

# 体外培养的大鼠皮层神经元氧糖剥夺后 Sema3A、Nrp-1 mRNA 表达上调与轴突网络损伤的关系

陶玉倩<sup>1\*</sup>, 田青<sup>1</sup>, 叶文华<sup>2</sup>, 杨颖<sup>1</sup>, 张赛<sup>1</sup>, 陈淑英<sup>1</sup>

(1 中山大学医学院附属第一医院神经科, 广东广州 510080; 2 佛山市南海区人民医院 ICU, 广东佛山 528200)

**摘要:**【目的】研究体外培养的大鼠皮层神经元氧糖剥夺(OGD)处理后, Sema3A、Nrp-1 mRNA 的表达变化及其与神经元轴突网络损伤的关系。【方法】体外培养新生 SD 大鼠皮层神经元,随机分为正常对照组和 OGD 处理组;噻唑蓝(MTT)比色法测定神经元活性; $\beta$  III-tubulin 免疫荧光染色观察轴突网络形态学变化,Real-time PCR 检测 Sema3A 及其受体 Nrp-1 mRNA 的表达; $\beta$  III-tubulin 免疫荧光染色观察外源性 Sema3A 蛋白对神经元轴突生长的影响。【结果】随着 OGD 时间的延长,神经元活性呈梯度下降( $P < 0.01$ );OGD 处理 4 h 可导致神经元轴突网络发生明显的崩解损伤;OGD 处理 4 h、6 h 后, Sema3A mRNA 表达水平显著上调( $P < 0.01$ );OGD 处理 6 h 后, Nrp-1 mRNA 表达水平显著上调( $P < 0.01$ );经外源性 Sema3A (5 mg/mL)蛋白处理,可观察到神经元的轴突生长及延伸受到明显抑制( $P < 0.01$ )。【结论】OGD 处理可诱导 Sema3A、Nrp-1 mRNA 表达上调,并且外源性 Sema3A 蛋白可在体外抑制轴突生长,提示 Sema3A/Nrp-1 可能参与 OGD 处理后轴突网络崩解、细胞凋亡等病理生理过程。

**关键词:** 大脑皮层神经元; 氧糖剥夺; Semaphorin 3A; Neuropilin-1; 轴突/损伤

**中图分类号:** R363      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2011)02-0186-05

## Up-regulation of Sema3A and Nrp-1 mRNA Expression in OGD-induced Neurite Network Damage of Cultured Rat Cerebral Cortical Neurons

TAO Yu-qian<sup>1</sup>, TIAN Qing<sup>1</sup>, YE Wen-hua<sup>2</sup>, YANG Ying<sup>1</sup>, ZHANG Sai<sup>1</sup>, CHEN Shu-ying

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of ICU, Nanhai District People Hospital, Foshan 528200, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the relationship between the alteration of Sema3A and Nrp-1 mRNA expression and the neurite network damage after oxygen glucose deprivation (OGD) in cultured rat cortical neurons. 【Methods】 Cultured cortical neurons of newborn SD rats were randomly divided into control group and OGD treatment group. Neuronal survival rate was assayed with MTT method. Morphological changes of neurite network were observed with beta III tubulin ( $\beta$  III-tubulin) immunofluorescence staining. The expression of Sema3A and Nrp-1 mRNA were detected by real-time PCR. The effect of exogenous Sema3A protein on the axonal outgrowth was measured with  $\beta$  III-tubulin immunofluorescence staining. 【Results】 Treated with OGD, the neuron survival rate reduced in a time-dependent manner ( $P < 0.01$ ). OGD 4 h led to serious damage of neurite network. After OGD 4 h and 6 h, the mRNA expression of Sema3A obviously increased ( $P < 0.01$ ); and after OGD 6 h, the mRNA expression of Nrp-1 was also significantly up-regulation ( $P < 0.01$ ). The outgrowth and extension of neuron axon were obviously inhibited by the treatment with exogenous Sema3A (5 mg/mL) ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】 OGD can induce up-regulation of Sema3A and Nrp-1 mRNA, and exogenous Sema3A protein inhibits axon outgrowth in vitro. Sema3A/Nrp-1 may participate in the pathophysiology process of neurite damage and neuron apoptosis in cultured neuron of OGD treatment.

**Key words:** cerebral cortical neurons; oxygen glucose deprivation; semaphorin 3A; neuropilin-1; axons/injuries

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(2): 186-190]

收稿日期: 2010-12-03

基金项目: 广东省自然科学基金(9151066302000004); 广东省自然科学基金(06021357)

作者简介: 陶玉倩, 博士, 副教授, 硕士生导师, \* 通信作者, E-mail: taoyuqiansums@163.com; 田青, 在读硕士研究生, E-mail: tianqingsums@163.com

Sema3A (Semaphorin3A) 是一种分子质量为 100 ku 的分泌型蛋白,最早由 Luo 等<sup>[1]</sup>从鸡脑中提取。在神经系统发育过程中,Sema3A 作为一种抑制性轴突导向因子,与受体 Neuropilin-1 (Nrp-1)<sup>[2]</sup>结合,通过诱导轴突末端的生长锥崩解,促使轴突生长方向逆转,从而起到轴突的定向导航作用<sup>[1]</sup>;并且以轴突导向作用为基础,参与神经纤维成束、分枝及突触形成等过程<sup>[3]</sup>。

近年来研究发现,Sema3A 在成年动物神经系统中也有表达,并且参与了神经系统损伤后神经再生与修复的病理生理过程<sup>[4]</sup>。Hou 等<sup>[5]</sup>报道,在鼠脑陈旧梗死灶及周围组织中,Sema3A 及其受体 Nrp-1 长期持续上调表达,提示 Sema3A 可能在脑卒中后的远期神经修复过程中起到抑制神经轴突再生的作用。

而在缺血性脑损伤的急性期,Sema3A 是否参与缺血后的损伤级联反应,Sema3A/Nrp-1 的表达变化及对神经元轴突存活的影响如何,还未见文献报道。本研究以体外培养的大鼠皮层神经元为模型,观察氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 处理对神经元轴突网络的影响和同一时间段 Sema3A/Nrp-1 mRNA 的表达情况,以及外源性 Sema3A 蛋白在体外对轴突生长的影响作用;探讨 OGD 处理后 Sema3A/Nrp-1 mRNA 的表达上调与轴突网络损伤的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂与仪器

胰酶、DNA 酶、胰酶抑制剂、阿糖胞苷、L-多聚赖氨酸、Hoechst33342 染液、MTT 等均购于 Sigma 公司。兔抗大鼠  $\beta$  III-tubulin 抗体购于 Abcam 公司,FITC、Cy3 偶联羊抗兔荧光二抗购于 Jackson 公司。Neurobasal 培养基、B27 购于 Invitrogen 公司。RNAiso Plus (D9108A)、SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit (DRR063A) 购于 TaKaRa 公司。细胞培养箱 (Heraeus 公司)、荧光显微镜 (Olympus 公司)、酶标仪 (Bio-TEK 公司)、Real-time PCR 仪 (MJ Research 公司) 等实验仪器均由中山大学附属第一医院神经科实验室提供。新生 24 h 内的 SD 大鼠,由中山大学医学院实验动物中心提供。

### 1.2 神经元原代培养

选取新生 24 h 内的 SD 大鼠,解剖显微镜下,

用显微手术镊无菌剥取大脑皮层,并剔除脑膜及血管组织,D-Hanks 液冲洗后剪碎(以上操作均在冰上进行)。胰酶 (0.25 mg/mL) 消化,37 °C,15 min;等体积 D-Hanks 液(含 0.08 mg/mL DNA 酶及 0.56 mg/mL 胰酶抑制剂),终止消化,并吹散成悬液;过滤后离心 1 500 r/min,5 min,弃上清。Neurobasal 培养液(含体积分数 1% 胎牛血清、2% B27)重悬细胞,吹散为单细胞悬液。细胞计数后调整为合适的细胞密度,接种于 L-多聚赖氨酸(0.1 mg/mL)预包被的培养皿中,置于 37 °C,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。接种 24 h 后加入阿糖胞苷(10  $\mu$ mol/L)抑制胶质细胞生长,接种 3 d 后半量换液,以后每 3 ~ 4 d 半量换液 1 次。

### 1.3 神经元 OGD 模型的建立

原代皮层神经元培养 5 ~ 6 d 后,吸弃原有细胞培养液,换入平衡盐缓冲液(KCl 3, NaCl 156, MgSO<sub>4</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, HEPES 10; 单位 mmol/L, pH 7.35),35 mm 培养皿中加入 1 mL,96 孔板中加入 100  $\mu$ L。然后将培养皿置入缺氧密闭盒中,持续缓慢通入体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 和 95% N<sub>2</sub>,以置换密闭盒内的氧气;通气 30 min 后于 37 °C 培养箱中继续培养,达到所需缺氧时间后进行相应的实验观察。

### 1.4 $\beta$ III-tubulin、Hoechst33258 免疫荧光染色

原代神经元接种于放有灭菌盖玻片的六孔培养板中,制成细胞爬片,培养 5 ~ 6 d 后,进行 OGD 处理。荧光染色:吸弃培养液,PBS 漂洗;40 g/L 多聚甲醛溶液冰上固定 30 min 后;0.1% TritonX-100/PBS 37 °C 孵育 30 min 破膜;正常山羊血清室温封闭 30 min,弃血清免洗;加入兔抗大鼠  $\beta$  III-tubulin 一抗(1:1000,1% BSA/PBS 稀释),4 °C 湿盒内孵育过夜。次日吸弃一抗,PBS 漂洗;滴加 FITC 或 Cy3 偶联的羊抗兔荧光二抗(1:100,1% BSA/PBS 稀释)避光室温孵育 60 min。PBS 漂洗后再滴加 Hoechst33258 染液,染色 10 min, PBS 充分漂洗后中性甘油封片。荧光显微镜下观察拍照。

### 1.5 MTT 法测细胞活力

原代培养神经元,调整细胞浓度为  $2 \times 10^4$  个/L,种植于 96 孔培养板培养 5 ~ 6 d 后,实验分组:正常对照组和 OGD 处理组(分别进行 OGD 处理 2、4、6 和 8 h),每组设立 6 个平行复孔及 1 个空白对照孔。进行 MTT 检测:每孔加入 MTT 20  $\mu$ L (终浓度为 5 mg/mL,避光),37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱

继续培养 4 h 后,小心弃除上清,加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ ,振荡 10 min 溶解紫色结晶物,用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度值( $D_{490\text{nm}}$ )。两组数据均扣除空白对照孔  $D_{490\text{nm}}$  值后,计算细胞存活率( $\%$ ) =  $D_{\text{处理组}}/D_{\text{正常组}} \times 100\%$ 。

### 1.6 Real-time RT-PCR 检测 Sema3A/Nrp-1 mRNA

利用有机溶剂提取法(RNAiso Plus、氯仿等)提取皮层神经元总 RNA,进行 RNA 浓度、纯度检测及完整性鉴定,纯度及完整性高的 RNA 用于后续实验。按照 SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit 试剂盒说明书操作,进行两步法 RT-PCR 反应:首先将总 RNA 逆转录为 cDNA(37  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min 逆转录; 85  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s 逆转录酶失活),得到的 cDNA 再进行后续的 Real-time PCR 反应(95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s 变性; 60  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s 退火延伸; 30 循环)。Sema3A、Nrp-1 及  $\beta$ -Actin mRNA 引物序列由 Takara 公司设计合成,产物大小分别为:144 bp、100 bp 及 150 bp。运用双标准曲线法进行 Sema3A、Nrp-1 mRNA 的相对定量分析,数据以目的基因(即 Sema3A、Nrp-1)/内参基因(即  $\beta$ -Actin)的相对表达量进行统计分析。

### 1.7 轴突长度测量

神经元贴壁培养 3 d 后,加入终浓度为 5 mg/mL 的 Sema3A,连续作用 48 h 后, $\beta$ III-tubulin 免疫荧光染色,并拍摄显微镜下荧光图像,利用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像分析,以轴突末端至其胞体结合部的循迹距离为尺度界定标准,测量图像中所有细胞的轴突长度。正常对照组在相同时间点进行荧光染色,并拍照测量轴突长度。两组分别随机选取 10 个视野,共有 230 个神经元的轴突纳入测量。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组独立样本均数间比较采用  $t$  检验,多组独立样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。实验结果均经重复实验 3 次。

## 2 结 果

### 2.1 OGD 处理导致神经元轴突网络损伤

正常状态下,原代大鼠皮层神经元培养至 5 ~ 6 d,可观察到神经元胞体饱满立体,胞核大,轴突粗壮健康,并互相交织为复杂而紧密的神经网络

(图 1A)。而经 OGD 处理 4 h 后,神经元胞体皱缩变形,胞核固缩,轴突变细崩解,原有的神经网络完全崩解为颗粒样碎片,细胞之间失去网络联系(图 1B)。

### 2.2 OGD 处理对神经元活性的影响

MTT 法检测大鼠皮层神经元经 OGD 处理后细胞活性的变化。实验结果显示,OGD 处理 2 h,即出现细胞活性的明显下降,其细胞存活率与正常对照组比较,降至(70.88  $\pm$  0.07)%;OGD 处理 4 h,细胞存活率下降至(51.15  $\pm$  0.04)%;并且随着 OGD 时间的延长,细胞存活率逐渐下降;OGD 处理 8 h,细胞活性降至最低值(11.76  $\pm$  0.01)%(图 2)。

### 2.3 神经元 OGD 处理后 Sema3A、Nrp-1 mRNA 表达变化

原代大鼠皮层神经元经 OGD 处理后,与正常对照组比较,Sema3A 及其受体 Nrp-1 mRNA 表达水平有上调趋势(图 3)。OGD 处理 4 h、6 h 后,Sema3A mRNA 表达水平分别上调为正常对照组的 2.06、1.48 倍;Nrp-1 mRNA 的表达水平,在 OGD 处理 2 ~ 4 h 内,无明显变化,OGD 处理 6 h 后,其表达水平上调为正常对照组的 3.10 倍。其中 OGD 分别处理 4 h、6 h 后,Sema3A、Nrp-1 mRNA 的表达先后达到高峰,以后随缺氧时间延长又逐渐下降。Real-time PCR 产物电泳鉴定显示产物单一特异(图 4)。

### 2.4 Sema3A 抑制神经元轴突生长

原代大鼠皮层神经元,种植后 2 d 即可观察到轴突由胞体轴丘处向外延伸生长,并逐渐与周围神经元形成突触联系(图 5A)。而经外源性 Sema3A 蛋白(5 mg/mL)处理 48 h 后,可明显观察到神经元轴突的生长及延伸受到抑制,不能与周围神经元形成良好的突触联系(图 5B),其平均轴突长度(270.54  $\pm$  43.6)  $\mu\text{m}$  与正常对照组(102.73  $\pm$  20.32)  $\mu\text{m}$  比较,明显缩短( $P < 0.01$ )。

## 3 讨 论

在卒中引发的脑损伤中,胞内钙超载引发一系列有害的级联反应,最终引起神经元的损伤和死亡<sup>[6]</sup>。有研究表明,在兴奋性毒性诱导体外培养的神元死亡的过程中,首先观察到的是轴突网络的退缩、崩解,随后神经元才出现典型的死亡形态学改变。轴突损伤对于整个神经元死亡来说可

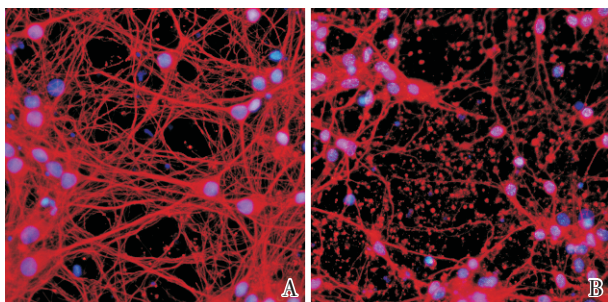


图 1 OGD 处理导致轴突网络崩解

Fig.1 OGD result in collapse of neurite network

A: normal control; B: OGD 4 h (× 200)

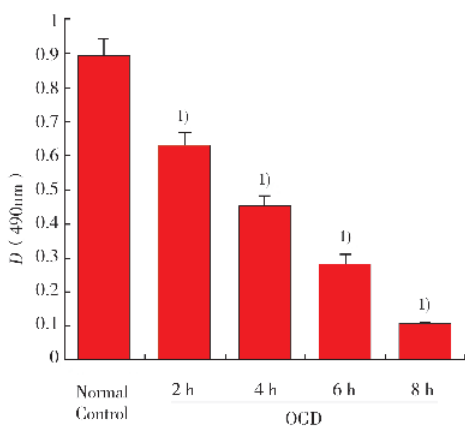


图 2 OGD 处理对神经元活性的影响

Fig.2 Effects of OGD on the survival of cultured cortical neurons

n = 6. <sup>1)</sup>P < 0.01 vs normal control; Error bar: standard deviation

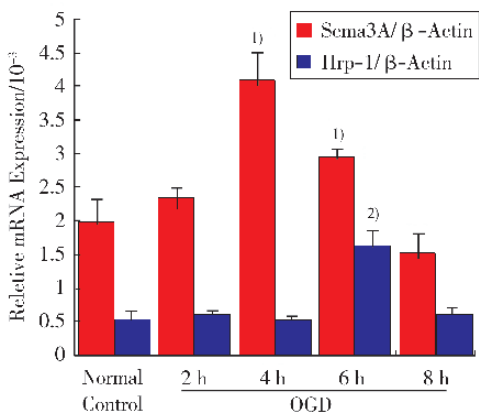


图 3 OGD 处理对 Sema3A/Nrp-1 mRNA 表达水平的影响

Fig.3 Effects of OGD on Sema3A/Nrp-1 mRNA expression

<sup>1)</sup>P < 0.01 vs Sema3A normal control, <sup>2)</sup>P < 0.01 vs Nrp-1 normal control, n = 6; Error bar: standard deviation

能是一个早期引发因素<sup>[7]</sup>, 然而有关轴突网络的退缩、崩解的分子生物化学机制还尚不清楚。

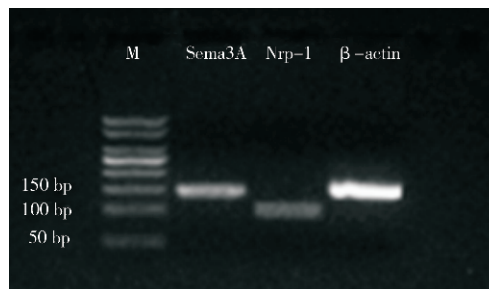


图 4 Real-time PCR 产物电泳鉴定图

Fig 4 The identification of real-time PCR product by electrophoresis

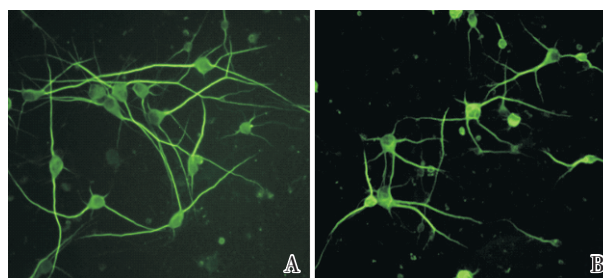


图 5 Sema3A 对神经元轴突生长的影响

Fig.5 Effects of Sema3A on the neurite outgrowth of cultured cortical neurons

A: Normal control; B: Sema3A 5 mg/mL, 48 h; × 200

本研究中, 体外培养的神经元经 OGD 处理 4 h 后, 可明显观察到神经元轴突网络崩解(图 2B)。同时, OGD 处理 4 h, 神经元细胞存活率下降至正常对照组的(51.15 ± 0.04)%, 并且随着 OGD 时间的延长, 细胞存活率逐渐下降; OGD 处理 8 h, 细胞活性降至最低值 (11.76 ± 0.01)% (图 1)。表明 OGD 处理可诱导神经元轴突网络的损伤、崩解, 并同时导致神经元损伤、死亡, 而轴突损伤可能是神经元死亡的一个诱发因素。

有动物实验证实<sup>[5]</sup>, Sema3A 及其受体 Nrp-1 mRNA 在陈旧梗死灶及周围组织长期持续上调表达, 提示 Sema3A 可能在脑缺血后梗死灶及周围损伤组织的慢性修复、神经再生及突触可塑性中起到重要作用, 并且这种作用主要是抑制性的<sup>[8]</sup>。本次研究着眼于脑缺血后的急性期, 观察到在 OGD 损伤 4 ~ 6 h 后, Sema3A mRNA 有明显的上调表达, 并且 OGD 处理 6 h 后, Nrp-1 mRNA 继而上调表达(图 3)。表明 Sema3A、Nrp-1 同样参与了缺血性脑损伤后的急性级联反应的病理生理过程; Sema3A 可能诱导 Nrp-1 表达上调, 并进一步与其结合, 激活下游信号通路。值得注意的是, OGD 处

理 4 h 后 Sema3A 上调表达达到高峰的同时(图 3),可观察到神经元轴突网络的严重崩解破坏(图 2B),提示 Sema3A 上调表达与神经元轴突损伤崩解可能存在一定的相关性。而随着缺氧时间的延长(6~8 h),Sema3A、Nrp-1mRNA 的表达又逐渐下降,可能由于细胞活性的进一步下降,细胞凋亡、坏死加重,RNA 合成受到抑制所致。

通过本实验观察及结合以往文献报道推测,由 Sema3A 激活的抑制性信号不仅局限于神经系统发育的早期,其在动物出生乃至成年后仍然发挥作用。尤其在体内神经系统遭受损伤后<sup>[5,9]</sup>,在病理性细胞凋亡的过程中,病灶周围处于应激状态但仍有活力的神经元或相关胶质细胞可能会分泌 Sema3A 等抑制性轴突导向因子,继而被周围细胞表面 Sema3A 受体 Nrp-1 所识别,激活胞内信号通路,最终导致轴突损伤,继而细胞死亡。同样,神经元遭受 OGD 损伤后的 4~6 h,Sema3A/Nrp-1 表达明显上调(图 3),提示 Sema3A、Nrp-1 可能在缺血性脑损伤急性期的神经再生障碍、炎症和细胞凋亡等病理生理过程中起着重要作用。

既往研究报道,Sema3A 可在中枢神经系统损伤后的胶质瘢痕中表达,起到抑制神经元轴突延伸的作用<sup>[4]</sup>。本实验将体外培养的皮层神经元予以 Sema3A(终浓度 5 mg/mL)处理 48 h,可明显观察到神经元轴突的生长及延伸受到抑制,不能与周围神经元形成良好的突触联系;从而在细胞水平证明了 Sema3A 对于出生后动物的神经元,可发挥明显的抑制轴突生长及诱发轴突损伤的作用。已有文献报道,Sema3A 在一定浓度范围内能够诱导体外培养的小脑颗粒神经元凋亡<sup>[10]</sup>。那么,Sema3A 作为一种轴突导向因子,不仅在轴突导向生长方面发挥作用,可能在特定的因素诱导下如轴浆运输的破坏、细胞间相互营养支持的减少等,通过某种抑制性信号导致神经元活性降低甚至诱发细胞凋亡,而其轴突导向和细胞凋亡的信号转导是否通过同一条信号通路,还需要进一步的实验证实。

综上所述,在正常神经系统发育过程中,Sema3A 起到重要的轴突导向作用,以确保建立精密有效的神经网络,而在成年动物神经系统损伤后,在神经元死亡的早期,可能通过诱导轴突损

伤,对轴突再生产生消极影响,阻碍新的轴突网络的建立形成,并且进一步诱发神经元损伤甚至凋亡。而对于 OGD 处理后 Sema3A/Nrp-1 mRNA 表达上调与轴突网络损伤的关系的探讨研究,有助于阐释 Sema3A 在神经元死亡早期所起到的初始引发作用,进而为脑卒中后的早期神经保护提供新的靶点和思路。

#### 参考文献:

- [1] Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones [J]. *Cell*, 1993, 75(2): 217-227.
- [2] Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, et al. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors [J]. *Cell*, 1999, 99(1):59-69.
- [3] Fiore R, Püschel AW. The function of semaphorins during nervous system development [J]. *Front Biosci*, 2003, 8:S484-499.
- [4] Niclou SP, Franssen EH, Ehlert EM, et al. Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(4): 902-912.
- [5] Hou ST, Keklikian A, Slinn J, et al. Sustained up-regulation of semaphorin 3A, Neuropilin1, and doublecortin expression in ischemic mouse brain during long-term recovery [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(1): 109-115.
- [6] Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(3):310-318.
- [7] Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. Axonal self-destruction and neurodegeneration [J]. *Science*, 2002, 296(5569):868-871.
- [8] Pasterkamp RJ, Verhaagen J. Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006, 361(1473):1499-1511.
- [9] Klebanov O, Nitzan A, Raz D, et al. Upregulation of Semaphorin 3A and the associated biochemical and cellular events in a rat model of retinal detachment [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 247(1):73-86.
- [10] Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, et al. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis [J]. *J Neurochem*, 1999, 73(3):961-971.

(编辑 刘清海)