

• 论 著 •

RhoE 在小鼠中枢神经系统通过 NF- κ B 信号通路调节神经细胞凋亡

董慧敏 吕龙琴 董若辰 刘宝辉 毛善平

【摘要】 目的 探讨 RhoE 对神经细胞凋亡的作用及可能的相关机制。**方法** 用免疫组织化学染色、Q-PCR 和免疫印迹等方法检测 RhoE^{-/-} 及 RhoE^{+/+} 小鼠脑组织内 RhoE、Caspase3 和 P65 蛋白表达水平。**结果** RhoE^{-/-} 小鼠脑组织内无 RhoE 蛋白表达;RhoE^{-/-} 小鼠多部位脑组织 cleaved-Caspase3 表达水平较 RhoE^{+/+} 小鼠显著降低($P<0.05$);同时 RhoE^{-/-} 小鼠脑组织内 P65 蛋白表达水平较 RhoE^{+/+} 小鼠显著增高($P<0.05$),但 mRNA 水平无明显改变($P>0.05$)。**结论** RhoE 在小鼠中枢神经系统内可能通过 NF- κ B 信号通路中 P65 蛋白表达水平来调控神经元的凋亡;RhoE 可能是一个新的神经元凋亡调控位点。

【关键词】 RhoE NF- κ B 信号通路 神经元 凋亡

【中图分类号】 R741.02 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)05-0509-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.05.001

The RhoE regulated neurocytes apoptosis through NF- κ B signaling pathway in central nervous system Dong Huimin, Lv Longqin, Dong Ruochen, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of the RhoE on neurocytes apoptosis. **Methods** Immunohistochemistry, Q-PCR and western blot were performed to explore RhoE, P65 and cleaved-Caspase3's expression levels in RhoE^{-/-} and RhoE^{+/+} mice brain tissue. **Results** Immunohistochemistry showed there was no expression of RhoE in RhoE^{-/-} mice brain. Compared with RhoE^{+/+} mice, cleaved-Caspase3 protein level decreased in RhoE^{-/-} mice's brain tissue ($P<0.05$). On the other hand, P65 protein level increased in RhoE^{-/-} mice's brain ($P<0.05$), but there's no significant difference in the mRNA level ($P>0.05$). **Conclusion** The results showed the RhoE could regulated neurocytes apoptosis through P65 expression level in central nervous system. The RhoE probably regulated P65 in protein level. And the RhoE could be a new regulatory site for neurocytes apoptosis.

【Key words】 RhoE NF- κ B signaling pathway Neurocytes Apoptosis

我国经济的快速发展带来人民生活方式的巨大改变,人民群众的平均寿命随之延长。在此背景下神经退行性疾病及脑血管病等神经系统疾病的发病率和患病率持续上升,极大地降低患者的生存质量,并给患者家庭和社会带来沉重负担。神经系统疾病常有后遗症,与神经细胞凋亡及坏死导致的神经元减少以及神经细胞的难以再生性密切相关。神经细胞凋亡广泛发生于包括阿尔茨海默病、脑血管病、格林巴利综合征、多发性硬化、脑外伤等在内的多种神

经系统疾病中。减少神经元凋亡,维持一定的神经元数量,可能缓解患者临床症状。目前神经元凋亡的具体机制尚不完全明确。本研究发现小 GTP 酶蛋白家族成员 RhoE 参与小鼠中枢神经系统神经细胞凋亡,并可能与 NF- κ B 信号通路活性有关,可能是一个新的神经元凋亡调控位点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

RhoE 抗体为实验室制作, P65 抗体(AB7970)购自于美国 Abcam 公司, GAPDH 抗体(SC-5385)购于美国 Santa Cruz 公司, cleaved-Caspase3 (SC-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号为 81502175, 81371390)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[董慧敏 吕龙琴 董若辰 毛善平(通信作者)], 神经外科(刘宝辉)

7148)购于美国 Santa Cruz 公司,鼠抗兔二抗(31464)购自美国 Thermo Scientific Pierce 公司,鼠抗兔二抗(31464)、鼠抗羊二抗(31400)购自美国 Thermo Scientific Pierce 公司。二甲基亚砜(DMSO)购自武汉天源生物技术公司。TRIzol 试剂盒购自美国英杰生命技术公司,逆转录试剂盒购自上海基星生物科技有限公司。

1.1.2 细胞系和实验动物

RhoE 基因敲除小鼠(RhoE^{-/-}小鼠)饲养于德克萨斯医疗中心生命与科学技术研究所动物中心。使用 RhoE^{+/+}的雌雄小鼠杂交得到 RhoE^{-/-}小鼠,具体构建方法见文献^[1],RhoE^{+/+}小鼠为对照组。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法

颈椎脱臼法处死小鼠,断头取小鼠大脑制作蜡块;蜡块切片厚度为 6 μ m,石蜡切片经过脱蜡、抗原修复后 5%正常山羊血清(PBS 稀释)封闭;一抗比例:RhoE(羊源性,1:200),一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 室温冲洗后二抗染色;冲洗后染色封片,显微镜观察照相。

1.2.2 Q-PCR 检测 mRNA 水平

以 TRIzol 法提取细胞内 mRNA;使用逆转录试剂盒进行逆转录。反应体系:5 \times RT 4 μ L + dNTP 2 μ L + Oligo(dT) 20 1 μ L + RNA 酶抑制剂 1 μ L,用 DEPC 水将总体积配至 20 μ L。反应条件:42 $^{\circ}$ C 20 min,95 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min。引物序列:P65,5'-GTGGGGACTACGACCTGAATG/GGGGCACGATTGTCAAAGATA-3';GAPDH,5'-GAGTCAACGGATTTTGGTTCGT/TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'。PCR 反应体系:2 \times PCR 混合液 25 μ L + cDNA 2 μ L,上下游引物各 2 μ L,加超纯水使总体积为 50 μ L。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 4 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min 后取出。使用公式 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算各个基因表达水平。

1.2.3 免疫印迹法检测蛋白水平

细胞内蛋白提取:RIPA 裂解液加入培养孔内,冰上裂解,离心后收集上清液蛋白;动物组织蛋白提取:取小鼠顶叶、额叶、海马组织,用液氮充分研磨后加入 500 μ L RIPA,裂解后取上清液。以 BCA 法测蛋白水平。电泳条件:10%L 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,70 V,2 h;转膜:硝酸纤维素膜,转膜 1 h;室温下 5%脱脂奶粉封闭 1 h;孵育一抗膜于稀释的一抗中,RhoE(羊源性,1:

200,实验室制作),GAPDH(羊源性,1:200,Santa Cruz,SC-5385,USA),cleaved-Caspase3(兔源性,1:100,Santa Cruz,SC7148,USA),P65(兔源性,1:1000,Abcam,AB7970,USA);4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;室温下二抗(1:2000)孵育 2 h;洗膜后 Odyssey Infrared haging 扫膜。

1.2.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0,使用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RhoE^{-/-}小鼠脑组织内无 RhoE 表达

利用免疫组织化学染色和免疫印迹法检测 RhoE^{-/-}小鼠和 RhoE^{+/+}小鼠脑组织内 RhoE 表达水平显示 RhoE^{-/-}小鼠脑组织内无 RhoE 蛋白表达,造模成功(图 1)。

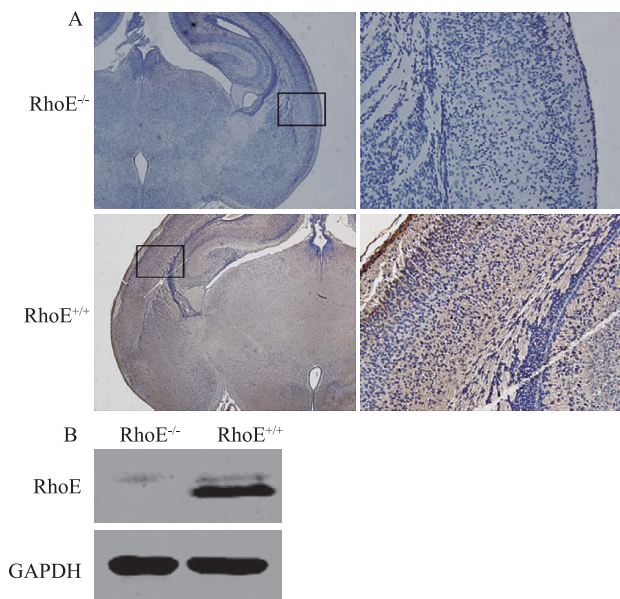


图 1 RhoE^{-/-}小鼠脑组织内无 RhoE 表达,基因敲除小鼠模型构建成功 A 为免疫组织化学染色;B 为免疫印迹

2.2 RhoE^{-/-}小鼠脑组织细胞凋亡减少

取顶叶脑组织提取蛋白后利用免疫印迹法检测显示 RhoE 被敲除后发现 RhoE^{-/-}小鼠脑组织多部位包括额叶、顶叶、海马 cleaved-Caspase3 的蛋白表达水平较对照组明显下降($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 RhoE^{-/-}小鼠脑组织中 NF- κ B 信号通路活性增高

免疫印迹法检测 RhoE^{-/-}小鼠和 RhoE^{+/+}小鼠脑组织中 P65 蛋白表达水平显示在 RhoE 被敲除

后 P65 蛋白表达水平较对照组升高($P<0.05$);同时 Q-PCR 显示 RhoE 被敲除后与对照组比较 P65 的 mRNA 水平无明显改变($P>0.05$)(图 3)。

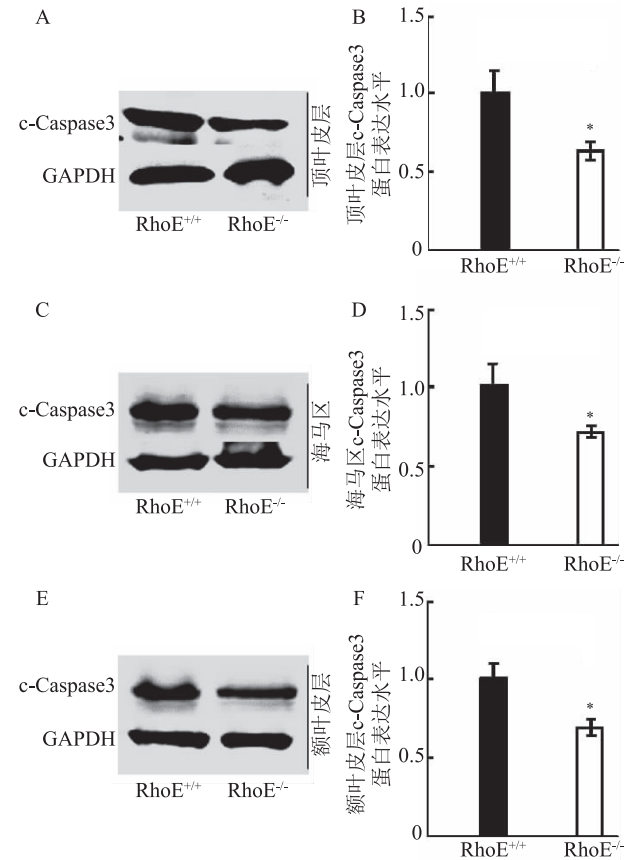


图 2 RhoE^{-/-} 小鼠脑组织内多部位 c-Caspase3 表达水平降低 A,B 为顶叶皮层;C,D 为海马;E,F 为额叶皮层;与 RhoE^{+/+} 比较,* $P<0.05$

3 讨论

近几十年来我国经济的飞速发展,物质资源的丰富和生活条件的改善,大幅度提高了我国人民的物质条件和预期寿命。随着国民生活方式的改变和寿命的延长,我国疾病谱较前有了较大的改变,慢性病逐步取代传染病占据我国疾病的前列。在此背景下包括阿尔茨海默病在内的神经系统退行性疾病、脑血管病、神经系统变性病等疾病患病率逐年升高,且都具有预后差、致残率、致畸率较高的特点,极大地降低了患者的生活水平,给患者家庭及社会带来了沉重的经济和护理负担。神经元变性和凋亡导致的神经细胞减少广泛发生于 AD 等多种神经系统疾病中,是其重要发病基础。减少细胞凋亡,维持一定数量的神经细胞可能缓解疾病的进展,并改善临床症状及患者预后^[2-4]。目前神经细胞凋亡的机制尚

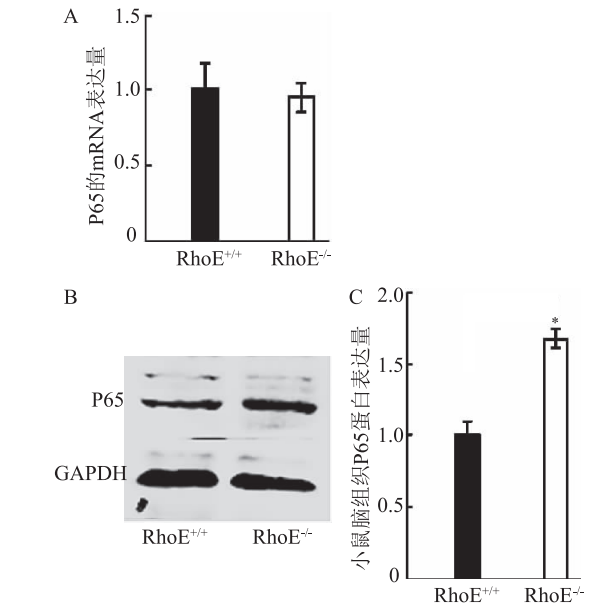


图 3 RhoE^{-/-} 小鼠脑组织内 P65 蛋白表达水平增高,mRNA 水平无明显改变 A 为 RhoE 被敲除后 P65 的 mRNA 水平无明显改变($P>0.05$);B,C 为 RhoE 被敲除后 P65 的蛋白水平增高;与 RhoE^{+/+} 比较,* $P<0.05$

不完全清楚。对于神经细胞凋亡分子机制的进一步了解有望为疾病的治疗提供新的靶点。

多个研究发现在中枢神经系统中 NF- κ B 信号通路在神经细胞生长、分化以及对细胞外信号的反应中均有参与^[5-6]。NF- κ B 通路在行为、学习能力和记忆形成方面都有着重要作用^[6-8]。NF- κ B 作为抗凋亡基因,是 B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family 的上游,NF- κ B 功能被抑制后可以阻止细胞分化^[9-10],并导致凋亡。这个现象在多种原代神经元中被发现^[9-12],是十分重要的抗凋亡蛋白。在哺乳动物体内 NF- κ B 家族有 5 个成员:P65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 和 p52/p100。35%~61% 的 NF- κ B 家族成员都有着相同的由 300 个氨基酸组成的 Rel-homology domain (RHD)在 N 端。RHD 区域可以被二聚化、核转位和 DNA 绑定^[13-14]。在缺少特定刺激的情况下 NF- κ B 家族成员存在于细胞质中,并与 κ B inhibitory proteins(I κ Bs)蛋白相绑定,处于失活的二聚体或异二聚体状态^[15]。既往发现胞内有两条通路可以解除 NF- κ B 的抑制状态,并使其进入细胞核启动目标基因转录,即经典途径(classic pathway)和非经典途径(alternative pathway)^[16]。目前 NF- κ B 信号通路调控的具体分子机制尚不完全清楚,如何准确调控 NF- κ B 信号通路活性对于神经细胞凋亡有重要意义。本研究发现,小 GTP 家

族成员 RhoE 蛋白在小鼠中枢神经系统内参与调控 NF- κ B 信号通路活性和神经细胞凋亡,可能是一个新的 NF- κ B 信号通路调控位点。

RhoE 蛋白也被称为 RND3,属于 Rho 蛋白家族,是一种小 GTP 结合蛋白。大多数小 G 蛋白成员在相关酶作用下在与 GTP 结合的活性状态和 GDP 结合的失活状态间转换。RND 蛋白与 Rho 家族的其他蛋白有着不同的性质和调节机制^[17]。有研究发现,RND 蛋白家族成员总是绑定到 GTP,不受 GTPase 的调节,不存在 GTP 活性形式与 GDP 失活形式转换的过程^[18]。目前有研究表明,RND 蛋白的活性主要受它们的表达水平、表达位置及磷酸化等因素的影响。其生物学功能及作用机制还在进一步探讨中。

RhoE 最初被发现并认为是 Rho 蛋白激酶 1 (Rho protein kinase 1, ROCK1)的抑制物^[18]。既往研究发现其生物学功能主要依靠可通过 Rho 激酶介导,主要参与肌动蛋白骨架形成、肌球蛋白磷酸化以及凋亡^[19-20]。最近有相关研究证实,RhoE 在小鼠神经元发育中起着重要作用^[21-22]。同时,本课题组前期研究表明 RhoE 在室管膜上皮细胞中可以调节细胞增殖^[22],并且参与调控神经干细胞的增殖^[23]。以上结果均提示,RhoE 在中枢神经系统中有着重要作用。

本研究通过 RhoE^{-/-}小鼠和 RhoE^{+/+}小鼠脑组织中的研究发现,RhoE 与神经细胞凋亡有关。当 RhoE 被敲除后小鼠脑组织中的 cleaved-Caspase3 表达水平降低,提示神经细胞凋亡减少;同时与神经细胞凋亡密切相关的 NF- κ B 信号通路重要成员 P65 蛋白表达水平下降。由此提示,RhoE 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路活性来调控神经细胞凋亡;Q-PCR 显示在 RhoE 被敲除后 P65 的 mRNA 水平和对照组比较无明显改变,提示 RhoE 可能是在转录后水平对 P65 进行调节,具体作用机制还有待于进一步研究。

综上所述,神经细胞凋亡广泛发生于多种神经系统疾病中。减少神经细胞凋亡可能有助于改善疾病预后。本研究在小鼠脑组织中发现了小 GTP 蛋白家族成员 RhoE 参与调控神经细胞凋亡,并可能是对 NF- κ B 信号通路中 P65 的蛋白水平而非 mRNA 水平进行调控,为今后的药物靶向治疗提供可能的作用位点。

参 考 文 献

- [1] Yang X, Wang T, Lin X, et al. Genetic deletion of RhoE/RhoE results in mouse heart Calcium leakage through upregulation of protein kinase A signaling[J]. *Circ Res*, 2015, 116(1): e1-e10.
- [2] Gao C, Chang P, Yang L, et al. Neuroprotective effects of Hydrogen sulfide on Sodium azide-induced oxidative stress in PC12 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 242-250.
- [3] Aliev G, Ashraf GM, Tarasov VV, et al. Alzheimer disease - future therapy based on dendrimers[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2019, 17(3): 288-294.
- [4] Ao L Y, Yan YY, Zhou L, et al. Immune Cells After Ischemic Stroke Onset: Roles, Migration, and Target Intervention[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 66(3): 342-355.
- [5] Liu Y, Zhang Y, Zheng X, et al. And synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 112.
- [6] Liu F, Liu TW, Kang J. The role of NF-kappa B-mediated JNK pathway in cognitive impairment in a rat model of sleep apnea[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(12): 6921-6931.
- [7] Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B[J]. *Mechanisms of Development*, 1993, 43(2-3): 135-147.
- [8] Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG, et al. Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity[J]. *Brain research. Molecular Brain Research*, 1996, 38(2): 179-190.
- [9] Bhakar A L, Tannis L L, Zeindler C, et al. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(19): 8466-8475.
- [10] Chiarugi A. Characterization of the molecular events following impairment of NF-kappaB-driven transcription in neurons[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002, 109(1/2): 179-188.
- [11] Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, et al. Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(24): 10356-10365.
- [12] Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, et al. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons[J]. *J Cell Biol*, 2000, 14(2): 325-332.
- [13] Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B[J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1994, 10: 405-455.
- [14] Dejardin E. The alternative NF-kappa B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(9): 1161-1179.
- [15] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [16] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity[J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(6): 280-288.
- [17] Wherlock M, Mellor H. The Rho GTPase family: a Rac to Wrchs story[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(2): 239-240.