

RhoA 和 ROCK2 在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中的表达

梁婵婵^{1,2}, 王巧真^{3*}, 蒋欣³, 刘金梦³, 徐进超^{1,2}, 郑怡雯^{2,3}, 王箐³

(潍坊医学院: 1. 生物科学与技术学院, 2. 神经疾病与再生修复实验室, 3. 临床医学院, 潍坊 261053)

[摘要] 目的: 通过研究 RhoA 和 ROCK2 在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓内的表达变化以阐明 Rho/ROCK 信号通路在肌萎缩侧索硬化症(ALS)病程中的作用。方法: 饲养 SOD1-G93A 转基因小鼠和同窝野生型小鼠至发病早期、中期和晚期, 部分小鼠冰上剥离新鲜脊髓组织, 利用 RT-PCR 方法检测 RhoA 和 ROCK2 mRNA 的表达, 利用 Western Blot 方法检测 RhoA 和 ROCK2 蛋白的表达; 部分小鼠行心脏灌注并剥离其脊髓组织制成冰冻切片, 利用免疫组织化学染色方法检测 RhoA 和 ROCK2 蛋白的表达。结果: 在 SOD1-G93A 鼠发病的早期、中期和晚期, 转基因小鼠脊髓中 RhoA 和 ROCK2 的 mRNA 及蛋白表达均上调。免疫组织化学染色实验结果显示, 野生型小鼠脊髓中 RhoA 和 ROCK2 弥散分布于胞质和突起中, 阳性染色浅; SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中 RhoA 和 ROCK2 阳性染色深, 大量聚集在细胞膜及细胞质。结论: RhoA 和 ROCK2 在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中异常高水平表达与 ALS 脊髓区病变密切相关, 可能参与 ALS 疾病进程。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化症; 脊髓; RhoA; ROCK2; SOD1-G93A 转基因小鼠

DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2020.01.005

The expression of RhoA and ROCK2 in the spinal cord of SOD1-G93A transgenic mice

Liang Chanchan^{1,2}, Wang Qiaozhen³, Jiang Xin³, Liu Jinmeng³,
Xu Jinchao^{1,2}, Zheng Yiwen^{2,3}, Wang Qing³

(1. College of Biological Science and Technology, 2. Neurologic Disorders and Regenerative Repair Lab,
3. Clinical Medical College, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the role of Rho/ROCK signaling pathway in the progression of ALS by detecting the changes of RhoA and ROCK2 expression in the spinal cord of SOD1-G93A transgenic mice. **Methods:** SOD1-G93A transgenic mice and littermate wild-type mice were raised to the early, middle and late stages of the disease. A part of mice were killed to dissect fresh spinal cord tissue on ice for RT-PCR and Western Blot experiments. Another part of mice were perfused intracardially and fixed, then the spinal cord tissues were separated to prepare frozen sections for immunohistochemical staining. **Results:** RT-PCR and Western Blot assays showed that in the early, middle and late stages of the disease, up-regulated mRNA and protein expressions of RhoA and ROCK2 in the spinal cord of SOD1-G93A transgenic mice were found compared with wild-type mice. The results of immunohistochemical staining showed that RhoA and ROCK2 were lightly stained and diffusely distributed in the cytoplasm and processes of the spinal cord of wild-type mice, while RhoA and ROCK2 were deeply positive stained in SOD1-G93A transgenic mice, and a large amount of RhoA and ROCK2 were clustered in the cell membrane and cytoplasm. **Conclusion:** The abnormally high expressions of

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS059, 2016WS0666); 山东省高校科研计划项目重点项目(J18KZ013);
潍坊医学院博士启动基金(2017BSQD22); 国家级大学生创新训练项目(201810438009); 山东省大学生科研项目
(18SSR282); 潍坊医学院大学生科技创新基金(KX2018006, KX2018027)

* 通讯作者: 王巧真 电话: 18253633755, E-mail: wfmewqz@163.com

RhoA and ROCK2 in the spinal cord of SOD1-G93A transgenic mice were closely related to the lesions of the ALS spinal cord and might be involved in the progression of ALS.

[Key words] amyotrophic lateral sclerosis; spinal cord; RhoA; ROCK2; SOD1-G93A transgenic mice

肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种渐进性神经元损伤性疾病,运动神经元损失多见于脊髓和运动皮层。仅有5~10%的ALS病例是家族性,大多数病例是散发的。主要的临床症状包括呼吸困难、肌肉损伤和瘫痪。ALS的平均发病年龄为50~65岁,患者在出现症状后的预期寿命为3~5年,常见于在最初诊断后几年内患者因呼吸功能不全而死亡^[1]。ALS的病因尚不清楚。然而,超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)的突变被认为是引起ALS常见的原因之一。近年来,Rho/ROCK信号通路是人们在神经退行性疾病发病机制的研究热点。Zhang等^[2]在有关人类帕金森病(Parkinson's disease, PD)的研究中证实ROCK2参与了MPTP诱导的多巴胺能神经元的丢失,提示ROCK2抑制可能是一种有前途的治疗PD的新靶点。此外,ROCK1和ROCK2与阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)的病程也密切相关。一些非甾体类抗炎药可能通过阻断RhoA/ROCK信号降低AD发生的风险^[3,4]。越来越多的证据表明Rho/ROCK信号通路与多种神经退行性疾病发病密切相关,但RhoA和ROCK2与ALS发病的关系报道较少。因此,我们选取了广泛被用于ALS表型研究的SOD1-G93A转基因小鼠为实验动物模型,研究Rho/ROCK信号通路与ALS病程的关系,以期用于治疗该疾病探索有希望的药物靶点。

材料和方法

1 材料

1.1 实验动物 B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J(SOD1-G93A转基因小鼠, SOD1-G93A)和B6SJLF1/J野生型小鼠(wild-type, WT),均购自美国Jackson Laboratories(动物合格证编号为3100079226)。

1.2 主要试剂及仪器 兔抗小鼠RhoA多克隆抗体及兔抗小鼠ROCK2多克隆抗体购自英国Abcam公司,小鼠抗小鼠GAPDH单克隆抗体购自美国Proteintech Group公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联的山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠

IgG、兔SP试剂盒和浓缩型DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,RT-PCR试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司。NANO DROP 2000C紫外-可见分光光度计、MULTISKAN FC酶标仪购自美国Thermo Fisher公司,垂直电泳槽和转膜仪购自美国Bio-Rad公司, BX53型显微镜购自日本Olympus公司。

2 方法

2.1 实验标本制备 幼鼠于28 d龄剪取鼠尾进行DNA检测以区分SOD1-G93A转基因小鼠(SOD1-G93A)与野生型小鼠(wild-type, WT),并将小鼠饲养至95 d(发病早期)、108 d(发病中期)和122 d(发病晚期)^[5,6],分别用于提取全脊髓蛋白、RNA以及制备冰冻切片。

2.2 Western Blot检测 提取全脊髓蛋白,BCA法测定蛋白浓度,并以蛋白裂解液及蛋白质凝胶电泳上样缓冲液调定蛋白浓度为3 μg/μl。制备浓度为15%的SDS聚丙烯酰胺凝胶,每孔加脊髓蛋白30 μl,放于电泳槽中进行电泳(恒压120 V, 1.50 h),转膜(恒流0.3 A, 1.40 h),5%脱脂奶粉封闭孵育2 h,分别加入兔抗小鼠RhoA多克隆抗体(1:800)、兔抗小鼠ROCK2多克隆抗体(1:800)或小鼠抗小鼠GAPDH单克隆抗体(1:2000)一抗中4℃孵育过夜。次日,把PVDF膜放在5%脱脂奶粉中封闭30 min,敷HRP偶联的羊抗小鼠(1:10000)或羊抗兔(1:10000)的二抗,继PBS漂洗后加入ECL发光液显影,并应用凝胶图像分析系统扫描分析^[5,6]。

2.3 RT-PCR检测 RNA提取及逆转录反应:室温下Trizol裂解脊髓组织5 min后,离心5 min弃沉淀并按200 μl氯仿/ml Trizol的比例加入氯仿,震荡摇匀静置后离心,取上层水相与异丙醇混匀后离心,沉淀即RNA,75%乙醇洗涤RNA。按如下比例配置体系将所得RNA反转录成cDNA:2 μg RNA, 4 μl 5×RT Buffer, 1 μl RT Enzyme Mix, 1 μl Primer Mix, Nuclease-free Water,将体积补至20 μl,37℃加热15 min,98℃加热5 min,所得即为cDNA。

PCR扩增反应:按照如下比例配制体系进行扩增反应:2×Master Mix 10 μl, β-actin内参照基因上、下游引物各0.5 μl,目的基因RhoA或ROCK2上、下

游引物各 0.5 μ l ,cDNA 0.5 μ l ,去离子水补充至总体积 20 μ l。于 PCR 仪中反应后,将扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳检测, Biospectrum AC 凝胶成像分析系统下拍照并进行半定量分析。PCR 仪中运行程序参考本课题组前期方法^[5 6]。所用引物序列如下: RhoA 上游引物: 5'-AGCTTGTGG-TAAGACATGCTTG-3',下游引物: 5'-GTGTCCCATA-AAGCCAACTCTAC-3'; ROCK2 上游引物: 5'-TTG-GTTCGTCATAAGGCATCAC-3',下游引物: 5'-TGT-TGGCAAAGGCCATAATATCT-3'; β -actin 上游引物: 5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3',下游引物: 5'-GCAATGCCTGG GTACATGGTGG-3'。

2.4 免疫组织化学染色法检测 脊髓腰段组织冰冻切片常温干燥 2 h,0.5% Triton X-100 破膜 15 min,滴加 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶孵育 10 min,正常羊血清工作液封闭孵育 30 min,滴加兔抗小鼠 RhoA(1:80)或兔抗小鼠 ROCK2(1:80)按比例配成的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,并相继滴加兔 SP 试剂盒中的生物素标记二抗与 HRP 标记的链霉素卵白

素工作液进行孵育,继而应用 DAB 进行显色并在显微镜下观察 RhoA 和 ROCK2 的表达情况。终止染色后梯度脱水透明,中性树胶封片,显微镜下观察并拍片^[5 6]。

2.5 统计学处理 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 22.0 软件应用独立样本 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结 果

1 RhoA 和 ROCK2 mRNA 在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中的表达

以同窝野生型鼠为对照组,应用 RT-PCR 技术检测 RhoA 和 ROCK2 mRNA 在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中的表达变化,结果显示: SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中 RhoA(Fig. 1A ,B) 和 ROCK2(Fig. 1C ,D) mRNA 在发病早期、中期和晚期表达均上调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

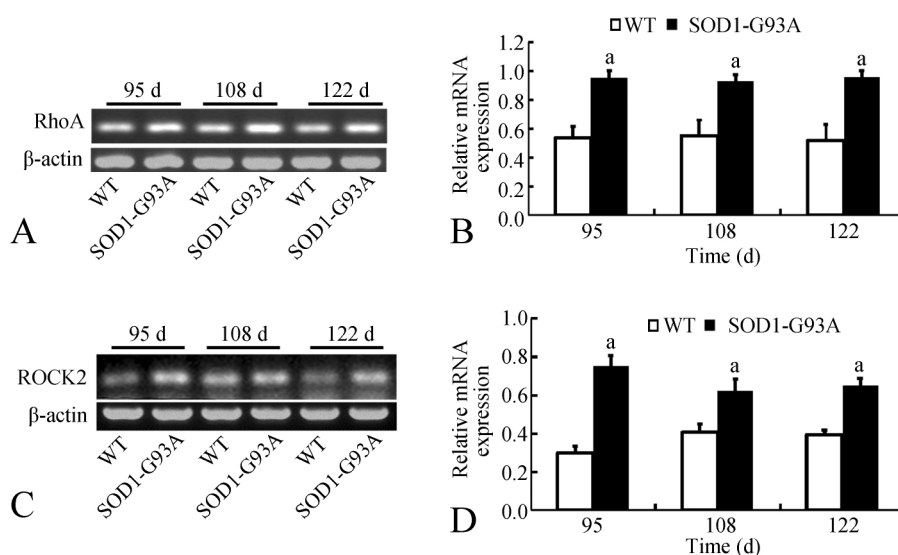


Fig. 1 RhoA and ROCK2 mRNA were up-regulated during the different stages (95 d, 108 d, 122 d) in the spinal cords of SOD1-G93A mice analysed by RT-PCR, compared with WT mice. A: The representative band of RhoA mRNA. B: The relative mRNA levels of RhoA. C: The representative band of ROCK2 mRNA. D: The relative mRNA levels of ROCK2. ^a $P < 0.01$ vs WT group.

2 RhoA 和 ROCK2 蛋白在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中的表达

以同窝野生型鼠为对照组,应用 Western Blot 技术检测 RhoA 和 ROCK2 蛋白在 SOD1-G93A 转基因

小鼠脊髓中的表达变化,结果显示: SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中 RhoA(Fig. 2A ,B) 和 ROCK2(Fig. 2C ,D) 蛋白在发病早期、中期和晚期表达均上调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

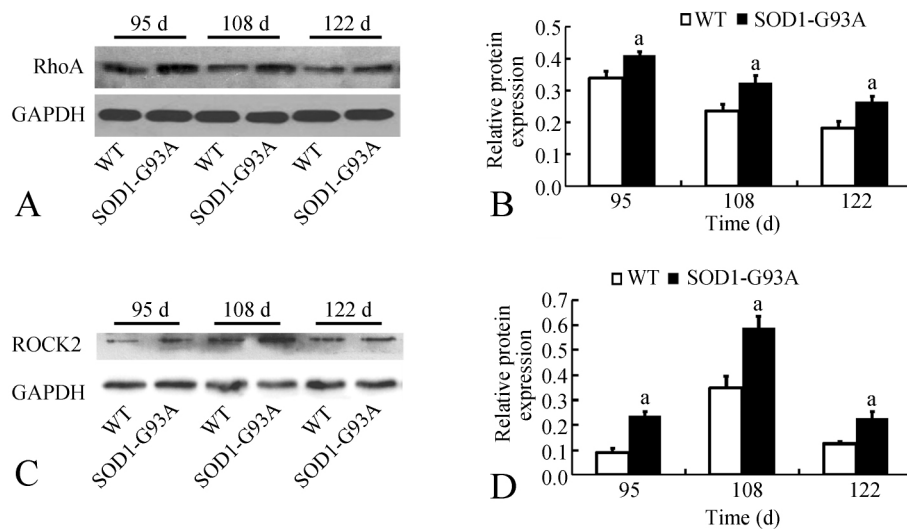


Fig. 2 RhoA and ROCK2 protein were up-regulated during the different stages in the spinal cords of SOD1-G93A mice. A and C: Western Blot. B and D: Semi-quantitative analysis. ^a $P < 0.01$ vs WT group.

3 RhoA 和 ROCK2 蛋白在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中的定位与分布

以同窝野生型小鼠为对照组,通过免疫组织化学染色法检测 RhoA 和 ROCK2 蛋白在脊髓中的表达情况,结果显示: SOD1-G93A 转基因小鼠和野生型小鼠的脊髓中, RhoA 和 ROCK2 阳性细胞大量聚集在细胞膜及细胞质中,且 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中 RhoA (Fig. 3A) 和 ROCK2 (Fig. 3B) 免疫反应性均较同窝野生型小鼠明显增强。

讨 论

ALS 是一种致死性运动神经元疾病,其特征是上、下运动神经元逐渐退化。ALS 紊乱的分子和病理生理机制包括兴奋毒性、蛋白质聚集、氧化应激、轴突运输受损和线粒体功能障碍等^[7]。研究发现,运动神经元死亡和轴突变性是人类 ALS 发病的重要病理特征。迄今为止,已经发现 19 个基因和基因位点与 ALS 有关,阐明 ALS 发病的分子机制将为该疾病的治疗提供新思路^[8]。

Rho 家族蛋白是肌动蛋白动力学的重要调控因子,调控细胞形状和运动。RhoA 是 Rho 家族成员中的鸟嘌呤三磷酸(GTP)结合蛋白,作为一个分子开关,在活跃的 GTP 结合形式和非活跃的 GDP 结合形式之间循环^[9]。Rho 激酶(ROCK)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是小 GTPase Rho 的下游靶点,RhoA 的 GTP 结合形式会引起 ROCK 活化^[10]。在哺乳动物

中发现了由两个不同基因编码的 ROCK,表达为 ROCK1(也称为 ROK β)和 ROCK2(也称为 ROK α)两个同源体。人 ROCK1 和 ROCK2 的基因都位于 18 号染色体上^[11]。两种亚型结构和功能相似,在哺乳动物胚胎发生和所有成体组织中都普遍表达,但丰度不同。ROCK1 在肝脏、肺、睾丸、血液和免疫系统中占主导地位,而 ROCK2 在大脑和肌肉中占主导地位。ROCK 的活化会导致细胞自噬、囊泡动力学、细胞生长和再生以及细胞形态和运动等多种细胞反应^[12]。ROCK 的抑制会引起神经突生长增加、轴突再生等生物事件^[13]。ROCK 的抑制是竞争性的,发生在 ATP 结合位点,已明确有 Y-27632、盐酸法舒地尔(Fasudil hydrocl, Fasudil)、hydroxyfasudil 和 H-1152P 这 4 种不同的 ATP 竞争性小分子选择性 ROCK 抑制剂^[14]。ROCK 抑制剂 Y-27632 和 Fasudil 被证明促进了神经突的生长,具有神经保护作用,提高了体外原代培养的运动神经元的存活率^[8]。Fasudil 不仅可以改善 AD 和 ALS 小鼠模型的病理状态,而且可通过灭活 ROCK 抑制 SOD1-G93A 诱导的运动神经元细胞死亡,导致治疗动物运动症状的发作明显延迟,存活的脊髓运动神经元数量增加,延长小鼠的生存时间^[15]。最近的证据表明,在神经退行性病变的背景下,中枢神经系统中抑制 ROCK 活性可导致病理减弱和功能改善。Günther 等^[14]研究发现, Fasudil 在 SOD1-G93A 晚期 ALS 小鼠的治疗应用中显著改善了小鼠的运动功能。Tönges 等^[16]通过体内研究证实了经口服 Fasudil 治疗后,会延长

SOD1-G93A 小鼠的生存期。

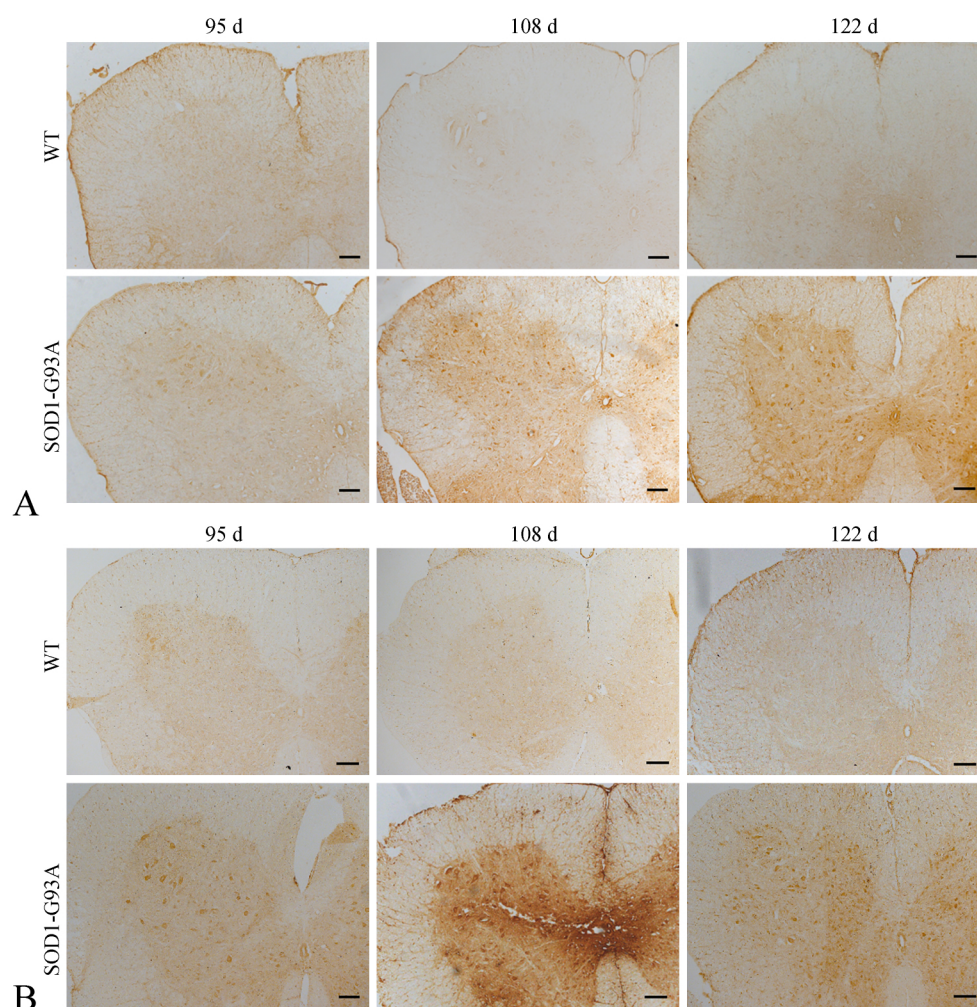


Fig. 3 The distribution of RhoA and ROCK2 in the gray matter of the spinal cords of SOD1-G93A mice and WT mice on 95 d ,108 d and 122 d detected by immunohistochemical staining. Bar = 100 μ m

Rho/ROCK 激酶信号通路是多个抑制因子的共享信号。动物研究的证据表明 ,RhoA/ROCK 信号通路参与视神经损伤和脊髓损伤、中风和神经退行性疾病等多种中枢神经系统疾病^[17]。在不同病理条件下 ,尤其是神经退行性疾病患者的神经组织中 ,ROCK(主要是 ROCK2) 的表达水平升高。通过活检 ALS 患者 ,发现其 ROCK2 蛋白质含量以及其下游目标 LIMK1 和 cofilin2 显著比同年龄对照组骨骼肌增加^[18]。本研究检测了 Rho/ROCK 信号通路关键信号分子 RhoA 和 ROCK2 在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中的表达变化 ,免疫组织化学检测显示 ,SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓 RhoA 和 ROCK2 阳性染色深 ,免疫反应性较野生型小鼠有不同程度增强。Western Blot 及 RT-PCR 检测均显示 ,RhoA 和 ROCK2 mRNA 和蛋白在 SOD1-G93A 转基因小鼠及

同窝野生型鼠脊髓内广泛表达 ,且随疾病进展 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓内 RhoA 和 ROCK2 表达较同窝野生型小鼠显著升高 ,原因可能与 RhoA/ROCK2 信号通路在 SOD1-G93A 转基因小鼠脊髓中被异常激活有关。RhoA 和 ROCK2 的异常高水平表达可能参与了 ALS 与运动神经元的退变。已证明通过药物抑制 Rho/ROCK 信号通路中不同信号分子可以促进神经元再生和存活。Koch JC 等^[19]在大鼠视神经损伤模型中 ,沉默 RhoA ,发现改善了轴突再生和存活率。通过敲除 ROCK2 ,发现增加了大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells ,RGCs) 的存活率 ,证明了沉默 ROCK2 是减轻轴索变性、抑制细胞凋亡和促进神经突生长的一种有效的策略^[20]。

目前为止 ,对于 ALS 的新治疗方案只有谷氨酸拮抗剂利鲁唑达到了临床应用。然而 ,这种药物还

不能达到治愈 ALS 患者的理想状态。ALS 的病因治疗策略须解决多种潜在的病理机制, 识别 RhoA/ROCK 抑制剂将有助于减轻神经退行性病变, 延缓疾病进程。进一步探讨 RhoA 和 ROCK2 参与 ALS 发病的分子机制将为治疗此疾病提供新靶点。

参 考 文 献

- [1] van Es MA, Hardiman O, Chio A, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet*, 2017, 390(10107): 2084 - 2098. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31287-4.
- [2] Zhang Q, Zhao YF, Xi JY, *et al.* Rho kinase II interference by small hairpin RNA ameliorates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(16): 4947 - 4956. DOI: 10.3892/mmr.2016.5889.
- [3] Henderson BW, Gentry EG, Rush T, *et al.* Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1) is increased in Alzheimer's disease and ROCK1 depletion reduces amyloid- β levels in brain [J]. *Neurochem*, 2016, 138(4): 525 - 531. DOI: 10.1111/jnc.13688.
- [4] Herskowitz JH, Feng Y, Matheyses AL, *et al.* Pharmacologic inhibition of ROCK2 suppresses amyloid- β production in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Neurosci*, 2013, 33(49): 19086 - 19098. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2508-13.2013.
- [5] 原 萌, 王 箐, 刘金梦, 等. DDX3 和 CK1 ϵ 在 SOD1-G93A 突变的 ALS 转基因小鼠纹状体的表达 [J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(2): 243 - 248. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2018.02.018.
- [6] 张雅雯, 王 箐, 原 萌, 等. DDX3 和酪蛋白激酶 1 ϵ 在肌萎缩侧索硬化症转基因鼠脑干中的表达变化 [J]. *解剖学报*, 2018, 49(1): 1 - 6. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2018.01.001.
- [7] Mathis S, Goizet C, Soulages A, *et al.* Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review [J]. *Neurol Sci*, 2019, 399: 217 - 226. DOI: 10.1016/j.jns.2019.02.030.
- [8] Zarei S, Carr K, Reiley L, *et al.* A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Surg Neurol Int*, 2015, 6: 171. DOI: 10.4103/2152-7806.169561.
- [9] Kimura K, Eguchi S. Angiotensin II type-1 receptor regulates RhoA and Rho-kinase/ROCK activation via multiple mechanisms. Focus on "Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells" [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(5): 1059 - 1061. DOI: 10.1152/ajpcell.00399.
- [10] Fujita Y, Yamashita T. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system [J]. *Front Neurosci*, 2014, 8: 338. DOI: 10.3389/fnins.2014.00338.
- [11] Hensel N, Rademacher S, Claus P. Chatting with the neighbors: crosstalk between Rho-kinase (ROCK) and other signaling pathways for treatment of neurological disorders. *Front Neurosci*, 2015, 9: 198. DOI: 10.3389/fnins.2015.00198.
- [12] Koch JC, Tatenhorst L, Roser AE, *et al.* ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 189: 1 - 21. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.03.008.
- [13] Chong CM, Ai N, Lee SM. ROCK in CNS: Different roles of isoforms and therapeutic target for neurodegenerative disorders [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(4): 455 - 462. DOI: 10.2174/1389450117666160401123825.
- [14] Günther R, Balck A, Koch JC, *et al.* Rho kinase inhibition with Fasudil in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis-symptomatic treatment potential after disease onset [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 17. DOI: 10.3389/fphar.2017.00017.
- [15] Takata M, Tanaka H, Kimura M, *et al.* Fasudil, a rho kinase inhibitor, limits motor neuron loss in experimental models of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170(2): 341 - 351. DOI: 10.1111/bph.12277.
- [16] Tönges L, Günther R, Suhr M, *et al.* Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Glia*, 2014, 62(2): 217 - 232. DOI: 10.1002/glia.22601.
- [17] Roser AE, Tönges L, Lingor P. Modulation of microglial activity by rho-kinase (ROCK) inhibition as therapeutic strategy in parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 94. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00094.
- [18] Conti A, Riva N, Pesca M, *et al.* Increased expression of myosin binding protein H in the skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(1): 99 - 106. DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.10.013.
- [19] Koch JC, Tönges L, Michel U, *et al.* Viral vector-mediated down-regulation of RhoA increases survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 273. DOI: 10.3389/fncel.2014.00273.
- [20] Koch JC, Tönges L, Barski E, *et al.* ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1225. DOI: 10.1038/cddis.2014.191.

(收稿日期: 2019-09-30)