论著

DOI: 10.3969/j.issn. 1671 -4695.2022.09.001 文章编号: 1671 -4695(2022)09 -0897 -05

溶血磷脂酸调控 RhoA/ROCK2 信号通路对大鼠脑缺血再灌注后的影响

李秋菊[1] 隋航[2] 房金妮[1] 庄绪娟[1] [山东第一医科大学附属青岛医院(青岛市城阳区人民医院) 1 神经内科; 2 神经外科 山东 青岛 266109]

【摘要】 目的 分析溶血磷脂酸(LPA)调控 RhoA/ROCK2 信号通路对脑缺血再灌注后的影响。方法 使用线栓法成功构建 20 只脑动脉栓塞大鼠,缺血 2 h 后再行灌注,灌注 24 h 后完成脑缺血再灌注模型,将其按照随机数字表法分为两组,每组各 10 只,分别为模型组和 LPA 组。LPA 组每日腹腔注射 50 μmol/L 的 LPA,模型组每日腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液,同时随机纳入 10 只健康大鼠作为对照组,各组均标准饲养 14 d。比较各组大鼠脑神经细胞活力、迁移、凋亡情况,并比较各组大鼠 14 d 后脑神经细胞炎症因子[白细胞介素(IL) -6、IL -1β、肿瘤坏死因子 α(TNF -α)]水平、细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白和 mRNA 表达情况。结果 标准饲养 7 d 和 14 d 后,模型组大鼠的脑神经细胞活力和迁移个数均低于对照组,LPA 组大鼠的脑神经细胞活力和迁移个数均高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$);且标准饲养 14 d 后,LPA 组大鼠的脑神经细胞活力和迁移个数高于 7 d 时,而模型组大鼠 14 d 的脑神经细胞活力和迁移个数低于 7 d 时,差异均有统计学意义($P<0.05$)。标准饲养 7 d 和 14 d 后,模型组大鼠的脑神经细胞凋亡率均高于对照组,LPA 组大鼠的脑神经细胞凋亡率低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$);标准饲养 14 d 后,LPA 组大鼠的脑神经细胞凋亡率低于 7 d,而模型组大鼠 14 d 的脑神经细胞凋亡率高于 7 d 时,差异均有统计学意义($P<0.05$)。标准饲养 14 d 后,模型组大鼠的脑神经细胞 IL -6、IL -1β、TNF -α 水平均高于对照组,LPA 组大鼠的脑神经细胞 IL -6、IL -1β、TNF -α 水平低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。标准饲养 14 d 后,模型组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白和 mRNA 均低于对照组,LPA 组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白和 mRNA 均高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 LPA 可通过调控 RhoA/ROCK2 信号通路提高脑神经细胞活性,促进迁移,抑制凋亡,缓解炎症反应。

【关键词】 大鼠 脑缺血再灌注 溶血磷脂酸 RhoA/ROCK2 信号通路

Effect of lysophosphatidic acid - regulated RhoA/ROCK2 signaling pathway on cerebral ischemia and reperfusion in rats.

LI Qiu - ju[1], *SUI Hang*[2], *FANG Jin - ni*[1], *et al.* 1 *Department of Neurology*, 2 *Department of Neurosurgery*, *Qingdao Hospital Affiliated to Shandong First Medical University* (*Qingdao Chengyang District People's Hospital*, *Qingdao Shandong* 266109, *China*.

【**Abstract**】 **Objective** To analyze the effect of lysophosphatidic acid (LPA) regulating RhoA/ROCK2 signaling pathway on cerebral ischemia and reperfusion. **Methods** Twenty rats with cerebral artery embolization were successfully constructed using the thread embolization method. The rats were reperfused after 2 hours of ischemia, and the cerebral ischemia reperfusion model was completed after 24 hours of perfusion. They were divided into 2 groups according to the random number table method, each with 10 rats, the model group and the LPA group. The LPA group was intraperitoneally injected with 50 μmol/L LPA daily, and the model group was intraperitoneally injected with the same amount of normal saline daily. At the same time, 10 healthy rats were randomly included as the control group. Each group was fed for 14 days. The viability, migration, and apoptosis of brain nerve cells in each group were compared, and the levels of inflammatory factors [interleukin(IL) -6, IL -1β and tumor necrosis factor α (TNF -α)] in brain nerve cells, the expression of RhoA and ROCK2 protein and mRNA in the cells were compared after 14 days. **Results** The brain nerve cell activity and migration number of rats in the model group were lower than the control group after standard feeding for 7 days and 14 days, and the LPA group were higher than the model group, the differences were statistically significant($P<0.05$); after 14 days of standard feeding, the viability and migration number of cerebral nerve cells in LPA group were higher than those at 7 days, while the viability and migration number of brain nerve cells in model group rats at 14 days were lower than 7 days, the differences were statistically significant($P<0.05$). After standard feeding for 7 days and 14 days, the apoptosis rate of brain nerve cells in the model group was higher than that of the control group, and the LPA group was lower than the model group, the differences were statistically significant($P<0.05$); after 14 days of standard feeding, the apoptosis rate of brain nerve cells in LPA group was lower than that at 7 days, while the apoptosis rate of brain nerve cells in model group rats at 14 days was higher than that at 7 days, the differences were statistically significant($P<0.05$). After standard feeding for 14 days, the levels of IL -6, IL -1β and TNF -α in the brain nerve cells of the model group were higher than those of the control group, the LPA group were lower than those of the model group, the differences were statistically significant($P<0.05$). After standard feeding for 14 days, the expression of RhoA, ROCK2 protein and mRNA in the brain nerve cells of the model group were lower than those in the control group, and the RhoA, ROCK2 protein and mRNA in the brain nerve cells of the LPA group were higher than those in the model group, and the differences were

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0290)

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** LPA can increase brain nerve cell activity by regulating RhoA/ROCK2 signaling pathway, promote migration, inhibit apoptosis, and alleviate inflammatory response.

【**Key words**】 Rats; Cerebral ischemia reperfusion; Lysophosphatidic acid; RhoA/ROCK2 signaling pathway

缺血性脑血管病是一种发病率和致死率均较高的疾病,对人类生命健康有严重影响,近年来我国缺血性脑血管病的致死率一直居于各类疾病之首,因此临床中对于脑缺血再灌注损伤的研究已经成为热点工作[1]。已有学者发现[2],脑缺血再灌注的发生机制与氧化应激、钙超载、炎症、细胞凋亡和能量障碍等多种因素,当发生脑缺血时,凋亡蛋白表达激活,容易造成脑细胞凋亡,因此临床中应当积极开展抗细胞凋亡治疗,以减少神经损伤。Rho 家族蛋白及其下游信号靶蛋白 Rho 激酶 2(ROCK2) 是与肿瘤的生长、增殖、侵袭、转移、凋亡等密切相关的蛋白,其为肿瘤发生、发展的重要指标,已经证实 RhoA/ROCK2 信号通路在乳腺癌、甲状腺髓样癌等的发生中均有重要作用[3]。近年来研究发现,溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid,LPA) 作为结构最简单的磷脂,是与肿瘤发生、发展均有密切相关性的细胞间信号分子,机体内 LPA 可来源于多种组织细胞内,且已知其在心血管系统中均表现出重要的生物学功能,如促进血小板聚集、诱导血管平滑肌收缩、促进心肌成纤维细胞增殖、促进血管平滑肌细胞增殖、介导内皮细胞和心肌细胞损伤等,与心肌细胞的多种离子通道均有调节作用,也参与了多种心脑血管疾病的发生、发展[4-5]。但临床中对于溶血磷脂酸、RhoA/ROCK2 信号通路的相关报道均相对较少,因此本文分析了 LPA 调控 RhoA/ROCK2 信号通路对脑缺血再灌注后的影响,以期能为今后临床治疗提供参考。现分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 实验材料 选择 30 只无特定病原体级成年雄性 SD 大鼠[广东省医学实验动物中心,许可证: SCXK(粤) 2021 -0035],体重为 220 ~250 g,平均(235.48 ±12.92) g。

1.2 试剂与仪器 (1) 试剂: LPA 购自中国南京博研生物科技有限公司; DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自中国浙江天杭生物科技股份有限公司; 噻唑蓝(MTT) 、预染 Marker 均购自美国赛默飞世尔公司; 青霉素 - 链霉素双抗、0.25% 胰酶均购自美国 Sigma 公司; 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; 银染试剂盒购自中国上海碧云天生物科技有限公司; AO/EB 染液、Tris、PIPA 裂解液均购自北京索莱宝科技有限公司; 聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF) 膜、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL) 发光液均购自美国 Millipore 公司; 一抗购自英国 Abcam 公司。(2) 仪器: 超净工作台购自美国 Airtech 公司; 细胞培养箱购自中国上海力申科学仪器有限公司; 超低温冰箱购自美国 Thermo 公司; -80 ℃冰箱购自美国 Thermo Scientific 公司; 精密电子天平购自德国 Sartorius 公司; 高压蒸汽灭菌锅购自日本雅马拓公司; 恒温水浴箱购自中国上海 Lichen 公司; 电泳仪购自美国 BIO - RAD 公司; 12/96 孔细胞培养板购自美国 Costar 公司; 细胞冻存管购自美国 Corning 公司; 高速离心机购自德国 Eppendorf 公司; 转膜仪购自美国 BIO - RAD 公司; 摇床购自德国 IKA 公司。

1.3 造模及分组

1.3.1 造模 采用 Longa 等改良的线栓法成功构建 20 只脑动脉栓塞大鼠,缺血 2 h 后再行灌注,灌注 24 h 后完成脑缺血再灌注模型。具体如下: 给予大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉,备皮消毒后将颈部皮肤切开,将周围组织钝性分离,暴露并分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,并给予颈外动脉结扎,使用动脉夹将颈内动脉和颈总动脉暂时夹闭,在距离颈总动脉分叉 0.4 cm 部位剪出小口,将制备好的线栓掺入,松开动脉夹,使线栓进入颅内 17 cm 左右,确保大脑动脉血流阻断。固定线栓,2 h 后将其拔除并缝合皮肤。造模成功标准: 术后大鼠麻醉清醒后出现站立不稳、左侧肢体瘫痪、提尾时向一侧转圈为造模成功。

1.3.2 分组 将成功制备的 20 只脑缺血再灌注模型大鼠随机数字表法分为两组,每组各 10 只,分别为模型组和 LPA 组。LPA 组每日腹腔注射 50 μmol/L 的 LPA,模型组每日腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液。同时纳入 10 只健康大鼠作为对照组,各组均标准饲养 14 d。

1.4 检测方法

1.4.1 获取大鼠脑神经细胞 标准饲养 7 d 和 14 d 后各组均采用断头法处死 5 只大鼠,取大鼠脑组织,置于 -20 ℃冰箱内冷冻 20 min,取 2 mm 脑组织制备细胞悬液,使用 DMEM 培养液(含 1% 青霉素 - 链霉素双抗 + 10% 胎牛血清) 进行常规培养,置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱内培养至细胞贴壁生长且形态良好,待细胞铺满瓶壁 70% 则进行转代,取对数生长期细胞开展后续研究。

1.4.2 细胞活力 MTT 法检测,将所取细胞的细胞悬液接种于 96 孔板内,设置细胞密度为 1×10^4 个/mL,100 μL/孔,细胞 12 h 后贴壁,加入 15 μL 的 MTT 溶液,孵育 4 h 并弃上清液,加入 150 μL 的 DMSO,摇床震荡 15 min,测量 570 nm 的吸光度(absorbance,A) 值,设置 3 孔重复。

1.4.3 细胞侵袭 Transwell 小室检测,在 Transwell 小室上室面加入 1∶8 稀释而来的 Matrigel 100 μL,下室面使用移液枪头涂抹浓度为 0.5 mg/mL 的 Fibronectin,置于 37 ℃,5% CO_2 的培养箱内包被 2 h,使用 Matrigel 凝固成胶,置于 4 ℃下过夜风干。拿出小室,吸除参与液体,将所取细胞接种,并加入 100 μL DMEM,37 ℃下孵

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

育 30 min，水化基底膜，将细胞重悬于 DMEM 培养液内，设置细胞浓度为 5×10^4/mL，接种于上室，下室加入 10% 胎牛血清 DMEM 培养液，置于 37 ℃，5% CO_2 的培养箱内培养 48 h，将小室上层细胞和 Matrigel 基质胶轻擦，磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）洗涤 3 次，加入 4% 多聚甲醛，室温下固定 15 min，并 PBS 洗 2 次，棉签擦拭上室面细胞，结晶染色，15 min 后使用 200 倍显微镜观察细胞迁移个数，重复 3 次。

1.4.4 细胞凋亡 流式细胞数检测，将所取细胞的细胞接种于 25 cm^2 培养瓶内，设置浓度为 5×10^4 个/mL，过夜培养，细胞贴壁 48 h 后加入胰蛋白酶消化，加入完全培养基终止消化，调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL，于 1.5 mL EP 管内加入 1 mL 细胞，4 ℃ 下以 1 000 r/min 的速率离心 10 min，弃上清液，PBS 洗 3 次，制备细胞悬液，相同条件下再次离心 10 min，弃上清液，加入 200 μL Binding Buffer 重悬，依次加入 Annexin V－FITC（10 μL）和 PI（10 μL），吹打混匀，室温下避光孵育 15 min，加入 Binding Buffer 300 μL，使用流式细胞仪进行检测。

1.4.5 炎症因子 取冰箱内脑组织缺血侧前额皮层 20 mg，加 PBS 溶液，以体积质量比 V∶m＝9∶1 进行匀浆，静置 30 min 后以 1 000 r/min 的速率，离心半径 10 cm，离心 10 min，取上清液，依据试剂盒说明书采用酶联免疫吸附试验对白细胞介素（interleukin，IL）－6、IL－1β、肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor alpha，TNF－α）水平进行检测。

1.4.6 RhoA、ROCK2 蛋白 蛋白质印迹法实验检测，使用试剂盒裂解所提取脑组织内的总蛋白，使用 BCA 蛋白浓度定量盒对其中总蛋白进行检测，采用 3 000 r/min 速率，离心半径 10 cm，离心取蛋白裂解液上清液，按照体积质量比 1∶0.5 加入 5×Loading Buff，使用震荡仪混合均匀，使用 100 ℃ 沸水变性 5 min，加入 30 μg 等量蛋白样品，设置电泳时间为 55 V，30 min 与 95 V，90 min，marker 标记到达底部认定为电泳结束，将蛋白凝胶取出，湿法转 PVDF 膜，时间为 90 min，电流为 2 mA，将膜浸泡于 10% 脱脂奶粉内，室温下封闭 2 h，加一抗（1∶1 000）稀释液孵育，置于 4 ℃ 下过夜，次日加二抗（1∶1 000）孵育 2 h，将发光液于 PVDF 膜上均匀涂抹，显影，使用 Image J 软件分析 RhoA、ROCK2 蛋白表达，以 β－actin 为内参。

1.4.7 RhoA mRNA、ROCK2 mRNA 表达 将所取细胞接种于 6 孔板内，设置密度为 5×10^4/mL，依据 Trizol 试剂说明书，提取总 RNA，使用分光光度计对 RNA 质量进行检测，使用反转录试剂盒反转录 cDNA，扩增，设置 GAPDH 为内参。RhoA：正 CTGCCTGCGACAGATGAGTG，反 TCCGATTACCAAGTGCTCTTTC；ROCK2：正 AGCGACGTGGCTATTGTGAAG，反 GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT；GAPDH：正 ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG，反 GCCATCACGCCACAGTTTC，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行相对定量，实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料均通过正态性检验，以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）描述，组间比较采用单因素方差分析，两两组间比较采用 LSD－t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑神经细胞活力情况比较 标准饲养 7 d 和 14 d 后，模型组大鼠的脑神经细胞活力低于对照组，而 LPA 组大鼠的脑神经细胞活力高于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；且标准饲养 14 d 后，LPA 组大鼠的脑神经细胞活力高于 7 d 时，而模型组大鼠 14 d 的脑神经细胞活力低于 7 d 时，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 各组大鼠脑神经细胞活力情况比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	只数	7 d	14 d	t 值	P 值
对照组	5	0.94±0.14	0.98±0.20	2.435	0.029
模型组	5	0.58±0.05	0.36±0.04	2.479	0.027
LPA 组	5	0.72±0.04	0.84±0.03	2.561	0.013
F 值		20.977	39.102		
P 值		<0.001	<0.001		

2.2 各组大鼠脑神经细胞迁移情况比较 标准饲养 7 d 和 14 d 后，模型组大鼠的脑神经细胞迁移个数少于对照组，LPA 组大鼠的脑神经细胞迁移个数多于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；标准饲养 14 d 后，LPA 组大鼠的脑神经细胞迁移个数多于 7 d，而模型组大鼠 14 d 的脑神经细胞迁移个数少于 7 d 时，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2。

表 2 各组大鼠脑神经细胞迁移情况比较（个，$\bar{x}\pm s$）

组别	只数	7 d	14 d	t 值	P 值
对照组	5	269.03±21.13	290.37±29.81	2.125	0.041
模型组	5	101.99±10.37	72.42±9.43	2.517	0.019
LPA 组	5	143.69±11.05	223.98±18.97	2.678	0.009
F 值		167.633	139.960		
P 值		<0.001	<0.001		

2.3 各组大鼠脑神经细胞凋亡情况比较 标准饲养 7 d 和 14 d 后，模型组大鼠的脑神经细胞凋亡率均高于对照组，而 LPA 组均低于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；标准饲养 14 d 后，LPA 组大鼠的脑神经细胞凋亡率低于 7 d，而模型组大鼠 14 d 的脑神经细胞凋亡率高于 7 d 时，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 3、图 1。

表 3 各组大鼠脑神经细胞凋亡情况比较（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	只数	7 d	14 d	t 值	P 值
对照组	5	0.12±0.01	0.15±0.03	2.037	0.044
模型组	5	27.68±2.42	39.11±4.50	2.559	0.014
LPA 组	5	19.10±3.59	10.92±1.43	2.549	0.016
F 值		159.579	272.110		
P 值		<0.001	<0.001		

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

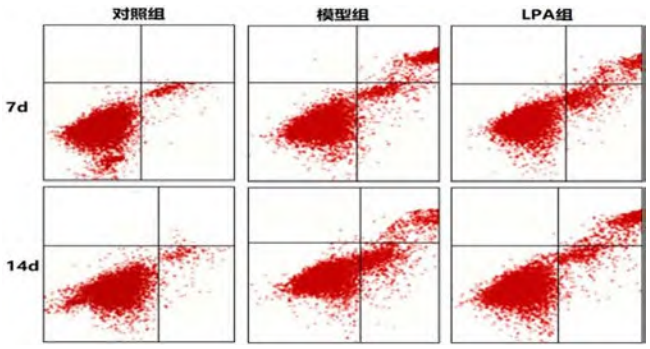

图1　流式细胞仪检测各组大鼠脑神经细胞凋亡图

2.4　各组大鼠 14 d 后脑神经细胞炎症因子水平比较　标准饲养 14 d 后，模型组大鼠的脑神经细胞 IL－6、IL－1β、TNF－α 水平均高于对照组，LPA 组大鼠的脑神经细胞 IL－6、IL－1β、TNF－α 水平均低于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 4。

表4　各组大鼠 14 d 后脑神经细胞炎症因子水平比较　（pg/mg，$\bar{x}\pm s$）

组别	只数	IL－6	IL－1β	TNF－α
对照组	5	52.49 ± 13.88	35.23 ± 8.37	233.59 ± 70.36
模型组	5	118.43 ± 27.55	61.41 ± 15.02	399.12 ± 109.22
LPA 组	5	72.12 ± 12.29	41.03 ± 6.03	259.49 ± 57.04
F 值		15.592	8.545	5.907
P 值		<0.001	0.005	0.016

2.5　各组大鼠 14 d 后脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白表达比较　标准饲养 14 d 后，模型组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白表达均低于对照组，而 LPA 组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白表达高于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 5 和图 2。

表5　各组大鼠 14 d 后脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白表达比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	只数	RhoA	ROCK2
对照组	5	0.27 ± 0.04	0.36 ± 0.05
模型组	5	0.22 ± 0.02	0.31 ± 0.05
LPA 组	5	0.37 ± 0.07	0.48 ± 0.08
F 值		12.429	9.956
P 值		0.001	0.003

图2　蛋白质印迹法检测各组大鼠 14 d 后脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 蛋白表达条带图

2.6　各组大鼠 14 d 后脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 mRNA 表达比较　标准饲养 14 d 后，模型组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 mRNA 表达均低于对照组，LPA 组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 mRNA 表达均高于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 6。

表6　各组大鼠 14 d 后脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 mRNA 表达比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	只数	RhoA mRNA	ROCK2 mRNA
对照组	5	1.99 ± 0.11	2.18 ± 0.06
模型组	5	1.71 ± 0.23	1.68 ± 0.14
LPA 组	5	2.57 ± 0.47	2.68 ± 0.51
F 值		10.075	13.101
P 值		0.003	0.001

3　讨论

脑缺血再灌注是一个涉及炎症反应、钙超载、自由基损伤、细胞凋亡等一系列复杂的级联反应，其中细胞凋亡是一个较为重要的生理病理机制，在细胞凋亡过程中涉及细胞程序化、自主化死亡等复杂过程，且该过程的完成受到多种调节基因的共同调控，而某些病理因素或生理因素则可通过诱导激活膜信号系统，启动有关调控细胞凋亡的程序基因，最终造成细胞按照一定程度控制自我损伤和死亡[6-8]。越来越多的证据表明，Rho/ROCK 信号通路是调控肿瘤细胞增殖和凋亡的重要通路[9-11]。RhoA 为 Rho/ROCK 信号传导通路中的关键信号分子，其能够通过对下游靶分子 ROCK 产生刺激而调整细胞形态和细胞极性，进而对细胞增殖、凋亡、迁移等多个方面发挥作用，并可对细胞的收缩、黏附、游走、生长分裂及肿瘤细胞的浸润、转化等多个行为和功能进行调节，其也对多种疾病的发生、发展有重要作用，是近年来临床研究的重点。

LPA 作为组织中广泛存在的，且对多种细胞均有不同生物学活性。既往有研究发现，LPA 能够促进细胞迁移、增殖、耐药等生物学效应，因此会加剧子宫癌、卵巢癌、乳腺癌等妇科癌症的恶化程度[12-13]。同时 LPA 还能够促进 Akt 磷酸化，激活核因子－kB 信号通路，进而抑制肿瘤细胞凋亡[14-16]。因此本研究考虑 LPA 可能会通过调控 Rho/ROCK 信号通路，继而上调脑缺血再灌注损伤神经细胞的迁移、增殖等，促进脑神经细胞增生，提高脑神经细胞活性，进而抑制脑部炎症反应，促进缺血再灌注后恢复[17]。本研究结果显示，标准饲养 7 d 和 14 d 后 LPA 组大鼠的脑神经细胞活力和迁移能力均明显提高，且脑神经细胞凋亡率明显降低，并随着给药时间的延长而作用增强；同时给药脑缺血再灌注大鼠 LPA 后还能够明显改善脑部炎症反应；在进一步研究中发现，标准饲养 14 d 后，模型组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 mRNA、蛋白表达均低于对照组，LPA 组大鼠的脑神经细胞内 RhoA、ROCK2 mRNA、蛋白表达均高于模型组，提示上述结果的出现可能与 Rho/ROCK 信号通路相关。可能是由于 LPA 可增加脑血管内皮细胞紧密连接的通透性，大鼠腹腔注射 LPA 后进入血液，进而经血脑屏障而进入中枢神经系统，健康大鼠体内正常状态下脑脊液内不存在 LPA，当缺血再灌注损伤模型大鼠腹腔注射 LPA 后，血液内 LPA 含量升高，经血脑屏障而进入中枢系统，进而通过同族的 G 蛋白偶联受体对靶

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

细胞产生刺激，促进 DNA 的合成和发生，进而促进细胞骨架快速改变，促进脑神经细胞的生长锥萎缩，轴突回缩，发生细胞圆化[18]。同时 LPA 可对 RhoA 蛋白产生刺激，促使星形胶质细胞发生“反应性神经胶质增生”，促进形成神经胶质瘢痕，进而提高脑神经细胞增生和迁移，抑制细胞凋亡，缓解脑部炎症反应，促进康复。

4 结论

综上所述，LPA 可通过调控 RhoA/ROCK2 信号通路提高脑神经细胞活性，促进迁移，抑制凋亡，缓解炎症反应。但本研究仍存在部分不足，研究中所使用的大鼠样本量较少，且多点观察，使每个时间点的大鼠样本量仅有 5 只，可能会对结果的准确性产生影响，今后仍需进一步探究。

参考文献

[1] Akinmoladun AC, Obadaye TS, Olaleye MT, et al. Prophylaxis with a multicomponent nutraceutical abates transient cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. J Food Biochem, 2021, 45(3): E13351.

[2] Jia YJ, Tong Y, Min LQ, et al. Protective effects of oridonin against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting the NLRP3 inflammasome activation [J]. Tissue Cell, 2021, 71(8): 101514.

[3] Lv YJ, Ma PS, Wang JL, et al. Betaine alleviates right ventricular failure via regulation of Rho A/ROCK signaling pathway in rats with pulmonary arterial hypertension [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 7(7): 174311.

[4] Ueda H. Pathogenic mechanisms of lipid mediator lysophosphatidic acid in chronic pain [J]. Prog Lipid Res, 2021, 81(1): 101079.

[5] Chiang JC, Chen WM, Lin KH, et al. Lysophosphatidic acid receptors 2 and 3 regulate erythropoiesis at different hematopoietic stages [J]. BBA Mol Cell Biol Lipids, 2021, 1866(1): 158818.

[6] Zhao SF, Liu XR, Kang J, et al. Analysis of microRNA expression in cerebral ischemia/reperfusion after mild therapeutic hypothermia treatment in rats [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(2): 168.

[7] Li Y, Gong M. Analysis of the neuroprotective effect of GLP-1 receptor agonist peptide on cerebral ischemia-reperfusion injury by Quantitative Proteomics Mass Spectrometry [J]. Brain Behav, 2021, 11(6): e02190.

[8] Liang QL, Yang J, He JJ, et al. Stigmasterol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammation and improving antioxidant defenses in rats [J]. Biosci Rep, 2020, 40(4): 2019-2021.

[9] Yang JR, Zhu YY, Zhang DF, et al. Effects of Different Doses of Calcium on the Mitochondrial Apoptotic Pathway and Rho/ROCK Signaling Pathway in the Bone of Fluorosis Rats [J]. Biol Trace Elem Res, 2021, 199(5): 1919-1928.

[10] Liu C, Li Y. Propofol relieves inflammation in MIRI rats by inhibiting Rho/Rock signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(2): 976-984.

[11] Zhou FT, Ma K. Fasudil protects against isoproterenol-induced myocardial infarction in mice via inhibiting Rho/ROCK signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(10): 5659-5667.

[12] Kano K, Matsumoto H, Kono N, et al. Suppressing postcollection lysophosphatidic acid metabolism improves the precision of plasma LPA quantification [J]. J Lipid Res, 2021, 62(30): 100029.

[13] Tamaki T, Kagawa N, Fukushima N. The Japanese lamprey (Lethenteron camtschaticum) expresses functional lysophosphatidic acid receptors [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 568(3): 1-7.

[14] Wang QL, Chen GL, Zhang Q, et al. Microcystin-leucine arginine blocks vasculogenesis and angiogenesis through impairing cytoskeleton and impeding endothelial cell migration by downregulating integrin-mediated Rho/ROCK signaling pathway [J]. Environ Scie Pollut Res Int, 2021, 9(7): 1007-1011.

[15] Ishimoto K, Minami A, Minami K, et al. Different effects of lysophosphatidic acid receptor-2 (LPA;) and LPA; on the regulation of chemoresistance in colon cancer cells [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2021, 41(1): 93-98.

[16] Himi T, Ahmed AD, Mohamed AA, et al. Autotaxin inhibition reduces cardiac inflammation and mitigates adverse cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 149(12): 95-114.

[17] Fransson J, Gómez CAI, RomeroImbroda J, et al. Activation of Macrophages by Lysophosphatidic Acid through the Lysophosphatidic Acid Receptor 1 as a Novel Mechanism in Multiple Sclerosis Pathogenesis [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(2): 470-482.

[18] Zhang DP, Shi RC, Wei X, et al. The Agpat4/LPA axis in colorectal cancer cells regulates antitumor responses via p38/p65 signaling in macrophages [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 24.

(收稿日期: 2021-12-20)

DOI: 10.3969/j.issn. 1671-4695.2022.09.002 文章编号: 1671-4695(2022)09-0901-05

脑卒中大鼠神经炎症反应和胶质细胞活化与认知功能的相关性研究

古次里娜·托汗 努尔比亚·艾海提* 金海燕 (喀什地区第二人民医院神经内科 新疆 喀什 844000)

【摘要】 目的 观察脑卒中大鼠神经炎症反应、胶质细胞活化与认知功能的相关性，探讨神经炎症反应、胶质细胞活化对脑卒中大鼠认知功能的影响。方法 将 60 只健康雄性 SD 大鼠随机数字表法分为 A 组、B 组和 C 组，各 30 只。A 组大鼠采用线栓阻断大脑中动脉法制备缺血再灌注大鼠模型。B 组大鼠仅操作到暴露分离颈总动脉、颈外动脉。C 组大鼠不做任何处理。分别于处理前，处理后 7、14、21 d 测量 3 组大鼠神经功能缺损评分。处理后 1 个月时采用 Morris 水迷宫测量 3 组大鼠认知功能，随后处死大鼠取脑组织，采用蛋白质印迹法检测脑组织中白细胞介素(IL)-6、干扰素、

基金项目: 新疆维吾尔族自治区级项目(编号: SYTG_201813)

* 通讯作者: 努尔比亚·艾海提，E-mail: neby2638@163.com

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net