

·基础研究·

PI3K-AKT 通路对脑缺血损伤神经干细胞的增殖作用*

崔晓萍¹ 陈建梅² 穆军山¹ 叶建新¹ 林敏¹ 赵文龙¹ 翁婧¹ 林航^{1,3}

摘要

目的:利用低氧干预分离的小鼠神经干细胞,通过构建腺病毒载体将腺病毒5-丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶3(Ad5-AKT3)基因和丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶3小干扰RNA(AKT3 siRNA)干扰转染至缺血神经干细胞,探索磷酸肌醇三磷酸激酶-丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(PI3K-AKT)通路对缺血性神经干细胞的增殖作用。

方法:取新生24h昆明小鼠海马,分离培养原代神经干细胞,并采用巢蛋白(Nestin)免疫荧光检测和5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)渗入实验对其进行鉴定;将所培养的传代神经干细胞随机分组:正常组、缺血模型组、低氧组(低氧+缺血模型组)、Lip2000组(低氧+缺血模型组+Lip2000空转染组)、AKT转染组(低氧+缺血模型组+Ad5-AKT3转染组)、AKT干扰组(低氧+缺血模型组+Lip2000+AKT3 siRNA干扰组)。建立脑缺血损伤的体外模型,低氧干预,构建腺病毒Ad5-AKT3载体和AKT3 siRNA后,各组行MTT检测;RT-qPCR检测AKT3 mRNA表达情况;Western Blot检测PI3K、AKT3、PCNA。

结果:通过免疫荧光检测Nestin鉴定神经干细胞球,在荧光显微镜下观察到绿色明亮且典型的细胞球,球内可见清晰结构;渗入BrdU免疫荧光检测可见整个着色细胞球。MTT OD值和RT-qPCR检测AKT3 mRNA均显示,与正常组相比,模型组和AKT干扰组下降($P < 0.05$),其余各组均升高($P < 0.05$),其中低氧组和Lip2000组之间无明显差异($P > 0.05$)。与模型组相比,除AKT干扰组下降外($P < 0.05$),其余各组均升高($P < 0.05$)。Western Blot检测PI3K、AKT3、PCNA蛋白表达与正常组相比,模型组和AKT干扰组表达量减少($P < 0.05$),低氧组、Lip2000组和AKT转染组均增加($P < 0.05$),其中AKT转染组差异最明显($P < 0.01$)。

结论:PI3K-AKT信号通路在低氧干预下有效促进神经干细胞的增殖过程。

关键词 PI3K-AKT信号通路;神经干细胞;腺病毒AKT载体;AKT干扰

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-02-0154-06

The role of PI3K-AKT pathway in proliferation of neural stem cell after cerebral ischemia injury/CUI Xiaoping, CHEN Jianmei, MU Junshan, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,31(2): 154—159

Abstract

Objective: Using low oxygen intervention in the separation of neural stem cells in mice, by constructing adenovirus vector Ad5 - AKT3 gene and AKT3 siRNA interference transfection to ischemia neural stem cells, to determine the role of PI3K - AKT pathway effect on in ischemic neural stem cell proliferation.

Method: Twenty-four hours Kunming mice's hippocampus was isolated. The original generation of neural stem cells were cultured, identifying by the Nestin immunofluorescence test and Brdu infiltration experiments. Passage neural stem cell randomly assigned to normal group, model group, ischemia and hypoxia group (low oxygen + ischemia model group), Lip2000 group (low oxygen + ischemia model + Lip2000 empty transfection

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.02.006

*基金项目:南京军区医药卫生科研基金(12MA100)

1 福建医科大学附属教学医院南京军区福州总医院神经内科,福州,350025; 2 南京军区福州总医院骨科; 3 通讯作者
作者简介:崔晓萍,女,主治医师; 收稿日期:2014-10-23

group), AKT transfection group (low oxygen + Ad5-AKT3 transfection group + ischemia model group), AKT interference group (low oxygen + Lip2000 + ischemia model group + Akt3 siRNA interference group). After establishment of *in vitro* model of cerebral ischemia injury, low oxygen intervention, constructing adenovirus Ad5 - AKT3 carrier and AKT3 siRNA, each group was determined by MTT detection, RT - qPCR; and Western Blot detection of PI3K, AKT3 and PCNA.

Result: neural stem cells are identified by immunofluorescence test of Nestin, Typical cell balls with green bright and its clear structure were observed under fluorescence microscope. Infiltration of Brdu immune fluorescence detected the entire staining cells. Determined by MTT OD value and RT-qPCR detection and comparing with normal group, AKT3 mRNA in model group and AKT interference group decreased ($P < 0.05$), the rest of the groups increased ($P < 0.05$). There is no significant difference ($P > 0.05$) between the low oxygen group and Lip2000 group Comparing with model group, except falling in AKT interference group ($P < 0.05$), the other groups increased ($P < 0.05$). Comparing with normal group, PI3K, AKT3, PCNA protein expression, decreased in model group and AKT interference group ($P < 0.05$), increased in low oxygen group, Lip2000 group and AKT transfection group ($P < 0.05$)., including Among those, AKT transfection group increased most obviously ($P < 0.01$).

Conclusion: Low oxygen promotes neural stem cells proliferation effectively through PI3K - Akt signaling pathway.

Author's address Department of Neurology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Army Command, Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, 350025

Key word PI3K - AKT pathway; neural stem cells; adenovirus AKT carrier; AKT interference

神经干细胞是一类存在于中枢神经系统内具有高度增殖、自我更新及分化能力,在一定条件下能不断进行有丝分裂并分化成神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞的原始母细胞。基于神经干细胞上述良好特性,神经干细胞移植研究取得了重要进展,在缺血缺氧性脑病^[1-2]、阿尔茨海默病^[3]、帕金森病^[4]、癫痫^[5]、脊髓损伤^[6]、多发性硬化症^[7]方面均表现出了它的良好潜能。在中枢神经损伤后,这些干细胞在不同程度上发生增殖反应,表明成体神经干细胞仍保持潜在的修复神经的能力。如果中枢神经发生疾病或损伤后,这些神经干细胞能够根据机体修复需要,充分增殖并分化为目标靶细胞,那么将是有效克服上述难题的理想途径。然而,这种自发条件下的修复反应是如此的微弱,远不能满足神经再生的需求,以至于在过去相当长一段时间内受到研究人员及医学者忽视。如果能揭开神经干细胞增殖的机制,我们将可以采取有效措施,促进神经干细胞对增殖信号作出积极反应,使内源性神经干细胞的优越性得到充分发挥。

磷酸肌醇三磷酸激酶-丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3-OH kinase-RAC- α serine/threonine-protein kinase, PI3K-AKT)信号通路

广泛存在于细胞中,是细胞内重要信号通路之一,通过影响下游多种效应分子的活化状态,对细胞增殖、分化、蛋白质合成进行调控,在细胞生长、增殖过程中发挥重要作用^[8]。Shioda等^[9]研究发现,磷酸肌醇三磷酸激酶-丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphatidylinositol 3-OH kinase-RAC- α serine/threonine-protein kinase-mammalian Target of Rapamycin, PI3K-AKT-mTOR)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)的增强剂——钒化合物可以促进脑缺血后神经干细胞增殖,表明通过加强PI3K-AKT-mTOR基因表达水平,可以促进神经干细胞的增殖。因此,我们认为不同刺激因素可以通过PI3K-AKT这一共同通路来促进神经干细胞增殖,PI3K-AKT可能是神经干细胞增殖的共同通路之一。

于是,本研究通过低氧干预神经干细胞,模拟缺血性脑卒中建立缺血神经干细胞模型,采用腺病毒重组AKT3转染和AKT3 siRNA干扰分别增强和沉默AKT3的表达,探索PI3K/AKT信号通路在缺血性神经干细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物选用新生24h的昆明小鼠。

试剂:改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Media/Nutrient Mixture F-12, DEME/F12)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2-deoxyUridine, Brdu)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、碱性成纤维细胞生长因子(basicity Fibroblast Growth Factor, bFGF)、表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)、磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffer Saline, PBS)、鼠抗巢蛋白(Nestin)、兔抗Brdu、羊抗小鼠异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT)、胰蛋白酶、胎牛血清、穿梭质粒pDC316(AdMax系统的腺病毒载体穿梭质粒)、转染试剂Lipofectamine2000、兔抗PI3K、AKT3、增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)、抗兔二抗均购于福州沃森生物试剂有限公司;AKT3引物购于上海生工生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠神经干细胞分离与培养:取新生24h昆明小鼠,断头取脑后置D-Hank液中,于低倍显微镜下分离出完整海马组织,用眼科剪将海马组织剪碎成糊状,经200目不锈钢筛网研磨过滤后,离心。加入DMEM/F12(1:1)培养基,内含bFGF(20ng/ml)、EGF(20ng/ml)、1% B27。细胞置于37℃,饱和湿度,5% CO₂培养箱中培养,第3天半量换液1次。第5—7天机械分离形成的神经球进行传代。

1.2.2 神经干细胞的鉴定:①取部分传代细胞,以每孔0.5ml接种24孔板内(已包被多聚赖氨酸),培养4d;②吸去培养基,PBS洗3次,5min/次;③4%多聚甲醛室温固定30min,PBS洗3次,5min/次;④0.3% Triton-X100室温破膜处理20min,PBS洗3次,5min/次;⑤5%正常羊血清37℃封闭30min;⑥倾去液体,加入1:80稀释的Nestin一抗,4℃过夜,PBS洗3次,5min/次;⑦加入1:80稀释的FITC标记的羊抗小鼠IgG-FITC,常温下避光作用2h,PBS洗3次,5min/次;⑧干燥后封片,荧光显微镜观察细胞并照相。

1.2.3 Brdu渗入实验:在传代2次的神经干细胞中加入终浓度为5μmol/L的Brdu继续培养3d。①取部分传代细胞,以每孔0.5ml接种24孔板内(已包被多聚赖氨酸),贴壁2h;②用缓冲液PBS洗3次,4%多聚甲醛室温固定30min,再用PBS洗涤3次;③0.3% Triton-X100室温破膜后用,10%羊血清室温下封闭30min;④离心弃去液体,加入1:500稀释的Brdu一抗,4℃过夜,PBS洗3次;⑤加入1:100稀释的抗羊抗小鼠IgG-FITC,室温下避光反应2h,PBS洗3次;⑥干燥后封片,荧光显微镜下观察、照相。

1.2.4 神经干细胞分组:将所培养的传代神经干细胞按照随机数字表法分组:正常组、缺血模型组、低氧组(低氧+缺血模型组)、AKT转染组(低氧+缺血模型组+Ad5-AKT3转染组)、Lip2000组(低氧+缺血模型组+Lip2000空转染组)、AKT干扰组(低氧+缺血模型组+Lip2000+AKT3 siRNA干扰组)。

1.2.5 建立神经干细胞缺血缺氧模型:根据文献^[10],采用氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)法模拟在体缺血,细胞培养至第9—10d时,以无糖Earle氏液替代原培养液。Earle氏液放入缺氧罐中预平衡30min后,将培养板至于缺氧罐内,93%N₂+7%CO₂接缺氧罐的进气口,出气口外接水瓶。缺氧罐放于培养箱中至箱体温度与培养箱一致(37℃),缺氧罐内分上层、隔层和下层,上层用来放置细胞和用以燃烧耗尽O₂的蜡烛;隔层可模拟正常的CO₂培养箱;下层盛超纯水维持罐体内合适湿度。通入93%N₂+7%CO₂的混合气体30min,关闭缺氧罐进口并置于培养箱内3h以模拟脑缺血缺氧状态。

1.2.6 构建腺病毒Ad5-AKT3载体:①传代神经干细胞接种于24孔板中,每孔5×10⁵个细胞,培养基为DMEM+10% Hyclone胎牛血清,置37℃含5% CO₂的培养箱中培养过夜;②取穿梭质粒pDC316-AKT3,用Lipofectamine2000脂质体按其所附说明书进行转染;③待大部分病变细胞从底部脱落后,收毒;④病毒转染神经干细胞,取上清进行PCR鉴定检测AKT3表达情况。

1.2.7 AKT3 RNA干扰(RNAi)技术:于转染前一天进行细胞计数,将待转染的处于对数生长期的神经干细胞转移至24孔细胞培养板中,控制各孔细胞生长密度使其在转染当天密度接近80%。①将神经

干细胞铺板在 0.5ml 不含抗生素含 PBS 的正常生长的细胞培养基中;②用 50 μ l OPTI-MEMI 培养基稀释 1 μ l—3 μ l 转染试剂 Lipofectamine2000 试剂,将 Lipofectamine2000 轻轻混匀,室温温水浴 5min;③使用 50 μ l 不含 OPTI-MEMI 培养基稀释 0.8 μ g—1.0 μ g DNA;④混合由第 3 步稀释的 DNA 和由第 2 步稀释的 Lipofectamine 2000,将此混合物在室温条件下保温 20min;⑤直接将以上复合物(100 μ l)加入到 24 孔细胞培养板的孔中,轻轻摇动培养板,使其混匀,在 37 $^{\circ}$ C, 5%的 CO₂ 孵箱中保温 48h;⑥使用荧光蛋白发光计数法来鉴定各组神经干细胞细胞转染载体的转染效率,转染 24h 后,在荧光显微镜观察下计数每个随机视野内发绿色荧光的细胞数,并统计发绿色荧光的细胞占观察到的细胞总数的百分比率,即为转染总效率;⑦在细胞中加入复合物 48h 后,将神经干细胞细胞传代至新鲜培养基中以备下一步实验。

1.2.8 低氧干预:在低氧条件下培养,把 Thermo Forma 孵箱的氧浓度调整为 1%,其他培养条件按常规进行。

1.2.9 MTT 检测:各组神经干细胞接种至细胞含量为 10⁵/ml 的 96 孔板,每孔接种 100L,每组设 3 个复孔,做好分组标记。每孔加入已过滤除菌的 MTT (5mg/ml, pH 7.4) 20 μ l, 室温孵育 4h, 去培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 轻轻震荡 10min 充分溶解结晶。酶联免疫检测仪 570nm 波长检测各孔光吸收值(OD 值), 记录分析结果。

1.2.10 RT-qPCR 法检测 AKT3 的基因表达:消化收集神经干细胞, 加入 1ml Trizol 裂解 RNA, 加 0.2ml 氯后吸取上层无色水相, 加等体积异丙醇沉淀 RNA, 用 1ml 75%乙醇清洗异丙醇, 开盖干燥 5min 去掉残留乙醇, 用 RNase-free Water 20 μ l 溶解 RNA, 检测 RNA 浓度计算 RNA 体积, 按照逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA 待用。根据荧光定量试剂盒说明书加样, AKT3 引物序列为:

F:CCUGGGUCAAGAAGUCAATT,
R:UUGACUUCUUUGACCCAGGTT;
GAPDH 引物序列为:
F:ACTGGCATTGTGATGGACTC,
R:CAGCACTGTGTTGGCATAGA;

然后在 Sofeware 7500 fast 荧光 PCR 仪上运行, 采集荧光 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 值, 统计分析。

1.2.11 Western blot 法检测各指标蛋白的表达:消化收集神经干细胞, 加 1ml 裂解缓冲液, 静置 30min, 取上清, 4 $^{\circ}$ C 离心, 13000r/min, 5min, 吸取上清, 取 100 μ l 待测样品加入 25 μ l 上样缓冲液变性, SDS-PAGE 电泳并转膜后, 5%脱脂奶粉将取出的 PVDF 膜封闭 2h 分别加抗 PI3K、AKT3、PCNA、 β -actin (1:1000) 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入相应二抗 (1:5000) 室温 60min, 避光配置显色液并覆盖 PVDF 膜, 在图像扫描仪运行 Image-lab 软件并进行分析。

1.3 统计学分析

用 SPSS 16.0 进行数据统计分析, 数据采用均值 \pm 标准差表示, 计量资料方差分析。

2 结果

2.1 神经干细胞观察

将 24h 昆明小鼠海马组织的单细胞悬浮于神经干细胞培养基中生长, 接种于培养瓶中观察。第 3 天出现立体感强且折光好的神经球, 神经球的体积和数目随着时间的推移不断增加(见图 1A)。机械吹打神经球进行传代形成下一代神经球(见图 1B)。

2.2 神经干细胞鉴定

通过免疫荧光检测 Nestin 鉴定神经干细胞球, 在荧光显微镜下观察到绿色明亮且典型的细胞球, 球内可见清晰结构(见图 2A)。渗入 Brdu 免疫荧光检测可见整个着色细胞球(见图 2B)。

2.3 低氧干预对神经干细胞活性的影响

与正常组相比, 模型组和 AKT 干扰组 MTT 的 OD 值下降 ($P < 0.05$), 其余各组均升高 ($P < 0.05$), 其中低氧组、Lip2000 组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 除 AKT 干扰组下降外 ($P < 0.05$), 余各组均升高 ($P < 0.05$)。与低氧组相比, AKT 转染组明显增高 ($P < 0.05$), 而 AKT 干扰组明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

图 1 神经干细胞 (×100)

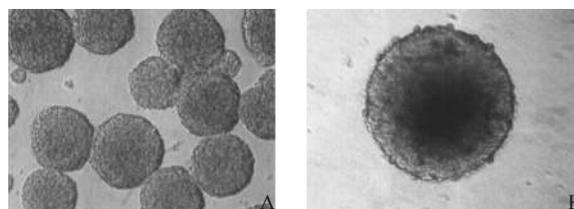
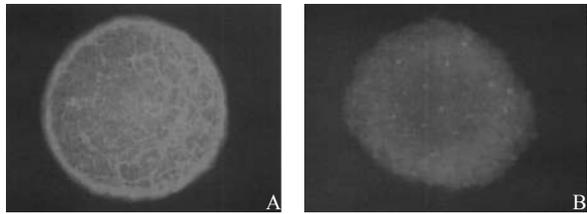


图2 神经干细胞鉴定 (组化染色, ×100)



2.4 神经干细胞中AKT3 mRNA的表达

与正常组相比,模型组和AKT干扰组MTT的OD值下降($P < 0.05$),其余各组均升高($P < 0.05$),其中低氧组和Lip2000组之间无明显差异($P > 0.05$)。与模型组相比,除AKT干扰组下降外($P < 0.05$),余各组均升高($P < 0.05$)。与低氧组相比,AKT转染组明显增高($P < 0.05$),而AKT干扰组明显降低($P < 0.05$)。见表2。

2.5 Western blot检测PI3K、AKT3和PCNA表达

PI3K、AKT3、PCNA蛋白表达与正常组相比,模型组和AKT干扰组表达量减少($P < 0.05$),低氧组、Lip2000组和AKT转染组均增加($P < 0.05$),其中AKT转染组差异最明显($P < 0.01$)。见图3。

3 讨论

缺血性脑损伤是目前严重危害人类健康的常见病之一,脑缺血后形成缺血中心区和半暗带区的梗

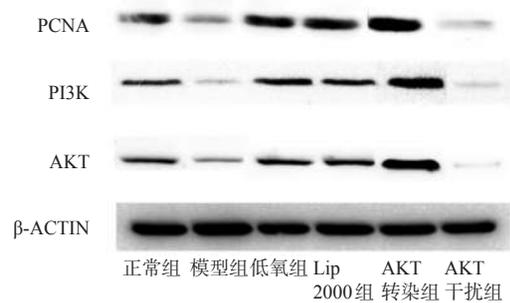
组别	MTT(OD值)
正常组	0.504±0.041
模型组	0.326±0.019 ^①
低氧组	0.724±0.012 ^{①②}
Lip2000组	0.748±0.025
AKT转染组	0.940±0.026 ^{①②③}
AKT干扰组	0.201±0.015 ^{①②③}

与正常组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$;与低氧组比较:③ $P < 0.05$

组别	Ct值(AKT3)	Ct值(GAPDH)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值
正常组	23.99±1.49	20.90±1.23	1
模型组	23.06±0.20	20.60±0.25	0.325±0.02 ^①
低氧组	22.16±1.20	21.60±0.84	0.537±0.13 ^{①②}
Lip2000组	22.33±0.67	21.71±0.60	0.541±0.16
AKT转染组	25.02±1.20	22.43±0.55	0.881±0.30 ^{①②③}
AKT干扰组	28.04±1.28	22.89±1.55	0.236±0.07 ^{①②③}

与正常组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$;与低氧组比较:③ $P < 0.05$

图3 Western Blot检测结果



死灶,缺血中心区神经元迅速变性坏死,无法恢复;而缺血半暗带区仍有一部分侧支循环为之供应血液,使该区域内的神经元保持不稳定的生理状态,这一区域内的神经元及时恢复血液供应有望恢复正常。因此,目前的治疗方法多以恢复缺血半暗带区的血液供应为目标,从而防止神经元进一步变性坏死,一定程度恢复脑功能。但这些治疗措施预后差,不能挽救缺血中心区的神经元,而近十年来,神经干细胞的发现,为缺血性脑损伤的治疗展现了美好的前景。为此我们必须搞清楚神经干细胞的提取与培养,以及神经干细胞的增殖机制。

海马是含有中枢神经内源性神经干细胞的组织之一,本研究发现从24h昆明小鼠中提取海马组织,在DMEM/F₁₂/N₂+EGF+bFGF培养基中培养出大量的细胞球,经神经干细胞Nestin免疫荧光鉴定,在荧光显微镜下观察到绿色明亮且典型的细胞球,球内可见清晰结构,初步证实所提取海马组织培养获得神经干细胞;进一步采用渗入BrdU免疫荧光检测,在荧光显微镜下可见整个着色细胞球。BrdU是在细胞分裂周期的S期中掺入DNA中的胸腺嘧啶的同源替代物,Snegovskikh等^[11]证明了BrdU阳性的细胞主要是增殖细胞。本研究结果不仅表明BrdU能渗入神经干细胞球的DNA中,且证实了神经干细胞的增殖能力。在离体培养的海马组织神经干细胞的基础上,本研究采用氧糖剥夺模拟在体缺血,OGD法建立的体外培养神经干细胞缺血实验有良好的效果^[10],其优点是无需特殊设备,方法简单易学;缺点主要是不能较好的模拟在体急性缺血和再灌注。本实验MTT法检测发现,体外模拟脑缺血神经干细胞活性下降,低氧干预能够增强神经干细胞的活性。

AKT是逆转录病毒AKT8癌基因v-akt编码的

蛋白产物,它含有3个同源性高达82%的亚型AKT1、AKT2、AKT3,其中AKT1的活化受多种激活剂调节;AKT2广泛产生于各种组织中;AKT3主要产生于大脑和睾丸中^[12]。细胞膜上的第二信使PIP2或PIP3被活化的PI3K催化后,迅速与AKT的PH区结合,使AKT从细胞质中转位到细胞膜上,在催化剂作用下使AKT成为有活性的激酶。先通过RT-PCR的方法将克隆的AKT3 cDNA片段插入真核表达载体pDC316,构建穿梭质粒。重组相关腺病毒载体(rAAV)基于其良好的安全性被誉为最有前途的基因转移载体之一,有研究报道,在大鼠脑组织内注射重组腺病毒2型,可在注射位点附近检测到细胞长期表达外源性基因,证实重组腺病毒2型可以转染神经细胞。目前已知基于血清型的AAV载体有AAV1—AAV8,其中AAV5载体在大脑的转导效率普遍较高^[13]。委托福州沃森生物试剂有限公司构建重组腺病毒Ad5-AKT3载体转染,旨在增强神经干细胞中AKT的表达。RNAi具有高特异性和高效抑制靶基因的特点,在RNAi的应用过程中利用脱靶效应导致特定基因的表达沉默,即siRNA通过与目的基因具有同源性的其他mRNA或者细胞的蛋白相结合,产生非特异性的作用。多项研究表明RNAi通过转录后调节基因表达,具有很强的抑制目的基因作用。本研究通过重组腺病毒Ad5-AKT3转染增强神经干细胞AKT3表达,以及AKT siRNA干扰技术沉默神经干细胞AKT表达,探索PI3K-AKT信号通路在缺血性脑损伤神经干细胞增殖中的作用。RT-qPCR检测神经干细胞中的AKT3结果显示,与正常组和低氧组比较,AKT转染组明显增高($P < 0.05$),AKT干扰组明显降低($P < 0.05$),表明重组腺病毒Ad5-AKT3转染后神经干细胞中AKT3基因的mRNA表达明显被增强;而相反AKT3 siRNA转染后神经干细胞中AKT3的基因明显被抑制,并由Western Blot检测结果进一步证实AKT转染组中AKT3的表达明显高于AKT干扰组($P < 0.05$)。然后通过MTT检测法检测,AKT转染组和AKT干扰组相比,随着AKT3基因表达的增强神经干细胞的生存率也升高。为了进一步明确PI3K-AKT信号通路与神经干细胞的关系,Western Blot检测PCNA、PI3K、AKT3的蛋白表达情况,正常对

照组神经干细胞中有一定程度PCNA、PI3K、AKT3蛋白的表达,在建立缺血损伤模型后神经干细胞中PCNA、PI3K、AKT3蛋白表达下降,随着低氧干预的介入表达上升,重组腺病毒Ad5-AKT3转染后使PCNA、PI3K、AKT3蛋白表达明显增加,而沉默AKT3 siRNA仅检测到微弱的PCNA、PI3K、AKT3蛋白表达;鉴于低氧组与Lip2000组间PCNA、PI3K、AKT3蛋白表达无明显差异,说明Lip2000对神经干细胞的增殖无明显影响,PI3K-AKT通路的激活能够促进脑缺血损伤神经干细胞的增殖作用。

参考文献

- [1] Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2010, 86(4):438—450.
- [2] Burns TC, Steinberg GK. Stem cells and stroke: opportunities, challenges and strategies[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(4):447—461.
- [3] Taupin P. Neurogenesis, NSCs, pathogenesis and therapies for Alzheimer's disease[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2011, (3):178—190.
- [4] Maisano X, Carpentino J, Becker S, et al. Embryonic stem cell-derived neural precursor grafts for treatment of temporal lobe epilepsy[J]. Neurotherapeutics, 2009, 6(2):263—277.
- [5] Bjugstad KB, Teng YD, Redmond DE Jr, et al. Human neural stem cells migrate along the nigrostriatal pathway in a primate model of Parkinson's disease[J]. Exp Neurol, 2008, 211(2):362—369.
- [6] Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Abdolrezaee S, et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2011, 28(8):1611—1682.
- [7] Martino G, Franklin RJ, Baron Van Evercooren A, et al. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects[J]. Nat Rev Neurol, 2010, 6(5):247—255.
- [8] Landgren H, Curtis MA. Locating and labeling neural stem cells in the brain[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(1):1—7.
- [9] Shioda N, Han F, Fukunaga K. Role of Akt and ERK signaling in the neurogenesis following brain ischemia[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, (85):375—387.
- [10] He K, Yan L, Pan CS, et al. ROCK-dependent ATP5D modulation contributes to the protection of notoginsenoside NRI against ischemia-reperfusion-induced myocardial injury [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(12): H1764—1776.
- [11] Snegovskikh V, Mutlu L, Massasa E, et al. Identification of putative fallopian tube stem cells[J]. Reprod Sci, 2014, 21(12):1460—1464.
- [12] Sato A, Sunayama J, Matsuda K, et al. Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR [J]. Neurosci Lett, 2010, 470(2):115—120.
- [13] Fujimoto S, Negishi M, Katoh H. RhoG promotes neural progenitor cell proliferation in mouse cerebral cortex[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(23):4941—4950.