

基础研究

TDZD-8 对新生大鼠背根节神经元
轴突再生影响的体外实验研究

黄贻泽, 李 骏, 康建平, 叶 飞, 冯大雄

(泸州医学院附属医院脊柱外科 646000 四川省泸州市)

【摘要】目的:探讨葡萄糖原合成酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)的抑制剂 TDZD-8 对新生大鼠背根节(dorsal root ganglion, DRG)神经元轴突生长和延长的影响。方法:取新生(<5d)SD 大鼠胸腰段背根节进行原代培养、提纯和鉴定。用 WD 法制成健康成年雌性 SD 大鼠 T9 平面完全性截瘫的脊髓损伤动物模型,造模 7d 后取 T8~T10 节段脊髓制作脊髓提取液。将不同浓度 TDZD-8 与成年大鼠脊髓提取液和新生大鼠 DRG 神经元分组培养:A 组,DRG 神经元+磷酸缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS);B 组,DRG 神经元+正常脊髓提取液;C 组,DRG 神经元+假手术脊髓提取液;D 组,DRG 神经元+全瘫脊髓提取液;E 组,DRG 神经元+全瘫脊髓提取液+不同浓度 TDZD-8。培养 2d 后观察并比较各组新生大鼠 DRG 神经元轴突平均长度和微管(Tubulin β III)荧光表达强度。结果:A 组、B 组和 C 组之间平均神经轴突长度及轴突远端 Tubulin β III 表达强度比较,无统计学意义,D 组明显减小,与 A、B 和 C 组分别比较,有统计学意义($P<0.01$)。0.5~3 μ M TDZD-8 处理组平均轴突长度及 Tubulin β III 荧光表达强度均明显高于 A、B、C 组,与 D 组比较,更为显著,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。5~25 μ M TDZD-8 处理组平均轴突长度与 A、B、C 组分别比较,明显缩短且有统计学意义($P<0.01$),与 D 组比较无统计学差异($P>0.05$);轴突远端 Tubulin β III 表达比 A、B、C、D 组及 0.5~3 μ M TDZD-8 处理组明显增强,有统计学意义($P<0.01$)。结论:完全瘫痪脊髓提取液明显抑制 DRG 神经元轴突生长,轴突回缩。低浓度 TDZD-8 能促进轴突生长,形成多个轴突或轴突分支,而高浓度 TDZD-8 明显抑制轴突生长,导致轴突回缩。

【关键词】脊髓损伤;背根节;轴突再生;TDZD-8;葡萄糖原合成酶-3 β 抑制剂

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.02.12

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-02-0146-06

In vitro effect of TDZD-8 on DRG neurons axonal regeneration in rats/HUANG Yize, LI Jun, KANG Jianping, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(2):146~151

【Abstract】Objective: To explore the in vitro effect of TDZD-8 (inhibitor of GSK-3 β) on DRG neurons axonal regeneration in rats. Method: All thoracic-lumbar DRGs of newborn SD rats (<5d) were harvested under the stereopsis microstat, and then DRG neurons were cultured, purified and identified. 15 adult female SD rats were randomly divided into three groups and 5 were subjected to weight-drop impact inducing complete paraplegia, 5 were in sham group and 5 in normal group respectively. The T8-T10 spinal cord extracts (SCEs) were harvested from 3 different groups respectively at the 7th day after operation. 5 groups were assigned as follows, group A was DRG neurons + PBS, group B was DRG neurons + normal SCE, group C was DRG neurons + sham operation SCE, group D was DRG neurons + complete paraplegia SCE and group E was DRG neurons + complete paralysis SCE + TDZD-8. The average axonal length and positive expression of Tubulin β III at distal end of neuronal axons were observed after 2 days co-culture. Result: There was no difference in average axonal length among group A, B and C respectively, while the axonal length in group D was significant shorter than that in group A, B and C respectively. The mean Tubulin β III fluorescence density of axonal distal end in group D was significant weaker than that in group A, B and C respectively and no difference was noted between group A, B and C. In 0.5~3 μ M TDZD-8 treatment groups, there were not only longer in average axonal length and higher in expression of Tubulin β III at axonal distal end than in those in group

基金项目:国家自然科学基金课题,批准编号:30872602

第一作者简介:男(1975-),主治医师,医学硕士,研究方向:脊髓损伤(现四川省隆昌县医院骨科)

通讯作者:冯大雄 E-mail: fdxl2002@163.com

A, B and C respectively, but significant longer than that in group D. In 5–25 μ M TDZD-8 treatment groups, the average axonal length was shorter than that in group A, B and C, while the expression of Tubulin β III at axonal distal end was significant higher than that in other groups respectively ($P < 0.01$). **Conclusion:** The complete paraplegia SCEs inhibit DRG neurons axonal growth obviously, which induce axonal retraction and growth cone collapse. Low dose of TDZD-8 can promote axon growth while high dose can inhibit axon growth obviously. TDZD-8 can enhance the expression of Tubulin β III at neuronal axon shaft and growth cone, especially in high dose.

[Key words] Spinal cord injury; Dorsal root ganglia; Axonal regeneration; TDZD-8; Glycogen synthase kinase 3 β inhibitor

[Author's address] Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Sichuan, Luzhou, 646000, China

研究发现, 脊髓损伤后, 中枢神经轴突不能再生、延长, 这归咎于脊髓损伤的微环境中存在大量抑制轴突再生和延长的抑制因子。这些抑制因子主要有髓鞘相关抑制因子、胶质瘢痕中的抑制因子、轴突引导因子及脊髓损伤后血小板释放的溶血磷脂酸等, 它们不仅通过共同的 Rho-ROCK II 细胞信号途径, 还通过神经元极性的细胞信号传递途径, 作用于轴突的生长锥, 抑制轴突生长锥内肌动蛋白丝的动态性、微管的聚合、组装及转运, 影响微管、微丝的动态平衡及轴突对特异性黏附因子的胞饮作用, 引起生长锥塌陷与回缩^[1,2]。在神经元极性的细胞信号途径中, 葡萄糖原合成酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 第 9 位点上的丝氨酸去磷酸化而激活, 对下游多种蛋白质底物产生级联瀑布信号传递, 起着重要的因子开关作用^[1]。本实验从脊髓损伤后整个抑制环境的角度出发, 观察 GSK-3 β 非 ATP 竞争性抑制剂 TDZD-8 (4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione) 对新生大鼠背根节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元轴突再生、延长的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

SD 大鼠 (泸州医学院实验动物中心提供), 不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 液、DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (Hyclone 公司提供), NM (神经细胞专用培养基)、神经细胞生长添加剂、青链霉素溶剂 (ScienCell 公司提供), 单克隆兔抗大鼠 Tubulin β III 抗体 (Abcam 公司提供), TDZD-8 (SIGMA 公司提供), 层流超净工作台、Heraeus 高速冷冻离心机、恒温震荡培养箱、Hera Cell 150 CO_2 培养箱、Olympus CKX41 倒置显微镜、带 Image-Pro Plus

6.0 软件的 Olympus 荧光显微镜。

1.2 大鼠 DRG 神经元的分离、培养、纯化与鉴定

取新生 SD 大鼠 (<5d) 2 只, 在体视显微镜台下, 逐个取出胸腰段 DRG, 立即置于 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 无菌溶液, 修剪远近端神经根和被膜后剪碎置于 1U/ml 胶原酶中酶解消化、机械吹打、离心后, 将 DRG 神经元重新悬浮于含有 100U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、2mM 左谷氨酰胺和 10% 胎牛血清 (FCS) 及 10% 阿糖胞苷 (抑制非神经元细胞生长) 的 DMEM/F12 培养液中; 进行细胞计数, 每培养皿大约 $10 \sim 15 \times 10^5$ 个/ml (按每培养皿 1.5ml 培养液) 进行细胞贴壁培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度孵箱中孵化 3~4h, 待细胞贴壁后加入上述 DMEM/F12 培养液 1ml 过夜; 次日, 抽去 DMEM/F12, 加入 NM 培养液 1.5ml 继续培养, 每 2d 更换半量培养液。纯化: 采用 10% 5 氟尿嘧啶 (5-FU) 抑制非神经细胞生长。鉴定是采用神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 做神经元特异性细胞免疫鉴定, 纯化后的神经元占总细胞的 95% 以上。

1.3 大鼠完全截瘫脊髓提取液的制备

健康雌性 SD 成年大鼠 15 只, 体重 200~250g, 随机分为: 手术瘫痪组 (5 只)、假手术组 (5 只) 和正常组 (5 只)。WD 法 (10g 打击棒 25mm 高度垂直打击)^[3,4] 制成 SD 大鼠 T9 平面完全性截瘫的脊髓损伤动物模型, 假手术组仅作椎板开窗, 正常组不做任何手术处理。造模 1 周后取出 T8~T10 节段脊髓 (每份标本重 100~120mg), 立即 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 无菌溶液中修剪脊膜、部分神经根, 洗去表面血迹, 每份标本置于 1ml PBS 无菌溶液中进行匀浆、离心 (3000rpm, 10min), 取上清液, 用 0.2 μm 的针头滤器过滤后冷冻 (-20 $^{\circ}\text{C}$) 保存^[3,4]。

1.4 实验分组及处理

取新生大鼠 DRG 神经元原代培养后 5d 的培

养皿,去除培养液,每孔加入 NM 培养液 1.5ml,分 5 组:A 组,DRG 神经元+PBS;B 组,DRG 神经元+正常脊髓提取液;C 组,DRG 神经元+假手术脊髓提取液;D 组,DRG 神经元+全瘫脊髓提取液;E1~E6 组,DRG 神经元+全瘫脊髓提取液+不同浓度 TDZD-8。每组 4 个培养皿:A 组每皿加入 60 μ l PBS,B 加入 60 μ l 正常脊髓提取液,C 组加入 60 μ l 假手术脊髓提取液,D 组加入 60 μ l 全瘫脊髓提取液,E1~E6 组加入 60 μ l 全瘫脊髓提取液和不同浓度 (0.5 μ M、1 μ M、3 μ M、5 μ M、10 μ M、25 μ M) 的 TDZD-8。置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度孵箱中共同培养 2d 后,于倒置显微镜下观察 DRG 神经元轴突生长情况并行照相,固定后进行细胞免疫荧光 NSE 鉴定神经元及观察微管蛋白(Tubulin β III)表达。

1.5 观察指标和统计学分析

用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量每组 60 个轴突长度,从轴突起始到最远端,以最长度轴突为准,计算每组平均轴突长度。并用带 Image-Pro Plus 6.0 软件的 Olympus 荧光显微镜进行每组荧光照相,按 Zhou 和 He 等^[5,6]描述的方法,测量轴突远端约 50 μ M 长的平均微管荧光密度 AFU/ μ M (任意荧光单位/ μ M)=(总荧光密度 It-背景荧光密度 Ib)/轴突长度 L (图 1)。试验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用统计分析软件 SPSS 13.0 进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 TDZD-8 对新生大鼠 DRG 神经元轴突生长和延长的影响

新生 SD 大鼠 DRG 神经元和成年大鼠脊髓提取液、不同浓度 TDZD-8 共同培养后 2d,各组

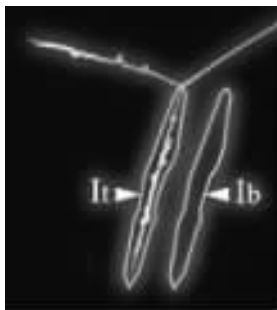


图 1 轴突远端平均微管荧光密度 AFU/ μ M=(It-Ib)/L(It:轴突远端总微管荧光密度;Ib:背景荧光密度;L:所测量的轴突远端长度;AFU:任意荧光单位)

平均轴突长度见表 1。可见,D 组和 5~25 μ M TDZD-8 处理组平均轴突长度均缩短,0.5~3 μ M TDZD-8 处理组平均轴突长度均增加,1 μ M TDZD-8 处理组平均轴突长度增长最明显。进行单因素方差分析发现:A、B 和 C 组之间比较无统计学差异(P 值>0.05);D 组平均轴突长度与 A、B 和 C 组比较明显减小,差异有显著性 ($P<0.01$);0.5~3 μ M TDZD-8 处理组长度与 A 组比较明显增加,差异有显著性 ($P<0.01$),而 5~25 μ M TDZD-8 处理组轴突长度与 A 组比较明显减小,差异有显著性($P<0.01$)。

各组轴突远端荧光密度测量结果见表 1。A、B 和 C 组神经轴突 Tubulin β III 的表达强,特别在轴突远端和生长锥表达更强,两两之间比较无统计学差异;D 组神经胞体 Tubulin β III 有表达,但在轴突表达弱,特别在轴突远端和生长锥几乎无表达,与其余组比较差异均有显著性 ($P<0.01$);TDZD-8 处理组轴突远端 Tubulin β III 荧光表达与 A、B 和 C 组比较明显增强,差异有显著性($P<0.01$)。E1~E3 组(0.5~3 μ M TDZD-8 处理组)轴突干和生长锥 Tubulin β III 表达明显,轴突干有多处 Tubulin β III 浓聚,远端生长锥也明显浓聚,且可见轴突有分支,其中 E2 组 (1 μ M TDZD-8 处理组)形成更多轴突,轴突分支更明显;E4~E6 (5~25 μ M TDZD-8 处理组)轴突干和生长锥 Tubulin β III 表达明显,但轴突长度明显缩短,形成宽大生长锥,其中 E6 组(25 μ M TDZD-8 处理组)轴突缩短更明显,远端形成宽大生长锥(图 2)。

表 1 各组大鼠 DRG 神经元轴突长度及轴突远端荧光密度测量结果 ($\bar{x}\pm s$)

	<i>n</i>	轴突长度 (μ m)	荧光密度 (AFU/ μ m)
A 组	60	380.7 $\pm$ 16.7	208.2 $\pm$ 5.6
B 组	60	378.2 $\pm$ 15.4	206.2 $\pm$ 6.6
C 组	60	376.6 $\pm$ 13.0	204.6 $\pm$ 7.0
D 组	60	130.2 $\pm$ 11.8 ^①	67.1 $\pm$ 4.2 ^②
0.5 μ M TDZD-8 组	60	393.4 $\pm$ 24.0 ^{①③}	324.5 $\pm$ 6.3 ^①
1 μ M TDZD-8 组	60	414.5 $\pm$ 37.7 ^{①③}	365.6 $\pm$ 9.2 ^①
3 μ M TDZD-8 组	60	395.0 $\pm$ 32.5 ^{①③}	375.0 $\pm$ 6.2 ^①
5 μ M TDZD-8 组	60	207.2 $\pm$ 30.5 ^①	387.0 $\pm$ 7.6 ^①
10 μ M TDZD-8 组	60	171.3 $\pm$ 23.5 ^①	480.4 $\pm$ 15.1 ^①
25 μ M TDZD-8 组	60	134.2 $\pm$ 19.2 ^①	486.3 $\pm$ 12.6 ^①

注:①与 A、B、C 组比较 $P<0.01$,②与其他各组比较 $P<0.01$,③与 D 组比较 $P<0.01$

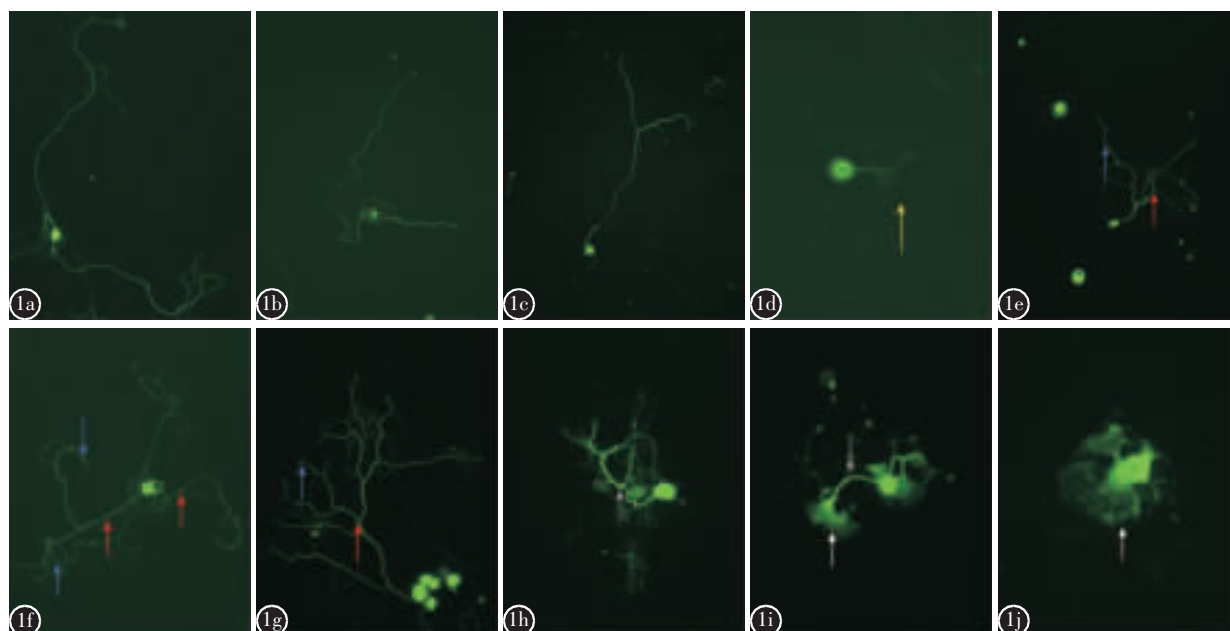


图 2 a A 组神经元生长良好,轴突免疫荧光表达明显 b B 组神经元生长良好,轴突免疫荧光表达明显 c C 组神经元生长良好,轴突免疫荧光表达明显 d D 组神经元轴突明显回缩,轴突远端免疫荧光表达弱(黄色箭头所示) e $0.5\mu\text{M}$ TDZD-8 处理组能促进神经元轴突生长,轴突有分支,轴突远端免疫荧光表达有所增强 f $1\mu\text{M}$ TDZD-8 处理组明显促进神经元轴突生长和延长,形成多个轴突且分支增多,轴突远端免疫荧光表达增强 g $3\mu\text{M}$ TDZD-8 处理组促进神经元轴突生长和延长,轴突分支增多,轴突远端免疫荧光表达增强 h $5\mu\text{M}$ TDZD-8 处理组抑制神经元轴突生长,轴突回缩,轴突远端免疫荧光表达有所增强 i $10\mu\text{M}$ TDZD-8 处理组抑制神经元轴突生长和延长,轴突回缩,轴突远端免疫荧光表达增强,形成宽大生长锥 j $25\mu\text{M}$ TDZD-8 处理组明显抑制神经元轴突生长和延长,轴突明显回缩,轴突远端免疫荧光表达增强,形成宽大生长锥)

3 讨论

3.1 脊髓损伤后 GSK-3 β 细胞信号传递途径的作用

国内外研究表明:(1)轴突引导因子包括轴突排斥因子及轴突诱导因子,在脊髓胚胎发育阶段,引导轴突生长锥正确、有序生长,脊髓损伤后,其表达上调^[7,8]。其中,Semaphorin3A 与位于生长锥上的 Neuropilin-1/Plexin-A 受体结合,在 fyn 酪氨酸激酶的作用下,激活磷脂酰肌醇-3 激酶,并产生其脂质化产物磷脂酰肌醇 3、4、5-三磷酸,二者堆积在生长锥尖端,使 Akt(又名蛋白激酶 B)第 308 位点上的丝氨酸与第 473 位点上的苏氨酸磷酸化而激活;同时 fyn 也激活 ILK(整合素连接激酶);激活的 Akt、ILK 抑制 GSK-3 β 的第 9 位的丝氨酸去磷酸化而激活 GSK-3 β ;激活的 GSK-3 β 作用于多种蛋白质底物而产生级联瀑布信号传递,抑制微管的聚合、组装与转运,影响微管、微丝的动态平衡及轴突对特异性黏附因子的胞饮作用及生长锥的动态平衡,引起生长锥塌陷^[7-9]。(2)脊

髓损伤后胶质瘢痕中的抑制因子存在于髓鞘细胞表面及细胞外基质细胞中,在脊髓损伤后表达上调,特别是细胞外基质中的 Aggrecan 等,激活 ILK,通过 GSK-3 β 信号途径来抑制轴突再生^[10]。(3)脊髓损伤后,激活的血小板释放的溶血磷脂酸与轴突表面受体结合,通过 Ca^{2+} 敏感的酪氨酸激酶 Pyk2,使 GSK-3 β 的第 9 位点的丝氨酸和第 21 位点的苏氨酸磷酸化,导致微管相关蛋白 tau 磷酸化,引起轴突回缩^[11]。本实验观察到,完全性截瘫的大鼠脊髓提取液对 DRG 轴突生长、延长及 Tubulin β III 的表达具有明显的抑制作用,表明全瘫脊髓提取液中含有大量抑制因子。此外,在神经元轴突的形成过程中,多个轴引导因子、粘附因子、神经生长因子等通过调节 GSK-3 β 的第 9 位点的丝氨酸磷酸化促进轴突生长。因此,GSK-3 β 在这些抑制信号的传递过程中起到因子开关的作用,调节其活性对脊髓损伤后,克服轴突再生的抑制环境具有重要的意义^[1,5,7,12]。

3.2 抑制 GSK-3 β 对脊髓损伤后神经元轴突生

长的作用

Jiang 等^[13] 研究海马神经元轴突形成过程中 GSK-3 β 的作用发现, 第 2 时相非极性和第 3 时相极性的神经元中, GSK-3 β 在所有的树突均有表达; 虽然第 2 阶段细胞的所有树突顶端都出现了 pGSK-3 β (9-丝氨酸磷酸化失活的 GSK-3 β), 但 pGSK-3 β 在第 3 阶段细胞的轴突顶端的表达要比树突的多得多, 且 pGSK-3 β /GSK-3 β 比值也明显更高。由此表明 GSK-3 β 的活性对促进神经突起转化为轴突、轴突生长和延长方面具有重要作用。Dill 等^[14] 用分离、培养新生大鼠 (生后 7d) 大脑颗粒神经元 (cerebellar granular neuron, CGN) (培养基中含 10 μ g/ml 层粘连蛋白)、PC12 细胞 (用 NGF 分离) 及成年大鼠 (7~10 周龄) 的 DRG (培养基中含 100ng/ml NGF) 分别与硫酸软骨素糖蛋白、髓鞘相关性糖蛋白培养, 用 Bio-Rad DC 蛋白测定试剂、Western 印迹分析 Akt 及 GSK-3 β 的磷酸化水平; 同时还观察成年大鼠脊髓损伤后 24h 损伤段脊髓内 Akt 及 GSK-3 β 的磷酸化水平及应用 GSK-3 β 抑制剂氯化锂与 SB415286 在存在硫酸软骨素糖蛋白、髓鞘相关性糖蛋白抑制因子的情况下, DRG 轴突再生延长的情况, 实验观察到: 硫酸软骨素糖蛋白、髓鞘相关性糖蛋白使 CGN、PC12 Akt 磷酸化水平明显减少而 GSK-3 β 的磷酸化水平升高; 在脊髓损伤后, 也观察到同样的结果; 在存在硫酸软骨素糖蛋白、髓鞘相关性糖蛋白的条件下, GSK-3 β 抑制剂明显促进 CGN、DRG 轴突的生长与延长。这表明: 中枢神经系统的抑制因子抑制 Akt, 激活 GSK-3 β 信号途径, 引起生长锥塌陷。研究^[1,5,7,12] 发现, 激活的 GSK-3 β 有以下作用: (1) 使位于生长锥的崩溃蛋白反应性介质蛋白-2 (collapsin response mediator protein-2, CRMP-2) 第 514 位点上的丝氨酸与第 518 位点上的苏氨酸磷酸化, 解除了 CRMP-2 与微管亚单位 α/β 的连结, 抑制微管的组装, 生长锥塌陷; CRMP-2 磷酸化后, 通过与 Numb 的相互作用, 抑制轴突对特异性粘附因子的胞饮作用; CRMP-2 磷酸化后, 抑制 Rac-1 相关蛋白 (Rac-1 associated protein, Sra-1) 与动力蛋白-1 (kinesin-1) 的连结, 导致肌动蛋白丝去组装; CRMP-2 磷酸化后, 抑制其与阿糖腺苷三磷酸轻链相互作用, 抑制轴突生长锥内蛋白的转运, 从而抑制轴突生长。(2) 使微管连接蛋白 APC (adenomatous polyposis

coil, APC, 是一种微管末端的加尾蛋白, 故又称为加尾轨道蛋白) 磷酸化, 使其与微管蛋白亚单位的连结解除, 抑制轴突生长。(3) 使微管相关蛋白 1 β (microtubulin binding protein 1 β , MAP1 β) 去磷酸化, 降低微管的动态平衡, 影响轴突生长。本实验也观察到: 全瘫脊髓提取液 (含有轴突生长抑制因子) 明显抑制轴突生长, 神经胞体 Tubulin β III 有表达, 但在轴突表达少, 特别在轴突远端和生长锥几乎无表达; TDZD-8 处理组神经细胞轴突再生、延长, 形成多个轴突, 轴突分支, 轴突干上 Tubulin β III 多处浓聚, 同样轴突分支处也有 Tubulin β III 浓聚。因此, GSK-3 β 的活性对维持神经元极性及微管的组装具有重要作用, 是调节微管聚合、稳定微管的关键点, 适当抑制 GSK-3 β 能导致轴突再生、延长和轴突分支。

3.3 不同浓度 TDZT-8 对神经元轴突生长的作用

目前 GSK-3 β 的抑制剂主要有氯化锂、SB-216763、SB-425286、TDZD-8 及 GSK-3 β 多肽抑制剂, 其中氯化锂 (lithium) 是丝氨酸/苏氨酸激酶的抑制剂, 对 GSK-3 β 抑制的特异性差; SB-425286 及氯化锂对 GSK-3 β 的抑制及促进轴突再生的作用不如 SB-216763、TDZD-8, SB-216763 及 TDZD-8 是目前发现的抑制作用最强、选择性最佳的 GSK-3 β 抑制剂^[15-17]。TDZD-8 是第一个 GSK-3 β 的非 ATP 竞争性抑制剂, 它的半效抑制浓度 (IC₅₀) 是 2 μ M^[17]。Yoshimura 等^[18] 体外试验观察也发现, 氯化锂、SB216763 和 SB415296 等轻度抑制 GSK-3 β , 使已磷酸化 CRMP-2 去磷酸化, 能促进海马神经轴突形成和延长, 形成多个轴突和轴突分支。Zhou 等^[11] 试验观察发现, Nogo 和 CSPGs 都明显影响成年大鼠 DRG 神经元轴突的组装, 导致轴突回缩; 完全抑制 GSK-3 β 不能促进 DRG 神经元轴突再生和延长, 反而抑制轴突生长, 而适度抑制 GSK-3 β 和神经生长因子才能有效克服 Nogo 和 CSPGs 等抑制因子, 促进轴突形成和生长。同样 Kim 等^[19] 小鼠 DRG 神经元体外培养和组织切片实验观察发现, 高浓度多肽抑制剂能完全抑制 GSK-3 β , 导致神经元轴突延长受阻, 缺少分支, 形成宽大生长锥; 而低浓度多肽抑制剂适当抑制 GSK-3 β , 诱导促进轴突生长和延长, 轴突分支, 形成多个轴突。本实验也观察到, 低浓度 (0.5 μ M、1 μ M 和 3 μ M) TDZD-8 能促进脊髓损伤

后新生大鼠 DRG 神经元轴突形成和延长,形成多个轴突和轴突分支。而在 10、15、20、25 μ M TDZD-8 处理组,DRG 神经元轴突生长明显被抑制,轴突明显回缩,仅形成宽大生长锥。其机制是: APC、CRMP-2 和 MAP1 β 对 GSK-3 β 抑制剂的敏感性是不同的,低浓度抑制能使 APC 在轴突干和分支点形成多个聚集点,显著减少 CRMP-2 磷酸化,而高浓度抑制剂明显增加 APC 这些聚集点,几乎完全减少 CRMP-2 磷酸化;低浓度抑制基本不改变 MAP1 β 磷酸化水平,高浓度抑制剂明显减少其磷酸化水平。这样,在低浓度 GSK-3 β 抑制剂作用下,GSK-3 β 部分活性失活,MAP1 β 仍能被磷酸化而 APC/CRMP-2 几乎没被磷酸化,去磷酸化 APC 延轴突多点聚集导致轴突分支,去磷酸化 CRMP-2 致使树突向轴突转化形成多轴突,而 MAP1 β 仍能被磷酸化使轴突延长。相反,高浓度抑制剂完全抑制 GSK-3 β 的活性,导致所有底物去磷酸化,APC 广泛激活和 MAP1 β 完全失活,妨碍微管活性,过度稳定微管,强烈抑制轴突生长,形成粗大轴突,增大生长锥^[17-20]。

4 参考文献

1. Zhou FQ, Snider WD. Cell biology: GSK-3 β and microtubule assembly in axons[J]. Science, 2005, 308(5719): 211-214.
2. Kubo T, Yamaguchi A, Lwata N, et al. The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders [J]. Ther Clin Risk Manag, 2008, 4(3): 605-615.
3. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-12.
4. 胡俊勇, 李佛保, 李先明, 等. 大鼠损伤脊髓提取液对骨髓基质细胞培养特性的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(7): 530-533.
5. Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC[J]. Neuron, 2004, 42(6): 897-912.
6. He Y, Yu W, Baas PW. Microtubule reconfiguration during axonal retraction induced by nitric oxide [J]. J Neurosci, 2002, 22(14): 5982-5991.
7. Yoshimura T, Arimura N, Kaibuchi K. Signaling networks in neuronal polarization[J]. J Neurosci, 2006, 26(42): 10626-10630.
8. Bolsover S, Fabes J, Anderson PN. Axonal guidance molecules and the failure of axonal regeneration in the adult mammalian spinal cord[J]. Restor Neurol Neurosci, 2008, 26(2-3): 117-130.
9. Eickholt BJ, Walsh FS, Doherty P. An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling [J]. J Cell Biol, 2004, 157(2): 211-217.
10. Zhou FQ, Walzer M, Yao-hong Wu, et al. Neurophins support regenerative axon assembly over CSPGs by an ECM-integrin-independent mechanism[J]. J Cell Sci, 2006, 119(13): 2787-2796.
11. Sayas CL, Ariaens A, Ponsioen B, et al. GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(4): 1834-1844.
12. Yoshimura T, Arimura N, Kaibuchi K, et al. Molecular mechanisms of axon specification and neuronal disorders [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1086: 116-125.
13. Jiang H, Guo W, Liang X. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms-critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators[J]. Cell, 2005, 120(1): 123-137.
14. Dill J, Wang H, Zhou F, et al. Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS[J]. J Neurosci, 2008, 28(36): 8914-8928.
15. Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, et al. Treatment with the glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus[J]. Shock, 2008, 30(3): 299-307.
16. Owen R, Gordon-Weeks PR. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β in sensory neurons in culture alters filopodia dynamics and microtubule distribution in growth cones [J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 23(4): 626-637.
17. Martinez A, Alonso M, Castro A. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease [J]. J Med Chem, 2002, 45(6): 1292-1299.
18. Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N. GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity [J]. Cell, 2005, 120(1): 137-149.
19. Kim WY, Zhou FQ, Zhou J. Essential roles for GSK-3 α and GSK-3 β -primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth [J]. Neuron, 2006, 52(6): 981-996.
20. Guzzocrea S, Genovese T, Mazzon E, et al. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition reduces secondary damage in experimental spinal cord trauma [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 318(1): 79-89.

(收稿日期: 2009-07-16 修回日期: 2009-11-09)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)