

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.04.0441

· 论 著 ·

RNA 干扰 RGMa 对大鼠脑缺血再灌注损伤后大脑皮质血管再生的影响

王 玉,秦新月*,张融融,幸享凤,谢 扉
重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨 RNA 干扰排斥性导向分子 a (repulsive guidance molecule a, RGMa) 对大鼠脑缺血再灌注损伤后大脑皮质血管再生的作用及其可能的机制。**方法** 大鼠随机分为假手术组(S 组)、脑缺血再灌注损伤组(I/R 组)、脑缺血再灌注损伤+RGMa 特异性 RNA 干扰重组腺病毒干预组(I/R+rAd-shRGMa 组)以及脑缺血再灌注损伤+空载体重组腺病毒注射组(I/R+rAd-HK 组)。大鼠在脑缺血前接受腺病毒注射,然后采用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型。再灌注后 2 d 免疫荧光双标法定位 RGMa 及其受体 Neogenin 在血管内皮细胞上的表达。腺病毒注射后 7 d,免疫组化标记 CD31⁺ 的血管内皮细胞,计数大脑皮质缺血周围区微血管数;蛋白质印迹实验检测血管内皮生长因子 a(VEGFa)蛋白表达水平;评估神经功能缺损。**结果** 在缺血再灌注损伤后,RGMa 及其受体 Neogenin 在 CD31⁺ 细胞上均有表达。RNA 干扰抑制 RGMa 表达后,微血管数量增多,VEGFa 蛋白表达水平升高,神经功能缺损减轻。**结论** RNA 干扰 RGMa 表达可促进缺血再灌注损伤后缺血皮质周围区血管再生,该过程可能与脑组织 VEGFa 表达水平上调有关。

[关键词] 排斥性导向分子 a;脑缺血;再灌注损伤;血管再生
[中图分类号] R 743.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)04-0441-05

Effect of RGMa-targeted RNA interference on angiogenesis in rat cerebral cortex after focal cerebral ischemia/reperfusion injury

WANG Yu, QIN Xin-yue*, ZHANG Rong-rong, XING Xiang-feng, XIE Fei
Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of RNA interference targeting repulsive guidance molecule a (RGMa) on angiogenesis in rat cerebral cortex after focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury and its potential mechanism. **Methods** The experimental animals were randomly divided into sham operated group(S), cerebral I/R group, I/R plus RGMa-specific recombinant adenovirus (I/R+rAd-shRGMa) and I/R plus empty carrier recombinant adenovirus group (I/R+rAd-HK). Adenovirus were injected into the right cortex and hippocampus in rats before undergoing I/R surgery. The transient middle cerebral occlusion (tMCAO) model was induced by ligation with nylon monofilament. Location of RGMa and Neogenin was assessed by Laser confocal microscope 2 days after tMCAO. Seven days after adenovirus injection, the expression of CD31 was detected by immunohistochemistry and the expression of vascular endothelial growth factor a (VEGFa) was detected by Western blotting analysis. Neurological score was evaluated before animals were sacrificed. **Results** Both RGMa and Neogenin were expressed in CD31⁺ cells after focal cerebral I/R injury as shown by double staining. Suppression of RGMa *via* RNA interference increased the number of CD31⁺ cells and the expression of VEGFa, and improved the neurological deficits. **Conclusion** RGMa-targeted RNA interference can promote angiogenesis in peri-infarction cortex after cerebral I/R injury, which is partly related to the increase of VEGFa expression in the cerebral tissues.

[Key words] repulsive guidance molecule a; brain ischemia; reperfusion injury; angiogenesis
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(4): 441-445]

缺血性脑血管疾病是神经系统的常见疾病,具有高发病率、高致残率及高致死率的特点,严重危害人类健康。新血管的形成(angiogenesis)是脑梗死后早期的重要过程,能改善局部血流供应,帮助清除坏死组织,为神经元修复、再生创造良好的微环境,从而促进神经功能康复^[1]。排斥性导向分子a(repulsive guidance molecule a, RGMa)是一种轴突导向因子。近期研究发现,RGMa在中枢神经系统受损后过度表达^[2],与其受体Neogenin结合后,介导轴突生长抑制、排斥性导向作用,并参与了神经增殖、分化、存活等过程^[3]。研究发现血管和神经系统具有一定的相似性,因此它们之间存在着一些共同的分子信号,许多神经导向因子如Netrin-1、Netrin-4、Ephrin-B2等在神经和血管生长过程中均能发挥调节作用^[4]。但目前关于RGMa在血管系统中的作用尚待阐明。本研究采用重组腺病毒对缺血再灌注大鼠脑组织RGMa的转录进行RNA干扰(RNA interference, RNAi),从而抑制RGMa表达,观察血管再生情况,探讨RNA干扰RGMa对大鼠局灶性缺血再灌注后血管再生的影响及潜在的机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 RGMa特异性RNAi重组腺病毒rAd-shRGMa(产品名:rAd5-P748;病毒滴度: 2.5×10^{10} pfu/mL)及空载体重组腺病毒rAd-HK(产品名:rAd5-HKshRNA;病毒滴度: 2.5×10^{10} pfu/mL)购自武汉晶赛生物工程有限公司。兔抗大鼠RGMa多克隆抗体、小鼠抗大鼠CD31单克隆抗体购自Abcam公司,兔抗大鼠Neogenin多克隆抗体购自Santa Cruz公司,兔抗大鼠血管内皮生长因子a(VEGFa)多克隆抗体、小鼠抗大鼠 β -actin多克隆抗体购自Proteintech公司。Dylight 488标记山羊抗兔IgG购自Earthox公司,Cy3标记山羊抗小鼠IgG购自Proteintech公司。免疫组化检测相关试剂盒、免疫印迹检测相关试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验动物及分组 清洁级成年雄性SD大鼠50只,体质量180~280 g,购于重庆医科大学实验动物中心。将大鼠随机分为4组,即假手术组(S组)、脑缺血再灌注损伤血组(I/R组)、脑缺血再灌注损伤+RNAi重组腺病毒干预组(I/R+rAd-shRGMa组)以及脑缺血再灌注损伤+空载体重组腺病毒注射组(I/R+rAd-HK组)。假手术组除了不插入线栓外,其余步骤同模型制作。I/R组制作

大脑中动脉缺血再灌注损伤模型,参照本课题组前期的线栓法^[5-6]制备,结合Longa评分^[7];1~3分的大鼠纳入实验,0分与4分以及在取材时发现蛛网膜下隙出血者剔除实验组,并从同批次实验大鼠中随机抽取补齐。I/R+rAd-shRGMa组和I/R+rAd-HK组大鼠接受腺病毒注射后立即制作脑缺血再灌注损伤模型。腺病毒的立体定位参照本课题组前期的实验方法^[6],以前囟为坐标原点,右侧两点皮质(2.0, 1.0, -1.2) mm、(1.5, -3.0, -1.2) mm以及海马(2.5, -3.5, -3.5) mm作为靶点。每个点分别注射腺病毒2 μ L,注射速度0.2 μ L/min,注射完毕后保留微量进样器在原位5 min后拔针。I/R组再分为2 d和7 d亚组,2 d组用免疫荧光定位RGMa及其受体Neogenin在缺血脑组织中的表达,其余大鼠在脑缺血再灌注后7 d分别进行免疫组化微血管计数及蛋白质印迹实验检测VEGFa的表达。所有大鼠在处死前进行神经功能评分。

1.3 蛋白质印迹实验 大鼠断头取脑后,取出缺血侧大脑中动脉供血区皮质于-80℃保存。按照蛋白提取说明书提取出组织蛋白。蛋白样品在10%的SDS-PAGE凝胶中分离后,转移至PVDF膜上,与兔抗大鼠VEGFa多克隆抗体(1:750)或小鼠抗大鼠 β -actin多克隆抗体(1:3 000)4℃孵育过夜。二抗(1:1 000)室温孵育2 h后,使用凝胶成像分析系统扫描拍照,应用Fusion软件进行结果分析,以VEGFa/ β -actin的相对值表示蛋白表达水平。

1.4 免疫荧光检测 取大鼠缺血侧脑组织制备冰冻切片(片厚10 μ m),-80℃保存。取出晾干,放入丙酮中固定30 min,PBS冲洗后放入乙二胺四乙酸(EDTA)溶液(1 mmol/L,pH=8)中进行微波修复,10 min后PBS冲洗;加入0.3% Triton破膜,PBS冲洗后封闭血清37℃孵育1 h,甩去血清;兔抗大鼠RGMa多克隆抗体(1:50)、兔抗大鼠Neogenin多克隆抗体(1:20)分别与小鼠抗大鼠CD31单克隆抗体(1:100)混合后,滴加到脑组织上,4℃孵育过夜。第2天将切片37℃复温1 h,PBS冲洗后,在避光条件下加入Dylight 488标记山羊抗兔IgG(绿光)和Cy3标记山羊抗小鼠IgG(红光)的混合二抗(稀释浓度均为1:100),37℃孵育2 h后PBS冲洗,50%甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.5 免疫组化及微血管计数 从每只大鼠冰冻切片中随机抽取5张,经过抗原修复、破膜、 H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶、血清封闭后,与小鼠抗大鼠CD31单克隆抗体(1:200)混合,4℃孵育过夜,按照

说明书进行免疫组化染色、DAB 显色并封片。在显微镜下观察阳性细胞并拍照,每张切片中采集 5 个不重叠的 200 倍视野进行微血管计数。参考 Weidner 改良微血管计数法^[8],染色棕黄、与背景明显有别的内皮细胞作为一个计数单位(相互分离的内皮细胞、内皮细胞簇、内皮细胞条索均按 1 个微血管计数),不以是否形成血管管腔或管腔内有无红细胞作为计数单位,管腔>6 个红细胞大小、带有肌层的血管不计算在内。

1.6 神经功能评估 参照 Garcia 等^[9]的评分标准,采用评分者单盲的方法对大鼠的自主运动、四肢运动协调性、前肢运动对称性、爬网能力、躯体本体感觉以及胡须刺激的反应等 6 项进行评分,最低分 3 分,最高分 18 分,得分越低表明神经功能缺损越严重。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐时两两比较行 LSD 检验,方差不齐时行 Tamhane 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 缺血再灌注损伤后 RGMa 及其受体 Neogenin 的表达 共聚焦结果(图 1)显示,大鼠缺血周围脑皮质区可见 RGMa(图 1A,绿光)与 Neogenin(图 1B,绿光),均在 CD31⁺细胞(红光)上表达。

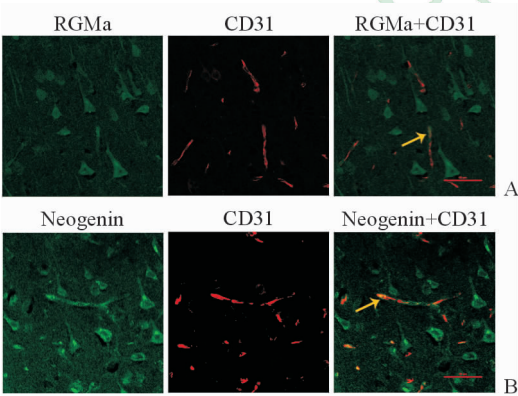


图 1 RGMa (A)、Neogenin (B)与 CD31 免疫荧光双标阳性细胞染色

Fig 1 Dual-labeled immunofluorescence of RGMa (A) or Neogenin (B) with CD31

RGMa; Repulsive guidance molecule a. Arrows showing RGMa⁺, Neogenin⁺ endothelial cells. Original magnification;×600

2.2 各组大鼠皮质 CD31 免疫组化染色及微血管计数 大鼠脑缺血再灌注损伤后 7 d,缺血周边区可见 CD31 标记的棕色的单个内皮细胞散在分布或呈细条索排列(图 2)。I/R 组微血管数量(54.6±

6.35)较 S 组(9.40±1.14)增多($P<0.01$);I/R+rAd-HK 组微血管数量为 56.60±4.16 与 I/R 组比较差异无统计学意义;I/R+rAd-shRGMa 组微血管数量最多(77.80±3.70),与其他 3 组比差异均有统计意义($P<0.01$)。

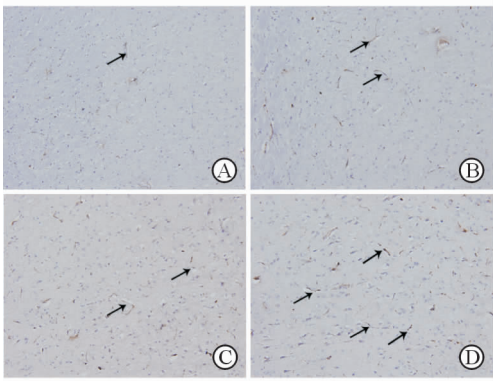


图 2 rAd-shRGMa 对大鼠大脑皮质缺血周围区 CD31 表达的影响

Fig 2 Effects of rAd-shRGMa on CD31 expression in peri-infarction cortex area

A: Sham operated group; B: Cerebral ischemia/reperfusion (I/R) group; C: I/R + rAd-HK group; D: I/R + rAd-shRGMa group. Arrows show CD31⁺ cells. Original magnification;×200

2.3 蛋白质印迹实验检测脑组织内 VEGFa 蛋白表达 如图 3 所示,脑缺血再灌注损伤后(I/R 组)大鼠缺血侧脑皮质 VEGFa 蛋白表达较 S 组升高($P<0.01$)。与 I/R 组比较,I/R+rAd-HK 组 VEGFa 蛋白水平无明显变化($P>0.05$),而 I/R+rAd-shRGMa 组 VEGFa 蛋白水平升高($P<0.01$)。

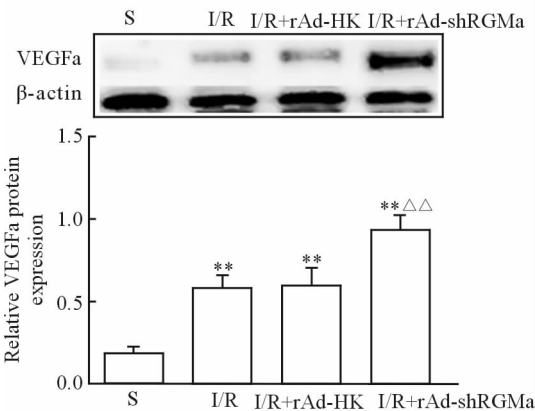


图 3 rAd-shRGMa 对缺血侧脑皮质 VEGFa 蛋白表达的影响

Fig 3 Effects of rAd-shRGMa on the expression of VEGFa in the ischemia cortex tissues of each group

S: Sham operated; I/R: Ischemia/reperfusion; VEGFa: Vascular endothelial growth factor a. ** $P<0.01$ vs S group; $\triangle\triangle P<0.01$ vs I/R group. $n=5$, $\bar{x}\pm s$

2.4 神经功能评估 与 S 组比较,I/R 组大鼠出现严重的神经功能缺损($P<0.01$)。给予腺病毒 rAd-shRGMa 干预后,大鼠的神经功能缺损减轻($P<0.01$),而 I/R+rAd-HK 组大鼠神经功能缺损与 I/R 组比较未见明显变化。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分

Tab 1 Neurological scores of rats in different groups

$n=5, \bar{x}\pm s$

Group	Neurological scores
S	16.56±0.53
I/R	9.89±2.47 **
I/R+rAd-HK	9.56±2.07 **
I/R+rAd-shRGMa	13.00±1.32 **△△

S: Sham operated; I/R: Ischemia/reperfusion. ** $P<0.01$ vs S group; △△ $P<0.01$ vs I/R group

3 讨论

近期研究发现 RGMa 不仅参与了细胞的增殖、分化、黏附和迁移以及轴突导向等早期神经系统发育过程,在神经系统损伤后,还介导了轴突生长的抑制、炎症反应的调节等,在脑缺血、多发性硬化、老年性痴呆等中枢神经系统疾病的病理机制中发挥着多种作用^[3]。近年来,许多研究表明血管神经系统拥有一些共同的机制及特性,并且有研究证实一些神经导向因子在对神经生长起导向作用的同时也对血管发生起着调节作用,例如神经轴突导向四大家族之一 Netrin 家族的成员 Netrin-1 在血管生成中发挥着重要作用^[10]。在调节血管新生的过程中,Neogenin 可作为 Netrin-1 的受体,介导 Netrin-1 对血管平滑肌的作用^[11],然而其对内皮细胞的促血管生成效应可能并非由 Netrin 介导。值得注意的是,Neogenin 也是神经系统中 RGMa 的主要受体,且 RGMa 与 Neogenin 结合的亲和力远高于 Netrin-1^[12]。已有研究发现在肿瘤进展过程中 RGMb 可能参与调节 HGF 和 BMP-7 介导的血管新生过程^[13],但关于 RGMa 是否参与调节缺血再灌注脑损伤后血管再生的过程,目前鲜有报道。

本研究发现,大鼠脑缺血再灌注损伤后 7 d,缺血皮质周围区微血管数目较假手术组(S 组)明显增加($P<0.01$),这与 Hayashi 等^[14]报道的血管新生

从卒中后 1 d 开始并在 3~7 d 迅速增多相一致。研究报道 RGMa 在局灶脑缺血再灌注 12 h 时开始升高,2 d 时达高峰,随后有所下降,在 2 周时仍稍高于正常水平^[2]。RGMa 的受体 Neogenin 则在缺血再灌注损伤后 1 d 开始持续升高,并在 14 d 达到高峰^[15]。而在本研究中,RGMa 表达的高峰期即缺血再灌注损伤后 2 d,RGMa 及其受体 Neogenin 在血管内皮细胞上均有表达,提示其可能参与损伤后血管新生的过程。本课题组前期研究已经证明,用重组腺病毒 rAd-shRGMa 进行特异性 RNAi 可显著降低 RGMa 表达、促进轴突生长、改善大鼠神经功能^[16]。当给予腺病毒抑制 RGMa 表达后,缺血皮质周围区微血管数量较对照组增多($P<0.01$),且神经功能改善($P<0.01$)。因此,RGMa 可能在缺血再灌注损伤后发挥负性调节作用,通过 RNAi 抑制 RGMa 表达则促进了血管的再生,而新生的血管改善了缺血、缺氧引起的神经细胞损伤,从而促进神经功能的康复。

缺血性脑卒中后血管再生涉及多种生长因子和细胞因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及血管紧张素(Ang)等,其中 VEGF 具有诱导血管新生、促血管内皮细胞增殖和增加血管通透性等生物活性^[17],VEGFa 是其主要的亚型。本研究发现,经 RNA 重组腺毒干预后 VEGFa 蛋白表达水平较对照组升高($P<0.01$)。

综上所述,RGMa 可能通过抑制缺血再灌注损伤后 VEGFa 的表达从而阻碍缺血再灌注损伤后的血管再生,而 RNA 干扰抑制 RGMa 表达后,有利于 VEGFa 发挥血管再生调节作用,最终促进了缺血再灌注后血管新生。因而在缺血再灌注损伤后血管再生过程中 RGMa 可能通过受体 Neogenin 调控 VEGF 通路发挥负性调节作用,但其机制仍有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, et al. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model[J]. J Clin Invest, 2004, 114: 330-338.

[2] Jiang F, Yin H, Qin X. Fastigial nucleus electrostimulation reduces the expression of repulsive

- guidance molecule, improves axonal growth following focal cerebral ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37: 1906-1914.
- [3] 王恬竹,秦新月. 排斥导向分子在中枢神经系统中的研究进展[J]. *西部医学*, 2014, 26: 680-682, 685.
- [4] 许伯凯,陈建伟,郑雅媛,李佳盈,翁颖盛. 血管发生及其与神经发生之间联系的研究进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2012, 31: 763-767.
- [5] 程 创,秦新月,郭 佳,燕伟平,徐广会,白永生. 过表达 Fibulin-5 对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的保护作用[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36: 1386-1389.
- [6] Feng J, Wang T, Li Q, Wu X, Qin X. RNA interference against repulsive guidance molecule A improves axon sprout and neural function recovery of rats after MCAO/reperfusion[J]. *Exp Neurol*, 2012, 238: 235-242.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [8] Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred E N, Moore D H, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84: 1875-1887.
- [9] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, Hu X J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26: 627-635.
- [10] 胡 佳,朱 超,黄 矛. 神经导向因子 Netrin-1 在血管生成中可能的双向作用[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 950-952.
- HU J, ZHU C, HUANG M. The possible dual role of neuronal guidance factor netrin-1 during angiogenesis and vascularization[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 950-952.
- [11] Park K W, Crouse D, Lee M, Karnik S K, Sorensen L K, Murphy K J, et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16210-16215.
- [12] Wilson N H, Key B. Neogenin: one receptor, many functions[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 874-878.
- [13] Sanders A J, Ye L, Li J, Mason M D, Jiang W G. Tumour angiogenesis and repulsive guidance molecule b: a role in HGF- and BMP-7-mediated angiogenesis[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45: 1304-1312.
- [14] Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan P H. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 2: 166-180.
- [15] Tsuchiya A, Hayashi T, Deguchi K, Sehara Y, Yamashita T, Zhang H, et al. Expression of netrin-1 and its receptors DCC and neogenin in rat brain after ischemia[J]. *Brain Res*, 2007, 1159: 1-7.
- [16] Wang T, Wu X, Yin C, Klebe D, Zhang J H, Qin X. CRMP-2 is involved in axon growth inhibition induced by RGMa *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47: 903-913.
- [17] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280: 1358-1366.

[本文编辑] 周燕娟