

Rho 激酶影响大鼠海马神经元突起生长的实时成像

刘南暖, 郭国庆, 陈 静, 沈伟哉

(暨南大学医学院 人体解剖学教研室, 广东 广州 510632)

[摘 要] 目的: 观察 Rho 激酶对大鼠海马神经元突起生长的影响。方法: 体外培养新生大鼠海马神经元 5 d 后, 连续动态观察溶血性磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA) 及 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 对神经元突起生长的影响。结果: 对照组神经元一级突起迅速生长、延伸, 不断发分支, 形成丰富的二级、三级突起; 用 LPA 处理后, 神经元大部分突起进行性塌陷, 一级突起逐渐缩短并且变细, 二级、三级突起数量减少, 且较细小; 而预先用 Y-27632 处理后再加 LPA, 细胞突起塌陷的现象减少, 神经元的突起不断分支、延伸, 一级、二级、三级突起数量较 LPA 组增多且长度也增加。结论: Rho 激酶参与 LPA 诱导海马神经元突起回缩的过程, 抑制 Rho 激酶的活性可抑制 LPA 诱导的突起回缩。

[关键词] Rho 激酶; 神经元; 突起; 海马; 延时显微成像; 大鼠

[中图分类号] R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2007)06-0572-04

The real-time imaging of neurites outgrowth of hippocampal neurons affected by Rho-kinase in rats

LIU Nan-nuan, GUO Guo-qing, CHEN Jing, SHEN Wei-zai

(Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To observe the effects of Rho-kinase on neurites outgrowth of hippocampal neurons in Rats. **Methods:** Neurons from the hippocampus of neonatal rats were cultured for 5 days *in vitro*. The effects of lysophosphatidic acid (LPA) and Rho-kinase inhibitor Y-27632 on neurites outgrowth of neurons were investigated by Time-lapse microscopy. **Results:** Primary neurites in control neurons grew quickly and branched, subsequently more secondary and third neuritis were formed. Stimulation of neurons with LPA induced neurites collapse progressively, accompanied by which the primary neurites retracted, and became thin gradually, also the secondary and third neurites decreased in number and length, whereas pretreatment of neurons with Rho-kinase inhibitor, Y-27632, before LPA reduced neurites collapse, compared with LPA group, neurons became more and longer branches. **Conclusion:** Neurites retraction induced by LPA can be regulated by Rho-kinase.

[Key words] Rho-kinase; neurons; neurites; hippocampus; Time-lapse microscopy; rats

作为神经系统的功能和结构单位, 神经元极化状态的确立及其相互之间建立起精确的突触联系是其发挥功能的基本条件^[1]。Rho GTP 酶家族及其相

关分子包括 Rac、Cdc42、RhoA 等, 参与神经元发育包括突起生长、细胞分化、树突棘形成等过程^[2-3], 在神经元极化和突触形成的过程中发挥关键作用。

有研究显示^[4] RhoA 与其下游分子 Rho 激酶相互作用可以诱导细胞骨架重排,促使生长锥塌陷而导致突起的回缩,但由于技术条件的限制,人们对 RhoA/Rho 激酶调节突起生长的过程了解尚显匮乏。本文通过延时显微成像的方法动态连续的观察改变 Rho 激酶的活性后海马神经元突起的变化过程,探讨 Rho 激酶对神经元突起生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

ROCK 的特异性抑制剂 Y-27632 (Sigma 公司,美国);RhoA 的激动剂溶血性磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) (Sigma 公司,美国);DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司,美国);胎牛血清 (杭州四季青公司);细胞有丝分裂抑制剂阿糖胞苷 (Sigma 公司,美国);电控倒置研究显微镜 (型号 DMIRE2, LEICA 公司,德国)

1.2 方法

1.2.1 海马神经细胞的分离和培养

新生 1 d SD 乳鼠 (SPF 级,雌雄不拘,购自南方医科大学实验动物中心),用体积分数 75% 乙醇消毒,分层剪开头皮和颅骨,暴露两侧大脑半球,用弯头眼科无齿镊去除大脑皮质后部,暴露并取出双侧海马;置解剖液 (4 ℃, 0.01 mol/L PBS) 中,将海马组织块用解剖液清洗并用直头虹膜镊去除血管等结缔组织后,转入含 6 mL 培养液 (体积分数 90% DMEM/F12 + 10% 胎牛血清) 的 10 mL 离心管中,用经火抛光的细口吸管轻轻吹打数次后静置 2~3 min,吸取上清液,用 200 目不锈钢筛网过滤入 10 mL 离心管中,再静置 2~3 min,吸出上清液,用 300 目不锈钢筛网过滤入 10 mL 离心管中。计数按照 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞密度将细胞种植在用多聚-L-赖氨酸 (0.1 g/L) 包被过 35 mm 细胞培养皿中,每皿加 2 mL 细胞悬液,置 37 ℃, 5% CO_2 , 饱和湿度二氧化碳培养箱内培养,24 h 后用培养液换全液 1 次,接种后第 3 天,在培养皿中加入细胞分裂抑制剂阿糖胞苷 10 $\mu\text{mol/L}$ 以抑制非神经细胞的增殖,作用 48 h 后更换新鲜培养液,以后每周换液 2 次,每次半量换液。

1.2.2 细胞分组

细胞随机分 3 组:①对照组:用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 条件下培养;②LPA 组:培养基中加入 LPA 使其终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$;③Y-27632 + LPA 组:

培养基中加入 Y-27632 使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,预处理细胞 1 h,再加入 LPA (1 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2.3 延时显微成像

用配置有微培养系统的 LEICA DMIRE2 型电控倒置研究显微镜对细胞延时成像。取体外培养 5 d 细胞按上述分组原则进行加药处理,然后将培养板放置于显微镜的载物台上,用 LEICA DFC300 照相机采集连续的细胞照片。用 LEICA-Qwin 图象分析软件中的 Time-lapse 程序设置相应参数。20 倍物镜下恒定视野,连续摄片拍摄,每帧照片间隔 30 min。

1.2.4 突起分级标准

依照 Ohara 和 Havton 的方法^[5]:从胞体直接发出的突起为一级突起,从一级突起发出的为二级突起,依次类推。

2 结果

2.1 大鼠海马神经元的一般生长状态

新生大鼠海马神经元接种后 12 h,大部分细胞可贴壁,呈圆形,周围有光晕,细胞活性好,少数神经元开始伸出 1~2 个突起。培养 24 h 后,伸出突起的神经元数量逐渐增多,细胞透亮、有光泽,生长旺盛。培养 3 d 后,神经元突起增多并延长,少数突起开始建立起联系,胶质细胞迅速分裂增殖,此时应用阿糖胞苷抑制胶质细胞生长。培养 4~5 d,神经元生长状态良好,胞体增大,呈锥体形或不规则形,胞突主干和分支进一步延长并增粗,形成稀疏的网络,胶质细胞的生长得到控制,数量减少,此时适合对单个神经元做追踪观察。培养 6~8 d 后神经元突起之间神经网络变的稠密。培养 9 d 后神经胶质细胞又迅速分裂增殖。

2.2 Rho 激酶对大鼠海马神经元突起生长的影响

LPA 处理海马神经元胞体无明显的变化,但是与对照组相比大部分一级突起缩短并且变细,二级、三级突起数量减少,且较细小。用 Y27632 预处理后再加入 LPA,胞体产生明显位移,一级、二级、三级突起数量较 LPA 组增多且长度也增加,但各级突起的数量及长度的改变较对照组无明显差异。

2.3 RhoA 激酶影响大鼠海马神经元突起生长过程的实时成像

电控倒置研究显微镜下,对照组在开始记录时,神经元胞体发出 4 个一级突起,未见明显的二级突起,除一突起很长,其余突起均短小,30 min 后一级突起发出几个细小二级、三级突起,一级突起延长,

在胞体一侧有一小突起发出,60 min 后二级、三级突起生长迅速,有四级分支形成,90 min 后,细胞未见明显的再分支现象,但是各级分支与开始时相比大部分有明显的延长和增粗(图 1)。LPA 组在加药处理后 30 min,可见神经元一个一级突起迅速缩短,末端变细,60 min 后二级突起开始缩短,部分三级突起基本消失,120 min 后退缩的一级突起变的细小(短箭头示),二级突起缩短,部分三级突起完全消失(图 2),但是用 Y-27632 预处理后再加 LPA,

30 min 后胞体变的稍圆并有轻度的下移,位于胞体近端的一个细小的二级突起消失,而稍远侧的二级突起却迅速生长延长,60 min 后胞体明显下移,一侧发出一个新的细长的一级突起,原有一级、二级突起继续生长,三级突起开始出现,90 min 后胞体变为多边形,位移减慢,四级突起出现,120 min 后,胞体与部分一级突起融合,一级突起的数量增加,一级、二级、三级、四级突起仍在生长延伸,神经元具有良好的极性(图 3)。

3 讨论

LPA 是一种胞外磷酸脂信号,可以刺激 RhoA

活性,现有资料显示^[6-7],LPA 可以诱导神经突起回缩并且与 RhoA/Rho 激酶信号密切相关。本实验结果显示,LPA 激活 Rho 激酶后,海马神经元的各级

突起变细,并且进行性缩短,部分突起甚至消失最终导致神经元分支减少。RhoA 是 Ras 家族中的一个小分子鸟苷三磷酸酶, RhoA 的构像有两种形式,一种有活性与 GTP 偶联,另一种无活性与 GDP 偶联^[8]。Rho 激酶又称为 Rho 相关激酶(Rho-associated kinase, ROCK),是 RhoA 下游最主要、最具特色的信号分子^[3,8],它们共同参与体内多种细胞生理反应,尤其是对细胞骨架的调节^[9]。研究显示^[4,10], RhoA 激活后通过 Rho 激酶使微管、微丝等细胞内骨架发生重排而导致神经突起的回缩,这其中涉及到 LIM 激酶磷酸化^[11],肌球蛋白轻链磷酸酶的抑制,以及 mDia 蛋白的激活等下游信号分子的改变^[12-13]。

Y-27632 是 Rho 激酶活性的特异性抑制剂^[14],它通过竞争 Rho 激酶的 ATP 结合位点而抑制其活性。本实验预先用 Y-27632 抑制 Rho 激酶活性后,神经细胞突起塌陷的现象减少,细胞的形态包括突起和分支与对照组细胞接近。虽然已有资料表明,激活 Rho 激酶可诱导突起回缩,而抑制其活性可促使突起生长延伸^[6],但是目前尚无资料实时显示这一过程。本实验进一步用延时显微成像技术对突起的回缩和生长过程进行了观察,结果显示,LPA 处理后,首先是一些细小的一级突起回缩、变细,之后较长一级突起的二级突起缩短,并逐渐波及一级突起。用 Y-27632 预处理后再用 LPA 干预,首先是近端的细小的二级突起回缩消失,远侧的二级突起不受影响,之后神经元的突起不断分支、延伸,出现与对照组神经相似的较丰富的突起及分支。虽然本实验的结果并不能阐明突起回缩或生长的原因,但通过延时显微成像技术发现 Rho 激酶参与了 LPA 诱导神经突起回缩这一过程,而且在用 Y-27632 阻断 Rho 激酶信号通路后,LPA 诱导突起回缩的作用受到抑制。

[参考文献]

- [1] HUANG C H, CHENG J C, CHEN J C, et al. Evaluation of the role of Disabled-2 in nerve growth factor-mediated neurite outgrowth and cellular signaling[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(6):1339-1347.
- [2] NEGISHI M, KATO H. Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation[J]. *J Biochem* (Tokyo), 2002, 132(2):157-166.
- [3] HALL A, NOBES C D. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2000, 355(1399):965-970.
- [4] SCHMIDT J T, MORGAN P, DOWELL N, et al. Myosin light chain phosphorylation and growth cone motility[J]. *Neurobiol*, 2002, 52(3):175-188.
- [5] HAVTON L A, OHARA P T. Quantitative analyses of intracellularly characterized and labeled thalamocortical projection neurons in the ventrobasal complex of primates [J]. *J Comp Neurol*, 1993, 336(1):135-150.
- [6] VAN LEEUWEN F N, OLIVO C, GRIVELL S, et al. Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1):400-406.
- [7] FUKUSHIMA N, WEINER J A, KAUSHAL D, et al. Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20(2):271-282.
- [8] GOVEK E E, NEWEY S E, AELST L V. The role of the Rho GTPases in neuronal development[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(10):1-49.
- [9] RIDLEY A. Rho: Theme and variations[J]. *Curr Biol*, 1996, 6(1):256-264.
- [10] RAFTOPOULOU M, HALL A. Cell migration: Rho GTPases lead the way[J]. *Dev Biol*, 2004, 265(1):23-32.
- [11] MAEKAWA M, ISHIZAKI T, BOKU S, et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase [J]. *Science*, 1999, 285(5429):895-898.
- [12] AMANO M, CHIHARA K, NAKAMURA N, et al. Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase[J]. *Genes Cells*, 1998, 3(3):177-188.
- [13] FUKUSHIMA N, MORITAB Y. Actomyosin-dependent microtubule rearrangement in lysophosphatidic acid-induced neurite remodeling of young cortical neurons [J]. *Brain Res*, 2006, 1094(1):65-75.
- [14] DARENFED H, DAYANANDAN B, ZHANG T, et al. Molecular characterization of the effects of Y-27632[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2007, 64(2):97-109.

[责任编辑:李 弘]