

文章编号:1003-2754(2021)12-1060-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2021.0283

Rho 激酶抑制剂介导 RhoA/ROCK2 通路对 VaD 大鼠海马神经元的保护机制

胡跃强¹, 向军军¹, 邓秋媚², 吴林², 莫雪妮², 陈炜¹, 姚春²

摘要: **目的** 探讨基于腺相关病毒为载体构建的 Rho 蛋白激酶 2 (ROCK2) 抑制剂对血管性痴呆 (VaD) 大鼠海马神经元的保护机制。**方法** SD 大鼠 40 只,随机分为假手术组、模型组、ROCK2 干扰剂组 (shROCK2)、阴性对照组 (空载体 shROCK2)。采用双侧颈总动脉永久结扎术制作 VaD 大鼠模型,将 AAV9-ROCK2-shRNA 通过脑立体定位术注射至大鼠海马组织,阴性对照组注入等量空载体腺相关病毒。4 w 后,采用 Morris 水迷宫测定大鼠学习、记忆能力,RT-PCR、Western blot 检测各组大鼠 RhoA/ROCK2 通路 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 的 mRNA 及蛋白表达水平,电镜观察大鼠海马突触超微结构变化。**结果** 术后 4 w,与模型组及阴性对照组比较,ROCK2 干扰组大鼠空间学习及记忆能力显著改善,海马中上述 4 个指标 mRNA 及其蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$),且海马组织内突触前后囊泡正常、细胞器更加完整。**结论** Rho 蛋白激酶 2 抑制剂通过抑制 RhoA/ROCK2 信号通路降低下游相关蛋白表达,进而起到促进神经轴突再生,减轻 VaD 大鼠认知功能障碍的作用。

关键词: 血管性痴呆; 突触再生; 腺相关病毒; Rho 激酶抑制剂; RhoA/ROCK2 通路

中图分类号:R743.3

文献标识码:A

The protective mechanisms of hippocampal neurons on RhoA/ROCK2 pathway mediated by Rho kinase inhibitors in vascular dementia rats HU Yueqiang, XIANG Junjun, DENG Qiumei, et al. (Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective mechanism of Rho protein kinase 2 (ROCK2) inhibitor constructed based on adeno-associated virus vector on vascular dementia (VaD) rat hippocampal neurons. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, ROCK2 interference group (shROCK2), negative control group. The VaD model was prepared by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. AAV9-ROCK2-shRNA was injected into the hippocampus of the rat by stereotaxic technique, the negative control group was injected with the same amount of empty vector adeno-associated virus. After 4 weeks, morris water maze was used to test the learning and memory abilities of rats. RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of RhoA, ROCK2, MLC, MLCP. **Results** Four weeks after operation. The mRNA and protein expressions of the above 4 indicators in hippocampus increased ($P < 0.01$), the synaptic vesicles disappeared, and the structure of hippocampus was chaotic in the model group. Compared with the model and control group, the learning and memory ability of rats in ROCK2 interference group was significantly improved, the mRNA and protein of the above 4 indicators were significantly decreased ($P < 0.05$), and the pre-synaptic vesicles were normal and the organelles were more complete. **Conclusion** Rho protein kinase 2 inhibitors can reduce the expression of downstream related proteins by inhibiting RhoA/ROCK2 signaling pathway, then promote neuronal axon regeneration and alleviate cognitive dysfunction of VaD rats.

Key words: Vascular dementia; Synaptic regeneration; Adeno-associated virus; Rho kinase inhibitors; RhoA/ROCK2 pathways

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 是指由一系列脑血管因素引起的在脑组织损害基础上产生的以高级神经认知功能障碍为主的临床综合征^[1,2]。其确切的发病机制尚未完全清楚,但临床疗效也不甚理想^[3]。因此,对于 VaD 的机制及治疗研究显得十分迫切。新近研究发现,小 G 蛋白 RhoGTP 酶亚家族 (ras homolog gene family member A, RhoA)/Rho 激酶 (rho-associated protein kinase, ROCK) 通路在轴突生长分化、树突棘形成和维持以及记忆过程中起重要作用^[4]。在认知障碍患者脑组织中, RhoA/

ROCK2 活性上调^[5],而降低 ROCK2 的表达,或者抑制 Rho 或 ROCK2 的活性均可减缓认知障碍的发

收稿日期:2021-06-09;修订日期:2021-09-30

基金项目:国家自然科学基金(81860842);广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划(桂教人才 202006);广西中医脑病临床研究中心项目(桂科 AD20238028)

作者单位:(1. 广西中医药大学第一附属医院神经内科,广西 南宁 530023;2. 广西中医药大学,广西 南宁 530200)

通讯作者:姚春, E-mail:1197840425@qq.com

展^[6],故其有望成为治疗 VaD 的重要靶点。本研究采用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)基因干扰技术表达短发夹结构 RNA(Short hairpin RNA, shRNA)抑制 RhoA/ROCK2 信号通路,观察其对 VaD 大鼠的影响,以期防治本病提供新靶点和新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只,3 月龄,体重(250 ± 50)g,由湖南斯莱克景达物实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK 湘 2019-0004。随机分成 4 组($n = 10$):假手术组、模型组、ROCK2 干扰组(腺相关病毒)、对照组(ROCK2 空载体病毒)。

1.2 药物制备及主要仪器试剂 (1)实验药物 AAV9-ROCK2-shRNA 注射液及空载体病毒:由上海吉满生物科技有限公司制造;(2)主要试剂:引物及内参(天根生物科技有限公司),BCA 试剂盒、 β -actin 抗体(碧云天生物公司);兔抗 RhoA 多克隆抗体、兔抗 ROCK2 单克隆抗体、兔抗 MLC 多克隆抗体(美国 Abcam);兔抗 MLCP 单克隆抗体(北京 Bioss)。

1.3 实验模型制备及药物干预方法 参照文献制备 VaD 大鼠模型^[7],评估模型成功后,将 AAV-ROCK2-shRNA 原液稀释至 $5.07E + 12$ VG/ml,采用脑立体定位仪将 ROCK2 干扰剂注射海马组织,每只动物注射总量 4 μ l,持续 5 min;阴性对照组注射等量空载体病毒。术后各组大鼠正常喂养,观察 4 w。

1.4 指标观察

1.4.1 学习记忆能力测定 定位航行实验:第 1 周、第 4 周,每组大鼠每天上下午从 4 个象限各训练一次,将大鼠寻找平台的时间设置为 120 s,记录大鼠从入水到爬上平台所需时间,即逃避潜伏期,此作为大鼠空间学习能力的检测指标。空间搜索实验:大鼠完成定位航行实验后,于第 1 周、第 4 周进行空间探索实验,撤走平台,依次将大鼠从 4 个象限放入水中,分别记录其跨越原来平台的次数作为空间记忆的检测指标。

1.4.2 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测各组大鼠 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP mRNA 表达 取海马组织置于 1 ml EP 管内,在 -80 °C 条件下保存,总 RNA 运用 Trizol 法提取,提取完成后取 2 μ g RNA 开始逆转录。引物序列: β -actin:上游 5'-GCGCAAGTACTCTGTGTGG-3',下游 5'-AGGCTGTAACCGCAGCTCAG-3'; RhoA 上游 5'-AGGATTGGCGCTTTTGGTA-3',下游 5'-TTCA-CAAGATGAGGCACCCC-3'; ROCK2 上游 5'-ACAAACCAAGCTAACTGCCT-3',下游 5'-CTACGGGTGCGTTCTTTCT-3'; MLC 上游 5'-CTCGGACGAGTGAACGTGAA-3',下游 5'-

GAGAACCTCTCTGCTTGCCT-3'; MLCP 上游 5'-CCCGAGGAT GTGATCACTGG-3',下游 5'-TGCG-GCTACAAGCCTATCTG-3'。逆转录后扩增条件如下:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,48 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,共 40 个循环,最后完成 72 °C 总延伸 5 min,每组各取 5 μ l PCR 产物电泳,凝胶成像仪获取图像, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 对样本基因进行表达差异相对定量分析。

1.4.3 Western blot 检测大鼠 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达 按说明书提取各组大鼠海马组织蛋白,用 BCA 试剂盒测定并调整每个样本蛋白浓度之后上样,连接电泳装置及电源,电压设为 120 V 恒压,1.5 h 后停止电泳;用封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液)室温封闭膜 2 h,用新配制的封闭液稀释抗体 4 °C 孕育过夜;用封闭液稀释各蛋白一抗对应的二抗,室温下孵育膜 1 h,用 PBST 洗膜用于图像采集;加 ECL 工作液,在凝胶成像仪下曝光成像,采用凝胶成像分析系统进行图像分析,获取各组 Western blot 条带的平均光密度(OD)值,内参为 β -actin,目的蛋白与内参光密度比值即为目的蛋白的相对值。

1.4.4 透射电镜观察海马病理变化 大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,迅速取出脑组织,取 2 mm × 2 mm × 2 mm 大小的右侧海马 CA₁ 区组织 1 块,置于 2.5% 戊二醛预固定然后入 1% 锇酸继续固定,经 70%、80%、95% 乙醇、无水丙酮脱水、环氧树脂 Epon812 浸透和包埋,全自动石蜡切片机超薄切片,厚度约 4 μ m,3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电子显微镜观察海马组织的结构变化。

1.5 数据统计 采用统计学分析软件 SPSS 20.0 进行数据统计,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据间显著性差异比较用单因素方差分析,检验水准 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 行为学检测 组间比较,术前各组大鼠潜伏期及跨越平台次数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 1 w,模型组、阴性对照组与 ROCK2 干扰组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),与假手术组比较有显著性差异($P < 0.01$ 或 0.05);术后 4 w,与模型组比较,ROCK2 干扰组潜伏期缩短、跨越平台次数显著增加($P < 0.05$),阴性对照组潜伏期时间与跨越平台次数较模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

2.2 各组大鼠 RhoA/ROCK2 通路相关基因 mRNA 表达的变化 实时荧光定量 PCR 结果显示,与假手术组比较,模型组及阴性对照组 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP mRNA 表达量明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,ROCK2 干扰组 RhoA、

ROCK2、MLC、MLCP 表达量 mRNA 含量显著下降 ($P < 0.05$), 模型组与阴性比较四者的 mRNA 表达量无明显变化 ($P > 0.05$) (见表 2)。

2.3 各组大鼠 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白的表达变化 Western blot 检测结果表明, 与假手术组比较, 模型组及阴性对照组 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, ROCK2 干扰组四者表达显著下降 ($P < 0.05$); 模型组与阴性对照组比较四者的蛋白表

达量无明显变化 ($P > 0.05$) (见表 3、图 1)。

2.4 电镜观察大鼠海马区超微结构变化 如图 2 所示, 假手术组突触结构正常且清晰, 突触前膜有大量球形突触小泡, 可见清晰的线粒体, 突触间隙宽度及形态正常, 突触后膜厚度正常且均匀; 模型组与阴性对照组突触形态结构不完整, 细胞器结构不清晰, 突触小泡分布零散且形态模糊; ROCK2 干扰组突触结构清晰, 前膜和后膜形态正常, 可见清晰的线粒体结构, 突触间隙宽度正常 (见图 2)。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫行为学检测比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	定位航行(潜伏期)(s)			跨越平台次数(次数/次)		
	术前	术后 1 w	术后 4 w	术前	术后 1 w	术后 4 w
假手术组	23.24 ± 2.53	21.67 ± 3.57	22.24 ± 4.59	4.75 ± 0.73	4.82 ± 0.80	4.90 ± 0.84
模型组	46.95 ± 5.01**	44.35 ± 5.23**	42.02 ± 4.05**	2.15 ± 0.43*	2.12 ± 0.40*	2.20 ± 0.39*
ROCK2 组	35.42 ± 4.17	33.22 ± 4.28	32.55 ± 4.30#	3.68 ± 0.55	3.59 ± 0.52	3.60 ± 0.50#
阴性对照组	47.64 ± 5.13**	45.66 ± 4.97**	43.42 ± 4.75**	2.23 ± 0.45*	2.30 ± 0.44*	2.26 ± 0.38*

与假手术组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组及阴性对照组比较 # $P < 0.05$

表 2 各组大鼠 RhoA/ROCK2 通路相关基因 mRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5, 2^{-\Delta\Delta CT}$)

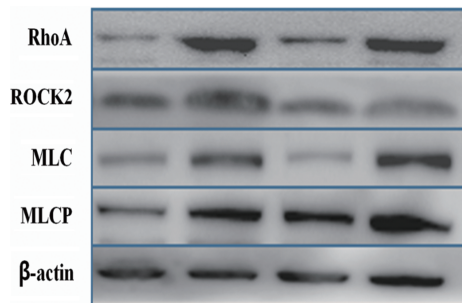
组别	RhoA	ROCK2	MLC	MLCP
假手术组	0.21 ± 0.07	0.20 ± 0.08	0.32 ± 0.11	0.23 ± 0.06
模型组	2.35 ± 0.46 [▲]	2.30 ± 0.41 [▲]	2.27 ± 0.43 [▲]	2.83 ± 0.40 [▲]
ROCK2 干扰组	1.70 ± 0.25 [#]	1.61 ± 0.23 [#]	1.78 ± 0.28 [#]	1.75 ± 0.27 [#]
阴性对照组	2.31 ± 0.40 [▲]	2.27 ± 0.43 [▲]	2.25 ± 0.46 [▲]	2.69 ± 0.49 [▲]

与假手术组比较 [▲] $P < 0.01$; 与模型组及阴性对照组比较 # $P < 0.05$

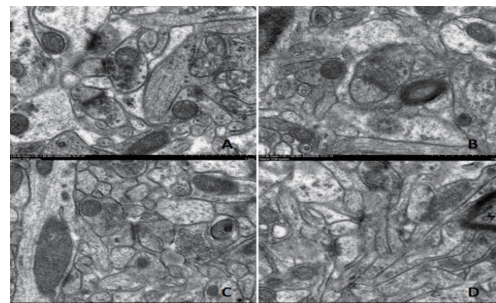
表 3 各组大鼠 RhoA/ROCK2 通路相关蛋白 OD 值的表达水平比较 ($n = 5$)

组别	RhoA	ROCK2	MLC	MLCP
假手术组	1.33 ± 0.20	1.11 ± 0.22	1.42 ± 0.23	1.56 ± 0.18
模型组	6.50 ± 0.86 [▲]	5.43 ± 0.71 [▲]	6.29 ± 0.73 [▲]	5.82 ± 0.65 [▲]
ROCK2 干扰组	4.29 ± 0.72 [#]	3.87 ± 0.53 [#]	4.38 ± 0.60 [#]	3.70 ± 0.46 [#]
阴性对照组	6.71 ± 0.84 [▲]	5.36 ± 0.77 [▲]	7.07 ± 0.76 [▲]	5.76 ± 0.69 [▲]

与假手术组比较 [▲] $P < 0.01$; 与模型组及阴性对照组比较 # $P < 0.05$



(1~4 道分别代表假手术组、模型组、ROCK2 干扰组、阴性对照组)
图 1 各组大鼠 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 蛋白表达电泳图



(×10000, A:假手术组; B:模型组; C:ROCK2 干扰组; D:阴性对照组)
图 2 各组大鼠海马电镜下超微结构的比较

3 讨 论

RhoA/ROCK 信号通路被称为肌动蛋白细胞骨架的调节器,也是细胞形态异质性的调节器^[8]。在神经发育过程中,Rho/ROCK 信号通路参与轴突生长及轴突生长抑制因子到生长锥的肌动蛋白细胞骨架信号换能过程^[9,10],在传导髓磷脂相关抑制因子引起肌动蛋白细胞骨架重组、生长锥塌陷及抑制神经突起延伸过程中起着关键作用,已成为神经损伤发生的重要病理机制^[11]。激活后的 RhoA/ROCK2 可以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、细胞周期的调节等,在中枢神经系统中参与调节突触可塑性,而抑制 Rho/ROCK 信号通路可促进轴突再生及神经功能恢复^[12]。

肌球蛋白轻链(myosin light chain,MLC)是 Rho 激酶(ROCK2)下游底物之一,其表达与突触再生密切相关。细胞内的 MLC 磷酸化水平对调节突出再生起到重要作用,在肌球蛋白轻链激酶和肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase,MLCP)双重调节下,MLC 发生磷酸化和去磷酸化的相互转化^[13]。

研究已证实,过表达的 MLC 可增加与肌动蛋白丝交联产生的收缩力,最终造成细胞骨架的重排和轴突生长的抑制,导致生长锥塌陷、回缩,抑制轴突生长^[12]。抑制 Rho/ROCK 通路可减少 MLCP 的肌球蛋白结合亚单位,降低 MLCP 的磷酸酶活性,减少 MLC 磷酸基团的水解;换言之,抑制 RhoA/ROCK2 可改善细胞骨架重排、促进轴突生长,这可能成为治疗 VaD 的新靶标。因此,本研究通过检测 VaD 大鼠海马 RhoA/ROCK2 通路及下游 MLC、MLCP 的表达情况,证实沉默 ROCK2 表达可导致海马组织中 RhoA、ROCK2、MLC、MLCP 的表达显著下调,从而起到神经保护作用。国内陈玲丽通过制作氟致小鼠智力损伤模型,得出相似的研究结果^[14]。

通过本实验研究,我们认为具有较高的安全性、低免疫原性、可持续表达等特性腺相关病毒(AAV)载体^[15]转染的 ROCK2 抑制剂可能通过抑制 Rho/ROCK 信号通路及其下游分子的传导,进一步促进轴突的生长及神经元的修复,从而改善智能,其机制值得进一步探索。

[参考文献]

- [1] Yuan M,Zhu H,Chen J,et al. A novel squaramide compound alleviates cognitive deficits through activation of Akt and Erk1/2 in a rat model of vascular dementia[J]. *J Integr Neurosci*,2019,18(4):401-408.
- [2] 唐 慧,白 雪,李双阳. 基于玄府气血理论研究风药组方对血管性痴呆大鼠海马突触兴奋性氨基酸受体的影响[J]. *亚太传统医药*,2021,17(3):23-28.
- [3] 于文涛,赵润生,高维娟,等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠海马马脑源性神经生长因子介导的 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. *中药药理与临床*,2018,34(3):141-146.
- [4] Ding BJ, Ma WW. Soybean isoflavone alleviates β -amyloid 1-42 induced inflammatory response to improve learning and memory ability by down regulation of Toll-like receptor 4 expression and nuclear factor- κ B activity in rats[J]. *Int J Dev Neurosci*,2011,29(5):537-542.
- [5] Hensel N, Rademacher S, Claus P. Chatting with the neighbors: crosstalk between Rho-kinase(ROCK) and other signaling pathways for treatment of neurological disorders[J]. *Front Neurosci*,2015,9:198-227.
- [6] 裴海艳,万 君,崔 洁,等. Rho/ROCK 信号通路在阿尔茨海默病中的研究进展[J]. *海南医学*,2019,30(9):1187-1189.
- [7] Zhang ZH, Shi GX, Li QQ, et al. Comparison of cognitive performance between two rat models of vascular dementia[J]. *Int J Neurosci*,2014,124(11):818-823.
- [8] Stankiewicz TR, Linseman DA. Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*,2014,8:314-327.
- [9] Kozlov S, Afonin A, Evsyukov I, et al. Alzheimer's disease: as it was in the beginning[J]. *Rev Neurosci*,2017,28(8):825-843.
- [10] Hottman DA, Li L. Protein prenylation and synaptic plasticity: implications for Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*,2014,50(1):177-185.
- [11] 张昆仑,李丽敏,赵迎春. Rho 激酶及其抑制剂在缺血性脑血管病的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*,2016,43(4):350-353.
- [12] 鄢圣娟,王兆薇,田 亮,等. 异丙酚介导的 RhoA/ROCK2 信号通路对脑缺血再灌注后神经炎症、细胞凋亡和脑梗死的作用[J]. *卒中与神经疾病*,2021,28(1):14-19.
- [13] 杨 洋,陶 涛,付 洁,等. 米诺环素促进 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧后神经生长及机制研究[J]. *重庆医学*,2018,48(22):2909-2912.
- [14] 陈玲丽. RhoA/ROCK 信号通路在氟致小鼠智力损伤中的作用及其机制[D]. 山西农业大学,2018.
- [15] 杨 帆,杨 艳,王晓亮,等. 不同血清型腺相关病毒在大鼠 DRG 神经元转染效果的比较[J]. *实验动物科学*,2020,37(6):66-69.