

## 脑白质损伤新生大鼠脑白质 P75NTR 蛋白 与 RhoA mRNA 的表达及意义

李德渊, 陈娟, 石晶, 李晋辉, 姚裕家

(四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 最近研究发现 NgR-P75NTR- RhoA 信号通路在神经损伤和重塑方面发挥关键作用,但其确切传导机制及在缺氧缺血后新生动物 P75NTR 对下游分子 RhoA 调控变化尚不清楚。该实验在建立新生大鼠缺氧缺血性脑白质损伤(WMD)模型基础上,观察 WMD 新生大鼠脑白质 P75NTR 和 RhoA mRNA 表达变化,探讨 WMD 时两者的关系及意义,为临床治疗早产儿 WMD 提供新思路 and 实验依据。**方法** 制备新生大鼠 WMD 模型,光镜及电镜观察脑组织形态学改变。应用免疫组织化学方法及荧光定量 RT-PCR 检测对照组及 WMD 12, 24, 48, 72 h 和 7 d 组病变侧脑白质 P75NTR 蛋白及 RhoA mRNA 表达变化。**结果** 光镜和电镜形态学发现 WMD 组缺氧缺血 48 h 后即有显著的脑室周围脑白质损伤。WMD 组大鼠纹状体和胼胝体 P75NTR 蛋白水平 12 h 开始升高,48 h 达峰值,至 72 h 略有下降,与对照组比较差异有显著性,均  $P < 0.01$ ,之后下降明显,第 7 天与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。WMD 组大鼠脑白质 RhoA mRNA 表达 12 h 开始升高,48 h 达到峰值,与对照组比较,差异有显著性,均  $P < 0.05$ 。72 h 仍高于对照组水平,之后开始下降,第 7 天与对照组比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。**结论** WMD 新生大鼠脑白质中 P75NTR 蛋白水平呈现先上升后下降的趋势。其升高与介导神经细胞凋亡和抑制神经轴突再生可能有关,表达下降则与缺氧缺血性损伤加重神经细胞坏死相关。RhoA mRNA 的表达变化趋势与 P75NTR 一致,提示 P75NTR 水平升高可促使 RhoA mRNA 高表达。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(4):317-320]

**[关键词]** 缺氧缺血;脑白质损伤;P75NTR;RhoA;新生大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0317-04

### Expression of P75NTR protein and RhoA mRNA in the brain of neonatal rats with white matter damage

LI De-Yuan, CHEN Juan, SHI Jing, LI Jin-Hui, YAO Yu-Jia. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Chen J, Email: chenjuan2000@163.com)

**Abstract: Objective** Recent studies have indicated that the signal pathway of NgR-P75NTR- RhoA plays a key role in nerve injury and remodeling, but its exact mechanism and the role of the downstream molecule RhoA regulated by P75NTR remain unclear in hypoxia-ischemia (HI) neonatal animals. The present study was designed to assess the expression of P75NTR protein and RhoA mRNA in neonatal white matter and to investigate their relationship in newborn rats with white matter damage (WMD). **Methods** The rat WMD model was established by the ligation of right common carotid artery, followed by 6% hypoxia exposure for 4 hrs. The control group was sham-operated, without HI treatment. The histological changes of brain tissue were observed under light and electron microscopes. Expression of P75NTR protein and RhoA mRNA in the brain white matter after 12, 24, 48 and 72 hrs and 7 days of HI were detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results** Periventricular white matter damage was observed by 48 hrs of HI. Expression of P75NTR protein increased in the striatum and callosum zones at 12 hrs, peaked at 48 hrs, and remained at a higher level than control until 72 hrs of HI in the WMD group ( $P < 0.01$ ). After 7 days of HI expression of P75NTR protein was no longer statistically different from controls. The RhoA mRNA was higher in the WMD group for the first 72 hrs and then declined to control values. **Conclusions** Increased P75NTR protein might mediate apoptosis of nerve cells and inhibit the regeneration of neuron axons. The subsequent decline back to control value may be correlated with the aggregation of necrosis of nerve cells after HI. The patterns of RhoA mRNA expression were consistent with those of P75NTR protein, suggesting that the increased P75NTR level may promote RhoA mRNA expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(4):317-320]

**Key words:** Hypoxia-ischemia; White matter damage; P75NTR; RhoA; Neonatal rats

[收稿日期]2007-02-10; [修回日期]2007-03-23

[作者简介]李德渊,男,在读博士研究生,主治医师。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯作者]陈娟,女,博士,副教授,四川大学华西第二医院新生儿科,邮编:610041。

脑白质损伤(white matter damage, WMD)是早产儿神经系统远期后遗症的主要原因之一,而神经细胞生长锥的崩溃和异常出芽,导致神经细胞间正常连接的破坏和异常连接的出现,是WMD早产儿神经系统远期后遗症的基本神经病理学改变<sup>[1]</sup>。最近研究发现 NgR-P75NTR-RhoA 信号通路在神经元生长锥调控中起着关键性作用,已成为当前研究的新热点。目前该信号通路确切传导机制尚不清楚,但 P75NTR 起着关键作用,它调控分子开关 RhoA,进而影响神经损伤和重塑<sup>[2]</sup>。本研究在成功建立新生大鼠 WMD 动物模型基础上,采用免疫组化和荧光定量 RT-PCR 方法检测 WMD 新生大鼠脑组织 P75NTR 蛋白和 RhoA mRNA 表达变化,探讨两者的相互关系及在中枢神经损伤后抑制轴突再生的机制,为临床治疗 WMD 提供新思路 and 实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

120 只 2 d 新生 SD 大鼠,雌雄不限,动物随机分为 12, 24, 48, 72 h 和 7 d 对照组及 WMD 组,每组动物 12 只用于实验。

### 1.2 动物模型制备和取材

参照 Back 等<sup>[3]</sup>方法,将 2 d 新生大鼠行颈正中切口,分离并结扎右侧颈总动脉,缝合切口恢复 1 h,然后置于含 6% 氧气和 94% 氮气混合气的缺氧舱中 4 h(流量 2 L/min),再放回常氧母鼠笼中饲养。对照组仅分离右侧颈总动脉,不结扎,亦不作低氧处理。分别于缺氧后 12, 24, 48, 72 h 和 7 d 处死对照组及 WMD 组动物,取脑组织固定,切取侧脑室周围胼胝体、纹状体区用于 P75NTR 免疫组化染色及苏木精-伊红染色、电镜观察。用于荧光定量 RT-PCR 只需分离结扎侧脑白质,存于液氮中,留备 RNA 提取。

### 1.3 免疫组织化学法测定 P75NTR 水平

按照 P75NTR 免疫组化染色说明,切片脱蜡水化、室温孵育、抗原修复、羊血清封闭、滴加 1:500 P75NTR(购自 UP STATE 公司)一抗、滴加生物素化羊抗兔 IgG 室温孵育、滴加 SABC 试剂、DAB 显色、苏木精复染。阴性对照片除用 3% 正常羊血清替代一抗外,余步骤相同。每张切片于同一部位随机取 2 个视野采图,棕黄色为阳性表达,Image pro plus 4.5 图像分析软件对图像进行分析,阳性结果选择积分光密度(IOD)作为参数进行统计分析。

### 1.4 荧光定量 RT-PCR 测定 RhoA 表达水平

将制备好的右侧脑白质按 TRIzol 说明书操作抽提总 RNA。2  $\mu$ g 总 RNA 用于逆转录反应,反应体系 20  $\mu$ L,包括 Oligo(dT)18 primer、H<sub>2</sub>O 5  $\times$  buffer、Nasin Inhibitor、10mM dNTP mix、AMV 等离心混匀后 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,70 $^{\circ}$ C 加热 10 min 后结束反应,冰上冷却后 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

RhoA 基因序列引物检索自 NCBI Genebank,上游引物:5'-AATGTGCCCATCATCCTAGTT-3'(128 bp),下游引物:5'-TGTTTGCCATATCTCTGCCTT-3',扩增产物长度为 128 bp。内参 Beta-actin 上游引物:5'-GCCAACACAGTGCTGTCT-3',下游引物:5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。PCR 反应体系 30  $\mu$ L,包括 Taq 酶、RhoA 及 Beta-actin 上下游引物、SYBER Green-I 染料及 cDNA 模板等。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,45 个循环。扩增反应结束后,绘制各反应管扩增动力学曲线,确定扩增循环数 Ct 值,以  $\beta$ -actin 作标准校正,计算产物相对量。mRNA 的相对含量根据公式 Fold change =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\beta\text{-actin})$  and  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{treated}) - \Delta Ct(\text{untreated})$  计算。

### 1.5 统计学分析

免疫组化 IOD 数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计学方法采用 *t* 检验和单因素方差分析 *q* 检验, LSD 法比较各 WMD 组两两间差异。荧光定量 RT-PCR 统计以相对含量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  作为参数,以中位数  $M(P_{50})$  表示,行秩和检验,分析工具为 SPSS10.0 软件包。

## 2 结果

### 2.1 光镜所见

各时间点对照组纹状体和胼胝体细胞无明显变化。WMD 组随缺氧时间延长,病理改变越重。HI 后 12 h, WMD 组侧脑室旁纹状体区细胞出现水肿; 48 h 出现核固缩、胼胝体细胞稀疏; 72 h 可见侧脑室旁白质呈筛网状坏死; 7 d 可见侧脑室旁白质出现疏松、液化灶。见图 1A, B。

### 2.2 电镜所见

对照组少突胶质细胞结构正常。WMD 组缺氧缺血后 12 h 可见少突胶质细胞线粒体肿胀明显、线粒体嵴减少; 48 h 可见少突胶质细胞凋亡,细胞核染色体边集,核膜完整,突起减少; 72 h 可见少突胶质细胞坏死,染色质分布不均,胞浆空,核糖体消失。

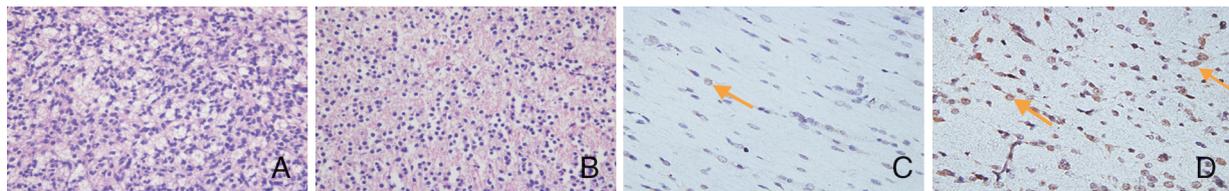


图1 对照组、WMD组纹状体细胞48 h改变(A,B 苏木精-伊红染色×400倍)。A:对照组细胞排列有序,细胞胞核大,胞浆少;B:WMD组细胞排列紊乱、核固缩。(C,D P75NTR 免疫组化染色×400倍)。C:少量免疫阳性细胞表达(如黄色箭头所指),胞浆着色浅;D:WMD组大量免疫阳性细胞表达(如黄色箭头所指),棕黄色细腻颗粒弥漫分布在胞浆内,少部分位于胞核,胞核浓缩深染。

### 2.3 免疫组化染色结果

对照组各时间点纹状体、胼胝体区有 P75NTR 蛋白的少量表达。HI 后 12 h, 右侧大脑纹状体、胼胝体区阳性细胞表达增加, 48 h 达高峰, 可见大量免疫阳性细胞表达, 棕黄色细腻颗粒弥漫分布在胞浆内, 少部分位于胞核, 着色深, 细胞失去正常形态

见图 1C,D。随之蛋白表达开始下降, 至脑损伤后 72 h 仍保持较高水平, 以上各组 IOD 值与对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。脑损伤后 7 d 与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 1, 图 2)。

表 1 纹状体与胼胝体 P75NTR 免疫组化图像 IOD 值分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

时段	纹状体		t	P	胼胝体		t	P
	对照组	WMD 组			对照组	WMD 组		
12 h	42.61 ± 4.42	110.83 ± 14.01 <sup>a</sup>	19.71	<0.01	42.17 ± 4.62	100.72 ± 12.86 <sup>a</sup>	18.19	<0.01
24 h	41.83 ± 4.34	166.39 ± 12.17 <sup>a</sup>	40.91	<0.01	42.00 ± 5.17	152.11 ± 10.37 <sup>a</sup>	40.32	<0.01
48 h	41.78 ± 5.39	439.33 ± 43.42 <sup>a</sup>	38.55	<0.01	41.44 ± 4.46	395.17 ± 27.45 <sup>a</sup>	53.96	<0.01
72 h	42.94 ± 6.74	270.22 ± 33.69 <sup>a</sup>	28.06	<0.01	41.67 ± 4.90	246.78 ± 32.21 <sup>a</sup>	26.71	<0.01
7 d	41.39 ± 5.53	44.17 ± 3.94	1.74	>0.05	40.56 ± 3.91	43.06 ± 5.87	1.50	>0.05

a 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; WMD 各组间两两比较均  $P < 0.01$

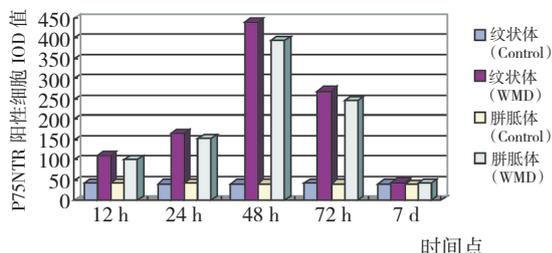


图 2 纹状体与胼胝体 P75NTR IOD 值变化

### 2.4 荧光定量 RT-PCR 结果

各组在 128 bp 位置出现一条电泳条带与待测基因片段长度符合, 证实产物为 RhoA 基因。WMD 组 12, 24, 48, 72 h RhoA mRNA 扩增产物相对含量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  均较对照组升高, 均  $P < 0.05$ , 而 7 d 与对照组之间无统计学差异,  $P > 0.05$ 。WMD 各组间 RhoA mRNA 相对含量两两比较, 差异有统计学意义, 均  $P < 0.05$ , (见表 2)。

表 2 不同时段 RhoAmRNA 相对表达量与对照组比较 ( $M/P_{50}$ )

分组	n	12 h	24 h	48 h	72 h	7 d
对照组	6	0.300	0.375	0.375	0.530	0.500
WMD	6	1.205 <sup>a</sup>	2.415 <sup>a</sup>	4.830 <sup>a</sup>	1.500 <sup>a</sup>	0.500
Z		-2.169	-2.508	-2.923	-2.500	-0.574
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

a WMD 各组间两两比较  $P < 0.05$

## 3 讨论

本实验借鉴 Back 等<sup>[3]</sup>动物模型进行研究, 在建立 2 d SD 大鼠 WMD 动物模型基础上, 探讨 WMD 新生大鼠脑白质 P75NTR 蛋白和 Rho-AmRNA 表达变化。WMD 的主要原因是缺氧缺血性脑损伤, 而缺氧缺血后诸多机制所致的神经细胞生长锥崩溃和异常出芽, 是 WMD 早产儿神经系统远期后遗症的基本神经病理改变。NgR-P75NTR-RhoA 信号传导通路对维持神经细胞生长锥的正常形态和功能, 起着十分重要的作用。作为 NgR 共受体, 神经营养素低亲和力受体 P75NTR 传递中枢神经系统产生的髓磷脂生长抑制体 (MBGIs) 的生长抑制信号到胞内, 并作用于下游 RhoA 这一分子信号开关, 通过一系列胞内信号传导最终作用于细胞骨架蛋白 F-actin 从细胞膜表面特定位点脱落, 导致生长锥塌陷和崩溃以及新的、异常的伪足出现, 产生神经元间的异常连接<sup>[4,5]</sup>。

既往研究表明, P75NTR 在中枢神经系统发育阶段广泛表达, 而生后表达明显减少, P75NTR 表达与神经元生理或表型关系到目前还没有明确, 推测与 CNS 发育过程中神经元选择性死亡有关<sup>[6]</sup>。

有文献报道<sup>[7]</sup>,成年大鼠急性前脑缺血早期(6 h)即可见到 P75NTR 阳性神经细胞表达增高,48 h 达到高峰,7 d 后基本恢复正常。亦有报道<sup>[8]</sup>,在体外实验中,成年大鼠海马 P75NTR 水平在短暂缺血后持续高表达。本实验通过建立 WMD 模型,采用免疫组化法检测 P75NTR 蛋白的表达变化,结果显示 P75NTR 蛋白在 HI 后 12 h 开始升高,48 h 达到峰值,72 h 开始下降,至第 7 天降至正常。这一趋势与文献报道有所不同,可能与动物发育不同阶段及试验的方法和检测途径不同有关。有关 CNS 损伤后 P75NTR 基因上调的机制报道甚少,可能与脑缺血后可引起许多即刻早期基因如 c-fos、c-jun 基因的过度表达,编码转录因子,引起一些后效基因表达增高有关<sup>[9,10]</sup>。诸多研究表明 P75NTR 的高表达与神经细胞的凋亡有密切关系,这在成年大鼠的实验中得到证实<sup>[11]</sup>。我们也注意到 P75NTR 的高表达时段在 HI 后 48 h,正是 WMD 少突胶质细胞凋亡的高峰时期,这在本研究的光镜及电镜形态学检查中亦得到证实。而随着 HI 时间的延长,少突胶质细胞和其他神经细胞的坏死加重,数量进一步减少,神经再生又受到抑制,与 P75NTR 表达减少有一定的关系。P75NTR 的高表达暗示缺氧缺血性脑损伤可能与神经营养素受体的信号传导不平衡有关,P75NTR 与某些毒性蛋白结合能抑制细胞死亡和加速轴突延伸,这将为开发新药提供新的药物靶位。

本实验亦对新生鼠 HI 后 P75NTR 下游信号分子 RhoA 这一细胞肌动蛋白细胞骨架的重要调节因子表达变化进行了研究。结果显示 HI 后 12 h RhoA mRNA 开始升高,48 h 达到峰值,72 h 开始下降,但仍高于对照组水平,至第 7 天降至正常。与成年动物脊柱损伤相比,后者 24 h 后才出现 RhoA 活性增高<sup>[12]</sup>。本实验缺氧缺血新生动物 RhoA 表达变化出现早,持续时间更长,这可能与新生动物的神经元及少突胶质细胞发育不完善,对缺氧缺血损伤更为敏感有关。RhoA 在 HI 后表达变化与 P75NTR 的变化一致,据此我们推测 RhoA 活化可能与 P75NTR 的高表达有关。正如 Dubreuil 等<sup>[13]</sup>报道,脊髓损伤后,神经胶质细胞和神经元 RhoA 的活化依赖于 P75NTR。在 P75NTR 基因敲除(P75NTR -/-)神经元生长锥中 RhoA 活性和它的 P75 +/+ 同类相比,其生长锥的 GST-RBD 着色减少了 32%。也有报道急性脑损伤后 P75NTR 基因敲除动物 RhoA 活性直到 72 h 之后出现增高,均证实了 P75NTR 在调控 RhoA 活性中的重要作用<sup>[14]</sup>。但缺氧缺血性脑损伤后引起 RhoA 表达升高的具体机制还有待进一

步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Back SA. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms[J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2006, 12(2): 129-140.
- [2] Domeniconi M, Filbin MT. Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration[J]. Neurol Sci, 2005, 233(12): 43-47.
- [3] Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia[J]. J Neurosci, 2002, 22(2): 455-463.
- [4] Yamashita T, Fujitani M, Hata K. Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor[J]. Anatom Sci Int, 2005, 80(1): 37-41.
- [5] Ahmed Z, Dent RG, Suggate EL, Barrett LB, Seabright RJ, Berry M, et al. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 28(3): 509-523.
- [6] Kokaia Z, Andberg G, Martinez-Serrano A, Lindvall O. Focal cerebral ischemia in rats induces expression of P75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons[J]. J Neurosci, 1998, 84(4): 1113-1125.
- [7] Greferath U, Mallard C, Roufail E, Rees SM, Barrett GL, Bartlett PF. Expression of the p75 neurotrophin receptor by striatal cholinergic neurons following global ischemia in rats is associated with neuronal degeneration[J]. Neurosci Lett, 2002, 332(1): 57-60.
- [8] Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, Salehi AH, Becker EB, Said F, et al. Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad5[J]. J Neurosci, 2003, 23(36): 11373-11381.
- [9] Becker EB, Howell J, Kodama Y, Barker PA, Bonni A. Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis[J]. J Neurosci, 2004, 24(40): 8762-8770.
- [10] Dhanoa NK, Krol KM, Jahed A, Crutcher KA, Kawaja MD. Null mutations for exon III and exon IV of the p75 neurotrophin receptor gene enhance sympathetic sprouting in response to elevated levels of nerve growth factor in transgenic mice[J]. Exp Neurol, 2006, 198(2): 416-426.
- [11] Paul CE, Vereker E, Dickson KM, Barker PA. A pro-apoptotic fragment of the p75 neurotrophin receptor is expressed in p75NTR ExonIV null mice[J]. J Neurosci, 2004, 24(8): 1917-1923.
- [12] Madura T, Yamashita T, Kubo T, Fujitani M, Hosokawa K, Tohyama M. Activation of Rho in the injured axons following spinal cord injury[J]. EMBO Reports, 2004, 5(4): 412-417.
- [13] Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system[J]. J Cell Biol, 2003, 162(2): 233-243.
- [14] Gehler S, Gallo G, Veien E, Letourneau PC. p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity[J]. J Neurosci, 2004, 24(18): 4363-4372.

(本文编辑:吉耕中)