

文章编号:1000-5404(2013)13-1345-05

论著

大鼠骨髓间充质干细胞神经分化过程中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白分布的变化及意义

王翠琴, 张广宇, 彭越, 彭涛, 贾延劼 (450052 郑州, 郑州大学第一附属医院神经内科)

[摘要] **目的** 探讨大鼠骨髓间充质干细胞神经分化过程中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)分布的变化及意义。**方法** 常规体外培养大鼠 MSCs, 采用 β -巯基乙醇诱导 MSCs 分化为神经细胞。实验分 MSCs 空白对照组、二甲基亚砜(DMSO)阴性对照组、 β -巯基乙醇诱导组、不同浓度雷帕霉素干预组、不同浓度雷帕霉素干预 + β -巯基乙醇诱导组。采用免疫荧光法检测诱导前后 mTOR 在细胞内的分布, 激光共聚焦显微镜观察照相; Western blot 法检测诱导前后神经细胞相关蛋白和 mTOR 通路蛋白的表达。**结果** ①诱导前 mTOR 主要在 MSCs 细胞核内点状分布, 细胞质也有少量的分布; 诱导后核内荧光信号减弱, mTOR 向细胞质转移。雷帕霉素处理后, 随着雷帕霉素浓度的提高(10 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$), mTOR 向细胞质转移越明显。雷帕霉素浓度超过 50 $\mu\text{mol/L}$ 后, 细胞形态变圆, 部分细胞脱壁, 死亡率显著增加($P < 0.05$)。② β -巯基乙醇可诱导骨髓间充质干细胞分化为神经细胞, 诱导后神经细胞 Tau 蛋白、MAP-2 蛋白表达显著增加。雷帕霉素(10 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$)干预后, 随着雷帕霉素浓度(10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$)的提高, Tau 蛋白、MAP-2 蛋白表达逐渐增加, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时 Tau 蛋白、MAP-2 蛋白表达下降($P < 0.05$)。③Western blot 检测结果提示, 诱导前后总 mTOR 表达不变; 磷酸化 mTOR、磷酸化 p70S6K、磷酸化 4EBP1 诱导后较诱导前表达下降($P < 0.05$), 雷帕霉素干预后下调更加显著($P < 0.05$)。**结论** mTOR 在 MSCs 神经分化过程中由细胞核内向细胞质转移, 活性下降, 表达下调, 提示 mTOR 在 MSCs 神经分化过程中可能发挥了重要作用。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 诱导; 神经细胞; mTOR; 雷帕霉素

[中图分类号] R322.8; R329.21; R979.5

[文献标志码] A

Distribution and significance of mammalian target of rapamycin during differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neurons

Wang Cuiqin, Zhang Guangyu, Peng Yue, Peng Tao, Jia Yanjie (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution and significance of mammalian target of rapamycin (mTOR) during the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into neurons. **Methods** Rat MSCs were cultured by conventional method *in vitro*, and were induced by β -mercaptoethanol (β -ME) to differentiate into neurons. The MSCs were divided into a MSCs blank control group, a dimethyl sulfoxide (DMSO) negative control group, a β -ME induction group, different concentrations of rapamycin intervention groups, and different concentrations of rapamycin intervention + β -ME induction groups. Immunofluorescence and laser confocal microscopy were used to observe the intracellular distribution of mTOR before and after induction. Western blotting was used to detect the expression of neuron-related proteins and mTOR before and after induction. **Results** (1) Before β -ME induction, mTOR were mainly distributed in the cell nucleus like spots, and a small amount was distributed in the cytoplasm. After β -ME induction, the nuclear fluorescence signal reduced, and mTOR translocated into the cytoplasm. After rapamycin treatment, mTOR translocation to the cytoplasm became more obvious along with the increase of rapamycin concentration (10 to 30 $\mu\text{mol/L}$). When the concentration of rapamycin was more than 50 $\mu\text{mol/L}$, the morphology of MSCs became round, some cells detached, and the cell death rate was significantly increased ($P < 0.05$). (2) MSCs were induced by β -ME to differentiate into neurons and the expression of Tau and MAP-2 increased significantly. After rapamycin treatment, the expression of Tau and MAP-2 gradually increased along with the increase of rapamycin

[基金项目] 国家自然科学基金(81071114)

[通信作者] 贾延劼, E-mail: jiayanjie1971@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130228.1713.004.html>(2013-02-28)

concentration (10 to 20 $\mu\text{mol/L}$). When the concentration reached 30 $\mu\text{mol/L}$, the expression of Tau and MAP-2 was down-regulated ($P < 0.05$). (3) Western blotting results suggested that the total expression of mTOR was the same before and after β -ME induction. The expression of phospho-mTOR, phospho-p70S6K and phospho-4EBP1 was significantly decreased after β -ME induction ($P < 0.05$), and the decrease became more significant after rapamycin treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** During the induction of MSCs differentiation into neurons, mTOR translocated into cytoplasm from cell nucleus, and the expression of mTOR declines. mTOR may play an important role in regulating MSCs differentiation into neurons.

[Key words] bone marrow mesenchymal stem cells; induction; neurons; mTOR; rapamycin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071114). Corresponding author: Jia Yanjie, E-mail: jiayanjie1971@yahoo.com.cn

雷帕霉素靶蛋白 (target of rapamycin, TOR) 是近年来发现的一类进化上非常保守的蛋白激酶家族,广泛存在于各种生物细胞中。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,可调节细胞生长、增殖及一些细胞内活动,如 mRNA 转录及翻译、自噬及细胞骨架再组装。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种具有多向分化潜能的干细胞,在特定条件下可向神经细胞分化^[1],但具体机制尚不清楚。有研究表明在帕金森病的治疗中,移植自体已分化 MSCs 取代多巴胺能神经元是一种安全有效的细胞疗法^[2]。mTOR 在骨髓间充质干细胞中是否表达,在骨髓间充质干细胞向神经细胞分化过程中 mTOR 细胞内分布及表达是否会发生变化,目前尚无定论。本研究通过体外诱导大鼠 MSCs 向神经细胞分化,观察 mTOR 在此分化过程中分布及表达的变化,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

MSCs 由 SPF 级 Wistar 大鼠股骨中分离提取,连续传 10 代以上,液氮冻存,实验前常规复苏。其中 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄不限,体质量 150 ~ 200 g,由河南省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(豫)2005-0001。

1.2 主要试剂

DMEM 液体培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; mTOR、p-mTOR、磷酸化 p70S6K (p-p70S6K)、磷酸化 4EBP1 (p-4EBP1) 兔抗单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司; Tau、MAP-2、GFAP 兔抗多克隆抗体均购自 Santa Cruz; Cy3 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 购自上海碧云天公司; 雷帕霉素、多聚赖氨酸、噻唑蓝 (MTT) 均购自 Sigma 公司; 其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 主要方法

1.3.1 细胞培养及实验分组 实验分 5 组: MSCs 空白对照组、诱导组、不同浓度雷帕霉素干预组、不同浓度雷帕霉素干预 + 诱导组、二甲基亚砜 (DMSO) 阴性对照组,雷帕霉素分 3 个浓度梯度: 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 。常规体外培养大鼠 MSCs,按照 5×10^4 /孔比例接种于 24 孔细胞培养板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养

箱内培养。待细胞密度达 70% ~ 80% 加入不同浓度的雷帕霉素处理液 (10 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$),且每组处理液 DMSO 浓度均低于 0.1%,作用 24 h。

1.3.2 体外诱导 MSCs 分化为神经细胞 取相应组细胞进行诱导实验。DMEM 完全培养基, D-Hank's 液清洗 3 次,加入预诱导液 (DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清 + 1 mmol/L β -巯基乙醇) 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。预诱导后,加入诱导液 (DMEM 培养基, 5 ~ 10 mmol/L β -巯基乙醇), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 5 h。

1.3.3 细胞存活率检测 采取四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法,检测各组细胞存活率^[3]。

1.3.4 免疫细胞化学染色法 将各组细胞用 PBS 液洗过后,4% 多聚甲醛溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,含 0.1% Triton X-100 的洗液洗涤 3 次,每次 5 min,并用封闭液封闭 1 h,然后用 mTOR 抗体 (抗体滴度 1:100) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用含 0.1% Triton X-100 的洗液洗涤 3 次,用 Cy3 标记山羊抗兔 IgG (1:200) 在室温下进行染色标记,DAPI 复染,荧光显微镜下观察。

1.3.5 Western blot 分别收集各组细胞,充分裂解细胞,离心保留上清,-80 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用,以 BCA 法测定总蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 凝胶,电泳结束后取出凝胶转移至同等大小的硝酸纤维素膜上。转移后的硝酸纤维素膜置于封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入兔抗 mTOR、p-mTOR、p-p70S6K、p-4EBP1 单克隆抗体 (1:1000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST 漂洗 10 min \times 3 次;辣根过氧化物酶 (HRP) 联抗兔 IgG (1:3000),室温处理 2 h,TBST 漂洗 10 min \times 3 次;ECL 显色液中反应,曝光至条带清晰。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异 (LSD 法)。

2 结果

2.1 β -巯基乙醇体外可诱导 MSCs 分化为神经细胞

诱导 2 h 后少数 MSCs 开始发生神经元样改变,胞体收缩变圆,伸出细长突起;诱导 5 h 后,多数细胞发生神经元样改变,胞体收缩变圆或呈锥形,伸出细长突起,交织成网。

2.2 不同浓度雷帕霉素处理后 mTOR 在细胞内分布的变化

2.2.1 MTT 检测细胞存活率 诱导后较诱导前细胞存活率

略下降,雷帕霉素处理后,诱导前,雷帕霉素 10 $\mu\text{mol/L}$ 较雷帕霉素未处理前细胞存活率略高,随着雷帕霉素浓度(20 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$)的提高,细胞存活率逐渐下降,当雷帕霉素浓度超过 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,大部分细胞脱壁死亡,细胞存活率明显下降,因此本实验雷帕霉素浓度采用 10 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$;诱导后,细胞存活率均较诱导前下降,且随着雷帕霉素浓度(10 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$)的提高,细胞存活率下降越明显。见表 1。

表 1 β -巯基乙醇诱导 MSCs 前后不同浓度雷帕霉素处理后各组细胞存活率比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

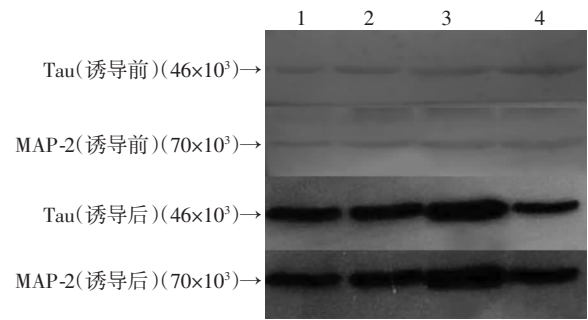
时间	0 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	30 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$
诱导前	95.72 \pm 0.41 ^{abcd}	96.54 \pm 0.25 ^{acd}	90.96 \pm 0.43 ^{abd}	78.88 \pm 0.40 ^{abc}	28.06 \pm 0.82 ^{abcd}
诱导后	89.52 \pm 0.40 ^{bcd}	90.32 \pm 0.43 ^{acd}	88.62 \pm 0.41 ^{abd}	69.52 \pm 0.40 ^{abc}	10.62 \pm 0.36 ^{abcd}

a: $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较; b: $P < 0.05$, 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 比较;
c: $P < 0.05$, 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 比较; d: $P < 0.05$, 与 30 $\mu\text{mol/L}$ 比较

2.2.2 细胞形态学变化 正常 MSCs 细胞呈长梭形,细胞形态较均匀,雷帕霉素处理后,随着雷帕霉素浓度(10 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$)的提高,细胞形态变化不明显。当雷帕霉素浓度超过 50 $\mu\text{mol/L}$ 后,细胞形态变圆,细胞脱壁明显,死亡率显著增加。 β -巯基乙醇体外诱导 MSCs 过程中,随着雷帕霉素浓度(10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$)的提高,神经元样改变越明显,雷帕霉素浓度超过 30 $\mu\text{mol/L}$ 时,神经诱导效率下降。见图 1。

2.2.3 免疫细胞化学法检测结果

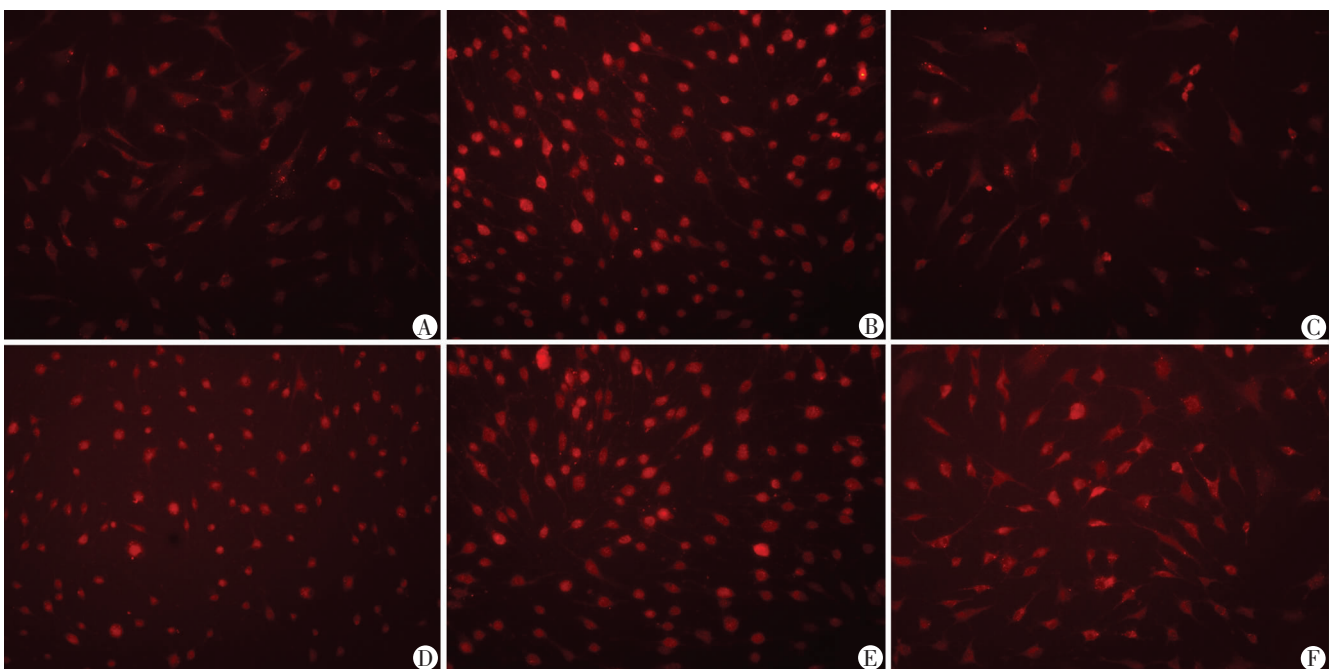
2.2.3.1 Tau 和 MAP-2 的表达 诱导前神经元标志物 Tau 和 MAP-2 基本不表达, β -巯基乙醇诱导后 5 h,神经元标志物 Tau 和 MAP-2 表达明显,雷帕霉素处理后,随着雷帕霉素浓度(10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$)的提高,Tau 和 MAP-2 表达逐渐增加,当雷帕霉素浓度超过 30 $\mu\text{mol/L}$ 时,Tau 和 MAP-2 表达下降,各组 GFAP 表达率均小于 1%,无显著差异。见图 2。



1: 雷帕霉素 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 雷帕霉素 10 $\mu\text{mol/L}$; 3: 雷帕霉素 20 $\mu\text{mol/L}$; 4: 雷帕霉素 30 $\mu\text{mol/L}$

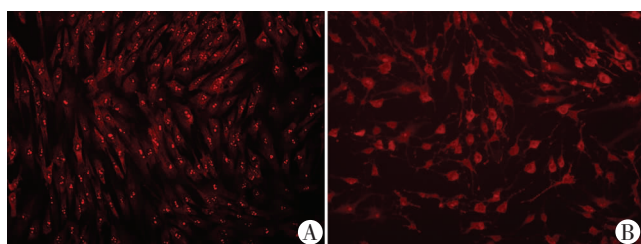
图 2 Western blot 检测 β -巯基乙醇诱导 MSCs 前后不同浓度雷帕霉素处理后各组细胞 Tau 蛋白和 MAP-2 蛋白表达

2.2.3.2 mTOR 在细胞内的分布 诱导前,mTOR 呈核内强荧光信号,且点状聚集,细胞质亦有少量分布,分布均匀(图 3A); β -巯基乙醇诱导后 5 h,核内高荧光信号减弱(图 3B),点状聚集不明显,细胞质荧光信号较诱导前增加。雷帕霉素处理后,诱导前,雷帕霉素(10 $\mu\text{mol/L}$)组 mTOR 在核内呈点状荧光信号聚集,但较未用雷帕霉素处理组其核内点状荧光信号强度减弱,极少部分细胞核内点状强荧光信号消失(图 4A);雷帕霉素(20 $\mu\text{mol/L}$)组 mTOR 核内点状荧光信号强度较雷帕霉素(10 $\mu\text{mol/L}$)组弱,部分细胞核内点状荧光信号消失(图 4B);雷帕霉素(30 $\mu\text{mol/L}$)组 mTOR 在极少数细胞中有核内点状荧光信号聚集,大部分细胞核内强荧光信号消失(图 4C)。 β -巯基乙醇诱导后 5h,雷帕霉素(10 $\mu\text{mol/L}$)组 mTOR 在部分细胞中可见核内点状荧光信号,但较诱导前弱,细胞质荧光信号增强(图 4D);雷帕霉素(20 $\mu\text{mol/L}$)组 mTOR 在极少数细胞核内可见弱的点状荧光信号,大多数细胞核内点状荧光信号消失(图 4E);雷帕霉素(30 $\mu\text{mol/L}$)组细胞均未见核内点状荧光信号出现(图 4F)。



A、D: 10 $\mu\text{mol/L}$; B、E: 20 $\mu\text{mol/L}$; C、F: 30 $\mu\text{mol/L}$

图 1 β -巯基乙醇诱导 MSCs 不同浓度雷帕霉素处理后细胞 Tau(A ~ C)和 MAP-2(D ~ F)表达 (荧光显微镜 $\times 200$)

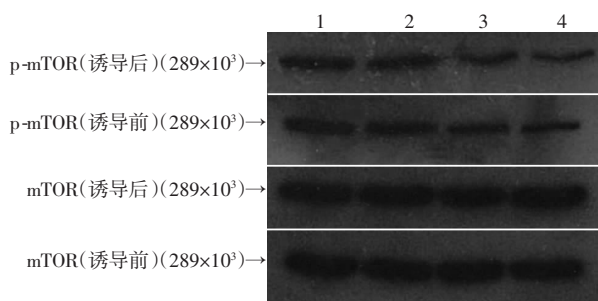


A: 诱导前; B: 诱导后 5 h

图3 β -巯基乙醇诱导 MSCs 前后 mTOR 在细胞内的分布
(荧光显微镜 $\times 200$)

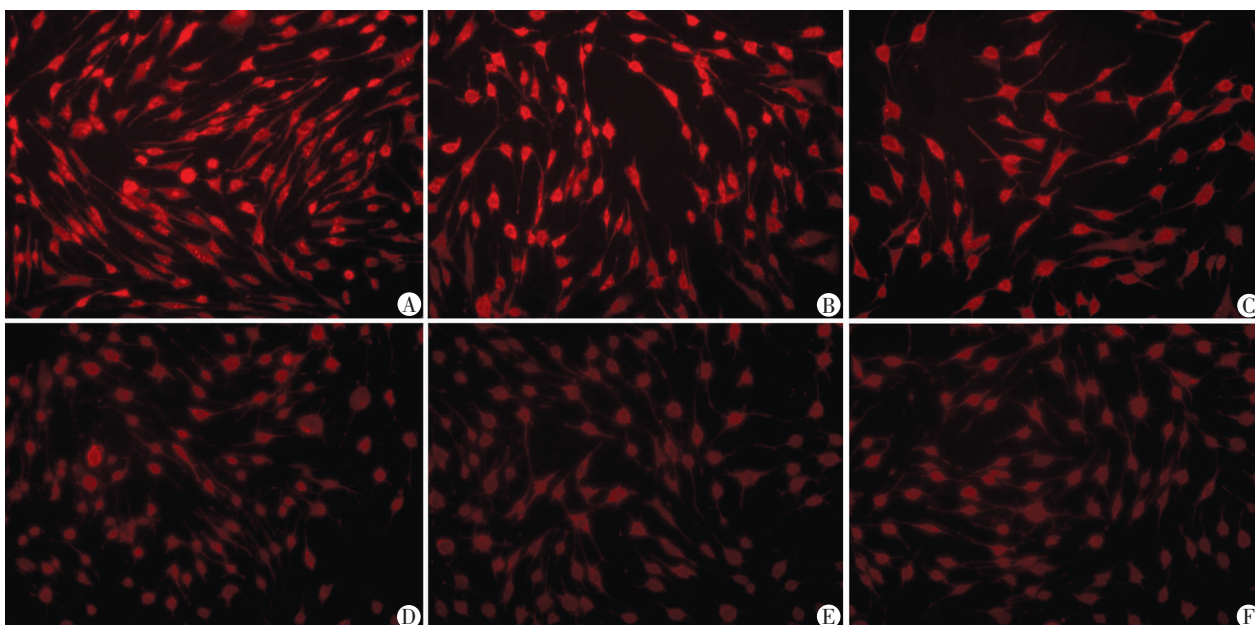
2.3 mTOR 及其下游底物表达的变化

诱导前,随着雷帕霉素浓度由 $10 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 不断提高, p-mTOR 表达量不断下降, β -巯基乙醇诱导后 5 h, p-mTOR 表达量较诱导前下降, 并且随着雷帕霉素浓度由 $10 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 不断提高, p-mTOR 表达量较雷帕霉素未处理组下降越明显, 诱导前后总 mTOR 表达量不变。p-p70S6K、p-4EBP1 诱导后较诱导前表达量下降; 雷帕霉素 $10 \mu\text{mol/L}$ 处理后, p-p70S6K、p-4EBP1 表达量下降, 诱导后其表达量下降更明显。见图 5、6。



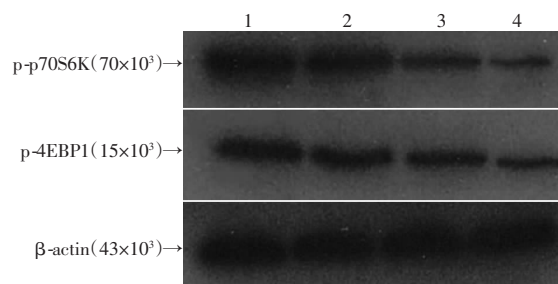
1: 雷帕霉素 $0 \mu\text{mol/L}$; 2: 雷帕霉素 $10 \mu\text{mol/L}$; 3: 雷帕霉素 $20 \mu\text{mol/L}$; 4: 雷帕霉素 $30 \mu\text{mol/L}$

图5 Western blot 检测 β -巯基乙醇诱导 MSCs 前后不同浓度雷帕霉素处理后 mTOR 和 p-mTOR 蛋白的表达



A、D: 雷帕霉素 $10 \mu\text{mol/L}$; B、E: 雷帕霉素 $20 \mu\text{mol/L}$; C、F: 雷帕霉素 $30 \mu\text{mol/L}$; A ~ C: 诱导前; D ~ F: β -巯基乙醇诱导后 5 h

图4 β -巯基乙醇诱导 MSCs 前后不同浓度雷帕霉素处理后 mTOR 在细胞内的分布及表达 (荧光显微镜 $\times 200$)



1: 未诱导组(空白对照组); 2: β -巯基乙醇诱导后 5 h 组; 3: 未诱导 + 雷帕霉素处理组; 4: β -巯基乙醇诱导后 5 h + 雷帕霉素处理组

图6 Western blot 检测 β -巯基乙醇诱导 5 h MSCs 前后雷帕霉素 $10 \mu\text{mol/L}$ 处理组 p-p70S6K 和 p-4EBP1 蛋白的表达

3 讨论

Kim 等^[3]在人胚肾 293 细胞系及猴的肾上皮 CV-1 细胞系的研究中发现, mTOR 是个核穿梭蛋白, 能与其他核转运蛋白结合, 从而转移分布的位置, 其穿梭可能与雷帕霉素敏感的 mTOR 信号途径及蛋白起始翻译有关。在对鼠纤维母细胞的研究中发现, 正常情况下 mTOR 主要分布在线粒体, 电离辐射可使 mTOR 由线粒体向细胞核转移^[4]。此后, 又有多项研究表明 mTOR 在一定条件下可进行核穿梭^[5-8]。本研究免疫细胞化学法结果表明: β -巯基乙醇诱导前, mTOR 主要在核内点状高信号分布, 诱导后, mTOR 核内分布减弱。雷帕霉素处理后, 随着雷帕霉素浓度 $10 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 的提高, 核内信号减弱越明显, 提示在 MSCs 神经分化过程中 mTOR 可能发生了核转移。

mTOR 在调控神经分化及突触可塑性过程中发挥重要作用^[9], 树突及轴突的生长乃至突触的发生都

依赖于适当的 mTOR 活性^[10]。神经分化过程中 mTOR 活性下降,应用雷帕霉素不利于神经细胞分化,并可减少神经突起的分支、细胞大小及神经元标志物的免疫活性^[11]。在炎症^[12]及严重脊髓损伤^[13]时,增加 mTOR 活性可显示明显的神经保护作用及促进轴突生长。然而,过高的 mTOR 活性可影响神经元的形态及功能^[10]。在某些神经变性疾病治疗过程中,雷帕霉素可通过降低正常神经细胞 mTOR 活性达到缓解疾病病程的目的^[14]。本研究显示,诱导后,p-mTOR 表达减少,mTOR 活性下降,神经元标志物 Tau 和 MAP-2 表达明显,雷帕霉素处理后,随着浓度由 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐提高,p-mTOR 表达量逐渐减少,mTOR 活性逐渐下降,神经元标志物 Tau 和 MAP-2 表达逐渐增加,当雷帕霉素浓度达到 30 $\mu\text{mol/L}$ 时,Tau 和 MAP-2 表达下降,提示适当的 mTOR 活性可能在 MSCs 向神经细胞分化过程中发挥重要作用。

氨基酸、胰岛素、生长因子可激活 mTOR 信号通路^[15],mTOR 被激活后转化为其活化形式 p-mTOR、p-mTOR 可直接反应 mTOR 活性。mTOR 主要通过两条磷酸化作用途径对蛋白质合成进行调控^[10]。一条途径是激活 S6 激酶(S6K),mTOR 磷酸化并激活 S6K 蛋白激酶使核糖体蛋白 S6 磷酸化并驱动 5'TOP(5'末端寡聚嘧啶)mRNA 的翻译,mTOR 可正调控 5'TOP 转录产物编码核糖体蛋白和翻译延长因子,从而促进核糖体生物合成和翻译延长。另一条途径是失活翻译抑制剂 4EBP1(真核细胞 4E 结合蛋白 1),4EBP1 是翻译起始因子 eIF4E 的抑制剂,与 eIF4E 结合可引起主要翻译途径 5'帽状结构的 mRNA 翻译停止,mTOR 可磷酸化 4EBP1,释放 eIF4E,允许翻译开始。S6K 及 4EBP1 的磷酸化程度可间接反映 mTOR 的活性^[16]。本研究中 Western blot 检测结果表明:诱导后较诱导前 p-mTOR 表达下降,通过不同浓度的雷帕霉素改变 mTOR 活性,p-mTOR、p-p70S6K 及 p-4EBP1 均发生了相应的变化,这也提示了 MSCs 向神经细胞分化过程中 mTOR 活性下降。

综上所述,本研究发现 mTOR 在 MSCs 向神经分化过程中由细胞核内向细胞质转移,活性下降,表达下调,且改变 mTOR 活性可影响 MSCs 向神经细胞分化,提示 mTOR 在 MSCs 神经分化过程中可能发挥了重要作用。

参考文献:

[1] 景黎君,贾永林,鲁晶晶,等. MicroRNA-9-1 慢病毒载体的构建及

其对小鼠骨髓间质干细胞诱导分化为神经细胞的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(2): 326-331.

- [2] Hayashi T, Wakao S, Kitada M, *et al.* Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 272-284.
- [3] Kim J E, Chen J. Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14340-14345.
- [4] Tirado O M, Mateo-Lozano S, Sanders S, *et al.* The PCPH oncoprotein antagonizes the proapoptotic role of the mammalian target of rapamycin in the response of normal fibroblasts to ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6290-6298.
- [5] Jiang R, Choi W, Hu L, *et al.* Activation of polyamine catabolism by N1, N11-diethyl norspermine alters the cellular localization of mTOR and downregulates mTOR protein level in glioblastoma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(10): 1644-1648.
- [6] Lin F, Zhang P L, Yang X J, *et al.* Morphoproteomic and molecular concomitants of an overexpressed and activated mTOR pathway in renal cell carcinomas[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2006, 36(3): 283-293.
- [7] Liu J, Brown R E. Morphoproteomics demonstrates activation of mammalian target of rapamycin pathway in papillary thyroid carcinomas with nuclear translocation of mTOR in aggressive histological variants[J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(12): 1553-1559.
- [8] Fielhaber J A, Tan J, Joung K B, *et al.* Regulation of karyopherin $\alpha 1$ and nuclear import by mammalian target of rapamycin [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(18): 14325-14335.
- [9] Jaworski J, Sheng M. The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity[J]. *Mol Neurobiol*, 2006, 34(3): 205-219.
- [10] 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.
- [11] Zeng M, Zhou J N. Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(4): 659-665.
- [12] Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D. Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(2): 314-324.
- [13] Lu P, Wang Y, Graham L, *et al.* Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury [J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1264-1273.
- [14] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 585-595.
- [15] Wang X, Proud C G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21: 362-369.
- [16] Sudarsanam S, Johnson D E. Functional consequences of mTOR inhibition [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010, 13(1): 31-40.

(收稿:2012-12-26;修回:2013-02-01)

(编辑 王小寒)