

本文引文格式:刘文静,郭健雄,王小义,等. RhoA/Cofilin 信号通路在慢性铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达中的作用机制[J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(6): 848-852.

【论著与临床报道】

RhoA/Cofilin 信号通路在慢性铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达中的作用机制

刘文静, 郭健雄, 王小义, 程厚之, 张丽凤, 廖素婵, 李艳丽, 黄俊杰
(右江民族医学院基础医学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 研究 RhoA/Cofilin 信号通路在慢性铝中毒大鼠海马和大脑皮层中突触相关蛋白表达及学习记忆功能的调控作用。方法 根据大鼠每天体重,配置浓度为 20 mmol/L 的麦芽酚铝溶液,按 20 μ mol/kg 对大鼠腹腔注射 2 个月建立慢性铝中毒大鼠模型,将慢性铝中毒模型大鼠随机分为 2 个组,即模型组、RhoA 抑制剂组,RhoA 抑制剂组用 40 mg/kg 的 Rhosin 盐酸盐腹腔注射,每天给药 1 次,连续 30 d;另设空白对照组,每组各 5 只。用 Morris 水迷宫定位航行实验记录大鼠找到平台的游泳路径轨迹,Western Blot 分别检测 RhoA、Cofilin、突触素(SYN)、突触后致密蛋白(PSD-95)在海马组织和大脑皮层中的表达水平。结果 Morris 水迷宫定位航行实验结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠运动轨迹趋向性较差,偏离目标平台;与模型组比较,RhoA 抑制剂组大鼠运动轨迹更多趋向于目标平台。Western Blot 结果显示,铝中毒模型组海马组织和大脑皮层的 Cofilin、PSD-95、SYN 蛋白相对表达量均比空白对照组的明显降低($P < 0.05$);铝中毒模型组海马组织和大脑皮层的 RhoA 蛋白相对表达量均比空白对照组的明显升高($P < 0.01$);RhoA 抑制剂组海马组织和大脑皮层的 Cofilin、PSD-95、SYN 蛋白相对表达量均比铝中毒模型组的明显升高($P < 0.05$);RhoA 抑制剂组海马组织和大脑皮层的 RhoA 蛋白相对表达量均比铝中毒模型组的明显降低($P < 0.05$)。结论 通过抑制 RhoA/Cofilin 信号通路可以改善慢性铝中毒大鼠的学习记忆能力,可能与通过上调海马组织和大脑皮层中 RhoA、SYN 和 PSD-95 蛋白表达和下调海马组织和大脑皮层中 Cofilin 蛋白表达有关。

关键词: RhoA/Cofilin 信号通路;麦芽酚铝;慢性铝中毒;学习记忆能力;突触相关蛋白

中图分类号: R595 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2024)06-0848-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.06.002

The mechanism of RhoA/Cofilin signaling pathway in learning and memory and the expression of synaptic-related proteins in rats with chronic aluminum poisoning

LIU Wenjing, GUO Jianxiang, WANG Xiaoyi, CHENG Houzhi,
ZHANG Lifeng, LIAO Suchan, LI Yanli, HUANG Junjie

(School of Basic Medicine, Youjiang Medical University
for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

基金项目:广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281142);百色市科学研究与技术开发计划项目(百科 20224140);右江民族医学院高层次人才科研课题(yy2020gcky036)

第一作者:刘文静,在读硕士研究生,研究方向:神经系统病理生理,E-mail:3300711049@qq.com

共同第一作者:郭健雄,硕士,研究方向:神经系统病理生理,E-mail:1468971862@qq.com

通讯作者:黄俊杰,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经系统病理生理、学习与记忆的机制,E-mail:1559199466@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the regulatory effect of RhoA/Cofilin signaling pathway on synaptic-related protein expression and learning and memory function in hippocampus and cerebral cortex of rats with chronic aluminum poisoning. **Methods** A chronic aluminum poisoning model rat was established by intraperitoneal injection of a 20 mmol/L maltol aluminum solution at a dose of 20 $\mu\text{mol/kg}$ per day for 2 months, based on the daily body weight of the rats. The rat models of chronic aluminum poisoning were randomly divided into two groups: a model group and a RhoA inhibitor group. The RhoA inhibitor group received intraperitoneal injections of 40 mg/kg Rhosin hydrochloride once daily for 30 consecutive days. An additional blank control group was included, with 5 rats in each group. The Morris water maze positioning navigation experiment was used to record the swimming paths of the rats to find the platform. Western Blot analysis was performed to detect the expression levels of RhoA, Cofilin, synaptophysin (SYN), and postsynaptic density protein 95 (PSD-95) in the hippocampus and cerebral cortex. **Results** The results of Morris water maze positioning navigation experiment showed that compared with the blank control group, the rats in the model group exhibited poorer trajectory orientation and deviated from the target platform. Compared with the model group, the movement trajectory of rats in the RhoA inhibitor group was more inclined to the target platform. Western Blot results showed that the relative expression levels of Cofilin, PSD-95, and SYN proteins in the hippocampal tissue and cerebral cortex of the aluminum poisoning model group were significantly lower than those of the blank control group ($P < 0.05$). The relative expression level of RhoA protein in the hippocampal tissue and cerebral cortex of the aluminum poisoning model group was significantly higher than that of the blank control group ($P < 0.01$). The relative expression levels of Cofilin, PSD-95, and SYN proteins in the hippocampal tissue and cerebral cortex of the RhoA inhibitor group were significantly higher than those of the aluminum poisoning model group ($P < 0.05$). The relative expression level of RhoA protein in the hippocampal tissue and cerebral cortex of the RhoA inhibitor group was significantly lower than that of the aluminum poisoning model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibiting the RhoA/Cofilin signaling pathway can improve the learning and memory abilities of rats with chronic aluminum poisoning, which may be related to the up-regulation of the expression of RhoA, SYN, and PSD-95 proteins and the down-regulation of the expression of Cofilin protein in the hippocampal tissue and cerebral cortex.

Key words: RhoA/Cofilin signaling pathway ; aluminum maltol ; chronic aluminum poisoning ; learning and memory abilities ; synaptic-related proteins

铝是地壳中含量最丰富的金属元素,随着人为开采和使用频率的增加,人类接触铝并通过各种途径摄入机体的频率也随之增加。近期研究发现,蓄积在机体中的铝可多层次、多途径的损害认知功能^[1]。RhoA 是 Rho 家族中的一种 GTPase 小蛋白,在介导突触重塑中起关键作用。Cofilin 是 RhoA 基因表达下游重要的效应分子,与人的学习、记忆和联想等功能密切相关^[2-3]。已有研究表明,铝中毒导致的学习记忆功能障碍可能与 RhoA/Cofilin 信号通路中某些蛋白的调节有关,但其作用机制尚未完全明确^[4]。本研究旨在通过用 RhoA 抑制剂 Rhosin 盐酸盐干预慢性铝中毒大鼠后,探索 RhoA/Cofilin 信号通路在慢性铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与药品 三氯化铝与麦芽酚购买于上海阿拉丁生化科技有限公司,Rhosin 盐酸盐购买于成都埃法生物科技有限公司,抗体均购买于武汉三鹰生

物技术有限公司。

1.2 实验动物 购买于广东维通利华实验动物技术有限公司 15 只成年雄性清洁级 SD 大鼠,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0014,体重(180 \pm 20) g,采取每笼 5 只饲养。本实验已经通过右江民族医学院伦理委员会审批(动物实验伦理审查号:2021090102)。

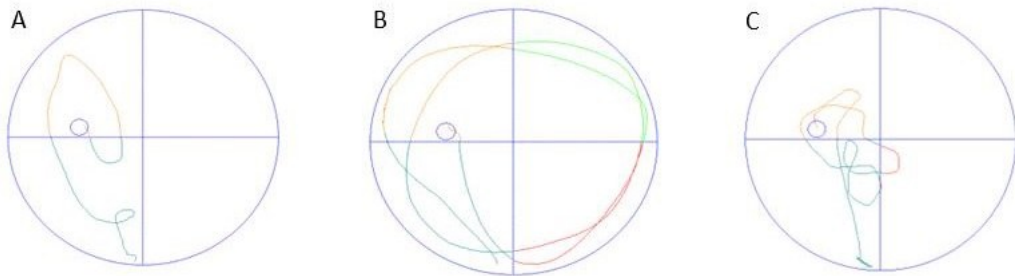
1.3 实验方法

1.3.1 慢性铝中毒大鼠模型建立和分组 根据参考文献^[5],配置浓度为 20 mmol/L 的麦芽酚铝溶液,按 20 $\mu\text{mol/kg}$ 对大鼠腹腔注射 2 个月建立慢性铝中毒大鼠模型,将慢性铝中毒大鼠模型随机分为 2 个组,即铝中毒模型组($n = 5$)、RhoA 抑制剂组($n = 5$),RhoA 抑制剂组用 40 g/kg 的 Rhosin 盐酸盐腹腔注射,每天给药 1 次,连续 30 d。另 5 只大鼠不作任何处理为空白对照组。

1.3.2 Morris 水迷宫记录描绘动物找到平台的游泳路径轨迹^[6] 第 1 天,对每只大鼠进行标记后,依次将

其放入水迷宫水池中自由游泳 60 s, 随后捞出。第 2 天开始, 固定实验时间和实验环境不变, 对其进行定位航行实验训练, 将每只大鼠依次放入 4 个不同的象限中, 并通过计算机收集和绘制大鼠找到平台的游泳路径轨迹, 一共训练 4 d。

1.3.3 Western Blot 检测 RhoA、Cofilin、SYN、PSD-95 在大鼠海马组织及大脑皮层中的表达水平 首先分别提取海马组织和大脑皮层中的蛋白, 经过蛋白浓度测定后, 进行制备 SDS-PAGE 凝胶, 上样电泳, 转膜, 封闭, 一抗孵育, 二抗孵育, 洗膜之后曝光显影, 采用 ImageJ 软件对曝光条带进行分析和测定数值, 计算 RhoA、Cofilin、SYN、PSD-95 蛋白的相对表达量。



注: A. 空白对照组; B. 铝中毒模型组; C. RhoA 抑制剂组。

图 1 Morris 水迷宫记录大鼠找到平台的游泳路径轨迹

2.2 Western Blot 检测 RhoA、Cofilin、SYN、PSD-95 在大鼠海马组织及大脑皮层中的表达水平 铝中毒模型组海马组织和大脑皮层的 Cofilin、PSD-95、SYN 蛋白相对表达量均比空白对照组的明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 铝中毒模型组海马组织和大脑皮层的 RhoA 蛋白相对表达量比空白对照组的明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); RhoA 抑制剂组

1.4 统计学方法 SPSS 22.0 统计软件进行数据统计, 实验数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 每组数据用 Kolmogorov-Smirnov 进行正态性检验, 呈正态分布, 则用 One-Way ANOVA 进行多组间比较, 若方差齐, 采用 LSD 法进行多重比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫定位航行实验记录大鼠找到平台的游泳路径轨迹 从各组大鼠定位航行实验游泳路径轨迹图看出, 与空白对照组比较, 铝中毒模型组大鼠运动轨迹偏离平台, 找到平台的时间明显增长。与铝中毒模型组比较, RhoA 抑制剂组大鼠运动轨迹更趋向于目标平台, 找到平台的时间明显缩短, 见图 1。

海马组织和大脑皮层的 Cofilin、PSD-95、SYN 蛋白相对表达量均比铝中毒模型组的明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); RhoA 抑制剂组海马组织和大脑皮层的 RhoA 蛋白相对表达量比铝中毒模型组的明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1~表 2、图 2~图 3。

表 1 各组大鼠海马组织中 RhoA、Cofilin、SYN、PSD-95 蛋白表达情况

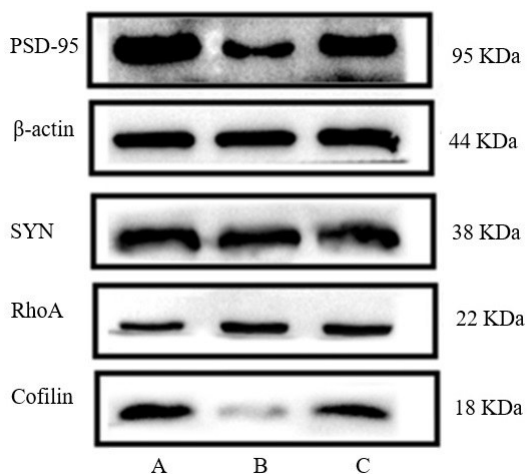
组别	n	RhoA	Cofilin	SYN	PSD-95
空白对照组	3	0.59 ± 0.12	1.08 ± 0.04	1.07 ± 0.06	1.12 ± 0.18
铝中毒模型组	3	1.02 ± 0.14 ^b	0.55 ± 0.38 ^a	0.65 ± 0.22 ^a	0.61 ± 0.10 ^a
RhoA 抑制剂组	3	0.70 ± 0.31 ^c	0.84 ± 0.20 ^c	0.88 ± 0.20 ^c	0.84 ± 0.30 ^c

注: ①表内计量资料数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示; ②与空白对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与铝中毒模型组相比, c: $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠大脑皮层中 RhoA、Cofilin、SYN、PSD-95 蛋白表达情况

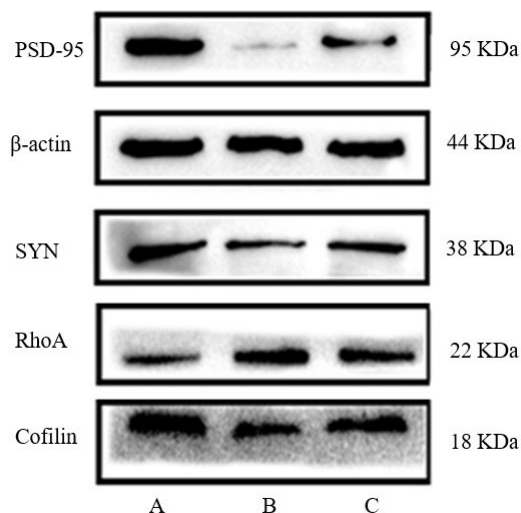
组别	n	RhoA	Cofilin	SYN	PSD-95
空白对照组	3	0.85 ± 0.16	1.13 ± 0.20	1.24 ± 0.27	1.13 ± 0.06
铝中毒模型组	3	1.22 ± 0.21 ^b	0.87 ± 0.26 ^a	0.70 ± 0.47 ^a	0.46 ± 0.18 ^a
RhoA 抑制剂组	3	1.12 ± 0.20 ^c	0.96 ± 0.20 ^c	0.86 ± 0.49 ^c	0.74 ± 0.06 ^c

注: ①表内计量资料数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示; ②与空白对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与铝中毒模型组相比, c: $P < 0.05$ 。



注:A.空白对照组;B.铝中毒模型组;C.RhoA抑制剂组。

图2 各组海马组织中 PSD-95、SYN、RhoA、Cofilin 蛋白表达情况



注:A.空白对照组;B.铝中毒模型组;C.RhoA抑制剂组。

图3 各组大脑皮层中 RhoA、Cofilin、PSD-95、SYN 蛋白表达情况

3 讨论

铝具有神经毒性作用,摄入过多或者排出障碍所导致的体内铝蓄积过量是引起多种神经系统疾病的重要因素之一^[7-8]。RhoA 在肌动蛋白细胞黏附、细胞骨架的重组、细胞分化中起到了关键作用。Cofilin 已成为肌动蛋白较为关键的调节因素,通过切割肌动蛋白纤维丝,可解聚旧的肌动蛋白纤维,聚合并改造出新的棘突,与神经突触可塑性密切相关^[9-10]。本研究 Morris 水迷宫定位航行实验结果显示,与空白对照组相比,铝中毒模型组大鼠潜伏期明显增长,说明慢性铝中毒可导致大鼠学习记忆能力下降,与文献报道结果一致^[11]。给予 Rhosin 盐酸盐干预后,RhoA 抑制剂组大鼠潜伏期缩短,这表明抑制 RhoA/Cofilin 信号通路可以改善铝中毒所引起的学习记忆能力减退和认知障

碍。突触是实现神经元信息传递的基本结构单元,其形态、数量、密度和信号传递效率的变化称为突触可塑性,突触可塑性是神经系统生长发育、损伤修复以及学习和记忆的神经生物学基础^[12-13]。突触素(synaptophysin, SYN)是关键突触前囊泡膜蛋白,其能准确反映突触的分布、数量和密度,是突触可塑性变化的最直接指标。突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)在突触后密度区表达丰富,与膜受体、离子通道和细胞黏附因子等相互作用,进而参与调节突触可塑性及学习记忆能力^[14-15]。本研究结果发现,与空白对照组相比,慢性铝中毒大鼠海马组织和大脑皮层中的 SYN、PSD-95 蛋白表达明显减少,给予 Rhosin 盐酸盐干预后,RhoA 抑制剂组中的 SYN、PSD-95 蛋白明显增多,这表明抑制 RhoA/Cofilin 信号通路可能提高突触可塑性相关蛋白 SYN、PSD-95 在海马组织和大脑皮层中的表达水平,进一步影响突触可塑性,最终提高铝中毒大鼠学习记忆能力。

综上所述,通过抑制 RhoA/Cofilin 信号通路可以改善慢性铝中毒大鼠的学习记忆能力,可能与通过上调海马组织和大脑皮层中 RhoA、SYN 和 PSD-95 蛋白表达和下调海马组织和大脑皮层中 Cofilin 蛋白表达有关。

参考文献:

- [1] 朱元州,孙昊,赵慧,等. 铝中毒的诊断和治疗[J]. 巴楚医学,2024,7(2):1-16.
- [2] LI L, WANG Q, SUN X, et al. Activation of RhoA pathway participated in the changes of emotion, cognitive function and hippocampal synaptic plasticity in juvenile chronic stress rats[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 233: 123652.
- [3] MEDINA C, DE LA FUENTE V, TOM DIECK S, et al. Cofilin 1 and actin dynamics involvement in fear memory processing[J]. Neurobiol Learn Mem, 2020, 173: 107275.
- [4] 贾芸菁,钟斌,李晨羽,等. 铝致大鼠认知功能障碍中 miR-9-5p、RHOA 的表达研究[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(14): 1063-1068.
- [5] 李欢. LNC001209 通过 CD36 调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与铝致认知功能损害的机制研究[D]. 太原:山西医科大学, 2021.
- [6] 符兆英,姜艳娜,高成,等. 水迷宫实验在学习记忆相关疾病和药物研究中的应用及其影响因素[J]. 延安大学学报:医学科学版, 2024, 22(1): 84-87, 101.
- [7] 雷洁昕,陈鹏,周本宏. 益母草碱改善三氯化铝所诱导阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力的作用机制[J]. 河北医药, 2024, 46(15): 2251-2255.
- [8] 郭健雄,刘文静,王小义,等. RhoA/cofilin 通路激活破坏海马突触可塑性参与铝中毒致学习记忆障碍的机制研究[J]. 中国临床新医学, 2024, 17(7): 806-811.

- [9] 李绿梅. RhoA-ROCK2 通路参与幼年慢性应激大鼠情绪、认知障碍及海马突触可塑性改变的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2023.
- [10] SEO J, HWANG H, SOHN H, et al. Cyclin Y regulates spatial learning and memory flexibility through distinct control of the actin pathway[J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(3):1351-1364.
- [11] 程厚之, 张丽凤, 梁祚仁, 等. 五味子乙素对铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达影响的研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(6):714-718.
- [12] 余明月, 苏凯奇, 申昕, 等. 电针对脑缺血再灌注学习记忆障碍大鼠海马源性神经营养因子转化和突触可塑性的影响[J]. *针刺研究*, 2024, 49(04):391-397.
- [13] 杨嘉誉, 马小涵, 张蕴, 等. 电针神庭、百会穴通过 ARC/GluR2/NMDAR2B 调节海马突触可塑性改善 MCAO/R 大鼠学习记忆的机制研究[J]. *中国中医急症*, 2024, 33(3):409-414.
- [14] WANG Q Z, KOHLS W, WILLS M, et al. A novel stroke rehabilitation strategy and underlying stress granule regulations through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(1):e14405.
- [15] DING B, LIN C H, LIU Q, et al. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- κ B signaling pathway in vivo and in vitro[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):302.

收稿日期: 2024-09-09; 修回日期: 2024-10-20

(上接第 847 页)

- [9] WANG W Y, MU M, ZOU Y J, et al. Glycogen metabolism reprogramming promotes inflammation in coal dust-exposed lung [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 242:113913.
- [10] WANG W Y, MU M, ZOU Y J, et al. Inflammation and fibrosis in the coal dust-exposed lung described by confocal Raman spectroscopy[J]. *PeerJ*, 2022, 10:e13632.
- [11] 李淑吟. 二陈汤加味治疗尘肺病痰湿蕴肺型咳嗽的临床观察[J]. *西藏医药*, 2024, 45(3):130-132.
- [12] WU B C, SODJI Q H, OYELERE A K. Inflammation, fibrosis and cancer: mechanisms, therapeutic options and challenges[J]. *Cancers*, 2022, 14(3):552.
- [13] GEBHARAT C, NÉMETH J, ANGEL P, et al. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(11):1622-1631.
- [14] HESSELSTRAND R, WILDT M, et al. Biomarkers from bronchoalveolar lavage fluid in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease relate to severity of lung fibrosis[J]. *Respir Med*, 2013, 107(7):1079-1086.
- [15] PARK E Y, SEO M J, PARK J H. Effects of specific genes activating RAGE on polycystic kidney disease[J]. *Am J Nephrol*, 2010, 32(2):169-178.
- [16] KARIKÓ K, WEISSMAN D, WELSH F A. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling: a unifying theme in ischemic tolerance [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(11):1288-1304.
- [17] LU Z R, DENG M G, MA G S, et al. TRIM38 protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation injury via the TRAF6/TAK1/NF- κ B signalling pathway [J]. *PeerJ*, 2022, 10:e13815.
- [18] FAN Y H, YU Y, MAO R F, et al. TAK1 Lys-158 but not Lys-209 is required for IL-1 β -induced Lys63-linked TAK1 polyubiquitination and IKK/NF- κ B activation [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(4):660-665.
- [19] ESPADA C E, ST GELAIS C, BONIFATI S, et al. TRA-F6 and TAK1 contribute to SAMHD1-mediated negative regulation of NF- κ B signaling [J]. *J Virol*, 2021, 95(3):e01970-20.
- [20] ARAKI K, KINOSHITA R, TOMONOBU N, et al. The heterodimer S100A8/A9 is a potent therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Mol Med*, 2021, 99(1):131-145.

收稿日期: 2024-07-27; 修回日期: 2024-09-07