

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 2/Akt 信号通路对 6-羟基多巴胺处理的 SH-SY5Y 细胞模型的作用及分子机制

李梦一^{1,2} 吴安婷^{1,2} 许泽婷^{1,2} 张庭^{1,3} 李军伟^{1,2} 周鹏^{1,2}
崔怀瑞^{1,2} 孙臣友^{1,2*}

(1.温州医科大学基础医学院解剖学教研室,浙江 温州 325035; 2.温州医科大学基础医学院神经科学研究所,浙江 温州 325035; 3.温州医科大学基础医学院 2020 级,浙江 温州 325035)

[摘要] **目的** 探讨调控哺乳动物雷帕霉素蛋白复合物 2(mTORC2)/Akt 信号通路对 6-羟基多巴胺(6-OHDA)损伤的 SH-SY5Y 细胞系是否具有保护作用,并阐明其分子作用机制。**方法** 经维甲酸(RA)处理的 SH-SY5Y 细胞分别给予 6-OHDA、mTORC2 信号通路抑制剂 PP242 和激动剂 A-443654,通过免疫荧光染色观察各组细胞数目的变化;提取细胞总蛋白进行 Western blotting 和免疫共沉淀(CoIP)实验,明确 mTORC2 信号通路关键蛋白的表达水平及其相互作用;采用流式细胞术检测各组细胞的凋亡率。同时制备 SH-SY5Y 与 Bv-2 细胞系共培养的帕金森病(PD)模型,运用 MTT 及 ELISA 方法检测各组细胞活力及培养上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 β (IL-1 β)的含量。**结果** 6-OHDA 损伤的 PD 细胞模型组酪氨酸羟化酶(TH)/增殖细胞核抗原(PCNA)/Hochest-TH/5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)-单标或双标阳性细胞数较正常组明显减少,凋亡率升高;Rictor、p-Akt、发育及 DNA 损伤反应调节蛋白 1(RED D1)的表达均上升,且 Rictor 与 p-Akt 或 RED D1 存在相互作用;共培养模型中细胞活力明显降低且上清液中 TNF- α 和 IL- β 含量上升。A-443654 组随着上述蛋白表达的进一步上调,细胞存活和凋亡以及炎症因子水平均有明显改善,而 PP242 组则呈现相反的变化。**结论** A-443654 通过使 Akt 磷酸化而激活 mTORC2 信号通路,引起 Rictor 和 RED D1 蛋白的表达增加,继而提高细胞存活率并降低凋亡率,促进 SH-SY5Y 细胞的增殖分化,改善了 6-OHDA 引起的细胞损伤以及抑制了炎症因子的释放。

[关键词] 帕金森病;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 2;PP242;A-443654;免疫荧光;SH-SY5Y 细胞系

[中图分类号] Q189 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2023.05.004

Effect and molecular mechanism of mammalian target of rapamycin complex 2/Akt signaling pathway on 6-hydroxydopamine-treated SH-SY5Y cell model

LI Meng-yi^{1,2}, WU An-ting^{1,2}, XU Ze-ting^{1,2}, ZHANG Ting^{1,3}, LI Jun-wei^{1,2}, ZHOU Peng^{1,2},
CUI Huai-rui^{1,2}, SUN Chen-you^{1,2*}

(1.Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325035, China;

2.Institution of Neuroscience, School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325035, China;

3.2020 Grade School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325035, China)

[Abstract] **Objective** To study whether the regulation of mammalian target of rapamycin complex 2(mTORC2)/Akt signaling pathway has a protective effect on SH-SY5Y cell line damaged by 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and to clarify its molecular mechanism. **Methods** SH-SY5Y cells treated with retinoic acid (RA) were given 6-OHDA, mTORC2 signaling pathway inhibitor PP242 and agonist A-443654 respectively. The changes of cell number in each group were investigated by immunofluorescent staining; The total protein was extracted and the expression level and interaction of key proteins in mTORC2 signaling pathway were determined by Western blotting and co-immunoprecipitation (CoIP); The

[收稿日期] 2022-06-16 **[修回日期]** 2022-07-12

[基金项目] 浙江省自然科学基金(LY22H090004);温州市科技局基础性医疗卫生科技项目(Y20190059)

[作者简介] 李梦一(1997—),女(汉族),河南省郑州市人,硕士。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

Email:sunchenyou1972@aliyun.com Tel:(0577)86689965

apoptosis rate of cells in each group was detected by flow cytometry. At the same time, the co-culture Parkinson's disease (PD) model was made using SH-SY5Y cell line and Bv-2 cell line; MTT colorimetric method was used to detect the cell viability of each group; ELISA was used to detect the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in cell culture supernatant. **Results** The number of tyrosine hydroxylase (TH)/proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/hochest-, TH/5-bronmo-2'-deoxyuridine (BrdU)-labeled positive cells in 6-OHDA-lesioned PD cell model group was significantly lower than that in the normal group; The apoptosis rate was higher; The expression of Rictor, p-Akt and regulated in DNA damage and development 1 (REDD1) was increased; There was an interaction between Rictor and p-Akt or REDD1; The cell viability was significantly reduced in the co-culture model; the content of TNF- α and IL- β increased in the cell culture supernatant. With further up-regulation of the abovementioned protein expressions, the cell survival, apoptosis and pro-inflammatory cytokine levels in A-443654 group were significantly ameliorated, while PP242 group showed the opposite changes. **Conclusion** A-443654 activates mTORC2 signaling pathway by p-Akt, which increases the expression of Rictor and REDD1 protein. These changes contribute to the amelioration in cell survival rate, apoptosis rate, and the proliferation and differentiation and decrease of apoptosis rate of SH-SY5Y cells. These result improved 6-OHDA-induced cell damage and inhibited the release of pro-inflammatory cytokines.

[**Key words**] Parkinson's disease; Mammalian rapamycin target protein 2; PP242; A-443654; Immunofluorescence; SH-SY5Y cell line

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是第2常见的神经退行性疾病^[1],其临床症状主要是运动迟缓、静止性震颤和齿轮样僵硬等^[2],PD主要的病理特征为中脑黑质致密部多巴胺能神经元变性缺失^[3],目前尚未明确导致PD患者多巴胺能神经元变性的原因。有研究表明,在PD患者尸检中发现存在小胶质细胞过度增生的黑质炎症,因此,以小胶质细胞激活为特征的神经炎症被认为是PD多巴胺能神经元退变的重要原因之一^[4]。现今药物和手术等治疗方案虽可在一定程度上缓解PD的临床症状,但均未从根本上解决PD黑质中多巴胺能神经元缺失的问题,因此,积极探索PD治疗的有效手段具有重要的科学价值和临床意义。

磷酸肌醇-3-激酶相关激酶蛋白家族中有一种进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶——哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)^[5],它通过与其他蛋白相结合形成了结构和功能不同的两种复合物:对雷帕霉素敏感的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)和对雷帕霉素不敏感的 mTORC2^[6]。目前对 mTORC1 的研究内容较多,但对 mTORC2 的功能却知之甚少。但是有文献报道,敲除 mTORC2 的关键蛋白 Rictor 可抑制癫痫发作,改善自闭症谱系障碍样行为和长期记忆,并使缺乏磷酸酶和张力蛋白同源物的小鼠大脑中的代谢正常化^[7]。基于此,我们猜想是否能通过调控 mTORC2 信号通路来改善 PD 的病理变化。

调控及 DNA 损伤反应调节蛋白 1 (regulated DNA damage and development 1, REDD1) 是一种应激反应蛋白,正常生理状态下 REDD1 在人体组织中表达较低,但在组织缺氧、过量活性氧产生,DNA

损伤以及慢性炎症的情况下 REDD1 的表达量会明显升高^[8]。文献报道,在应激反应中,REDD1 可能对 mTORC2 信号通路具有一定的调节作用,且依据细胞的种类以及细胞状态的不同而有所不同^[9,10]。

我们拟从细胞水平展开研究,向 SH-SY5Y 细胞培养基及与 Bv-2 共培养的细胞培养基中加入 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine,6-OHDA)制作 PD 细胞模型,然后通过加入 mTORC2 信号通路激动剂和抑制剂来调控该信号通路。采用分子生物学和形态学等多种方法探讨调控 mTORC2 信号通路是否对 6-OHDA 损伤的 mTORC2 SH-SY5Y 细胞具有神经保护作用,并寻找出 mTORC2 信号通路作用的关键靶点来阐明其分子机制。

材料和方法

1. SH-SY5Y 细胞系的培养、分组及给药

将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^8 /L 的浓度接种于培养板,用含 10% FBS (美国 Gibco 公司)的高糖 DMEM/F-12(美国 Gibco 公司)进行培养,待细胞贴壁后,将培养基换成含有 2% FBS 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 维甲酸(retinoic acid, RA,美国 Sigma 公司)的分化培养基,诱导分化细胞 4 d;第 5 天,给予细胞 6-OHDA (美国 Sigma 公司)处理 24 h 和 $2 \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \mu\text{mol/L}$ 及 $8 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 PP242 (美国 MCE 公司)刺激 48 h;或在 6-OHDA 处理后 1 d 给予 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $3 \mu\text{mol/L}$ 及 $6 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 A-443654(美国 MCE 公司)处理细胞 24 h,待获取最适作用浓度后进行后续实验。

2. SH-SY5Y 和 Bv-2 细胞系非接触共培养及给药

将 Bv-2 细胞以 1×10^8 /L 的浓度接种于 24 孔板,待细胞铺满孔底 70%时,按与 SH-SY5Y 细胞相

同的给药方式处理 Bv-2 细胞。收集 Bv-2 细胞的培养基,18 000×g 4 ℃ 离心 5 min 后,替换 SH-SY5Y 细胞的分化培养基,继续培养 24 h,即非接触共培养。

3. MTT 比色法检测细胞活性

将细胞以 1×10^4 /孔的浓度接种于 96 孔板,将细胞分组并按上述方法给药,同时设置调零孔。待细胞处理完成后,弃培养基,加入 100 μ l 新鲜培养基和 10 μ l MTT 溶液(福州飞净生物科技有限公司),放置 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 4 h。之后,弃含有 MTT 溶液的培养基,加入 110 μ l 甲胍(福州飞净生物科技有限公司),在低速摇床上室温振荡 10 min。待结晶充分溶解后,酶联免疫检测仪测定 570 nm 吸光度(absorbance, A)值。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡 (AnnexinV-FITC/PI 双染法)

细胞接种于 6 孔板中并按上述方法给药后,收集细胞,并用预冷的无菌 PBS 离心洗涤细胞两次,取阴性对照组细胞加入凋亡阳性对照液于冰上孵育 30 min。随后 1000 r/min 离心 5 min,用 1×结合缓冲液重悬细胞,加入等量未经处理的活细胞混匀,均分为 3 管:空白对照管、10 μ l PI 单染管、5 μ l Annexin V-FITC 单染管。其余分组经无菌 PBS 洗涤完两次后,加入 500 μ l 1×结合缓冲液重悬细胞,并依次加入 10 μ l PI 和 5 μ l Annexin V-FITC,轻柔涡旋混匀后,室温避光孵育 5 min(该实验中试剂均购自杭州联科生物技术有限公司)。

孵育完成后,在流式细胞仪上检测 Annexin V-FITC[极限(extreme, Ex) = 488 nm;相对长度单位(emphasize, Em) = 530 nm]以及 PI(Ex = 535 nm; Em = 615 nm)。检测数据采用 FlowjoV10 软件处理分析,根据所得二维散点图分析细胞凋亡情况,并计算细胞凋亡率。

5. 免疫荧光细胞化学染色

细胞接种于 24 孔板中并按上述方法给药,弃培养基,用 4%多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 3 次。随后加入下列一抗:兔抗酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)多克隆抗体(1:500, Proteintech 公司)和小鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体(1:2400, Cell Signaling Technology 公司)4 ℃ 孵育过夜。次日,弃一抗, PBS 洗涤 3 次,加入二抗: DyLight™488 山羊抗兔抗体(1:1500, Jackson 公司)和 DyLight™594 山羊抗小鼠抗体(1:1500, Jackson 公司)荧光二抗孵育 1.5 h。 PBS 洗涤 3 次后,用含 Hoechst 的 75%甘油封片,于 4 ℃ 冰箱保存。

为采用 BrdU 标记新生细胞检测细胞的增殖分化,细胞贴壁后,给予 10 μ mol/L BrdU(美国 Sigma

公司)孵育 48 h,再给予其他药物处理,并按上述方法孵育 TH 一抗及荧光二抗。然后重新用 4%多聚甲醛固定细胞,用 2 mol/L HCl 在 37 ℃ 的恒温培养箱中变性 45 min,再加入硼酸钠(pH 8.5)中和 2 次。加入一抗:小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:200, Novus 公司)4 ℃ 摇床孵育 24 h,次日,洗去一抗,加入二抗: DyLight™594 山羊抗小鼠抗体(1:1500, Jackson 公司)室温下孵育 1.5 h 后,洗涤封片,于 4 ℃ 冰箱保存。采用正置荧光显微镜(Nikon, CI-L)对片子进行摄片,最后通过 Image J v1.8.0.112 软件对免疫阳性细胞进行计数。

6. 细胞总蛋白的提取及 Western blotting 蛋白表达的检测

细胞给药处理完成后,每孔加入 250 μ l 放射免疫沉淀法裂解缓冲液(radio immunoprecipitation assay lysis buffere, RIPA)/苯甲基磺酰氟 phenylmethysulfonyl fluoride, PMSF)(100:1)裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),4 ℃ 摇床裂解 20 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清留用,即为细胞总蛋白。蛋白中加入 5×上样缓冲液(上海雅酶生物医药科技有限公司),96 ℃ 金属浴 10 min。在 8%聚丙烯酰胺凝胶下通过 80 V 和 120 V 的电压分离蛋白,根据分子量校准切取目的蛋白所在凝胶,用 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)覆盖其上接通 320 mA 的恒定电流,转膜 70 min。封闭后,在 4 ℃ 摇床与下列特异性一抗孵育过夜:兔抗 Rictor 抗体(Novus 公司, 1:2000)、兔抗 p-Akt 抗体(Cell Signaling Technology 公司, 1:2000)、兔抗 Akt 抗体(Cell Signaling Technology 公司, 1:1000)、小鼠抗 β -actin 抗体(Abgent 公司, 1:2000)、兔抗 REDD1 抗体(Novus 公司, 1:2000)。第 2 天,用 1×TBST 洗涤条带,室温下与含 HRP 的山羊抗兔抗体(Jackson 公司, 1:5000)或山羊抗小鼠二抗(Jackson 公司, 1:5000)孵育 2 h。1×TBST 洗去二抗,用 ECL 化学发光试剂(上海雅酶生物医药科技有限公司)曝光条带, Western blotting 检测结果采用 Image J v 1.8.0.112 软件进行灰度值分析。

7. 免疫共沉淀

用含有 1 μ mol/L PMSF 的裂解缓冲液(上海爱必信生物科技有限公司)冰上裂解细胞 5 min,随后超声破碎 3 次,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清,加入 5 μ l 目的蛋白抗体,同时设置同源非特异性抗体作为阴性对照,4 ℃ 摇床混合过夜。次日,样本中加入 Protein A 和 Protein G(上海爱必信生物科技有限公司)各 5 μ l, 4 ℃ 摇床混匀 3 h, 12 000 r/min 离心 1 min 保留沉淀。洗涤缓冲液清洗沉淀 3 次,加入 40 μ l SDS,涡旋振荡并 12 000 r/min

离心 30 s,96 ℃金属浴加热 5 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 1 min 后取上清。样品检测同 Western blotting。

8. ELISA 检测白细胞介素 1β 和肿瘤坏死因子 α 含量

在酶标板中加入稀释标准品、未经药物处理的细胞培养基和各组细胞培养上清样本各 100 μl,以及 50 μl 稀释后的检测抗体进行孵育。孵育完成后加入 100 μl HRP 标记的链霉亲和素(杭州联科生物技术有限公司),室温振荡 300 r/min 孵育 45 min。然后每孔加入 100 μl 显色底物四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine,TMB,杭州联科生物技术有限公司),室温避光孵育 15 min 后,加入终止液与 TMB 混合均匀。样品通过酶联免疫检测仪采用双波长检测法测定 450 nm 最大吸收波长和 630 nm 参考波长下的 A 值,通过样本 A 值参照标准曲线计算出样本中白细胞介素 1β(interleukin-1β, IL-1β)或肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)的浓度。

9. 统计学分析

所有结果均采集至少 3 次,采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。数据以均值±标准误($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)表示,3 组或 3 组以上统计学差异通过 One-Way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls post hoc 检验进行分析。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极其显著。

结 果

1. mTORC2 信号通路对 6-OHDA 处理的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

采用 MTT 比色法检测不同浓度的 PP242 以及 A-443654 处理后细胞的活力变化。参照文献[11,12],将抑制剂 PP242 设置为 2 μmol/L、4 μmol/L 和 8 μmol/L 的浓度梯度,激动剂 A-443654 设置为 1.5 μmol/L、3 μmol/L 和 6 μmol/L 的浓度梯度。结果显示,与未经任何处理的空白对照组相比,给予 6-OHDA 处理后的细胞活力下降,而给予不同浓度的抑制剂 PP242 处理后,细胞活力均有不同程度的进一步下降,其中 4 μmol/L 浓度 PP242 组除细胞活力下降外,细胞数量也减少至正常组的 50%左右($P<0.001$)。在给予不同浓度的激动剂 A-443654 处理后,1.5 μmol/L 浓度时细胞活力相较于 6-OHDA 组差异并不明显;3 μmol/L 浓度处理组相较于 6-OHDA 组有所提高($P<0.01$),但仍不及空白对照组的细胞活力水平($P<0.05$);6 μmol/L 浓度处理时细胞增长速度虽快却难以贴壁,导致细胞容易脱落死亡,最终细胞活力反而下降($P<0.001$,图 1A,1B)。

这些结果表明,抑制剂 PP242 可以降低细胞活力,抑制细胞生长;而适当浓度的激动剂 A-443654 可以一定程度上恢复细胞的活力,因此,对 6-OHDA

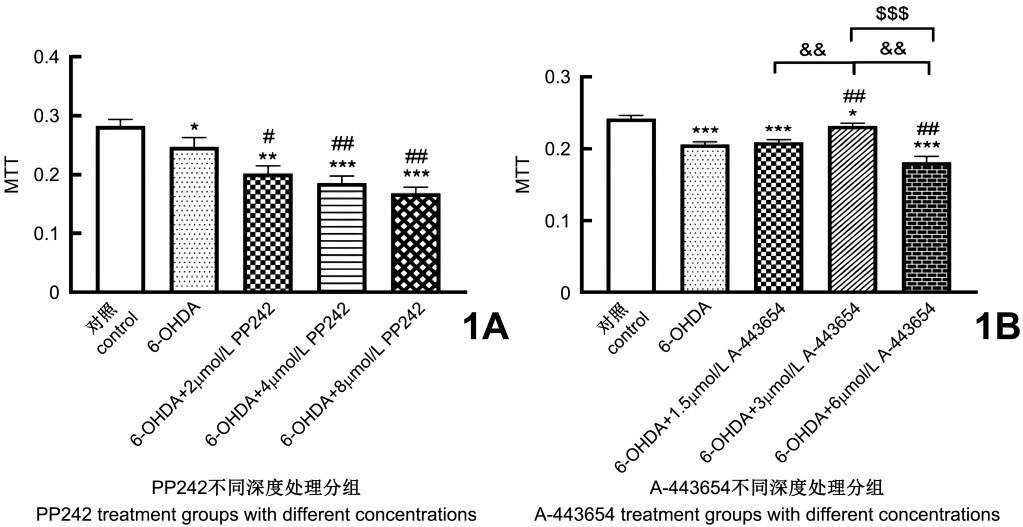


图 1 MTT 法对不同浓度药物处理 SH-SY5Y 细胞活力检测的结果
A. 不同浓度的 PP242 对细胞活力的影响; B. 不同浓度的 A-443654 对细胞活力的影响; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 各组别与空白对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 各组别与 6-OHDA 组相比; && $P<0.01$, 6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组以及 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组相比; &&& $P<0.001$, 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组相比

Fig.1 Results of MTT assay on the viability of SH-SY5Y cells treated with different concentrations of drugs
A, Effects of different concentrations of PP242 on cell viability; B, Effects of different concentrations of A-443654 on cell viability; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, compared with the blank control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with 6-OHDA group; && $P<0.01$, comparison between 6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654 group and 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 group or 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 group; &&& $P<0.001$, comparison between 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 group and 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 groups

损伤的细胞有一定的保护作用。依据上述结果和研究目的,我们最终选择 4 μmol/L PP242 和 3 种不同浓度的 A-443654 进行后续研究。

2. mTORC2 信号通路对 6-OHDA 处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

根据 MTT 实验结果,我们将细胞分为以下 7 组:空白对照组、DMSO + NaCl 组、DMSO + 6-OHDA 组、6-OHDA + 4 μmol/L PP242 组、6-OHDA + 1.5 μmol/L A-443654 组、6-OHDA + 3 μmol/L A-443654 组和 6-OHDA + 6 μmol/L A-443654 组。采用流式细胞术确定 mTORC2 信号通路对 6-OHDA 处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响。依据流式细胞术测得的结果计算各组细胞的凋亡率,结果显示,6-OHDA 损伤组的细胞凋亡率明显高于空白对照组和 DMSO + NaCl 组 ($P < 0.0001$);6-OHDA + PP242 组细胞凋亡率升高更加明显 ($P < 0.0001$),凋亡率为所有组别中最高;给予 1.5 μmol/L 和 3 μmol/L A-443654 激动该通路后细胞的凋亡率较 6-OHDA 损伤组均明显下降 ($P < 0.0001$),其中 3 μmol/L A-443654 组下降的

最为显著 ($P < 0.001$);而给予 6 μmol/L A-443654 激动该通路后细胞的凋亡率反而比 6-OHDA 损伤组有所上升 ($P < 0.05$),但凋亡水平低于 6-OHDA + PP242 组(图 2A~2H)。

3. mTORC2 信号通路对 6-OHDA 处理的 SH-SY5Y 细胞增殖和分化能力的影响

为明确 mTORC2 信号通路对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞的增殖和分化能力的影响,采用免疫荧光化学染色法检测 TH、PCNA、Hoechst 阳性细胞、TH/PCNA/Hoechst 共标记细胞以及 TH、BrdU 阳性细胞、TH/BrdU 双标记细胞的数量。

3.1 各组 TH、PCNA 与 Hoechst 的单标及共标记阳性细胞数目的结果:与空白对照组和 DMSO + NaCl 组相比,DMSO + 6-OHDA 组 TH、PCNA 与 Hoechst 的单标及共标记阳性细胞数目均明显减少 ($P < 0.001$);6-OHDA + 4 μmol/L PP242 组各阳性细胞的数量比 DMSO + 6-OHDA 组减少更为显著 ($P < 0.0001$);1.5 μmol/L 浓度的 A-443654 组与 DMSO + 6-OHDA 组相比,细胞增殖分化能力的变化并不明

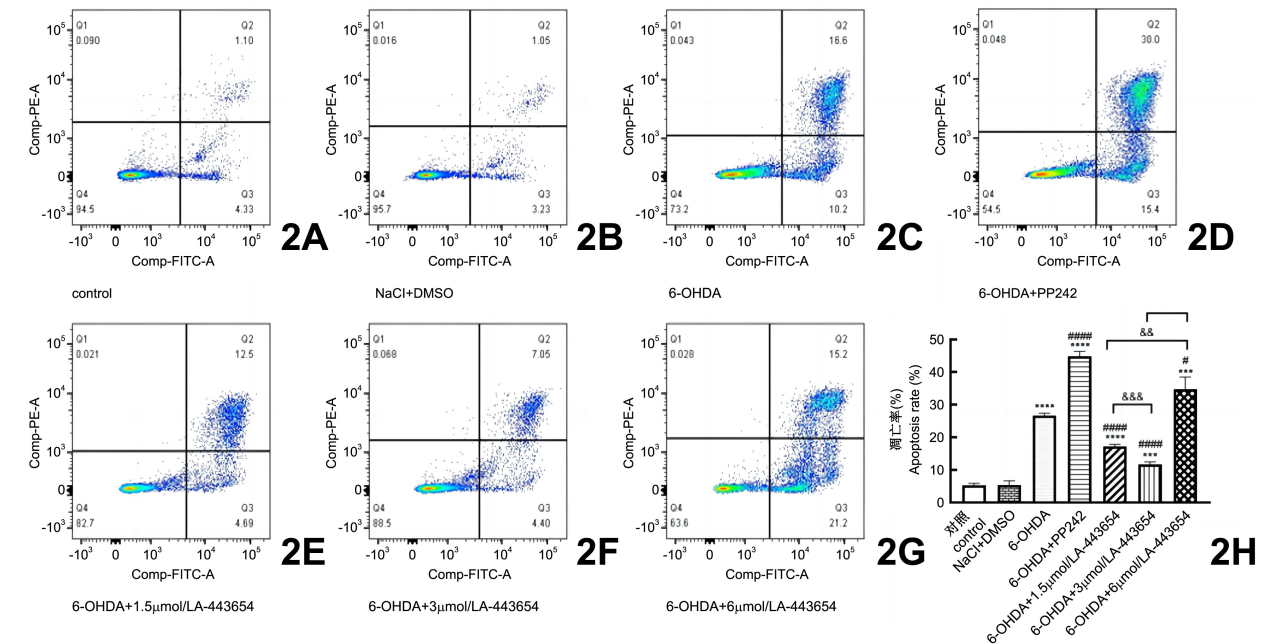


图2 流式细胞术检测结果及凋亡率统计图

A~G. 流式细胞散点图; A. 空白对照组; B. DMSO+NaCl 组; C. DMSO+6-OHDA 组; D. 6-OHDA + 4 μmol/L PP242 组; E. 6-OHDA + 1.5 μmol/L A-443654 组; F. 6-OHDA + 3 μmol/L A-443654 组; G. 6-OHDA + 6 μmol/L A-443654 组; H. 各组细胞凋亡率统计图; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 各组别与空白对照组相比; # $P < 0.05$, #### $P < 0.0001$, 各组别与 6-OHDA 组相比; && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$, 6-OHDA + 1.5 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA + 3 μmol/L A-443654 组以及 6-OHDA + 6 μmol/L A-443654 组相比; \$\$\$ $P < 0.001$, 6-OHDA + 3 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA + 6 μmol/L A-443654 组相比

Fig.2 Ratio of apoptotic cells by flow cytometric analysis

A-G, Scatting plot from flowcytometry analysis; A, control group; B, DMSO+NaCl group; C, DMSO+6-OHDA group; D, 6-OHDA+4 μmol/L PP242 group; E, 6-OHDA+1.5 μmol/L A-44365 group; F, 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 group; G, 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 group; H, Statistical chart of apoptotic ratio, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with the blank control group; # $P < 0.05$, #### $P < 0.0001$, compared with 6-OHDA group; && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$, comparison between 6-OHDA + 1.5 μmol/L A-443654 group and 6-OHDA + 3 μmol/L A-443654 group or 6-OHDA + 6 μmol/L A-443654 group; \$\$\$ $P < 0.001$, comparison between 6-OHDA + 3 μmol/L A-443654 group compared and 6-OHDA + 6 μmol/L A-443654 group

显 ($P>0.05$); $3\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度的 A-443654 组相比于 DMSO+6-OHDA 组的各阳性细胞的数量有明显的增加,能够部分逆转 6-OHDA 所致的细胞增殖分化能力的下降 ($P<0.0001$); 而 $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度的 A-443654 组各阳性细胞数量略少于 DMSO+6-OHDA 组 ($P<0.05$, 图 3A~3H)。

3.2 各组 TH 与 BrdU 单标及共标阳性细胞数目的结果:与空白对照组和 DMSO+NaCl 组相比, DMSO+6-OHDA 组无论是 TH、BrdU 还是 TH/BrdU 双标记细胞数量都明显减少 ($P<0.001$); $4\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度的 PP242 组,各阳性细胞的数量比 DMSO+6-OHDA 组减少更为明显 ($P<0.0001$); A-443654 各浓度组阳性细胞变化趋势同结果 3.1 (图 4A~4H)。3.1 和 3.2 的结果提示,只有在最适浓度下的 mTORC2 信号通路的激动剂才能够促进新生的 SH-SY5Y 细胞的增殖及向多巴胺能神经元分化。

4.mTORC2 信号通路各关键蛋白及 REDD1 蛋白表达情况

为确定 mTORC2 信号通路激动剂和抑制剂对该通路关键蛋白表达的影响,用 Western blotting 检测 mTORC2 信号通路支架蛋白 Rictor 及其下游蛋白 Akt、p-Akt 以及 REDD1 蛋白的表达。结果表明,6-OHDA 损伤组 Rictor、p-Akt、REDD1 蛋白表达均比空白对照组和 DMSO+NaCl 组升高 ($P<0.001$); $1.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ A-443654 组上述蛋白表达与 6-OHDA 损伤组差别不大 ($P>0.05$); $3\text{ }\mu\text{mol/L}$ A-443654 组上述蛋白表达较 6-OHDA 损伤组上升的更为显著 ($P<0.0001$); $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ A-443654 组上述蛋白的表达相比于空白对照组和 DMSO+NaCl 组均有明显升高。抑制剂 PP242 组 Rictor、p-Akt 蛋白的表达与空白对照组和 DMSO+NaCl 组相比显著下降 ($P<0.05$),比 6-OHDA 损伤组下降的更为显著 ($P<0.001$),但 REDD1 蛋白表达却高于空白对照组和 DMSO+NaCl 组,而低于其他各组 ($P<0.05$)。此外,总的 Akt 蛋白表达各组间无明显变化 ($P>0.05$, 图

5A~5D)。

上述结果表明,6-OHDA 造成的损伤可引起 Rictor 和 p-Akt 以及与损伤相关蛋白 REDD1 的表达升高;抑制 mTORC2 信号通路后 Rictor 和 p-Akt 的表达下降,REDD1 表达升高;激活 mTORC2 信号通路后 Rictor、p-Akt 和 REDD1 的表达进一步升高,且 REDD1 可能与 Rictor 或 p-Akt 存在关联。

5. Co-IP 验证 Rictor/REDD1、p-Akt/REDD1 以及 Rictor/p-Akt 的相互作用

为了验证 REDD1 是否与 mTORC2 信号通路的关键蛋白 Rictor 及下游靶蛋白 Akt 之间存在相互作用,进行了免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, CoIP) 检测。结果显示, Rictor 和 p-Akt 作为 mTORC2 信号通路的关键蛋白确实存在相互作用; REDD1 与 Rictor 之间也存在相互作用,而 REDD1 与 p-Akt 无明显的相互作用关系 (图 6A,6B)。

6. mTORC2 信号通路对促炎因子 IL-1β 和 TNF-α 水平的影响

为探讨 6-OHDA 诱导的促炎因子对 REDD1 蛋白表达的影响以及激活 mTORC2/Akt 信号通路对其的作用,我们采用 SH-SY5Y 和小胶质细胞系 Bv-2 非接触共培养模型细胞来检测细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 的炎性因子的水平。

ELISA 结果显示,6-OHDA 损伤组细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 的含量较空白对照组和 DMSO+NaCl 组明显升高 ($P<0.0001$); 6-OHDA+PP242 组 IL-1β 和 TNF-α 的含量较 DMSO+6-OHDA 组进一步升高 ($P<0.0001$); $1.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ A-443654 组 IL-1β 和 TNF-α 的含量明显高于空白对照组和 DMSO+NaCl 组 ($P<0.001$),但较 DMSO+6-OHDA 组略下降 ($P<0.05$); $3\text{ }\mu\text{mol/L}$ A-443654 组 IL-1β 和 TNF-α 的含量明显低于 DMSO+6-OHDA 组 ($P<0.001$),但仍高于空白对照组和 DMSO+NaCl 组 ($P<0.001$); $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ A-443654 组 IL-1β 和 TNF-α 的含量较 DMSO+6-OHDA 组略有增加 ($P<0.05$, 表 1)。

表 1 各组细胞培养上清中 IL-1β 和 TNF-α 含量的测定和比较

Table 1 Concentration and comparison of IL-1β and TNF-α in cell culture supernatant

组别 groups	IL-1β 含量 (ng/L) IL-1β concentration (ng/L)	TNF-α 含量 (ng/L) TNF-α concentration (ng/L)
空白对照组 (control group)	4.04±0.1	49.63±4.675
DMSO+NaCl	4.84±1.8	67.003±7.975
DMSO+6-OHDA	23.609±1.645 ****	1181.176±60.53 ****
6-OHDA+PP242	34.662±3.35 ****,###	1773.331±103.47 ****,###
6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654	22.936±5.025 ***,#	1081.78±72.655 ****,#
6-OHDA+3 μmol/L A-443654	16.122±2.55 ***,###	730.894±75.625 ****,###
6-OHDA+6 μmol/L A-443654	28.984±4.715 ****,#	1414.586±107.845 ****,##

*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 各组与空白对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$, 各组与 DMSO+6-OHDA 组相比
*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, compared with the blank control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$, compared with the DMSO+6-OHDA group

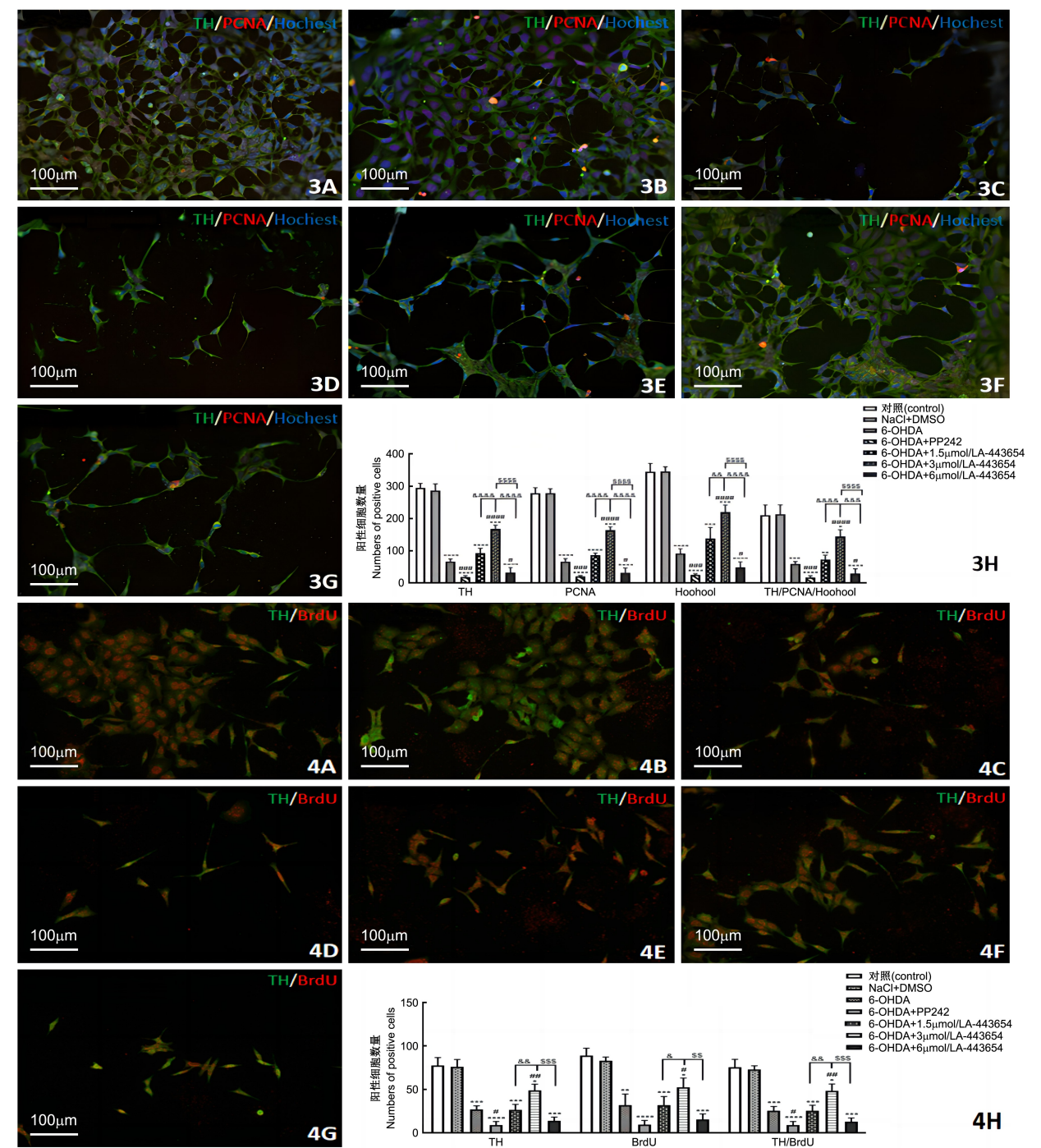


图3 SH-SY5Y 细胞 TH/PCNA/Hoechst 共标记阳性细胞及统计图

A. 空白对照组; B. DMSO+NaCl 组; C. DMSO+6-OHDA 组; D. 6-OHDA+4 μmol/L PP242 组; E. 6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654 组; F. 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组; G. 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组; TH 为绿色荧光标记胞膜、PCNA 为红色荧光标记细胞核、Hoechst 为蓝色荧光标记细胞核,标尺示 100 μm; H. TH-、PCNA-、Hoechst-阳性细胞以及 TH/PCNA/Hoechst 共标记细胞数目统计图; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; 各组别与空白对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 各组别与 6-OHDA 组相比; & $P<0.05$, && $P<0.01$, 6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组以及 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组相比; \$\$\$ $P<0.01$, \$\$\$\$ $P<0.001$, 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组相比

图4 SH-SY5Y 细胞 TH/BrdU 共标记阳性细胞及统计图

A. 空白对照组; B. DMSO+NaCl 组; C. DMSO+6-OHDA 组; D. 6-OHDA+4 μmol/L PP242 组; E. 6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654 组; F. 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组; G. 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组; TH 为绿色荧光标记胞膜、BrdU 为红色荧光标记细胞核,标尺示 100 μm; H. TH-、BrdU-阳性细胞以及 TH/BrdU 共标记细胞数目统计图; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 各组别与空白对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 各组别与 6-OHDA 组相比; & $P<0.05$, && $P<0.01$, 6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组以及 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组相比; \$\$\$ $P<0.01$, \$\$\$\$ $P<0.001$, 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 组与 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 组相比

Fig.3 SH-SY5Y cells TH/PCNA/Hoechst labeled positive cells and statistical chart

A, Control group; B, DMSO+NaCl group; C, DMSO+6-OHDA group; D, 6-OHDA+4 μmol/L PP242 group; E, 6-OHDA+1.5 μmol/L A-443654 group; F, 6-OHDA+3 μmol/L A-443654 group; G, 6-OHDA+6 μmol/L A-443654 group; H, TH/PCNA/Hoechst labeled positive cells and statistical chart

group; F, 6-OHDA+3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group; G, 6-OHDA+6 $\mu\text{mol/L}$; A-443654 group; TH (green fluorescent), PCNA (red fluorescent), Hoechst (blue fluorescent); Bar=100 μm ; H, Number of TH-, PCNA-, Hoechst-positive cells and TH/PCNA/Hoechst-labelled positive cells; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, compared with the blank control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with 6-OHDA group; & $P<0.05$, && $P<0.01$, comparison between 6-OHDA+1.5 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group and 6-OHDA+3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group or 6-OHDA+6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group; \$\$\$ $P<0.01$, \$\$\$\$ $P<0.001$, comparison between 6-OHDA+3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group and 6-OHDA+6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group

Fig.4 SH-SY5Y cells TH/BrdU labeled positive cells and statistical chart

A. Control group; B. DMSO+NaCl group; C. DMSO+6-OHDA group; D. 6-OHDA+4 $\mu\text{mol/L}$ PP242 group; E. 6-OHDA+1.5 $\mu\text{mol/L}$ A-44365 group; F. 6-OHDA + 3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group; G. 6-OHDA + 6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group; TH, green fluorescent; BrdU, red fluorescent; Bar=100 μm ; H, Statistical chart of TH-, BrdU-positive cells and TH/BrdU-labelled positive cells; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, compared with the blank control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with 6-OHDA group; & $P<0.05$, && $P<0.01$, comparison between 6-OHDA+1.5 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group and 6-OHDA+3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group or 6-OHDA+6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group; \$\$\$ $P<0.01$, \$\$\$\$ $P<0.001$, comparison between 6-OHDA+3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group and 6-OHDA+6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group

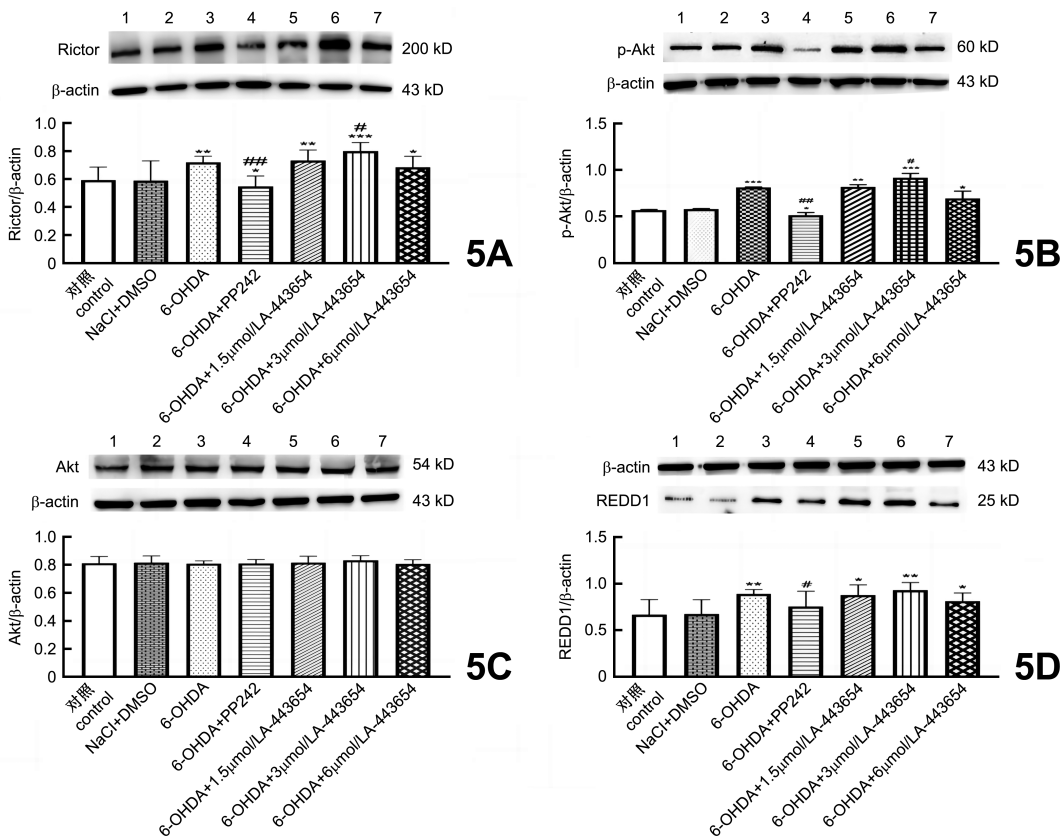


图5 SH-SY5Y 细胞 mTORC2 信号通路 Rictor、p-Akt 及 REDD1 蛋白的检测结果

A. 各组 Rictor 蛋白; B. p-Akt 蛋白; C. Akt 蛋白; D. REDD1 蛋白的 Western blotting 测定结果; 序号 1~7 分别表示空白对照组、DMSO+NaCl 组、DMSO+6-OHDA 组、6-OHDA+4 $\mu\text{mol/L}$ PP242 组、6-OHDA+1.5 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 组、6-OHDA+3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 组、6-OHDA+6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 各组与空白对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 各组与 DMSO +6-OHDA 组相比

Fig.5 Expression levels of Rictor, p-Akt and Akt proteins in mTORC2 signaling pathway, as well as REDD1 protein in SH-SY5Y cells Western blotting showing the protein bands including (A) Rictor, (B) p-Akt, (C) Akt and (D) REDD1 among groups; Serial numbers 1-7 indicate control group, DMSO+NaCl group, DMSO+6-OHDA group, 6-OHDA+4 $\mu\text{mol/L}$ PP242 group, 6-OHDA+1.5 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group, 6-OHDA+3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group and 6-OHDA+6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 group, respectively; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, compared with the blank control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with the 6-OHDA group

7. mTORC2 信号通路对 6-OHDA 作用的 SH-SY5Y 和 Bv-2 非接触共培养细胞活力的影响

为验证 6-OHDA 诱导小胶质细胞释放的促炎因子是否影响 SH-SY5Y 的细胞活力以及 mTORC2 信号通路对这一过程所起的作用,采用 MTT 法检测 SH-SY5Y 和 Bv-2 非接触共培养细胞的活力。结果表明,与空白对照组和 DMSO + NaCl 组相比,

6-OHDA 损伤组的细胞活力明显下降($P<0.001$),且 6-OHDA+PP242 组的细胞活力下降的更为明显($P<0.0001$);1.5 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 组与 6-OHDA 组相比,细胞活力无明显变化($P>0.05$);3 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 组较 6-OHDA 损伤组细胞活力有明显的提高($P<0.0001$),但仍不及空白对照组和 DMSO + NaCl 组($P<0.05$);6 $\mu\text{mol/L}$ A-443654 组细胞活力



图6 Rictor 与 p-Akt 和 REDD1 的免疫共沉淀
A. 免疫印迹法分析 Rictor 与 p-Akt 免疫共沉淀的结果; B. 免疫印迹法分析 Rictor 与 REDD1 免疫共沉淀的结果; p-Akt 和 REDD1 蛋白免疫印迹条带分别在 60 kD 和 25 kD; IB. 免疫印迹; IP. 免疫沉淀

Fig.6 Immunocoprecipitation of Rictor with p-Akt and REDD1
Immuno-coprecipitation of Rictor and p-Akt (A) and Rictor and REDD1 (B) was analyzed by Western blotting; Molecular weight of protein bands was 60 kD for p-Akt and 25 kD for REDD1, respectively; IB, Immunoblotting; IP, Immunoprecipitation

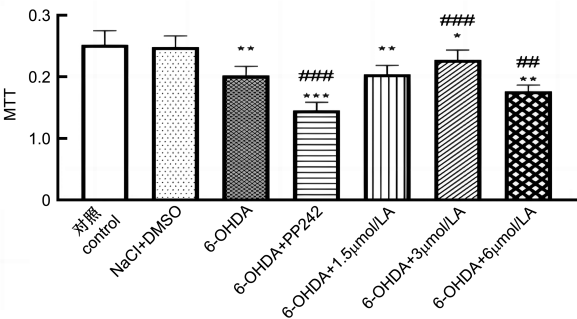


图7 SH-SY5Y 和 Bv-2 非接触共培养 PD 模型细胞活力
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 各组别与空白对照组相比; #### $P<0.01$, ### $P<0.001$, 各组别与 DMSO+6-OHDA 组相比
Fig.7 Cells viability of SH-SY5Y and BV-2 non-contact co-culture cells
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, compared with the blank control group; ### $P<0.01$, #### $P<0.001$, compared with the 6-OHDA group

较 6-OHDA 损伤组有所下降 ($P<0.001$), 见图 7。

讨 论

SH-SY5Y 神经母细胞瘤样细胞是母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 的一个亚克隆^[13]。据报道,采用向维甲酸(retinoic acid, RA)诱导分化的 SH-SY5Y 细胞中加入 6-OHDA 可制备 PD 体外细胞模型,选择这个细胞系是因为它起源于人类,且具有儿茶酚胺能(尽管不是严格的多巴胺能)神经元的特性及易于培养^[14]。6-OHDA 作为 PD 模型的神经毒性药物可导致细胞发生氧化应激而死亡^[15]。在本实验中,我们使用同样的方法处理细胞建立 PD 细胞模型进行体外相关方面的研究。

mTOR 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,它会影响 mRNA 转录、蛋白质翻译,细胞信号传导以及细胞代谢等。目前,mTOR 已被证实可参与神经细胞的发育、成熟及其功能^[6]。mTOR 包含两种复合物,我们主要关注 mTORC2。最早关于 mTORC2 在神经元中的报道是来自其对果蝇树突发生作用的研究^[16]。研究发现,敲低 Rictor 后导致 mTORC2 活力下降,且降低 Akt 的磷酸化水平继而抑制树突的发生,因此将 Rictor 作为 mTORC2 关键蛋白,而 Akt 被确定为

mTORC2 下游的靶分子^[12]。敲除 Rictor 的小鼠除了表现出较低磷酸化水平的 Akt 外,研究人员还发现,敲低 Rictor 可导致小鼠脑内多巴胺能信号的中断^[17]。我们主要研究 mTORC2 信号通路对 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用。通过激动剂 A-443654 和抑制剂 PP242 调控 mTORC2 信号通路的关键蛋白分子,联合免疫荧光等结果,我们发现给予抑制剂 PP242 处理后, mTORC2 信号通路的关键蛋白 Rictor 和 p-Akt 的表达量明显下降,这与文献报道的结果相一致^[18];同时该组细胞的存活能力及增殖分化能力明显降低,且伴随着凋亡率和炎症因子含量的增加。另外, A-443654 因其可提高 Akt Ser473 位点的磷酸化水平,一直被用作 mTORC2 信号通路的激动剂^[19]。有文献报道, A-443654 可通过增强老年小鼠 mTORC2 的活性使其记忆恢复到年轻小鼠的水平^[20]。本研究发现, A-443654 可以增加 SH-SY5Y 细胞的增殖和分化能力,降低 6-OHDA 造成的损伤,提高细胞活力,但是这种修复能力是有限的,存在浓度依赖效应。

REDD1(又称 RTP801)是一种应激诱导蛋白,炎症刺激下 REDD1 表达会增加^[21],但 REDD1 在不同细胞类型的应激反应中具有促存活或促凋亡的双重作用^[8]。例如,有研究发现,在过度表达 REDD1 的肺癌细胞中, Akt Ser473 位点的磷酸化水平显著增加^[9],这与我们使用 6-OHDA 处理的 SH-SY5Y 细胞,在用 A-443654 激活 mTORC2 信号通路后, Western blotting 检测的结果“除引起 Rictor 蛋白及 Akt 的磷酸化水平增加外, REDD1 蛋白的表达也进一步增加”相一致。另外,通过 CoIP 实验,我们发现, Rictor 与 p-Akt 和 REDD1 之间均存在相互作用。

据报道,在 PD 患者的纹状体和脑脊液中检测到 TNF-α、IL-1β 等促炎因子的增加,已证明, PD 患者脑脊液中高浓度的促炎因子对体外培养的多巴胺能神经元具有毒性作用^[22],加之长期以来小胶质细胞的激活一直被认为是 PD 发生的重要原因之一^[23]。本研究采用 SH-SY5Y 与 Bv-2 共培养的细胞模型来模拟脑内真实的复杂环境,并通过 ELISA

检测共培养的细胞上清液中促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的水平,结果表明,6-OHDA 组 TNF- α 和 IL-1 β 的水平明显升高,与上述文献报道相一致。另有研究表明,PP242 可发挥促炎作用并促进细胞死亡^[24],与我们的实验结果“使用 PP242 抑制 mTORC2 信号通路可导致促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平上调”相一致,但给予 A-443654 处理后的 mTORC2 信号通路激动剂组,促炎因子水平则明显下降,表明调控 mTORC2 信号通路是可以改变 6-OHDA 所致的炎症反应。

由于 REDD1 与炎症应激有关,而 PD 的产生与神经炎症密不可分。根据我们的实验结果推测,炎症可引起 REDD1 表达升高,后者通过与 Rictor 的相互作用,引起 Rictor 的表达增加,继而引起其下游的靶蛋白 Akt 的磷酸化水平增加。此外,在激活 mTORC2 信号通路后,Rictor 和 p-Akt 的表达量均进一步升高,这也进一步增加了 REDD1 的表达量,这些升高的蛋白水平单独或共同作用于 SH-SY5Y 细胞,促进其增殖和分化能力的增强并增加了细胞的存活率,后者直接或间接引起细胞上清液中促炎因子水平及细胞凋亡率的下降,但具体的调节机制还需进一步研究。

综上所述,通过激活 mTORC2 信号通路可以促进 SH-SY5Y 细胞的增殖分化,改善 6-OHDA 损伤 PD 模型细胞的存活率,降低细胞的凋亡率且抑制促炎因子水平的升高,因此,调控 mTORC2 信号通路的关键蛋白可能为临床上预防和治疗 PD 提供新的靶点和思路。

参 考 文 献

[1] Malar DS, Prasanth MI, Brimson JM, et al. Neuroprotective properties of green tea (*Camellia sinensis*) in Parkinson’s disease: a review[J]. *Molecules*, 2020, 25(17):3926.

[2] Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease[J]. *CMAJ*, 2016, 188(16):1157-1165.

[3] Nutt JG, Wooten GF. Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson’s disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10):1021-1027.

[4] Sarkar S, Nguyen HM, Malovic E, et al. Kv1.3 modulates neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson’s disease [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(8):4195-4212.

[5] Hare SH, Harvey AJ. mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer[J]. *Am J Cancer Res*. 2017;7(3):383-404.

[6] Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, et al. Molecular neurobiology of mTOR[J]. *Neuroscience*, 2017, 341:112-153.

[7] Chen CJ, Sgritta M, Mays J, et al. Therapeutic inhibition of mTORC2 rescues the behavioral and neurophysiological abnormalities associated with Pten-deficiency[J]. *Nat Med*, 2019, 25(11):1684-1690.

[8] Pérez-Sisqués L, Solana-Balaguer J, Campoy-Campos G, et al. RTP801/REDD1 is involved in neuroinflammation and modulates cognitive dysfunction in Huntington’s disease[J]. *Biomolecules*,

2021, 12(1):34.

[9] Jin HO, Hong SE, Kim JH, et al. Sustained overexpression of Redd1 leads to Akt activation involved in cell survival[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336(2):319-324.

[10] Britto FA, Dumas K, Giorgetti-Peraldi S, et al. Is REDD1 a metabolic double agent? Lessons from physiology and pathology[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(5):C807-C824.

[11] Lu Z, Zhang Y, Xu Y, et al. mTOR inhibitor PP242 increases antitumor activity of sulforaphane by blocking Akt/mTOR pathway in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(1):451-461.

[12] Han EK, Levenson JD, McGonigal T, et al. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition[J]. *Oncogene*, 2007, 26(38):5655-5661.

[13] Ponzoni M, Bachetti T, Corrias MV, et al. Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1):92.

[14] Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1):10.

[15] Wang TT, Ye X, Bian W, et al. Allopregnanolone modulates GABAAR-dependent CaMK II δ 3 and BDNF to protect SH-SY5Y cells against 6-OHDA-induced damage [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2021, 52(1):5-13.(in Chinese)

王彤彤,叶鑫,边维等. 别孕烯醇酮对 6-羟基多巴胺损伤的细胞系 SH-SY5Y 的保护作用[J]. *解剖学报*, 2021, 52(1):5-13.

[16] Kilo L, Stürner T, Tavasani G, et al. Drosophila dendritic arborisation neurons: fantastic actin dynamics and where to find them[J]. *Cells*, 2021, 10(10):2777.

[17] Siuta MA, Robertson SD, Kocalis H, et al. Dysregulation of the norepinephrine transporter sustains cortical hypodopaminergia and schizophrenia-like behaviors in neuronal rictor null mice[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(6):e1000393.

[18] Urbanska M, Gozdz A, Swiech LJ, et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36):30240-30256.

[19] Laguesse S, Morisot N, PhamLuong K, et al. mTORC2 in the dorsomedial striatum of mice contributes to alcohol-dependent F-Actin polymerization, structural modifications, and consumption [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43(7):1539-1547.

[20] Johnson JL, Huang W, Roman G, et al. TORC2: a novel target for treating age-associated memory impairment[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15193.

[21] Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(23):2893-2904.

[22] Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson’s disease: role for cytokines[J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(8): 999-1016.

[23] Doorn KJ, Moors T, Drukarch B, et al. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson’s disease patients[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2:90.

[24] Fan W, Cheng K, Qin X, et al. mTORC1 and mTORC2 play different roles in the functional survival of transplanted adipose-derived stromal cells in hind limb ischemic mice via regulating inflammation in vivo[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(1):203-214.

(编辑 安晓意)