文章编号:1000-5404(2009)12-1177-04

论著

脑缺血再灌注大鼠 GAP-43 和 RhoA 蛋白表达及 NEP1-40 对其的影响

邹 佳,李长清 (重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

摘 要:目的 观察侧脑室注射 NEP1-40 对脑缺血再灌注大鼠轴突再生、患肢功能恢复和 RhoA 信号通路活动的影响,探讨其可能的机制。**方法** 将 60 只成年雄性 SD 大鼠分为假手术组、脑缺血对照组、侧脑室注射 PBS 组和侧脑室注射 NEP1-40 组;采用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型;用 Western blot 方法检测缺血灶周边脑组织生长相关蛋白(GAP-43)和 RhoA 蛋白表达;用 Montoya 设计的"楼梯测试"方法对患肢运动功能进行测试。**结果** ①侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠缺血灶周边脑组织 GAP-43 在术后 7 d 和 14 d 均高于脑缺血对照组和侧脑室注射 PBS 组,以术后 7 d 最显著。②侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠缺血灶周边脑组织 RhoA 在术后各时相点显著低于脑缺血对照组和侧脑室注射 PBS 组。③侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠在术后各时相点"楼梯测试"结果显著高于脑缺血对照组和侧脑室注射 PBS 组。**结论** NEP1-40 能够促进脑缺血再灌注大鼠损伤后轴突再生和运动功能恢复,其机制可能与抑制 RhoA 信号通路活动有关。

关键词:脑缺血再灌注;NEP1-40;生长相关蛋白-43;RhoA
中图法分类号:R341;R363.27;R743.31 **文献标识码**:A

Effects of NEP1-40 on GAP-43 and RhoA expression in rats of cerebral ischemic-reperfusion model

ZOU Jia, LI Chang-qing (Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the effects of NEP1-40 on axon regeneration, motor function recovery of affected limbs and RhoA signal pathway in cerebral ischemia-reperfusion rats for exploring the possible mechanisms. Methods A total of 60 adult male Sprague-Dawley (SD) rats were equally divided into sham operation group (sham group), cerebral ischemia-reperfusion control group (control group), intra-lateral ventricle injection of PBS group (PBS group), and intra-lateral ventricle injection of NEP1-40 group (NEP1-40 group). The middle cerebral artery ischemia-reperfusion model (MCAI/R) was established by nylon monofilament occlusion method in rats. The changes in growth associated protein-43 (GAP-43) and RhoA expressions were determined by Western blotting technique. The motor function of affected limbs was tested by the "staircase test" of Montoya's design. Results ① The expression of GAP-43 in NEP1-40 group was higher than that in the control and the PBS groups at 7 d and 14 d after MCAI/R, peaking at 7 d; ② The expression of RhoA in NEP1-40 group was significantly lower than that in the control and the PBS groups at each time point; ③ The results of "staircase test" in NEP1-40 group were much higher than those in the control group and the PBS groups at each time point after MCAI/R. Conclusion NEP1-40 can improve axon regeneration in cerebral ischemia-reperfusion rats and promote the recovery of motor function. The mechanism may be associated with the inhibition of RhoA signal pathway.

Key words: cerebral ischemia reperfusion; NEP1-40; GAP-43; RhoA

成年哺乳动物在中枢神经系统损伤后,机体的功能恢复困难,其原因主要是神经轴突的再生受到限制。研究表明,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(oligodendrosyte-myelin glycoprotein, OMGP)作用于相同的受体 NgR,激活 RhoA,继而引起

基金项目:重庆市自然科学基金(2004-54-83)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2004-54-83)
作者简介:邹 佳,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事脑血管疾病方面的研究。E-mail: jiajia-smile@163.com
通信作者:李长清,E-mail:licq9217@163.com
收稿日期:2008-12-31;修回日期:2009-02-18

轴突生长锥的崩溃,抑制轴突出芽和生长[1]。NEP1-40能与 Nogo-66 等 Nogo-A 受体(Nogo-A receptor, NgR)配体竞争性结合 NgR,阻断髓鞘对轴突生长的抑制作用,促进损伤轴突再生。本实验采用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,观察 NEP1-40 对脑缺血再灌注大鼠 GAP-43 蛋白和 RhoA 蛋白表达的影响,结合楼梯测试,研究其对大鼠脑缺血再灌注损伤后瘫痪治疗的可行性及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 200 ~ 250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供(合格证号:检动字 2002A040)。分为 A 组(假手术组,15 只)、B 组(脑缺血对照组,15 只)、C 组(侧脑室注射 PBS 组,15 只)和 D 组(侧脑室注射 NEP1-40 组,15 只),各组又分为术后 7、14 d 和 21 d 3 个时相点,各时相点 5 只。

1.2 主要仪器和试剂

DualLab 小动物立体定向仪(美国 Stoelting 公司),低温超速离心机(美国 Sigma 公司),垂直电泳槽、电泳仪、电转槽为 Bio-Rad 公司产品。NEP1-40 购自美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司,兔抗 GAP-43 单克隆抗体(美国 Chmicon 公司),HRP 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉生物公司),小鼠抗 RhoA 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉生物公司),ECL 化学发光试剂盒(南京凯基生物公司),其他为国产分析纯试剂。

1.3 脑缺血再灌注大鼠模型制作与侧脑室注射

B、C、D 组大鼠参照 Longa、Kuga 等改良的线栓法建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,缺血 2 h 后再灌注。造模成功的标准为大鼠手术麻醉清醒后出现左侧肢体瘫痪,站立不稳,提尾时向一侧转圈,无瘫痪和死亡的动物剔除。假手术组(A 组)大鼠按前述方法仅右侧颈外动脉结扎即缝合皮肤,不做进一步处理。

将 C、D 2 组大鼠用 3.5% 的水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔注射麻醉动物,用脑立体定位仪固定,纵向切开颅顶皮肤,充分暴露前囟,在大脑前囟后 0.8 mm,右旁 1.5 mm 处开颅,深入皮质下 3.5 mm。C 组大鼠用微量注射器注入 0.01 mol/L PBS(pH =7.4)50 μl,D 组大鼠注入 NEP1-40 稀释液 50 μl(25 μg/50 μl PBS),缓慢注入,50 min 注射完,保留注射器 5 min,之后拔出,用石蜡封住针眼,缝合切口。均在造模成功后 24 h 注射。

1.4 大鼠前肢功能测试

参照 Montoya[2] 设计的"楼梯测试"方法测试大鼠前肢功能。造模前对大鼠进行 7 d 的楼梯训练,观察大鼠更偏爱使用哪侧前肢,确定大鼠的优势爪,选择左利爪的大鼠 60 只纳入下一步测试。左利爪大鼠左侧测试:测试标准为 1 h。仅在楼梯左侧放有食物,每 5 分钟添加 1 次,1 h 的食物小球最大量仍为 72 粒(每粒食物小球质量为 45 mg)。连续进行 7 d 的左侧测试,之后对 B、C、D 组大鼠进行手术造模,假手术组仅进行右侧颈外动脉结扎。各组大鼠在造模前,造模后 7、14 d 和 21 d 分别进行左前肢功能测试。

1.5 Western blot 检测缺血灶周边区大脑皮质 GAP-43 及 RhoA 蛋白表达

在相应时相点处死大鼠,按照凯基全蛋白提取说明书提取全蛋白,应用 Bradford 法测定提取物的蛋白浓度,用 12% 分离胶行蛋白 SDS-PAGE 变性电泳,分离含一定量蛋白的全蛋白抽提物,检测 GAP-43、RhoA 和 GAPDH 时每泳道蛋白上样量均为 40 μg。电泳结束,将蛋白电转印至 PVDF 膜;TBS 洗膜后,用一抗工作液孵膜,4 ℃过夜(16 ~ 18 h);TBST 缓冲液洗膜 3 次,用 HRP 标记二抗工作液孵膜,37 ℃1 h;洗膜 3 次,ECL 化学发光法显影、拍照,实验重复 5 次,图像处理系统对条带进行灰度值测定。以 GAPDH 为内参照,一抗为小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1∶1 000),二抗为 HRP 标记羊抗小鼠 IgG(1∶1 000)。

1.6 半定量分析

Western blot 膜片用 ChemiDoc XRS 系统扫描,并用 Quantity One 4.6 版图像分析软件(Bio-Rad 公司产品)测量 GAP-43 蛋白、RhoA 蛋白和内参照 GAPDH 蛋白各显色条带的平均光密度值,以 GAP-43 和 RhoA 分别与对应的内参 GAPDH 蛋白显色条带的 OD 值的比值标示 GAP-43 蛋白和 RhoA 蛋白相对表达量。

1.7 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠前肢功能测试

造模术前各组间大鼠左前肢抓取能力比较无统计学差异($P > 0.05$);术后各时相点侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠的左前肢抓取能力明显高于脑缺血对照组和侧脑室注射 PBS 组($P < 0.05$),但仍低于假手术组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时相点左前肢功能比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

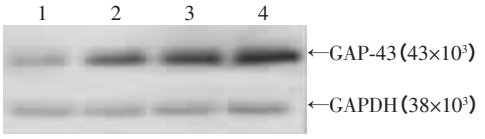
组别	术前 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
假手术组	69.40 ± 1.67	69.00 ± 1.58	69.40 ± 1.14	69.80 ± 0.84
对照组	69.00 ± 1.58	17.20 ± 1.93[a]	19.60 ± 1.14[a]	24.20 ± 0.84[a]
PBS 组	69.60 ± 2.27	17.20 ± 2.39[a]	19.20 ± 1.10[a]	24.00 ± 0.71[a]
NEP1-40 组	70.25 ± 1.71	21.80 ± 1.30[abc]	27.80 ± 2.78[abc]	40.60 ± 1.14[abc]

a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; b: $P < 0.05$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与 PBS 组比较

2.2 各组大鼠脑组织 GAP-43 蛋白表达

与假手术组比较,侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠 GAP-43 蛋白表达术后 7 d 最高,之后逐渐降低,21 d 降到接近假手术组水平。脑缺血对照组与侧脑室注射 PBS 组大鼠各时相点脑组织 GAP-43 蛋白的表达比较无明显差异($P > 0.05$),但侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠在造模术后 7 d 和 14 d 脑组织 GAP-43 蛋白的表达均高于脑缺血对照组和侧脑室注射 PBS 组,以术后 7 d 最

显著。见图 1、2 和表 2。



1:假手术组;2:对照组;3:PBS 组;4:NEP1-40 组

图 1　Western blot 检测各组术后 7 d 的 GAP-43 蛋白表达



1:假手术组; 2: NEP1-40 组 7 d; 3: NEP1-40 组 14 d; 4: NEP1-40 组 21 d

图 2　Western blot 检测假手术组与 NEP1-40 组术后各时相点 GAP-43 蛋白表达

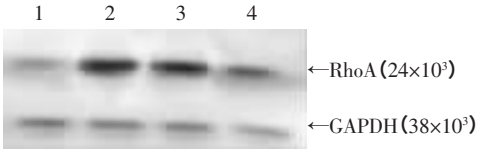
表 2　各组大鼠各时相点 GAP-43 蛋白的表达 ($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
假手术组	0.86 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.85 ± 0.02
对照组	2.15 ± 0.03[a]	1.24 ± 0.02[a]	0.86 ± 0.02
PBS 组	2.17 ± 0.02[a]	1.22 ± 0.01[a]	0.85 ± 0.01
NEP1-40 组	3.18 ± 0.02[abc]	2.23 ± 0.02[abc]	0.87 ± 0.01

a: $P<0.05$, 与假手术组比较; b: $P<0.05$, 与对照组比较; c: $P<0.05$, 与 PBS 组比较

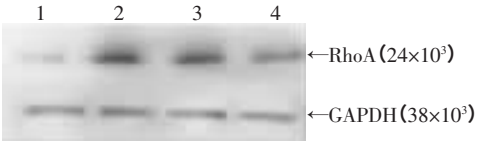
2.3　各组大鼠脑组织 RhoA 蛋白表达

与假手术组比较,侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠脑组织 RhoA 蛋白的表达在术后 7 d 最高,之后逐渐降低,到 21 d 仍高于假手术组。脑缺血对照组与侧脑室注射 PBS 组大鼠各时相点脑组织 RhoA 蛋白的表达比较无明显差异,侧脑室注射 NEP1-40 组大鼠术后各时相点脑组织 RhoA 蛋白的表达强度均显著低于脑缺血对照组和侧脑室注射 PBS 组,见图 3、4 和表 3。



1:假手术组;2:对照组;3:PBS 组;4:NEP1-40 组

图 3　Western blot 检测各组术后 7 d 的 RhoA 蛋白表达



1:假手术组; 2: NEP1-40 组 7 d; 3: NEP1-40 组 14 d; 4:NEP1-40 组 21 d

图 4　Western blot 检测假手术组与 NEP1-40 组术后各时相点 RhoA 蛋白表达

表 3　各组大鼠各时相点 RhoA 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
假手术组	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.45 ± 0.01
对照组	2.12 ± 0.02[a]	2.04 ± 0.02[a]	1.93 ± 0.02[a]
PBS 组	2.13 ± 0.02[a]	2.06 ± 0.01[a]	1.91 ± 0.02[a]
NEP1-40 组	0.93 ± 0.02[abc]	0.85 ± 0.04[abc]	0.64 ± 0.03[abc]

a: $P<0.05$, 与假手术组比较; b: $P<0.05$, 与对照组比较; c: $P<0.05$, 与 PBS 组比较

3　讨论

NEP1-40 是 Nogo-66 的 N 端的 1-40 个氨基酸片段,而 Nogo-66 又是轴突生长抑制因子 Nogo-A 的 C 端。NEP1-40 也是 Nogo-66 与 NgR 结合的必需片段,能与 Nogo-66 等 NgR 配体竞争性结合 NgR[3]。在离体情况下,NEP1-40 能部分阻断髓鞘对轴突生长的抑制作用,鼠胸脊髓半切后,鞘内注射 NEP1-40 引起皮质脊髓束(corticospinal tract,CST)显著芽生和功能改善。Li 等[4]以脊髓半切损伤为模型,观察 NEP1-40 皮下注射对 CST 再生和瘫痪康复的影响,发现脊髓损伤后立即皮下注射 NEP1-40 可明显促进 CST 再生和运动功能改善,其效果与鞘内注射相似。Mingorance 等[5]以嗅内区海马通路薄片培养为模型,发现用 NEP1-40 处理可显著促进解剖离断的嗅内区神经元轴突再生,并与其海马的目标神经元建立突触联系,提示 NEP1-40 在非脊髓损伤模型有促进损伤轴突再生的作用。Wang 等[6]以大鼠右侧大脑中动脉皮层支闭塞为模型,观察 NEP1-40 对 Nogo-A 的阻断作用,发现给予 NEP1-40 干预后,NogoA 的蛋白水平在不同时间点都明显减低。本实验采用大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,用 NEP1-40 进行侧脑室注射,发现与侧脑室注射 PBS 组和脑缺血对照组比较,造模术后各时相点大鼠左前肢功能测试明显改善,证明侧脑室注射 NEP1-40 能促进中枢神经系统损伤后轴突的再生和运动功能改善,证实出其临床应用潜力。

生长相关蛋白 43(GAP-43)是一种特异性胞膜磷酸蛋白,其主要作用是启动生长锥形成,并使其附着、延伸和抵抗回缩因素的影响,促进单胺递质释放与维持长时程增强效应,在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用[7,8]。新近的研究表明 GAP-43 与神经系统的发育、突触形成和可塑性以及神经再生有密切的关系,在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用,被认为是神经元生长发育和可塑性的分子标记物[9]。本实验显示侧脑室注射 NEP1-40 组造模后 7 d GAP-43 表达最高,之后降低,术后 21 d

时降至假手术组水平。给予 NEP1-40 侧脑室注射的大鼠在造模术后 7 d 和术后 14 d 脑组织 GAP-43 蛋白的表达均明显高于 PBS 侧脑室注射组和脑缺血对照组,提示给予 NEP1-40 侧脑室注射可明显促进轴突的再生,这可能是其促进运动功能康复的机制之一。

RhoA 是小 G 蛋白超家族中 Rho 家族的 Rho 亚族中的成员。RhoA 激活抑制轴突出芽和生长的细胞内信号传递可能机制为髓鞘抑制因子(Nogo-A、MAG 和 OMGP)的激活,作用于受体 NgR,通过 P75NTR 的帮助,激活 RhoA,通过其下游的 Rho 激酶调节肌动蛋白的活动,继而引起轴突生长锥(neurite growth cone)的崩溃[10],抑制轴突出芽和生长。本实验显示侧脑室注射 NEP1-40 组 RhoA 蛋白表达 7 d 最高,之后逐渐降低,到 21 d 时表达仍高于假手术组。给予 NEP1-40 侧脑室注射的大鼠在造模术后各时相点脑组织 RhoA 蛋白的表达均显著低于 PBS 侧脑室注射组和脑缺血对照组。说明给予 NEP1-40 侧脑室注射对 RhoA 信号通路活动有明显抑制作用,这与 GAP-43 蛋白的表达模式刚好相反,提示 NEP1-40 促进轴突的再生和运动功能康复可能是通过调节 RhoA 信号通路的活动实现的。

总之,脑缺血可诱导缺血脑组织中 GAP-43 和 RhoA 蛋白表达增高,NEP1-40 通过促进 GAP-43 蛋白的表达,同时抑制 RhoA 蛋白的表达,最终促进脑缺血再灌注大鼠损伤的神经轴突的再生和患肢功能的恢复。

参考文献:

[1] Jacobs W B, Fehlings M G. The molecular basis of neural regeneration [J]. Neurosurgery, 2003, 53(4): 943 - 948.

[2] Montoya C P, Campbell-Hope L J, Pemberton K D, *et al*. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats[J]. J Neurusci Methods, 1991, 36(2 - 3): 219 - 228.

[3] GrandPre T, Li S, Strittmatter S M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration[J]. Nature, 2002, 417(6888): 547 - 551.

[4] Li S, Strittmatter S M. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2003, 23(10): 4219 - 4227.

[5] Mingorance A, Sole M, Muneton V, *et al*. Regeneration of lesioned entorhino-hippocampal axons in vitro by combined degradation of inhibitory proteoglycans and blockade of Nogo-66/NgR signaling [J]. FASEB J, 2006, 20(3): 491 - 493.

[6] Wang F, Liang Z, Hou Q, *et al*. Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction[J]. Neurosci Lett, 2007, 417(3): 255 - 260.

[7] Nadeau S, Hein P, Fernandes K J, *et al*. A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 29(4): 525 - 535.

[8] Becker T, Lieberoth B C, Becker C G, *et al*. Differences in the regenerative response of neuronal cell populations and indications for plasticity in intraspinal neurons after spinal cord transection in adult zebrafish [J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 30(2): 265 - 278.

[9] Li Y, Chen J, Zhang C L, *et al*. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells[J]. Glia, 2005, 49(3): 407 - 417.

[10] Teng F Y, Tang B L. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents? [J]. J Neurochem, 2005, 94(4): 865 - 874.

(编辑 王 红)

(上接 1176 页)

2 讨论

节育环移位腹腔引起各种并发症报道较多,但引起闭袢性绞窄性肠梗阻较少见。烟台郭吉田等[1]及广东李小玲[2]各报道 1 例,一般认为节育环由子宫游走腹腔,可能由于当时置环时对子宫壁有损伤,后随强烈的子宫收缩,驱使节育环穿过受损的子宫壁移位腹腔,部分节育环光滑,有一定弹性,寄居在腹腔内某处可不引起症状,一部分由于环的刺激,可引起炎症和黏连。本例患者第 1 次置环不知去向,可能由于环在腹腔内存在时间太长,失去环的光滑性,同时见环的一侧粘连固定,另一侧活动部位形成 1 个疝环,这样给了蠕动小肠嵌入环内的机会,一旦小肠进入环内,即造成闭袢性绞窄性肠梗阻,随即出现嵌入的肠管缺血、坏死,可见,本例应属于一种极少见的情况。因此,放置节育环后要定期随访很重要[1],可通过 X 线透视、摄片、B 超作随访的方法,凡置环后再孕,应考虑节育环脱落或移位,移入腹腔后要随时观察患者腹痛情况,有无梗阻症状,一旦出现梗阻症状,及时手术探查,解除梗阻原因,治疗切除病变的肠段,同时对症支持治疗,患者应很快康复。

关键词: 节育环;肠梗阻

中图法分类号: R574.2 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 郭吉田,吕忠船, 荆鹏程. 游走节育环致绞窄性肠梗阻并直肠癌 1 例[J]. 中华普通外科杂志, 2003, 18(10): 611.

[2] 李小玲. 节育环肠嵌顿致绞窄性肠梗阻 1 例[J]. 实用妇产科杂志, 2004, 20(1): 51.

(编辑 王 红)