

Y27632 对脊髓损伤微环境下新生大鼠背根节神经元轴突再生的影响

黄贻泽,冯大雄,李 骏,康建平,叶 飞

(泸州医学院第一附属医院脊柱外科 646000 四川省泸州市)

【摘要】目的:探讨 Rho 蛋白激酶 II (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase II, ROCK II) 特异性抑制剂 Y-27632 对脊髓损伤微环境下新生大鼠背根节(dorsal root ganglion, DRG)神经元轴突再生和延长的影响。**方法:**取新生(<5d)SD 大鼠胸腰段 DRG 神经元进行原代培养、提纯和鉴定。将健康雌性 SD 成年大鼠 15 只随机分为脊髓损伤组、假手术组和正常组,每组 5 只;用 WD 法制成 T9 平面脊髓损伤动物模型,造模 7d 后取 T8~T10 节段脊髓制作脊髓提取液。将新生大鼠 DRG 神经元分为 5 组进行培养:A 组,DRG 神经元+PBS;B 组,DRG 神经元+正常组脊髓提取液;C 组,DRG 神经元+假手术组脊髓提取液;D 组,DRG 神经元+损伤脊髓提取液;E 组,DRG 神经元+损伤脊髓提取液+不同浓度(5、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$)Y27632。培养 2d 后观察并比较各组新生大鼠 DRG 神经元轴突平均长度和微管(Tubulin β III)荧光表达强度。**结果:**A、B 和 C 组平均神经轴突长度及轴突远端 tubulin β III 表达强度比较无统计学差异($P>0.05$);D 组明显减小,与 A、B 和 C 组分别比较有统计学差异($P<0.05$)。5、10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组平均轴突长度以及轴突远端和生长锥 tubulin β III 表达强度比 D 组有所增加 ($P<0.05$),10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组增加更明显,但小于 A、B 和 C 组 ($P<0.05$)。20~50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组平均轴突长度以及轴突远端和生长锥 tubulin β III 表达强度三组间比较无统计学差异($P>0.05$);与 5~10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组、D 组比较明显增加($P<0.05$);与 A、B、C 组比较平均轴突长度无统计学差异($P>0.05$),平均荧光密度明显增加($P<0.05$)。**结论:**损伤脊髓提取液能明显抑制新生大鼠 DRG 神经元轴突生长,导致轴突回缩。加入 5~10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 能促进轴突生长,20~50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 更能明显促进轴突生长。

【关键词】 脊髓损伤;背根节;轴突再生;Y27632;Rho 蛋白激酶 II;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.09.16

中图分类号:R683.2,R965.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-09-0765-06

In vitro effect of Y27632 on dorsal root ganglion neurons axonal regeneration in neogenetic rats with spinal cord injury/HUANG Yize, Feng Daxiong, LI Jun, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(9): 765~770

【Abstract】 Objective: To explore the in vitro effect of Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase II (ROCK II) inhibitor(Y27632) on dorsal root ganglion(DRG) neurons axonal growth and extension with in neogenetic rats with spinal cord injury.**Method:** All thoracic-lumbar DRGs harvested from new-born Sprague-Dawley(SD) rats(<5d) were cultured, purified and indentified. 15 adult female SD rats were randomly divided into three groups with each group of 5 animals. 5 animals were subjected to weight-drop impact inducing T9 spinal cord injury(SCI), 5 in sham operation group and 5 in normal group. T8-T10 spinal cord extracts(SCEs) were harvested in each group at 7th day after spinal cord injury. The experiment was divided into 5 groups which termed as followings: DRG neurons + phosphate-buffered saline(PBS)(group A), DRG neurons + normal SCEs(group B), DRG neurons + sham operation SCEs(group C), DRG neurons + SCI SCEs(group D) and DRG neurons + SCI SCEs +(5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$)Y27632 (group E). The average axonal length and positive expression of tubulin β III at distal end of neuronal axons were observed after 2 days' co-culture respectively in intro.**Result:** There was no difference with regarding to average axonal length among group A, B and C respectively, while the axonal length in group D was significant shorter

基金项目:国家自然科学基金课题(批准编号:30872602)

第一作者简介:男(1975-),主治医师,医学硕士,研究方向:脊髓损伤(现在四川省隆昌县人民医院骨二科 642150)

电话:(0832)3953558 E-mail:jane_hyz@163.com 通讯作者:冯大雄 E-mail:fdxlz2002@163.com

than in group A, B and C. The mean tubulin β III fluorescence densities of axonal distal end in group D was significant weaker than in group A, B and C no difference existed between group A, B and C. In 5–10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 group, there were average longer axonal length and higher expression of tubulin β III at axonal distal end than in group D, but less than in group A, B and C respectively. 10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 group showed longer length and higher expression than 5 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 group. In 20–50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 groups, average axonal length showed no difference but higher expression of tubulin β III at axonal distal end existed compared with group A, B and C, which was more than 5–10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 groups and group D. There no difference among 20–50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 groups. **Conclusion:** The SCI SCEs inhibit DRG neurons axonal growth obviously, 5–10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 could promote axon growth, while 20–50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 could promote axon growth obviously.

[Key words] Spinal cord injury; Dorsal root ganglia; Axonal regeneration; Y27632; Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase II; Rat

[Author's address] Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Sichuan, 646000, China

脊髓损伤(SCI)后中枢神经轴突不能再生, 其原因为SCI后微环境中存在大量抑制轴突再生和延长的因子。这些因子主要有髓鞘相关抑制因子、瘢痕组织中的硫酸软骨素糖蛋白(chondroitin sulphate proteoglycans, CSPGs)、轴突引导因子及SCI后血小板释放的溶血磷脂酸, 它们通过共同的细胞信号途径, 作用于轴突的生长锥, 使生长锥内的肌球蛋白和肌动蛋白丝收缩、肌动蛋白丝解聚, 影响微管的动态平衡, 使轴突生长锥始终保持在被抑制状态, 生长锥塌陷^[1-3]。在这一细胞信号途径中, Rho蛋白激酶II (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase II, ROCK II) 被磷酸化而激活, 作用于多种蛋白质底物而产生级联瀑布信号传递, 起着重要的因子开关作用^[4]。本研究从SCI后整个抑制环境的角度出发, 观察ROCK II特异性抑制剂Y27632对新生大鼠背根节(dorsal root ganglia, DRG)神经元轴突生长和延长的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要器材

SD大鼠(泸州医学院实验动物中心), 不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的PBS、DMEM/F12培养基、胎牛血清(Hyclong公司), 神经细胞培养基(NM)、神经细胞生长添加剂、青链霉素溶剂(Scien Sell公司), 兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)(博士德公司), 单克隆兔抗大鼠tubulin β III抗体(Abcam公司), I型胶原酶、Y27632(SIGMA公司), 层流超菌工作台(上海力申科学仪器有限公司), Heraeus高

速冷冻离心机、Hera Cell 150 CO_2 培养箱(德国Heraeus公司)、恒温震荡培养箱(上海天呈实验仪器制造有限公司), Olympus CKX41倒置显微镜、带Image-Pro Plus 6.0软件的Olympus荧光显微镜(日本OLYMPUS光学仪器有限公司)。

1.2 新生大鼠DRG神经元的分离、培养、纯化与鉴定

取新生SD大鼠(<5d)2只, 在体视显微台下, 逐个取出胸腰段DGR, 立即置于4℃ PBS无菌溶液中, 修剪远近端神经根和被膜, 并剪碎置于1U/ml I型胶原酶中酶解消化、机械吹打、离心后, 将DRG神经元重新悬浮于含有100U/ml青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、2mmol/L左谷氨酰胺和10%胎牛血清及10%阿糖胞苷(抑制非神经元细胞生长, 纯化神经元)的DMEM/F12培养液中; 细胞计数后, 按照每培养皿约 $(10\sim15)\times10^5$ 个/ml密度(每培养皿1.5ml培养液)进行细胞贴壁培养, 置于37℃、5% CO_2 、饱和湿度孵箱中孵化3~4h, 待细胞贴壁后加入上述DMEM/F12培养液1ml过夜; 次日, 抽去DMEM/F12, 加入NM培养液1.5ml继续培养, 每2d更换半量培养液。培养5d后, 取新生SD大鼠DRG神经元原代培养皿, 用NSE进行神经元特异性细胞免疫染色(光镜下观察胞浆黄染视为NSE细胞免疫阳性, 为神经元细胞), 纯化后的神经元占总细胞的95%以上。

1.3 大鼠脊髓提取液的制备

健康雌性SD成年大鼠15只, 体重200~250g, 随机分为SCI组、假手术组和正常组, 每组5只。SCI组用WD法^[4](垂直打击法, 10g打击棒

25mm 高度垂直打击)制成 T9 平面完全性截瘫的 SCI 动物模型,假手术组仅椎板开窗,正常组不做任何手术处理。造模后 1 周取出 T8~T10 节段脊髓(每份标本重 100~120mg),立即 4℃ PBS 无菌溶液中修剪脊膜、部分神经根,洗去表面血迹,每份标本置于 1ml 无菌 PBS 中进行匀浆、离心(3000r/min,10min),取上清液,用 0.2μm 的针头滤器过滤后冷冻(-20℃)保存备用。

1.4 新生大鼠 DRG 神经元轴突生长和延长观察

新生大鼠 DRG 神经元原代培养 5d 后,去除培养液,每培养皿加入 NM 培养液 1.5ml。分为 5 组:A 组,DRG 神经元+PBS;B 组,DRG 神经元+正常组大鼠脊髓提取液;C 组,DRG 神经元+假手术组脊髓提取液;D 组,DRG 神经元+损伤脊髓提取液;E 组,DRG 神经元+损伤脊髓提取液+不同浓度(5、10、20、30、40、50μmol/L)Y26732。每组 4 个培养皿,包括 E 组各亚组。A 组每皿加入 60μl PBS,B 组每皿加入 60μl 正常脊髓提取液,C 组每皿加入 60μl 假手术脊髓提取液,D 组每皿加入 60μl 损伤脊髓提取液,E 组每皿加入 60μl 损伤脊髓提取液和不同浓度的 Y26732。置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱中共同培养 2d 后,于倒置显微镜下观察 DRG 神经元轴突生长情况并行照相,用 Image-Pro Plus 6.0 软件随机测量每组图片(放大倍数 10×100)中 60 个神经元的轴突长度,自轴突起始到最远端的距离测得每个神经元轴突实际长度(以最长轴突的长度作为每个神经元的轴突长度),计算每组平均轴突长度。

共同培养 2d 后的新生 SD 大鼠 DRG 神经元用 PBS 漂洗 3 次,4%多聚甲醛固定 30min;PBS 漂洗 3 次,固定后进行细胞免疫荧光 NSE 鉴定神经元。0.1%Triton X-100 室温下进行细胞打孔 10min,10%山羊血清室温孵育 10min 后,去血清,勿洗;加入 1:100 兔抗鼠 NSE,4℃过夜;加入 1:200 带荧光标记的单克隆抗 tubulin β III 二抗,37℃避光孵育 30~60min,PBS 漂洗 3 次,立即暗室里荧光观察,照相。荧光显微镜下观察到细胞及轴突呈绿色荧光为荧光染色阳性。用带 Image-Pro Plus 6.0 软件的 Olympus 荧光显微镜进行每组荧光照相,按 He 等^[5]描述的方法,测量轴突远端约 50μm 长的平均微管荧光密度[(任意荧光单位(AFU)/μm)],即:[总荧光密度(I_t)-背景荧光密度(I_b)]/轴突长度(L)(图 1)。

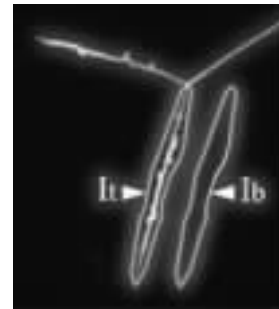


图 1 荧光密度测量示意图 (I_t, 轴突远端总微管荧光密度;I_b, 背景荧光密度;L, 所测量的轴突远端长度;AFU, 任意荧光单位)。轴突远端平均微管荧光密度(AFU/μm)=(I_t-I_b)/L

1.5 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

各组新生 SD 大鼠 DRG 神经元培养 5d 后,加入不同成分共同培养 2d 后平均神经轴突长度和轴突远端平均荧光密度见表 1。30μmol/L Y26732 治疗组平均轴突长度增长最明显。A、B 和 C 组之间比较无统计学差异;D 组平均轴突长度明显减小,与 A、B 和 C 组比较均有统计学差异($P < 0.05$);5μmol/L Y26732 治疗组与 D 组比较无统计学差异($P > 0.05$),10μmol/L Y26732 治疗组平均轴突长度有所增加,与 5μmol/L Y26732 治

表 1 各组新生大鼠 DRG 神经元轴突长度及轴突远端荧光密度 ($\bar{x} \pm s, n=60$)

	平均轴突长度 (μm)	轴突远端平均荧光密 度(AFU/μm)
空白组(A组)	396.5±22.4	208.2±5.6
正常组(B组)	392.2±15.4	206.2±6.6
假手术组(C组)	388.6±13.0	204.6±7.0
脊髓损伤组(D组)	128.6±13.8 ^①	67.1±4.2 ^①
Y26732 组(E组)		
5μmol/L	156.4±23.3 ^{①②}	124.6±3.4 ^{①②}
10μmol/L	264.5±29.8 ^{①②}	162.0±3.6 ^{①②}
20μmol/L	386.6±40.4 ^{③④}	345.0±3.9 ^{④⑤}
30μmol/L	431.2±40.4 ^{③④}	362.0±5.6 ^{④⑤}
40μmol/L	378.2±45.7 ^{③④}	360.3±4.2 ^{④⑤}
50μmol/L	399.8±49.8 ^{③④}	366.4±4.5 ^{④⑤}

注:①与 A、B 和 C 组比较 $P < 0.05$;②与 D 组比较 $P < 0.05$;③与 A、B 和 C 组比较 $P > 0.05$;④与 5~10μmol/L Y26732 治疗组和 D 组比较 $P < 0.05$;⑤与 A、B 和 C 组比较 $P < 0.05$

疗组、D 组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 但 5~10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组仍小于 A、B 和 C 组 ($P < 0.05$); 20~50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组平均轴突长度明显增加, 与 A、B 和 C 组比较均无统计学差异 ($P > 0.05$), 与 5~10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 组、D 组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 20~50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组之间比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。

A、B 和 C 组轴突 tubulin β III 表达强, 轴突远端和生长锥表达更强(图 2a~c), 两两之间比较无

统计学差异; D 组神经胞体 tubulin β III 有表达, 但在轴突表达弱, 轴突远端和生长锥几乎无表达(图 2d), 与 A、B 和 C 组比较差异显著 ($P < 0.01$); 5、10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 组轴突生长比 D 组好, 轴突远端和生长锥 tubulin β III 有所增强(图 2e、f), 但不如 A 组荧光表达强 ($P < 0.05$), 5、10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 组之间比较无统计学差异 ($P < 0.05$); 20~50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 组轴突远端和生长锥 tubulin β III 明显增强, 形成细长轴突和生长锥(图 2g~j),

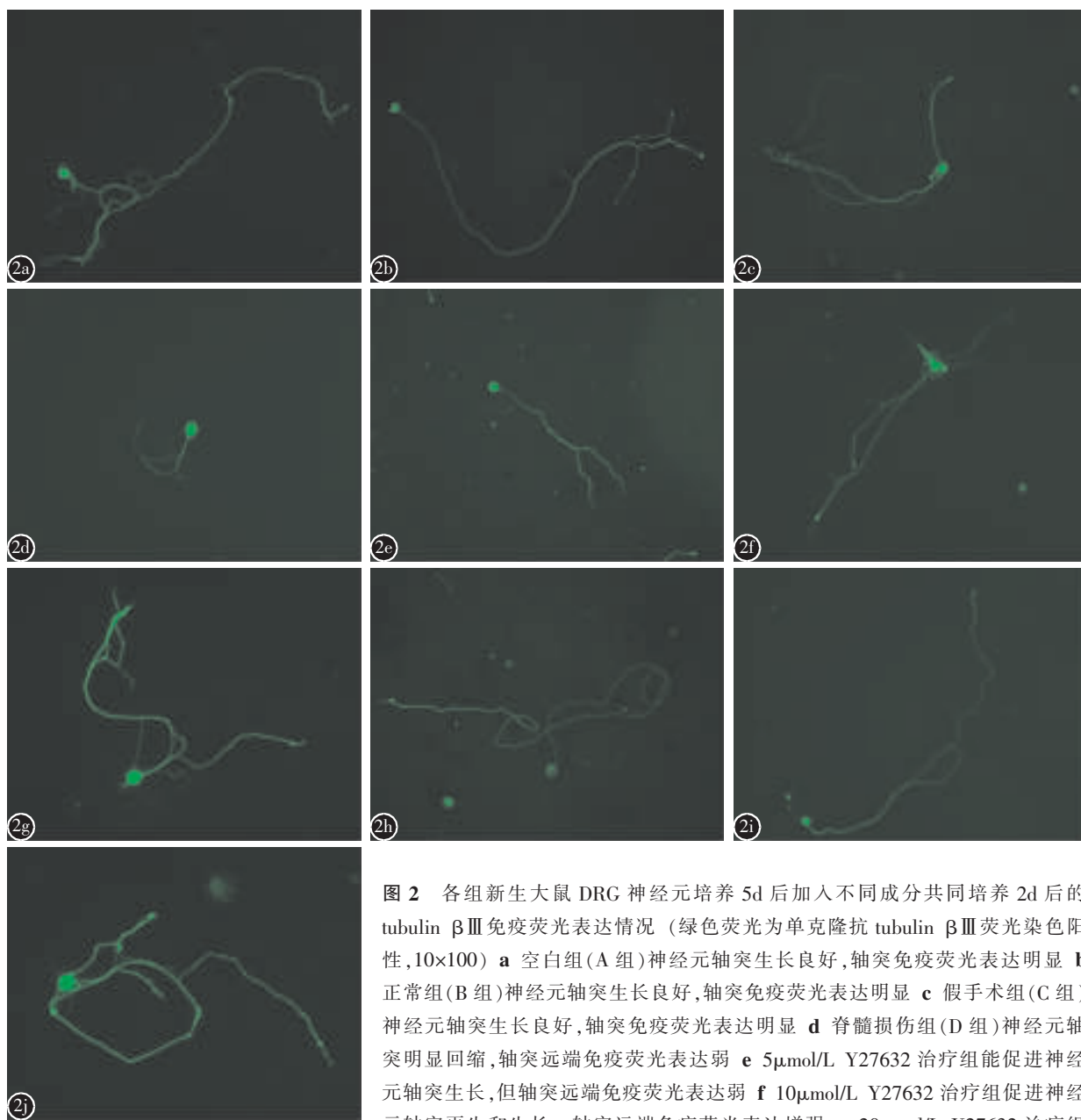


图 2 各组新生大鼠 DRG 神经元培养 5d 后加入不同成分共同培养 2d 后的 tubulin β III 免疫荧光表达情况 (绿色荧光为单克隆抗 tubulin β III 荧光染色阳性, 10×100) a 空白组(A 组)神经元轴突生长良好, 轴突免疫荧光表达明显 b 正常组(B 组)神经元轴突生长良好, 轴突免疫荧光表达明显 c 假手术组(C 组)神经元轴突生长良好, 轴突免疫荧光表达明显 d 脊髓损伤组(D 组)神经元轴突明显回缩, 轴突远端免疫荧光表达弱 e 5 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组能促进神经元轴突生长, 但轴突远端免疫荧光表达弱 f 10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组促进神经元轴突再生和生长, 轴突远端免疫荧光表达增强 g 20 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组

促进神经元轴突再生和生长, 轴突远端免疫荧光表达明显 h 30 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组促进神经元轴突再生和生长, 形成细长轴突, 轴突远端免疫荧光表达明显 i 40 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组促进神经元轴突再生和生长, 形成细长轴突, 轴突远端免疫荧光表达明显 j 50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组促进神经元轴突再生和生长, 形成细长轴突, 轴突远端免疫荧光表达明显

与 A、B 和 C 组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$), 与 5~10 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组、D 组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 而 20~50 $\mu\text{mol/L}$ Y27632 治疗组之间比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 Rho-ROCK II 细胞信号途径对脊髓损伤后轴突再生抑制信号传递的作用

SCI 后, 原发损伤与继发损伤形成了髓鞘残片、少突胶质细胞、少突胶质细胞碎片残留、损伤所致的反应性胶质瘢痕以及脊髓空洞共存的微环境。国内外研究证实, 在 SCI 后的微环境中, 存在许多生长抑制分子和轴突排斥分子, 如髓鞘相关的抑制分子、胶质瘢痕中的抑制分子、轴突引导分子和血小板释放的溶血磷脂酸等。象真核细胞一样, 这些细胞外抑制分子通过膜外向膜内信号受体信号传递, 最终作用于轴突生长锥的细胞骨架, 导致生长锥的塌陷和轴突回缩。(1)在髓鞘相关的抑制分子中排斥引导分子 a (repulsive guidance molecule a, RGMa) 及排斥引导分子 b (repulsive guidance molecule b, RGMb) 均与膜受体 neogenin 特异性结合, 它们通过膜受体传递胞外抑制信号至质膜内, 均作用于细胞内小分子 Rho GTP 酶, 在 Rho 鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) 作用下与 ATP 结合而激活。激活的 Rho 与其下游的效应器蛋白 ROCK II 的 Rho 结合结构域相结合, 自身抑制环打开, 使 ROCK II 结合 ATP 而激活^[6]。(2)脊髓实质损伤后形成囊性空洞, 周围包绕着胶质瘢痕, 胶质瘢痕含有大多数基质分子抑制轴突再生。研究发现这些细胞外基质分子主要是 CSPGs 家族分子, 在发育中的 CNS 有较高表达, 成年后表达明显降低, SCI 后表达升高^[7]。Gopalakrishnan 等^[7]通过 PC12 细胞、Chan 等^[8]等通过 DRG 神经元与 CSPGs、Rho(C3) 或 ROCK II 的抑制剂 (Y27632) 共同培养, 并检测其作用底物, 证实 CSPGs 通过 Rho/ROCK II 信号传递途径抑制轴突的再生。(3)SCI 后, 其轴突排斥分子表达重新出现或表达上调, 主要是 Semaphorin 及 Ephrin^[9]。经体外培养证实, Ephrin B3 在纳克浓度下, 可抵抗神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 对轴突的再生作用; 在相同浓度下, Ephrin-B3 比 MAG 更明显强烈地抑制轴突的再生与延长, 它与其受体 EphA4 结合

后, 再与 P75NTR 形成复合物, 通过 Rho/ROCK II 信号传递途径, 抑制轴突的再生^[9]。(4)SCI 后, 激活的血小板释放的溶血磷脂酸与轴突表面受体结合, 除通过 Ca^{2+} 敏感的酪氨酸激酶 (Pyk2), 使葡萄糖原合成酶 3 β (GSK-3 β) 的酪氨酸磷酸化、第 9 和第 21 位的苏氨酸磷酸化, 导致微管相关蛋白 tau 磷酸化引起轴突回缩外, 还通过激活 Rho/ROCK-II 信号途径而抑制轴突再生^[10]。因此, 调控 ROCK-II 的活性对克服 SCI 后微环境中轴突生长抑制分子具有重要作用。

3.2 Y27632 对 SCI 后神经元轴突生长的影响

有研究表明, 大鼠 SCI 后, 局部应用 C3 转移酶 (Rho 抑制剂)^[11]、局部或鞘内注射 Y27632^[12]、腹腔内注射 Fasudil^[13] 能阻断 Rho-ROCK II 信号传导途径, 具有神经保护、抑制凋亡、减少胶质瘢痕、促进轴突再生与功能恢复的作用。分析这些抑制剂及相应的动物实验结果发现, 由于 C3 转移酶对 RhoA、B、C 等都有抑制作用; Fasudil 是非选择性的蛋白激酶抑制剂, 故二者对阻断 Rho-ROCK II 信号传导途径的特异性差; Y27632 是吡啶类衍生物, 有很好的细胞渗透性, 能通过和 ATP 竞争性地与 ROCK II 结合, 抑制其活化, 对 ROCK II 的抑制作用要比 Rho 的其他效应底物强几十倍, 促进 SCI 后轴突再生与生长, 也是目前研究较为广泛的 ROCK II 抑制剂。Y27632 同时还抑制 PRK2 (蛋白激酶 C 相关蛋白酶, 也是 Rho 的下游效应底物, 与 ROCK 有相似作用)、蛋白激酶 C (PKC)、PKA (依赖 cAMP 的蛋白激酶) 等其他蛋白酶, 从而促进神经生长和轴突延长^[14]。本研究以成年 SD 大鼠 SCI 后的损伤脊髓提取液视作 SCI 后微环境, 观察到新生大鼠 DRG 神经元和损伤脊髓提取液共同培养时, 轴突生长明显被抑制, 生长锥塌陷, 轴突远端和生长锥的 tubulin β III 表达极差或表达消失, 轴突生长锥塌陷, 抑制轴突延长, 轴突回缩。而正常脊髓提取液和假手术脊髓提取液不能抑制轴突延长, 轴突生长良好, 生长锥无塌陷, 轴突远端和生长锥 tubulin β III 表达明显。同时发现, Y27632 能促进轴突生长和延长, 并能增强轴突远端和生长锥的 tubulin β III 表达。

尽管如此, 抑制 ROCK II 仍不能“显著”促进轴突再生与功能恢复^[15]。Gopalakrishnan 等^[7]在鸡 DRG 神经元与 CSPGs 共同培养和 Y27632 促进轴突再生实验观察到, Y27632 的半效浓度

(EC50) 是 $12.4 \pm 2.3 \mu\text{mol/L}$, 最大有效剂量是 $100 \mu\text{mol/L}$, 低浓度 ($<10 \text{mmol/L}$) Y27632 不能促进未分化细胞轴突生长和延长, 高浓度 ($>25 \text{mmol/L}$) Y27632 才能促进神经元轴突再生和延长。其机制是: Y27632 抑制 ROCK II, 从而抑制磷酸化肌球蛋白轻链, 促进肌动蛋白解聚, 减少生长锥中心的 F-actin 束形成, 促进微管进入生长锥, 加强生长锥中微管组装, 形成丝足和少量的中心肌动蛋白束^[7]。低浓度 Y27632 也能影响其他类型细胞, 从而影响轴突生长、再生, 比如星形细胞, 导致出现反应性星形细胞增生, 星形细胞表达增强, 产生更多的生长抑制因子, 加强抑制轴突再生和延长^[15]; 高浓度 Y27632 不仅能完全抑制激活的 ROCK II, 还能抑制神经细胞内源性的 ROCK II 及 Prk2、PKC、PKA 等其他蛋白酶, 能明显促进轴突再生和延长^[14]。有学者也报道, 低浓度抑制 ROCK II 可促进胶质瘢痕的增生, 反而抑制神经生长, ROCK II 还与胞内其它蛋白激酶有“串线”作用^[15]。Chan 等^[15]用微泵给药的方式观察不同浓度的 ROCK II 抑制剂 Y27632 对 C4/5 脊髓背侧半切的 SD 大鼠轴突生长与功能恢复的影响, 共给药 14d, 以 PBS 为对照, 观察 6 周, 发现仅在高浓度下 (20mmol/L , $12 \mu\text{l/d}$) 损伤灶远端的周围灰质内有明显的上升与下降的皮质脊髓束的轴突出芽, 同时伴肢体的功能恢复, 脑积液内 ROCK II、cofilin 磷酸化水平降低; 在低浓度 (2mmol/L , $12 \mu\text{l/d}$) 下, 无轴突再生, 甚至减少轴突再生, 且无运动功能的恢复与前肢功能的代偿, 脑积液内 ROCK II、cofilin 磷酸化水平无改变。本研究观察到 $5 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ Y27632 均能促进 SCI 微环境下新生大鼠 DRG 神经元生长和轴突延长, 而 $20 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ Y27632 的促进作用较 $5 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ Y27632 更明显, 因而, 适当高浓度的 ROCK II 抑制剂能更有效促进轴突再生和延长。

4 参考文献

- Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(5): 387-398.
- Hsieh SHK, Ferraro GB, Fournier AE. Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and slingshot phosphatase [J]. J Neurosci, 2006, 26(3): 1006-1015.
- Arimura N, Menager C, Kawano Y, et al. Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(22): 9973-9984.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-12.
- He Y, Yu W, Baas PW. Microtubule reconfiguration during axonal retraction induced by nitric oxide [J]. J Neurosci, 2002, 22(14): 5982-5991.
- Myers KA, He Y, Hasaka TP, et al. Microtubule transport in the axon: re-thinking a potential role for the actin cytoskeleton [J]. Neuroscientist, 2006, 12(2): 107-118.
- Gopalakrishnan SM, Teusch N, Imhof C, et al. Role of Rho kinase pathway in chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells [J]. J Neurosci Res, 2008, 86(10): 2214-2226.
- Chan CC, Roberts CR, Steeves JD, et al. Aggrecan components differentially modulate nerve growth factor-responsive and neurotrophin-3-responsive dorsal root ganglion neurite growth [J]. J Neurosci Res, 2008, 86(3): 581-592.
- Bolsover S, Fabes J, Anderson PN. Axonal guidance molecules and the failure of axonal regeneration in the adult mammalian spinal cord [J]. Restor Neurol Neurosci, 2008, 26(2-3): 117-130.
- Sayas CL, Ariaens A, Ponsioen B, et al. GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(4): 1834-1844.
- Lehmann M, Fournier A, Sellws-Navarro I, et al. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration [J]. J Neurosci, 1999, 19(17): 7537-7547.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, et al. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair [J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6570-6577.
- Hara M, Takayasu M, Watanabe K, et al. Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats [J]. J Neurosurg, 2000, 93(1 Suppl): 94-101.
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases [J]. Mol Pharmacol, 2000, 57(5): 976-983.
- Chan CC, Khodarahmi K, Liu J, et al. Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2005, 196(2): 352-364.

(收稿日期: 2010-06-01 修回日期: 2010-08-03)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 李伟霞)