维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)04－0489－04

磷脂酰肌醇－3激酶/Akt在体外神经干细胞存活和分化中作用的实验研究

王　爽[1],贾延劼[1],谢　鹏[1],牟　君[1],赵裕光[2],王运良[1],董为伟[1]

(重庆医科大学附属第一医院 1.神经内科;2.普外科,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨磷脂酰肌醇－3激酶/Akt信号途径在体外培养神经干细胞存活、分化中的作用。方法:分为对照组、wortmannin组和LY294002组;免疫组化检测Nestin、NSE和S100的表达;TUNEL评价细胞凋亡率;Western Blotting检测磷酸化Akt、Caspase－9的表达。结果:随着wortmannin和LY294002浓度增大,细胞凋亡率逐渐增加。随着wortmannin和LY294002浓度增大,磷酸化Akt的表达逐渐减弱。高浓度时磷酸化的Caspase－9表达减弱。结论:神经干细胞存活依赖于PI3K/Akt途径的活化,其机制可能是PI3K/Akt活化后,促进了Caspase－9等蛋白的磷酸化,抑制了细胞凋亡事件的发生。

【关键词】磷脂酰肌醇－3激酶(PI3K);Akt;神经干细胞;凋亡

【中国图书分类法分类号】R329.2＋7　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－10－17

The experimental study on phosphatidylinositol 3－kinase/Akt in neural stem cells in vitro

WANG Shuang, et al

(*Department of Neurology, The first Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the function of PI3K (phosphatidylinositol－3 kinase)/Akt signal pathway in proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs). *Methods*: Control group, wortmannin group and LY294002 group were randomly assigned. The expression of Nestin, NSE and S100 were detected by immunohistochemistry. The ratio of cell apoptosis was estimated by TUNEL staining and the expressions of phosphorylated Akt and Caspase－9 were detected by Western blotting. *Results*: With the increase in concentration of wortmannin and LY294002, the ratio of NSCs apoptosis increased. The results of Western blotting indicated that the expression of phosphorylated Akt decreased when the concentration of wortmannin and LY294002 increased. High concentration of wortmannin and LY294002 inhitited Akt phosphorylated. At the same time, the expression of phosphorylated Caspase－9 decreased. *Conclusion*: The survival of NSCs depends on the activation of PI3K/Akt pathway, but PI3K/Akt pathway may have little function in the differentiation of NSCs.

【Key words】Phosphatidylinositol 3－kinase (PI3K); Akt; Neural stem cells; Apoptosis

PI3K/Akt信号转导通路是近年来发的1条参与细胞增殖调控的重要信号通路,PI3K和Akt是该通路的中心环节。磷脂酰肌醇－3激酶(Phosphatidylinositol 3－kinase,PI3K)通过催化底物磷脂酰肌醇(PI)发生磷酸化而将活化信号传入细胞内。PI3K与多种不同的生物细胞活动有关,如增殖分化、细胞凋亡等[1,2]。近年研究发现,PI3K信号途径也参与了神经系统的发育、保护、记忆等多种生理功能[3],但是,对于该信号途径在神经干细胞的作用知之甚少。本研究在体外培养神经干细胞的基础上,利用PI3K的活化物质Akt及PI3K特异性抑制剂wortmannin、LY294002作为研究指标,初步探讨PI3K/Akt信号途径在神经干细胞增殖分化中的作用。

1　材料和方法

作者介绍:王　爽(1976－　),女,博士生,
主要研究方向:神经干细胞基础及临床研究。

基金项目:国家自然基金资助项目(330370500),
中国博士后科学基金资助项目(2003033363),
重庆医科大学优秀博士学位论文科研经费资助。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 SD 大鼠 由第三军医大学大坪医院动物中心提供，新生清洁级。

1.1.2 主要试剂 EGF、bFGF、wortmannin、LY294002 购自 Sigma 公司；SP 试剂盒购自北京中山生物公司；Akt、Caspase-9 等磷酸化抗体购自 Santa Cruz 公司；Nestin、NSE、S100 等抗体购自 Neomarks 公司；末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)原位凋亡试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠神经干细胞培养 参照文献[4]。主要步骤为：无菌条件下取大鼠全脑，去除小脑，D-Hanks 液冲洗剪碎，0.25% 胰酶消化 15～20min，离心去除上清液，机械吹打成单细胞，以约 5×10^5/ml 的密度接种到完全培养基(Neurobasal 培养基 + B27 + 20ng/mlbFGF + 20ng/mlEGF)中，37℃，5%CO_2 条件下培养，6～7 天传代 1 次，方法同前。

1.2.2 神经干细胞分化及鉴定 将各组细胞，离心去上清，加入含血清培养基(Neurobasal 培养基 + 10% 胎牛血清)重新悬浮，接种于涂有 poly-L-lysine 的 6 孔培养板中，贴壁培养 48h。

将贴壁的细胞经 4% 的多聚甲醛固定 15min，PBS 洗 3 次，免疫组化染色参照说明书。一抗分别为 Nestin、NSE、S100 抗体(抗体滴度均为 1∶100)，同时作空白对照，DAB 显色。每张玻片采用双人双盲随机记数 200 个细胞，计算阳性细胞百分比例。

1.2.3 实验分组 分为对照组、wortmannin 组和 LY294002 组。wortmannin 组再随机分成 2 组(浓度分别为 5nmol/L、10nmol/L)。LY294002 组也随机分成 2 组(浓度分别为 2μmol/L、5μmol/L)。

1.2.4 TUNEL 检测 按原位检测凋亡细胞试剂盒说明书操作，滴加水溶性封片剂后，荧光显微镜观察。同样每张玻片采用双人双盲随机记数 200 个细胞，计算凋亡细胞百分比例。

1.2.5 Western Blotting 参考 Lin 的方法，略改进[7]。收集各组细胞，以冰冷的 HBII 缓冲液与细胞一起加入 EP 管中，超声粉碎，4℃、10000g 离心 15min，收集上清蛋白质样本，测定蛋白质含量，贮于 -70℃ 备用；取 50～100μg 蛋白在质量浓度 100g/L 的 SDS-PAGE 胶中电泳；之后将蛋白质在电转移电泳槽中以 4℃、200mA 下进行转移 1h 转至 PVDF 膜；取出膜后用质量浓度 50g/L 脱脂牛奶/PBS 封闭，在室温下振摇 1h，以阻断非特异性结合；将 PVDF 膜以仔细洗 4 次，置于杂交袋中，再加入以 PBS 稀释的各种 Akt、Caspase-9 抗体(1∶500～1000)，4℃ 孵育过夜；反应完后羊抗小鼠过氧化物酶抗体(1∶1000)温育 1h，用 ECL 化学发光试于暗室自显影。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学处理；所有数据用($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较用 t 检验。

2 结 果

2.1 神经干细胞形态学变化

细胞在无血清培养基中悬浮生长，细胞最初形成由两三个细胞组成的小细胞团，随培养时间的增加，细胞团逐渐增大、增多，7 天时生长为数十个细胞到数百个细胞的细胞团，形态规则，折光性强(图 1)。

无论 wortmannin 组还是 LY294002 组，随着浓度增大，神经干细胞的形态变化逐渐明显。低浓度时(wortmannin 浓度为 5nmol/L、LY294002 浓度为 2μmol/L)，神经干细胞形态变化与空白对照组相比变化不明显。但是高浓度时(wortmannin 浓度为 10nmol/L、LY294002 浓度为 5μmol/L)，细胞团开始分散，折光性差，呈现明显的退化状态。

2.2 神经干细胞分化

细胞贴壁后，开始从细胞团边缘伸出突起，随时间的推移，突起越来越长。原有的细胞团逐渐消失。免疫组化染色发现，神经干细胞标记抗体 Nestin 阳性细胞(图 2)，NSE 和 S100 阳性细胞(图 3，图 4)，说明神经干细胞具有多种分化潜能。

无论 wortmannin 组还是 LY294002 组，随着浓度增大，对神经干细胞形态学影响明显，细胞核呈棕黄色的凋亡细胞较对照组增多(图 5)。但是将存活的各组细胞接种后，分化方式基本相同，而且分化后细胞 NSE、S100 的表达无显著性差异($P>0.05$，图 6)。

2.3 TUNEL 检测

随着 PI3K 特异性抑制剂浓度增大，神经干细

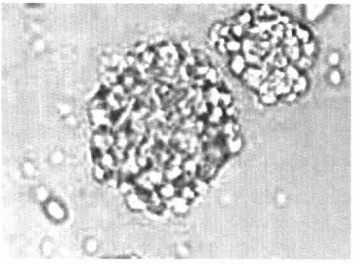


图 1 培养 7d 的神经干细胞 (200×)

维普资讯 http://www.cqvip.com

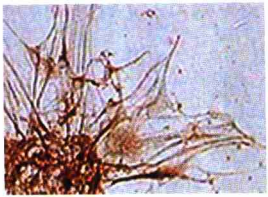


图 2 培养 7d 的神经干细胞 (Nestin 染色,200×)

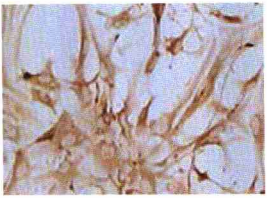


图 3 神经干细胞诱导分化 (NSE 染色,200×)

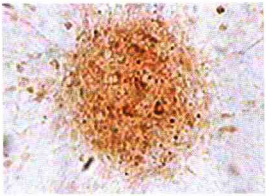


图 4 神经干细胞诱导分化 (S100 染色,100×)



图 5 LY294002 组凋亡细胞 (100×)

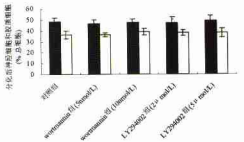


图 6 神经干细胞分化结果

胞凋亡率也逐渐增加。低浓度时(wortmannin 和 LY294002 浓度分别为 5nmol/L、2μmol/L),神经干细胞凋亡率与对照组无显著性差异($P>0.05$);高浓度时(wortmannin 和 LY294002 浓度分别为 10nmol/L、5μmol/L),神经干细胞凋亡率与对照组、低浓度组有显著性差异($P<0.05$)。但是,wortmannin 组和 LY294002 组之间无显著性差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1 TUNEL 检测结果

组 别	细胞凋亡率(%)
对照组	20.6±2.3
wortmannin(5nmol/L)	22.6±5.1*
wortmannin(10nmol/L)	31.8±6.0▲
LY294002(2μmol/L)	23.5±4.2*
LY294002(5μmol/L)	34.2±6.2▲

与对照组比较:*$P>0.05$ ▲$P<0.05$

2.4 Western Blotting

随着 PI3K 特异性抑制剂浓度增大,磷酸化 Akt 的表达逐渐减弱,但是 AKT 的表达却无显著性变化,说明 wortmannin 和 LY294002 都可以抑制 Akt 的磷酸化(图 7,8)。

当高浓度的 wortmannin (10nmol/L) 和 LY294002(5μmol/L),抑制了 Akt 磷酸化,与此同时,磷酸化的 Caspase-9 表达减弱,同样 caspase-9 的表达无显著性变化,说明 wortmannin 和 LY294002 可以抑制 Caspase-9 的磷酸化(图 9)。

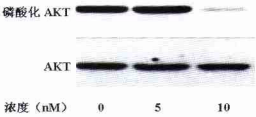


图 7 wortmannin 抑制 AKT 的磷酸化量效关系

维普资讯 http://www.cqvip.com

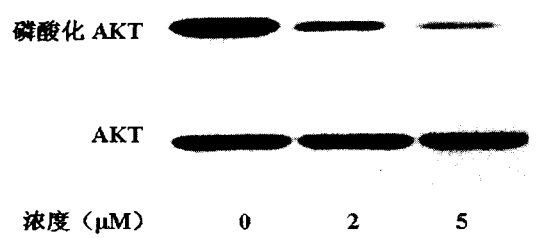


图 8 LY294002 抑制 AKT 的磷酸化量效关系
对照组 wortmannin 组 LY294002 组

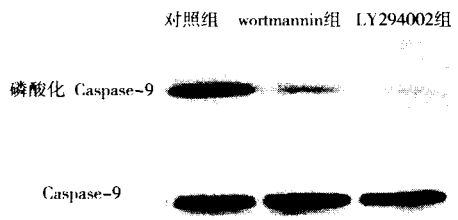


图 9 Western Blotting 结果

3 讨 论

PI3K 是催化肌醇磷脂肌醇环上 3 位羟基磷酸化，生成各种 3－磷酸脂肌醇磷脂，包括 PI－3－P、PI－3,4－P2 和 PI－3,4,5－P3。Akt 是一种 PKC 相关的丝氨酸/苏氨酸激酶，也称蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)，有连接酪氨酸磷酸化和丝/苏氨酸激酶磷酸化的作用，是 PI3K 的主要下游靶目标，其激酶结构域与 PKA 和 PKC 都有约 70% 的同源性。它可以被许多生长因子激活，参与多条信号转导途径[1,2]。其中，生长因子与受体结合后，可通过 Scr 同源性(SH)结构域与 PI3K 的 P85 位点结合，PI3K 进而激活 3－磷酸肌醇依赖性蛋白激酶－1(PDK－1，即 PKB 激酶－1)，PDK－1 能使 Akt 丝氨酸(Ser473/474)磷酸化，引起下游靶基因的变化，后者使 Akt 磷酸化全部激活。Akt 激活后可激活核糖体 S6 激酶(P70S6K)，促进蛋白质合成及细胞增殖，Akt 也可促进 Bcl－2 表达，阻止细胞凋亡。因此，Akt 磷酸化可以作为衡量 PI3K 活性的指标[5,6]。

wortmannin 和 LY2940002 都是 PI3K 特异性抑制剂。其中 wortmannin 最初由 Penicillium-wortmannii 分离得到的，抑制 PI3K 活性的 IC50 为 4.2nmol/L；LY294002 是一种人工合成的更特异的 PI3K 抑制剂，虽然 IC50 高达 1.4μmol/L，但是比 wortmannin 稳定[7]。本研究根据这两种药物的 IC50 设计的不同浓度对 PI3K 的影响，呈剂量依赖性。从 Western Blotting 结果可知，低浓度的 wortmannin(5nmol/L)和 LY2940002(2μmol/L)对 PI3K 活性，即 Akt 磷酸化影响较小，而高浓度的 wortmannin 和 LY2940002 可以显著抑制 Akt 磷酸化。与此同时，随着浓度增大，神经干细胞的形态变化逐渐明显，凋亡率也呈剂量依赖性的增加，提示 PI3K/Akt 途径的活化程度与体外神经干细胞的存活可能有一定联系。

本研究进一步发现，阻断 Akt 磷酸化后，下游的 Caspase－9 等蛋白的磷酸化显著减少。众所周知，神经干细胞体外培养多采用添加生长因子(如 EGF、bFGF 等)的方法维持细胞生长、增殖和分化[8]。这些生长因子与受体结合后，使 Akt 磷酸化，活化后的 Akt 能够促进 Caspase－9 磷酸化，导致 Caspase－9 失活，最终使细胞存活。这是体内主要的抗凋亡信号转导途径之一[9,10]。因此，本研究提示神经干细胞存活依赖于 PI3K/Akt 途径的活化，其机制可能是 PI3K/Akt 活化后，促进了 Caspase－9 等蛋白的磷酸化，从而抑制了细胞的凋亡。

Barnabé－Heider 等研究认为，神经营养因子通过自分泌或旁分泌调节 PI3K/Akt 途径，维持神经前体细胞的存活，另一条激酶通路 MEK－ERK 途径也参与这一调控过程，同时还参与了神经前体细胞的诱导分化[11]。这一结果与本研究类似。

通过 wortmannin、LY294002 等阻断 PI3K 活化后，对于神经干细胞诱导分化为神经细胞和神经胶质细胞并没有显著影响。因此，本研究提示 PI3K/Akt 途径可能在神经干细胞的诱导分化中的作用甚微。

参 考 文 献

[1] Cantley LC. The phosphoinositide 3－kinase pathway [J]. Science, 2002; 296(5573): 1655－1657.

[2] Manning BD, Cantley LC. The tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3－kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin signaling [J]. Biochem Soc Trans, 2003; 31(3): 573－578.

[3] Rodgers EE, Theibert AB. Functions of PI 3－kinase in development of the nervous system [J]. Int J Dev Neurosci, 2002; 20(3－5): 187－197.

(下转第 496 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

膜细胞,可见 COX－2 表达被显著抑制。表明亚硒酸钠可能通过抑制 COX－2 而有效地防治糖尿病肾病的发生发展。

参 考 文 献

[1] Juliane, Vucadinovic Mario, Rehm Margot, et al. COX－2 and osteopontin in cocultured platelets and mesangial cells: Role of glucocorticoids[J]. J. Kidney Int, 2000; 57(6): 2229－2238.

[2] Reddi Alluru S, Bollineni, Jaya S, et al. Selenium－deficient induces renal oxidative stress and injury via TGF－[beta] 1 in normal and diabetic arts[J]. J. Kidney Int, 2001; 59(4): 1342－1353.

[3] Makita Z, Vlassara H, Ceramic A, et al. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo[J]. J Boil Chem, 1992; 267: 5133－5138.

[4] Feng L, Sun W, Xia Y, et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression[J]. J. Arch. Biochem. Biophy., 1993; 307(2): 361－368.

[5] Kiritoshi Shinsuke, Nishikawa Takeshi, Sonoda Kazuhiro, et al. Hyperglycemia－Induced Reactive Oxygen Species through the Mitochondrial Electron Transport Chains Induce the Expression of Cyclooxygenase－2 Gene in Human Mesangial Cells[J]. J. Diabetes, 2002; 51(2): A184.

[6] Khan Kanwar Nasir M, Paulson Susan K, Verburg Kenneth M, et al. Pharmacology of cyclooxygenase－2 inhibition in the kidney[J]. J. Kidney Int, 2002; 61(4): 1210－1219.

[7] Harris Cynthia J, Brater D, Craig. Renal effects of cyclooxygenase－2 selective inhibitors[J]. J. Nephropathy and Hypertension, 2001; 10(5): 603－610.

[8] Sheng XQ, Huang KX, Xu HB, et al. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus [J]. J. Biol Trace Elem Res, 2004; 99(1－3): 241－254.

[9] Neve Jean, Xu Xue－Ming, Carlson Bradley A, et al. Selenium as a 'nutraceutical': how to conciliate physiological and supra－nutritional effects for an essential trace element[J]. J. Clin Nutr and Meta Care, 2002; 5(6): 659－663.

[10] Ersoz G, Yakaryilmaz A, Turan B, et al. Effect of sodium selenite treatment on platelet aggregation of streptozotocin－induced diabetic rats[J]. J. Thromb Res, 2003; 111(6): 363－367.

[11] Battell ML, Delgatty HLM, Mcneill JH, et al. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rat[J]. J. Mol Cell Biochem, 1998; 179: 27－34.

[12] Douillet C, Tabib A, Bost M, et al. A selenium supplement associated or not with Vitamin E delays early renal lesions in experimental diabetes in rats[J]. J. Proc Soc Exp Biol Med, 1996; 211: 323－331.

[13] 倪银星. 硒与糖尿病[J]. 重庆医科大学学报, 2002; 27(3): 366－368.

[14] 张玉洪, 肖 谦. 单核苷酸多态性在研究糖尿病微血管病变易感基因中的应用[J]. 重庆医科大学学报, 2004; 29(1): 18－20.

(上接第 492 页)

[4] 贾延劼, 杨于嘉, 宋建辉, 等. 新生大鼠神经干细胞的分离培养[J]. 中国当代儿科杂志, 2002; 4(2): 81－84.

[5] Lin CH, Yeh SH, Lu KT, et al. A role for the PI－3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala[J]. Neuron, 2001; 31(1): 1－20.

[6] Edstrom A, Ekstrom PA. Role of phosphatidylinositol 3－kinase in neuronal survival and axonal outgrowth of adult mouse dorsal root ganglia explants[J]. J Neurosci Res, 2003; 74(5): 726－735.

[7] Walker EH, Pacold ME, Perisic O, et al. Structural determinants of phosphoinositide 3－kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine[J]. Mol Cell, 2000; 6(4): 909－919.

[8] Villa A, Snyder EY, Vescovi A, et al. Establishment and properties of a growth factor－dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS[J]. Exp Neurol, 2000; 161(1): 67－84.

[9] Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell－intrinsic death machinery[J]. Cell, 1997; 91(2): 231－241.

[10] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase－9 by phosphorylation[J]. Science, 1998; 282(5392): 1318－1321.

[11] Barnabé－Heider F, Miller FD. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways[J]. J Neurosci, 2003; 23(12): 5149－5160.