

PI3K/Akt 通路在 UC-MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 中的作用机制

张德双^{1,2}, 白小红¹, 姚裕家¹, 母得志¹, 陈娟^{1△}

1. 四川大学华西第二医院 新生儿科 (成都 610041); 2. 泸州医学院附属医院 新生儿科 (泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)通路在脐带间充质干细胞(UC-MSCs)移植治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)中的机制。**方法** 10 日龄 SD 大鼠分为假手术组、移植组(MSCs 组)、抑制剂组(LY 组)及 HIBD 组,制作 HIBD 动物模型,5-溴脱氧嘧啶尿苷标记 UC-MSCs 后侧脑室移植,移植后 24 h、48 h, TUNEL、Western blot 分别检测细胞凋亡及 caspase3、磷酸化 Akt(P-Akt)蛋白表达。**结果** 移植后 24 h、48 h, MSCs 组细胞凋亡数及 caspase3 蛋白表达量较 LY 组及 HIBD 组减少($P<0.05$),而 P-Akt 表达较 LY 组及 HIBD 组增加($P<0.05$),且随移植后时间的延长,各指标的表达均呈下降趋势($P<0.05$)。**结论** UC-MSCs 移植治疗 HIBD 新生大鼠时,脑组织细胞凋亡减少,caspase3 表达下调,P-Akt 表达上调,PI3K/Akt 信号通路可能为其重要机制。

【关键词】 PI3K/Akt 通路 脐带间充质干细胞 移植 缺氧缺血性脑损伤 机制

Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Grafts for Neonatal Rats Model of HIBD: the Mechanism of PI3K/Akt Signaling Pathway ZHANG De-shuang^{1,2}, BAI Xiao-hong¹, YAO Yu-jia¹, MU De-zhi¹, CHEN Juan^{1△}. 1. Department of Neonatology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Neonatology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China
△ Corresponding author, E-mail: chenjuan2000@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway for umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) treating in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain damage (HIBD). **Methods** P10 SD rats were divided into sham group, MSCs group, inhibitor (LY 294002) group (LY group) and HIBD group randomly. To establish a neonatal rat model of HIBD, UC-MSCs labeled with Brd U were transplanted into the lateral ventricle of rats. At 24 and 48 h after transplantation, the number of apoptotic cells was detected by TUNEL, while the expression of caspase3 protein and phosphorylation of Akt (P-Akt) were quantified by Western blot. **Results** At 24 and 48 h after transplantation, both the apoptotic cells and caspase3 protein expression in MSCs group were less than those in LY group and HIBD group ($P<0.05$), while the expression of P-Akt was higher than those in LY group and HIBD group ($P<0.05$), and with the passage of time after transplantation, the expression of each index showed a downward trend. **Conclusion** The apoptotic cells of brain and the expression of caspase3 protein decrease, while the expression of P-Akt increase. PI3K/Akt signaling pathway may be an important mechanism for UC-MSCs transplantation in HIBD rats.

【Key words】 PI3K/Akt signaling pathway Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells Transplantation Hypoxia-ischemia brain damage Mechanism

重度新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic ischemic encephalopathy, HIE)可导致新生儿死亡及远期神经系统后遗症的发生,迄今没有根治性治疗措施。近年的研究提示,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxia-ischemia brain damage, HIBD)可产生保护性作用^[1,2],但其具体机制尚不完全清楚。由于缺氧缺血所致细胞凋亡是新生儿 HIE 发生病理改变并遗留神经系统后遗症的核心与关键^[3],而磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)通路为经典的促

存活抗凋亡信号通路^[4],可通过激活酪氨酸激酶受体,经 Akt 的磷酸化介导下游级联反应,最终抑制凋亡关键蛋白酶 caspase3 的活化,阻断细胞凋亡。本研究拟探讨脐带间充质干细胞(UC-MSCs)通过 PI3K/Akt 信号通路对细胞凋亡的影响,从而揭示 UC-MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 可能的机制,为 UC-MSCs 治疗新生儿重度 HIE 提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

UC-MSCs 订购于四川脐血库。5-溴脱氧嘧啶尿苷(Brd U)、山羊抗小鼠 IgG/TRITC (1:100)、山羊

抗兔 IgG/FITC(1:100)、山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记(1:3 000)、山羊抗兔 IgG/辣根酶标记(1:3 000)、小鼠抗大鼠 β -actin 抗体(1:3 000),均购自北京中杉金桥有限公司;小鼠抗人 Brd U 抗体(1:250)购自 Abcam 公司;TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒购于 Roche 公司;兔抗大鼠 caspase3 抗体(1:500)购于 Beyotime 公司;兔抗大鼠磷酸化 Akt(P-Akt)抗体(1:400)及 LY 294002 均购于 Sigma 公司。

1.2 动物与分组情况

10 日龄清洁级 SD 大鼠共 156 只,由四川大学实验动物中心提供,平均出生体质量为(15.13 $\pm$ 2.87) g。对 SD 大鼠进行随机等量($n=36$)分为 4 组:假手术组,移植组(MSCs 组),抑制剂组(LY 组)及 HIBD 组。缺氧缺血处理后,MSCs 组死亡 2 只,抑制剂组死亡 4 只,HIBD 组死亡 6 只,根据动物死亡情况进行随机等量补充,最后,仍保证各组动物数目相同($n=36$)。根据侧脑室移植后 24 h 及 48 h,各组再平分为 2 个亚组($n=18$),其中,6 只进行 TUNEL 检测,12 只进行 Western blot 检测(6 只检测 caspase3 表达,6 只检测 P-Akt 表达)。

1.3 实验方法

1.3.1 Brd U 标记移植细胞 在细胞传代后,将 Brd U(200 μ mol/L)加入细胞培养液中。于加入标记物 Brd U 后 48 h,将细胞用生理盐水制成单细胞混悬液($4\times 10^4/\mu$ L)以备。

1.3.2 动物模型建立 借鉴 Rice 等^[5]的方法,制备 HIBD 动物模型。乙醚麻醉 SD 大鼠,固定于手术台上;常规消毒铺巾,颈部正中偏右行长约 0.5 cm 切口,分离并用 7-0 丝线结扎右侧颈总动脉,缝合皮肤;1 h 后置于 92% N_2 和 8% O_2 的缺氧舱中 2.5 h,流量 2 L/min,缺氧后放回常氧母鼠笼中饲养。整个操作过程中保持恒温。假手术组动物:右侧颈总动脉游离后不行结扎直接缝合切口,不作缺氧处理。术后均放回常氧母鼠笼中饲养。从动物的神经行为学及脑组织病理学改变两方面综合判断 HIBD 动物模型是否建立成功。

1.3.3 侧脑室移植 ①MSCs 组:建模后 24 h,微量进样器抽取 5 μ L 制备好的 UC-MSCs 悬液注入大鼠右侧脑室内,由人字缝前 3.0 mm、右 1.8 mm 处进针,深度约为 2.3 mm,缓慢注射约 5 min,后留针约 5 min。②LY 组:选择同时间、同部位、同方式注入等量加入抑制剂 LY 294002 (20 μ mol/L)的 UC-MSCs 悬液,LY 294002 可特异性抑制 PI3K 活性,进而抑制 Akt 磷酸化。③HIBD 组与假手术组:

均注入等量生理盐水。

1.3.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 分别于移植治疗后 24 h 和 48 h,处死各组动物取脑,按照 TUNEL 试剂盒操作步骤进行。TUNEL 检测所取脑组织切片包括皮层及海马区域。最后置于荧光显微镜下观察,各组均随机选取 10 个视野(200 倍)进行观察。凋亡细胞判定:细胞核染成绿色。凋亡指数为视野中凋亡细胞所占百分率。

1.3.5 Western blot 检测 caspase3 及 P-Akt 的表达 分别于移植治疗后 24 h 和 48 h,处死各组动物取脑。取右侧大脑组织的皮层及海马区,置于冰上预冷的 1.5 mL EP 管内,立即冻存于 -80°C 冰箱备用。取出冻存标本,冰上匀浆,冷冻离心机(4°C , 14 000/min)离心 30 min。离心后提取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,各孔加入 60 μ g 蛋白样品进行电泳、转膜、5%封闭液封闭 20 min,分别加入一抗小鼠抗大鼠 β -actin 抗体(1:3 000)、兔抗大鼠 caspase3 抗体(1:500)、兔抗大鼠 P-Akt 抗体(1:400),室温孵育 1 h, 4°C 冰箱过夜。TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,ECL 化学发光试剂盒显影。采用凝胶成像分析软件对条带的积分光密度(OD)值进行测定,同时计算目的蛋白与内参 OD 值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIBD 模型鉴定

2.1.1 神经行为学观察 术前各组大鼠神经行为学功能均正常。术后 HIBD 大鼠均有程度不同的神经行为学异常。缺氧缺血 10~15 min,大鼠开始出现翻滚、躁动不安;20~30 min 开始出现呼吸急促、全身青紫;30~60 min 大部分动物表现为抑制状态,如活动减少、运动迟缓、灵活性降低、一侧肢体活动障碍、站立不稳、翻身困难等,部分表现为兴奋状态,如强直性抽搐、震颤等;1 h 后大部分动物出现意识障碍,如嗜睡、昏睡、昏迷等。恢复供氧 1 h 后大鼠活动逐渐增加,大部分表现为向右侧转圈运动,持续 24 h 左右消失。假手术组大鼠行动灵活,双侧肢体运动对称。所有动物切口愈合均良好,无感染发生。

2.1.2 脑组织大体标本观察 缺氧缺血 24 h 后,

可见新生大鼠脑组织出现明显水肿、充血,以右侧较为明显;缺氧缺血 72 h 后,脑组织水肿、充血减轻,出现液化、梗死;假手术组大鼠大脑左右对称、形态正常,无水肿、充血、液化、梗死等病理改变(图 1)。

2.1.3 脑组织 HE 染色观察 缺氧缺血 24 h 后海

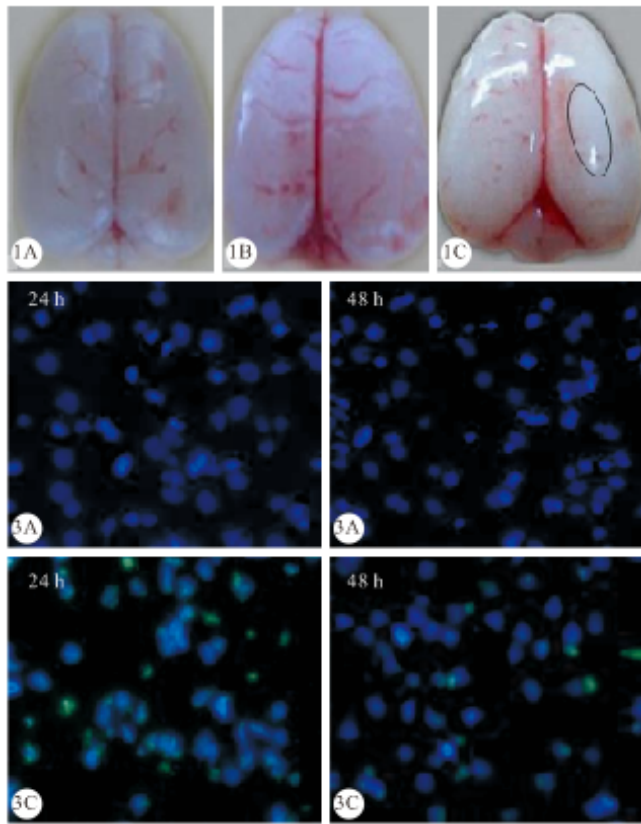


图 1 缺氧缺血后新生大鼠脑组织病理学改变(椭圆区域代表液化、梗死脑组织)

改变〔箭头代表水肿神经细胞(B)及皱缩神经细胞(C)〕。×400

Fig 1 The pathological changes of neonatal rats' brain after HI by HE staining〔arrows show edema neuronal cells (B) and shrinkage neuronal cells (C)〕. ×400

马区域及大脑皮层脑组织细胞排列紊乱,结构不清,胞体肿胀呈气球样变,细胞稀疏,形态异常;缺氧缺血 72 h 后,部分细胞出现皱缩,结构不清,细胞间隙增宽;假手术组大鼠脑组织细胞排列有序,结构清晰,形态正常(图 2)。

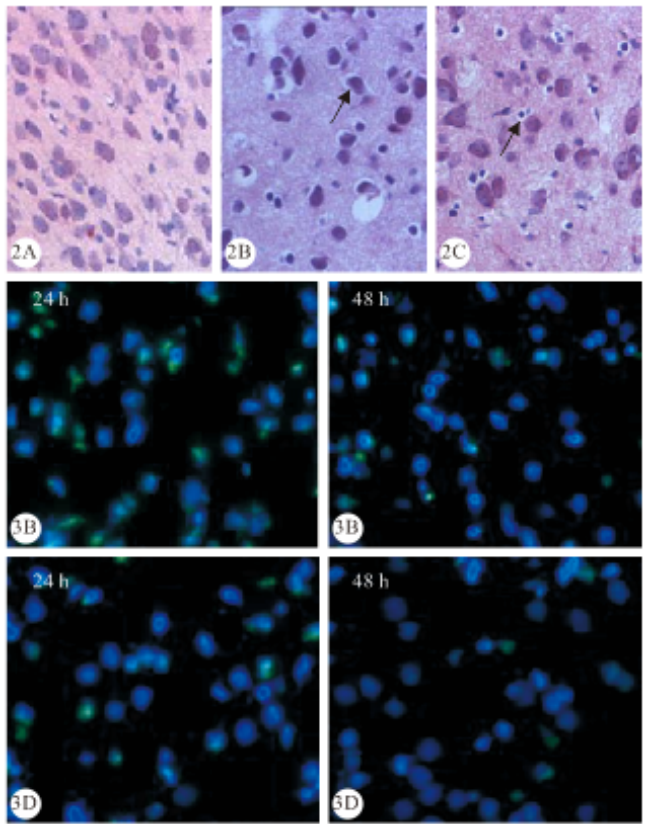


图 2 HE 染色观察缺氧缺血后新生大鼠脑组织病理学

改变〔箭头代表水肿神经细胞(B)及皱缩神经细胞(C)〕。×400

图 3 TUNEL 染色检测各组大鼠细胞凋亡情况。×200

Fig 2 The pathological changes of neonatal rats' brain after HI by HE staining〔arrows show edema neuronal cells (B) and shrinkage neuronal cells (C)〕. ×400

Fig 3 The expression of apoptotic cells in rats by TUNEL staining (the green fluorescence represents the apoptotic cells). ×200

1A, 2A, 3A; Sham group; 1B, 2B, 24 h after HI; 1C, 2C, 72 h after HI; 3B; HIBD group; 3C; LY group; 3D; MSCs group

2.2 细胞凋亡情况

移植治疗后 24 h 和 48 h;HIBD 组细胞凋亡最为明显,LY 组少于 HIBD 组,但差异无统计学意义($P>0.05$),MSCs 组较 HIBD 组、LY 组均减少($P<0.01$)。且随着移植后时间的延长,各组细胞凋亡指数均呈下降趋势,其中,除假手术组外,不同时间点细胞凋亡指数比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 3、附表。

2.3 Caspase3 及 P-Akt 的表达

移植治疗后 24 h 和 48 h;caspase3 在 HIBD 组表达最为明显,MSCs 组较 HIBD 组、LY 组均减少(P 均 <0.05);而 P-Akt 在假手术组表达最为明

附表 各组大鼠细胞凋亡指数比较($\bar{x}\pm s$)

Table		The comparison of apoptosis index (AI) in rats ($\bar{x}\pm s$)			
Group	<i>n</i>	AI (%)		<i>t</i>	<i>P</i>
		24 h	48 h		
Sham	6	1.78±1.20	1.69±0.94	0.145	0.444
HIBD	6	39.75±3.14 *	18.63±2.42 *	13.049	<0.01
LY	6	37.89±2.78 *	17.14±1.89 *	15.119	<0.01
MSCs	6	33.24±3.13 *·#	12.57±2.58 *·#	12.482	<0.01
<i>F</i>		425.067	86.721		
<i>P</i>		<0.01	<0.01		

* $P<0.01$, vs. sham group; # $P<0.01$, vs. HIBD and LY groups

显, MSCs 组较 LY 组、HIBD 组均升高(P 均 <0.05)。且随着移植后时间的延长,caspase3 及 P-Akt 的表达均呈下降趋势,其中,除假手术组外,各指标在不同时间点的表达比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。

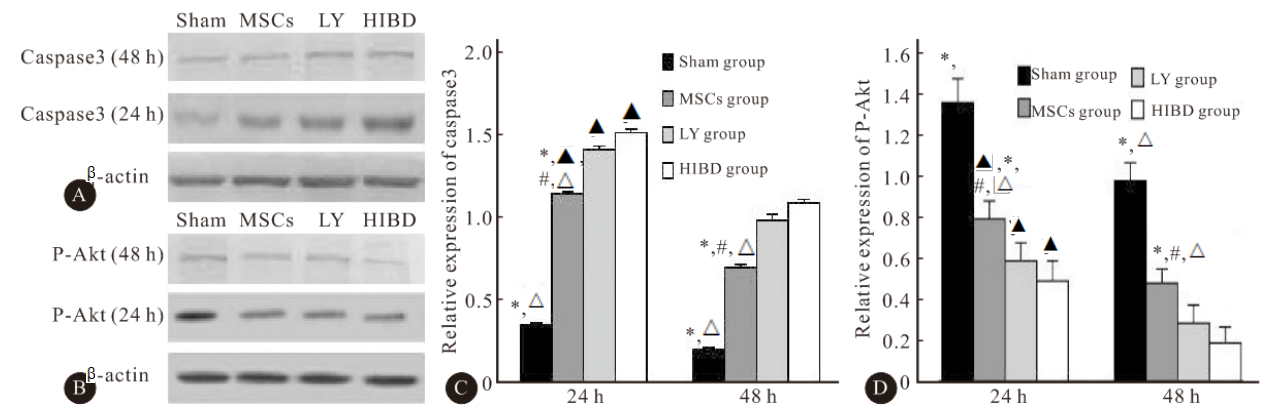


图 4 各组大鼠脑组织 caspase3 和 P-Akt 的表达

Fig 4 Expression of caspase3 and P-Akt proteins in the brains of rats

A, B: Expression of caspase3 (A) and P-Akt (B) detected by Western blot; C, D: Quantification of the expression of caspase3 (C) and P-Akt (D). * $P < 0.05$, vs. HIBD group; # $P < 0.05$, vs. sham group; $\Delta P < 0.05$, vs. LY group; $\blacktriangle P < 0.05$, vs. 48 h in the same group

3 讨论

10 日龄 SD 大鼠的神经发育成熟程度相当于人类足月儿^[6]。因此,为更好地模拟足月新生儿 HIE 的病理生理改变,本研究选用 10 日龄新生 SD 大鼠为研究对象。借鉴 Rice 法制作足月新生儿 HIE 动物模型^[5]。

判断 HIBD 动物模型制作成功的指标,目前较为常用且简单、易行的方法为神经行为学变化及脑组织病理学改变。故本研究采用上述方法对 HIBD 动物模型建立成功与否进行判断。结果表明, HIBD 组动物部分表现为兴奋状态,如抽搐、震颤、向右侧转圈行动;部分表现为抑制状态,如运动迟缓、灵活性降低、对侧肢体活动障碍、翻身困难等。而假手术组大鼠行动灵活,双侧肢体运动对称。脑组织大体标本观察可见, HIBD 后 24 h 脑组织出现明显水肿、充血,以右侧明显;72 h 后损伤侧脑组织可见有液化、梗死。脑组织病理学观察可见, HI 后脑组织细胞排列紊乱、结构不清、胞体肿胀、细胞稀疏、间隙增宽,以皮层及海马区域为主。上述脑组织的病理学改变与新生儿 HIE 的病理学损伤相一致。以上结果显示,本研究所制作的新生大鼠 HIBD 动物模型能够模拟新生儿 HIE 的神经行为学改变以及脑组织病理学变化,证实了新生大鼠 HIBD 动物模型建立成功。

缺氧缺血所诱导的神经细胞凋亡性损伤是新生儿 HIE 发病机制的重要环节,也是最终导致新生儿后期神经行为和(或)功能性障碍的根本原因,而 PI3K/Akt 为经典的促存活抗凋亡信号通路。在

PI3K/Akt 通路中, caspase3 蛋白为关键的凋亡效应蛋白酶,一旦被激活,则会对下游一系列的细胞内关键蛋白酶进行催化裂解,引起细胞结构与功能受损^[7]。而 Akt, 又称蛋白激酶 B, 为 caspase3 上游重要的启动分子, 通过磷酸化下游与凋亡相关靶蛋白, 在调控细胞存活与凋亡方面发挥重要作用^[8,9]。P-Akt 为 Akt 的活性形式, 在脑缺血损伤中具有促进神经细胞存活, 抑制凋亡的作用^[10]。一般情况下, Akt 以低活性或失活性状态存在于细胞胞浆中, 其在上游分子如 PI3K 调节作用下可发生磷酸化为活化形式的 P-Akt, 通过作用于多种底物, 最终作用于凋亡靶蛋白 caspase 家族, 调节细胞存活。

由于 UC-MSCs 具有来源丰富、容易提取、倍增时间短、免疫原性低、移植后长时间存活等多种优点而成为近年来干细胞移植领域的研究热点^[11], 故本研究选择 UC-MSCs 作为移植细胞来源。目前研究应用 MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 表明: MSCs 对缺氧缺血所致新生大鼠脑损伤具有明显的保护作用^[2,12], 但其具体机制尚不清楚, 也是研究者们关注的焦点。有研究表明, UC-MSCs 可经释放神经营养因子进而减少细胞凋亡, 最终促进濒临死亡的自体神经元存活^[13]。而 PI3K/Akt 通路在调控缺氧缺血环境中 MSCs 移植治疗后的促存活抗凋亡机制的研究却罕见报道^[14,15]。

由于缺氧缺血后 24~48 h, 细胞凋亡达高峰, 故本研究选择侧脑室移植 24 h (即缺氧缺血 48 h) 作为初始检测时间点, 鉴于 PI3K/Akt 通路中细胞凋亡的主导地位及 caspase3、P-Akt 的关键作用, 本研究采用原位末端 TUNEL 法及 Western blot 技

术对细胞凋亡数量、凋亡蛋白 caspase3 及 P-Akt 分别进行检测。结果表明:移植后 24 h 及 48 h, MSCs 组的细胞凋亡数量及 caspase3 蛋白表达均低于 LY 组及 HIBD 组 ($P < 0.05$), 而 P-Akt 表达均高于 LY 组及 HIBD 组 ($P < 0.05$), 并且随着移植后时间的推移各指标的表达均呈下降趋势。由此可知, UC-MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 时, 在阻断 PI3K/Akt 信号通路后, 细胞凋亡数量及凋亡蛋白 caspase3 明显增多, 而 P-Akt 明显减少, 据此推测 UC-MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 时, 可通过 PI3K/Akt 信号通路的激活, 最终减少细胞凋亡, 发挥神经保护作用; 而根据移植后各指标随时间的变化趋势, 我们得知, UC-MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 的抗凋亡机制主要在缺氧缺血性脑损伤的早期发挥作用, 与缺氧缺血后细胞的凋亡趋势相一致。根据以上结果, 可将 PI3K/Akt 信号通路作为早期逆转重度 HIE 所致脑损伤的新靶点, 为临床治疗 HIE 提供了新思路。当然, MSCs 移植治疗 HIBD 的具体机制尚待更多、更深层的实验研究以证实。然而, 根据 HIE 的发病机制及干细胞移植治疗的可能机制, 本研究拟在下一步实验中进一步探讨 UC-MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 在血管重建以及炎症因子释放方面所起的多重保护性作用机制, 为 UC-MSCs 进一步应用于临床治疗新生儿 HIE 提供更多的实验依据。

参 考 文 献

- Xia G, Hong X, Chen X, *et al.* Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood alleviates hypoxic ischemic brain injury in rat neonates. *J Perinat Med*, 2010; 38(2): 215-221.
- Wei X, Du Z, Zhao L, *et al.* IFATS collection: the conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. *Stem Cells*, 2009; 27(2): 478-488.
- Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, *et al.* Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol*, 2008; 37(1): 7-38.
- Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol*, 2006; 34(3): 249-270.
- Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 1981; 9(2): 131-141.
- Hagberg H, Ichord R, Palmer C, *et al.* Animal models of developmental brain injury: relevance to human disease. A summary of the panel discussion from the Third Hershey Conference on Developmental Cerebral Blood Flow and Metabolism. *Dev Neurosci*, 2002; 24(5): 364-366.
- Kuranaga E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions *in vivo*. *Genes Cells*, 2012; 17(2): 83-97.
- Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Survivin signaling in clinical oncology: a multifaceted dragon. *Med Res Rev*, 2013; 33(4): 765-789.
- Shortt J, Martin BP, Newbold A, *et al.* Combined inhibition of PI3K-related DNA damage response kinases and mTORC1 induces apoptosis in MYC-driven B-cell lymphomas. *Blood*, 2013; 121(15): 2964-2974.
- Endo H, Nito C, Kamada H, *et al.* Activation of the Akt/GSK3 β signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006; 26(12): 1479-1489.
- El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev*, 2014; 20(5): 523-544.
- Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev*, 2011; 7(1): 195-207.
- Neuhoff S, Moers J, Rieks M, *et al.* Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells *in vitro*. *Exp Hematol*, 2007; 35(7): 1119-1131.
- Yi W, Sun Y, Yuan Y, *et al.* Clq/tumor necrosis factor-related protein-3, a newly identified adipokine, is a novel antiapoptotic, proangiogenic, and cardioprotective molecule in the ischemic mouse heart. *Circulation*, 2012; 125(25): 3159-3169.
- Hou M, Liu J, Liu F, *et al.* Clq tumor necrosis factor-related protein-3 protects mesenchymal stem cells against hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Int J Mol Med*, 2014; 33(1): 97-104.

(2015-04-30 收稿, 2015-09-12 修回)

编辑 余琳