文章编号:1000-5404(2007)05-0413-03

论著

视神经损伤后 RhoA 在大鼠视网膜中的分布及表达研究

王艳华,王 一,陈丽峰,曾玉晓,吴 楠 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察视神经损伤后 RhoA 在大鼠视网膜中的分布及表达变化。**方法** 将 36 只成年 Long Evans 大鼠随机分为正常组,视神经损伤 1、3、7 d 组,共 4 组,每组 9 只,通过免疫组化染色,观察 RhoA 在视网膜中的分布变化;用 Western blot 分析统计 RhoA 表达变化。**结果** 正常及视神经损伤后 1 d,RhoA 主要分布于视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)层;3 d 分布于 RGCs 及内丛状层;7 d 分布于 RGCs、内丛状层、内核层及外丛状层。Western blot 示:视神经损伤后 1、3、7 d,RhoA 表达均高于正常组($P<0.01$,$P<0.05$),但 7 d 表达量最高。**结论** 视神经损伤可显著增加 RhoA 在视网膜中的表达量及分布范围,它在视神经损伤后再生过程中发挥重要的作用。

关键词: 视神经损伤;RhoA

中图法分类号: R322.91;R345;R774.602 **文献标识码:** A

Distribution and expression of RhoA in rat retina after optic nerve crush

WANG Yan-hua, WANG Yi, CHEN Li-feng, ZENG Yu-xiao, WU Nan (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the distribution and expression of RhoA in the rat retina after optic nerve crush. Methods Totally 36 adult Long Evans rats were equally divided into 4 groups, normal group, 1, 3 and 7 d after optic nerve crushing groups. The expression of RhoA was analyzed by Western blotting analysis, and the distribution was assayed by immunohistochemistry. Results In normal retina and the retina 1 d after optic nerve crush, RhoA was mainly distributed in the layer of retinal ganglion cells (RGCs). In the group of 3 d after optic nerve crush, it existed in the RGCs and inner plexiform layer. However, its immunoreactivity was abundant not only in the RGCs and inner plexiform layers but also in the inner nuclear and outer plexiform layers 7 d after optic nerve crush. Western blot analysis showed the expression of RhoA in 3 optic nerve crushing groups was increased significantly than normal group($P<0.01$, $P<0.05$). Conclusion The distribution and expression of RhoA are extended and enhanced after optic nerve crush.

Key words: optic nerve crush; RhoA

RhoA 是一种小分子 GTPase,它在神经元迁移,突起的生长中发挥重要作用[1],同时也是抑制中枢神经再生的重要信号传导物质[2],但视神经损伤后 RhoA 的分布及表达变化尚少见报道。本实验通过视神经不全损伤模型,用免疫组化及 Western blot 方法研究视神经损伤后 RhoA 在大鼠视网膜中表达与分布变化,为进一步研究视神经再生机制奠定基础。

基金项目: 全军医药卫生科研基金(01Z039)
Supported by the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA(01Z039)

作者简介: 王艳华(1975-),女,山西省文水县人,博士研究生,医师,主要从事视神经损伤和再生方面的研究,原在武警 8650 部队医院工作。电话:(023)68754401,E-mail: wangyh@mail.tmmu.com.cn

通讯作者: 王 一,电话:(023)68754401, E-mail: wangyieye@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-06-27;**修回日期:** 2006-09-24

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

约 3 月龄的成年 Long Evans 大鼠 36 只,体质量 250~300 g,雌雄不限,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,符合国家医用动物使用标准,清洁级,检证字 SCXK(渝)20020003。采用随机数字表法分为正常组,双眼视神经中度钳夹伤后 1、3、7 d 组,每组 9 只。

1.2 大鼠视神经钳夹伤模型制作

参照文献[3]制作大鼠视神经双眼钳夹伤模型。实验大鼠用速眠新(1.0 ml/kg)肌肉注射麻醉,固定于手术台,手术显微镜下剪开大鼠手术眼上穹隆结膜约 120°,避开涡静脉,钝性分离暴露视神经长 3~4 mm,用中号无创血管夹在球后 2 mm 处钳夹视神经 10 s。术后载玻片轻压角膜,镜下观察眼底,无缺血者纳入实验。术毕分层缝合,双眼涂金霉素眼膏,并送动物

所饲养，各组饲养条件相同。

1.3 RhoA 免疫组织化学染色

每组2只大鼠，共8只大鼠，16个眼球。眼球去前节，置10%中性甲醛固定72 h后，行冰冻切片。参照蔡文琴[4]的方法行免疫组织化学染色。第一抗体为抗大鼠RhoA单克隆抗体(1:200，PBS稀释，Upstate公司)，采用博士德公司ABC法免疫组化试剂盒进行后续染色，二抗为生物素标记的羊抗小鼠IgG，DAB显色，阴性对照组以PBS代替第一抗体。

1.4 Western blot 分析

每组7只大鼠，共28只大鼠，56个视网膜神经上皮层。RIPA裂解液裂解视网膜神经上皮层组织，BCA法蛋白定量，12%分离胶行蛋白SDS-PAGE变性电泳，电转印于PVDF膜，丽春红染色，剪下相应蛋白电泳条带，含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液室温封闭2 h，加入抗大鼠RhoA单克隆抗体(4 μg/ml，封闭液稀释)，4 ℃过夜，TBST缓冲液洗膜3次，加入HRP标记的抗小鼠二抗，室温孵育1 h 30 min，洗膜4次，增强型化学发光法显影、拍照。以GAPDH为内参照，一抗为抗大鼠GAPDH多克隆抗体(1:200，封闭液稀释，Santa公司)。

用Image-Pro Plus 5.0软件对Western blot蛋白条带进行灰度值分析，以目的条带与内参照条带的比值代表目的蛋白的表达水平。

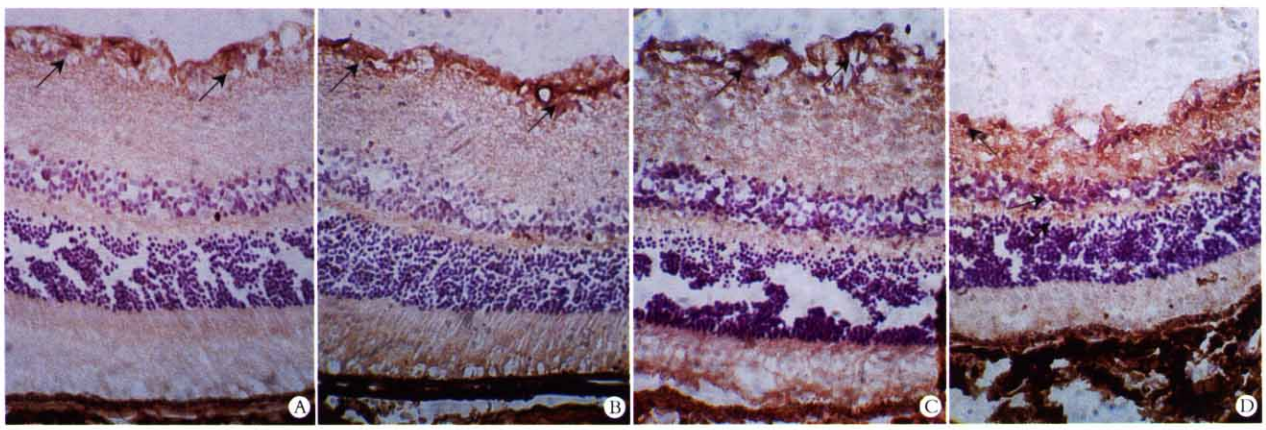
1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用SPSS 10.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 视神经钳夹伤后RhoA在视网膜中的分布变化

正常大鼠视网膜中，视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells，RGCs)层可见少量RhoA表达，其余各层均未见RhoA阳性染色(图1A)；视神经损伤后RhoA表达增高，分布随视神经损伤时间延长而扩大。损伤后1 d，RhoA主要分布于RGCs层(图1B)；损伤后3 d，RhoA不仅分布于RGCs层，内丛状层及少数内核层细胞也可见RhoA阳性着色(图1C)；损伤后7 d，RhoA分布于RGCs、内丛状层、内核层及外丛状层(图1D)。



↑：阳性表达部位 A：正常对照组；B：损伤后1 d；C：损伤后3 d；D：损伤后7 d

图1 视神经损伤后RhoA在视网膜中的分布情况 (ABC×400)

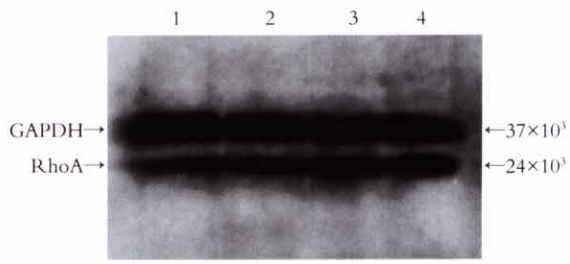
2.2 视神经钳夹伤后RhoA在视网膜中的表达变化

表1及图2显示了RhoA在视神经损伤后1、3、7 d及正常大鼠视网膜中的表达。在总蛋白上样量基本一致、内参照GAPDH条带亮度基本相同的前提下，视神经损伤后1、3、7 d，RhoA表达均高于正常组($P<0.01$，$P<0.05$)；RhoA表达于视神经损伤后7 d高于1 d($P<0.05$)，但1 d与3 d，3 d与7 d相比无显著性差异($P>0.05$)。

表1 视神经钳夹伤后RhoA在视网膜中的表达变化($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	RhoA/GAPDH
正常组	7	0.576 8 ±0.118 2
视神经损伤后1 d	7	0.727 0 ±0.131 2[a]
视神经损伤后3 d	7	0.827 5 ±0.076 1[b]
视神经损伤后7 d	7	0.863 7 ±0.097 9[bc]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，与视神经损伤后1 d组比较



1：正常组；2：损伤后1 d；3：损伤后3 d；4：损伤后7 d

图2 Western blot示RhoA在视网膜中的表达

3 讨论

在成年哺乳动物中，视神经损伤后难以再生的重要机制之一是抑制性周围环境的阻碍作用。这些抑制

物主要有髓鞘源性抑制物,如Nogo、髓磷脂相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)、少突细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp)以及硫酸软骨素糖蛋白(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)等胶质瘢痕抑制物[5]。目前已证实RhoA在这些抑制物质引起的抑制性信号传导中发挥了重要作用[5,6],并且应用C3转移酶抑制RhoA的激活后,能拮抗CSPG的抑制作用,成功促进RGCs轴突在胶质瘢痕上生长[7];此外,许多细胞外基质如Ephexin、Semaphorin/Plexin以及Slit/Robc均通过激活RhoA而抑制轴突再生[5,6];说明RhoA在抑制视神经再生中具有重要作用。

我们通过Western blot分析大鼠视神经损伤后视网膜中RhoA的表达,发现损伤后1 d RhoA的表达已明显高于正常大鼠视网膜,损伤后7 d更为显著。说明损伤视神经显著增强视网膜RhoA蛋白的表达。与本实验结果相似,玻璃体腔注射N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)引起视网膜损伤后1 d,RhoA蛋白表达明显高于正常视网膜,5 d后下降到正常水平[8]。而脊髓挫伤后1 d,RhoA蛋白表达无明显增加,1 d后表达显著增高[9]。

出生后1 d的鸡视网膜中,RhoA主要在RGCs与无长突细胞中表达,少数双极细胞及感光细胞内节也可表达[10];正常成年Wistar大鼠RhoA主要在内层视网膜表达,NMDA引起视网膜损伤可扩大其分布范围[8]。本实验免疫组化染色显示:正常成年Long Evans大鼠视网膜RhoA主要分布于RGCs层;视神经损伤明显扩大RhoA在视网膜中的分布范围,且随损伤时间延长而进一步扩大,损伤后3 d达内丛状层,7 d后从RGCs层到外丛状层均可见RhoA分布。

总之,本实验通过Long Evans大鼠视神经中度钳夹伤模型,观察到损伤视神经可显著增加RhoA在视网膜中的表达量及分布范围,为进一步研究视神经损伤及再生机制奠定了基础,也为视神经保护因子的作用机制研究提供新的切入点。

参考文献:

[1] Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way [J]. Dev Biol, 2004, 265(1): 23-32.

[2] Yiu G, He Z G. Signaling mechanisms of the myelin inhibitors of axon regeneration[J]. Curr Opin Neurobiol, 2003, 13(5): 545-551.

[3] 李　灿,王　一.睫状神经营养因子对大鼠视神经不全损伤后轴浆运输的影响[J].第三军医大学学报, 2004, 26(5): 408-411.

[4] 蔡文琴.现代实用细胞与分子生物学实验技术[M].北京:人民军医出版社, 2003: 104-109.

[5] Tang B L. Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms[J]. Neurochem Int, 2003, 42(3): 189-203.

[6] Schwab M E. Nogo and axon regeneration[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14(1): 118-124.

[7] Monnier P P, Sierra A, Schwab J M, *et al*. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar[J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 22(3): 319-330.

[8] Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kumai T, *et al*. Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina[J]. Brain Res, 2004, 1018(1): 111-118.

[9] Sung J K, Miao L, Calvert J W, *et al*. A possible role of RhoA/Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat[J]. Brain Res, 2003, 959(1): 29-38.

[10] Santos-Bredariol A S, Santos M F, Hamassaki-Britto D E. Distribution of the small molecular weight GTP-binding proteins Rac1, Cdc42, RhoA and RhoB in the developing chick retina[J]. J Neurocytol, 2002, 31(2): 149-159.

(编辑　薛国文)

(上接412页)

疗效,同时降低毒副作用。免疫治疗对前列腺肉瘤的治疗具有积极意义。Skinner[3]建议成年人采用下列方案:术前行介入化疗(髂内动脉插管),再行盆腔放疗,然后做根治性肿瘤切除,术后做周期性化疗。对于儿童可采用术前化疗、手术切除、术后放疗及周期性预防化疗的方案[4]。对于已失去根治性手术时机而又不愿尿流改道的患者,为提高其生存质量行经尿道前列腺电切术不失为一种有效的姑息性治疗手段[5]。前列腺肉瘤发展快,预后差。横纹肌肉瘤恶性程度高,几乎均于1年内死亡;平滑肌肉瘤预后稍好,平均生存期2~3年。影响预后的因素包括年龄、肿瘤细胞类型、侵犯程度、临床分期等。长期存活有赖于早期诊断和根治性切除。放疗、化疗及免疫治疗的改进有望改善预后。

关键词:前列腺肿瘤;肉瘤;诊断;治疗;预后

中图法分类号:R737.25　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Dundore P A, Cheville J C, Nascimento A G, *et al*. Carcinosarcoma of the prostate. Report of 21 cases[J]. Cancer, 1995, 76(6): 1035-1042.

[2] Waring P M, Newland R C. Prostatic embryonal rhabdomyosarcoma in adults. A clinicopathologic review[J]. Cancer, 1992, 69(3): 755-762.

[3] Skinner D G. Sarcoma of the prostate M// Kaufman J J. Current Urologic Therapy. 2nd. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996: 351-352.

[4] Ashlock R, Johnstone P A. Treatment modalities of bladder/prostate rhabdomyosarcoma: a review[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2003, 6(2): 112-120.

[5] Koleski F G, Turk T M, Wojcik E M, *et al*. Carcinosarcoma of the prostate J. World J Urol, 1999, 17(5): 316-318.

(编辑　薛国文)