基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0041-03

Aβ诱导的认知障碍大鼠海马RGMa和RhoA表达的研究

尹红蕾,秦新月,罗家明,王 敬,殷 成,陈黎燕

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市高校神经病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨Aβ诱导的认知障碍大鼠海马内反义导向分子(Repulsive guidance molecule,RGMa)及Ras基因同源物A(Ras homologous A,RhoA)表达情况。方法:20只SD大鼠被随机分为认知障碍模型组(10只),生理盐水对照组(10只),建立Aβ1-40致认知障碍大鼠模型,Morris水迷宫检测大鼠认知功能,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 检测RGMa和RhoA mRNA的表达,免疫组织化学方法检测RGMa蛋白的表达。结果:与对照组相比较,模型组大鼠显示学习、记忆能力明显下降($P<0.01$),海马RGMa mRNA表达下调($P<0.05$),RGMa蛋白表达也降低($P<0.05$),而RhoA mRNA表达显著增高($P<0.01$)。结论:Morris水迷宫检测显示大鼠认知功能障碍,RGMa表达降低及RhoA mRNA表达上调可能参与了Aβ1-40致认知功能障碍大鼠海马神经元变性病理过程。

【关键词】反义导向分子;Ras基因同源物A;β-淀粉样蛋白;认知障碍;海马神经元

【中国图书分类法分类号】R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

The expression of RGMa and RhoA in the hippocampus of rats with cognitive impairment induced by Aβ

YIN Hong-lei, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the expression of RGMa and RhoA in the hippocampus of cognitive impairment rats induced by Aβ1-40. *Methods*: Morris water maze was used to study the cognitive function, and reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)method was used to determine the changes of RGMa mRNA and RhoA mRNA expressions. mmunohistochemistry was used to detect the expression of RGMa protein. *Results*: Model group showed learning and memory impairment, the expression levels of RGMa mRNA and protein in the hippocampus decreased compared with control group ($p<0.05$), in contrast, RhoA mRNA upregulated. *Conclusion*: Morris water maze test showed cognitive impairment in rats. The down regulation of RGMa expression and the increasing of RhoA expression may be involved in hippocampal neuronal degeneration pathological process of cognitive impairment induced by the Aβ in rats.

【Key words】Repulsive guidance molecule; Ras homologous; β-amylod protein; Hippocampal neuron; Cognitive handicap

近年来,随着对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)发病机制研究的不断深入,逐渐发现轴突抑制因素[1]在AD的发生、发展中起着重要作用。RGMa[2,3]是一种轴突导向分子,最初发现于鸡胚视觉系统中。后来发现其在中枢神经生长发育过程中起多种作用,近年发现对中枢神经系统损伤后轴突的生长具有抑制作用,并且此抑制作用是通过RhoA-Rho激酶信号传导通路,导致轴突再生困难。本文拟观察RGMa和RhoA在Aβ诱导的认知障碍大鼠海马组织中的表达情况,为探讨Aβ介导的认知障碍的病理过程奠定实验基础。

作者介绍:尹红蕾(1981-),女,硕士,
研究方向:脑血管疾病及脂质病。

通讯作者:秦新月,女,教授,E-mail:qinxingyue@yahco.com。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

重庆医科大学动物中心提供23只成年SD大鼠,雌雄不论,体重260~320g,饲以标准颗粒饲料,分笼喂养,自由饮食,实验室内通风良好。温度保持在18~25℃。大鼠适应性喂养1周后,经Morris水迷宫测试,4个象限测试中有2个象限超过2min

未找到安全平台者视为记忆障碍,淘汰3只,剩余20只大鼠被随机分为造模组(10只),生理盐水对照组(10只)。

1.2 仪器与试剂

Morris水迷宫,脑立体定位仪(日本成茂公司),凝胶扫描成像仪(BIO-RAD公司),BS-50型光学显微镜(Olympus,German),图像分析系统(北航CM—2000B型),山羊抗RGMa抗体(Santa Cruz公司),RT-PCR反应试剂盒(TakaRa,大连宝生物公司),根据Gene Bank基因序列RGMa(NO.XP218791)和RhoA(NO.NM057132),分别设计引物:RGMa(上游:5'-GCTGGATGGATGGGTATGGG-3',下游:5'-GCCGCAGTGAGTGTAGTTGG-3'),RhoA(上游:5'-GCAAAGACCAAAGACGGAGTGAG-3',下游:5'-CTGCCAATGCAATCTGTTAAGGAGT-3'),以及内参β-actin(上游:5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游:5'-CGGACTCATCGT ACTCCTGCT-3'),由重庆升博生物技术公司合成。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 建立β淀粉样蛋白(Aβ1-40)致大鼠认知障碍模型

大鼠经3.5%水合氯醛腹腔麻醉,固定于立体定位仪上,颅顶部正中切开皮肤,参照大鼠脑立体定位图谱,选择右侧海马CA1区为注射靶区,于前囟向后3.0mm,中线旁开2.2mm处,钻开颅骨,微量进样器自脑表面垂直进针2.8mm,将Aβ1-40缓慢注入(10μl),留针10min以保证溶液充分弥散,然后缓慢撤针。生理盐水注射组注入等体积生理盐水。

1.4 Morris水迷宫行为学测试

造模1个月后,Morris水迷宫测定大鼠的学习记忆能力[4]:①定位航行试验(Place navigation):通过对训练大鼠游泳寻找平台,观测其逃避潜伏期长短可检测动物的学习能力。历时5d,每天各2次,将大鼠面向池壁分别从2个入水点放入水中,记录其在2min内寻找到平台的时间(逃避潜伏期,Escape latency)和游泳路径。如果大鼠在2min未找到平台,潜伏期记为120s,并由实验者用手牵引其至平台上,让大鼠停留10s,再放回笼中。②空间探索试验(Spatial probe):第6d撤除平台,任选1个入水点放入水中,记录2min内大鼠在池中的游泳轨迹和时间,分别计算在各象限所停留时间的百分比。

1.5 标本取材

实验动物饲养1个月,经行为学测试后处死。经腹腔注射3.5%的水合氯醛深度麻醉后,每组各4只动物直接断头取脑,置于冰面上的培养皿上,取右侧海马,放入用DEPC水浸泡过夜且已消毒的冻存管中,置于液氮中冷冻,大约2~3h后转移-80℃冰箱中保存。剩余动物4%多聚甲醛缓冲固定液心内灌注、固定、取材海马部位,石蜡包埋,作石蜡切片(片厚4μm),行免疫组织化学检查。

1.6 RT-PCR检测RGMa和RhoA mRNA的表达

采用Trizol一步法提取海马组织总RNA。逆转录反应参数:30℃,10min;50℃,30min;99℃,5min;5℃,5min,瞬间离心。聚合酶链反应:以逆转录所得cDNA 10μl为模板,上游引物0.5μl、下游引物0.5μl、40μl体系。扩增参数:(94℃,2min)×1循环;(94℃,30s;57.6℃,30s;72℃,1min)×35循环。结果用Quantity One-4.4.0软件进行半定量分析。

1.7 免疫组织化学方法检测RGMa蛋白表达

切片常规脱蜡至水,微波修复抗原,滴加山羊抗RGMa抗体(1:100),4℃孵育过夜;加二抗后,DAB显色,然后脱水、透明、封片;PBS代替一抗作阴性对照;光学显微镜下观察,棕黄色颗粒为免疫阳性细胞。

1.8 统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS11.0统计软件行t检验,检验水准$\alpha=0.05$,$P<0.05$即认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠行为学检测

大鼠在Morris水迷宫中定向航行试验如表1,各组平均逃避潜伏期日渐缩短,表明各组大鼠学习寻找平台的能力在历次的学习训练中均得到提高,从第2d开始,模型组与对照组比较,平均逃避潜伏期明显延长,模型组大鼠轨迹图多以边缘式和随机式为主(图1)。撤去平台后,如表2所示,以在原平台象限(第2象限)的活动时间为指标,模型组与对照组比较,原平台象限活动时间明显缩短(图2),显现出学习记忆力明显减退。

表1 大鼠逃避潜伏期变化(单位:s,$\bar{x}\pm s$)

组别	1d	2d	3d	4d	5d
对照组	86.8±14.8	49.4±11.2	3.1±7.68	213.2±5.05	8.03±4.02
模型组	91.9±10.2	84.7±11.1**	53.5±6.48**	45.9±8.85 **	26.8±7.99**

*$P<0.05$,**$P<0.01$ 与对照组比较

表2 大鼠在各象限所停留时间的百分比(单位:%,$\bar{x}\pm s$)

组别	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
对照组	22.97±6.62	40.03±7.72	18.40±3.71	18.57±7.54
模型组	28.16±9.43	27.68±5.18**	21.97±4.29	23.01±5.09

*$P<0.05$,**$P<0.01$ 与对照组比较

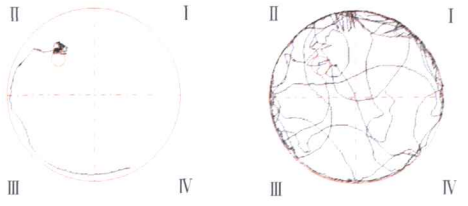


图1 大鼠游泳轨迹图

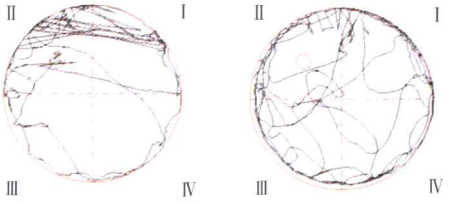
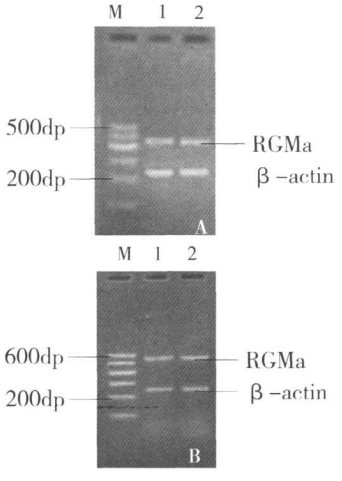


图2 大鼠游泳轨迹图(撤除平台后)

2.2 海马内RGMa和RhoA mRNA表达

RGMa和RhoA mRNA凝胶电泳图像分别见图3-A、B。RGMa,RhoA和β-actin mRNA转录产物大小分别为456bp、512bp、229bp。海马内注射Aβ1-40后,RGMa mRNA转录水平下调,模型组和对照组RGMa相对强度分别为1.075 3±0.042 1、1.242 8±0.036 5,差别有统计学意义($P<0.05$)。模型组RhoA mRNA表达水平明显高于对照组($P<0.01$),相对强度分别为1.528 1±0.024 3,1.125 7±0.026 5。



注:M为Marker;1.为模型组;2.为对照组

图3 A.大鼠海马RGMa mRNA表达;B.大鼠海马RhoA mRNA表达

2.3 大鼠海马内RGMa蛋白的表达

在假手术对照组海马神经元排列整齐,胞膜上可见RGMa免疫阳性表达,模型组海马神经元排列散乱,部分神经元坏死崩解,2组光密度值分别为0.157 2±0.005 8,0.144 0±0.004 6,与对照组相比较,RGMa表达降低,差别有统计学意义($P<0.05$)。

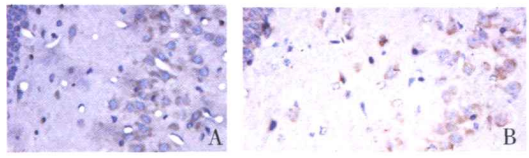


图4 大鼠海马RGMa的表达(DAB×400) A对照组;B模型组

3 讨 论

Brinks H等[5]研究表明,给予海马内嗅区皮层特异性RGMa抗体后,起自内嗅区皮层终止于外分子层的轴突出现生长混乱,不能到达正确的靶区,可见RGMa的过低表达不利于轴突的生长发育。此外,在成年哺乳动物脑外伤及脊髓损伤后[2,3]RGMa呈不同程度的过高表达并持续数周到数月,抗RGMa抗体干预能够显著促进轴突生长,并有效地促进神经功能的恢复,在体外实验中,RGMa与目前研究比较多的轴突抑制蛋白nogo,MAG,Oligo等同样作用于RhoA-Rho激酶信号传导通路抑制中枢神经系统轴突再生,但这一过程与后三者的共同受体NgR无关。本实验结果表明Aβ诱导的认知障碍模型大鼠海马内RGMa表达降低而RhoA表达上调,因此RGMa在Aβ诱导的认知障碍发病过程中起到的主要作用可能是对生长锥介导排斥性导向信号,RGMa表达较正常减少时对轴突生长亦产生负面影响。而Aβ可以直接影响RhoA上调而产生轴突抑制作用,大量研究资料表明[6],降低可溶性和寡聚体Aβ含量的一种可行方法就是干扰RhoA-Rho激酶通路。某些非甾体类抗炎药[7]可作为Rho抑制剂显著减少毒性物质Aβ42的分泌,脑室内注射ROCK特异性抑制剂Y-27632可有效降低PDAPP转基因小鼠Aβ42水平,从而促进神经突起再生并减轻炎症反应。但是在Aβ1-40致认知障碍大鼠模型中,RGMa对轴突生长抑制作用的机制还有待于进一步研究,是否通过RhoA-Rho激酶信号传导通路尚待研究。

另外,给转基因AD大鼠[8]皮下注射轴突抑制蛋白NgR可溶性片段后,Aβ表达水平降低,淀粉样蛋白斑减少,轴突营养不良有所改善,其机制有可能是降低了Aβ产生过程中的限速酶水平,如β内分泌

(下转第 47 页)

程中关键在于单细胞悬液的获得，其中消化液浓度的选择和消化时间的掌握尤为重要，浓度太高或消化时间太长，容易因消化过度致细胞损伤甚至死亡，而浓度太低或消化时间太短，易造成消化不足致组织块残留，细胞容易聚集成团，导致中间的细胞缺乏营养物质而衰老死亡。在参考了以往文献的基础上，经过反复实验，最后选用机械吹打加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液37℃孵育，孵育时间在显微镜下观察掌握，一般在15min左右，结果证实采取这一方案种植的细胞生长良好。另外，原代取材过程中的污染控制也很重要，一定要保证无菌操作。

在以往的研究中，大鼠神经干细胞的体外培养既有取材于新生大鼠，也有取材于胎鼠[4-7]。本实验对2种来源的神经干细胞培养方法进行了比较，采用相同的消化条件、接种密度、无血清培养基进行培养，培养出的神经球分别进行细胞表面抗原Nestin免疫组化染色和荧光染色，均显示为阳性，且形成的神经球经传代吹打消化形成单细胞后还能重新生成新的神经球，表明其具有自我更新和增殖能力。神经球经胎牛血清混合培养诱导分化后均能形成神经元和NSCs，表明培养出的细胞具有多向分化的潜能，进一步证实2种方法均能培养出神经干细胞，但各有优劣：胎鼠来源者神经球形成更早，数量更多，增殖活力更强，但组织取材过程稍复杂，容易造成取材过程中细胞被污染，胎鼠的胎龄需要严格控制。新生鼠来源者鼠源容易获得，组织取材过程操作简单，容易控制污染，但神经干细胞成球率更低。

在不久的将来，研究神经干细胞移植，将为神经损伤失修复和神经系统退行性疾病的治疗开辟新的途径，而NSCs的体外培养正是这些研究的重要基础，因此，利用细胞培养技术分离培养NSCs已成为近年来神经科学研究的热点。目前，NSCs体外培养主要采用无血清培养基，细胞传代数量有限，无法生产出能满足细胞移植的足够量的NSCs，且如何精确控制NSCs的定向分化都是NSCs培养过程中尚需解决的问题。

参 考 文 献

[1] Reynolds BA,Weiss S.A multipotent EGF2 responsive striatalembryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J].J Neurosci,1992;12(11):4565-4574.

[2] Pruszak J,Sonntag KC,Aung MH,et al.Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo[J].Curr Pharm Biotechnol,2007;8(3):141-145.

[3] Gage FH, Fisher LJ.Isolation, characterization,and use of stem cells from the CNS[J].Annu Rev Neurosci,1995;18:159.

[4] 刘 瞬，王红云，何 乐，等.胚胎大鼠神经干细胞培养及分化鉴定的实验研究[J]. 中国现代神经疾病杂志,2006;6(1):52-56.

[5] 曾可斌，王学峰.脑脊液对体外培养骨髓基质细胞生长的影响[J]. 现代神经疾病杂志,2003;3(2):96-99.

[6] 尹国才，栾 佐，屈素清，等.新生鼠大脑皮层神经干细胞培养及其在同胞鼠的细胞替代作用[J]. 中华围产医学杂志,2005;8(4):255-258.

[7] 陈福权，邱建华，王锦玲，等.大鼠嗅球神经干细胞培养[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,2004;39(11):687-690.

(上接第 43 页)

酶等。这一发现为Aβ介导的认知障碍的临床治疗提供了一条新的思路。那么提高模型大鼠海马的RGMa表达水平能否起到与此类似的作用，以及提高到何种程度尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hardy J,Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science,2002;297(5580):353-356.

[2] Schwab JM,Monnier PP.Central nervous system injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain[J]. Archives Of Neurology,2005;62(10):1561-1568.

[3] Katsuhiko H,Masashi F. RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury[J]. The Journal Of Cell Biology,2006;173(1):47-58.

[4] Nakamura S,Murayama N,Noshita T,et al.Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide[J]. Brain Res,2001;912(2):128-136.

[5] Brinks H,Conrad S,Vogt J,et al.The repulsive guidance molecule RGMa is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus[J]. J Neurosci,2004;24:3862-3869.

[6] Steven P,Xu H,Megan L Kerr,et al.The β-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism[J]. Brain,2008;131(1):90-108.

[7] Zhou Y,Su Y,Baolin L,et al.Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A?42 by inhibiting rho[J]. Science,2003;302:1215-1217.

[8] Park JH,Gimbel DA,GrandPre T,et al.Alzheimer precursor protein interaction with the nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition[J]. Neurosci,2006;26(5):1386-1395.