雷帕霉素保护实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元的作用途径

https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3001

投稿日期：2020-03-24

送审日期：2020-03-30

采用日期：2020-05-09

在线日期：2020-08-25

中图分类号：R459.9；R318；R744.5+1

文章编号：2095-4344(2021)05-00695-06

文献标识码：A

谢 阳，张淑江，刘梦兰，罗 映，杨 洋，李作孝

文章快速阅读：

文章特点—

△实验性自身免疫性脑脊髓炎模型是目前在国际中被公认的进行多发性硬化研究的最理想动物实验模型，对该模型小鼠脊髓神经元进行自噬研究；

△使用AKT/mTOR/P706K自噬通路抑制剂雷帕霉素进行干预；

△探讨雷帕霉素诱导自噬的激活而对脊髓神经元发挥保护作用的机制。

实验动物分组及干预：

①将54只雌性C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组及雷帕霉素组，每组18只；②模型组及雷帕霉素组注射含MOG35-55的完全弗氏佐剂和百日咳菌稀释液进行实验性自身免疫性脑脊髓炎造模；③雷帕霉素组小鼠在免疫当日开始腹腔注射雷帕霉素，正常组与模型组注射等量生理盐水。

检测指标：

(1) 尼氏染色观察脊髓组织病理形态；
(2) 免疫荧光双标染色观察脊髓组织中自噬标志物LC3与NeuN的表达及共定位情况；
(3)Western blot检测脊髓组织中mTOR、P70S6K蛋白及其磷酸化水平。

结论：

(1) 雷帕霉素可能通过抑制P70S6K及mTOR蛋白磷酸化水平从而激活自噬；
(2) 对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元起保护作用。

文题释义：

雷帕霉素：不仅是一种新型的免疫抑制剂，也同样是一种自噬诱导剂，它是通过特异性抑制哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白即mTOR信号通路而激活自噬，而且它可以选择性对mTOR蛋白以及下游P70S6激酶参与蛋白质合成的磷酸化水平进行抑制，从而诱导自噬，雷帕霉素还能够对溶酶体生物合成产生正性效应，从而增加自噬溶酶体产生，使得细胞损伤后残余的病理蛋白质清除能力显著增强，并可以抑制神经元及神经胶质细胞凋亡和减少聚集体的大量产生。

自噬：它能够对蛋白质质量实现精准调控，从而更好地维持神经元结构功能的稳定性，在诸如帕金森病、亨廷顿病等神经退行性疾病中都发现存在着自噬的缺陷，导致大量残余蛋白蓄积诱发氧化应激反应等而引起疾病的发生发展，自噬的调控存在着多种途径，其中mTOR依赖的自噬途径在体内通过对蛋白质平衡的调控而对神经元的功能结构稳定发挥着关键的作用。

摘要

背景：当前就自噬的有关报道较多，但神经元中自噬水平改变与神经元保护机制的关系未有明确定论。

目的：探究mTOR自噬通路抑制剂雷帕霉素是否通过调控P70S6K及mTOR蛋白水平激活自噬发挥对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元的保护作用。

方法：将54只雌性C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组及雷帕霉素组，每组18只，模型组及雷帕霉素组注射含MOG35-55的完全弗氏佐剂和百日咳菌稀释液进行实验性自身免疫性脑脊髓炎造模，雷帕霉素组小鼠在免疫当日开始腹腔注射雷帕霉素[1 mg/(kg·d)]，正常组与模型组则每天同一时间注射等量生理盐水，将小鼠在发病高峰期时处死，正常组和其余未发病小鼠在饲养4周后处死并取出脊髓组织，分离出腰膨大段组织，分别进行尼氏染色行脊髓组织病理观察，免疫荧光双标染色观察脊髓组织中自噬标志物LC3与NeuN的表达及共定位情况，Western blot检测脊髓组织中mTOR、P70S6K蛋白及其磷酸化水平。

结果与结论：①正常组小鼠均未发病，模型组和雷帕霉素组小鼠均不同程度发病，雷帕霉素组与模型组比较，潜伏期有延长($P < 0.01$)，进展期缩短明显($P < 0.01$)，高峰期时的神经功能障碍评分有所下降($P < 0.05$)；②模型组尼氏小体数量在发病高峰期时相较于正常组明显降低($P < 0.05$)，而雷帕霉素组尼氏小体数量相较于模型组明显增加，但仍然低于正常组($P < 0.05$)；③模型组小鼠脊髓神经元中自噬标志物LC3散乱分布无明显点状聚集现象，而雷帕霉素组小鼠脊髓神经元中LC3呈明显的点状聚集，LC3与NeuN的分布基本一致；④模型组和雷帕霉素组mTOR及P70S6K蛋白的磷酸化水平高于正常组，但雷帕霉素组mTOR及P70S6K蛋白的磷酸化水平却低于模型组；⑤结果表明，雷帕霉素可能通过抑制P70S6K及mTOR蛋白磷酸化水平从而激活自噬，对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元起保护作用。

关键词：雷帕霉素；变态反应性脑脊髓炎；脊髓；神经元；尼氏小体；自噬；蛋白；鼠；实验

Mechanism by which rapamycin protects spinal cord neurons in experimental autoimmune encephalomyelitis mice

Xie Yang, Zhang Shujiang, Liu Menglan, Luo Ying, Yang Yang, Li Zuoxiao

西南医科大学附属第一医院神经内科，四川省泸州市 646000

第一作者：谢阳，男，1992年生，四川省成都市人，汉族，2017年西南医科大学毕业，硕士，医师，主要从事脑血管介入、神经免疫研究。

通讯作者：李作孝，硕士，教授，主任医师，西南医科大学附属第一医院神经内科，四川省泸州市 646000

https://orcid.org/0000-0003-4293-0014 (谢阳)

基金资助：泸州市人民政府基金课题 (2018LZXNYD-ZK17)，项目负责人：李作孝

引用本文：谢阳，张淑江，刘梦兰，罗映，杨洋，李作孝 . 雷帕霉素保护实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元的作用途径[J]. 中国组织工程研究，2021，25(5):695-700.

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Xie Yang, Master, Physician, Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Corresponding author: Li Zuoxiao, Master, Professor, Chief physician, Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: There are increasing reports about autophagy, but the relationship between the level of autophagy in neurons and the neuroprotection mechanism is not clear.

OBJECTIVE: To investigate whether rapamycin, an mammalian target of rapacmycin (mTOR) autophagy pathway inhibitor, could activate autophagy by mediating the P70s6k and mTOR protein levels to protect spinal cord neurons in experimental autoimmune encephalomyelitis mice.

METHODS: Fifty-four healthy female C57BL/6 mice were divided into three groups: control group, model group and treatment group, with 18 mice in each group. Mice in the model group and treatment group were injected with complete Freund's adjuvant containing MOG35-55 and pertussis diluent for establishing models of experimental autoimmune encephalomyelitis. At the same time, the mice in the treatment group were given rapamycin (1 mg/kg per day), and those in the model and control groups were given the same amount of normal saline. The mice in the model and treatment were sacrificed at the peak of the onset, and the non-morbid mice, including those in the control group, were sacrificed after 4 weeks of feeding. The spinal cord tissue from each animal was taken to isolate the intumescentia lumbalis of the spinal cord. Nissl staining was used for pathological observation of the spinal cord tissue. Immunofluorescence double staining was used to observe the expression and co-localization of autophagy markers LC3 and NeuN in spinal cord tissue. Western blot was used to detect mTOR, P70S6K proteins and their phosphorylation levels in spinal cord tissue.

RESULTS AND CONCLUSION: No mice in the control group had an attack, but those in the other groups developed experimental autoimmune encephalomyelitis to different extents. Compared with the model group, the treatment group had prolonged incubation time ($P < 0.01$), shortened progressive stage ($P < 0.01$), and decreased neurologic dysfunction score ($P < 0.05$). Compared with the control group, the model group had the significantly less number of Nissl bodies ($P < 0.05$), while the number of Nissl bodies in the treatment group was significantly higher than that in the model group, but still lower than that in the control group ($P < 0.05$). In the model group, LC3 was scattered in the spinal cord neurons and had no obvious dot-like aggregation, whereas in the treatment group, LC3 showed obvious dot-like aggregation, and its distribution was basically consistent with that of NeuN. The phosphorylation levels of mTOR and P70S6K proteins were highest in the model group, followed by the treatment group and control group in turn. To conclude, rapamycin might through inhibiting the phosphorylation levels of mTOR and P70S6K proteins activate the activity of autophagy to protect the spinal cord neurons in experimental autoimmune encephalomyelitis mice.

Key words: rapamycin; experimental autoimmune encephalomyelitis; spinal cord; neuron; Nissl body; autophagy; protein; mouse; experiment

Funding: *Luzhou Municipal People's Government Fund, No. 2018LZXNYD-ZK17 (to LZX)*
How to cite this article: *XIE Y, ZHANG SJ, LIU ML, LUO Y, YANG Y, LI ZX. Mechanism by which rapamycin protects spinal cord neurons in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(5):695-700.*

0 引言 Introduction

多发性硬化是一种以中枢神经系统白质的慢性炎性脱髓鞘为主要病变特点的疾病，早期在多发性硬化的动物模型中发现了淋巴 T 细胞经过活化后导致髓鞘中的髓磷脂这一特殊结构发生损伤，该病理结构改变与多发性硬化非常相似[1-3]，所以当时大家普遍认可多发性硬化为一种原发性的炎性脱髓鞘性疾病的这一说法。直到 21 世纪初期，神经元的退行性病理改变在多发性硬化的发病机制中起着重要作用才使得其重新受到了关注。已有研究证实，多发性硬化在早期发病过程中已出现了轴突－神经元之间的不可逆性损伤，这是引起多发性硬化患者表现出神经功能障碍呈进行性发展的主要因素[4]。神经元作为一种高度分化细胞，它不能够依靠自身的细胞分裂去清除体内错误折叠蛋白质和一些致伤性产物[5]，此时需要依赖一种能够对蛋白质质量实现精准调控，从而更好地维持神经元结构功能的稳定性，自噬正是扮演着这样的角色。

自噬在神经退行性疾病中的作用也逐渐开始得到关注，在生理状态下自噬激活可以维系神经元稳定[6]。自噬功能缺陷与神经退行性变性疾病如帕金森病、亨廷顿病及阿尔茨海默病等有重要联系，在这些疾病中自噬均存在异常，而在多发性硬化和实验性自身免疫性脑脊髓炎的血清中已经发现有自噬相关标记物以及相关基因存在着异常表达的情况，这提示多发性硬化疾病进展中可能存在有自噬的异常表达[7]。

过去对神经退行性疾病治疗药物的研究主要围绕抗炎和免疫抑制 2 种效应而开展，但目前有更多的数据表明通过激活神经元自噬，可以清除掉大量因氧化应激损伤所残余的病理蛋白而改善及延缓疾病的症状和进展[8]，寻找一种理想化的自噬激活剂便成为治疗神经退行性疾病的关键点。雷帕霉素 (rapamycin，Rap) 不仅是一种新型的免疫抑制剂[9]，也同样是一种自噬诱导剂，它是通过特异性抑制哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapacmycin，mTOR) 信号通路而激活自噬[10-12]，而且它可以选择性对 mTOR 蛋白以及下游 P70S6 激酶 (参与蛋白质合成) 的磷酸化水平进行抑制，从而诱导自噬[13]；雷帕霉素还能够对溶酶体生物合成产生正性效应，从而增加自噬溶酶体产生，使得细胞损伤后残余的病理蛋白质清除能力显著增强，并可以抑制神经元及神经胶质细胞凋亡和减少聚集体的大量产生[14]，而发挥其对神经元保护的效益。

当前就自噬的有关报道较多，但神经元中自噬水平改变与神经元保护机制的关系未有明确定论。该实验使用雷帕霉素干预 MOG35-55 诱发的实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠，通过观察脊髓神经元的病理变化，mTOR 信号通路中 mTOR 蛋白及其下游元件 P70S6K 蛋白的磷酸化水平以及自噬相关基因蛋白 LC3 的表达，旨在探讨雷帕霉素是否能够通过调控 P70S6K 及 mTOR 蛋白水平激活自噬从而对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的脊髓神经元发挥保护作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 1 月至 2019 年 10 月在西南医科大学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 54 只 C57BL/6 健康雌性小鼠 (育龄 6–8 周，

体质量 17−20 g)，购买于成都达硕实验动物有限公司，动物质量合格证号为 SPFC58 17-189，所有小鼠均在相同环境中饲养，实验操作过程通过西南医科大学动物实验伦理审查，编号为 201912-8。

1.3.2 实验试剂及相关药物 雷帕霉素 (北京中科亚光生物技术公司，货号 179023)；MOG35-55 多肽 (武汉凯通精细化工有限公司，货号 WH20983)；百日咳毒素 (Sigma 公司，货号 P2853)；结核杆菌 H37Ra(Sigma 公司，货号 R0906-04)；完全福氏佐剂 (Difco 公司，货号 Js3048)；兔抗 GAPDH 抗体 (KPL 公司，货号 GB103742)；山羊抗兔 HRP(ASPEN 公司，货号 AS1107)；兔抗 P-mTOR 及 mTOR 抗体 (Abcam 公司，货号 ab137133)；兔抗 P-P70S6K 及 P70S6K 抗体 (Abcam 公司，货号 ab59208)；抗荧光淬灭封片剂 (Roche 公司，货号 10004160)；尼氏染液 (ASPEN，货号 AS1095)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验性自身免疫性脑脊髓炎模型建立 将抗原 MOG35-55 用 PBS 稀释成 3 g/L，用等体积完全弗式佐剂混匀后使其总质量浓度达到 5 g/L，将该溶液注入 10 mL 玻璃注射器中充分混匀，放置在冰盘上并反复抽打使其充分乳化，最终形成油包水乳化剂。将配制好的乳化物按 0.2 mL/ 只的剂量于小鼠脊柱两侧任意 2 点处进行皮下注射 (1 个部位注入 0.1 mL)，拔出针头后按压约 2 min，避免乳化物外渗，在造模当日与 48 h 后以 200 ng/ 只的剂量腹腔注射 0.5 mL 百日咳菌稀释液 (PTX)。

组织工程实验动物造模过程的相关问题	
造模目的：	多发性硬化的标本在临床中难以获取，很大程度限制了对此疾病的深入研究，为进一步探究多发性硬化发病的相关免疫及病理机制，建立与其相对应的动物实验模型显得尤为重要
选择动物的基本资料：	C57BL/6 健康雌性小鼠 (育龄 6–8 周，体质量 17–20 g)
模型与所研究疾病的关系：	实验性自身免疫性脑脊髓炎模型是目前在国际中被公认的进行多发性硬化研究的最理想动物实验模型，因其容易获取、操作方便等优势而得到广泛认可
造模技术描述：	免疫细胞过继转移，它主要是将供体动物的髓鞘特异性致病 T 细胞转移到相应的受体动物中，诱导主动免疫的发生而致病。采用对免疫抗原 MOG35-55 多肽敏感的 C57BL/6 小鼠，将 MOG35-55 与含有结核分枝菌素 H37Ra 的完全弗式佐剂充分乳化混匀后皮下注射，于免疫当日及 48 h 分 2 次将百日咳菌稀释液进行腹腔注射造模
动物数量及分组方法：	将 54 只实验小鼠随机分为 3 组，分别为正常组、模型组和雷帕霉素组，每组 18 只，再将 18 只小鼠随机分为甲、乙、丙 3 个亚组，每亚组 6 只
造模成功评价指标：	通过神经功能障碍评分、行为学改变及苏木精－伊红染色观察评价造模成功
造模后取材及观察指标：	将小鼠在发病高峰期时处死，而正常组和其余未发病的小鼠在饲养 4 周后处死并取材。甲组行脊髓组织病理切片观察，乙组行免疫荧光双标染色，丙组行 Western blot 检测。观察各组小鼠行为学改变、神经功能障碍评分、尼氏染色及尼氏小体计数、mTOR 及 P70S6K 蛋白及其磷酸化水平表达、LC3 与脊髓神经元共定位现象
伦理委员会批准：	实验操作过程通过西南医科大学动物实验伦理审查，编号为 201912-8

1.4.2 实验动物的分组及药物的干预 将 54 只实验小鼠随机分为 3 组，分别为正常组、模型组和雷帕霉素组，每组 18 只，再将 18 只小鼠随机分为甲、乙、丙 3 个亚组，每组 6 只。模型组及雷帕霉素组注射含 MOG35-55 的完全弗氏佐剂和百日咳菌稀释液进行造模，而正常组注射同剂量不含 MOG35-55 的完全弗氏佐剂和百日咳菌稀释液。雷帕霉素组小鼠在免疫当日开始腹腔注射雷帕霉素 [1 mg/(kg·d)]，正常组与模型组则每天同一时间注射等量生理盐水，若连续 3 d 小鼠 Kono 神经功能障碍评分未再加重、四肢瘫痪甚至出现死亡则作为实验性自身免疫性脑脊髓炎发病的高峰期，将小鼠在发病高峰期时处死，而正常组和其余未发病的小鼠在饲养 4 周后处死并取材。甲组行脊髓组织病理切片观察，乙组行免疫荧光双标染色，丙组行 Western blot 检测。

1.4.3 神经功能障碍的评分 从免疫当日开始，每天观察并记录各组小鼠的体质量、精神、活动、进食情况，并对各组小鼠按照 Kono 评分标准进行发病高峰期时神经功能障碍评分。

评分具体的标准如下：0 分，未出现临床相关症状；1 分，尾部无力下垂；2 分，双侧后肢无力，被动翻身后可复原；3 分，双侧后肢瘫痪，被动翻身不可复原；4 分，四肢瘫痪；5 分，濒死状态或者死亡。症状介于两评分标准之间者以 ±0.5 计分。

1.4.4 取材、标本处理

(1) **组织取材病理检测：**在发病高峰期时将 3 组中的甲、乙组小鼠取出，麻醉后开胸暴露心脏，用灌注针从左心室刺入，深度达主动脉弓，固定结扎后将针芯拔出，缓慢剪开右心耳，将温热生理盐水快速注入冲洗周围血液，直至肝脏开始变白，然后用 40 g/L 多聚甲醛灌注冲洗固定，约半小时以后进行断头处理，小心取出完整的整段脊髓组织，取出后立即放入 40 g/L 多聚甲醛中浸泡 1 d，将所取标本进行常规石蜡包埋固定，在脊髓的腰膨大位置进行连续切片，切片厚度约 4 μm，选取其中 6 张进行尼氏染色。

(2) **腰髓总蛋白提取：**在免疫后的发病高峰期时将 3 组中的丙组小鼠取出，麻醉后放置于冰盘上迅速断头处死，快速取出完整脊髓组织，并将其腰膨大部分单独分离出来，放入 EP 管中用 RIPA 裂解液裂解后剪碎，使用 PBS 漂洗去除血污，然后加入组织蛋白提取试剂，在冰盘上用玻璃匀浆器反复研磨，将匀浆液转移到离心管中，3 000 r/min 离心 10 min，离心后小心吸取位于中间层的蛋白物，放置于室温中保持干燥使其逐渐沉淀，使用蛋白溶解缓冲液将沉淀溶解后再次离心，取上清液保存于 −80 ℃冰箱中备用。

1.4.5 检测指标及相关操作方法

(1) **尼氏染色及尼氏小体的计数：**取各组小鼠石蜡包埋固定后的切片，遵循下面步骤完成尼氏染色，倒置显微镜下观察脊髓组织中被染色的尼氏小体的数量、形态和分布情况，并计量尼氏染色阳性的脊髓神经元数量。尼氏染色的具体操作步骤为：石蜡切片脱蜡至水 → 尼氏染液染色 → 水洗分化 → 脱水封固 → 最后完成尼氏小体计数。

(2) 免疫荧光双标法检测脊髓神经元中自噬标志物 LC3 蛋白的聚集情况及与 NeuN 的共定位：将之前制备好的石蜡切片加入到 65 ℃烘箱中烘片 2 h，反复清洗后进行微波修复，调中火到沸时断电处理，并且每隔 10 min 使用低火直至沸；待室温冷却后加 PBS 反复冲洗 3 次，切片放入体积分数为 3% 过氧化氢溶液中室温条件下避光孵育 10 min；PBS 冲洗 3 次，甩干后 5% BSA 封闭 20 min；将所有切片放入 50 μL 稀释好的一抗中，并对组织进行覆盖，4 ℃孵育过夜；PBS 冲洗 3 次，把所有制备的切片放置于 50−100 μL 稀释的同种属二抗中，37 ℃孵育 50 min；PBS 冲洗 3 次，所有切片放置于 50−100 μL 的 DAPI 染液中，在室温条件下避光孵育约 5 min；PBS 冲洗 3 次，取适量抗荧光淬灭剂滴入组织上并覆盖，使用盖玻片进行封固，并使用荧光显微镜进行观察。

(3)Western blot 检测 mTOR 通路中 mTOR 蛋白及其磷酸化水平表达：将之前提取出的腰髓总蛋白取适量，使用 BCA 蛋白质浓度试剂盒检测相应的蛋白浓度，并经过 SDS-PAGE 电泳 − 转膜 − 抗体孵育 (将封闭液除去以后加入 1 ∶ 1 000 稀释的 p-mTOR、p-P70S6K 及 GAPDH 一抗，4 ℃孵育过夜，TBST 连续洗涤，加入稀释的二抗，室温避光孵育约 30 min)− 化学发光检测，最后使用 AlphaEaseFC 软件对相应蛋白条带的吸光度值进行分析即为蛋白表达水平。

1.5 主要观察指标 各组小鼠行为学改变、神经功能障碍评分、尼氏小体计数、mTOR 和 P70S6K 蛋白及其磷酸化水平表达、LC3 与脊髓神经元共定位现象。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件对相关数据进行分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两独立样本均数间比较采用 *t* 检验，而多个独立样本的均数间比较采用 ANOVA 单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法进行处理，选取双侧 α=0.05 为检验水准，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验 54 只 C57BL/6 小鼠，均进入结果分析，中途无脱落。

2.2 各组小鼠发病情况 正常组小鼠都未发病。模型组和雷帕霉素组均有不同程度发病，在发病初期时主要以体质量降低、反应迟钝等为主要表现；随着病程进展逐渐出现一些神经功能障碍症状，以尾部张力下降为首发表现。与模型组比较，雷帕霉素组小鼠发病率相对较低，神经功能障碍症状较轻，多以反应笨拙、尾部张力下降为主，见**图 1**。

2.3 模型组和雷帕霉素组小鼠潜伏期、进展期及发病高峰期时的神经功能障碍评分 见**表 1**。与模型组比较，雷帕霉素组小鼠进展期缩短明显，潜伏期延长，差异有显著性意义 ($P < 0.01$)，并且在发病高峰期，其神经功能障碍评分下降 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠脊髓神经元尼氏小体计数 见**图 2** 和**表 2**。正常组小鼠脊髓神经元分布及形态均未见异常，神经元轴突与胞体之间界限清晰，细胞核淡染区与尼氏小体深染区之间轮廓清晰；模型组小鼠发病高峰期可见脊髓神经元中尼氏小体数量明显减少、排列不规整、形态不规则，轴突与胞体、胞体与胞核之间轮廓模糊；与模型组比较，雷帕霉素组小鼠脊髓神经元排列较整齐，胞体与轴突轮廓模糊现象少见。

表 1 | 各组小鼠潜伏期、进展期及发病高峰期时的神经功能障碍评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 | **Comparison of neurological dysfunction scores at the incubation stage, progressive period and peak period between model and treatment groups**

组别	*n*	潜伏期 (d)	进展期 (d)	功能障碍评分
模型组	18	12.68±1.94	7.34±1.77	3.13±1.17
雷帕霉素组	18	14.81±1.85[b]	4.28±1.56[b]	2.12±0.93[a]

表注：与模型组比较，[a]$P < 0.05$，[b]$P < 0.01$

表 2 | 各组小鼠尼氏标记的脊髓神经元数量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 | **Comparison of the number of spinal cord neurons labeled with Nissl staining**

组别	*n*	尼氏标记的脊髓神经元的数量 (个 / 视野)
正常组	6	58.63±3.22
模型组	6	39.22±3.13[a]
雷帕霉素组	6	45.63±3.64[ab]
F 值		44.01
P 值		< 0.01

表注：与正常组比较，[a]$P < 0.01$；与模型组比较，[b]$P < 0.05$

与正常组比较，模型组和雷帕霉素组小鼠经尼氏标记的脊髓神经元数量均显著下降，因此在实验性自身免疫性脑脊髓炎发病过程中不仅有炎性脱髓鞘性特异性病理结构改变，还存在脊髓神经元的损伤坏死。与模型组比较，雷帕霉素组尼氏标记的脊髓神经元数量升高，该结果说明雷帕霉素对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元有保护作用。

2.5 免疫荧光双标法观察模型组与雷帕霉素组小鼠脊髓中自噬标志物 LC3 蛋白与 NeuN 的分布及共定位情况 见**图 3**。在免疫荧光双标法荧光显微镜下无论模型组还是雷帕霉素组小鼠自噬标志物 LC3 的分布聚集位点与脊髓中 NeuN 的分布基本一致，即 LC3 的点状聚集主要发生于脊髓神经元中，在脊髓组织的其余细胞中少见，Merge 图中可以看见模型组小鼠脊髓神经元中 LC3 散乱分布并且无明显点状聚集现象，而与模型组对比，雷帕霉素组 Merge 图中可以看见脊髓神经元丰富，在脊髓神经元中 LC3 显著增多，呈现典型的点状聚集，即可初步推断脊髓组织中 LC3 主要积聚于脊髓神经元中，实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠发病高峰期存在着明显的自噬缺陷，而雷帕霉素可以增加脊髓神经元中自噬小体的产生，诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元中自噬的发生。

2.6 各组小鼠脊髓神经元中 mTOR、P70S6K 蛋白及其磷酸化水平 见**表 3** 和**图 4**。在自噬活性调控中 mTOR 信号通路发挥着至关重要的作用。与正常组比较，模型组小鼠发病高峰期的 mTOR 蛋白磷酸化水平显著增加，雷帕霉素组小鼠该指标相较于正常组有所增加，与模型组比较，雷帕霉素组 mTOR 的磷酸化水平下降。在 mTOR 信号通路下游的 P70S6K 蛋白磷酸化水平在各组中的表达情况与 mTOR 磷酸化水平基本一致。

表 3 | 各组小鼠发病高峰期时 mTOR 及 P70S6K 蛋白磷酸化水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 | Comparison of the relative gray value of phosphorylated mTOR and P70S6K proteins levels among different groups at the peak period

组别	*n*	P-mTOR 蛋白相对灰度值	P-P70S6K 蛋白相对灰度值
正常组	6	0.115±0.025	0.241±0.077
模型组	6	0.454±0.043[b]	0.465±0.044[b]
雷帕霉素组	6	0.290±0.048[bc]	0.362±0.053[ac]
F 值		91.158	18.115
P 值		< 0.01	< 0.01

表注：与正常组比较，[a]$P < 0.05$，[b]$P < 0.01$；与模型组比较，[c]$P < 0.05$

3 讨论 Discussion

以前针对 mTOR 信号通路在多发性硬化及实验性自身免疫性脑脊髓炎中的作用研究主要就免疫细胞的调控机制进行阐述，而 mTOR 作为经典调节自噬的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶，在细胞自噬激活中发挥关键的作用，主要通过 PI3K/Akt 及 LKB1/AMPK 信号通路的支配对自噬相关基因进行调节而调控自噬，其中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的调控尤为关键， P70S6K 和 4E-BP1 是 mTOR 下游中的直接作用底物，其中 4E-BP1 磷酸化后抑制真核细胞中的翻译起始因子而促进依赖于 cap 的翻译过程，P70S6K 通过 mTOR 磷酸化激活后促进核糖体的形成，并与 4E-BP1 联合参与了蛋白质的合成。与此同时，调控自噬的丝氨酸 / 苏氨酸激酶 P70S6K 还可通过调控核糖体的蛋白 S6 的磷酸化而抑制自噬的发生 [15-16]。在自噬的信号转导通路中，mTOR 是被发现参与其中的第一个分子，作为自噬激活启动的信号转导通路中的一个重要调控靶点，它还可以控制自噬相关基因的表达，mTOR 可以对自噬相关基因 Atg1 和 Atg15 的哺乳动物同系物的磷酸化水平进行调控，从而抑制自噬的启动激活。mTOR 依赖的自噬途径在体内通过对蛋白质平衡的调控而对神经元的功能结构稳定发挥着关键的作用 [17]。

雷帕霉素作为 mTOR 的特异性抑制剂，通过对自噬的激活而在多种神经系统退行性疾病治疗中发挥着重要的神经保护作用 [18]。在帕金森病、阿尔茨海默病及亨廷顿病等神经系统退行性疾病动物模型中，雷帕霉素干预后诱导中枢神经系统神经元的自噬，减少因为氧化应激等损伤而导致的大量病理性蛋白质聚集，从而使小鼠临床症状改善 [19]。早在 1977 年就被 MARTEL 发现雷帕霉素可以对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的病情进展进行遏制 [20]，在慢性实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠动物模型中也同样得到了证实，这可能是雷帕霉素通过保护神经元从而改善临床症状并减缓了该病的进展程度 [21]。另外在脂多糖诱导过的体外神经细胞研究中发现，雷帕霉素通过增强细胞自噬清除细胞内大量因氧化应激造成损伤的蛋白及线粒体 DNA 等，从而对神经细胞起到保护的作用 [22]。还有研究表明雷帕霉素可以通过诱导自噬减缓因损伤而大量聚集在胞内的异常蛋白质的毒副作用，最终改善神经系统退行性疾病的症状及病情进展 [23]。雷帕霉素可与 FK506 结合蛋白相结合而形成 Rap-FKBP12 复合物，并与该复合物的结合位点 (FRB) 结合对 mTOR 特异性抑制，同时可以选择性抑制 mTOR 下游 P70S6 激酶的磷酸化，从而诱导自噬的发生 [24]，被抑制的 mTOR 通过增加对溶酶体的生物合成，促进自噬溶酶体的形成，加强对胞内残存蛋白质的清除，减少聚集体的形成并抑制神经胶质细胞及神经元的凋亡。正是基于这样的神经保护机制，对雷帕霉素在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中枢神经系统脊髓神经元的相关保护机制进行探讨与研究。

该实验发现雷帕霉素组可以缩短疾病的进展期 ($P < 0.01$)、延长发病的潜伏期 ($P < 0.01$)，而且能减低神经功能障碍评分 ($P < 0.05$)，尼氏标记的存活脊髓神经元的数量升高 ($P < 0.05$)，这都提示雷帕霉素对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的脊髓神经元有保护作用。介导自噬激活的 mTOR 信号通路的 mTOR 及其下游的 P70S6 蛋白激酶的磷酸化水平经定量分析显示：与模型组比较，雷帕霉素组的 mTOR 磷酸化水平和 P70S6K 磷酸化水平明显下降，同时雷帕霉素组小鼠发病高峰期时脊髓神经元中免疫荧光双标法检测自噬标志物 LC3 呈明显的点状聚集现象，LC3 与 NeuN 共定位现象显著，由此可以得出雷帕霉素对实验性自身免疫性脑脊髓炎发病高峰期小鼠脊髓神经元发挥着保护作用，这可能与它抑制 mTOR 信号通路中 mTOR 及 P70S6 蛋白激酶的磷酸化并激活自噬有关。

作者贡献：实验设计为谢阳、李作孝；实验实施为谢阳、张淑江、刘梦兰；实验评估为李作孝；资料收集为谢阳、杨洋；数据分析为谢阳、罗映。

经费支持：该文章接受了“泸州市人民政府基金课题 (2018LZX-NYD-ZK17)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为 201912-8。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过西南医科大学生物统计学专家审核。

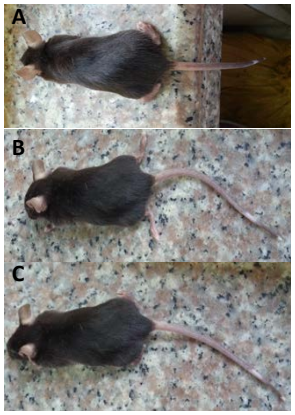
文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] HUANG WJ, CHEN WW, ZHANG X. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. Exp Ther Med. 2017;13(6):3163-3166.

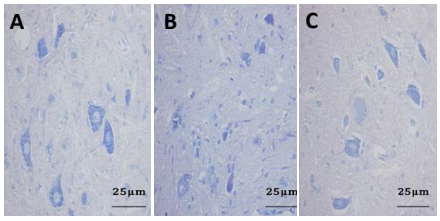
[2] MAHAD DH, TRAPP BD, LASSMANN H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2015;14(2):183-193.



图注：图中 A 为正常组，未发病；B 为模型组，实验性自身免疫性脑脊髓炎高峰期时表现，尾部张力明显下降；C 为雷帕霉素组，实验性自身免疫性脑脊髓炎高峰期时表现，神经功能障碍症状较轻，多以反应笨拙、尾部张力下降为主

图 1 | 各组小鼠行为学改变

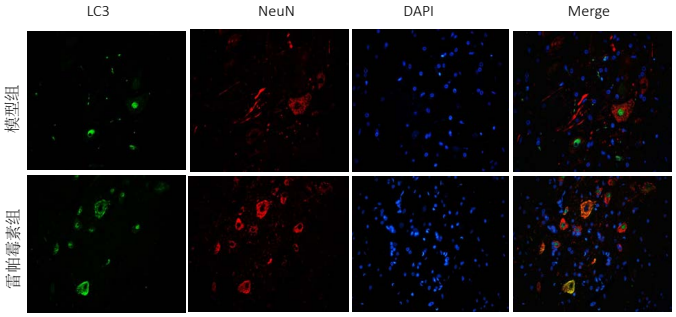
Figure 1 | Behavioral changes of mice in each group



图注：图中 A 为正常组；B 为模型组；C 为雷帕霉素组。与模型组比较，雷帕霉素组小鼠脊髓神经元排列较整齐，胞体与轴突轮廓模糊现象少见

图 2 | 各组小鼠发病高峰期时脊髓神经元尼氏染色 (×400)

Figure 2 | Nissl staining of mouse spinal cord neurons at the peak period (×400)



图注：两组小鼠自噬标志物 LC3 的分布聚集位点与脊髓中 NeuN 的分布基本一致。与模型组对比，雷帕霉素组脊髓神经元丰富，在脊髓神经元中 LC3 显著增多，呈现典型的点状聚集

图 3 | 模型组与雷帕霉素组小鼠脊髓神经元中 LC3 与 NeuN 表达及共定位情况 (荧光显微镜，×200)

Figure 3 | Expression and co-localization of LC3 and NeuN in mouse spinal cord neurons under immunofluorescence microscope (×200)

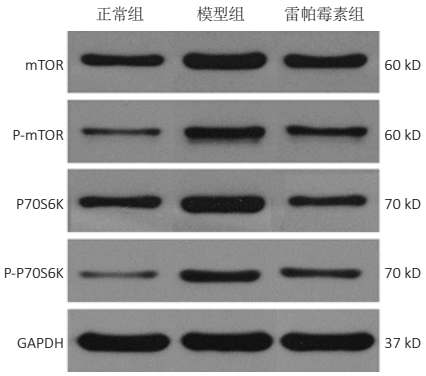


图 4 | 各组小鼠脊髓神经元中磷酸化 mTOR 和 P70S6K 蛋白的电泳条带

Figure 4 | Electrophoretic bands of mTOR and P70S6 proteins phosphorylated in spinal cord neurons of mice

[3] 胡学强 , 常艳宇 . 我国多发性硬化诊治现状与进展 [J]. 重庆医科大学学报 , 2017,42(6): 669-671.

[4] ROVARIS M, GAMBINI A, GALLO A, et al. Axonal injury in early multiple sclerosis is irreversible and independent of the short-term disease evolution. Neurology. 2005;65(10):1626-1630.

[5] KELLER CW, LÜNEMANN JD. Autophagy and Autophagy-Related Proteins in CNS Autoimmunity. Front Immunol. 2017;8:165.

[6] KOMATSU M, WAGURI S, CHIBA T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature. 2006;441(7095):880-884.

[7] GANDHI S, ABRAMOV AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:428010.

[8] CACCAMO A, MAJUMDER S, RICHARDSON A, et al. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. J Biol Chem. 2010; 285(17):13107-13120.

[9] DELLO RUSSO C, LISI L, FEINSTEIN DL, et al. mTOR kinase, a key player in the regulation of glial functions: relevance for the therapy of multiple sclerosis. Glia. 2013;61(3):301-311.

[10] CHIANG GG, ABRAHAM RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. J Biol Chem. 2005;280(27):25485-25490.

[11] PARK S, CHAPUIS N, TAMBURINI J, et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2010;95(5):819-828.

[12] YU SY, LIU L, LI P, et al. Rapamycin inhibits the mTOR/p70S6K pathway and attenuates cardiac fibrosis in adriamycin-induced dilated cardiomyopathy. Thorac Cardiovasc Surg. 2013;61(3):223-228.

[13] SBRANA FV, CORTINI M, AVNET S, et al. The Role of Autophagy in the Maintenance of Stemness and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Stem Cell Rev Rep. 2016;12(6):621-633.

[14] FRENZEL L, HERMINE O. Mast cells and inflammation. Joint Bone Spine. 2013;80(2):141-145.

[15] FENG X, HOU H, ZOU Y, et al. Defective autophagy is associated with neuronal injury in a mouse model of multiple sclerosis. Bosn J Basic Med Sci. 2017;17(2):95-103.

[16] KUMAR S, PATEL R, MOORE S, et al. Estrogen receptor β ligand therapy activates PI3K/Akt/mTOR signaling in oligodendrocytes and promotes remyelination in a mouse model of multiple sclerosis. Neurobiol Dis. 2013;56:131-144.

[17] NEUFELD TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. Curr Opin Cell Biol. 2010;22(2):157-168.

[18] DLCETTA D, DOMINICI R. The local mammalian target of rapamycin (mTOR) modulation: a promising strategy to counteract neurodegeneration. Neural Regen Res. 2019;14(10):1711-1712.

[19] OH JE, LEE HK. Pattern recognition receptors and autophagy. Front Immunol. 2014;5:300.

[20] MAIESE K, CHONG ZZ, SHANG YC, et al. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. Trends Mol Med. 2013; 19(1):51-60.

[21] SPILMAN P, PODLUTSKAYA N, HART MJ, et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. PLoS One. 2010;5(4):e9979.

[22] NAKAHIRA K, HASPEL JA, RATHINAM VA, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol. 2011;12(3):222-230.

[23] SEKIGUCHI A, KANNO H, OZAWA H, et al. Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice. J Neurotrauma. 2012; 29(5):946-956.

[24] RÜTHER BJ, SCHELD M, DREYMUELLER D, et al. Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. Glia. 2017;65(12):1900-1913.