doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.11.021

论著·实验研究

产前补充牛磺酸调节 Rho 家族因子活性促进生长受限新生大鼠神经干细胞增殖的研究

李翔文[1,2] 李芳[1] 刘敬[1,2] 王燕[2] 付薇[2]

（1. 锦州医科大学火箭军总医院新生儿科，北京 100088；
2. 解放军陆军总医院八一儿童医院新生儿重症监护中心，北京 100700）

［摘要］ **目的** 探讨产前补充牛磺酸通过调节 Rho 家族因子活性促进生长受限（FGR）新生大鼠神经干细胞增殖的可能性，为产前补充牛磺酸促进生长受限患儿脑发育提供实验依据。**方法** 将 24 只 Sprague-Dawley 孕鼠随机分为对照组、FGR 组、牛磺酸组（n=8），通过全程饥饿法建立 FGR 模型。采用逆转录－聚合酶链反应法、免疫组化及免疫印迹法检测各组新生鼠脑组织神经干细胞特异性胞内标记物脂肪酸结合蛋白 7（FABP7）、Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶 2（ROCK2）、ras 同源基因家族成员 A（RhoA）、Ras 相关的 C3 肉毒素底物（rac）表达水平。**结果** FGR 组 FABP7 阳性细胞 OD 值、FABP7 mRNA 及蛋白的表达低于对照组，牛磺酸组 FABP7 阳性细胞 OD 值、FABP7 mRNA 及蛋白的表达高于 FGR 组（P<0.05）。FGR 组中 RhoA、ROCK2 mRNA 的表达高于对照组，牛磺酸组中 RhoA、ROCK2 mRNA 表达高于对照组但低于 FGR 组（P<0.05）；FGR 组中 rac mRNA 的表达低于对照组，牛磺酸组中 rac mRNA 表达高于 FGR 组及对照组（P<0.05）；FGR 组中 RhoA、ROCK2 蛋白表达水平高于对照组，牛磺酸组中 RhoA、ROCK2 蛋白表达水平低于 FGR 组（P<0.05）。**结论** 产前补充牛磺酸可促进 FGR 新生大鼠神经干细胞增殖，其机制可能与调控 Rho 家族因子的活性有关。

［中国当代儿科杂志，2016，18（11）：1158-1165］

［关键词］ 牛磺酸；胎儿生长受限；神经干细胞；Rho 家族因子；大鼠

Effect of antepartum taurine supplementation in regulating the activity of Rho family factors and promoting the proliferation of neural stem cells in neonatal rats with fetal growth restriction

LI Xiang-Wen, LI Fang, LIU Jing, WANG Yan, FU Wei. Department of Neonatology, Rocket Army General Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Jinzhou Medical University, Beijing 100700, China (Liu J, Email: liujingbj@sina.com)

Abstract: Objective To study the possible effect of antepartum taurine supplementation in regulating the activity of Rho family factors and promoting the proliferation of neural stem cells in neonatal rats with fetal growth restriction (FGR), and to provide a basis for antepartum taurine supplementation to promote brain development in children with FGR. **Methods** A total of 24 pregnant Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: control, FGR, and taurine (n=8 each). A rat model of FGR was established by food restriction throughout pregnancy. RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blot were used to measure the expression of the specific intracellular markers for neural stem cells fatty acid binding protein 7 (FABP7), Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2), ras homolog gene family, member A (RhoA), and Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac). **Results** The FGR group had significantly lower OD value of FABP7-positive cells and mRNA and protein expression of FABP7 than the control group, and the taurine group had significantly higher OD value of FABP7-positive cells and mRNA and protein expression of FABP7 than the FGR group (P<0.05). The FGR group had significantly higher mRNA expression of RhoA and ROCK2 than the control group. The taurine group had significantly higher mRNA expression of RhoA and ROCK2

［收稿日期］2016-05-28；［接受日期］2016-07-19
［基金项目］国家自然科学基金资助项目（81471087）。
［作者简介］李翔文，女，硕士研究生，住院医师。
［通信作者］刘敬，男，主任医师，教授。

than the control group and significantly lower expression than the FGR group (P<0.05). The FGR group had significantly lower mRNA expression of Rac than the control group. The taurine group had significantly higher mRNA expression of Rac than the FGR and control groups (P<0.05). The FGR group had significantly higher protein expression of RhoA and ROCK2 than the control group. The taurine group had significantly lower protein expression of RhoA and ROCK2 than the FGR group (P<0.05). **Conclusions** Antepartum taurine supplementation can promote the proliferation of neural stem cells in rats with FGR, and its mechanism may be related to the regulation of the activity of Rho family factors.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(11): 1158-1165]

Key words: Taurine; Fetal growth restriction; Neural stem cell; Rho family factor; Rats

胎儿生长受限（fetal growth restriction, FGR）是指出生体重小于同胎龄新生儿出生体重的百分之十的新生儿，生后容易出现短期和长期的神经发育障碍，主要缺陷表现在记忆、识别、视觉空间感知、行为以及注意力等方面。由于 FGR 患儿神经发育缺陷会对个人生活质量产生深刻影响，因此也受到了越来越多的关注[1-2]。相关研究表明，FGR 可能导致大脑神经干细胞表达以及分化发生改变，FGR 患儿在出生时，由于海马神经元、星形胶质细胞跟未成熟的少突胶质细胞的比例发生了改变，从而导致缺陷的发生[3-4]。牛磺酸是胎儿和新生儿必须氨基酸，本课题组前期研究显示，牛磺酸能够抑制脑细胞凋亡、促进神经干细胞增殖；激活蛋白激酶 A-cAMP 反应元件结合蛋白（protein kinase A-cAMP response element binding protein signal pathway, PKA/CREB）通路及抑制 Ras 同源基因 /Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶（Ras homolog gene/a Rho-associated coiled coil-forming proteinkinase, Rho/ROCK）通路促进 FGR 新生鼠脑发育及脑保护作用[5-7]，但是能否通过 Rho 家族因子促进神经干细胞的增殖尚不明确。为此，本研究拟通过全程饥饿方法建立 FGR 模型，探讨产前补充牛磺酸是否能够通过调节 Rho 家族因子活性而促进 FGR 新生鼠神经干细胞的增殖，为产前补充牛磺酸促进 FGR 胎儿脑发育提供进一步的理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

牛磺酸颗粒（北京奥博星生物有限公司）；兔抗脂肪酸结合蛋白 7（fatty acid binding protein 7, FABP7）、ROCK2、Ras 同源基因家族成员 A（Ras homolog gene family member A, RhoA）、β-actin 抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔多克隆抗体（abcam 公司，美国）；即用型 SABC-POD（山羊 IgG）试剂盒及二氨基联苯胺（diaminobenzi-dine, DAB）显色试剂盒（黄）（武汉博士德生物工程有限公司）；蛋白质 marker（Thermo 科技有限公司，立陶宛）；RIPA 裂解液、PMSF（南京碧云天公司）；反转录试剂盒（Fermentas 公司，立陶宛）；PV-9000 免疫组织化学染色试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司）；2SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 试剂（TOYOBO 生物公司，日本）；显微镜（尼康公司，日本）；病理切片机（Leica 公司，德国）；凝胶成像分析系统（BIV-RAD 公司，美国）、超速低温离心机（Sigma 公司，美国）。

1.2　实验动物分组与模型建立

健康成年 Sprague-Dawley（SD）大鼠，雌性 24 只，雄性 12 只，体重 250~300 g，予标准大鼠颗粒饲料和充足饮水喂养（动物与饲料均购于解放军医学院实验动物中心）。每晚将雌雄大鼠以 2∶1 合笼，次日晨取阴道分泌物镜检，以发现精子之日为妊娠第 0 天，受孕后随机分为对照组、FGR 组和牛磺酸组，每组 8 只孕鼠。对照组妊娠期摄取足够饲料，记录当日消耗饲料重量。参考文献[8-9]通过全程饥饿法建立 FGR 模型。牛磺酸组自建立模型一周后开始在孕鼠饲料中添加牛磺酸 [每日 300 mg/kg]，直至自然分娩。FGR 的判断标准：各组孕鼠自然分娩后，电子天平称量新生鼠体重，精确到 0.01 g，以低于对照组新生鼠平均体重的 2 个标准差定义为 FGR。

1.3　取材

每组新生鼠生后立即称体重及脑重。各组用随机数字表法抽取 10 只新生鼠，将其脑组织完整固定于 4% 多聚甲醛 4℃过夜，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，行厚约 4 μm 冠状面连续切片用于免疫组化法。同时，各组随机选取 6 只新生鼠大脑组织置于 –80℃下冻存，用于逆转录 – 聚合酶链反应（RT-PCR）及蛋白免疫印迹（Western

blot）检测。

1.4 RT-PCR 检测 FABP7、RhoA、ROCK2、rac mRNA 表达

每组每只新生鼠取大脑组织约 100 mg 裂解，提取纯化总 RNA，用 273BR02588 型核酸蛋白分析仪（BIO-RAD）进行定量，按照试剂盒说明书（Promega, A3500）进行逆转录操作。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物，经基因库检索验证且与其他基因无高度同源性，由上海生工生物技术工程公司合成，引物序列见表 1。PCR 反应体系（20 μL）：2×SG Green qPCR 混合液 10 μL、正向引物 0.4 μL、反向引物 0.4 μL、荧光染料 0.4 μL、脱氧核糖核酸 1 μL、蒸馏水 7.8 μL。PCR 反应条件：95℃预变性 10 min；95℃变性 15 s，不同退火温度[RhoA 60℃、FABP7 60℃、ras 相关的 C3 肉毒素底物（ras-related C3 botulinum toxin substrate, rac）56℃、ROCK2 50℃，GAPDH 52℃]退火 30 s，72℃延伸 32 s，40 个循环。以各组新生鼠脑组织 FABP7、ROCK2、RhoA、rac mRNA 扩增产物的积分吸光度值与 GAPDH 的比值作为 FABP7、RhoA、ROCK2、rac mRNA 的表达水平。

表 1 引物序列

关键分子名称	上下游引物	产物长度	退火温度
RhoA	F: 5'-CTGGTGATTGTTGGTGATGG-3' R: 5'-TACCTGCTTCCCGTCCACT-3'	138 bp	60℃
ROCK2	F: 5'-GGGTTAGTCGGTTGGTGAAA-3' R: 5'-GGTTTGTTTGGAGCAAGCTG-3'	142 bp	50℃
rac	F :5'-ACTCATTCCAGACCCACGAC-3' R: 5'-ACACAATCTCCGCACCGTA-3'	132 bp	56℃
FABP7	F: 5'-AGAAGTGGGATGGCAAAGAA-3' R: 5'-TAACAGCGAACAGCAACGAC-3'	100 bp	60℃
GAPDH	F: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' R: 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	349 bp	52℃

注：[RhoA] Ras 同源基因家族成员 A；[ROCK2] Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶 2；[rac] ras 相关的 C3 肉毒素底物；[FABP7] 脂肪酸结合蛋白 7。

1.5 Western blot 法检测 FABP7、RhoA、ROCK2 表达

每组每只新生鼠取大脑组织约 0.2 g，液氮研磨，加入细胞裂解液 0.5 mL 提取总蛋白，提取前加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂。4℃ 15 300 转/min 离心 30 min。取 2 μL 蛋白粗提液，Bradford 方法蛋白定量。配胶上样、电泳，无蛋白快速封闭液封闭；加入 FABP7、RhoA、ROCK2 抗体（1∶1 000）4℃过夜，之后加羊抗兔 HRP 标记 IgG 或羊抗小鼠 HRP 标记 IgG（1∶3 000）孵育 1 h，洗涤。ECL 发光液，暗室曝光检测 FABP7、RhoA、ROCK2 表达，扫描保存为 jpg 文件，进行灰度分析。FABP7、RhoA、ROCK2 灰度值除以内参 β-actin 的灰度值以校正误差，所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。

1.6 免疫组化法检测 FABP7 光密度值

每个大脑组织标本随机取 3 张切片，切片常规脱蜡入水，3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，高压锅高压抗原修复 3 min，3% 过氧化氢滴加于切片组织上以封闭内源性过氧化物酶，室温孵育 10 min；滴加小鼠抗 FABP7 单克隆抗体（1∶300），4 ℃孵育过夜；加入羊抗小鼠 IgG 37 ℃孵育 30 min；吸水纸吸干切片周围的液体后滴加辣根过氧化物酶复合物 37℃孵育 30 min。以上各步间均用 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次，每次 5 min；DAB 显色 15 s，苏木素复染 30 s 左右，水洗后用 1% 的盐酸酒精分化，再用 PBS 液水洗返蓝。梯度脱水、透明、中性树胶封片。FABP7 主要表达在细胞质中，呈棕褐色，目前被认为是神经干细胞最具特异性的胞内标记物。以 PBS 代替一抗作阴性对照。每张切片在侧脑室管膜下区（subventricularzone, SVZ）等相应部位随机取 10 个视野，于 400 倍光镜下观察阳性细胞分布并计数。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件包对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，

多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-q 检验；计数资料以百分率（%）表示，多组间比较采用卡方检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生鼠出生体重及脑重的比较

记录下对照组所有新生鼠的体重，以体重小于 5.6 g（小于对照组平均体重的两个标准差）定义为 FGR，对照组及 FGR 组中死胎及死产分别为 6 只及 2 只，新生鼠脑重中存在 8 个缺失值，进行缺失值处理。对照组共分娩新生鼠 67 只，死亡 6 只，FGR 发生率为 0；FGR 组共分娩新生鼠 65 只，其中 FGR 新生鼠 57 只，死亡 2 只，FGR 的发生率为 88%；牛磺酸组共分娩新生鼠 66 只，FGR 新生鼠 32 只，FGR 的发生率为 48%；成功建立 FGR 模型，且牛磺酸组 FGR 的发生率较 FGR 组明显下降（P<0.05）。对照组、FGR 组、牛磺酸组新生鼠之间的体重、脑重及脑重体重比差异有统计学意义（P<0.05）；FGR 组新生鼠体重、脑重明显低于对照组（P<0.05）；牛磺酸组新生鼠体重、脑重低于对照组（P<0.05），但高于 FGR 组（P<0.05）；FGR 组新生鼠脑重体重比高于对照组（P<0.05）；牛磺酸组新生鼠脑重体重比高于对照组及 FGR 组（P<0.05）。见表 2。

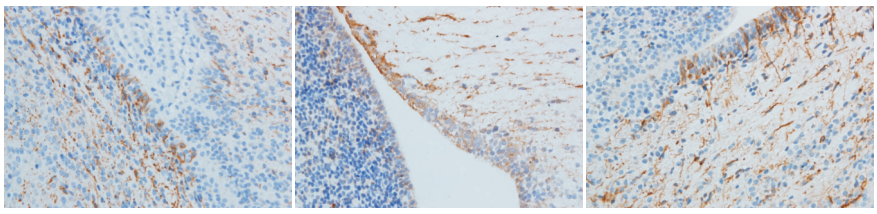
表 2 各组新生鼠一般情况比较

组别	鼠数（活产数 / 总产数）	脑重 (g, $\bar{x} \pm s$)	体重 (g, $\bar{x} \pm s$)	脑重体重比 ($\bar{x} \pm s$)	FGR 发生率 [例 (%)]
对照组	61/67	0.255 ± 0.032	6.9 ± 0.6	0.037 ± 0.004	0(0)
FGR 组	63/65	0.202 ± 0.018[a]	4.7 ± 0.7[a]	0.040 ± 0.004[a]	57(88)
牛磺酸组	66/66	0.233 ± 0.023[a,b]	5.7 ± 0.4[a,b]	0.041 ± 0.005[a,b]	32(48)
$F(\chi^2)$ 值		63.06	211.86	30.09	(103.03)*
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组相比，P<0.05；b 示与 FGR 组相比，P<0.05。* 示 FGR 组与牛磺酸组的比较结果。

2.2 免疫组化法检测各组新生鼠脑组织 SVZ 区 FABP7 的表达结果

对照组、FGR 组及牛磺酸组新生鼠脑组织 SVZ 区 FABP7 阳性细胞的 OD 值比较差异有统计学意义（P<0.05）。其中 FGR 组新生鼠脑组织中 FABP7 阳性细胞 OD 值低于对照组（P<0.05）；牛磺酸组 FABP7 阳性细胞 OD 值较 FGR 组及对照组均增高（P<0.05）。见图 1，表 3。



对照组　　FGR 组　　牛磺酸组

图 1 免疫组化法检测各组新生鼠脑组织 SVZ 区 FABP7 阳性细胞分布（DAB，×400）　A：对照组 SVZ 区可见密集分布的 FABP7 阳性细胞；B：FGR 组 SVZ 区可见散在分布的 FABP7 阳性细胞；C：牛磺酸组 SVZ 区可见最为密集分布的 FABP7 阳性细胞。FABP7 阳性表达主要位于细胞质中，呈棕褐色。

表 3　各组新生鼠脑组织中 FABP7 的表达比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	鼠数	FABP7 OD 值	FABP7 蛋白表达	FABP7 mRNA
对照组	6	19 153 ± 7 410	0.357 ± 0.034	1.5 ± 0.5
FGR 组	6	4 287 ± 3 272[a]	0.285 ± 0.028[a]	0.8 ± 0.3[a]
牛磺酸组	6	43 982 ± 22 115[a,b]	0.364 ± 0.045[b]	2.7 ± 0.5[a,b]
F 值		21.700	5.531	38.085
P 值		0.002	0.027	<0.001

注：a 示与对照组相比，*P*<0.05；b 示与 FGR 组相比，*P*<0.05。[FABP7] 脂肪酸结合蛋白 7。

2.3　RT-PCR 检测各组新生鼠脑组织中 FABP7 mRNA 表达结果

各组新生鼠脑组织中 FABP7 mRNA 表达差异有统计学意义（*P*<0.05）。其中 FGR 组新生鼠脑组织 FABP7 mRNA 表达较对照组降低（*P*<0.05）；补充牛磺酸后，牛磺酸组新生鼠脑组织 FABP7 mRNA 表达水平高于对照组及 FGR 组（*P*<0.05）。见表 3。

2.4　Western blot 检测各组新生鼠脑组织中 FABP7 蛋白的表达

各组新生鼠脑组织中 FABP7 蛋白表达结果差异有统计学意义（*P*<0.05）。其中 FGR 组 FABP7 蛋白表达量较对照组减少（*P*<0.05）；补充牛磺酸后，牛磺酸组中 FABP7 蛋白表达量较 FGR 组显著增加（*P*<0.05），但与对照组比较差异无统计学意义（*P*>0.05）。见图 2，表 3。

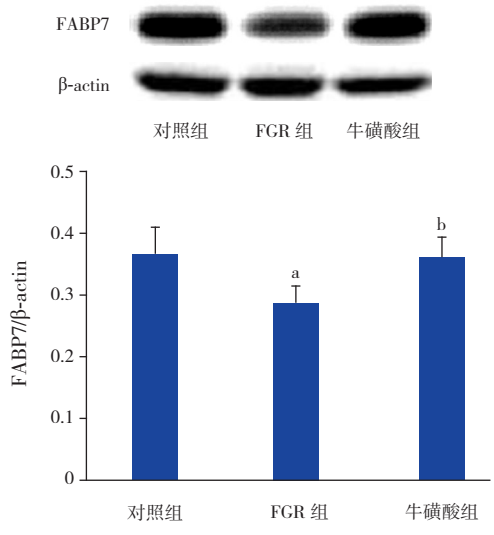


图 2　Western blot 检测各组新生鼠脑组织中 FABP7 蛋白表达水平变化　上图为各组 FABP7 蛋白电泳条带图；下图为各组 FABP7 蛋白表达水平统计图（*n*=6）。a 示与对照组相比，*P*<0.05；b 示与 FGR 组相比，*P*<0.05。

2.5　RT-PCR 检测各组新生鼠脑组织中 RhoA、ROCK2、rac mRNA 的表达结果

各组新生鼠脑组织 RhoA、ROCK2、rac mRNA 表达差异有统计学意义（*P*<0.05）。其中，FGR 组 RhoA、ROCK2 mRNA 表达较对照组明显增高（*P*<0.05）；予以补充牛磺酸后，新生鼠脑组织 RhoA、ROCK2 mRNA 低于 FGR 组，但仍高于对照组（*P*<0.05）。FGR 组中 rac mRNA 较对照组明显降低（*P*<0.05），予以补充牛磺酸后，新生鼠脑组织 rac mRNA 表达水平高于 FGR 组及对照组（*P*<0.05）。见表 4。

表 4　各组新生鼠脑组织 RhoA、ROCK2、rac mRNA 表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	鼠数	RhoA	ROCK2	rac
对照组	6	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.3	1.13 ± 0.24
FGR 组	6	2.8 ± 0.9[a]	9.4 ± 7.2[a]	0.95 ± 0.20[a]
牛磺酸组	6	1.5 ± 0.4[a,b]	2.1 ± 1.2[a,b]	1.46 ± 0.33[a,b]
F 值		25.407	11.027	8.190
P 值		<0.001	<0.001	0.002

注：a 示与对照组相比，*P*<0.05；b 示与 FGR 组相比，*P*<0.05。[RhoA] Ras 同源基因家族成员 A；[ROCK2] Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶 2；[rac] ras 相关的 C3 肉毒素底物。

2.6　Western blot 法检测各组新生鼠脑组织中 RhoA、ROCK2 蛋白的表达情况

各组新生鼠脑组织 RhoA、ROCK2 蛋白表达差异有统计学意义（*P*<0.05）。其中 FGR 组 RhoA、ROCK2 表达水平较对照组明显增高（*P*<0.05）；牛磺酸组新生鼠脑组织 RhoA、ROCK2 表达较 FGR 组降低（*P*<0.05），稍高于对照组，但差异无统计学意义（*P*>0.05）。见图 3，表 5。

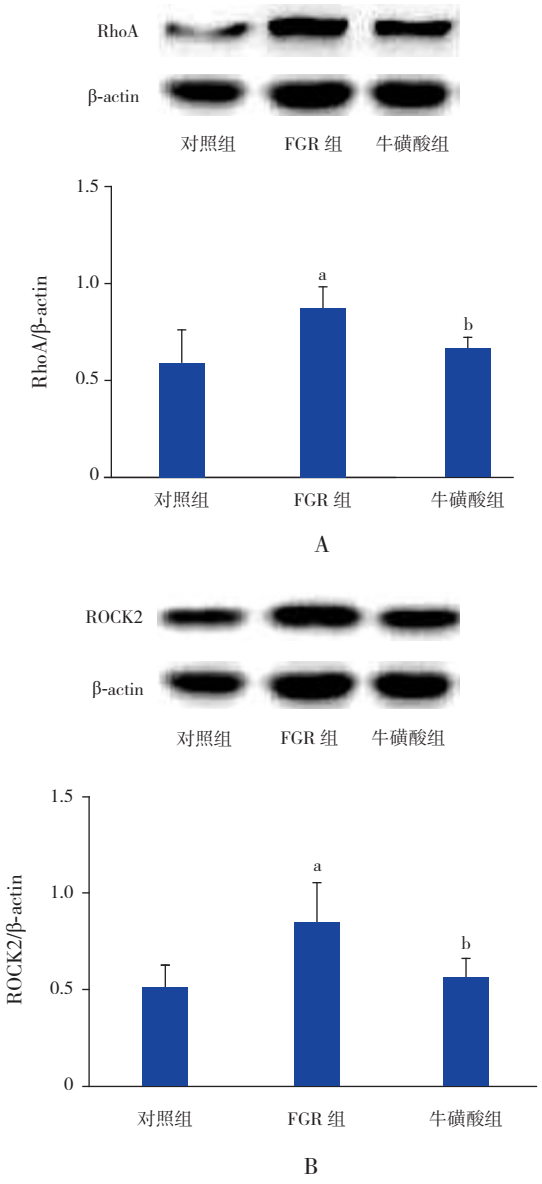


图 3　Western blot 检测各组新生鼠脑组织中 RhoA 和 ROCK2 的蛋白表达　A 图为各组 RhoA 蛋白电泳条带图及 RhoA 蛋白表达水平统计图（n=6）；B 图为各组 ROCK2 蛋白电泳条带图及 ROCK2 蛋白表达水平统计图（n=6）。a 示与对照组相比，P<0.05；b 示与 FGR 组相比，P<0.05。

表 5　各组新生鼠脑组织 RhoA 及 ROCK2 蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	鼠数	RhoA	ROCK2
对照组	6	0.60 ± 0.15	0.52 ± 0.09
FGR 组	6	0.86 ± 0.11[a]	0.84 ± 0.20[a]
牛磺酸组	6	0.65 ± 0.06[b]	0.55 ± 0.10[b]
F 值		10.432	10.082
P 值		0.001	0.001

注：a 示与对照组相比，P<0.05；b 示与 FGR 组相比，P<0.05。

3　讨论

FGR 患儿的围生期病死率较同期正常围生儿高 4~6 倍，且出生后常易发生新生儿窒息、低氧血症、胎粪吸入综合征、红细胞增多症、酸中毒、低血糖等。此外，FGR 最终会导致宫内生长受限患儿头部发育异常，最终导致神经发育异常[10-12]。本结果显示对照组新生鼠 FGR 发生率为 0；FGR 组新生鼠 FGR 发生率为 88%，提示建模成功。且补充牛磺酸后，FGR 发生率为 48%，表明牛磺酸能够减少 FGR 的发生。同时，FGR 组的脑重低于对照组，予以补充牛磺酸后，脑重明显增加；说明 FGR 的发生导致了新生鼠脑重的降低，产前补充牛磺酸能增加新生鼠脑重。同时 FGR 组脑重体重比高于对照组，补充牛磺酸后，脑重体重比高于对照组及 FGR 组，表明牛磺酸主要作用于 FGR 大脑，增加新生鼠脑重。目前，产前超声可以对胎儿体重、头围、头重以及头重体重比进行估算，宫内生长受限患儿的头部大小是产前预测宫内神经发育不良的独立参数。头重每降低一个标准差，其神经发育不良结局增加 10%，提示头重与神经的发育密切相关[12-13]。头重的降低可能介导了生长受限患儿胎盘功能障碍的发生，进一步导致体重下降[13]。本研究提示牛磺酸可降低新生鼠 FGR 的发生率，且主要表现为增加新生鼠脑重，从而降低其神经发育不良结局。

FABP7 阳性的细胞被认为是神经干细胞。FABP7 在哺乳动物的神经上皮细胞、脑室下区的放射状胶质细胞特异性表达，放射性胶质细胞在神经发生中具有导向作用，在大脑发育过程中扮演神经干细胞以及神经祖细胞的作用。FABP7 在神经干细胞中高表达，且当神经干细胞分化后，其表达水平下降[14]。本研究的 RT-PCR、免疫组化及 Western blot 结果显示 FGR 新生鼠大脑中 FABP7 表达降低，予以补充牛磺酸后，FABP7 表达明显增加。FGR 的发生导致 FGR 新生鼠大脑神经干细胞的减少，孕鼠产前补充牛磺酸，能促进 FGR 新生鼠神经干细胞的增殖。

牛磺酸是大脑中含量最丰富的氨基酸之一，大量研究表明牛磺酸能够促进脑的发育及脑保护作用，同时，牛磺酸还可作为一种营养因素以及保护因素，促进大脑神经干细胞的增殖，例如牛

磺酸可通过调节多种信号通路的活性因子促进神经干细胞增殖，如 WNT 信号通路及 Shh 信号通路的相关因子 Gli1、Wnt2、Shh、Cox5a、Ndufv1 等[15]。本研究表明，牛磺酸还可以通过调节 Rho 家族因子 RhoA、ROCK2、rac 的表达，从而促进宫内生长受限新生鼠神经干细胞的增殖。

目前，Rho 家族因子中最主要的因子为 Rho、rac、cdc42。Rho 家族因子能够参与多种细胞功能，包括细胞骨架、膜运输、细胞周期、基因转录、粘附、迁移和凋亡等[16]。Rho 有三种不同的亚型（RhoA、RhoB、RhoC），其中 RhoA 在神经系统中最有代表性。本研究结果显示 FGR 新生鼠 RhoA 表达增加，补充牛磺酸后脑组织中 RhoA 表达降低。RhoA 在神经系统的发育过程中作用于特定的细胞，抑制 RhoA 的活动，能够减少新生鼠产后早期发育中神经干细胞的凋亡，从而促使躯体感觉皮质神经元的密度和数量增加[17]；敲除中脑中的 RhoA 能够促进神经干细胞的生存以及增殖[18]。

ROCK 为 Rho 的下游因子，Rho/ROCK 途径是中枢神经系统中普遍存在的介导抑制性信号，阻断中枢神经细胞再生的重要通路[19]。Koyanagi 等[20]指出神经干细胞从胚胎干细胞分离后，通过激活 Rho/ROCK 导致神经干细胞的凋亡。ROCK 有两种亚型，ROCK1 和 ROCK2。其中，ROCK2 主要在大脑及脊髓中表达，ROCK2 在 Rho/ROCK 通路中扮演着重要的作用，参与细胞凋亡信号通路以及细胞生存和细胞自噬。ROCK2 可以激活磷酸酶、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因（phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN）以及 Fas 基因从而降低细胞生存率[20]。ROCK2 表达下调能够降低神经细胞的蛋白酶和 caspase-3 活性，增加苏氨酸蛋白激酶和坍塌反应调节蛋白 2 水平，从而抑制细胞凋亡及自噬，促进神经干细胞生存。ROCK 抑制剂，如法舒地尔和 y-2763215，主要通过 Rho/ROCK 通路影响 ROCK2 的下游信号，如 LIMK1、Akt，从而促进神经干细胞再生以及神经干细胞保护作用，同时，ROCK 抑制剂能够在 1- 甲基 -4- 苯基 -1,2,3,6- 四氢吡啶（1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MTPT）损伤、以及氧葡萄糖剥夺、切断或血清剥夺的情况下，发挥神经保护作用[21]。

通常，rac 及其下游效应器的激活促进神经干细胞的生存，而 Rho 及其下游效应器的激活可诱导神经细胞凋亡。Rho 家族的 GTP 酶（Rho family of GTPases, rac GTPase）生存信号和 Rho/ROCK 凋亡信号在许多类型的神经细胞如神经干细胞、小脑颗粒神经元和脊髓运动神经元中扮演着重要的角色，以相互拮抗的方式形成一个关键的信号网络，维持体内神经细胞的生存。本结果显示 FGR 新生鼠 rac 表达下降，予以补充牛磺酸后，rac 表达增加。其中，Rac GTPase 可以短暂快速脉冲刺激导致蛋白激酶 21 信号下游效应器蛋白激酶 A、磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 苏氨酸蛋白激酶通路以及多种促凋亡 Bcl-2 家族蛋白如 Bad 和 Bax 抑制，促进神经干细胞存活[22]。rac 依赖途径能够抑制线粒体凋亡，同时通过 Rho 的下游效应器如 ROCK、PTEN 等拮抗 Rho，而 Rho/ROCK/PTEN 可终止 Akt 激活[23]，提示 rac 也可通过抑制 Rho/ROCK 信号通路而促进神经干细胞的增殖。

孕鼠产前补充牛磺酸后能够减少 FGR 的发生率，牛磺酸主要作用于新生鼠大脑，增加新生鼠脑重；FGR 的发生导致新生鼠大脑神经干细胞明显减少，孕鼠产前补充牛磺酸后，能促进新生鼠大脑神经干细胞的增殖，牛磺酸可促进神经干细胞增殖，其机制可能与调控 Rho 家族因子的活性有关，如抑制 Rho/ROCK 通路因子 RhoA、ROCK2 及其下游效应器，激活 rac 及其下游效应器；是否直接调控 Rho 家族因子有待于进一步研究。

［参　考　文　献］

[1] 王华伟，刘敬 . 胎儿生长受限及其对脑发育的不良影响 [J]. 中国实用儿科杂志，2015, 30(10): 796-799.
[2] 王晓凤，刘敬 . 宫内生长受限对患儿远期神经行为及心理发育的影响 [J]. 中华全科医师杂志，2012, 11(3): 202-204.
[3] Baschat AA. Neurodevelopment after fetal growth restriction[J]. Fetal Diagn Ther, 2014, 36(2): 136-142.
[4] Fung C, Ke X, Brown AS, et al. Uteroplacental insufficiency alters rat hippocampal cellular phenotype in conjunction with ErbB receptor expression[J]. Pediatr Res, 2012, 72(1): 2-9.
[5] 王晓凤，滕慧云，刘敬，等 . 孕鼠补充牛磺酸减少胎儿生长受限胎鼠脑细胞凋亡 [J]. 中华围产医学杂志，2013, 16(3): 510-513.
[6] 陈慧，李坚，刘敬，等 . 产前补充牛磺酸促进宫内生长受限胎鼠脑细胞增殖 [J]. 中华围产医学杂志，2011, 14(10): 612-617.
[7] 王晓凤，刘颖，刘敬，等 . 孕鼠补充牛磺酸对宫内生长受限胎鼠脑组织 Ras 同源基因 –Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶通路关键信号分子表达的影响 [J]. 中华实用儿科临床杂志，2013,

28(8): 312-315.

[8] Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, et al. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet[J]. J Physiol, 2006, 576(Pt 3): 935-946.

[9] Menendez-Castro C, Fahlbusch F, Cordasic N, et al. Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20369.

[10] van Batenburg-Eddes T, de Groot L, Steegers EA, et al. Fetal programming of infant neuromotor development: the generation R study[J]. Pediatr Res, 2010, 67(2): 132-137.

[11] Baschat AA. Fetal growth restriction - from observation to intervention[J]. J Perinat Med, 2010, 38(3): 239-246.

[12] Baschat AA. The fetal circulation and essential organs - a new twist to an old tale[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2006, 27(4): 349-354.

[13] Baschat AA. Neurodevelopment following fetal growth restriction and its relationship with antepartum parameters of placental dysfunction[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2011, 37(5): 501-514.

[14] Liu RZ, Mita R, Beaulieu M, et al. Fatty acid binding proteins in brain development and disease[J]. Int J Dev Biol, 2010, 54(8-9): 1229-1239.

[15] Pasantes-Morales H, Ramos-Mandujano G, Hernández-Benítez R. Taurine enhances proliferation and promotes neuronal specification of murine and human neural stem/progenitor cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 803: 457-472.

[16] Stankiewicz TR, Linseman DA. Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 314.

[17] Numano F, Inoue A, Enomoto M, et al. Critical involvement of Rho GTPase activity in the efficient transplantation of neural stem cells into the injured spinal cord[J]. Mol Brain, 2009, 2: 37.

[18] Katayama K, Melendez J, Baumann JM, et al. Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(18): 7607-7612.

[19] 刘颖 , 刘敬 . Rho-ROCK 信号通路研究进展 [J]. 中国儿童保健杂志 , 2012, 20(9): 822-825.

[20] Koyanagi M , Takahashi J, Arakawa Y, et al. Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(2): 270-280.

[21] Zhang L, Valdez JM, Zhang B, et al. ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18271.

[22] Koch JC, Tönges L, Barski E, et al. ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1225.

[23] Stankiewicz TR, Loucks FA, Schroeder EK, et al. Signal transducer and activator of transcription-5 mediates neuronal apoptosis induced by inhibition of Rac GTPase activity[J]. J Biol Chem, 2012, 287(20): 16835-16848.

（本文编辑：万静）