

## 脑源性神经营养因子通过 PI3K/Akt/mTOR 信号途径对胚鼠缺氧神经元的保护作用

陈艾<sup>1,2,3,4</sup>, 熊励晶<sup>1,2,3</sup>, 马骄<sup>1,2,3</sup>, 童煜<sup>2,3</sup>, 毛萌<sup>1,2,3</sup>

1 四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041; 2 四川大学华西第二医院西部妇幼医学研究院

妇儿疾病与出生缺陷教育部重点实验室, 早期发育与损伤重点实验室, 四川 成都 610041;

3 发育与妇儿疾病四川省重点实验室, 四川 成都 610041; 4 泸州医学院附属医院儿科, 四川 泸州 646000

**摘要:** **目的** 探讨脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对缺氧(oxygen deprivation, OD)神经元的保护作用是否与激活自噬有关,其信号通路是否通过 PI3K/Akt/mTOR 途径。**方法** 1)建立胚鼠神经元 OD 损伤模型;CCK-8 法观察不同浓度 BDNF 对 OD 神经元细胞活性的影响;2)检测 OD 神经元 1,3,5 h 自噬微管相关蛋白轻链 3(LC3)的表达,情况观察 BDNF 对 OD 神经元的保护作用是否与自噬有关;3)检测 p-Akt, p-mTOR, p-p70S6K 以及 LC3II 的表达,对比 BDNF 与自噬激活剂雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, Rapamycin)对 Akt/mTOR/p70S6K 的影响,以及自噬被 3-MA 抑制后, BDNF 对 Akt/mTOR/p70S6K 的影响。**结果** 1)50  $\mu\text{g/L}$  BDNF 可对 OD 神经元起保护作用( $P < 0.05$ ),100  $\mu\text{g/L}$  BDNF 效应次之;2)BDNF 和/或 Rapamycin 在下调 p-Akt/p-mTOR/p-p70S6K 表达的同时可上调 LC3II 的表达;当 3-MA 抑制自噬后, BDNF 对 LC3II 的上调作用被抑制。**结论** BDNF 通过 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 信号途径激活自噬,发挥对 OD 神经元的保护作用。

**关键词:** 脑源性神经生长因子; 自噬; 神经元; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 自噬微管相关蛋白轻链 3

**中图分类号:** Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-6579(2013)10-1049-03

**Neuronal protective effect of brain-derived neurotrophic factor mediate by autophagy through PI3K/Akt/mTOR pathway.**  
CHEN Ai<sup>1,2,3,4</sup>, XIONG Li-jing<sup>1,2,3</sup>, MA Jiao<sup>1,2,3</sup>, TONG Yu<sup>2,3</sup>, MAO Meng<sup>1,2,3</sup>. (1 Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2 Laboratory of Early Developmental and Injuries, West China Institute of Woman and Children's Health, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3, Key Laboratory of Obstetric & Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, Chengdu, Sichuan 610041, China; 4, Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Corresponding author: MAO Meng, E-mail: dffmmao@126.com

**Abstract:** **Objective** Based on growing evidence linking autophagy to ischemic preconditioning, it was hypothesized that autophagy was necessary for neuroprotection conferred by hypoxic preconditioning and further aimed to test whether brain-derived neurotrophic factor(BDNF) protects against hypoxic neuronal damage by autophagy activation and the possible signaling pathway. **Methods** Primary cultured cortical neurons of pregnant rats were treated with oxygen deprivation (OD) for 0.5~6 h to mimic hypoxic injury in vivo. Neuronal autophagy was measured with expression of microtubule associated protein light chain 3(LC3), and the LC3II, p-Akt, p-mTOR, and p-p70S6K protein were detected by western-blot after treated with autophagy promotor rapamycin or autophagy inhibitor 3-methyladenine(3-MA). **Results** 1) Compared with the control group, cells treated with 50  $\mu\text{g/L}$  BDNF had the highest cell viability. 2) BDNF decreased the expression of P-Akt, p-mTOR, and p-p70S6K, and increased the expression of LC3II. Similar to the roles of rapamycin to the signals, BDNF-induced up-regulation of LC3II was inhibited by 3-MA. **Conclusion** BDNF protects cortical neurons against oxygen deprivation damage by autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway.

**Key words:** brain-derived neurotrophic factor; autophagy; cortical neurons; mammalian target of rapamycin; light chain 3

缺氧性脑病是儿科的常见疾病,累及神经系统

中多个区域而遗留瘫痪、智力低下,生长发育迟缓等后遗症<sup>[1]</sup>。目前认为,神经元在缺氧后是否继续存活取决于细胞能维持多久的稳态。自噬是继坏死、凋亡后发现的第三种细胞死亡形式,对维持神经元的稳态起关键作用。自噬的关键启动位点哺乳动物

**【基金项目】** 国家自然科学基金(30973215);四川省科技支撑计划(2012SZ0010);教育部创新团队和新世纪人才计划(IRT 0935)

**【作者简介】** 陈艾,女,主治医师,在读博士,研究方向为小儿神经康复。

**【通信作者】** 毛萌, E-mail: dffmmao@126.com

雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是磷酸酰肌醇 3 磷酸酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路的下游靶点。有文献报道,脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)可通过多种机制实现对各种神经损伤的修复作用<sup>[2]</sup>,本课题组也已证实 BDNF 通过 PI3K/Akt 信号途径对缺氧(oxygen deprivation, OD)神经元有确切保护作用。因此,本研究旨在探讨 BDNF 对 OD 神经元的保护作用是否与自噬有关,其信号通路是否通过 PI3K/Akt/mTOR 信号途径。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 16~18 d SD 孕鼠,清洁级,体质量 350~400 g 左右,由四川省医学科学院实验动物研究所提供[生产许可证号:SCXK(川)2004-15]。

1.2 主要试剂 多聚赖氨酸、鼠尾胶原、BDNF,雷帕霉素(rapamycin),3-甲基腺嘌呤(3-MA 购于美国 Sigma 公司,高糖培养基、神经元培养基、B-27 神经刺激因子、LC3,磷酸化 Akt (Ser473)、磷酸化 mTOR 抗体(Ser2448)、磷酸化 p70S6K(Thr389)、 $\beta$ -actin 购于美国 CST 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于北京中杉金桥公司,细胞计数-8(CCK-8)试剂盒购于日本同仁化学公司。

1.3 主要设备 24 孔、96 孔塑料培养板(广州洁特生物),二氧化碳(CO<sub>2</sub>)培养箱(日本三洋公司),厌氧培养箱(美国热电公司),超净工作台(加拿大阿尔泰克公司)。

1.4 胚鼠原代神经元的培养 按照本实验组方法进行<sup>[3]</sup>。

1.5 神经元缺氧模型的建立 选用培养 7 d 生长良好的神经元,放于条件为 37℃、99.99 mL/L N<sub>2</sub> 的厌氧培养箱。

1.6 CCK-8 测量细胞活力 观察不同剂量 BDNF 以及 rapamycin 对 OD 神经元的作用。实验按说明书进行。神经元细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板。BDNF 及 rapamycin 分为三组。见图 1;对照组:只做缺氧处理。此外,为了校正吸光度,取 3 孔仅加入相同体积培养液,不加入细胞作为空白组。每组 3 个复孔,每孔加入培养体系总体积 1/10 的 CCK-8 试剂于 50 mL/L CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 1 h,酶标仪检测 450 nm 吸光度值(A450)。取 3 个复孔的平均吸光度以确定细胞活力。细胞活力% =  $[A(\text{药物}) - A(\text{空白})] / [A(\text{细胞}) - A(\text{空白})] \times 100$ 。

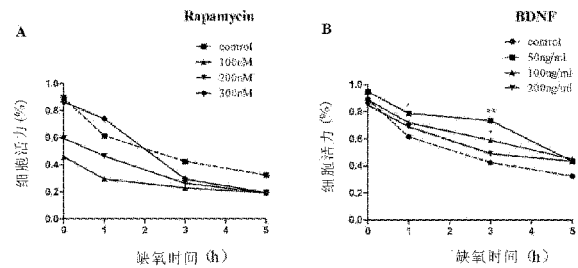
1.7 蛋白样品的制备及 Western blot 检测 在缺氧前 24 h 加入 50  $\mu$ g/L BDNF,缺氧前 0.5 h 加入

10 mM 3-MA 或 300 nM rapamycin。提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量后分别取 25  $\mu$ g 蛋白样品进行蛋白电泳和转膜。先后用 p-Akt (Ser473) (1 : 1 000), p-mTOR (1 : 1 000), p-p70S6K (Thr389) (1 : 1 000), LC3 (1 : 1 000), 以及一抗  $\beta$ -actin (1 : 500) 和辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 1 000) 进行杂交,洗膜后用化学发光底物(美国密理博公司)在化学发光成像仪中显影。所得结果用 Gel-pro Analyzer 软件分析。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 细胞活力 CCK-8 的 A450 直接反映细胞活力,A450 值越高,细胞活力越强。与对照组比较,加入 BDNF 后,神经元细胞活力明显增强。于 OD 1~3 h,50  $\mu$ g/L BDNF 组的细胞活力最强,100  $\mu$ g/L BDNF 组的细胞活力其次( $P < 0.05$ )。300 nM rapamycin 组在 OD 2 h 前细胞活力较对照组高。见图 1。



注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

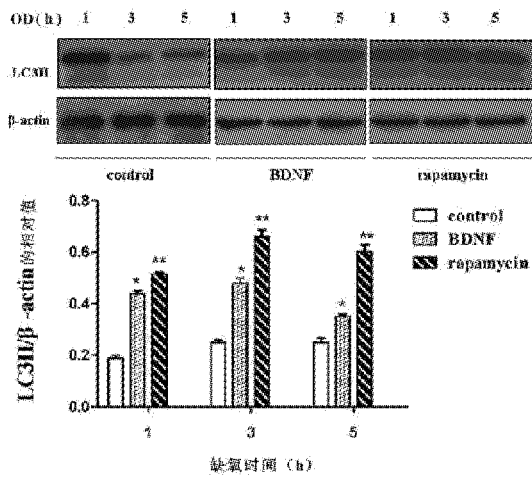
图 1 缺氧皮质神经元细胞活力 (%)

Fig. 1 Neuron viability under hypoxic conditions

## 2.2 免疫印迹

2.2.1 免疫印迹显示的缺氧后各组神经元 LC3 的表达情况 与对照组比较,50  $\mu$ g/L BDNF 提高 OD 神经元细胞活力的同时,于缺氧 1, 3, 5 h 增加了 LC3 的表达( $P < 0.05$ )。LC3II 在 BDNF 组于 OD 3 h 出现高峰。与阳性参照 300 nM 自噬诱导剂 rapamycin 比较,两者有相同趋势,rapamycin 上调 LC3 的作用更强( $P < 0.01$ )。见图 2。

2.2.2 BDNF 对磷酸化 Akt/mTOR/p70S6 以及 LC3II 表达的影响 相对于对照组,BDNF 可抑制 Akt/mTOR/p70S6 磷酸化的表达,同时 LC3II 表达升高。见图 3 A, B; 当加入自噬抑制剂 3-MA 后,BDNF 对 LC3II 的上调作用被抑制。见图 3A, C。BDNF 与自噬诱导剂 rapamycin 对磷酸化 Akt/mTOR/p70S6 的调控趋势一致。见图 3A, D。



注: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

图 2 免疫印迹显示的缺氧后各组神经元 LC3 的表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Expression of LC3 in BDNF group and rapamycin group within the OD duration ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

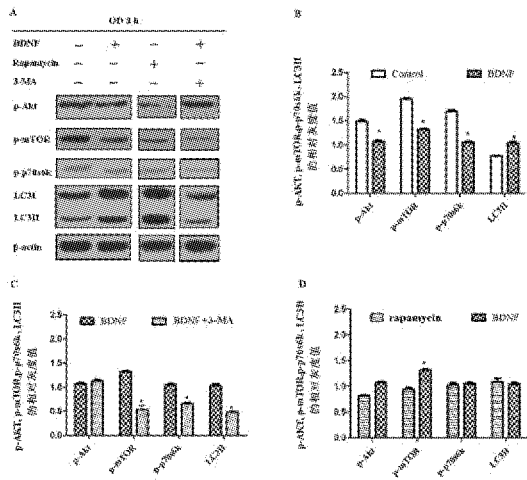


图 3 BDNF 对 Akt/mTOR/p70S6 通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Influence of BDNF to the subsites of Akt/mTOR/p70S6 signal way ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论

3.1 自噬及其检测 自噬是凋亡, 坏死以后的第三种细胞程序性死亡<sup>[4]</sup>, 指细胞在自噬相关基因 (autophagy related gene, Atg) 的调控下利用溶酶体/噬泡降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程。当神经元遭遇应激, 如缺氧、饥饿、感染等侵袭时, 自噬的启动可能有助于维持神经元稳态。目前认为, 在所有的 Atg 蛋白中, 只有 LC3/Atg8 贯穿于自噬发生的始终。自噬发生时, LC3-I 通过类泛素化酶反应偶联磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) (LC3-PE), 聚集于自噬体内外膜上, 在自噬体和溶酶体融合后, 外膜上的 LC3II 通过 Atg4 脱离, 内膜上的 LC3II 被溶酶体酶降解。因此, LC3II 是

目前监测自噬发生的常用指标<sup>[5]</sup>。

### 3.2 BDNF 对 OD 神经元的保护作用与自噬有关

前期试验发现加入外源性 BDNF 后, 原代培养神经元对一定时限缺氧 (0~6 h) 的耐受性增强<sup>[6]</sup>。为了探索 BDNF 是否经过自噬途径产生神经元的保护作用, 首先用 CCK-8 检测发现 50 μg/L BDNF 能明显提高 OD 神经元的细胞活性 (图 1)。与此同时, 50 μg/L BDNF 干预的 OD 神经元 LC3 表达增高 (图 2), 说明 BDNF 的神经元保护作用与自噬相关。

本次实验中, BDNF 对 OD 神经元的保护作用存在剂量依赖性, 剂量越大, 缺氧后的神经元细胞活性越差, 这与本实验组曾经观察到的结论一致。有综述报道, 通过不同途径添加 BDNF 参与神经系统的调控, 剂量各不同<sup>[2]</sup>。如小鼠实验的脑室内注射浓度一般是 5 μg/只, 而培养神经元则多为 50~100 μg/L。提示只有适当浓度的 BDNF 才能发挥对缺氧损伤神经元的保护作用。

### 3.3 BDNF 通过 PI3K/Akt 信号途径激活自噬, 达到对 OD 神经元的保护作用

自噬的关键启动位点 mTOR 是 PI3K/Akt 信号通路的下游靶点, 本课题组已证实 BDNF 通过 PI3K/Akt 信号途径对缺氧 (oxygen deprivation, OD) 神经元有确切保护作用。

BDNF 与 TrkB 结合后, 能启动 PI3K/Akt 传导通路, 激活的 PI3K 促进质膜上产生第二信使 3、4、5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PtdIn-3, 4, 5P3), 与 Akt 结合后产生 AktSer308 位点磷酸化<sup>[7]</sup>。磷酸化的 Akt 继续导致下游 mTOR473 位点的磷酸化。mTOR 激酶是氨基酸、ATP 和激素的感受器, 也是自噬的负调控分子。哺乳动物细胞中, 核糖体蛋白质 s6 (p70s6k) 也抑制自噬的发生, 它位于 mTOR 信号途径下游, 其活性受 mTOR 正向调节<sup>[8]</sup>。于是, 进一步观察了 BDNF 对磷酸化 Akt/mTOR/p70S6 以及 LC3II 表达的影响。结果发现, 与对照比较, BDNF 可抑制 Akt/mTOR/p70S6 磷酸化的表达, 同时 LC3II 表达升高 (图 3 A, B)。

雷帕霉素 (rapamycin) 是为美国 FDA 批准适用于临床移植的免疫抑制剂, 通过抑制 mTOR 的活性, 使 Apg 13 去磷酸化, 抑制 p70S6 活性而诱导自噬发生<sup>[9]</sup>。不同 rapamycin 剂量呈现不同的效应, 如袁莉等<sup>[10]</sup>研究发现, 大鼠缺血前经脑室内注射 10 mmol/L 5 μL rapamycin, 可以减少缺血后皮层及海马细胞的丢失, 而 5 μg/mL 雷帕霉素对胶质瘤干细胞具有特异性的抗肿瘤效应<sup>[11]</sup>, 本实验结果显示, 300 nM 浓度的 rapamycin 对 OD 神经元有保护作用, 100~200 nM rapamycin 对 OD 神经元的保护作

用不明显(图 1),提示 rapamycin 发挥诱导自噬的功能与其浓度和靶细胞有关。此外,实验也发现 rapamycin 与 BDNF 对磷酸化 Akt/mTOR/p70S6 的调控趋势一致(图 3A,D),抑制 PI3K-Akt-mTOR 能促进自噬的发生,与已有的报道结果相似<sup>[12-13]</sup>。

加入自噬抑制剂 3-MA 后,BDNF 对 LC3II 的上调作用被抑制(图 3A,C)。这与预期的结果符合,从反面证明 BDNF 对 Akt/mTOR/p70S6 的作用被自噬抑制剂调控。但是,3-MA + BDNF 组的 p-mTOR, p-p70S6 较 BDNF 组更为下调。其可能的原因是:1) PI3K 存在 I, II, III 亚类,其中 PI3KIII 又被成为 hVps34(human vacuolar protein sorting 34),hVps34 的存在才能生成 PtdIn(3)P,继而形成 PtdIn-3,4,5P3 与 Akt 结合。而 3-MA 是 hVps34 的抑制剂,因此,3-MA 可以抑制 hVps34 而使下游 Akt/mTOR/p70S6 的磷酸化都下调。2)在 Vps34 基因敲除小鼠的细胞和组织上,仍然可以出现 GFP-LC3 的聚集<sup>[14]</sup>。并且,有研究表明 3-MA 对自噬的抑制还可以通过 class I PI3K<sup>[15]</sup>等 classIII PI3K 之外的途径。因此,3-MA 下调 p-mTOR, p-p70S6 与 3-MA 下调 LC3 并不矛盾。

综上,本实验结果提示,BDNF 对缺氧性脑损伤的神经保护作用与自噬有关,其信号传递途径之一经 PI3K/ Akt/mTOR/p70S6 来完成。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 邹峥,刘小惠,邹大卫. 缺氧缺血性脑损伤[J]. 实用儿科临床杂志,2011,26(18):1446-1449.
- [2] Chen AI, Xiong L, Tong YU, et al. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury[J]. *Biomedical Reports*, 2013, 1:167-176.
- [3] 马骄,俞丹,毛萌,等. 神经丝氨酸蛋白酶抑制剂对新生大鼠神经元损伤的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志,2010,27(24):1859-1861.
- [4] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. *Cell*, 2010, 140(3):313-326.
- [5] Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335:1-32.
- [6] Sun X, Zhou H, Luo X, et al. Neuroprotection of brain-derived neurotrophic factor against hypoxic injury invitro requires activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(3-4):363-370.
- [7] Zhu W, Nelson CM. PI3K signaling in the regulation of branching morphogenesis[J]. *Biosystems*, 2012, 109(3):403-411.
- [8] Geering B, Cutillas PR, Vanhaesebroeck B. Regulation of class IA PI3Ks, is there a role for monomeric PI3K subunits? [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 2):199-203.
- [9] LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations[J]. *Drug Resist Updat*, 2008, 11(1-2):32-50.
- [10] 袁莉,姚亚民,吕丹丹,等. Rapamycin 保护大鼠缺血性脑损伤和特定脑区神经新生有关[J]. 神经解剖学杂志,2011,27(3):263-270.
- [11] 沈亦雯,汤奇胜. 雷帕霉素对胶质瘤干细胞的特异性凋亡作用[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2010,4(5):578-582.
- [12] Wu YT, Tan HL, Huang Q, et al. Activation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway promotes necrotic cell death via suppression of autophagy[J]. *Autophagy*, 2009, 5(6):824-834.
- [13] Chen M, Du Y, Qui M, et al. Ophiopogonin B-induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(2):430-436.
- [14] Jaber N, Dou Z, Chen JS, et al. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(6):2003-2008.
- [15] Wu YT, Tan HL, Shui G, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(14):10850-10861.

收稿日期:2013-03-18

本刊网址:www. cjchc. net