

文章编号:1003-2754(2019)06-0509-04

Akt/mTOR 信号通路在氨甲酰促红细胞生成素促进脑梗死后神经发生作用的研究

李 洋, 闫保君

摘 要: **目的** 探讨 Akt/mTOR 信号通路在氨甲酰促红细胞生成素(carbamylated erythropoietin, CEPO)促进脑梗死后室管膜下区(subventricular zone, SVZ)神经发生的作用。**方法** 按随机数字表法将雄性小鼠分为 Sham 组、MCAO 组、CEPO 组和 GSK2141795(Akt 阻断剂)组。运用线栓法制作小鼠大脑中动脉闭塞模型。用改良的神经功能评分评价神经功能恢复状况。用 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)标记增殖细胞,巢蛋白(Nestin)标记神经干细胞,应用免疫荧光技术观察各组小鼠 SVZ 中 BrdU⁺/Nestin⁺细胞的表达情况,Western blot 技术测定各组小鼠 SVZ 内 p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达量的变化情况。**结果** GSK 组小鼠在各评估时间点神经功能评分分值较 CEPO 组显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 7 d, GSK 组小鼠 SVZ 中 BrdU⁺/Nestin⁺细胞数, p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达量较 CEPO 组显著减少($P < 0.05$)。**结论** CEPO 可促进脑梗死后 SVZ 内神经干细胞增殖,这一过程可能是通过 Akt/mTOR 信号通路完成的。

关键词: 氨甲酰促红细胞生成素; Akt/mTOR 信号通路; 室管膜下区; 脑卒中; 神经发生

中图分类号: R743.3 **文献标识码:** A

The role of Akt/mTOR signaling pathway in neurogenesis induced by carbamylated erythropoietin within subventricular zone after ischemic stroke Li Yang, YAN Baojun. (Department of Interventional Neuroradiology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of Akt/mTOR signaling pathway in neurogenesis motivated by carbamylated erythropoietin (CEPO) in the subventricular zone (SVZ) after cerebral ischemia. **Methods** Mice were divided into four groups at random: sham-operated mice treated with vehicle (Sham), middle cerebral artery occlusion (MCAO)-operated mice treated with vehicle (MCAO), MCAO mice treated with CEPO (CEPO), and MCAO mice treated with CEPO and Akt inhibitor GSK2141795 (GSK2141795). Mice were subjected to the MCAO model of ischemic stroke by thread-occlusion method. The neurological functional outcome of the mice was measured by modified neurological severity score (mNSS). Proliferative cells were labeled with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), and neural stem cells (NSCs) were labeled with Nestin. The number of BrdU⁺/Nestin⁺ in the SVZ was measured using immunofluorescence. The expression of p-Akt and p-mTOR in the SVZ was quantified by Western blot. **Results** GSK2141795 group showed markedly worse performance in the mNSS test than CEPO group ($P < 0.05$). GSK2141795 significantly reduced the number of BrdU⁺/Nestin⁺ cells and the expression of p-Akt and p-mTOR in mice than those in the CEPO group ($P < 0.05$). **Conclusion** CEPO may regulate neurogenesis in SVZ via Akt/mTOR signaling pathway after cerebral infarction.

Key words: Carbamylated erythropoietin; Akt/mTOR; Subventricular zone; Stroke; Neurogenesis

脑梗死是最常见的脑卒中类型(约占 80%),具有高病死率、高致残率、高复发率的特点。已有研究显示,哺乳动物大脑室管膜下区(subventricular zone, SVZ)的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在生理情况下处于相对静息状态,但在脑梗死后被激活,不断增殖分化为新生神经元,迁移至梗死灶附近,分化为成熟神经元修复受损脑组织^[1],提示 SVZ 神经发生或许是治疗脑梗死的关键靶点。

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)可促进脑梗死后神经功能恢复,但其存在增高血液黏滞度,诱

发血栓等副作用。氨甲酰促红细胞生成素(carbamylated erythropoietin, CEPO)是无生血功能的 EPO 衍生物,无诱发血栓生成等副作用,且具有和 EPO 相近的神经保护作用。已有文献证实,CEPO 可促进脑梗死后 SVZ 内 NSCs 增殖^[2],但具体机制尚不明确。Akt/mTOR 信号通路在中枢神经系统

收稿日期:2019-04-12;修订日期:2019-06-02

作者单位:(郑州大学第一附属医院神经介入科,河南 郑州 450000)

通讯作者:闫保君, E-mail:303035716@qq.com

内,与神经元、胶质细胞增殖及突触可塑性的调控密切相关。肿瘤学研究表明,CEPO 与其受体结合后激活 Akt/mTOR 信号通路,促进结肠癌细胞增殖^[3]。

本研究拟探讨 Akt/mTOR 信号通路在 CEPO 促进脑梗死后神经发生作用的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 CEPO (Warren Pharmaceuticals, 美国); GSK2141795 (Aktx 阻断剂, MCE, 美国); 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU, Sigma-Aldrich, 美国); 小鼠抗小鼠 nestin 抗体 (abcam, 美国); 兔抗小鼠 BrdU 抗体 (abcam, 美国); 兔抗小鼠 p-Akt 抗体 (abcam, 美国); 兔抗小鼠 p-mTOR 抗体 (abcam, 美国); Alexa Fluor[®] 488 标记的山羊抗小鼠二抗 (abcam, 美国); Alexa Fluor[®] 555 标记的驴抗兔二抗 (abcam, 美国); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (proteintech, 美国); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (proteintech, 美国)。

1.2 实验动物 成年雄性 C57BL/6 小鼠 85 只, 体重 25 ~ 30 g, 12 ~ 14 w 龄。根据完全随机数字表法分为 4 组: Sham 组 (18 只)、大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 组 (23 只)、CEPO 组 (20 只) 和 GSK 组 (24 只)。自模型成功后, CEPO 组和 GSK 组小鼠每天接受 CEPO 腹腔注射一次, 剂量为 8000 IU/kg, 连续 7 d; 将 GSK2141795 溶于 DMSO, 再用生理盐水稀释, 剂量为 10 μg/g, GSK 组小鼠自模型成功后隔天接受灌胃一次, 连续 7 d^[4]。给予 Sham 组和 MCAO 组等量生理盐水。在避光条件下, 将 BrdU 粉末溶于生理盐水, 浓度为 5 mg/ml。用于免疫荧光的小鼠于术后 1 d 开始, 连续 7 d 腹腔注射剂量为 50 mg/(kg · d) 的 BrdU 溶液^[5]。

1.3 MCAO 模型的制备 应用改良线栓法制作小鼠右侧 MCAO 模型。术前禁食禁水 12 h, 用 5% 水合氯醛 (7.0 ml/kg) 腹腔注射麻醉后, 取仰卧位固定。小鼠颈部备皮、消毒后, 取正中切口, 分离右侧颈总、颈外及颈内动脉。在距颈总动脉分叉约 2 mm 处剪一小口, 插入线栓至大脑中动脉起始端, 轻柔推进 8 ~ 10 mm, 结扎缝合。栓塞 1 h 后, 缓慢拔出线栓约 10 mm, 剪去体外线栓。MCAO 组、CEPO 组和 GSK 组小鼠均按上述方法制作 MCAO 模型。Sham 组小鼠将线栓插入至大脑中动脉起始端后迅速拔出, 其余操作同以上 3 组。

1.4 神经功能评定 参照改良神经功能评分法 (modified Neurological Severity Scores, mNSS)^[6],

分别在小鼠造模后第 1、7、14、28 天进行神经功能评价。从运动、感觉、平衡、反射 4 个方面对神经功能进行综合评估, 评分 12 ~ 16 分的小鼠进入实验。评分越高神经功能损害越严重, 0 分, 无神经损伤症状; 1 分, 有神经功能损害; 2 分, 神经功能损害最严重。

1.5 免疫荧光 每组随机抽取 6 只小鼠, 取脑组织进行免疫荧光检测。把 BrdU 作为细胞增殖标记物, nestin 作为神经干细胞标记物。用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 和 4% 多聚甲醛溶液灌注、固定各组小鼠, 取脑后将其放入 4% 多聚甲醛溶液中过夜固定。然后分别置于 10%、30% 蔗糖溶液脱水至脑组织沉底。冰冻后切成 20 μm 厚的脑片, PBS 中漂洗后, 放入 0.25% Triton X-100 溶液打孔 30 min。1% BSA 溶液封闭 30 min 后, 4 °C 孵育一抗过夜: 兔抗小鼠 BrdU 抗体 (1: 600), 小鼠抗小鼠 nestin 抗体 (1: 200)。PBS 漂洗脑片 3 × 10 min 后, 在室温下孵育 555 标记的驴抗兔二抗 (1: 400) 和 488 标记的山羊抗小鼠二抗 (1: 400) 1 h, 再用 PBS 漂洗, 在 400 倍荧光显微镜下观察、拍照^[7]。分别随机选取 SVZ 3 个不重叠视野, 每只小鼠至少选择 3 张脑片。应用 Image J (NIH) 图像分析软件计算每组 SVZ 增殖 NSCs 数。

1.6 Western blot 每组随机抽取 6 只小鼠, 在第 7 天用 Western blot 技术检测各组小鼠 SVZ 中 p-Akt 和 p-mTOR 的表达量。取小鼠梗死侧 SVZ 组织, 加入适量 RIPA、PMSF 和磷酸酶抑制剂。将组织置于冰上充分匀浆后离心 15 min (4 °C, 14000 r/min), 取上清液测定总蛋白含量, 分装保存于 -80 °C。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳, 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。室温下用 5% BSA 溶液封闭 1 h 后, 加入兔抗小鼠 p-Akt 一抗 (1: 600), 在 4 °C 下孵育过夜。用 TBST 漂洗 3 × 5 min, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h。洗涤 5 min, 把 PVDF 膜放入扫描仪内, 采用 ECL 显色, 观察、拍照, 用 Image J 分析所获取条带灰度。甘油酸-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 和 p-mTOR 一抗 (1: 800) 检测步骤同上^[8]。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件统计分析, 所有数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用重复测量和多因素方差分析比较各组间 mNSS 是否存在差异, 采用单因素方差分析比较各组间免疫荧光细胞计数及 Western blot 蛋白光密度值, 应用 LSD 检验进行组间比^[15]。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分 重复测量方差分析结果显示,CEPO组小鼠 mNSS 分值整体下降情况明显低于 MCAO 组和 GSK 组($P < 0.05$);MCAO 组和 GSK 组小鼠 mNSS 整体下降情况,差异无统计学意义($P > 0.05$)。单因素方差分析比较各组各个时间点差异(见表1)。

2.2 CEPO 显著促进小鼠 SVZ 内 NSCs 增殖 免疫荧光结果显示,术后 7 d,MCAO 组小鼠 SVZ 中 BrdU⁺/Nestin⁺ 细胞数较 Sham 组显著增多,且 CE-

PO 组 BrdU⁺/Nestin⁺ 细胞数较 MCAO 组和 GSK 组明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见图1、表2)。

2.3 CEPO 通过激活 Akt/mTOR 信号通路促进 SVZ 中 NSCs 增殖 术后 7 d,MCAO 组 p-Akt 和 p-mTOR 表达量较 Sham 组明显增加,CEPO 组的表达量较 MCAO 组明显增加,GSK 组的表达量较 CEPO 组显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见图2、表3)。

表1 各组小鼠 mNSS 差异(分, $\bar{x} \pm s$)

| 时间 | MCAO 组(n=6) | CEPO 组(n=6) | GSK 组(n=6) | F 值/ χ^2 | P 值 |
|------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|-------|
| 1 d | 13.310 ± 1.375 | 13.552 ± 1.903 | 13.670 ± 2.045 | 1.818 | 0.580 |
| 7 d | 12.742 ± 2.054 | 8.742 ± 2.517 | 12.223 ± 2.628 | 2.81 | 0.082 |
| 14 d | 10.742 ± 1.947* | 6.466 ± 2.623 | 11.017 ± 3.033* | 4.452 | 0.021 |
| 28 d | 9.134 ± 2.018* | 4.456 ± 2.097 | 8.743 ± 3.202* | 5.735 | 0.040 |

与 CEPO 组比较 * $P < 0.05$; Sham 组小鼠 mNSS 评分为 0

表2 各组小鼠 SVZ 中 BrdU⁺/Nestin⁺ 细胞(个, $\bar{x} \pm s$)

| Sham 组(n=6) | MCAO 组(n=6) | CEPO 组(n=6) | GSK 组(n=6) | F 值 | P 值 |
|---------------|------------------|-----------------|------------------|--------|-------|
| 5.500 ± 3.211 | 27.331 ± 8.991*# | 70.714 ± 10.066 | 30.653 ± 12.148# | 47.782 | 0.000 |

与 Sham 组比较 * $P < 0.05$; 与 CEPO 组比较 # $P < 0.05$

表3 各组小鼠 SVZ 中各蛋白光密度($\bar{x} \pm s$)

| 蛋白 | Sham 组(n=6) | MCAO 组(n=6) | CEPO 组(n=6) | GSK 组(n=6) | F 值 | P 值 |
|--------|---------------|-----------------|---------------|----------------|--------|-------|
| p-Akt | 0.414 ± 0.113 | 0.893 ± 0.120*# | 1.324 ± 0.145 | 0.803 ± 0.166# | 31.981 | 0.000 |
| p-mTOR | 0.215 ± 0.121 | 0.431 ± 0.145*# | 0.746 ± 0.166 | 0.435 ± 0.171# | 15.306 | 0.000 |

与 Sham 组比较 * $P < 0.05$; 与 CEPO 组比较 # $P < 0.05$

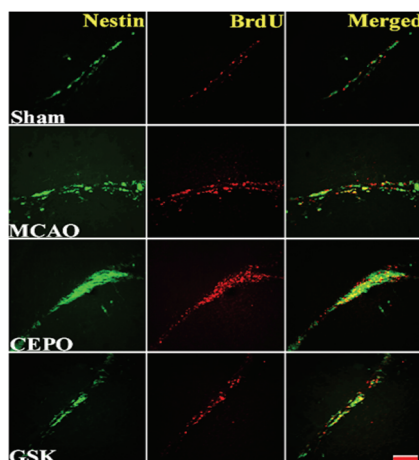


图1 各组小鼠 SVZ 中 BrdU⁺/Nestin⁺ 细胞(免疫荧光, ×400)

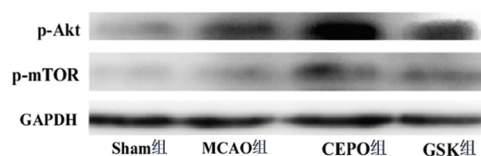


图2 各组小鼠 SVZ 中 p-Akt 和 p-mTOR 表达量

3 讨论

国内外研究证实,脑梗死后 SVZ 神经发生处于激活状态,促进神经发生可改善脑梗死病情,人为抑制神经发生会加剧神经功能损伤^[9]。成年哺乳动物脑 SVZ 内神经发生持续终生,在脑部创伤、脊髓损伤、脑组织缺血、脑出血等病理条件下,SVZ 神经发生激活,能够自我更新、存在高度分化潜能的内源性

NSCs 生成大量的新生神经元,后者沿血管网定向迁移至梗死区,通过参与免疫调节、局部血管新生并分化为成熟神经元替代或修复神经损伤。

EPO 通过与造血相关组织中 EPO 受体(EPOR)结合刺激红细胞增殖、分化与成熟。近来研究表明,EPOR 在许多细胞中均有表达,包括神经元、胶质细胞和血管内皮细胞,EPO 可通过促进血管发生、抑制炎症反应、抑制 NO 的合成、阻断谷氨酸兴奋毒性、抗氧化反应和细胞凋亡、增强神经突触信号传递、调节神经干细胞的增殖与分化等途径在缺血性脑血管疾病中发挥重要保护作用,改善脑梗死后神经功能预后^[10]。尽管如此,由于 EPO 促进红细胞生成,存在易导致红细胞增多症,增高血液黏滞度,改变血流动力学而诱发形成血栓等副作用,从而限制了 EPO 在脑梗死等疾病的临床运用。EPO 中的赖氨酸通过氨甲酰化反应转换为高瓜氨酸而形成 CEPO,后者是无生血功能的 EPO 衍生物,不与经典的 EPOR 结合,不刺激骨髓造血系统,无促红细胞生成和诱发血栓等副作用,且具有和 EPO 相近的神经保护作用。CEPO 作为一种神经保护剂,可促进脑梗死后 SVZ 内 NSCs 增殖,但其具体机制尚不明确。

Akt/mTOR 是公认的细胞内经典信号途径,参与细胞增殖、分化及凋亡等多种功能的调节。在中枢神经系统中,Akt/mTOR 信号通路与神经元、胶质细胞的增殖分化、突触的重塑、神经递质的信号传递、氧化应激以及自噬、凋亡的调控密切相关,在神经生理病理过程中发挥关键作用^[11]。Akt/mTOR 信号通路在受到外部刺激因素后被激活,Akt 活化后,mTOR 随之被激活,通过调节其下游的 p70S6K 和 4EBP1 管理基因编码和蛋白合成介导神经细胞增殖、发育分化、轴突再生、髓鞘形成以及突触重塑。本研究结果表明,脑梗死后上调了 SVZ 内 Akt 信号通路,mTOR 表达量升高,SVZ 神经发生比正常生理状态有所增强。使用 CEPO 后 SVZ 中 Akt 和 mTOR 表达量进一步升高,NSCs 增殖增强,促进脑梗死后神经功能恢复。而应用 Akt 选择性阻断剂 GSK2141795,抑制了 Akt 表达,并伴随有 mTOR 表达量的下降,抵消了 CEPO 对脑梗死的神经功能恢复作用。证明了脑

梗死后 CEPO 可能通过 Akt/mTOR 信号通路,产生促进 SVZ 内 NSCs 增殖的效应,进而改善神经功能。本研究探索了 CEPO 对脑梗死后 SVZ 内 NSCs 增殖的具体机制,为找到促进脑梗死后神经发生的潜在靶点提供了重要依据。

[参考文献]

- [1] Ruan L, Wang B, ZhuGe Q, et al. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke [J]. *Brain Research*, 2015, 1623: 166-173.
- [2] Li W, Yang Y, Hu Z, et al. Neuroprotective effects of DAHP and trip-tolide in focal cerebral ischemia via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR pathway activation [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2015, 9: 48.
- [3] Gaire BP, Song MR, Choi JW. Sphingosine 1-phosphate receptor subtype 3 (S1P3) contributes to brain injury after transient focal cerebral ischemia via modulating microglial activation and their M1 polarization [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 284.
- [4] Lie MEK, Gowing EK, Johansen NB, et al. GAT3 selective substrate l-isoserine upregulates GAT3 expression and increases functional recovery after a focal ischemic stroke in mice [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2017, 39(1): 74-88.
- [5] Zhang JC, Xu H, Yuan Y, et al. Delayed treatment with green tea polyphenol EGCG promotes neurogenesis after ischemic stroke in adult mice [J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(5): 3652-3664.
- [6] Ling L, Zhang S, Ji Z, et al. Therapeutic effects of lipo-prostaglandin E1 on angiogenesis and neurogenesis after ischemic stroke in rats [J]. *International Journal of Neuroscience*, 2016, 126(5): 469-477.
- [7] Simon FHP, Erhart P, Vcelar B, et al. Erythropoietin preconditioning improves clinical and histologic outcome in an acute spinal cord ischemia and reperfusion rabbit model [J]. *Journal of Vascular Surgery*, 2016, 64(6): 1797-1804.
- [8] Zhang SJ, Wang RL, Zhao HP, et al. MEPO promotes neurogenesis and angiogenesis but suppresses gliogenesis in mice with acute ischemic stroke [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 849: 1-10.
- [9] 满江, 王建平, 崔可飞, 等. 多奈哌齐对血管性痴呆大鼠室管膜下区神经发生相关因子 VEGF 和 IGF-1 的影响 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35(10): 900-903.
- [10] Liu XY, Zhou XY, Hou JC, et al. Ginsenoside Rd promotes neurogenesis in rat brain after transient focal cerebral ischemia via activation of PI3K/Akt pathway [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015, 36(4): 421-428.
- [11] Yang X, Geng KY, Zhang YS, et al. Sirt3 deficiency impairs neurovascular recovery in ischemic stroke [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2018, 24(9): 775-783.