

脊髓损伤模型大鼠星形胶质化形成与Akt/mTOR/p70S6K信号通路的激活

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

文章亮点:

- 1 脊髓损伤后出现的反应性星形胶质细胞增生、胶质瘢痕形成被认为既是限制中枢神经系统再生能力的主要因素, 亦是阻碍神经再生的主要屏障。因此如何发现并控制那些影响胶质细胞增生反应的分子机制, 从而限制过度的星形胶质反应对脊髓损伤后的再生、修复以及神经功能恢复具有重要意义。
- 2 蛋白信号转导通路在细胞的生长、增殖、分化及凋亡中发挥重要作用, 因此找到一条与脊髓损伤后星形胶质细胞增生反应有关的信号通路至关重要。
- 3 研究表明, 激活 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路可显著减弱受损脊髓组织中星形胶质细胞标志蛋白表达、抑制过度的星形胶质细胞增生反应, 促进脊髓损伤后运动功能恢复, 为脊髓损伤的修复与治疗提供了新思路。
- 4 通过适度的激活 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路而限制过度的星形胶质细胞反应, 可以改善神经再生的环境。但是鉴于蛋白激酶信号级联在体内的复杂性, 此通路介导脊髓损伤后脊髓内源性神经干细胞向神经元方向分化、诱导新神经元的形成的能力还需进一步的体内研究。

关键词:

实验动物; 脑及脊髓损伤模型; mTOR; 雷帕霉素; 蛋白激酶信号级联; 神经系统损伤; 脊柱; 星形胶质细胞; 神经胶质; 轴突再生; 国家自然科学基金

主题词:

西罗莫司; 神经系统; 脊柱; 神经胶质

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81100929)

摘要

背景: 既往研究集中于如何促进大鼠脊髓损伤后的神经再生, 但对于如何抑制脊髓损伤后星形胶质细胞过度增殖反应的因素、从而改善神经再生的环境研究尚少。

目的: 观察 Akt/mTOR/p70S6K 蛋白激酶信号转导通路对大鼠脊髓损伤后反应性星形胶质化形成的影响, 从而为改善脊髓损伤后神经再生环境、修复脊髓损伤提供分子学机制依据。

方法: 建立 SD 大鼠轻型脊髓损伤模型, 分为 4 组: 实验组造模后行 ATP 治疗 7 d; 对照组造模后行等量生理盐水治疗 7 d; 干预组造模后行等量的 ATP 联合雷帕霉素治疗 7 d; 假手术组椎板切除后行等量生理盐水治疗 7 d。分别于造模后 1, 3, 7, 14 d 采用免疫组化、Western blot 法检测 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K、胶质纤维酸性蛋白表达变化, 并采用 BBB 运动功能评分评价大鼠脊髓损伤后经不同方法治疗后运动功能的恢复情况。

结果与结论: 假手术组大鼠脊髓中 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路分子呈低水平表达, 在脊髓损伤后其表达增加。外源性 ATP 可显著增强大鼠受损脊髓中 Akt/mTOR/p70S6K 信号分子的表达, 而雷帕霉素可明显抑制 ATP 诱导的表达上调。激活的 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路可显著减弱受损脊髓组织中胶质纤维酸性蛋白的表达、抑制脊髓损伤后过度的星形胶质细胞增生反应, 促进脊髓损伤后 BBB 运动功能评分增加, 而雷帕霉素阻碍了由 ATP 诱导的上述效应。结果证实, ATP 通过诱导 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路激活抑制大鼠脊髓损伤后星形胶质瘢痕的形成, 具有改善脊髓损伤后神经再生环境、促进脊髓损伤修复和改善神经功能的潜能, 此信号通路是治疗脊髓损伤的重要干预环节。

胡凌云, 张建英, 林宏, 苟林, 林涛, 李伟, 刘康, 孙振刚. 脊髓损伤模型大鼠星形胶质化形成与 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路的激活[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(5):697-703.

Activation of Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway limits excessive astrocytic responses after spinal cord injury in rats

Hu Ling-yun¹, Zhang Jian-ying², Lin Hong¹, Gou Lin¹, Lin Tao¹, Li Wei¹, Liu Kang³, Sun Zhen-gang⁴ (¹Department of Orthopaedics, ²Imaging Center, Nanchong Central Hospital, Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; ³Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; ⁴Department of Orthopaedics, the First People's Hospital of Qingdao Economic Development District, Qingdao 266555, Shandong Province, China)

胡凌云, 男, 1983 年生, 四川省南充市人, 汉族, 2010 年兰州大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事脊髓损伤的生物修复与功能重建研究。

通讯作者: 胡凌云, 川北医学院第二临床医学院, 南充市中心医院骨科, 四川省南充市 637000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2015.05.008

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)05-00697-07

稿件接受: 2014-11-25

Hu Ling-yun, Master, Attending physician, Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Department of Orthopaedics, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Accepted: 2014-11-25

Abstract

BACKGROUND: Most investigations have focused on nerve regeneration after spinal cord injury, but for how to inhibit excessive proliferation response of astrocytes after spinal cord injury and improve nerve regenerative environment is rarely reported.

OBJECTIVE: To examine the effects of the protein kinase B/mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal S6 protein kinase (Akt/mTOR/p70S6K) signal transduction pathway on excessive astrocytic responses after spinal cord injury in adult rats, and to provide the molecular mechanism evidence for improving nerve regenerative environment following spinal cord injury and repairing spinal cord injury.

METHODS: The minimal spinal cord injury model was produced in Sprague-Dawley rats. The rat models were divided into four groups: experiment group (receiving 7-day ATP treatment after modeling), control group (receiving 7-day saline treatment after modeling), interference group (receiving 7-day ATP and rapamycin treatment after modeling), and sham-operated group (receiving 7-day saline treatment after laminectomy). Using immunohistochemical staining and western blot analyses, we detected the changes of Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, p70S6K, p-p70S6K, and glial fibrillary acidic protein expressions in spinal cord tissues after surgery. BBB locomotor rating scale was applied to evaluate the animal's locomotor performance after different treatments were administered following spinal cord injury.

RESULTS AND CONCLUSION: The sham-operated group animals exhibited a low expression of the Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway at the protein level, and the expressions increased following spinal cord injury. Prominently elevated levels of its components were observed in the ATP-treated group, whereas rapamycin suppressed the upregulations of the Akt/mTOR/p70S6K signaling molecules induced by ATP. Activated Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway significantly attenuated expressions of glial fibrillary acidic protein in the injured spinal cord, limited excessive astrocytic responses, and elevated the BBB scores after spinal cord injury. Rapamycin inhibited the above effects induced by ATP. These findings suggest that ATP-mediated Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway activation can inhibit excessive glial scar formation after spinal cord injury, and have the potential of improving the regenerative environment, motor function and promoting repair potential for spinal cord injury, so this signaling pathway should be considered as a potential therapeutic strategy for spinal cord injury.

Subject headings: Sirolimus; Nervous System; Spine; Neuroglia

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81100929

Hu LY, Zhang JY, Lin H, Gou L, Lin T, Li W, Liu K, Sun ZG. Activation of Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway limits excessive astrocytic responses after spinal cord injury in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(5):697-703.

0 引言 Introduction

中枢神经系统损伤不仅破坏神经通路,而且会诱导胶质细胞产生巨大变化。在脊髓损伤后,星形胶质细胞迁移至损伤区域增生、肥大,其内的中间丝蛋白如胶质纤维酸性蛋白以及蛋白聚糖类等表达上调均会抑制神经轴突的生长,与此同时,反应性星形胶质细胞沉积细胞外基质形成胶质瘢痕。胶质瘢痕是轴突再生和功能联系重建的物理和生化屏障,阻碍脊髓损伤后神经功能的恢复^[1-2],因此如何发现并控制那些影响胶质细胞增生反应的分子机制,从而限制过度的星形胶质反应对脊髓损伤后的再生、修复以及神经功能恢复具有重要意义。

蛋白激酶信号级联在调节基因表达、细胞生存、增殖、分化等方面起重要作用,藉此影响着细胞与组织损伤后的修复与可塑性。一些蛋白质激酶持久激活特性为治疗损伤提供了一个重要的时间窗^[3]。蛋白质信号级联已在中枢神经系统损伤包括脊髓损伤的治疗中引起了极大兴趣。

Akt/mTOR/p70S6K信号通路作为应对细胞外信号、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]。已有研究发现在神经细胞增殖、发育、分化、轴突再生、髓鞘形成、凋亡以及介导突触的可塑性中发挥重要作用^[2, 4, 6-21]。

ATP被认为是信号通路的重要调节因子,与嘌呤信号

在神经生理及病理过程中起重要作用^[22-23]。ATP作为营养因子通过P2受体在中枢神经系统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^[22-24]。mTOR是稳定的能量感受器,其活性依赖于细胞ATP水平^[5]。体外研究证实胞外ATP偶联P2受体激活 mTOR/p70S6K信号可抑制细胞凋亡^[25]、促进细胞增殖^[8]。作为中枢神经系统损伤后关键的蛋白激酶启动信号,ATP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, 24]。文章主要研究ATP所诱导的Akt/mTOR/p70S6K信号通路对大鼠脊髓损伤后星形胶质细胞反应以及神经运动功能恢复的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2013年8月至2014年6月在川北医学院组织工程与干细胞研究所完成。

材料:

实验动物: 96只成年健康雌性SD大鼠,体质量250-300 g,由川北医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK川2013-18,并经川北医学院伦理委员会批准。

实验方法:

大鼠轻型脊髓损伤模型的制备: 主要参照文献Mothe等^[26]的研究,戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,常规备皮消毒。取后正中切口约5 cm逐层切开,分离肌肉,暴

实验所用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
ATP	山东齐鲁制药公司
雷帕霉素	Sigma 公司
兔多克隆抗体Akt、phospho-Akt (Ser473)、mTOR和phospho-mTOR(Ser2448)	Cell Signaling Technology公司
兔多克隆抗体p70S6K、phospho-p70S6K (Thr389)、兔多克隆抗体胶质纤维酸性蛋白	Abcam公司
PVDF膜、Western blot检测试剂AB液	Millipore公司
小鼠多克隆抗体 β -actin	北京中杉金桥生物技术公司
BCA蛋白定量试剂盒	北京博奥森生物技术公司
HRP标记的二抗、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公司
Image-Pro PLUS图像分析软件	Meyer Instruments 公司

露椎骨, 去除T₈₋₁₀棘突及相应椎板, 在T₈₋₉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30规格的无菌穿刺针(其尖端与针柄成45°角)制成“轻型脊髓损伤模型”。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0.5 mm), 并将针尖从脊髓尾端逐渐向头端倾斜, 以造成大约5 mm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°)。术后挤压腹部协助排尿, 直至膀胱功能恢复。

大鼠处死后, 取10 mm长包含损伤区的脊髓节段作检测。大体组织学分析造模是否成功: 在轻型脊髓损伤24 h后, 处死大鼠作组织切片, 用苏木精-伊红染色, 在显微镜下观察组织大体形态, 证实能达到预期目的: 中央管及附近细胞保持完整性。

动物分组、运动功能测试及组织样品准备: 96只大鼠按随机数字表法分为以下4组: 实验组脊髓损伤后行ATP[40 mg/(kg·d)]治疗7 d(24只); 对照组脊髓损伤后行等量生理盐水治疗7 d(24只); 干预组脊髓损伤后行等量的ATP联合雷帕霉素[3 mg/(kg·d)]治疗7 d(24只)^[27]; 假手术组椎板切除后行等量生理盐水治疗7 d(24只)。

分别于造模后1, 3, 7, 14 d, 对每组各6只大鼠根据BBB运动功能评分方法评估后肢运动情况后处死^[28], 以损伤为中心快速取出由3个受损脊髓节段组成的约1.0 cm长的脊髓组织块。将所取组织块矢状切成两等分, 一部分固定在40 g/L的PBS多聚甲醛中, 4 °C过夜, 进一步作免疫组织化学研究; 另一等分保存在液氮中, 作蛋白质表达检测。

免疫组化检测: 固定后, 石蜡包埋, 然后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, 体积分数3% H₂O₂ 室温孵育10 min, 蒸馏水洗后放入10 mmol/L 枸橼酸盐(pH

6.0)中行微波抗原修复。冷却PBS洗涤后, 5%牛血清蛋白室温封闭1 h, 使用一抗胶质纤维酸性蛋白(1:500)作免疫组化染色, 4 °C孵育过夜。PBS洗3次(5次/min)后, 滴加生物素化羊抗兔/鼠二抗, 室温孵育30 min, PBS洗3次后, 滴加ABC试剂室温孵育30 min, 经PBS洗涤后用DAB显色、复染、脱水、封固。Olympus光学显微镜下观察并拍照。阴性对照用PBS代替一抗。胶质纤维酸性蛋白阳性细胞计数方法: 在每张切片的监测区域随机选择3个大小为350 μ m \times 350 μ m范围内的目标细胞计数。

Western blot 检测: 用RIPA缓冲液 [(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mmol/L PMSF, 0.1% SDS), 加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Sigma)]裂解脊髓组织, 裂解液在4 °C离心机离心15 min(12 000 r/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2 h后, 分别用Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR(Ser2448)、p70S6K、p-p70S6K(Thr389)、胶质纤维酸性蛋白(1:1 000)、 β -actin (1:400)一抗4 °C孵育过夜, 经PBST洗3次后用HRP标记的二抗(1:5 000) 37 °C孵育2 h。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射线片上。对Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR(Ser2448)、p70S6K和p-p70S6K(Thr389)和胶质纤维酸性蛋白的Western blot定量分析采用相对吸光度法(Image-Pro PLUS软件), p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K表达为每条带的累积吸光度比相应的Akt、mTOR、p70S6K, 胶质纤维酸性蛋白表达为每条带的累积吸光度比相应的 β -actin。

主要观察指标: 观察各组Akt/mTOR/p70S6K信号通路分子、胶质纤维酸性蛋白的表达情况, 以及星形胶质细胞增殖与运动功能恢复情况。

统计学分析: 采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析, 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, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验分批进行, 脱落动物在下一批随机分组补充。总共饲养104只SD大鼠, 96只纳入实验, 8只不纳入实验统计: 3只死于造模过程中, 5只死于后期膀胱破裂或泌尿系感染。

2.2 ATP激活脊髓损伤后脊髓组织中的Akt/mTOR/p70S6K信号通路 Western blot检测结果发现, 实验组的p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K表达水平在脊髓损伤后7 d明显高于对照组以及假手术组($P < 0.01$, 图1)。应用mTOR的特异性抑制剂雷帕霉素后, 发现雷帕霉素可显著抑制ATP所诱导的上述蛋白磷酸化水平上调($P < 0.01$, 图1)。

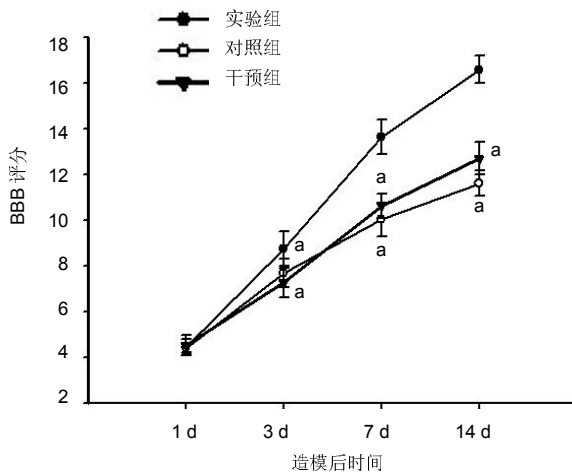


图4 各组大鼠脊髓损伤后的BBB运动功能评分比较

Figure 4 BBB score in each group after spinal cord injury

图注: 实验组在脊髓损伤后2周内的BBB评分明显高于对照组及干预组($P < 0.05$)。与实验组比较, ^a $P < 0.05$ 。

mTOR的Ser2448位点磷酸化是体内、体外依赖Akt磷酸化的主要位点^[6], Thr389位点是mTOR在体内与体外激活p70S6K的主要位点^[29], 且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。

2.3 激活的Akt/mTOR/p70S6K信号对脊髓损伤后星形胶质细胞增生反应的影响 免疫组织化学检测发现, 在脊髓损伤后脊髓组织中的星形胶质细胞显著增生, 胶质纤维酸性蛋白的表达水平明显高于假手术组(图2A)。在脊髓损伤后14 d, 实验组的胶质纤维酸性蛋白表达水平低于对照组, 而雷帕霉素阻碍了由ATP所诱导的此种效应。细胞计数发现实验组的胶质纤维酸性蛋白阳性细胞明显少于对照组与干预组($P < 0.05$, 图2B), 但实验组星形胶质细胞的增殖反应及胶质纤维酸性蛋白表达并未完全受到抑制。与实验组相比, 对照组与干预组中的脊髓组织损伤附近可见粗厚与多支链的星形胶质细胞分布。

Western blot检测证实了免疫组化的发现, 实验组的胶质纤维酸性蛋白表达水平明显低于对照组和干预组($P < 0.05$, 图3B)。与干预组相比, 实验组胶质纤维酸性蛋白表达水平在术后时间段的增加趋势更为缓慢(图3A)。

2.4 激活的Akt/mTOR/p70S6K信号对脊髓损伤后大鼠运动功能恢复的影响 如图4所示, 实验组在脊髓损伤后2周内的BBB评分明显高于对照组, 而雷帕霉素则阻碍了其BBB评分升高, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

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, 有望为脊髓损伤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而参与受损神经

系统保护与修复。在本实验中, 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表达水平是显著上调的, 激活的Akt引起了其下游重要信号分子mTOR、p70S6K的激活。用雷帕霉素不仅抑制了ATP诱导的mTOR及其下游p70S6K的表达增加与激活也导致了Akt表达的下调与活性的抑制, 表明Akt/mTOR/p70S6K信号转导通路存在于受损脊髓中, 并且经外源性ATP作用后显著激活了此信号通路(图1)。位点Ser2448是Akt在体内与体外依赖的mTOR磷酸化位点^[6], 对于p70S6K在体内的活性起着重要作用^[6]。先前的研究表明P2受体在各种神经元损伤后表达是上调的^[22-24], 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^[24], 在本实验模型中, ATP是否也可通过P2受体而激活PI3K/Akt, 并导致mTOR/p70S6K的激活还需进一步的研究。

星形胶质细胞广泛分布于中枢神经系统各个区域, 为中枢神经系统内最主要的细胞组成部分。在正常的脊髓中, 星形胶质细胞为神经元的代谢提供物质支持, 维持细胞内环境离子及pH值动态平衡, 清除和释放谷氨酸等作用, 可表达标志物胶质纤维酸性蛋白。星形胶质细胞在中枢神经系统损伤后被激活, 经历形态、分子表达等变化后成为反应性星形胶质细胞。反应性星形胶质细胞及其分泌的细胞外基质分子(如硫酸软骨素蛋白多糖)参与胶质瘢痕形成。脊髓损伤后轴突近端残存部分进入胶质瘢痕并处于一种营养不良状态其末端生长锥可坍塌萎缩从而形成一种不规则球状结构终止向远端进一步再生^[30]。活化的星形胶质细胞可分泌肿瘤坏死因子、白细胞介素、干扰素等多种炎症因子, 它们既能抑制轴突的再生, 又反过来进一步促进星形胶质细胞的活化与胶质瘢痕的形成, 形成恶性循环^[31]。所以, 其作为其抑制神经再生的机械与生化屏障, 阻碍脊髓功能的恢复^[2, 32-33]。因此对脊髓损伤后星形胶质细胞的调控, 抑制其过度活化以及增殖反应, 则可改善中枢神经系统损伤的再生环境、利于神经再生。

本实验证实了ATP所介导的Akt/mTOR/p70S6K信号转导通路激活可显著抑制脊髓损伤后星形胶质细胞的增殖反应以及胶质瘢痕形成, 利于脊髓损伤后神经功能的恢复(图2-4)。已知激活的Akt/mTOR/p70S6K信号通路在细胞发育、生长、增殖以及存活中发挥重要作用。其可通过必要蛋白的合成而参与神经细胞增殖^[6-9]、发育^[10-11, 34]、轴突再生^[2, 4, 16-17]、髓鞘形成^[18-19], 并抑制神经细胞的凋亡^[7, 20]。但本实验发现激活的Akt/mTOR/p70S6K信号通路并未促进星形胶质细胞的大量增殖与活化, 相反却抑制星形胶质细胞的增殖反应。基于目前的相关研究, 认为其有可能存在如下机制: 适当的Akt/mTOR/p70S6K信号活性可促进脊髓内源性神经前体细胞向神经元系分化, ATP可能还诱导其他的信号通路来限制胶质细胞的过度反应。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棘突的形成, 从而在

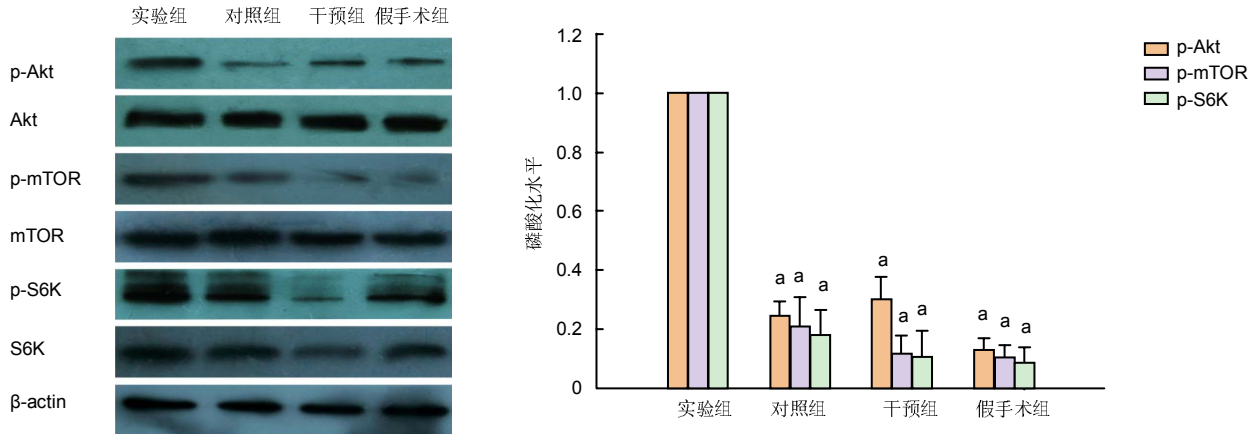


图 1 Western blot 检测各组大鼠造模后 7 d 脊髓 p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K 的表达

Figure 1 Western blot analysis for p-Akt, p-mTOR, and p-p70S6K expression in spinal cords of all groups at 7 days after modeling

图注: 与实验组比较, $^aP < 0.01$ 。提示实验组的 p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K 表达水平在脊髓损伤后 7 d 明显高于对照组以及假手术组 ($P < 0.01$)。干预组应用 mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素后, 发现雷帕霉素可显著抑制 ATP 所诱导的上述蛋白磷酸化水平上调 ($P < 0.01$)。

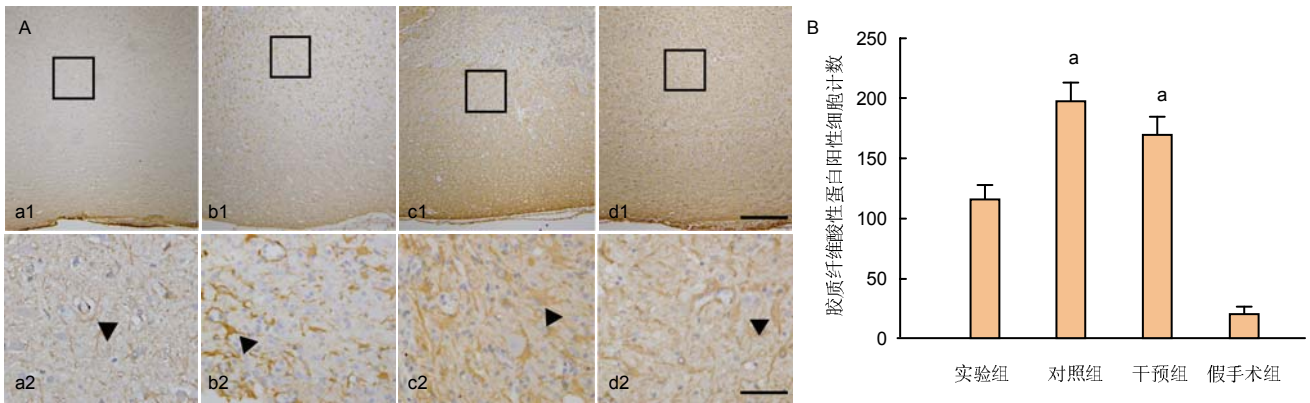


图 2 免疫组化分析各组大鼠造模后 14 d 脊髓组织中胶质纤维酸性蛋白的表达

Figure 2 Immunohistochemical staining for GFAP expression in spinal cords of rats at 14 days after modeling

图注: 图 A 中上下排图像(标尺为 50 μm)是上排(标尺为 250 μm)方框区域中放大的图像, 箭头所指为着色的靶细胞; a1, a2 为假手术组, b1, b2 为实验组, c1, c2 为对照组, d1, d2 为干预组。图 B 为胶质纤维酸性蛋白阳性细胞计数分析, 与实验组比较, $^aP < 0.05$ 。

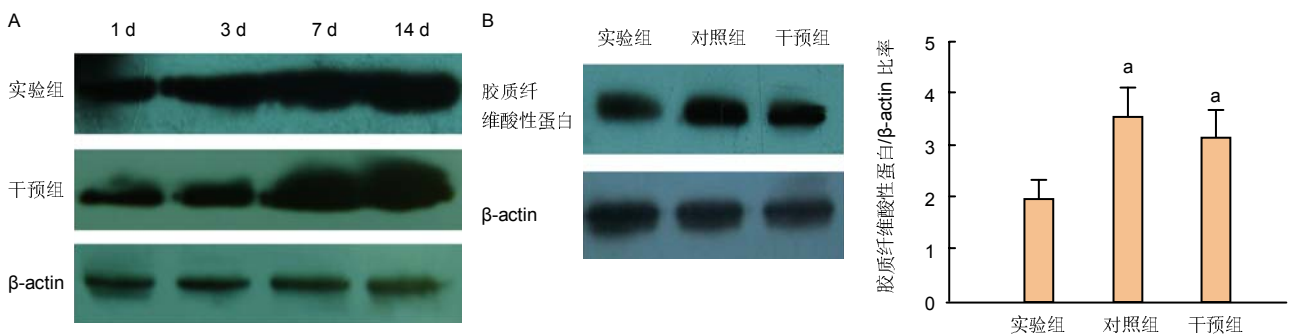


图 3 Western blot 分析实验组与干预组大鼠脊髓中胶质纤维酸性蛋白在造模后的动态表达变化

Figure 3 Western blots analysis of GFAP expression in spinal cords of rats in experimental group and intervention group after modeling

图注: 图 A 为实验组与干预组脊髓胶质纤维酸性蛋白在造模后 1, 3, 7, 14 d 的动态表达变化, 提示实验组胶质纤维酸性蛋白表达水平在术后时间段的增加趋势较干预组更为缓慢; B 为实验组与干预组在脊髓损伤后 2 周脊髓中胶质纤维酸性蛋白的表达水平。与实验组比较, $^aP < 0.05$ 。

神经元的发育过程中起重要作用^[10-11, 34]。体外已证实激活 Akt 促进神经干细胞向神经元方向分化, 在体外促进神经形成^[13, 15, 34-35], 并且依赖于 mTOR/p70S6K 信号活性^[6, 14]。体内亦已发现 PI3K/Akt 通路可以增强大脑缺血诱导的神经形成, 在改善缺血损伤后的记忆和认知功能上起着重要作

用^[36]。因此, 作者认为 Akt/mTOR/p70S6K 信号通路可通过促进脊髓损伤后脊髓内源性神经前体细胞分化为新神经元、减少向胶质细胞分化的机制而有益于脊髓损伤后的修复与功能恢复。有研究提示调控 mTOR 及其上游 PTEN 信号有增加中枢神经系统损伤后神经元再生、促进皮质脊髓束

再生以及修复的潜能^[2, 37-38]。更进一步在体内研究此通路介导脊髓损伤后增殖的内源性神经前体细胞向神经元分化从而促进脊髓损伤后新神经元的形成十分必要。

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而参与受损神经系统保护与修复,其极有可能介导其他信号通路限制星形胶质细胞的过度增殖反应。研究表明纤维蛋白原可主要通过其表面携带的转化生长因子 β 与星形胶质细胞相互作用并激活后者,通过激活转化生长因子 β /Smad信号转导通路活化星形胶质细胞、上调表达硫酸软骨素蛋白多糖抑制轴突再生^[39]。信号传感器与转录激活剂3在脊髓损伤后星形胶质细胞的增殖、迁移的调控过程中发挥重要作用,激活此信号,可抑制炎症细胞的迁移与扩散,同时可增强反应性胶质细胞的迁徙^[40-41]。因此,ATP是否能调控这些信号而达到抑制星形胶质细胞的活化尚需进一步研究。

新近的研究发现,适当的星形胶质细胞形成可在脊髓损伤后填充,损伤区缺失处,为损伤后血管形成提供支架,以及促进组织整合,限制炎症和防止神经元死亡等积极作用,减少组织损伤以及神经元凋亡,从而可能在脊髓损伤后的神经功能恢复中起相当的作用^[42-44]。

反应性星形胶质细胞在脊髓损伤后除了能产生促炎症递质妨碍神经功能恢复外,还能分泌多种细胞因子和神经生长因子促进脊髓功能恢复。反应性星形胶质细胞可分泌促进轴突再生分子,如层黏蛋白和纤黏蛋白,它们在体外显示出良好的辅助轴突再生以及突触延展的作用^[45]。反应性星形胶质细胞还可以通过分泌表达神经生长因子、神经营养因子3和胶质源性神经营养因子等起到保护神经元作用。几个体外研究亦表明,mTOR信号通路参与培养的星形胶质细胞生存与生长^[15, 46]。Shih等^[47]证实在体外与体内星形胶质细胞来源的骨膜蛋白可以通过激活Akt信号促进脊髓损伤后轴突的再生。本实验亦证实激活Akt/mTOR/p70S6K信号通路并未完全抑制星形胶质细胞的增殖反应,提示其在胶质细胞分化、生长中的作用(图2, 3)。

因此,通过适度的激活Akt/mTOR/p70S6K信号通路而限制过度的星形胶质细胞反应,可以改善神经再生的环境。但是鉴于蛋白激酶信号级联在体内的复杂性,此通路介导脊髓损伤后脊髓内源性神经干细胞向神经元方向分化、诱导新神经元的形成的能力还需进一步的体内研究。

致谢: 感谢川北医学院组织工程与干细胞研究所对本实验的技术支持。

作者贡献: 实验设计为胡凌云,动物造模、组织提取及运动评分实验由胡凌云、林宏、苟林、林涛、李伟完成,免疫生化检测由胡凌云、张建英、刘康完成,实验资料收集、整理与统计由胡凌云、张建英完成,胡凌云、孙振刚成文。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical

issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 蛋白激酶信号级联-是指在调节众多细胞生物进程如生长、增殖、发育、分化以及凋亡的信号机制中的重要组成部分,在受到细胞外信号的刺激后可导致一系列与细胞生长、凋亡有关基因表达调节的转录因子与复合体的激活。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Young W. Spinal cord regeneration. Cell Transplant. 2014;23: 573-611.
- [2] Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. Exp Neurol. 2008;209:294-301.
- [3] Neary JT. Protein kinase signaling cascades in CNS trauma. IUBMB Life. 2005;57: 711-718.
- [4] Swiech L, Perycz M, Malik A, et al. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. Biochim Biophys Acta. 2008; 1784:116-132.
- [5] Inoki K, Ouyang H, Li Y, et al. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. Microbiol Mol Biol Rev. 2005; 69:79-100.
- [6] Chung H, Li E, Kim Y, et al. Multiple signaling pathways mediate ghrelin-induced proliferation of hippocampal neural stem cells. J Endocrinol. 2013;218: 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 Neurosci Res. 2003;72:352-362.
- [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 Cell Sci. 2013; 126: 1763-1772.
- [9] Jiang LH, Yang NY, Yuan XL, et al. Daucosterol promotes the proliferation of neural stem cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2013;140 :90-99.
- [10] Wyatt LA, Filbin MT, Keirstead HS. PTEN inhibition enhances neurite outgrowth in human embryonic stem cell-derived neuronal progenitor cells. J Comp Neurol. 2014;522:2741-2755.
- [11] Jaworski J, Sheng M. The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. Mol Neurobiol. 2006;34:205-219.
- [12] Chen YN, Liu H, Zhao HB, et al. [Salidroside via ERK1/2 and PI3K/AKT/mTOR signal pathway induces mouse bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural cells]. Yao Xue Xue Bao. 2013;48 :1247-1252.
- [13] Otaegi G, Yusta-Boyo MJ, Vergano-Vera E, et al. Modulation of the PI 3-kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. J Cell Sci. 2006;119:2739-2748.
- [14] 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. Mol Cell Neurosci. 2008;39: 118-124.
- [15] 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. Cell Stem Cell. 2011;9: 447-462.

- [16] Lu Y, Belin S, He Z. Signaling regulations of neuronal regenerative ability. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;27C :135-142.
- [17] Morgan-Warren PJ, Berry M, Ahmed Z, et al. Exploiting mTOR signaling: a novel translatable treatment strategy for traumatic optic neuropathy? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:6903-6916.
- [18] Wahl SE, McLane LE, Bercury KK, et al. Mammalian target of rapamycin promotes oligodendrocyte differentiation, initiation and extent of CNS myelination. *J Neurosci.* 2014;34: 4453-4465.
- [19] Narayanan SP, Flores AI, Wang F, et al. Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J Neurosci.* 2009;29: 6860-6870.
- [20] 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. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013; 238: 951-959.
- [21] 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. *Eur J Neurosci.* 2006;23:3375-3384.
- [22] Sperlagh B, Csolle C, Ando RD, et al. The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacol Hung.* 2012;14: 231-238.
- [23] Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. Role of purinergic receptors in CNS function and neuroprotection. *Adv Pharmacol.* 2011;61:495-528.
- [24] Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther.* 2006; 109:297-324.
- [25] Ahmad S, Ahmad A, Ghosh M, et al. Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J Biol Chem.* 2004;279:16317-16325.
- [26] Mothe AJ, Tator CH. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience.* 2005;131:177-187.
- [27] Hentges KE, Sirry B, Gingeras AC, et al. FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:13796-13801.
- [28] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12: 1-21.
- [29] Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, et al. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:1432-1437.
- [30] White RE, Jakeman LB. Don't fence me in: harnessing the beneficial roles of astrocytes for spinal cord repair. *Restor Neurol Neurosci.* 2008;26:197-214.
- [31] Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* 2014;565:30-38.
- [32] Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, et al. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed).* 2009;2: 558-570.
- [33] Gris P, Tighe A, Levin D, S, et al. Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. *Glia.* 2007;55: 1145-1155.
- [34] Drew KL, McGee RC, Wells MS, et al. Growth and differentiation of adult hippocampal arctic ground squirrel neural stem cells. *J Vis Exp.* 2011;(47). pii: 2199.
- [35] Bai Y, Cui M, Meng Z, et al. Ectopic expression of angiopoietin-1 promotes neuronal differentiation in neural progenitor cells through the Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:296-301.
- [36] 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. *Neuroscience.* 2008;155:876-887.
- [37] Don AS, Tsang CK, Kazdoba TM, et al. Targeting mTOR as a novel therapeutic strategy for traumatic CNS injuries. *Drug Discov Today.* 2012;17: 861-868.
- [38] Liu G, Detloff MR, Miller KN, et al. Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2011;233:447-456.
- [39] Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, et al. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci.* 2010;30: 5843-5854.
- [40] O'Callaghan JP, Kelly KA, VanGilder RL, et al. Early Activation of STAT3 Regulates Reactive Astroglia Induced by Diverse Forms of Neurotoxicity. *PLoS One.* 2014;9:e102003.
- [41] Okada S, Nakamura M, Kato H, et al. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med.* 2006;12:829-834.
- [42] Oki K, Kaneko N, Kanki H, et al. Musashi1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia. *Neurosci Res.* 2009;66:390-395.
- [43] Wu L, Li JJ, Chen L, et al. Combined transplantation of GDAsBMP and hr-decorin in spinal cord contusion repair. *Neural Regen Res.* 2013;8(24): 2236-2248.
- [44] Okano H, Kaneko S, Okada S, et al. Regeneration-based therapies for spinal cord injuries. *Neurochem Int.* 2007;51: 68-73.
- [45] Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, et al. Adult NG2+ cells are permissive to neurite outgrowth and stabilize sensory axons during macrophage-induced axonal dieback after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2010;30: 255-265.
- [46] Pastor MD, Garcia-Yebenes I, Fradejas N, et al. mTOR/S6 Kinase Pathway Contributes to Astrocyte Survival during Ischemia. *J Biol Chem.* 2009;284:22067-22078.
- [47] Shih CH, Lacagnina M, Leuer-Biscioti K, et al. Astroglial-derived periostin promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2014;34:2438-2443.