

# 磁刺激对缺氧缺糖神经元 Robo2 及 RhoA 表达的影响

杨云凤 吴碧华 李芸 张全波 刘黎明

**【摘要】** 目的 观察磁刺激对大鼠缺氧缺糖神经元形态及 Robo2、RhoA 表达的影响,探讨磁刺激对缺氧缺糖神经元轴突再生的影响及可能机制。方法 原代培养皮质神经元,分为正常组(control, C)、缺氧缺糖(oxygen/glucose deprivation, OGD)组、假刺激(shame, S)+缺氧缺糖组、40%最大输出强度(40% of maximum intensity of stimulation, M1)+缺氧缺糖组、60%最大输出强度(60% of maximum intensity of stimulation, M2)+缺氧缺糖组。各刺激组自细胞接种后第2~6天接受磁刺激,连续刺激5d;各组细胞于第6天相同时间取材。采用倒置显微镜每日定时观察各组细胞生长形态,RT-PCR检测各组细胞 Robo2、RhoA mRNA 的表达。结果 缺氧缺糖损伤后,神经元突起较正常组细胞渐渐缩短,细胞折光性下降,而 Robo2、RhoA mRNA 的表达高于正常组( $P<0.05$ );40%、60%强度组较 OGD 组大部分细胞突起长出,部分突起连接形成神经网络,而 Robo2 mRNA 的表达高于 OGD 组( $P<0.05$ )、RhoA mRNA 的表达低于 OGD 组( $P<0.05$ )。结论 磁刺激通过抑制受损神经元 RhoA mRNA 的表达,上调 Robo2 mRNA 的表达,而促进受损神经元轴突再生,可能是磁刺激促进受损神经元轴突再生的机制之一。

**【关键词】** 经颅磁刺激; 神经元; 轴突

## Effects of magnetic stimulation on expression of Robo2, RhoA in oxygen and glucose deprivation of neurons

YANG Yun-feng, WU Bi-hua, LI Yun, ZHANG Quan-bo, LIU Li-ming. Department of Geriatrics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Corresponding author: WU Bi-hua, Email: bhua100@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of magnetic stimulation on the expression of Robo2, RhoA in neurons of oxygen and glucose deprivation, so as to explore the possible mechanism of magnetic stimulation inducing neurons axonal regeneration of oxygen and glucose deprivation. **Methods** Primary cortical neurons were divided into control group, Oxygen/Glucose Deprivation group, Sham simulation group, Forty percent of maximum stimulus intensity to stimulate the OGD group, Sixty percent of maximum stimulus intensity to stimulate the OGD group. Cells were stimulated from the second day to the sixth day after plantation, and cells were drawn at the same time on the seventh day. Inverted microscope and RT-PCR were used to study the morphological changes of neurons and the expression of Robo2, RhoA at mRNA levels. **Results** In oxygen and glucose deprivation group the neurite length of neurons were shorter and cells refraction declined, and Robo2, RhoA mRNA expression significantly higher than those in control group( $P<0.05$ ). In the 40%, 60% intensity group the neural neurite and neural connection between cells were both significantly more than those in Oxygen/Glucose Deprivation group, and Robo2 mRNA expression was significantly higher than those in Oxygen/Glucose Deprivation group( $P<0.05$ ), but RhoA mRNA expression was significantly less( $P<0.05$ ). **Conclusion** Magnetic stimulation may increase Robo2 expression of damaged neurons by inhibiting RhoA expression, promoting damaged neurons axonal regeneration, which may be one of the mechanisms of magnetic stimulation promoting damaged neurons axonal regeneration.

**【Key words】** Transcranial magnetic stimulation; Neurons; Axons

近年来越来越多的动物实验发现脑损伤后重复经颅磁刺激 (repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS) 治疗, 通过调节频率、强度、刺激间歇和刺激时间对中枢神经系统具有促进神经细胞轴突再生改善神经损伤后的神经功能的恢复<sup>[1-4]</sup>。脑缺血缺氧损伤后中枢神经细胞再生、神经轴突的再生和神经网络是否能够重建是神经康复的关键。研究发现脑缺血损伤后神经功能康复的病理生理机制可能与 RhoA 信号通路有着较为密切的关系。RhoA 信号通路是调节神经轴突再生及生长的主要信号通路。研究发现, 激活 RhoA 可引起轴突生长锥的崩溃、崩解, 抑制轴突出芽和生长<sup>[5-6]</sup>。而 rTMS 是否能抑制 RhoA 引起轴突生长锥崩溃, 改善轴突可塑性, 目前还未见明确报道。Robo 为跨膜受体蛋白, 具有促神经突起生长和延长作用<sup>[7-8]</sup>, Robo1/2 是周围和中枢神经元轴突生长的重要条件<sup>[9]</sup>。有研究发现<sup>[10]</sup>, 坐骨神经切断后, Robo2 在受损背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 内的表达增高, 可能与早期的感觉轴突再生有关。这都说明 Robo2 与轴突生长密切相关, 对突触可塑性具有重要意义。而中枢神经系统受损后, Robo2 是否参与了神经轴突再生及重塑, 目前还未见明确报道。本实验体外建立神经细胞缺氧缺糖损伤 (oxygen/glucose deprivation, OGD) 模型, 体外模拟急性脑缺血缺氧。应用 RT-PCR 方法检测磁刺激后缺血神经元 Robo2 和 RhoA 表达, 探讨磁刺激能否促进大鼠缺血缺氧神经元轴突再生及其可能机制, 为临床脑梗死后神经功能康复治疗探索新途径。

## 材料和方法

### 一、主要材料及试剂

孕 15~18 d 胎龄 SD 大鼠由川北医学院实验动物中心提供, DMEM/F12 (高糖、低糖)、Neurobasal-A 培养液 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (FBS) (美国 HyClone 公司), B27 添加剂 (美国 Invitrogen 公司),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (连二亚硫酸钠)、多聚赖氨酸 (7 万~15 万)、胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司), TRizol 总 RNA 提取试剂 (天根生化科技有限公司), RT-PCR 试剂盒 (成都博瑞克生物有限公司), 兔抗 NeuN (神经元核特异蛋白) (Millipor 公司)。

### 二、大鼠皮质神经细胞体外原代培养

1. 细胞爬片的制备: 将盖玻片放于玻璃培养皿中, 泡酸过夜后取出, 自来水下洗净酸, 再用去离子水洗净, 放入玻璃培养皿, 将装有盖玻片的玻璃培养皿一起放入消毒饭盒中高压锅消毒灭菌备用。

2. 多聚赖氨酸包被培养板及盖玻片: 96 孔板, 6

孔细胞培养板中每孔加入配制好的多聚赖氨酸 (0.1 mg/ml), 以能盖住孔底为限。拟行免疫细胞化学技术检测的标本, 需在培养板中预先置入 1 cm×1 cm 的玻璃盖片, 然后再涂多聚赖氨酸, 超净台放置 20 min 后, 吸净培养板中的多聚赖氨酸, 加入适量 10% FBS 的 DMEM/F12 (高糖) 培养液, 置于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中备用, 临用前吸弃原培养液, PBS 液清洗 2 次, 新鲜细胞培养基 (含 10% FBS 的高糖 DMEM/F12 培养液) 清洗一次即可使用。

3. 神经元的分离及培养: 取孕 15~18 d SD 大鼠孕鼠, 无菌取出胎鼠, 快速断头取脑, 分离皮质剪成直径约为 1 mm<sup>3</sup> 大小的小组织块。加入 0.125% 胰蛋白酶在 37℃、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱消化约 30 min 后, 加入同等量含 10% FBS 的高糖 DMEM/F12 培养液 (完全培养基) 立即终止消化, 无菌玻璃吸管轻轻吹打分散后, 用 200 目钢网过滤。将过滤后所得单细胞悬液, 吸入无菌离心管中, 以 800 r/min 的速度离心 5 min, 弃上清, 完全培养基重悬细胞, 玻璃吸管轻柔吹打。以密度为  $1 \times 10^6$  个/ml 混匀后接种于经多聚赖氨酸处理的 6 孔、96 孔培养板及铺有盖玻片的 6 孔板中, 置于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱内进行培养。于培养 24 h 后, 细胞贴壁良好, 部分细胞周围开始出现突起, 培养液换为含 2% B27 的 Neurobasal-A 培养液, 抑制非神经元的增殖。以后每 3 d 换液一次, 每次更换一半新鲜培养液 (含 2% B27 的 Neurobasal-A 培养液)。6 d 用于实验研究, 在培养过程中 4 h 及 1 d、2 d、4 d、6 d 用倒置相差显微镜观察细胞的生长情况。

### 三、神经元纯度鉴定

将铺有盖玻片 6 孔培养板中的培养液弃去, 每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 吸弃多聚甲醛, 每孔加入 0.01 mol/L PBS 液清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 0.2% Triton X-100 室温下作用 10 min, 吸弃, 0.01 mol/L PBS 液清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 3% 过氧化氢浸泡 10 min; 0.01 mol/L PBS 液清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 5% BSA 溶液封闭 30 min (37℃); 吸去封闭液 (不洗), 直接滴加一抗 (兔抗 NeuN 1:100) 4℃ 孵育过夜, 阴性对照直接加 PBS; 0.01 mol/L PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 滴加相应生物素化二抗 37℃ (SABC 试剂盒内, 为即用型), 30 min; 0.01 mol/L PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 滴加辣根过氧化物酶标记抗生物素试剂 (SABC) 30 min; 0.01 mol/L PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 取出各孔内盖玻片, DAB 显色, 显微镜下控制, 显色效果满意后终止, 自来水冲洗 5 min; 苏木素染色 2 min, 冲洗后, 盐酸乙醇分化 1 s; 70% 乙醇, 30 s×2 次、80% 乙醇 30 s×2 次、95% 乙醇 30 s

×2次、无水乙醇分别脱水30 s×2次;晾干中性树脂封片,镜下观察并照相。胞质、胞核出现棕色颗粒为阳性为神经元。阳性细胞计数:切片放大10×40随机选取10个视野,以细胞核、胞质出现棕黄色颗粒者阳性,计算阳性细胞数在各个视野的百分率。

#### 四、OGD模型的建立

原代细胞接种后,24 h后全量换液,换为2% B27的Neurobasal-A培养液继续培养,培养至第4天时,换为低糖DMEM/F12培养液,加入终浓度为1 mmol/L的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,放入37℃、含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内进行培养60 min,60 min后,吸弃培养液,PBS洗两次,全量换液换为含2% B27的Neurobasal-A培养液继续培养至第6天,以模拟体外模拟脑缺血过程。

#### 五、实验分组磁刺激参数设定

原代培养神经元造模,即分为正常组(control, C)、OGD组、假刺激(shame, S)+缺氧缺糖组、40%最大输出强度(40% of maximum intensity of stimulation, M1)+缺氧缺糖组、60%最大输出强度(60% of maximum intensity of stimulation, M2)+缺氧缺糖组。每组为两个六孔板,正常组、缺氧缺糖组在细胞培养箱中培养6 d,各刺激组于第2天开始刺激,采用一径约8 cm的磁刺激探头垂直置于六孔板,距离各组六孔板约1 cm,不直接接触六孔板,每天于固定时间刺激,3串/d,100次/串,每串间隔时间1 min,连续刺激5 d,频率1 HZ,最大输出强度为4.2 T。假刺激组将强度设为0,刺激方法相同。于第6天同一时间取材。

#### 六、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测Robo2/RhoA mRNA的表达

收集各组神经元,TRizol法提取总RNA,测定其浓度计纯度,-80℃备用。每个样品各取3 μl总RNA按照逆转录试剂盒说明书操作,合成cDNA,再取2 μl cDNA用于PCR,其余冻存于-20℃备用。引物由上海生工生物工程公司合成,序列如下:Robo2(160 bp)上游引物5'-GTAACCCGCATCTGAACG-3',下游引物5'-TGAAACTAAAGGAAACCCAC-3'; RhoA(327 bp)上游引物5'-TTTGGTCTTTGCTGAACACT-3',下游引物5'-ACCAGTTCCAGAGGTTTATGT-3'; GAPDH(450 bp)上游引物5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

PCR反应条件:按94℃预变性5 min,然后94℃45 s、60℃45 s、72℃1 min,35次反复循环扩增,最后72℃延伸5 min。GAPDH为内参照进行PCR。取PCR扩增产物5 μl及Marker在1.2%琼脂糖凝胶电泳120 V,电泳45 min。然后在BIO-RAD成像仪上成像,照相保存。应用凝胶成像系统软件,测量Robo2

mRNA、RhoA mRNA和内参照GAPDH各显色条带的灰度值,Robo2和RhoA分别与对应的内参GAPDH显色条带的灰度值的比值表示Robo2和RhoA相对表达量。

#### 七、统计学处理

实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS 13.0软件包进行统计学处理,采用t检验,多组数据间均数的两两比较用One-Way ANOVA分析,显著性水平为0.05,  $P < 0.05$ 即认为差异有显著性。

## 结 果

一、大鼠皮层神经元的原代体外培养形态学观察  
神经细胞刚分离时呈圆形,细胞边缘光滑,折光性强,体积较小胞体透亮,种植4 h后大部分神经细胞贴壁;细胞培养24 h,细胞均匀贴壁,细胞体积增大,部分细胞变形呈多角形、伸出短小的突起,大部分呈圆形;2 d时细胞增大,周围突起增多(图1);4 d时细胞聚集成团,突起进一步增长、增粗,而此后细胞突起逐渐增长,6 d后细胞体积增大,胞体饱满清晰,边界清楚有明显的光晕,有很强的折光性及立体感,突起进一步增多、增长,相互间交错成网,并有突起连接在一起,未见明显的胶质细胞(图2)。

#### 二、大鼠皮层神经细胞免疫细胞化学鉴定

神经元特异核蛋白(NeuN)是神经元的特异性标志蛋白。将培养第6天的大鼠皮层神经细胞进行了抗NeuN细胞免疫细胞化学检测,显示胞核深染为强阳性、胞质淡染为弱阳性(图3),10×40倍视野下随机取10个视野,计数阳性细胞的百分率,鉴定神经元纯度为(93.7±5.5)%。

#### 三、缺氧缺糖损伤后神经细胞形态学观察

缺氧缺糖损伤后,神经细胞形态学较正常组变化明显,突起渐渐缩短,神经细胞胞体萎缩,部分坏死细胞周围光晕消失,折光性下降,突起明显缩短,部分细胞胞体崩解,细胞结构模糊,但仍贴壁,悬浮细胞较少(图4);高强低频磁刺激干预神经细胞后,细胞胞体轮廓较清楚,大部分细胞突起长出,部分突起连接形成神经网络(图5)。

#### 四、磁刺激对各组神经元Robo2 mRNA表达的影响

正常组的Robo2 mRNA表达很弱,缺氧缺糖损伤后Robo2 mRNA表达较正常组对照组明显增加( $P < 0.05$ ),提示缺血损伤后Robo2 mRNA的表达增加,假刺激组与缺氧缺糖组相比无明显变化( $P > 0.05$ ),M1组、M2组较缺氧缺糖组Robo2 mRNA的表达显著增加( $P < 0.05$ )(表1,图6,7A),提示磁刺激可

促进受损神经元 Robo2 mRNA 的表达增加。

表1 神经元 Robo2/GAPDH、RhoA/GAPDH 灰度比值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Robo2/GAPDH	RhoA/GAPDH
正常组(C)	0.4798±0.0274	0.6156±0.0247
缺氧缺糖组(OGD)	0.7410±0.0262 <sup>a</sup>	1.0711±0.0239 <sup>a</sup>
假刺激+缺氧缺糖组(S)	0.7769±0.0273	1.0366±0.0205
40% T+缺氧缺糖组(M1)	1.1467±0.0290 <sup>b</sup>	0.8246±0.0283 <sup>b</sup>
60% T+缺氧缺糖组(M2)	1.1909±0.0313 <sup>b</sup>	0.7688±0.0232 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与缺氧缺糖组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

### 五、磁刺激对各组神经元 RhoA mRNA 表达的影响

正常组的 RhoA mRNA 表达也很弱, 缺血损伤后 RhoA mRNA 表达较对照组明显增加 ( $P < 0.05$ ), 提示缺血损伤后 RhoA mRNA 的表达也增加, 假刺激组与缺氧缺糖组相比无明显变化 ( $P > 0.05$ ), M1 组、M2 组较缺氧缺糖组 RhoA mRNA 的表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 提示磁刺激干预受损神经元对 RhoA mRNA 表达有明显的抑制作用(表1, 图6, 7B)。

### 讨 论

近年来, 脑缺血动物模型研究较多, 而体外模拟脑缺血模型研究较少, 本实验体外建立神经细胞 OGD 模型造成神经细胞损伤<sup>[11-13]</sup>, 以模拟大鼠大脑皮层神经细胞急性缺血缺氧的体内环境。体外模拟脑缺血模型较在体脑缺血造模有优势: 在体研究易受体内多种因素影响, 而体外实验, 可以达到直接观察细胞形态和生化改变, 排除体内因素干扰的目的, 实验结果稳定, 重复性好。本实验应用孕 15~18 d SD 大鼠胎鼠皮质取材<sup>[14]</sup>, 在体外成功进行了大鼠皮质神经元的原代培养, 并观察了大脑皮层神经细胞体外生长过程, 神经细胞经 NeuN 免疫细胞化学染色鉴定其纯度, 显微镜下阳性表现为细胞核深染为强阳性、胞质淡染, 培养第 6 天原代神经元中阳性神经元占 90% 以上, 因此可以认为是较纯的神经细胞培养。目前, 体外缺氧缺糖培养引起神经细胞受损是体外模拟急性脑缺血缺氧的常用模型, 被广泛地应用于缺血缺氧神经细胞的分子病理生理机制研究<sup>[15]</sup>, 而造模方法及实际操作不尽相同, 本实验总结前人经验, 应用含 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  的低糖 DMEM/F12 培养液培养细胞造成神经细胞缺氧缺糖, 结果发现 OGD 30 min 内神经元未见明显损伤, 60 min 时神经元胞体出现皱缩, 部分细胞出现死亡, 存活率下降, 在体外成功地模拟了脑缺血模型。

本研究通过体外建立神经细胞 OGD 模型造成神

经细胞损伤, 模拟大鼠大脑皮层神经细胞急性缺血缺氧的体内环境。本实验结果显示: 神经元缺氧缺糖受损后, 神经细胞出现不同程度的损伤, 部分细胞出现皱缩、折光性下降、胞体立体感差、突起渐渐回缩变短, 也有部分贴壁细胞开始出现悬浮, 细胞出现不同程度的损伤; 给予频率为 1 Hz, 40%、60% 最大输出强度的磁刺激干预后, 缺氧缺糖神经元细胞形态有明显改善, 细胞折光性较好, 周围有光晕, 突起明显长出, 部分突起连接形成神经网络, 说明磁刺激可促进受损神经元的轴突长出及延伸。有关磁刺激对缺氧缺糖神经元的轴突再生作用机制可能有以下几个方面: rTMS 可减轻细胞水肿; 调节细胞外钙离子浓度; 调节神经递质及氨基酸代谢; 提高了受损细胞对葡萄糖再摄取能力, 提高缺氧耐受; 减少脑梗死的体积和抑制神经细胞的凋亡; 磁刺激可以影响 DNA 合成, RNA 转录; 能够通过作用于各种细胞膜外和膜上的蛋白质来影响细胞的功能, 包括离子通道、膜受体和酶等<sup>[16-18]</sup>。

Robo2 是近些年发现的参与中枢神经轴突诱向、轴突分支、树突生长过程的较新的分子<sup>[19-21]</sup>。研究表明: 在大脑皮质 Robo2 能促进皮质神经元的树突分支, 转染 Robo 的细胞株能促进 Robo 阳性神经元突起的长出<sup>[22]</sup>。郑林丰等<sup>[10]</sup>研究指出: 成年大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后损伤部位即开始出现 Robo2 mRNA 表达持续上调并在后 7 d 达到峰值, 其表达呈抛物线形, 说明脊髓受损后促进了 Robo2 的表达上调, 促进受损的轴突再生最终改善受损外周神经功能的恢复。所以我们认为, Robo2 不仅能维持正常神经系统的生长发育, 也能促进受损神经系统的再生。本实验发现在正常神经元中仅有较弱的 Robo2 mRNA 表达、在缺氧缺糖损伤后 Robo2 mRNA 的表达增高, 提示大鼠皮质神经元受损后 Robo2 可能参与了缺氧缺糖神经细胞的自身修复。

有动物实验表明: rTMS 可促进大鼠脑缺血神经细胞增殖及缺血性脑卒中后梗死周边区生长相关蛋白表达, 促进轴突再生、完善轴突重塑效能的作用, 从而改善受损神经功能。研究发现应用低频磁场对 PC12 细胞进行干预, 可明显促进细胞突起的生长<sup>[23]</sup>。而在体外, 磁刺激能否促进受损神经元轴突再生, 目前研究较少。本研究给予假刺激(频率 1 Hz, 强度为 0)、40% 最大输出强度(M1 组)、60% 最大输出强度(M2 组)等不同强度刺激缺氧缺糖神经元, 发现 M1 组、M2 组细胞的轴突明显长出, 且 Robo2 的表达进一步增加, 提示磁刺激对缺氧缺糖神经元有促进受损神经元轴突再生的作用, 说明磁刺激干预缺氧缺糖神经元后, 可能通过促进 Robo2 表达的上调, 而促进轴突

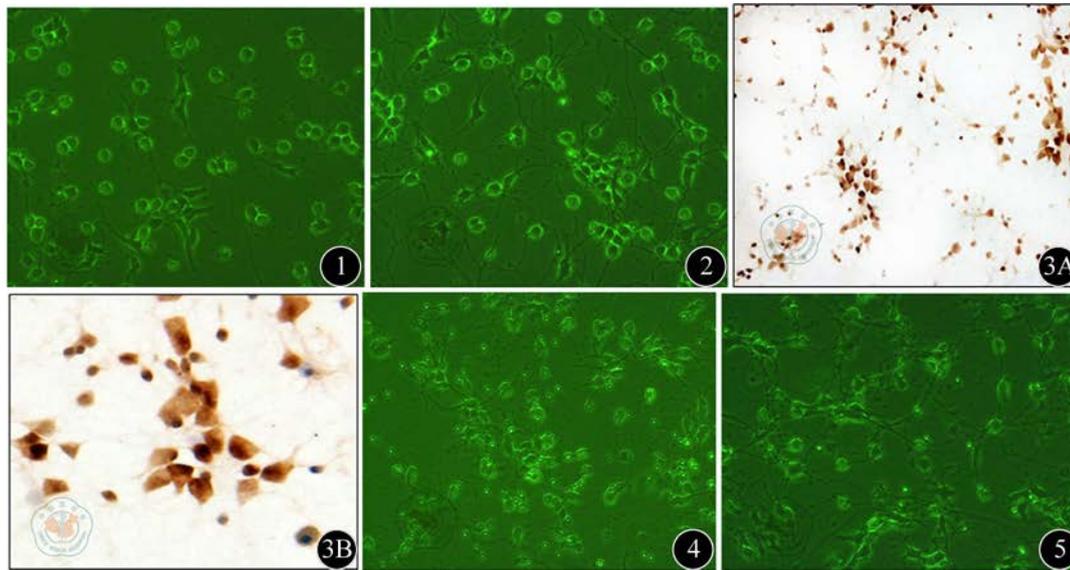


图1 原代第2天神经细胞 (×200) 图2 原代第6天神经细胞 (×200) 图3 原代神经抗NeuN鉴定 (3A: ×200; 3B: ×400) 图4 神经细胞缺氧缺糖损伤 (×200) 图5 rTMS治疗组 (×200)

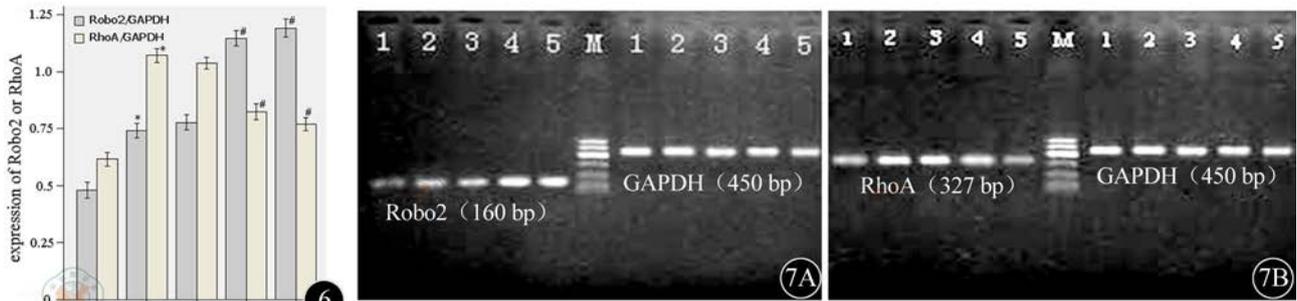


图6 Robo2/GAPDH、RhoA/GAPDH灰度值的变化。\*和#分别表示与正常对照组和OGD组比较差异有统计学意义 图7 1~5分别表示: 正常组、缺氧缺糖组、假刺激+缺氧缺糖组、40% T+缺氧缺糖组、60% T+缺氧缺糖组; M: DNA MW marker (DL600)。7A: Robo2 mRNA RT-PCR检测结果; 7B: RhoA mRNA RT-PCR检测结果

再生。

既往观点认为 Robo 受体需与 slit2 结合才能发挥轴突、树突生长调控的作用。而近年来有研究表明 Robo 除介导 slit 促神经突生长作用外, 相邻部位的同种 Robo 和 (或) 不同种的 Robo 之间能通过某种亲和机制相互作用, 发挥促神经生长的作用<sup>[8,24-25]</sup>。在无 slit2 的介导下, 本实验的研究结果发现: 磁刺激缺血组细胞后, Robo2 的表达较缺血组进一步增加, 且随强度的增加而增加, 说明磁刺激可能促进 Robo 受体之间的相互协同作用而促进轴突再生。而磁刺激的这种促进受体间相互协同的作用, 可能是通过神经元轴突网络的可塑性来实现的<sup>[26]</sup>。磁刺激后 Robo 的表达增高与许多神经营养因子受体在磁刺激治疗脑缺血后的表达相符, rTMS 治疗脑缺血缺氧再灌注大鼠后, 在大鼠海马齿状回颗粒细胞层、CA3 区脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 表达明显增加, 说明 rTMS 可通过上调 BDNF 的表达, 实现其对缺血脑细胞的神经保护作用<sup>[27]</sup>。结合本实验磁刺激可

促进受损神经元 Robo2 的表达, 提示: rTMS 可能通过上调 Robo2 的表达, 而发挥其对缺氧缺糖神经元的轴突再生作用。但 rTMS 如何调控 Robo2 的表达, 机制不明确, 还有待进一步研究。

RhoA 在轴突再生过程中起关键作用, 激活后导致其下游因子 (如 ROCK、PKN, 均为丝氨酸/苏氨酸激酶) 的激活, 影响了肌动-球蛋白系统而最终导致轴突生长锥塌陷, 轴突生长抑制, 轴突回缩, 若对其信号通路抑制则可促进轴突生长与延伸。研究发现在海马趾的神经细胞中, 活化的 RhoA 抑制神经元树突的生长<sup>[28]</sup>。脊髓损伤后, Fu 等<sup>[29]</sup>发现应用非甾体抗炎药抑制 RhoA, 可促进神经细胞的生长, 提高脊髓损伤后运动功能的恢复。也有研究发现应用 C3 转化酶或 Y27632 阻断 RhoA 信号通路可以促进受损中枢神经系统的轴突再生及动物四肢的神经功能康复<sup>[30]</sup>。通过这些文献报道, 进一步证实 RhoA 在中枢神经系统损伤后神经修复、轴突再生及神经功能康复中可能起着重要作用。本实验结果发现: 正常组细胞有较弱的 RhoA mRNA

表达, 缺氧缺糖受损后, 表达增加, 这提示皮质神经元缺氧缺血后激活了 RhoA 信号系统, 给予不同强度的磁刺激后, RhoA 又呈下降趋势, 且随磁场强度的增加而逐渐下降, 提示本实验参数磁刺激可能通过调节 RhoA 信号通路来促进受损神经元轴突再生、抑制轴突崩解, 实现对受损神经元的轴突再生作用。而 rTMS 如何调控 RhoA 信号通路, 机制不明确, 需进一步研究。

综上所述: 磁刺激通过抑制受损神经元 RhoA mRNA 的表达, 上调 Robo2 mRNA 的表达, 实现其对缺氧缺糖神经元的轴突再生, 最终促进神经功能的恢复, 而神经细胞缺氧缺糖受损后, 磁刺激如何调控 Robo2 的表达及如何调控 RhoA 信号通路, 还需进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S. Acquisition of ischemia tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus. *Brain Res*, 2005, 1037: 7-11.
- [2] Funamizu H, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, et al. Acute repetitive transcranial magnetic stimulation reactivates dopaminergic system in lesion rats. *Neurosci Lett*, 2005, 383: 77-81.
- [3] Wang F, Geng X, Tao HY, et al. The restoration after repetitive transcranial magnetic stimulation treatment on cognitive ability of vascular dementia rats and its impacts on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area. *Mol Neurosci*, 2010, 41: 145-155.
- [4] Ueyama E, Ukai S, Ogawa A, et al. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2011, 65: 77-81.
- [5] Jacobs WB, Fehlings MG. The molecular basis of neural regeneration. *Neurosurgery*, 2003, 53: 943-948.
- [6] Teng FY, Tang BL. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents? *J Neurochem*. 2005, 94: 865-874.
- [7] Seiat H, Ken I, Testiji M, et al. Slit and Glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia*, 2003, 42: 130-138.
- [8] Setigmann P, Moliot A, Fellert S, et al. Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo, signaling. *Curr Biol*, 2004, 14: 225-230.
- [9] Ma L, Tessier-Lavigne M. Dual branch-promoting and branch-repelling actions of slit/robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci*, 2007, 27: 6843-6851.
- [10] 郑林丰, 张建伟, 易西南, 等. 大鼠坐骨神经切断后 Robo2 在脊髓及背根节的表达变化. *解剖学杂志*, 2007, 30: 200-202.
- [11] Romera C, Hurtado O, Botella SH, et al. *In vitro* ischemic tolerance involves up regulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha-pathway. *Neuroscience*, 2004, 24: 1350-1357.
- [12] Jiang W, Gu W, Hossmann KA, et al. Establishing a photothrombotic ring' stroke model in adult mice with late spontaneous reperfusion: quantitative measurements of cerebral blood flow and cerebral protein synthesis. *Cerebral Blood Flow Metab*, 2006, 26: 927-931.
- [13] 任历, 于洪儒, 王洪新. 几种体外培养神经细胞缺氧模型效果的对比. *辽宁医学报*, 2007, 28: 20-22.
- [14] Sicaeros B, Campusano JM, O Dowd DK. Primary neuronal cultures from the brains of late stage *Drosophila* pupae. *J Vis Exp*, 2007(4): 1200.
- [15] Tabakman R, Lazarovici P, Kohen R. Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cell exposed to ischemia. *J Neurosci Res*, 2002, 68: 463-466.
- [16] Poirrier AL, Nyssen Y, Schohes F, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation improves open field locomotor recovery after low but no thigh thoracic spinal compression-injury in adult rats. *Neurosci Res*, 2004, 75: 253-261.
- [17] Grassi C, Ascenzo MD, Torsello A, et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*, 2004, 35: 307-315.
- [18] Gao F, Wang S, Guo Y, et al. Protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a rat model of transient cerebral ischemia: a micro PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 37: 954-961.
- [19] Werbowetski-Ogilvie TE, Seyed Sadr M, Jabdao N, et al. Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit. *Oncogene*, 2006, 25: 5103-5112.
- [20] Hammond R, Vivancos V, Naeem A, et al. Slit-mediated repulsion is a key regulator of motor axon pathfinding in the hindbrain. *Development*, 2005, 132: 4483-4495.
- [21] Wehrle R, Camand E, Chedotal A, et al. Expression of netrin-1, slit-1, and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. *Eur J Neurosci*, 2005, 22: 2134-2134.
- [22] Whitford KL, Marillat V, Stein E, et al. Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron*, 2002, 33: 47-61.
- [23] Trillo MA, Ubeda A, Blanchard JP. Magnetic fields at resonant conditions for the hydrogen ion after neurite outgrowth in pc12 cell: a test of the ion parametric resonance model. *Bioelectromagnetics*, 1996, 17: 10-20.
- [24] Liu Z, Patel K, Schmidt H, et al. Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 26: 232-240.
- [25] Mambetisaeva ET, Andrews W, Cmaurri L, et al. Robo Family of proteins exhibit differential expression in mouse spinal cord and robo-slit interaction is required for midline crossing in vertebrate spinal cord. *Development Dynamics*, 2005, 233: 41-51.
- [26] Siebner HR, Hartwigsen G, Kassuba T, et al. How does transcranial magnetic stimulation modify neuronal activity in the brain? Implications for studies of cognition. *Cortex*, 2009, 45: 1035-1042.
- [27] Müller MB, Tosehi N, Kresse AE, et al. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 2000, 23: 205-215.
- [28] Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci*, 2003, 23: 11416-11423.
- [29] Fu Q, Hue J, Li S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via RhoA inhibition. *J Neurosci*, 2007, 27: 4154-4164.
- [30] Chen H, Firestein BL. RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *J Neurosci*, 2007, 27: 8378-8386.

(收稿日期: 2013-09-03)

(本文编辑: 戚红丹)