

高压氧对实验性大鼠脑卒中后 RhoA 表达及神经功能的影响

陈胜利 李长清 陈康宁 黄河清 段炜

【摘要】目的 探讨高压氧(HBO)治疗对 MCAO 大鼠脑组织 RhoA 蛋白的表达强度变化和神经功能评分的影响。**方法** 将 126 只健康的雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、缺血 2 h 再灌注 HBO 治疗组(治疗组)和缺血再灌注未作处理组(对照组),每组大鼠 42 只。用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,缺血 2 h 后再灌注。评定各组脑组织造模后不同时间点 RhoA 蛋白的表达变化、不同的时间点神经功能评分改变。**结果** 假手术组双侧大脑皮质和基底节区可见 RhoA 蛋白弱阳性表达,术后各时间点表达强度无明显差异。与假手术组比较,治疗组和对照组缺血侧皮质神经元细胞和神经胶质细胞 RhoA 蛋白表达在缺血再灌注后 6 h 开始增加,随着时间的延长,RhoA 蛋白的表达进行性增加,至 48 h 达到高峰之后逐渐下降,到第 14 天仍明显增高。治疗组和对照组两组各时点 RhoA 蛋白阳性细胞平均光密度(AOD)比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。治疗组和对照组两组间比较,治疗组各时间点神经功能缺损评分均低于对照组,到术后第 14 天时,2 组神经功能缺损评分有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** (1)脑缺血后急性期和恢复期存在 RhoA 活动的增强,提示缺血性脑损伤启动了内源性抑制损伤后神经功能康复的机制。(2)HBO 治疗可降低 RhoA 蛋白在脑缺血后各时间点的阳性表达,和神经功能评分改变相一致,提示 HBO 治疗有调节 RhoA 信号传导通路活动的作用,这可能是其促进脑损伤后神经功能康复的机制之一。

【关键词】 脑卒中; 高压氧; 大鼠; 神经功能缺损评分

The effect of HBO on RhoA expression and nerve function in rat focal cerebral ischemic model CHEN Sheng-li*, LI Chang-qing, CHEN Kang-ning, HUANG He-qing, DUAN Wei. * Department of Neurology, Sanxia Central Hospital, Chongqing 404000, China

Corresponding author: LI Chang-qing, Email: licq9217@163.com

【Abstract】Objective To evaluate the effect of hyperbaric oxygenation therapy (HBO) on the RhoA expression and nerve function after transient focal cerebral ischemia in a rat model of middle cerebral artery occlusion. **Methods** One hundred and twenty-six healthy Sprague-Dawley rats were used and randomly divided into a sham operation group (shame group, $n=42$), a treatment group ($n=42$), and a control group ($n=42$). The animal model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by using the Zea-Longa method with the animals in the treatment and the control groups, and sham operation was performed with those in the sham group. HBO was applied to the animals in the treatment group. The RhoA protein expression was observed by using immunohistochemistry technique, and the neurological function was evaluated by Bederson's scale at different time points after MCAO. **Results** (1) Weakly positive expression of RhoA could be located in bilateral cortex and the basal ganglia in the sham group. The expression of RhoA in the treatment group and control group was increased as early as 6 hours after MCAO when compared with that of the sham group, and peaked at 48 h after MCAO and decreased after then, but was still higher than that of the shame group at 7th day to 14th day after MCAO. It was also found that the expression of RhoA of the treatment group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). (2) Evaluation with Bederson's scale showed that the neurological function of treatment group was significantly better than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** (1) The expression of RhoA was enhanced in the acute and recovery stages of cerebral infarction, which suggested that the endogenic mechanism activated by cerebral ischemic injury had inhibited neurological function rehabilitation. (2) HBO could reduce the expression of RhoA protein after cerebral ischemia, which was parallel to the change of neurological function, suggesting that the rehabilitation effect of HBO treatment might, to some extent, be due to regulating the RhoA signal pathway.

【Key words】 Stroke; Hyperbaric oxygenation; Rat; Neurological function scale

作者单位:404000 重庆,重庆三峡中心医院神经内科(陈胜利);重庆医科大学附属第二医院神经内科(李长清);第三军医大学西南医院神经内科(陈康宁、黄河清、段炜)

通讯作者:李长清,Email:licq9217@163.com

中枢神经系统损伤后其功能康复依赖于受损神经结构的再生和功能重建,寻求神经损伤后的功能康复及其机制研究是现今探讨的热点。目前发现轴突生长抑制因子 Nogo-A、髓鞘相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(oligodendrocyte-myelin glycoprotein, OMGP)通过相同的受体 NgR 介导,并且与 p75 结合形成复合体,实现抑制信号的跨膜转运,影响细胞内 RhoA 信号传导通路^[1,2]。RhoA 信号传导通路的激活引起轴突生长锥的崩解是限制轴突再生、影响中枢神经系统损伤后功能重建的主要机制^[3,4]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗可促进脑梗死后神经功能康复,已在临床上广泛应用^[5,6]。本实验拟以大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)为模型,研究 HBO 治疗对脑梗死大鼠 RhoA 蛋白表达的影响,结合神经功能评分,探讨 RhoA 对大鼠脑梗死后神经功能康复的影响。为临床脑梗死后神经功能康复探索新途径。

材料与方法

一、实验动物分组

选用清洁级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 126 只,体重 250 ~ 300 g(由第三军医大学野战外科研究所动物中心提供)。将大鼠随机分为假手术组、缺血 2 h 后再灌注 HBO 治疗组(治疗组)和缺血 2 h 后再灌注未作特殊处理组(对照组),每组 42 只。3 组大鼠分别在缺血再灌注后 6 h、12 h、24 h、48 h、96 h、7 d、14 d 共 7 个时间点再分成 7 个亚组,每个亚组 6 只大鼠。

二、动物模型制备

治疗组和对照组 84 只大鼠均按相同方法制备 MCAO 再灌注模型。MCAO 模型的制备参照 Longa 法用线栓法进行^[7],大鼠用 10% 的水合氯醛腹腔内注射(1 g/kg 体重)麻醉后,将其仰卧固定。分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA),在 ECA 远心端结扎,用动脉夹夹闭 ICA 远心端及 CCA 后凝断 ECA,于 ECA 结扎部位下端距 ICA 分叉处约 3 mm 剪一切口插入线栓,线栓沿 ICA 插入,感稍有阻力,深度为 18 ~ 22 mm,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。结扎线栓的入口处,线栓外留约 2 cm,缝合皮肤。于 2 h 后轻轻提拉所留线头至有阻力,实现大脑中动脉再灌注。治疗组造模成功 2 h 后开始 HBO 治疗,对照组造模成功 2 h 后除不给予 HBO 治疗外,其他处理与治疗组相同。假手术组只游离 CCA、ECA 与 ICA,不结扎,不阻断血流,缝合皮肤,各时间点的确认从缝合皮肤完成开始计算,不给予 HBO 治疗。

三、试剂

兔抗 RhoA 多克隆抗体由美国 Santa Cruz 公司提供,SABC-AP 免疫组化染色试剂盒由武汉博士德生物有限公司提供。

四、治疗方法

治疗组大鼠 MCAO 再灌注造模成功后 2 h 开始 HBO 治疗。采用烟台高压氧总厂生产的专用实验动物氧舱(由第三军医大学西南医院高压氧舱室提供),纯氧舱洗舱 10 min 后匀速加压 10 min,使舱内压力达到治疗压力 2.0 ATA,吸氧时间为 120 min,最后 20 min 匀速减压至常压。HBO 治疗每日 1 次,直至整个实验结束。

五、RhoA 蛋白表达水平的免疫组化检测

假手术组、治疗组和对照组大鼠均在相应预设时间点断头处死取脑组织,分离额叶中央前回皮质进行 RhoA 免疫组化分析,普通光学显微镜观察到的胞浆染成棕黄色为阳性细胞。利用图像分析软件进行图像分析测出阳性反应细胞的总面积(Area)和积分光密度(OD),算出平均光密度(AOD)。采用美国 Media Cybernetics 公司的 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件进行图像分析。

六、评定方法

于缺血再灌注后 6 h、48 h、7 d、14 d 各组动物在处死前进行神经功能缺损评分。神经功能缺损评分按照 Bederson 的方法^[8],0 分为无神经功能缺损症状;1 分为梗死半球对侧前肢屈曲;2 分为梗死半球对侧肩部抵抗力减低(梗死半球对侧前肢屈曲),爬行时不划圈;3 分为在 2 分的基础上,自由活动时刻圈;4 分为不能行走,意识丧失。

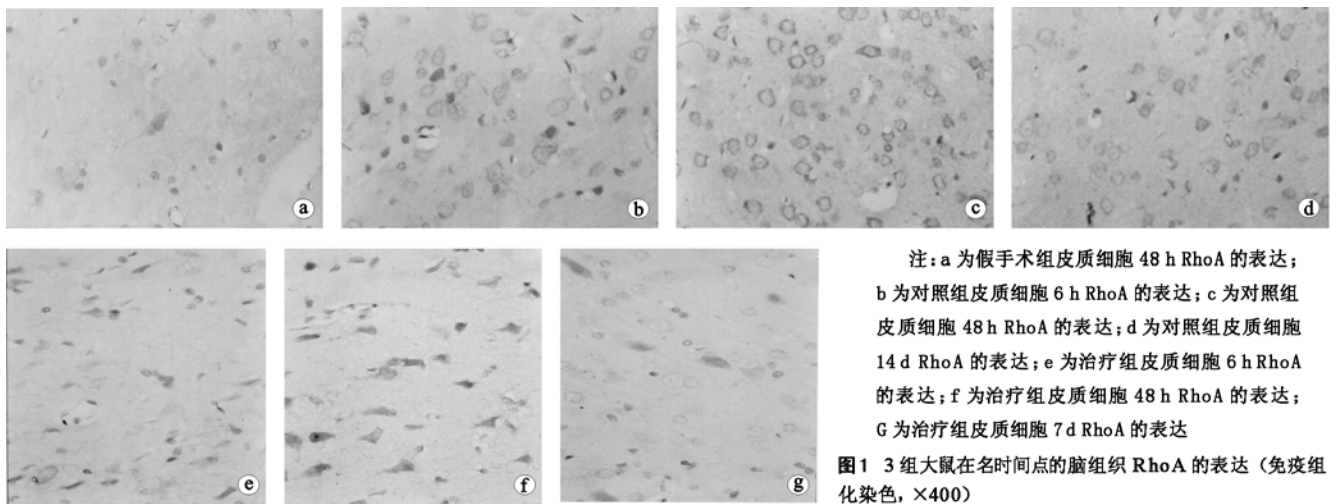
七、统计学分析

所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 10.0 版统计软件包进行统计学分析。采用 *t* 检验或非参检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、RhoA 蛋白表达水平

假手术组双侧大脑皮质可见 RhoA 蛋白弱阳性表达,术后各时间点表达强度无明显差异(图 1a)。与假手术组比较,治疗组、对照组缺血侧皮质神经元细胞和神经胶质细胞 RhoA 蛋白表达在缺血再灌注后 6 h 开始增加(图 1b、图 1e),位于胞浆中,呈棕黄色,随着时间的延长,RhoA 蛋白的表达进行性增加,至 48 h 达到高峰(图 1c、图 1f),之后逐渐下降,到第 14 天仍明显(图 1d、图 1g)。治疗组和对照组各时点 RhoA 蛋白阳性细胞平均光密度(AOD)比较差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 1)。



注: a 为假手术组皮质细胞 48 h RhoA 的表达; b 为对照组皮质细胞 6 h RhoA 的表达; c 为对照组皮质细胞 48 h RhoA 的表达; d 为对照组皮质细胞 14 d RhoA 的表达; e 为治疗组皮质细胞 6 h RhoA 的表达; f 为治疗组皮质细胞 48 h RhoA 的表达; G 为治疗组皮质细胞 7 d RhoA 的表达
图 1 3 组大鼠在名时间点的脑组织 RhoA 的表达 (免疫组化染色, ×400)

表 1 3 组各时间点脑组织 RhoA 阳性细胞 AOD 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	12 h	24 h	48 h	96 h	7 d	14 d
假手术组	6	20.84 ± 1.84	20.28 ± 1.48	20.08 ± 2.52	21.68 ± 3.27	20.92 ± 1.72	20.13 ± 3.64	21.55 ± 2.44
对照组	6	89.70 ± 2.59 ^a	109.37 ± 2.29 ^b	126.35 ± 3.62 ^b	157.01 ± 1.91 ^b	146.36 ± 3.10 ^b	140.92 ± 1.88 ^b	134.06 ± 3.19 ^b
治疗组	6	57.40 ± 3.44 ^{bc}	58.43 ± 3.43 ^{bc}	65.78 ± 1.66 ^{bc}	72.43 ± 2.57 ^{bc}	67.79 ± 1.55 ^{bc}	63.64 ± 2.64 ^{bc}	55.43 ± 2.76 ^{bc}

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与对照组比较, ^c $P < 0.01$

二、各时间点神经功能缺损评分比较

3 组大鼠术前神经功能缺损评分均为 0 分, 造模后各时间点神经功能缺损评分情况见表 2。

表 2 各时间点大鼠神经功能评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	48 h	7 d	14 d
对照组	42	2.83 ± 0.41	2.17 ± 0.41	1.67 ± 0.52	0.83 ± 0.75
治疗组	42	2.67 ± 0.52	2.33 ± 0.52	1.33 ± 0.52	0.50 ± 0.54 ^a

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$

讨 论

RhoA 是一种重要的调节肌动蛋白细胞骨架和细胞形态异质性的细胞内因子, RhoA 本质上是一种三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 酶, 与其它 G 蛋白一样, 其作用是水解鸟氨酸, 暴露结构上的靶点, 这些部位介导 GTP 酶和靶蛋白或效应物的相互作用, 体内这种 GTP 的循环过程起着多条信号通路的分子开关作用^[9]。近年来研究发现, RhoA 是一类主要的细胞信号转导的中介分子, 激活后的 RhoA 能影响许多生物学行为, 包括细胞骨架的组装、转录因子的激活及细胞周期的调节^[10]。由 RhoA 导致的下游因子的激活 [如 RhoA 相关激酶 (RhoA-associated kinase, ROCK)], 影响了肌动-球蛋白系统而导致轴突生长锥塌陷。影响肌动-球蛋白系统可能是 RhoA 激活导致轴突生长锥崩解的主要机制^[11]。

Brabeck 等^[12] 观察死于局灶脑梗死患者的脑组织 RhoA 和 RhoB 蛋白表达情况, 发现 RhoA 和 RhoB

蛋白表达在脑缺血后明显上调, 并持续到数月。我们的观察发现, 假手术组脑组织仅有弱的 RhoA 蛋白表达, 大鼠脑缺血后 6 h 在大脑皮质和基底节细胞的胞浆中可见 RhoA 蛋白的表达增加, 在 48 h 到达高峰, 随后开始下降, 但到 14 d 仍有较高表达, 提示大鼠脑缺血可激活 RhoA 蛋白在大鼠大脑皮质的神经元细胞和胶质细胞内的表达, 缺血性脑损伤启动了内源性抑制损伤后神经功能康复的机制。Dergham 等^[13] 研究发现, 用 RhoA 特异性的 C3 转化酶灭活 RhoA 或用 Y27632 阻断 RhoA 下游的 ROCK 的作用, 可以促进含髓鞘来源的抑制性底物中原代培养的皮质神经元突起的生长。Fournier 等^[14] 的研究发现, 用特异性的 C3 转化酶或 Y27632 阻断 RhoA 或 ROCK 可以促进损伤的 CNS 轴突再生及动物四肢的功能康复。该实验和我们的观察结果一致, HBO 治疗能降低 RhoA 蛋白在脑缺血后的各时间点的阳性表达, HBO 治疗组大鼠的神经功能明显改善明显优于对照组。提示 HBO 可以抑制 RhoA 的表达和改善 MCAO 大鼠瘫痪侧的神经功能。

HBO 治疗的急性期脑保护机制可促进脑缺血后的自然恢复过程^[5], 可能为急性期神经功能评分改善的主要原因。观察中发现急性期后继续使用 HBO 治疗对神经功能评分有持续改善作用, 并与对应的 RhoA 蛋白表达水平降低相一致, 提示 HBO 治疗对损害后神经症状的康复有促进作用, 其机制可能是通过调节 RhoA 信号通路活动, 进而改善皮质脊髓束可塑性而起作用的。

参 考 文 献

- [1] Asegawa Y, Fujitani M, Hata K, et al. Promotion of axon regeneration by myelin-associated glycoprotein and Nogo through divergent signals downstream of Gi/G. *J Neurosci*, 2004, 24:6826-6832.
- [2] Hata K, Kubo T, Yamaguchi A, et al. Signaling mechanisms of axon growth inhibition. *Drug News Perspect*, 2006, 19:541-547.
- [3] Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, et al. Multiple signals regulate axon regeneration through the nogo receptor complex. *Mol Neurobiol*, 2005, 32:105-111.
- [4] Wu KY, Hengst U, Cox LJ, et al. Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature*, 2005, 436:1020-1024.
- [5] 彭慧平, 卢晓欣, 汤永建, 等. 高压氧对脑缺血再灌注小鼠脑源性神经营养因子及神经细胞结构的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:263-265.
- [6] 徐江, 黄晓琳. 高压氧对脑缺血再灌注大鼠核因子- κ B 及细胞粘附分子-1 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:259-262.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [8] Bederson JB, Pitts LH, Tsujim M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of rat model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- [9] Arevalo MA, Rodriguez-Tebar A. Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3 β and stimulate axonal growth. *Mol Biol Cell*, 2006, 17:3369-3377.
- [10] Bryan B, Kumar V, Stafford LJ, et al. GEFT, a Rho family guanine nucleotide exchange factor, regulates neurite outgrowth and dendritic spine formation. *J Biol Chem*, 2004, 29:45824-45832.
- [11] Hiraga A, Kuwabara S, Doya H, et al. Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Peripher Nerv Syst*, 2006, 1:217-224.
- [12] Brabeck C, Mittelbronn M, Bekure K, et al. Effect of focal cerebral infarctions on lesional RhoA and RhoB expression. *Arch Neurol*, 2003, 60:1245-1249.
- [13] Dergham P, Ellezam B, Essagian C, et al. Rho signaling way targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci*, 2002, 22:6570-6577.
- [14] Fournier A E, Takizawa B T, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci*, 2003, 23:11416-1423.

(修回日期:2007-07-11)

(本文编辑:阮仕衡)

热休克预处理对过氧化氢诱导细胞次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因突变的保护效应

陆明康 洪承皎 李明 张保国

【摘要】 目的 研究热休克预处理对过氧化氢诱导的细胞基因突变损伤是否具有保护效应。方法 将 V79 细胞分为热休克处理组(热处理组)、过氧化氢损伤组(损伤组)和热休克预处理后过氧化氢损伤组(保护组)。采用 6-巯基鸟嘌呤(6-TG)筛选次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因突变细胞并形成细胞克隆,应用 Giemsa 染色法计数突变细胞克隆数,计算各组细胞的相对克隆形成率及基因突变率。结果 (1)温度 $>42^{\circ}\text{C}$, 1 h 的热休克处理会诱导明显的 HPRT 基因突变,细胞相对克隆形成率降低,基因突变率与 37°C 处理 1 h 组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$);温度 $\leq 42^{\circ}\text{C}$ 热休克处理 1 h,不会诱导明显的 HPRT 基因突变,细胞相对克隆形成率高,基因突变率与 37°C 处理 1 h 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)过氧化氢浓度 ≥ 0.5 mmol/L 时,各亚组 HPRT 基因突变率与 0 mmol/L 亚组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。(3)细胞在接受热休克预处理后再行过氧化氢处理,过氧化氢浓度 ≤ 1 mmol/L 的细胞没有发生明显的 HPRT 基因突变,与 0 mmol/L 亚组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而过氧化氢浓度超过 1 mmol/L 时,细胞发生明显的 HPRT 基因突变,与 0 mmol/L 亚组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。(4)损伤组与保护组相应浓度的亚组(除 0, 4 mmol/L 组)比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 热休克预处理对过氧化氢诱导的 HPRT 基因突变损伤细胞具有明显的保护作用。

【关键词】 热休克预处理; 过氧化氢; 基因突变

近年来,国内外针对热休克预处理对过氧化氢氧化损伤细胞的保护效应进行了大量的研究,发现其对过氧化氢氧化损伤

的心肌细胞^[1]、晶状体上皮细胞^[2]、肺内皮细胞^[3]、肺泡巨噬细胞^[4]等具有显著的保护效应,可以提高细胞的存活率。Spitz 等^[5]报道,经热休克预处理的中国仓鼠卵巢成纤维细胞,随后的过氧化氢损伤可减轻,细胞存活率提高。因此推测热休克预处理对过氧化氢氧化损伤的哺乳动物细胞具有保护效应。然而众所周知,过氧化氢不但能诱导细胞凋亡^[6],而且具有致突变效应^[7],而基因突变则可诱发机体细胞发生癌变。那么,热

基金项目:国家自然科学基金(10275083)

作者单位:215123 苏州,苏州大学放射医学与公共卫生学院,江苏省放射医学与防护重点实验室

通讯作者:张保国, Email: bgzhang@suda.edu.cn