

Rho-Rock信号通路阻断剂对脊髓损伤大鼠神经功能修复的作用

张树文, 王浩*

新疆维吾尔自治区人民医院脊柱二科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2023年9月19日; 录用日期: 2023年10月12日; 发布日期: 2023年10月19日

摘要

目的: 探讨Rho-Rock信号通路阻断剂Fasdiual对脊髓损伤(SCI)大鼠神经功能修复的作用。方法: 选取8周龄SD (Sprague-Dawley)雄性大鼠36只, 采用改良Allen打击法制备脊髓损伤(SCI)大鼠模型后根据实验干预措施随机分组, A组为BMSCs移植组、B组为BMSCs移植 + Fasdiual组、C组为BMSCs移植 + 生长因子组。于SCI术后4周采用BBB (Basso-Beattie-Bresnahan)评分法对SCI大鼠下肢运动功能恢复评分后取脊髓损伤节段制备标本, 采用免疫组织化学染色观察对比两组神经干样细胞特性表达蛋白NF200、NSE及胶质细胞GFAP的阳性表达。结果: SCI术后4周各组大鼠下肢运动功能评分均有明显改善, B、C两组SCI大鼠下肢运动功能评分均优于A组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), B组评分优于A组, 两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); SCI大鼠脊髓标本免疫组化结果显示NF200、NSE在B、C组表达量均高于A组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), GFAP在A组的表达量高于B、C组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: Rho-Rock抑制剂Fasdiual联合骨髓间充质干细胞定向移植后可促进损伤脊髓的修复, 促进SCI大鼠神经功能的恢复。

关键词

脊髓损伤, 信号通路, 骨髓间充质干细胞, 细胞分化

Effect of Rho-Rock Signaling Pathway Blocker on Neurological Recovery in Rats with Spinal Cord Injury

Shuwen Zhang, Hao Wang*

Second Department of Spine, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang

Received: Sep. 19th, 2023; accepted: Oct. 12th, 2023; published: Oct. 19th, 2023

*通讯作者。

Abstract

Objective: To investigate the effect of the blocker of Rho-Rock signaling pathway (Fasdiual) on neurological function in rats with spinal cord injury (SCI). **Methods:** Thirty-six Sprague-Dawley (SD) male rats aged 8 weeks were selected and prepared by a modified Allen method for spinal cord injury (SCI) and randomly divided into groups according to experimental interventions. Group A is BMSCs transplantation group, and group B is BMSCs transplantation with Fasdiual group, C group is BMSCs transplantation with growth factor group. After 4 weeks of SCI, BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) scoring method was used to evaluate the recovery of lower extremity motor function of SCI rats. Immunohistochemical staining was used to observe the positive expression of protein NF200, NSE of neural stem cells and GFAP of glial. **Results:** The motor function scores of lower extremities were significantly improved in all groups after 4 weeks of SCI. The scores of lower extremity motor function of SCI rats in both groups were significantly better than those in group A ($P < 0.05$). The score of group B was better than that of the group A, there was a statistically significant difference between the two groups ($P < 0.05$). The immunohistochemistry results of the spinal cord specimens of SCI rats showed that the expression levels of NF200 and NSE in group B and C were higher than those in group A, statistical significance ($P < 0.05$). The expression of GFAP in group A was higher than that in group B and C. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Rho-Rock blocker Fasdiual combined with bone marrow mesenchymal stem cells can promote the repair of injured spinal cord and promote the recovery of neurological function in SCI rats.

Keywords

Spinal Cord Injury, Signal Pathway, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Cell Differentiation

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脊髓损伤是严重的神经系统创伤, 治疗困难、致残率高, 一直是世界性难题, 而且交通伤、坠落伤、高能量损伤造成脊髓损伤的病例逐年增加[1], 干细胞移植可促进损伤脊髓内轴突的再生, 改善神经功能障碍, 具有广阔的应用前景[2] [3]。骨髓间质干细胞(BMSCs)移植治疗脊髓损伤大鼠的实验研究发现移植组取得良好的疗效, 相关文献分析认为神经干样细胞移植与 BMSCs 相比能获得更好的疗效, 因此体外诱导后移植更适用于脊髓损伤患者[3] [4] [5]。相关文献认为其中 Ras 同源基因-Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶 (Rho-Rock)信号通路是中枢神经系统中普遍存在的一条通路, 是介导抑制性信号阻断中枢神经细胞再生的最终途径[6]。彭涛等[7]研究结果首次证实了 Rock 抑制剂盐酸法舒地尔可以在体外快速、高效诱导大鼠 BMSCs 向神经元样细胞分化, 同时能够提高诱导后的成活率。因此本研究通过对抑制 Rho-Rock 信号通路及生长因子应用联合 BMSCs 定向移植, 探讨其对脊髓损伤大鼠神经功能恢复的作用。

2. 对象与方法

2.1. 材料验动物

成年 SD 雄性大鼠, 体质量 150~200 g, 由新疆医科大学实验动物中心提供。主要试剂: 胎牛血清、

低糖 DMEM 培养基、PBS 缓冲液、双抗、0.5%胰蛋白酶均购自美国 Hyclone 公司; NSE 抗体、GFAP 抗体及四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的羊抗兔 IgG 抗体、二脒基苯基吡啶(DAPI)复染液购自武汉博士德公司, NF200 抗体购自北京博奥森公司。本研究新疆维吾尔自治区人民医院动物伦理委员会批准(编号: IACUC20161208-05)。

2.2. BMSCs 的分离、提取及培养

无菌条件下取 3 周龄重约 100 g 雄性 SD 大鼠双侧股骨及胫骨置于 5%双抗的 DMEM 中, 反复冲洗骨髓腔, 吹打成单细胞悬液, 清洗、离心细胞 2 次。含体积分数 12%胎牛血清的 DMEM 制作单细胞悬液接种于培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 24 h 半量换液, 以后每 3 d 换液, 当细胞生长至 80%~90%时进行 1:3 传代, 第 3 代细胞已经去除非贴壁的骨髓造血干细胞, 得到纯化的 BMSCs, 移植备用。

2.3. BMSCs 移植及组织免疫组化观察

采用改良 Allen 打击法制作 SCI 大鼠模型后局部移植第 3 代 BMSCs, A 组在模型制作成功后连续 5 d 腹腔注射 1 ml 生理盐水, B 组在模型制作成功后连续 5 d 注射 Fasdiual (0.85 mg/kg), C 组在模型制作成功后连续 5 d 腹腔注射促神经营养因子(成纤维细胞生长因子 + 表皮生长因子)。术后 4 周在行 SCI 大鼠后肢 BBB 运动功能评分后处死取脊髓标本固定、脱水、包埋、制片后备用。烤片、脱蜡、脱水、孵育、抗原修复、山羊血清封闭、滴加一抗 4℃过夜、二抗孵育、DAB 显色、苏木素染色反蓝、脱水, 透明、封片后显微镜下拍照并观察 NF200、NSE 及 GFAP 的阳性表达。

2.4. 统计分析

应用 SPSS 17.0 统计软件分析, 服从正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

BBB 评分结果为各组 SCI 大鼠术后 1 d BBB 评分分别为(0.58 ± 0.55)、(0.61 ± 0.44)、(0.60 ± 0.36)分, 各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$), 术后 4 w 各组 SCI 大鼠运动功能均有明显改善, 各组治疗前后差异均有统计学意义($P < 0.05$); B、C 两组 SCI 大鼠运动功能评分分别为(11.23 ± 0.76)、(9.84 ± 1.12)分, 两组相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 分别与 A 组(6.81 ± 1.31)分比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 结果见表 1。

Table 1. The BBB scores of SCI rats at 1 d and 4 w after surgery

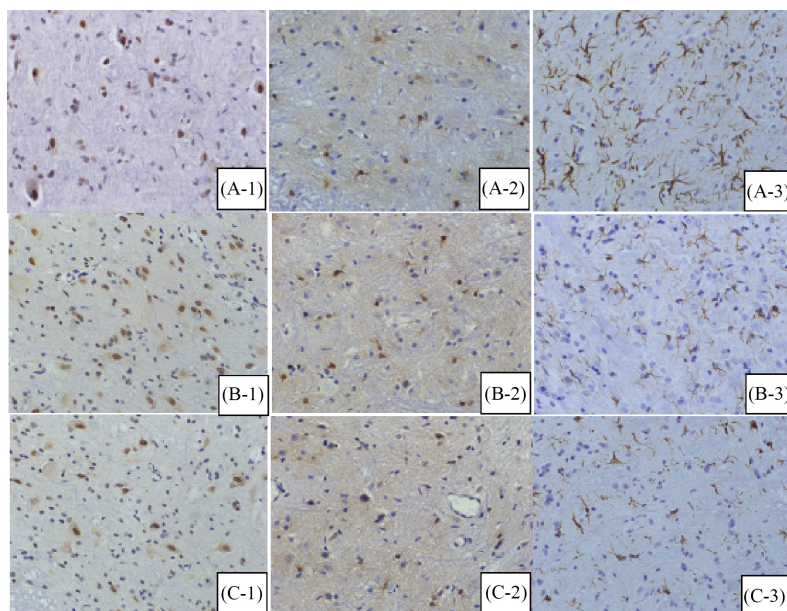
表 1. SCI 大鼠术后 1 d、4 w 点 BBB 评分

组别	SCI 后第 1 d	SCI 后第 4 w
A 组	0.58 ± 0.55	6.81 ± 1.31 ^{bc}
B 组	0.61 ± 0.44	11.23 ± 0.76 ^{ac}
C 组	0.60 ± 0.36	9.84 ± 1.12 ^{ab}

注: 与 A 组同时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 同时时间点比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组同时间点比较, ^c $P < 0.05$ 。

SCI 大鼠脊髓标本免疫组化染色结果显示 NF200、NSE、GFAP 在各组均有阳性表达, 半定量分析结果显示 NF200、NSE 在 B、C 组阳性表达明显高于 A 组, 组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), B、

C 两组之间比较 NF200、NSE 阳性表达差异无统计学意义($P > 0.05$); GFAP 在 A 组阳性表达高于 B、C 两组, 组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), B、C 两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 1。半定量分析见表 2。



注: 脊髓损伤标本 4 周时免疫组化染色观察(400 \times), A-1、B-1、C-1 分别为 A、B、C 组 NF200 免疫组化染色结果; A-2、B-2、C-2 分别为 A、B、C 组 NSE 免疫组化染色结果; A-3、B-3、C-3 分别为 A、B、C 组分别为 GFAP 免疫组化染色结果。

Figure 1. The immunohistochemical stain of NF200, NSE and GFAP

图 1. NF200、NSE、GFAP 免疫组化结果

Table 2. The semiquantitative analysis of NF200, NSE and GFAP

表 2. NF200、NSE、GFAP 半定量分析

组别	n	NF200	NSE	GFAP
A 组	12	7.04 \pm 2.36 ^{bc}	8.15 \pm 1.59 ^{bc}	12.15 \pm 2.23 ^{bc}
B 组	12	11.20 \pm 1.25 ^a	10.05 \pm 1.41 ^a	7.51 \pm 1.67 ^a
C 组	12	10.50 \pm 0.98 ^a	9.56 \pm 2.12 ^a	8.15 \pm 2.01 ^a

注: 与 A 组相比 ^a $P < 0.05$, 与 B 组相比 ^b $P < 0.05$, 与 C 组相比 ^c $P < 0.05$ 。

4. 讨论

骨髓间充质干细胞作为“种子细胞”具有取材方便, 易于体外培养增殖, 不引起免疫排斥反应等优点, 并且具有定向分化为神经干细胞的潜能[8]。骨髓间充质干细胞诱导为神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究表明神经干细胞移植组疗效优于骨髓间充质干细胞移植组, 因此通常选择骨髓间充质干细胞体外诱导分化为神经干细胞后再移植治疗脊髓损伤[9]。诱导骨髓间充质干细胞向神经干细胞分化的方法较多, 主要包括抗氧化剂等化学诱导法, 生长因子和改变骨髓间充质干细胞所处微环境共培养法和分步诱导、慢病毒转染的方法, 尽管存在多种不同诱导方法, 但普遍存在着定向分化效率低、分化稳定性参差不齐的缺点[10]。骨髓间充质干细胞的定向诱导分化受多种信号通路的调节, 相关研究表

明主要包括 Notch 信号通路、BMP 信号通路、Wnt 信号通路、Ca²⁺/CaM 信号通路等[11] [12] [13]。脊髓损伤可引起多条信号通路的激活,各通路之间存在一定联系,相关文献认为其中 Rho-Rock 信号通路是中枢神经系统中普遍存在的一条通路,是介导抑制性信号阻断中枢神经细胞再生的最终途径,抑制 Rho-Rock 信号通路可以促进 SCI 大鼠神经功能的恢复[6]。

本研究 BBB 评分结果表明三组 SCI 大鼠双后肢运动功能均有改善,B、C 两组 BBB 评分高于 A 组,结果表明 BMSCs 移植可改善 SCI 大鼠双下肢功能,给予 Rho-Rock 抑制剂及生长因子能够促进 SCI 大鼠双下肢功能的恢复,且 B 组 SCI 大鼠术后 4 周 BBB 评分高于 C 组,表明阻断 Rho-Rock 信号通路对 SCI 大鼠双后肢功能恢复的效果优于生长因子的应用。SCI 大鼠脊髓标本的免疫组化结果显示三组 BMSCs 诱导后均表达 NF200、NSE,且 B、C 组表达量高于 A 组,GFAP 表达量 B、C 组低于 A 组,结果表明 Fasdiual 在动物体内实验具有促进神经干样细胞表达的作用。BMSCs 移植到动物体内具有分泌神经营养因子、抑制炎症、促进轴突再生及神经通路重建等作用[14],可以促进 SCI 大鼠脊髓功能的恢复。Fasdiual 与 BMSCs 联合应用能提高 BMSCs 向神经干样细胞分化的作用,同时可减少星形胶质细胞的特异性标记物 GFAP 的表达,GFAP 在缺氧缺血后的反应性胶质细胞中明显表达,反映中枢受损后的严重程度,同时反映受损区域无菌性炎性改变。

Rho-Rock 信号通路包括三种成分:Rho 蛋白、Rho 激酶及 Rho 激酶的效应分子,主要参与了调控细胞骨架形成、增殖、迁移及基因转录和凋亡等功能,主要通过小 G 蛋白 GDP-GTP 之间的转换,来调节细胞内肌动蛋白的合成、降解、移动和收缩等,因此对细胞的分裂、黏附、收缩、迁移和分泌活动具有非常重要的调节作用,并且相关文献指出 Rho 及其相关分子在神经系统的发育过程轴突生长、分化、延伸及突触的形成过程中均能起到重要作用,Rho 蛋白及其相关的信号分子能介导硫酸软骨素蛋白多糖对神经元的抑制作用,因此抑制 Rho 蛋白及其下游因子可以促进脊髓损伤后神经功能的恢复[15]。相关研究通过体外诱导方式证实 Rock 抑制剂盐酸法舒地尔具有快速、高效诱导大鼠 BMSCs 向神经元样细胞分化的作用,并且能够提高诱导后的成活率[7],本研究通过两种不同治疗方式均能有效改善 SCI 大鼠神经功能,且 Fasdiual 应用疗效优于生长因子,笔者推测其主要原因可能与抑制 Rho-Rock 信号通路后可减少受损脊髓局部神经细胞的凋亡及促进了抑制细胞的诱导分化有关,还需进一步研究证实。

总而言之,本研究证实应用 Rho-Rock 信号通路阻断 Fasdiual 后可促进 SCI 大鼠神经功能的恢复,为后续研究奠定了一定的基础,但本文存在一定的局限性,样本量较小,尽管脊髓打击模型简单易操作,但打击操作过程中仍然存在一定的差异性,今后需进一步完善不足之处。

参考文献

- [1] Shank, C.D., Walters, B.C. and Hadley, M.N. (2019) Current Topics in the Management of Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurocritical Care*, **30**, 261-271. <https://doi.org/10.1007/s12028-018-0537-5>
- [2] de Freria, C.M., Van Niekerk, E., Blesch, A., et al. (2021) Neural Stem Cells: Promoting Axonal Regeneration and Spinal Cord Connectivity. *Cells*, **10**, Article 3296. <https://doi.org/10.3390/cells10123296>
- [3] 胡伟, 谢兴奇, 屠冠军. 骨髓间充质干细胞来源外泌体改善脊髓损伤后血脊髓屏障的完整性[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(7): 992-998.
- [4] 董春雷, 王宝兰, 李忠伟, 等. 减重步行训练对脊髓损伤大老干细胞移植后神经细胞诱导分化的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2015, 37(5): 321-326.
- [5] 郭卫春, 李军, 熊敏, 等. 促红细胞生成素动员骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤的作用机制研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(1): 278-280.
- [6] Kimura, T., Horikoshi, Y., Kuriyagawa, C., et al. (2021) Rho/ROCK Pathway and Noncoding RNAs: Implications in Ischemic Stroke and Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 11573. <https://doi.org/10.3390/ijms222111573>

- [7] 彭涛, 滕军放, 关文娟, 等. 盐酸法舒地尔体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化的可行性[J]. 郑州大学学报, 2010, 45(4): 560-562.
- [8] 吴向坤, 慕晓玲. 骨髓间充质干细胞向神经细胞分化机制及研究现状[J]. 农垦医学, 2007, 29(6): 454-456.
- [9] 李玉美, 余资江, 余彦, 等. 诱导为神经元样细胞的骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[C]//中国解剖学会. 中国解剖学会 2019 年年会论文文摘汇编, 2019: 118-119.
- [10] Shamosi, A., Mahmoudi, E. and Kermanian, F. (2022) Effect of Olibanum Extract/Graphene Oxide on Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells on Freeze Dried Scaffolds. *Iranian Journal of Biotechnology*, **20**, e3179.
- [11] 赵红斌, 甄英丽, 田蓉, 等. Notch 和 BMP 信号通路介导红景天苷促进小鼠骨髓间充质干细胞向神经元细胞定向分化的研究[J]. 中草药, 2016, 47(13): 253-267.
- [12] 吴倩, 贺强, 何翔, 侯吉学, 黄桂林. 骨髓间充质干细胞对淋巴内皮祖细胞迁移作用的研究[J]. 农垦医学, 2022(5): 395-400.
- [13] 吕威, 姚海江, 莫雨平, 等. 脊髓损伤后神经再生相关信号通路研究进展[J]. 2016, 22(3): 293-298.
- [14] Zhang, D., Sunm, Y. and Liu, W. (2023) Motor Functional Recovery Efficacy of Scaffolds with Bone Marrow Stem Cells in Rat Spinal Cord Injury: A Bayesian Network Meta-Analysis. *Spinal Cord*, **61**, 93-98. <https://doi.org/10.1038/s41393-022-00836-4>
- [15] 唐莲, 黄蕾, 杨利凤. Rho-Rock 抑制在脊髓损伤修复中的作用[J]. 交通医学, 2016, 30(1): 15-19.