

激活 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路对大鼠 脊髓损伤后神经再生的影响

胡凌云¹, 张建英², 林涛¹, 苟林¹, 林宏¹, 李伟¹, 刘康³, 孙振刚⁴

(1 川北医学院第二临床医学院 四川省南充市中心医院骨科; 2 影像中心 637000; 3 川北医学院组织工程与干细胞研究所 637000 四川省南充市; 4 山东省青岛市经济开发区第一人民医院骨科 266555)

【摘要】目的:探讨激活蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/p70 核糖体 S6 蛋白激酶(p70S6K)信号通路对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后神经再生及神经功能恢复的影响,为促进 SCI 修复提供分子学机制依据。**方法:**72 只雌性 SD 大鼠建立轻型 SCI 模型后随机均分为激活组(Act 组, SCI+ATP)、对照组(Con 组, SCI+生理盐水)、阻断组(Int 组, SCI+ATP+雷帕霉素);24 只大鼠仅打开椎板、不损伤脊髓,为假手术组(Sham 组)。分别于术后 1d、3d、7d、14d 采用 BBB 运动功能评分评价各 SCI 组大鼠经不同治疗后的神经功能,并采用 Western blot 检测各组在术后各时间点脊髓组织中 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K、Nestin、NeuN 蛋白表达情况,免疫组化检测各组在术后各时间点的 Nestin 和 NeuN 表达情况。**结果:**各 SCI 组术后 1d BBB 评分为 3~5 分,之后逐渐增加,术后 1d 和 3d 各组间 BBB 评分无显著性差异($P>0.05$),Act 组在 SCI 后 7d 和 14d 时的 BBB 评分明显高于 Con 与 Int 组($P<0.05$)。各 SCI 组在术后各时间点脊髓组织中 Akt、mTOR 及 p70S6K 磷酸化水平均明显高于 Sham 组($P<0.05$),Act 组的磷酸化水平在术后各时间点均明显高于 Con 组及 Int 组($P<0.05$),术后 7d 时磷酸化水平增高最为显著($P<0.01$)。各 SCI 组大鼠在术后各时间点的 Nestin 表达水平均高于 Sham 组($P<0.05$),Act 组的表达水平较 Con 组、Int 组显著性增高($P<0.05$)、Nestin 阳性细胞数显著性多于 Con 组与 Int 组($P<0.05$)。各 SCI 组在术后各时间点的 NeuN 表达均显著性低于 Sham 组($P<0.01$),各 SCI 组 NeuN 的表达在术后 1d、3d 无显著性差异($P>0.05$);Act 组在术后 7d 和 14d 时的 NeuN 表达水平明显高于 Con 组及 Int 组($P<0.05$),NeuN 阳性细胞数明显多于 Con 组与 Int 组($P<0.05$)。**结论:**激活 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路可显著增加 SCI 后 Nestin 及 NeuN 的表达,促进 SCI 后神经恢复和功能改善,此信号通路是治疗 SCI 的重要干预环节。

【关键词】脊髓损伤; mTOR; 雷帕霉素; 蛋白激酶信号级联; 神经再生; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.01.11

中图分类号: R683.2, Q189 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-01-0067-09

The effects of activated Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway on the neural regeneration after spinal cord injury in rats/HU Lingyun, ZHANG Jianying, LIN Tao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(1): 67-75

【Abstract】Objectives: To examine the impacts of the protein kinase B(Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/p70 ribosomal S6 protein kinase (p70S6K) signaling transduction pathway on neural regeneration and functional recovery after spinal cord injury (SCI) in adult rats, and to provide the molecular mechanism for promoting the SCI repair. **Methods:** A total of 72 female Sprague-Dawley rats of minimal injury model was randomly divided into the following groups: activation group (Act group, SCI plus ATP), control group (Con group, SCI plus saline) and interruption group (Int group, SCI plus ATP and rapamycin). The sham-operated group (Sham group) including 24 rats undergoing laminectomy without SCI. The BBB locomotor rating scale was used to evaluate the animal's locomotor performance after different treatments were administered at 1, 3, 7, and 14 days following SCI. The changes of Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, p70S6K, p-p70S6K, Nestin and NeuN expressions in spinal cord tissues of all groups were detected by using Western blot analysis at all ex-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81100929)

第一作者简介: 男(1983-), 主治医师, 硕士, 研究方向: 脊髓损伤的生物修复与功能重建

电话: (0817)2258614 E-mail: lingyunhunc@163.com

perimental time points after different disposals were administered following surgery, and the immunostaining was further performed for detecting the Nestin and NeuN in all groups after surgery. **Results:** Locomotor function assessment showed the BBB scores were 3–5 in the animals with SCI at 1d after injury, which gradually exhibited partial recovery of locomotor function after 1d following injury. No significant differences in BBB scores were observed among the three SCI groups at 1d and 3d after injury ($P>0.05$). At 7d and 14d after injury, the rats in the Act group exhibited significantly higher BBB score compared with the rats in the Con and Int group ($P<0.05$). Western blot showed prominently elevated phosphorylation level of Akt, mTOR and p70S6K in spinal cord tissues of all SCI groups at all experimental time points after surgery compared with the sham-operated group ($P<0.05$). The phosphorylation level of this signaling pathway in the Act group was significantly elevated by exogenous administration of ATP compared with the Con and Int group at all experimental time points after surgery ($P<0.05$), and the elevated level was particularly evident at 7d after SCI ($P<0.01$). Prominently elevated levels of nestin were detected in the injured spinal cords of all SCI groups compared with the Sham group at 1, 3, 7 and 14 days after surgery ($P<0.05$). A marked upregulation of nestin was noted in the Act group following SCI compared with the Con and Int group ($P<0.05$), and the number of Nestin-positive cells in the Act group was more than that of the Con and Int group ($P<0.05$). Significantly decreased expression of NeuN in the SCI groups was noted compared with the Sham group after surgery ($P<0.01$), and no significant differences in the expression were observed among the three SCI groups at 1d and 3d after injury ($P>0.05$). The expression of NeuN in the SCI groups gradually increased after 7d following SCI. The injured spinal cords in the Act group showed faster increase of NeuN and significantly higher level of NeuN expression compared with those from rats in the Con and Int group at 7d and 14d after SCI ($P<0.05$), and the number of NeuN-positive cells in the Act group was more than that of the Con and Int group respectively ($P<0.05$). **Conclusions:** Activated Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway can significantly increase the expression of Nestin and NeuN in the injured spinal cords after SCI and possesses the potential of promoting neural progenitor cells (NPCs) proliferation and neural regeneration, which improves motor function and promotes neural repair following SCI, intervention to this signaling pathway activity should be considered as a potential therapeutic strategy.

【Key words】 Spinal cord injury; mTOR; Rapamycin; Protein kinase signaling cascades; Neural regeneration; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan, 637000, China

有研究证实 SCI 后可产生自发性神经轴突芽生与轴突联系的重塑以及自发性神经元形成^[1]。提示成体中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 能够产生新的多能干细胞及其产物以达到整合复杂的脊髓神经环路, 从而在 SCI 后产生自发性神经功能恢复。但是 SCI 后自发性修复的生物学行为机制仍不是很清楚, 且这种自我修复的能力非常有限^[2]。目前认为 CNS 损伤后发生的自发性神经元形成是由位于 CNS 的内源性神经前体细胞 (neural progenitor cells, NPCs) 增殖、迁移到损伤区附近, 并向神经元分化所致^[1]。因此, 如何发现并控制这些关键的分子信号以引领具备增殖和分化潜能的内源性 NPCs 沿着神经元分化、促进神经再生及修复, 对 SCI 的治疗具有重要意义。鉴于蛋白激酶信号级联在调节基因表达、细胞

生存、增殖、分化等方面的重要作用, 已在 CNS 损伤包括 SCI 的治疗中受到广泛关注^[3]。Akt/mTOR/p70S6K 信号通路作为应对胞外信号、生长因子、细胞能量状态和应急等条件下细胞生长、增殖、存活和分化的一个中枢性控制器, 在神经生理病理过程中发挥着重要作用^[4,5]。研究发现其在神经细胞增殖^[6-9]、发育^[10]、分化^[11-13]、轴突再生^[6,14]、髓鞘形成^[13]、凋亡^[15,16]以及介导突触的可塑性^[17]中发挥重要作用。三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 作为 CNS 损伤后关键的蛋白激酶启动信号, 可激活 PI3K/Akt 通路在损伤后神经元生存和修复中发挥作用^[3,18]。本研究旨在探讨 ATP 诱导的 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路激活对大鼠 SCI 后 NPCs 的增殖反应、神经再生以及神经运动功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂、仪器

96 只成年健康雌性 SD 大鼠, 体重 250~300g (由川北医学院实验动物中心提供)。ATP (山东齐鲁制药公司); 雷帕霉素 (rapamycin) (Sigma 公司, USA); 兔多克隆抗体 Akt 和 phospho-Akt (Ser473), mTOR 和 phospho-mTOR (Ser2448) (Cell Signaling Technology 公司, USA); 兔多克隆抗体 p70S6K、phospho-p70S6K (Thr389)、鼠多克隆抗体 Nestin、鼠单克隆抗体 NeuN (Abcam 公司, Cambridge, UK); 聚偏氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜、Western blot 检测试剂化学发光液 (AB 液) (Millipore 公司, USA); 小鼠多克隆抗体 β -actin (北京中杉金桥生物技术公司); 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒 (北京博奥森生物技术公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术 (SABC) 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物技术公司); DP71 光学显微镜 (Olympus, Japan); Image-Pro PLUS 图像分析软件 (Meyer Instruments 公司, USA)。

1.2 动物模型制备

72 只大鼠参照 Mothe 等^[2]的方法制作大鼠轻型 SCI 模型: 戊巴比妥钠 (30mg/kg) 腹腔注射麻醉, 常规备皮消毒。取后正中切口约 5cm, 逐层切开, 分离肌肉, 暴露椎骨, 去除 T8~T10 棘突及相应椎板, 在 T8~T9 平面打开椎管, 充分暴露脊髓背面及两侧。于脊髓双侧分别用 30G 无菌穿刺针 (其尖端与针柄成 45°)、在手术显微镜帮助下, 以脊髓背侧中央静脉为中线标志, 将穿刺针偏离中线倾斜地刺入脊髓实质的侧柱中 (深 0.5mm), 并将针尖从脊髓尾端逐渐向头端倾斜, 以造成大约 5mm 长的脊髓损伤区 (针与脊髓表面的起始角度约为 45°, 终末角度约为 135°), 缝合肌肉和皮肤。以动物身体抖动、鼠尾痉挛性摆动并下垂、双下肢不完全性软瘫, 损伤后 1d 时 BBB 评分为 3~5 分作为造模成功的标志。术后挤压腹部协助排尿, 直至膀胱功能恢复。其余 24 只大鼠施行假手术, 即仅行椎板切除术而不造成 SCI。

1.3 动物分组、运动功能测试及组织样品准备

72 只 SCI 大鼠随机分为 3 组: 激活组 (Act 组), 脊髓损伤后行 ATP [40mg/(kg·d)] 治疗 7d (24 只); 对照组 (Con 组), 脊髓损伤后行等量生理盐

水治疗 7d (24 只); 干预组 (Int 组), 脊髓损伤后行等量的 ATP 联合雷帕霉素 [3mg/(kg·d)] 治疗 7d (24 只)。假手术组 (Sham 组, 24 只) 在椎板切除术后行等量生理盐水治疗 7d。分别于术后 1d、3d、7d、14d, 各 SCI 组每个时间点取 6 只大鼠行 BBB 运动功能评分, 评分后与 Sham 组每个时间点 6 只大鼠一起处死, 以损伤为中心快速切取由 3 个脊髓节段组成的约 1.0cm 长的脊髓组织块。将所取组织块矢状切成两等份, 一份固定在 4% 的 PBS 多聚甲醛中, 4℃过夜, 用作免疫组织化学研究; 另一份保存在液氮中, 待行蛋白质表达检测。

1.4 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路蛋白磷酸化水平的检测

用 RIPA 缓冲液 [(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 1mM PMSF, 0.1% SDS), 加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (Sigma)] 裂解脊髓组织, 4℃离心机离心 15min (12000r/min), 收集上清液并用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度。每孔 8 μ g 的总蛋白样品经浓度为 5%~17% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转入 PVDF 膜 (0.45 μ mol/L), 将膜用 2% 的封闭蛋白干粉室温封闭 2h 后, 分别加 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR (Ser2448)、p70S6K、p-p70S6K (Thr389)、 β -actin (1:400) 一抗 4℃孵育过夜, 经磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 洗 3 次后加 HRP 标记的二抗 (1:5000) 37℃孵育 2h。经 PBST 充分漂洗后, 目的蛋白信号由增强化学发光法检测并曝光于 X 线片上。采用 Western blot 半定量分析 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR (Ser2448)、p70S6K 和 p-p70S6K (Thr389), p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K 的相对光密度表达为每条带的累积光密度比相应的 Akt、mTOR、p70S6K 的累积光密度, 将 Act 组的磷酸化水平比值作为 1 (100%), 其余组的相对磷酸化水平则记为各自相对光密度比 Act 组的相对光密度。

1.5 Nestin 与 NeuN 蛋白表达的检测

用免疫组化对各组大鼠术后脊髓组织中 Nestin 与 NeuN 蛋白表达进行检测。组织固定后, 石蜡包埋, 以损伤为中心切成一系列连续的 5 μ m 厚的旁矢状面切片, 置于附有多聚赖氨酸的载玻片上。常规脱蜡至水后, 3% H₂O₂ 室温孵育 10min, 蒸馏水洗后放入 10mmol/L 枸橼酸盐 (pH 6.0) 中行微波抗原修复。冷却磷酸盐缓冲液 (PBS)

洗涤后,5%牛血清蛋白(BSA)室温封闭 1h,使用一抗 Nestin(1:200)、NeuN(1:500)作免疫组化染色,4℃孵育过夜。PBS 洗 3 次(5min/次)后,滴加生物素化羊抗兔/鼠二抗,室温孵育 30min,PBS 洗 3 次后,滴加 ABC 试剂室温孵育 30min,经 PBS 洗涤后用二氨基联苯胺(DAB)显色、复染、脱水、封片。Olympus 光学显微镜下观察并拍照。阴性对照用 PBS 代替一抗。Nestin 及 NeuN 阳性细胞计数方法:在每张切片的监测区域随机选择 3 个大小为 350×350μm 范围的目标细胞计数。

采用 1.4 中的 Western blot 方法检测各组大鼠术后脊髓组织中 Nestin 与 NeuN 蛋白表达以及 Act 组与 Int 组在术后各时间点 Nestin 与 NeuN 蛋白的表达情况。Nestin 与 NeuN 一抗的孵育浓度为 1:1000。对各组大鼠术后 Nestin 和 NeuN 的 Western blot 半定量分析采用相对光密度法,其相对光密度表达为每条带的累积光密度比相应的 β-actin。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 BBB 运动功能评分情况

Sham 组术后各时间点的 BBB 评分均为 21 分,各 SCI 组在术后的 BBB 评分均降低(表 1),SCI 后 1d、3d 各 SCI 组 BBB 评分无显著性差异($P > 0.05$),SCI 后 7d、14d 时 Act 组的 BBB 评分明显高于 Con 组($P < 0.05$),Int 组显著性低于 Act 组($P < 0.05$)。

2.2 各组脊髓组织中 p-Akt、p-mTOR 及 p-p70S6K 的表达情况

术后各时间点各组脊髓组织中 p-Akt、p-mTOR 及 p-p70S6K 的表达情况见图 1 和表 2。与 Act、Con 及 Int 组相比,Sham 组大鼠脊髓组织中的 p-Akt、p-mTOR 及 p-p70S6K 在各时间点均呈低水平表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SCI 后各时间点 Act 组大鼠的 p-Akt、p-mTOR 及 p-p70S6K 表达水平明显高于 Con 及 Int 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),在 SCI 后 7d,Act 组的 p-Akt、p-mTOR 和 p-p70S6K 表达水平达到最高,之后,其磷酸化水平逐渐降低。

2.3 Nestin 及 NeuN 的表达情况

免疫组织化学检测各组大鼠脊髓中 Nestin 及 NeuN 的表达情况见图 2、3 和表 3。SCI 后脊髓中的 Nestin 表达明显增高,在术后 7d 各 SCI 组 Nestin 的表达水平明显高于 Sham 组,Act 组的 Nestin 表达水平明显高于 Con 组及 Int 组;之后,各 SCI 组 Nestin 的表达水平逐渐下降。各 SCI 组在术后 NeuN 表达明显低于 Sham 组,在术后 7d 与 14d 表达逐渐增高,Act 组 NeuN 在术后 14d 的表达水平明显高于 Con 组及 Int 组。细胞计数显

表 1 术后各时间点各 SCI 组大鼠 BBB 评分结果
($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 BBB score in the activation, control, and interruption groups after SCI

	Act组 Act group	Con组 Con group	Int组 Int group
1d	4.47±0.35	4.43±0.22	4.53±0.43
3d	8.75±0.74	7.70±0.61	7.28±0.64
7d	13.64±0.75 ^{①②}	10.04±0.73	10.64±0.53
14d	16.59±0.60 ^{①②}	11.63±0.58	12.71±0.72

注:①与 Con 组比较 $P < 0.05$;②与 Int 组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with the Con group, $P < 0.05$; ②compared with the Int group, $P < 0.05$

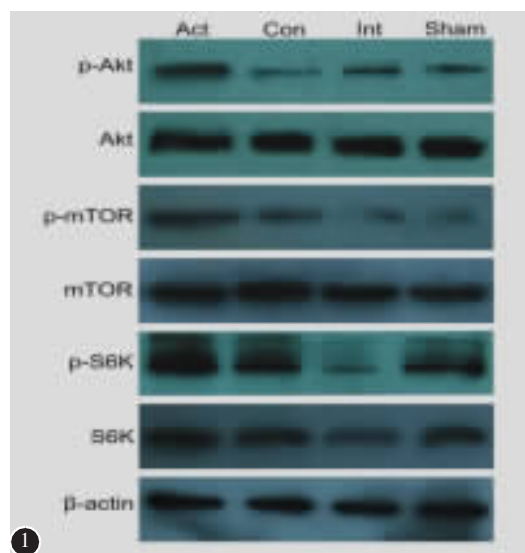


图 1 Western blot 检测各组大鼠术后 7d 脊髓中 p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K 的表达情况,Act 组 p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K 的表达水平明显高于 Con 组、Int 组及 Sham 组

Figure 1 Western blot analysis for p-Akt, p-mTOR, and p-p70S6K in spinal cords of all groups at 7d after surgery. Significant upregulations of P-Akt, P-mTOR, and P-p70S6K were noted in the Act group compared with the Con, Int and Sham groups at 7d after surgery

示 SCI 后 1~7d Nestin 阳性细胞数逐渐增多,之后下降,其中 Act 组的 Nestin 阳性细胞数在术后 7d 明显多于 Con 组与 Int 组,NeuN 阳性细胞数在 SCI 后下降明显,之后逐渐上升,在术后 14d 明显多于 Con 组与 Int 组。与 Con 组及 Int 组相比,Act 组脊髓组织损伤附近可见更多的 Nestin 阳性

NPCs 及 NeuN 阳性神经细胞分布。

Western blot 检测各组大鼠脊髓中 Nestin 及 NeuN 的表达情况见表 4 和图 4、5。Act 组的 Nestin 与 NeuN 表达水平在术后 7d 和 14d 均明显高于 Con 组及 Int 组。Act 组的 Nestin 表达在术后逐渐升高,在第 7d 达峰值后下降,与 Int 组相

表 2 术后各时间点在各组大鼠脊髓中 Akt、mTOR 和 p70S6K 的磷酸化水平 ($n=6, \bar{x} \pm s$)
Table 2 The phosphorylation levels of Akt, mTOR and p70S6K in spinal cords of all groups at all experimental time points after surgery

		1d	3d	7d	14d
Akt	Act组(Act group)	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}
	Con组(Con group)	0.73±0.15 ^③	0.58±0.121 ^③	0.34±0.05 ^③	0.48±0.04 ^③
	Int组(Int group)	0.67±0.131 ^③	0.47±0.06 ^③	0.38±0.07 ^③	0.54±0.11 ^③
	Sham组(Sham group)	0.43±0.06	0.26±0.04	0.08±0.01	0.29±0.04
mTOR	Act组(Act group)	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}
	Con组(Con group)	0.78±0.20 ^③	0.52±0.14 ^③	0.21±0.09 ^③	0.55±0.06 ^③
	Int组(Int group)	0.72±0.14 ^③	0.44±0.08 ^③	0.12±0.07 ^③	0.48±0.03 ^③
	Sham组(Sham group)	0.46±0.07	0.37±0.06	0.06±0.01	0.32±0.02
p70S6K	Act组(Act group)	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}	1 ^{①②③}
	Con组(Con group)	0.62±0.14 ^③	0.45±0.05 ^③	0.28±0.08 ^③	0.49±0.04 ^③
	Int组(Int group)	0.59±0.08 ^③	0.40±0.03 ^③	0.16±0.09 ^③	0.33±0.02 ^③
	Sham组(Sham group)	0.38±0.04	0.27±0.03	0.09±0.02	0.20±0.01

注:①与 Con 组比较 $P<0.05$,②与 Int 组比较 $P<0.05$,③与 Sham 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with the Con group, $P<0.05$; ②compared with the Int group, $P<0.05$; ③compared with the Sham group, $P<0.05$

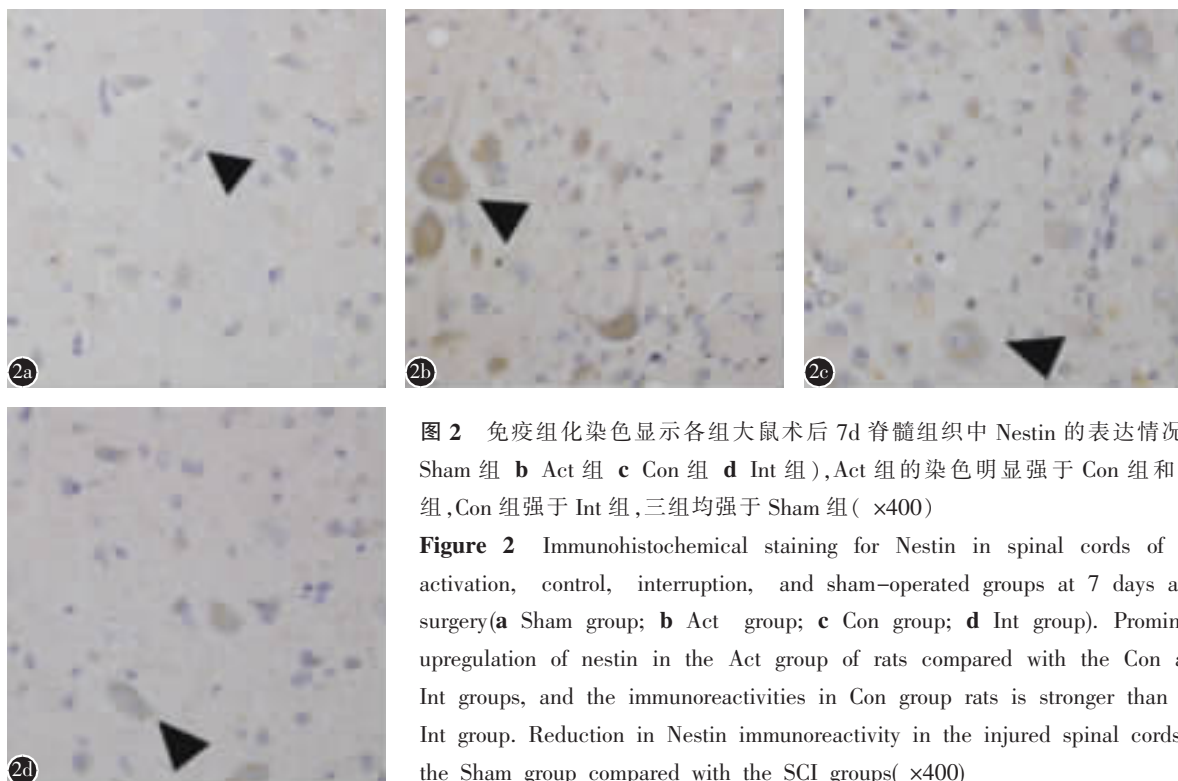


图 2 免疫组化染色显示各组大鼠术后 7d 脊髓组织中 Nestin 的表达情况(a Sham 组 b Act 组 c Con 组 d Int 组),Act 组的染色明显强于 Con 组和 Int 组,Con 组强于 Int 组,三组均强于 Sham 组($\times 400$)

Figure 2 Immunohistochemical staining for Nestin in spinal cords of the activation, control, interruption, and sham-operated groups at 7 days after surgery(a Sham group; b Act group; c Con group; d Int group). Prominent upregulation of nestin in the Act group of rats compared with the Con and Int groups, and the immunoreactivities in Con group rats is stronger than the Int group. Reduction in Nestin immunoreactivity in the injured spinal cords of the Sham group compared with the SCI groups($\times 400$)

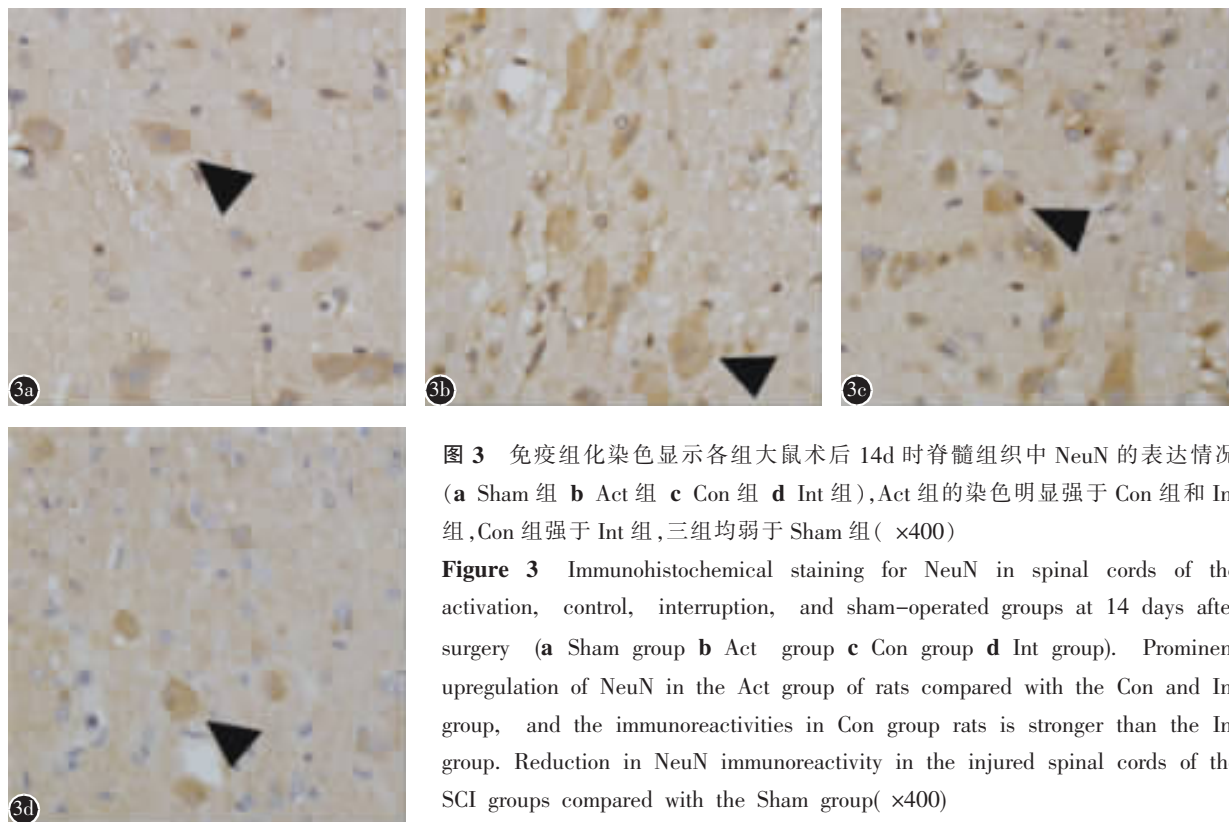


图 3 免疫组化染色显示各组大鼠术后 14d 时脊髓组织中 NeuN 的表达情况 (a Sham 组 b Act 组 c Con 组 d Int 组), Act 组的染色明显强于 Con 组和 Int 组, Con 组强于 Int 组, 三组均弱于 Sham 组 (×400)

Figure 3 Immunohistochemical staining for NeuN in spinal cords of the activation, control, interruption, and sham-operated groups at 14 days after surgery (a Sham group b Act group c Con group d Int group). Prominent upregulation of NeuN in the Act group of rats compared with the Con and Int group, and the immunoreactivities in Con group rats is stronger than the Int group. Reduction in NeuN immunoreactivity in the injured spinal cords of the SCI groups compared with the Sham group (×400)

表 3 各组大鼠术后各时间点 Nestin 和 NeuN 阳性细胞计数

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Nestin-positive and NeuN-positive counts in spinal cords of all groups at all experimental time points after surgery

	Nestin 阳性细胞计数 Nestin-positive counts				NeuN 阳性细胞计数 NeuN-positive counts			
	1d	3d	7d	14d	1d	3d	7d	14d
Act 组 (Act group)	21.6±7.6 ^①	49.5±9.4 ^{①②③}	68.3±12.7 ^{①②③}	34.2±8.3 ^{①②③}	46.4±13.3 ^①	31.5±9.8 ^①	76.4±19.3 ^{①②③}	105.6±20.4 ^{①②③}
Con 组 (Con group)	17.3±5.9	29.7±6.1 ^①	40.4±9.6 ^①	19.1±4.4	37.3±11.9 ^①	24.5±8.6 ^①	43.8±11.6 ^①	66.2±18.9 ^①
Int 组 (Int group)	16.8±4.3	25.4±7.2 ^①	35.6±8.3 ^①	22.7±5.3	39.8±12.1 ^①	29.7±7.2 ^①	46.5±9.4 ^①	58.1±15.7 ^①
Sham 组 (Sham group)	13.7±4.5	14.1±4.2	15.8±4.9	15.2±3.7	213.7±33.2	194.1±26.7	215.8±30.9	206.5±29.4

注: ①与 Sham 组比较 $P<0.05$; ②与 Con 组比较 $P<0.05$; ③与 Int 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared the Sham group, $P<0.05$; ②compared with the Con group, $P<0.05$, ③compared with the Int group, $P<0.05$

表 4 Western blots 方法检测各组大鼠在术后不同时间点 Nestin 和 NeuN 蛋白表达的相对光密度值 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Relative optical density of Nestin and NeuN in the all groups at all experimental time points after surgery respectively

	Nestin				NeuN			
	1d	3d	7d	14d	1d	3d	7d	14d
Act 组 Act group	2.62±0.34 ^①	4.45±0.53 ^{①②③}	8.62±0.94 ^{①②③}	4.22±0.33 ^{①②③}	1.34±0.15 ^①	1.15±0.13 ^①	2.58±0.18 ^{①②③}	4.42±0.34 ^{①②③}
Con 组 Con group	2.35±0.29 ^①	3.64±0.31 ^①	4.93±0.57 ^①	3.07±0.24 ^①	1.26±0.08 ^①	1.07±0.12 ^①	1.44±0.21 ^①	2.26±0.29 ^①
Int 组 Int group	2.46±0.36 ^①	3.42±0.18 ^①	5.24±0.64 ^①	2.73±0.29 ^①	1.46±0.26 ^①	1.22±0.14 ^①	1.68±0.19 ^①	2.54±0.24 ^①
Sham 组 Sham group	1.53±0.27	1.67±0.24	1.49±0.32	1.74±0.22	9.51±0.82	8.67±0.75	8.85±0.92	9.28±0.86

注: ①与 Sham 组比较 $P<0.05$; ②与 Con 组比较 $P<0.05$; ③与 Int 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with the Sham group, $P<0.05$; ②compared with the Con group, $P<0.05$; ③compared with the Int group, $P<0.05$

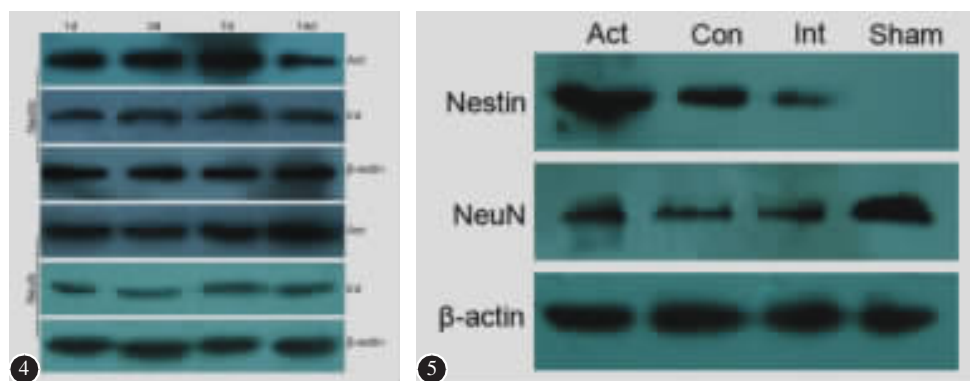


图 4 Western blot 方法检测 Act 组与 Int 组脊髓中 Nestin 与 NeuN 在术后 1、3、7、14d 的动态表达变化,与 Act 组相比,Int 组损伤脊髓中 Nestin 与 NeuN 的表达增加得更为缓慢 图 5 Western blot 方法检测各组大鼠分别在 SCI 后 7d 时的 Nestin 和 14d 时的 NeuN 表达水平,Act 组脊髓组织中的 Nestin 和 NeuN 表达水平明显高于 Con 组及 Int 组

Figure 4 Western blots showing the dynamic changes of Nestin and NeuN expression in the animals of the Act and Int groups at 1, 3, 7, and 14 days after SCI. Compared to the Act group, the injured spinal cords of Int group showed slower increases of NeuN and Nestin after SCI **Figure 5** Western blot analysis for Nestin and NeuN in the traumatic spinal cord of the Act, Con and Int groups at 7d and 14d after SCI respectively. A marked up-regulation of Nestin and NeuN was noted in the Act group at 7d and 14d following SCI respectively compared with the other two SCI groups

比,Act 组的 NeuN 表达水平在术后各时间点的增加更快、更显著,说明雷帕霉素抑制了此趋势。

3 讨论

作为在各种胞外信号刺激下调控细胞生长、增殖、存活与分化的中枢性控制器,Akt/mTOR/p70S6K 信号通路已在神经科学领域引起了极大的兴趣,有望为 SCI 的治疗开启新的路径。ATP 是神经系统创伤后启动蛋白激酶级联的关键促进因素,可介导重要蛋白激酶参与受损神经系统保护与修复^[3,18]。在本研究中,作者检测到在外源性 ATP 的作用下,受损脊髓组织中 Akt、mTOR 与 p70S6K 的磷酸化水平显著上调。mTOR 的 Ser2448 位点磷酸化是体内、体外依赖 Akt 磷酸化的主要位点^[5]; Thr389 位点是 mTOR 在体内与体外激活 p70S6K 的主要位点^[9],p70S6K 的磷酸化依赖于 mTOR,提示 ATP 诱导了受损脊髓组织中 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路的激活。用 mTOR 特异性抑制剂雷帕霉素不仅抑制了 ATP 诱导的 mTOR 及其下游 p70S6K 的磷酸化水平增加,也导致了 Akt 的磷酸化下调,表明 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路存在于受损脊髓中,外源性 ATP 可显著激活此信号通路。有研究表明,P2 受体在神经元损伤后表达是上调的,ATP 作为营养因子通过 P2 受体在 CNS 损伤后促进神经元的发育、分化、存

活及再生,介导受损神经组织重塑^[18,20,21]。P2 受体的激活对于 ATP 刺激引起 PI3K/Akt 信号转导通路的激活很关键^[18]。在本研究中,ATP 是否也可通过 P2 受体激活 PI3K/Akt,并导致 mTOR/p70S6K 的激活还需进一步研究。

在成年哺乳动物的脊髓组织中,NPCs 是位于中央管的室管膜细胞,起源于发育过程中神经干细胞(neural stem cells,NSCs)的原始神经上皮残留物,具有自我更新和分化潜力,在正常脊髓中仅存在有限的增殖活性^[2,22]。尽管成年哺乳动物 SCI 后在解剖以及功能上的再生能力非常有限,但在 SCI 后 NPCs 可呈现出明显的增殖反应^[2,23]、向损伤处迁移^[2,22],并具备分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞等的多向分化能力^[1,22,23],而这正是 CNS 损伤后产生自发性新神经元形成的基础^[1]。但是大多研究表明,损伤所诱发的脊髓内源性 NPCs 主要向星形胶质细胞系分化^[1,23],而过度的胶质增生、瘢痕形成会阻碍 SCI 后神经组织再生及修复。因此,调控某些关键的分子信号以促进内源性 NPCs 增殖,并引领这些具备增殖和分化能力的内源性 NPCs 在受损的脊髓组织中沿着神经元分化、促进神经元再生及修复,对 SCI 的治疗具有重要意义。

本研究结果证实,ATP 介导的 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路激活可显著增强受损脊髓组织

中的 Nestin 及 NeuN 的表达。Nestin 是 NPCs 的标记蛋白, NeuN 是神经元的标记蛋白, 说明 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路激活能促进 SCI 后 NPCs 的增殖以及神经元形成, 从而促进 SCI 后 BBB 运动功能评分的增加。Nestin 表达在 SCI 后 7d 显著增高, 与 Mothe 等^[2]的研究结果一致。Akt/mTOR/p70S6K 信号通路可在受到多种细胞外刺激因素后激活, 介导、参与细胞分化、发育、生长、增殖等过程。Akt/mTOR/p70S6K 信号通路在 NSCs 增殖中有重要作用。有研究表明, 胃饥饿素可通过激活 Akt/mTOR/p70S6K 信号促进海马 NSCs 的增殖与神经形成^[6]; Ryu 等^[7]的研究证实, ATP 通过激活 P2 嘌呤受体而诱导 Akt/mTOR/p70S6K 信号促进人 NSCs 的增殖, 抑制 Akt/mTOR/p70S6K 信号上游的抑制因子 PTEN 可在体外增强人胚胎干细胞源的 NPCs 神经轴突生长, 从而促进 NPCs 生长、增殖^[10]; Jiang 等^[9]与 Denis 等^[8]的研究也同样证实了 Akt 通路及 mTOR 信号通路在诱导 NSCs 增殖中的重要作用。本研究结果提示, 在体内 ATP 介导的 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路激活同样可增强大鼠 SCI 后脊髓内源性 NPCs 的增殖反应、促进 NPCs 的增殖, 而增殖的 NPCs 具备分化为神经细胞而促进脊髓修复的能力。

本研究结果显示, 激活 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路可增加损伤脊髓内 NeuN 的表达水平与其阳性细胞数量, 表明在 SCI 后形成的神经元增多与 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路激活可能存在关联。有研究报道, Akt 及 mTOR/p70S6K 信号通路可以通过激活蛋白质依赖合成的效应因子而参与神经元树突和轴突的形成, 在神经元的发育过程中起重要作用^[10, 24]。体外研究证实激活 Akt 可促进 NSCs 向神经元方向分化, 促进神经形成^[12, 24], 并且依赖于 mTOR/p70S6K 通路活性^[6, 11]。体内研究亦已发现 PI3K/Akt 通路可以增强鼠大脑缺血性诱导的神经形成, 在改善缺血损伤后的记忆和认知功能上起着重要作用^[25]。因此, 鉴于此信号通路在神经元分化与发育中的重要作用, 作者认为激活 Akt/mTOR/p70S6K 通路可通过促进增殖的脊髓内源性 NPCs 分化为新神经元而修复 SCI、促进神经功能恢复。此外, Akt/mTOR/p70S6K 通路在 Con 组的磷酸化激活可能是 SCI 后产生的自发性神经功能恢复的重要原因。

ATP 作为启动蛋白激酶级联的关键因素, 其

极有可能介导其他信号通路, 与 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路一起参与 NPCs 增殖、分化, 从而影响神经功能的恢复。相关研究表明, MEK/ERK、Jak2/STAT3 信号通路及 NPCs 增殖、分化及神经形成有关^[6, 24]。ATP 是否能调控这些信号通路而达到相应的效应以及 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路是否存在交联尚需进一步研究。另外, Akt 及 mTOR/p70S6K 信号通路在体内、体外研究中均显示出有抑制 NPCs 及神经元凋亡、保护受损神经细胞的能力^[15, 16], 故 ATP 介导的 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路在 SCI 后通过抑制神经细胞的凋亡而促进神经功能的恢复亦是可能的, 但尚需进一步研究。

传统的 NSCs 移植治疗 SCI 取得了一定的成绩, 可促进神经轴突再生、改善再生环境, 从而促进损伤修复以及神经功能恢复^[26, 27], 但这些方法在实际应用中也存在许多局限, 如干细胞供体来源限制、伦理问题、免疫排异反应问题等^[28], 并且其确切效果尚存争议(如有研究表明移植的 NSCs 并没有像预期的那样分化成神经元, 而是抑制其向神经元分化或促使其向胶质细胞系分化^[1, 26], 促进轴突再生的能力也很有限^[28], 且对损伤后脊髓内神经元回路的结构重建仍然是巨大的挑战^[26]), 离实际应用尚有一定距离^[27]。为此, 如何促进 SCI 后的内源性修复是治疗 SCI 新的途径, 其可避免传统方法的许多问题, 干预蛋白质信号级联 Akt/mTOR/p70S6K 为这一途径提供了新的思路。

4 参考文献

1. Bareyre FM. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury[J]. J Neurol Sci, 2008, 265(1-2): 63-72.
2. Mothe AJ, Tator CH. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat[J]. Neuroscience, 2005, 131(1): 177-187.
3. Neary JT. Protein kinase signaling cascades in CNS trauma[J]. IUBMB Life, 2005, 57(11): 711-718.
4. Swiech L, Perycz M, Malik A, et al. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784(1): 116-132.
5. Inoki K, Ouyang H, Li Y, et al. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(1): 79-100.
6. Chung H, Li E, Kim Y, et al. Multiple signaling pathways mediate ghrelin-induced proliferation of hippocampal neural stem cells[J]. J Endocrinol, 2013, 218(1): 49-59.

7. Ryu JK, Choi HB, Hatori K, et al. Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 72(3): 352–362.
8. Denis JA, Gauthier M, Rachdi L, et al. mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 8): 1763–1772.
9. Jiang LH, Yang NY, Yuan XL, et al. Daucosterol promotes the proliferation of neural stem cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 140(1): 90–99.
10. Wyatt LA, Filbin MT, Keirstead HS. PTEN inhibition enhances neurite outgrowth in human embryonic stem cell-derived neuronal progenitor cells[J]. *J Comp Neurol*, 2014, 522(12): 2741–2755.
11. Han J, Wang B, Xiao Z, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 39(1): 118–124.
12. Magri L, Cambiaghi M, Cominelli M, et al. Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(5): 447–462.
13. Wahl SE, McLane LE, Bercury KK, et al. Mammalian target of rapamycin promotes oligodendrocyte differentiation, initiation and extent of CNS myelination[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(13): 4453–4465.
14. Morgan-Warren PJ, Berry M, Ahmed Z, et al. Exploiting mTOR signaling: a novel translatable treatment strategy for traumatic optic neuropathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(10): 6903–6916.
15. Wang M, Li P, Liu M, et al. Potential protective effect of biphasic electrical stimulation against growth factor-deprived apoptosis on olfactory bulb neural progenitor cells through the brain-derived neurotrophic factor-phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(8): 951–959.
16. Walker CL, Walker MJ, Liu NK, et al. Systemic bisperoxovanadium activates Akt/mTOR, reduces autophagy, and enhances recovery following cervical spinal cord injury[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30012.
17. Horwood JM, Dufour F, Laroche S, et al. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(12): 3375–3384.
18. Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 109(3): 297–324.
19. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, et al. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(4): 1432–1437.
20. Sperlagh B, Csölle C, Ando RD, et al. The role of purinergic signaling in depressive disorders[J]. *Neuropsychopharmacol Hung*, 2012, 14(4): 231–238.
21. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. Role of purinergic receptors in CNS function and neuroprotection [J]. *Adv Pharmacol*, 2011, 61(5): 495–528.
22. Lacroix S, Hamilton LK, Vaugeois A, et al. Central canal ependymal cells proliferate extensively in response to traumatic spinal cord injury but not demyelinating lesions[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85916.
23. Barnabe-Heider F, Goritz C, Sabelstrom H, et al. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(4): 470–482.
24. Drew KL, McGee RC, Wells MS, et al. Growth and differentiation of adult hippocampal arctic ground squirrel neural stem cells[J]. *J Vis Exp*, 2011, 7(47): 2011, (47): e2199.
25. Shioda N, Han F, Morioka M, et al. Bis (1-oxy-2-pyridinethiolato) oxovanadium(IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2008, 155(3): 876–887.
26. Ben-Hur T. Reconstructing neural circuits using transplanted neural stem cells in the injured spinal cord[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3096–3098.
27. Tavares I. Human neural stem cell transplantation in spinal cord injury models: how far from clinical application[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(3): 61.
28. Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(2): 368–377.

(收稿日期:2014-09-09 末次修回日期:2014-12-03)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)