberation Army, Shijiazhuang, China

Abstract

Electromagnetic pulse (EMP) causes central nervous system damage and neurobehavioral disorders, and sevoflurane protects the brain from ischemic injury. We investigated the effects of sevoflurane on EMP-induced brain injury. Rats were exposed to EMP and immediately treated with sevoflurane. The protective effects of sevoflurane were assessed by Nissl staining, Fluoro-Jade C staining and electron microscopy. The neurobehavioral effects were assessed using the open-field test and the Morris water maze. Finally, primary cerebral cortical neurons were exposed to EMP and incubated with different concentration of sevoflurane. The cellular viability, lactate dehydrogenase (LDH) release, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level were assayed. TUNEL staining was performed, and the expression of apoptotic markers was determined. The cerebral cortexes of EMP-exposed rats presented neuronal abnormalities. Sevoflurane alleviated these effects, as well as the learning and memory deficits caused by EMP exposure. In vitro, cell viability was reduced and LDH release was increased after EMP exposure; treatment with sevoflurane ameliorated these effects. Additionally, sevoflurane increased SOD activity, decreased MDA levels and alleviated neuronal apoptosis by regulating the expression of cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2. These findings demonstrate that Sevoflurane conferred neuroprotective effects against EMP radiation-induced brain damage by inhibiting neuronal oxidative stress and apoptosis.

Citation: Deng B, Xu H, Zhang J, Wang J, Han L-C, et al. (2014) Neuroprotective Effects of Sevoflurane against Electromagnetic Pulse-Induced Brain Injury through Inhibition of Neuronal Oxidative Stress and Apoptosis. PLoS ONE 9(3): e91019. doi:10.1371/journal.pone.0091019

Editor: Zhongcong Xie, Massachusetts General Hospital, United States of America

Received: October 29, 2013; **Accepted:** February 6, 2014; **Published:** March 10, 2014

Copyright: © 2014 Deng et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grants No. 30371763, No. 81071060, No. 81070997, No. 31100785 and No. 81171237), the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (Grants No. 2006C254, No. 2011KJXX67 and No. 2013JM4040, 2012KTCG01-02, 2013KTZB03-03), and the Fourth Military Medical University Foundation (Grant No. 2013-D03). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: wangqiang@fmmu.edu.cn (QW); xlx116@fmmu.edu.cn (LXX); hfsang@fmmu.edu.cn (HFS)

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Most electrical equipment and wireless communication devices produce electromagnetic radiation. There is widespread concern regarding the adverse effects on human health caused by exposure to many types of electromagnetic fields (EMFs) [1,2]. The potential for EMF exposure to damage the central nervous system (CNS) has been discussed in-depth. Previous studies indicate that the non-thermal effects of EMF exposure can lead to cellular changes [3,4,5]. Additionally, EMF can increase reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in organs and cause histopathological damage and oxidative stress [6,7,8,9]; for example, under particular circumstances, exposure to a GSM-modulated, 900-MHz signal acts as a co-stressor for oxidative damage of neural cells [10]. Several studies also suggest that occupational exposure to electromagnetic fields may be associated with increased risk of neurodegenerative diseases [11,12].

Electromagnetic pulse (EMP), a specific type of EMF, is a short high-voltage pulse with an extremely fast rising time and a broad bandwidth from extremely low frequencies up to 1.5 GHz [13,14]. EMP is widely applied in medical therapies, such as those targeting osteoporosis, and is also used in military campaigns. However, the biological effects and potential harm to humans in an environment of electromagnetic radiation have not been well studied. Brain tissue is sensitive to EMP, which increases cerebral microvascular permeability in rats [15] and can disrupt the blood-brain barrier (BBB) [5]. Additionally, EMP exposure can cause long-term impairments in rat learning and memory [12]. However, the non-thermal effects of EMP remain controversial [2]. It is unknown whether the non-thermal effects of EMP can induce short-term histopathological damage and ultrastructural changes in cerebral cortex neurons.

Recently, the neuroprotective effect of inhaled anesthetics has attracted increased attention. Sevoflurane is an inhaled anesthetic

Two Monoclonal Antibodies Recognising aa 634-668 and aa 1026-1055 of NogoA Enhance Axon Extension and Branching in Cultured Neurons

Bin Deng^{1,2,3}, Fei Gao³, Fang-Fang Liu¹, Xiang-Hui Zhao¹, Cai-Yong Yu¹, Gong Ju¹, Li-Xian Xu^{2*}, Jian Wang^{1*}

1 Institute of Neurosciences, the Fourth Military Medical University, Xi'an, China, **2** Department of Anesthesiology, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an, China, **3** Department of Clinical Laboratory, No. 174 Hospital of People's Liberation Army, Xiamen, China

Abstract

In a previous study, we generated two monoclonal antibodies (mAbs) in mice, aNogoA-N and aNogo-66 mAb, which were raised against recombinant N-terminal fragments of rat NogoA and Nogo-66, respectively. When compared with the commercial rabbit anti-rat NogoA polyclonal antibody (pAb), which can specifically recognise NogoA, the two mAbs were also specific for the NogoA antigen in immunofluorescence histochemical (IHC) staining and Western blot (WB) analysis. Serial truncations of NogoA covering the N-terminal region of NogoA (aa 570–691) and Nogo-66 (aa 1026–1091) were expressed in *E. coli*. The epitopes recognised by aNogoA-N and aNogo-66 are located in the aa 634–668 and aa 1026–1055 regions of NogoA, respectively. Both mAbs remarkably enhanced the axon growth and branching of cultured hippocampal neurons *in vitro*. These results suggest that the antibodies that bind to aa 634–668 and aa 1026–1055 of NogoA may have stimulatory effects on axon growth and branching. Additionally, the two mAbs that we generated are specific for NogoA and significantly block NogoA function. In conclusion, two sites in NogoA located within aa 634–668 and aa 1026–1055 are recognised by our two antibodies and are novel and potentially promising targets for repair after central nervous system (CNS) injury.

Citation: Deng B, Gao F, Liu F-F, Zhao X-H, Yu C-Y, et al. (2014) Two Monoclonal Antibodies Recognising aa 634-668 and aa 1026-1055 of NogoA Enhance Axon Extension and Branching in Cultured Neurons. PLoS ONE 9(2): e88554. doi:10.1371/journal.pone.0088554

Editor: Lisa Ng Fong Poh, Agency for Science, Technology and Research - Singapore Immunology Network, Singapore

Received: October 29, 2013; **Accepted:** January 7, 2014; **Published:** February 12, 2014

Copyright: © 2014 Deng et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 30371763, No. 81071060, No. 81070997, No. 31100785), and in part by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (Grant No. 2006C254, No. 2011KJXX67). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jwangfm@fmmu.edu.cn (JW); xlx116@fmmu.edu.cn (LXX)

These authors contributed equally to this work.

Introduction

After injury, the central nervous system (CNS) of adult mammals is limited in its ability to recover because of the inability of damaged axons to reconnect and regain their physiological structure and function [1]. Factors that influence axon regeneration include neural cell-autonomous activity, glial scarring, local inflammation, and inhibition factors [2,3]. In the past two decades, several CNS myelin-derived axon growth inhibitory factors have been found, including NogoA, myelin-associated glycoprotein (MAG), and oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) [4,5,6]. These proteins have been the subject of great research interest and are highly clinically relevant. NogoA plays an important role in recovery from spinal cord injury, oligodendrocyte differentiation and myelination [7,8,9], and the development of the CNS [10,11]. A recent study reported that a region of NogoA (aa 290–562) attenuates cerebral ischaemia by inhibiting NADPH oxidase-mediated oxidative damage and neuronal apoptosis [12], indicating that the functional diversity of different fragments of NogoA must be explored.

The function of NogoA has been studied extensively using anti-NogoA antibodies [13,14]. In a previous study, we developed two

anti-NogoA monoclonal antibodies, aNogoA-N and aNogo66 mAb, which were generated in mice using recombinant aa 570–691 and aa 1026–1091 fragments, respectively, from NogoA [15]. In the present study, we analysed the specificity and affinity of the two mAbs to the NogoA molecule. We also detected the different epitopes in NogoA that could be recognised by the two mAbs. Using *in vitro* experiments, we found that these mAbs against NogoA enhanced axon growth and branch formation.

Materials and Methods

Animals

Male Sprague–Dawley rats weighing 200–220 g and Sprague–Dawley rat embryos (E18.5) were obtained from the Experimental Animal Center of the Fourth Military Medical University (Xi'an, China). All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Fourth Military Medical University. The protocols used in this research project complied with the guidelines for the care and use of laboratory animals of the Fourth Military Medical University. During the experiments, all efforts were made to minimise animal suffering and the number of animals used.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Isoflurane preconditioning provides neuroprotection against stroke by regulating the expression of the TLR4 signalling pathway to alleviate microglial activation

Received: 28 January 2015

Accepted: 20 May 2015

Published: 18 June 2015

Meiyan Sun^{2,*}, Bin Deng^{2,3,*}, Xiaoyong Zhao^{2,4,*}, Changjun Gao¹, Lu Yang¹, Hui Zhao¹, Daihua Yu¹, Feng Zhang⁵, Lixian Xu³, Lei Chen² & Xude Sun¹

Excessive microglial activation often contributes to inflammation-mediated neurotoxicity in the ischemic penumbra during the acute stage of ischemic stroke. Toll-like receptor 4 (TLR4) has been reported to induce microglial activation via the NF- κ B pathway. Isoflurane preconditioning (IP) can provide neuroprotection and inhibit microglial activation. In this study, we investigated the roles of the TLR4 signalling pathway in IP to exert neuroprotection following ischemic stroke *in vivo* and *in vitro*. The results showed that 2% IP alleviated neurological deficits, reduced the infarct volume, attenuated apoptosis and weakened microglial activation in the ischemic penumbra. Furthermore, IP down-regulated the expression of HSP 60, TLR4 and MyD88 and up-regulated inhibitor of κ B- α expression compared with I/R group *in vivo*. *In vitro*, 2% IP and a specific inhibitor of TLR4, CLI-095, down-regulated the expression of TLR4, MyD88, IL-1 β , TNF- α and Bax, and up-regulated κ B- α and Bcl-2 expression compared with OGD group. Moreover, IP and CLI-095 attenuated microglial activation-induced neuronal apoptosis, and overexpression of the TLR4 gene reversed the neuroprotective effects of IP. In conclusion, IP provided neuroprotection by regulating TLR4 expression directly, alleviating microglial activation and neuroinflammation. Thus, inhibiting the activation of microglial activation via TLR4 may be a new avenue for stroke treatment.

Ischemia/reperfusion (I/R)-induced brain injury is implicated in the pathophysiology of stroke and results in an initial area of neuronal death known as the core, surrounded by an area vulnerable to further damage known as the penumbra¹. Furthermore, neuronal apoptosis and necrosis in the penumbra can be viewed as primary causes of aggravated cerebral injury and functional impairment. Additionally, neuronal apoptosis can be exacerbated by the excessive formation of inflammatory reactions after an ischemic stroke, which has been demonstrated to be the one cause contributing to cerebral I/R injury². Although several studies have been devoted to developing methods to reduce inflammatory reactions during ischemic cerebral injury, effective methods have not yet been established.

¹Department of Anesthesiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China.

²Department of Gynaecology and Obstetrics, Nave General Hospital, Beijing, 100059, China. ³State Key Laboratory of Military Stomatology, Department of Anesthesiology, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China. ⁴Department of Anesthesiology, Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261053, China. ⁵Department of Medical Administration, Lintong Sanatorium of PLA Lanzhou Military District, Lintong, Xi'an, 710600, China. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.C. (email: chenleis@mail.tsinghua.edu.cn) or X.S. (email: sunxude@fmmu.edu.cn)

Electroacupuncture Pretreatment Attenuates Cerebral Ischemic Injury via Notch Pathway-Mediated Up-Regulation of Hypoxia Inducible Factor-1 α in Rats

Yu Zhao^{1,2} · Bin Deng¹ · Yichong Li² · Lihua Zhou² · Lei Yang⁴ · Xingchun Gou³ · Qiang Wang⁴ · Guozhong Chen⁵ · Hao Xu³ · Lixian Xu¹

Received: 16 February 2015 / Accepted: 29 April 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract We have reported electroacupuncture (EA) pretreatment induced the tolerance against focal cerebral ischemia through activation of canonical Notch pathway. However, the underlying mechanisms have not been fully understood. Evidences suggest that up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) contributes to neuroprotection against ischemia which could interact with Notch signaling pathway in this process. Therefore, the current study is to test that up-regulation of HIF-1 α associated with Notch pathway contributes to the neuroprotection of EA pretreatment. Sprague–Dawley rats were treated with EA at the acupoint “Baihui (GV 20)” 30 min per day for successive 5 days before MCAO. HIF-1 α levels were measured before and after reperfusion. Then, HIF-1 α antagonist 2ME2 and γ -secretase inhibitor MW167 were used. Neurologic deficit scores, infarction volumes, neuronal apoptosis, and Bcl2/Bax were evaluated. HIF-1 α and

Notch1 intracellular domain (NICD) were assessed. The results showed EA pretreatment enhanced the neuronal expression of HIF-1 α , reduced infarct volume, improved neurological outcome, inhibited neuronal apoptosis, up-regulated expression of Bcl-2, and down-regulated expression of Bax after reperfusion in the penumbra, while the beneficial effects were attenuated by 2ME2. Furthermore, intraventricular injection with MW167 efficiently suppressed both up-regulation of NICD and HIF-1 α after reperfusion. However, administration with 2ME2 could only decrease the expression of HIF-1 α in the penumbra. In conclusion, EA pretreatment exerts neuroprotection against ischemic injury through Notch pathway-mediated up-regulation of HIF-1 α .

Keywords HIF-1 α · Notch pathway · Stroke · Penumbra · Electroacupuncture · Neurobehavior function · Apoptosis

Yu Zhao and Bin Deng have contributed equally to this work.

✉ Hao Xu
haoxu83@hotmail.com

✉ Lixian Xu
xlx116@fmmu.edu.cn

¹ State Key Laboratory of Military Stomatology, Department of Anesthesiology, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

² Department of Anesthesiology, Binghua Hospital, Haerbin 150080, China

³ Institution of Basic Medical Science, Xi'an Medical University, Xi'an 710032, China

⁴ Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

⁵ Department of Anesthesiology, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350015, China

Introduction

Stroke is a major cause of death and disability in adults throughout the world, and only a minority of stroke patients receives thrombolytic therapy due to the narrow time window and side effects associated with the thrombolytic agent (Go et al. 2013). Therefore, new strategies focusing on neuroprotection are urgently needed. Preconditioning, as a potent endogenous protective procedure, activates several endogenous signaling pathways that protect against ischemia (Wang et al. 2009). Electroacupuncture (EA) has been shown to produce clinically beneficial effects in stroke patients, and EA pretreatment can also induce tolerance against ischemia (Zhao et al. 2012). However, the signaling mechanisms mediating the effects of EA pretreatment are unclear.

ORIGINAL ARTICLE

Asynchronous therapy targeting Nogo-A enhances neurobehavioral recovery by reducing neuronal loss and promoting neurite outgrowth after cerebral ischemia in mice

Liya Li^{1,2*}, Bin Deng^{3*}, Shiquan Wang¹, Haixing Zhong¹, Zhaoyu Liu¹, Weilin Jin⁴, Tao Jiang¹, Zhaoyang Xiao², and Qiang Wang¹

¹Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, China, ²Department of Emergency, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, China, ³Department of Anesthesiology, State Key Laboratory of Military Stomatology, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, China, and ⁴Institute of Neurosciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Jiao Tong University, Shanghai, China

Abstract

Therapeutics targeting the Nogo-A signal pathway hold promise to promote recovery following brain injury. Based on the temporal characteristics of Nogo-A expression in the process of cerebral ischemia and reperfusion, we tested a novel asynchronous treatment, in which TAT-M9 was used in the early stage to decrease neuronal loss, and TAT-NEP1-40 was used in the delayed stage to promote neurite outgrowth after bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) in mice. Both TAT-M9 and TAT-NEP1-40 were efficiently delivered into the brains of mice by intraperitoneal injection. TAT-M9 treatment promoted neuron survival and inhibited neuronal apoptosis. Asynchronous therapy with TAT-M9 and TAT-NEP1-40 increased the expression of Tau, GAP43 and MAP-2 proteins, and enhanced short-term and long-term cognitive functions. In conclusion, the asynchronous treatment had a long-term neuroprotective effect, which reduced neurologic injury and apoptosis, promoted neurite outgrowth and enhanced functional recovery after ischemia. It suggests that this asynchronous treatment could be a promising therapy for cerebral ischemia in humans.

Keywords

Global cerebral ischemia, neurite regeneration, neurological function recovery, Nogo-66 receptor, Nogo-A

History

Received 16 January 2015
Revised 4 April 2015
Accepted 13 May 2015
Published online 10 June 2015

Introduction

Stroke is the leading cause of death and disability in adults in China and the second most common cause of death and disability in the Western world [1]. In the early stage of stroke, oxidative stress not only causes the primary infarct, but also causes secondary damage in remote sites which cause a delay and selective neuronal loss, and influence recovery after stroke [2,3]. Meanwhile, axonal damage is an important pathology that leads to disability. Long-term neurological and behavioral impairment in the process of stroke are still key issues for post-ischemic survivors. Therefore, therapeutic strategies are needed to target not only on the early period of neuronal loss, but also on the later period of axonal regeneration which is the biggest problem of survivors facing today. So far, thrombolytic therapy is a relatively effective therapeutic method of the world [4]. But its narrow therapeutic window (<4.5 h) limits application and cannot solve dysuria after

stroke [5]. There are many other drugs for stroke, such as erythropoietin [6] and anti-apoptosis protein [7] which have neuroprotective effect in animal experiments. But these methods often target on one aspect of stroke which cannot solve the neuronal damage on the early stage of stroke and the disability on the chronic stage of stroke in the treatment.

Asynchronous therapy is a promising manner that using two different drugs or treatments in different stage which is more targeted on the different stage of stroke, and brings new hope to the post-ischemic survivors. A recent study showed a nearly full functional outcome recovery of rats when blocked the neurite growth-inhibitory protein Nogo-A in first 2 weeks and followed by rehabilitative training in last 2 weeks after the stroke [8]. Another study also found the infarct size of neonatal rat after perinatal hypoxic ischemic was significantly reduced when hypothermia and xenon were administered asynchronously [9]. Thus, asynchronous therapy, a promising manner that using two different drugs or treatments in different stage, seems having a synergistic neuroprotection after ischemic injury.

Amino-Nogo-A is a long specific region (aa186-1004) of Nogo-A, and M9 is a pivotal residue of amino-Nogo-A (290-562). M9 was fused with the most widely adopted protein transduction domains-HIV TAT (transactivator gene

*These authors contributed equally to this work.

Address for correspondence: Dr. Qiang Wang or Dr. Zhaoyang Xiao, Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. Tel: +86 29 8477 5343. Fax: +86 29 8477 1262. E-mail: wangqiang@fmmu.edu.cn (Q. Wang) or xiaozhaoyang2012@163.com (Z. Xiao)

MINI REVIEW

PirB is a novel potential therapeutic target for enhancing axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury in mammals

Zhaoyu Gou^{1,2*}, Yajing Mi^{2*}, Fengliang Jiang², Bin Deng², Jun Yang¹, and Xingchun Gou^{1,2}

¹College of Life Science, China West Normal University, Nanchong, China and ²Lab of Cell Biology & Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an, China

Abstract

A major barrier to axonal regeneration in mammals is the unfavorable extracellular environment that develops following injury to the central nervous system (CNS). In particular, three myelin-associated inhibitory proteins (MAIs) – Nogo, myelin-associated glycoprotein (MAG) and oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) – are known to inhibit axonal regeneration and functional recovery. These MAIs share a common receptor, glycosylphosphatidylinositol-anchored Nogo receptor (NgR). However, paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) – which was originally identified as a receptor for class I major histocompatibility complex (MHCI) in the immune system – is also expressed in neurones and plays a similarly inhibitory role in axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury through its association with MAIs. Importantly, suppression of PirB activity through antibody antagonism or genetic means can partially relieve the inhibition of neurite outgrowth *in vitro* and *in vivo*. In this review, we present the molecular features, expression patterns and known signaling pathways of PirB, and we specifically focus on putative roles for PirB in the CNS and its potential as a target of molecular therapies for enhancing axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury.

Keywords

Axonal regeneration, MAG, MHCI, myelin-associated inhibitory proteins, neuroimmunology, Nogo, OMgp, signaling pathway, synaptic plasticity

History

Received 25 July 2013
Revised 15 December 2013
Accepted 22 December 2013
Published online 9 January 2014

Introduction

In mammals, axonal regeneration, synaptic plasticity and subsequent motor recovery are processes that occur with some difficulty following injury to the central nervous system (CNS). The three myelin-derived inhibitors Nogo, myelin-associated glycoprotein (MAG) and oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) are potent *in vitro* inhibitors of neurite outgrowth, and they interact with the Nogo receptor (NgR) through their C-terminal 66-residue loops (Nogo-66) [1]. However, it has been shown that the genetic deletion of NgR does not significantly enhance neurite growth and synaptic plasticity following CNS injury [2], suggesting that one or more additional receptors may exist that function, either independently or synergistically, with NgR. In mice, paired immunoglobulin-like receptor B (PirB), which is an ortholog of human leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor B2 (LILRB2), has been identified as a candidate receptor for myelin inhibitors through expression clone screening [3]. LILRB2 belongs to the B-type subfamily of LILRs, which in

humans consists of five highly homologous family members: LILRB1, B2, B3, B4 and B5 [4,5].

Recent studies have demonstrated that PirB is also expressed in CNS neurones [6,7] and that it modulates neurite outgrowth and neuronal plasticity by associating with the three axonal outgrowth inhibitors Nogo, OMgp and MAG. It was also shown that a genetic deletion of PirB can dampen the inhibitory effects of these myelin-associated inhibitory proteins (MAIs) [3]. Additionally, *pirb* mutant mice showed greater visual cortical plasticity following injury compared with control mice [8]. These findings suggest that PirB may play an inhibitory role in neurite growth following CNS injury. Therefore, it may be possible to enhance axonal regeneration, synaptic plasticity and subsequent motor recovery by antagonizing the activity of PirB.

In the immune system, PirB functions as a receptor for class I major histocompatibility complex (MHCI), which leads to constitutive inhibitory signaling due to the ubiquitous expression of MHCI [9]. PirB has been implicated in a wide variety of immune-related functions, including neutrophil and macrophage integrin signaling [10], cytotoxic T lymphocyte triggering [11] and humoral and cellular immune responses [12]. Upon binding MHCI, the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) of the PirB cytoplasmic domain undergo tyrosine phosphorylation, which is mediated by Lyn, a member of the Src family of kinases [13]. Subsequently, these phosphorylated ITIMs recruit Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1

*These authors contributed equally to this work.

Address for correspondence: Xingchun Gou, Lab of Cell Biology & Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an, China. Tel: +86 29-86177603. Fax: +86 29-86177603. E-mail: gouxingchun@189.cn

Jun Yang, College of Life Science, China West Normal University, Nanchong, Sichuan Province, China. Tel: +86 29-86177472. Fax: +86 29-86177472. E-mail: yangjun@189.cn

ORIGINAL ARTICLE

Spatio-temporal expression of paired immunoglobulin-like receptor-B in the adult mouse brain after focal cerebral ischaemia

Xingchun Gou^{1,2}, Qiaomei Zhang³, Ning Xu³, Bin Deng¹, Huiwen Wang³, Lixian Xu¹, & Qiang Wang¹

¹Department of Anesthesiology, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an, PR China, ²Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, PR China, and ³Laboratory of Cell Biology & Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an, PR China

Abstract

Primary objective: Paired immunoglobulin-like receptor-B (PirB) is another receptor, except for the Nogo receptor, that is involved in inhibition of axons regeneration after central nervous system injury. However, the expression of PirB in focal cerebral ischaemic brain remains unclear. Herein, this study investigated spatial-temporal expression of PirB in the mouse brain following transient focal cerebral ischaemia.

Methods and procedure: Adult male C57BL/6 mice underwent a 60-minute transient occlusion of middle cerebral artery. Mice were killed and brain samples were harvested at 30 minutes, 2 hours, 24 hours, 3 days and 7 days after reperfusion. Expression of PirB in the brain was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), western blot analysis and immunohistochemical staining.

Main outcomes and results: The results showed that PirB was mainly expressed in ischaemic penumbra. PirB mRNA and protein expression began to increase at 2 hours, peaked at 24 hours and lasted for 7 days after reperfusion in the ischaemic penumbra. By using immunofluorescence, PirB signals were co-localized with NeuN-positive neurons.

Conclusion: PirB expression is up-regulated in ischaemic penumbra following transient focal cerebral ischaemia. PirB expression in neurons may play important pathological roles in the inhibition of axonal regeneration after stroke, suggesting that the inhibition of PirB expression may enhance axonal regeneration and functional recovery after stroke.

Keywords

Axonal regeneration, ischaemia, paired immunoglobulin-like receptor-B, stroke

History

Received 13 August 2012
Revised 1 May 2013
Accepted 3 June 2013
Published online 8 August 2013

Introduction

Stroke is one of the most common causes of death and the leading cause of adult serious disability in the world [1]. Approximately half of the survivors are likely to sustain lifelong losses in sensory, motor, cognitive, behavioural, communicative and/or emotional functioning, depending on the size and localization of injury [2]. It is difficult for central nervous system (CNS) injury to restore neurologic function by promoting the axon regeneration and restoration of neuronal contacts [3]. The myelin-associated protein in the microenvironment of injured neurons inhibits the axon regeneration, which is one of the important reasons that sensory and motor dysfunction is induced by stroke [4]. Myelin, an insulating layer surrounding axons, derived three axon regeneration inhibitors: myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte glycoprotein (OMgp) and Nogo, which bind the Nogo-66 receptor (NgR1) in the adult CNS to inhibit damaged axon regeneration [5, 6]. Although competitive antagonist peptide (NEP1-40) of NgR1 could block Nogo-66 or CNS

myelin inhibition of axonal outgrowth [7, 8], recent researches have shown that deletion of the NgR1 only has little effect on inhibition of neurite and axonal regeneration of the central neurons, indicating that another receptor may exist [9].

Paired immunoglobulin-like receptor-B (PirB), a type I transmembrane glycoprotein containing six extracellular immunoglobulin-like domains and an intracellular polypeptide, was identified as another receptor mediating axon regeneration inhibition by myelin-associated protein and its effect was probably more important than NgR1 [10, 11]. Moreover, genetic deletion of PirB protected brain injury after ischaemia [12]. It has been reported that PirB was widely expressed in the CNS of mice [13]. However, the location and expression of PirB in the brain after cerebral ischaemic injury are unknown. The expression of PirB in the normal and ischaemic brain tissue of mice was investigated in order to provide the evidence for further study on the roles of PirB in brain injury and repair.

Materials and methods

Animals and experimental groups

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation and was conducted

Correspondence: Dr Qiang Wang, Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, PR China. Tel: +86-29-84775337. Fax: +86-29-84771262. E-mail: wangqiang@fmmu.edu.cn

个人简历和研究成果

个人概况

邓斌，男，汉族，吉林长春人，1982年4月出生，未婚，E-mail: xajxdb@126.com

教育背景

2001年9月至2006年6月：

中国人民解放军第四军医大学，临床医学五年制，攻读医学学士学位。

2008年9月至2011年6月：

中国人民解放军第四军医大学，神经生物学专业，攻读理学硕士学位。导师：鞠躬院士；

2013年9月至今：

中国人民解放军第四军医大学，麻醉学专业，攻读麻醉学博士学位。导师：徐礼鲜教授；

工作简历

2006年6月至2012年9月：

南京军区厦门警备区海防第五十四团，医师

2012年9月至今：

南京军区厦门警备区医院，主治医师

博士期间已发表论文

(1) **Deng B**, Gou X, Chen H, Li L, Zhong H, Xu H, Jiang F, Zhao Z, Wang Q, **Xu L***. Targeted delivery of Neurogenin-2 protein in the treatment for cerebral ischemia-reperfusion injury. Biomaterials. 2013; 34(34):8786-97 (IF: 8.312)

(2) **Deng B**, Xu H, Zhang J, Wang Q, Sang HF, **Xu LX***. Neuroprotective effects of

sevoflurane against electromagnetic pulse-induced brain injury through inhibition of neuronal oxidative stress and apoptosis. PLoS ONE. 2014;9(3):e91019 (IF: 3.234)

(3) **Deng B**, Fei G, Liu FF, Zhao XH, Ju G, Wang J, **Xu LX***, Wang J. Two monoclonal antibodies recognising aa634-668 and aa1026-1055 of nogoA enhance axon extension and branching in cultured neurons. PLoS ONE. 2014;9(2):e88554 (IF: 3.234)

(4) Meiyan Sun, **Bin Deng (Co-first author)**, Xiaoyong Zhao, Lixian Xu, Lei Chen, Xude Sun. Isoflurane preconditioning providing neuroprotection by regulating the expression of TLR4 signaling pathway in alleviating microglial activation against stroke. Scientific Reports, 2015,5:11445. DOI: 10.1038/srep11445. (IF: 5.578)

(5) Liya Li, **Bin Deng (Co-first author)**, Qiang Wang. Asynchronous therapy targeting Nogo-A enhances neurobehavioral recovery by reducing neuronal loss and promoting neurite outgrowth after cerebral ischemia in mice. J Drug Target, 2015. DOI: 10.3109/1061186X.2015.1052070. (IF: 2.741)

(6) Yu Zhao, **Bin Deng (Co-first author)**, Lixian Xu. Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemic injury via Notch pathway mediated up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α in rats. CELL MOL NEUROBIOL, 2015. DOI: 10.1007/s10571-015-0203-9. (IF: 2.506)

(7) Zhao Y, Mi YJ, **Deng B**, Yang J, Gou XC. PriB is a novel potential therapeutic target for enhancing axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury in mammals. J Drug Target. 2014 6;22(5):365-71 (IF: 2.741)

(8) Gou X, Zhang Q, Xu N, **Deng B**, Wang H, Xu L, Wang Q. Spatio-temporal expression of paired immunoglobulin-like receptor-B in the adult mouse brain after focal cerebral ischaemia. Brain Inj. 2013;27(11):1311-5 (IF: 1.861)

(9) **邓斌**, 徐礼鲜. 轴突生长抑制因子 Nogo-A 及其抗体在脊髓损伤修复中的研究进展. 神经解剖学杂志. 2012; 28:531-534.

(10) **邓斌**, 鞠躬, 王键. 六种抗大鼠 Nogo-A 分子单克隆抗体的免疫荧光组织化学染色特性的比较. 细胞与分子免疫学杂志. 2011;27(04):425-427.

(11) 张进, **邓斌 (Co-first author)**, 徐浩, 李俊钢, 邓克强, 刘太阳生, 徐礼鲜. 电磁脉冲辐射致大鼠皮层神经元超微结构损伤效应及对空间学习记忆能力的影响. 神经解剖学杂志. 2013, 29(4):360-364

(12) **邓斌**, 邓克强, 吴水祥, 党杨杰, 徐礼鲜. 七氟醚的神经保护作用及其机制. 国

际麻醉学与复苏杂志. 2015; 36 (9):843-846.

(13) 邓克强, 吴水祥, 刘敏杰, **邓斌 (共同通讯作者)**, 徐礼鲜. 吸入麻醉药神经保护作用及其机制的研究进展. 神经解剖学杂志. 2015; 31(5):668-670.

待发表论文

(1) **Bin Deng**, Liya Li, Qiang Wang, Lixian Xu. Perturbing the Interactions between PirB and Myelin-Associated Inhibitors Provides Long-Term Neuroprotection after Stroke. *Biomaterials*. (under review)

(2) **Bin Deng**, Liya Li, Xingchun Gou, Fuhai Bai, Zhaohua Zhao, Xiangzhong Meng, Qiang Wang, Li xian Xu. Delivery of a novel antagonistic peptide that targets neuronal PirB enhances axonal. *Journal of neuroscience*. (under review)

(3) **Bin Deng**, Jinling Wang, Zhaohua Zhao, Qiang Wang, Li xian Xu. Electroacupuncture alleviated neuronal degeneration in the acute of focal or global cerebral ischemia assessed by Fluoro jade-C staining. *PLOS ONE*. (under review)

(4) Zhaohua Zhao, **Bin Deng (Co-first author)**, Li xian Xu. PirB Overexpression Deteriorates Neuron Survival through Increased Neuronal Apoptosis and Inhibited TrkB and mTOR Phosphorylation following OGD Injury. *CELL MOL NEUROBIOL*. (under review)

学术论文获奖

(1) **邓斌**, 徐礼鲜*, 七氟烷对电磁脉冲辐射性脑损伤的防护作用及机制研究, 全国第四次麻醉药理学学术会议, 2013.08, 大会报告, 优秀论文二等奖

(2) **邓斌**, 徐礼鲜*, TAT-LBD 靶向转导神经源素 Ngn2 治疗脑缺血再灌注损伤的研究. 全国第五次麻醉药理学学术会议, 2014.04, 中青年优秀论文及英语演讲一等奖

(3) **邓斌**, 徐礼鲜*, TAT-LBD 靶向转导神经源素 Ngn2 治疗脑缺血再灌注损伤的研究. 2014 年国际麻醉学基础与临床研究论坛, 2014.05, 优秀论文及英语演讲比赛三等奖

(4) **邓斌**, 徐礼鲜*, TAT-LBD 靶向转导神经源素 Ngn2 治疗脑缺血再灌注损伤的研究. 2014 年福建省麻醉学年会, 2014.04, 优秀论文及英语演讲三等奖

(5) **邓斌**, 孙绪德, 王强*, 徐礼鲜*, Perturbing the Interactions between PirB and

Myelin-Associated Inhibitors Provides Long-Term Neuroprotection after Stroke. 2015 年中华医学会麻醉学分会全国中青年麻醉学科医师学术论坛优秀论文二等奖。2015.06
(6) **邓斌**, 孙绪德, 王强*, 徐礼鲜*, Perturbing the Interactions between PirB and Myelin-Associated Inhibitors Provides Long-Term Neuroprotection after Stroke. 2015 年中华医学会麻醉学分会中青年优秀论文二等奖。2015.09

主持及参与课题

- (1) 项目名称: A β 诱导表观遗传修饰抑制 Ngn2 表达在 AD 认知障碍中的作用及机制研究, 负责人: **邓斌**, 编号: 81501207, 17.5 万+5.5 万, 经费来源: **国家自然科学基金青年项目**, 起止年月: 2016.01-2018.12。(主持)
- (2) 项目名称: TAT-LBD 靶向运载 PEP 对脑缺血再灌注损伤保护作用及相关机制的研究, (连续资助), 负责人: **邓斌**, 编号: 2013-D03, 2 万+2 万, 经费来源: 第四军医大学, 起止年月: 2014.01-2016.06。(主持, 已结题)
- (3) 项目名称: A β /TLR4/NF κ B 通路诱导表观遗传修饰抑制 BDNF 表达: 电磁脉冲认知障碍的机制及干预措施研究, 负责人: 孙绪德, 编号: 31570845, 60 万, 经费来源: **国家自然科学基金面上项目**, 起止年月: 2016.01-2019.12。(第一参与者)
- (4) 项目名称: 延迟远隔缺血后处理通过胆碱能抗炎通路减轻心肺复苏脑损伤的机制研究, 负责人: 高昌俊, 编号: 81571183, 57 万, 经费来源: **国家自然科学基金面上项目**, 起止年月: 2016.01-2019.12。(参与者)
- (5) 项目名称: TAT-LBD 靶向介导双靶点效应蛋白促进中枢神经功能修复及相关分子机制, 负责人: 徐礼鲜, 编号: 81471265, 经费来源: **国家自然科学基金面上项目**, 70 万, 起止年月: 2015.01-2018.12。(参与者)
- (6) 项目名称: 电针通过神经元 α 7nAChR 调控 Treg 减轻脑缺血后神经炎症的作用及机制研究, 负责人: 王强, 编号: 81473488, 经费来源: **国家自然科学基金面上项目**, 70 万, 起止年月: 2015.01-2018.12。(参与者)
- (7) 项目名称: 异氟烷对核电磁脉冲脑损伤的保护作用及其机制研究, 负责人: 孙绪德, 经费来源: 第四军医大学唐都医院科技创新基金 (**军事**), 15 万, 起止年月: 2015.01-2017.12。(第一参与者)

(8) 项目名称：电磁脉冲通过抑制海马神经元 Ngn2 表达损害认知功能的机制研究，负责人：陈国忠，编号：闽科计[2016]10 号，经费来源：福建省科技厅，10 万，起止年月：2016.01-2017.12。（第一参与者）

(9) 项目名称：PirBex 对脑缺血再灌注损伤保护作用及相关机制的研究，负责人：张进，编号：2013JM4040，经费来源：陕西省自然科学基金，4 万，起止年月：2013.01-2014.12（已结题）。（第一参与者）

获得专利

(1) 发明专利。一种 PirB 胞外多肽及应用，中国，2013100318857。王强，苟兴春，郭钊，邓斌，姜凤良，熊利泽。

(2) 发明专利。TAT-LBD-PEP 融合蛋白及其在治疗中枢神经系统损伤疾病中的应用，中国，2013100327517。王强，郭钊，苟兴春，邓斌，熊利泽。

其他获奖情况

(1) 2011 年 获第四军医大学基础部“建党 90 周年”演讲比赛一等奖，并获中国人民解放军总后勤部“当代革命军人核心价值观引领我成长”读书征文比赛百篇优秀征文。

(2) 2013 年 获第四军医大学三等奖学金。

(3) 2014 年 获口腔医院 SCI 论文发表先进个人。

(4) 2014 年 第四军医大学第十八场博士论坛优秀奖。

(5) 2015 年 第四军医大学首届优秀博士研究生。

(6) 2015 年 第四军医大学优秀学员。

(7) 2016 年 厦门警备区优秀基层干部。

(8) 2016 年 获第四军医大学一等奖学金。

致 谢

古都的夏日，阳光明媚，微风扶柳，万物争艳。在这个美好的季节里，徜徉在满怀收获喜悦的校园中，映入眼帘的是与时间赛跑的匆匆脚步，听到的是各种实验仪器奏出的美妙音符，感受到的是“至精至爱，效果效民”的崇高追求。在这个属于毕业季的日子里，我们心中有太多的不舍与怀念，有太多话语想倾诉。

还记得在去年的毕业答辩会上，几位即将毕业的同学在最后致谢时，都眼含热泪，他们说，舍不得离开这座教育、培养他们的神圣的医学殿堂，舍不得离开朝夕相处，互助友爱的口腔医院麻醉科的各位老师同事，更舍不得离开几年来给予大家悉心指导，无私关怀的各位导师。

是啊，师者如父母。导师的爱护是无私的，更是宽广博大的，那甜美的微笑和厚实的手掌始终呵护着我们；导师的教诲是严厉的，更是受益终身的，好似光和热，指引我们在正确的人生航道上茁壮成长。还记得您为我们修改论文而伏案忙碌的身影；还记得深夜时，您与我们一同讨论课题进展，在授业解惑中迸发科学智慧的情景；还记得在我们有困难时，您总是毫不犹豫，竭尽全力为我们提供帮助的往事。

我的导师，口腔医学院麻醉科徐礼鲜主任最常说的一句话是：“大家相聚在一起很难得，凡事要相互体谅和帮助，计较的少一点，付出的多一点”。这些话语至今影响着科里每一个人，形成了互助友爱，和谐奋进的科室文化。记得前年，科里一位博士研究生的母亲得了重病，急需救治，在无助之下，他打电话给徐主任请求帮助。当时徐主任正在外地参加学术会议，听到他焦急的话语，便顾不得手头的工作，立刻为他联系当地较好的部队医院，找好救护车，将他的母亲接送到医院，并请相关专家为其母亲详细诊疗；科室的张惠副主任还多次安慰这名学生，并尽己所能提供帮助。由于治疗及时，老人家的身体逐步的康复了。这位师兄将这份拳拳的师生情谊化为无穷的学习动力，在毕业时发表了多篇较高水平的 SCI 论文。

虽然平日里临床工作任务繁重，但导师们对科学研究的追求可以用孜孜不倦来形容。他们秉承“厚德精业，止于至善”的优良传统，爱岗敬业，勇于创新，不断超越，在口腔医学界树立了一座又一座丰碑。记得今年春节假期刚过，一大早上班，

就看到徐主任在办公室里，右肩敷着热毛巾，左手还在敲着键盘，同事们询问主任怎么了，徐主任只是笑笑说：“没什么，你们去忙吧”。后来，我们才知道，由于今年科里报的基金项目比较多，徐主任为了让学生和科里年轻医生的基金更具竞争力，从春节放假就开始忙着修改，右手累了，就换左手，左手累了，再换右手，基金里面的技术路线图都是他亲自绘制的，里面表述不正确的地方，哪怕是标点符号，他都一个一个的修改好，春节假期没有休息一天，结果连续一周下来，右肩酸痛得抬不起来了。听到这里，我们都再次被徐主任严谨认真的工作态度和精益求精的执着精神所深深感染，这种潜移默化的榜样力量，是对我们研究生最好的教育。春风化雨，杏林犹昌，在这种环境和氛围的带动下，科室人员与事业为伴，忠诚奉献，追求卓越，去年一年就发表十余篇 SCI 论文，历经十几年研制的，荣获国家科技进步二等奖且具有自主知识产权的“高氧静脉输注液及高氧口服液”也成功面世。当面对这些成绩时，徐主任总是对大家说：“这些得益于学校近些年来不断发展壮大，得益于口腔医学院各级组织的英明领导和科室人员的团结协作；荣誉已经属于过去，明朝更当奋勇拼搏”。

“不畏浮云遮望眼，不辞细土垒高山”。几年的研究生学习生活虽然只是我们人生长路中的一点，但我们庆幸能够成为一名四医大的学子，我们感谢各位导师的教诲和关爱，感谢您用渊博的学识和无私的心血为我们点燃航行的灯塔，为我们插上展翅高飞的双翼。

在这个即将离别的日子里，请让我们再向敬爱的导师说声：“衷心的的感谢您，我的老师！”