论著

文章编号:1000-5404(2006)03-0192-03

缺氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞 Akt mRNA 表达的变化

易 斌,钱桂生,白 莉,王关嵩 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 通过观察缺氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cell,PASMC)3 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt1、Akt2、Akt3)mRNA 的表达水平变化,初步探讨 Akt 信号途径在缺氧肺动脉高压(hypoxia pulmonary hypertension,HPH)血管重建中的作用。**方法** 组织贴片法建立纯 PASMC 细胞系。采用半定量 RT-PCR 技术检测常氧组(N 组)、低氧 2、8、12、24 组的 Akt1、Akt2 和 Akt3 基因 mRNA 的表达水平。**结果** 建立了纯 PASMC 细胞系。各组均检测出 Akt1、Akt2 和 Akt3 基因的 mRNA,图像定量分析光值显示各组表达的 mRNA 含量与缺氧时限存在一定的关系。**结论** Akt 信号通路可能是大鼠缺氧肺动脉高压中 PASMC 增殖和分化的重要传导途径,其中 Akt1 可能起主要作用。

关键词:平滑肌细胞;丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶;缺氧肺动脉高压

中图法分类号:R322.121;R364.4;R394.2 **文献标识码**:A

Changes of Akt mRNA expression in rat pulmonary arterial smooth muscle cells induced by hypoxia

YI Bin, QIAN Gui-sheng, BAI Li, WANG Guang-song (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the changes of Akt1, Akt2, Akt3 mRNA expression level in rat pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) induced by hypoxia and to investigate the value of Akt signaling pathway in vascular reconstruction during phyoxia pulmonary hypertension (HPH). Methods The pure PASMCs were established by tissue-sticking methods. Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to examine the Akt1, Akt2 and Akt3 mRNA expression after PASMCs were exposed to normoxia (21% O_2) or hypoxia (3% O_2) for 2, 8, 12 and 24 h respectively. Results The pure PASMCs were established. The mRNA of Akt1, Akt2, Akt3 could be detected in all groups. Exposed to hypoxia, the mRNA expression levels gradually increased, reached the peak at 8 h, then decreased, and at 24 h down to the level under normoxia. As compared with that exposed to normoxia, the mRNA expression levels of Akt1 at 2, 8, 12, 24 h, Akt2 at 8 h, Akt3 at 8 h in PASMCs exposed to hypoxia showed significant difference ($P < 0.05$). There was a significant difference in the mRNA expression of Akt1, Akt2, Akt3 between at 2 h and 8 h, as well as Akt1 at 12, 24 h, Akt2 at 12 h, Akt3 at 24 h with all at 8 h. Conclusion Akt signaling pathway might play an important role in the PASMCs proliferation and differentiation during hypoxia pulmonary hypertension. Akt1 may be the most important one.

Key words: pulmonary arterial smooth muscle cell; Akt; hypoxia pulmonary hypertension

近几年来,以肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cell, PASMC)为研究模型探讨缺氧肺动脉高压(hypoxia pulmonary hypertension,HPH)中血管重建的细胞内信号传导通路已经成为研究热点。目前研究主要集中在 STATs 途径、MLCK 途径和 PKC 途径。由于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase,Akt)参与的经磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase,PI3K)激活的细胞内信号通路与 PASMCs 的分化、生长、凋亡和迁移等多种生物学活动密切相关[1,2],因此 Akt 家族可能是 HPH 中血管重建中 PASMC 异常分化和增殖的重要调节基因之一,但是在此方面还缺乏研究。本研究通过观察缺氧致 PASMC 3 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt1、Akt2、Akt3)mRNA 的表达水平变化,旨在初步探讨 Akt 信号途径在缺氧肺动脉高压(HPH)血管重建中的作用,为缺氧肺动脉高压发生机制的阐明和防治提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

低糖 EMEM 培养基(PAA,美国),D-Hanks 液(hyclone,美

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400200)
Supported by National Natural Science Foundation of China(30400200)

作者简介:易 斌(1974-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事缺氧肺动脉重建的信号转导机制方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:13508370131

通讯作者:白 莉,电话:13983271873

收稿日期:2005-10-17;修回日期:2005-12-01

国），小鼠抗大鼠 α-SM-actin 单克隆抗体（BM002，武汉博士德），S-P 免疫组化试剂盒（SA1021，武汉博士德），AMV 逆转录酶（Promega，美国），Taq DNA 聚合酶、Oligo（dT）$_{15}$、dNTP（北京鼎国生物技术发展公司），其余试剂均为国产分析纯。自动常压缺氧孵箱（贺氏，德国）。Alpha Innotech 凝胶成像分析系统（Alpha Innotech，美国）。PTC-200DNA 扩增仪（MT research，美国）。

1.2　PASMC 的培养及分组

1.2.1　原代培养　　购自本校实验动物中心的 SD 大鼠，体质量 180～220 g，无菌环境下迅速取出心肺组织，在超净工作台直视下分离解剖肺主动脉主干。组织贴块法原代培养 PASMC。细胞长成单层和多层交错的致密细胞层，0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2　传代细胞纯化及鉴定　　采用 3 瓶序列法进行除去可能混入的内皮细胞和成纤维细胞[3]。采用小鼠抗大鼠 α-SM-actin 免疫组织化学染色鉴定，根据 S-P 法的常规操作进行，以细胞质中与细胞长轴相平行的细丝状棕黄色免疫沉淀为阳性结果。

1.2.3　分组　　第 4～9 代 PASMC 细胞用于实验。相同密度（$10^6/cm^2$）接种后分为常氧（21% O_2）（N）和 3% O_2 缺氧 2 h（H2）、8 h（H8）、12 h（H12）、24 h（H24）进行各指标的检测。待细胞长至瓶底 80% 左右换含 0.1% 胎牛血清 DMEM 培养基同步生长 24 h，随后进行缺氧处理。

1.3　RT-PCR 检测 Akt1、Akt2 和 Akt3 基因 mRNA 的表达

1.3.1　各组总 RNA 的提取和检测　　Tripure 试剂盒提取各组的总 RNA，1% 琼脂糖凝胶电泳检测证实无降解，紫外分光光度计测定纯度并定量，吸光度 $D(260)/D(280)$ 比值均在 1.85 左右。取 2 μg 总 RNA 进行逆转录后各取 5 μl 产物进行 PCR。内参以及各基因的引物情况见表 1。反应条件：95 ℃ 2 min；94 ℃ 50 s，退火温度 50 s，72 ℃ 90 s，30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。扩增完成后，取 10 μl PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳，Alpha Imager 图像分析仪进行灰度扫描，读取各带的吸光值（D），结果以 Akt/ GAPDH 的吸光值之比（D_{Akt}/D_{GAPDH}）进行半定量分析。

1.4　统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验。

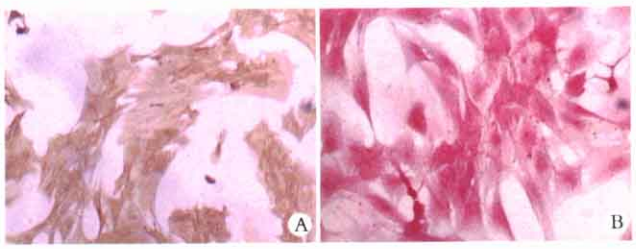
表 1　Akt1、Akt2、Akt3 和 GAPDH 基因引物

	引物序列	产物大小	温度
Akt1	上游 5′-CCACAGGTCGCTACTATGCC-3′ 下游 5′-ACAGCCCGAAGTCCGTTATC-3′	375 bp	55℃
Akt2	上游 5′-ATGGTAGCCAACAGTCTGAAGC-3′ 下游 5′-TTGCCGAGGAGTTTGAGATAAT-3′	167 bp	53 ℃
Akt3	上游 5′-TGGCACCAGAGGTATTAGAAGA-3′ 下游 5′-TATCAAGAGCCCTGAAAGCAA-3′	209 bp	52 ℃
GAPDH	上游 5′- TGGAGTCCACTGGCGTCTTCAC -3′ 下游 5′- CATGAGGTCCACCAQCCCTGTTG -3′	698 bp	64 ℃

2　结果

2.1　PASMC 建系以及鉴定结果

顺利培养出纯 PASMC 系，利用 S-P 法对 PSAMCα-SM-actin 免疫组化染色，98% 以上的细胞染色阳性，倒置显微镜下可见细胞质中与细胞长轴相平行的细丝状棕黄色免疫沉淀，证实均为平滑肌细胞（图 1）。

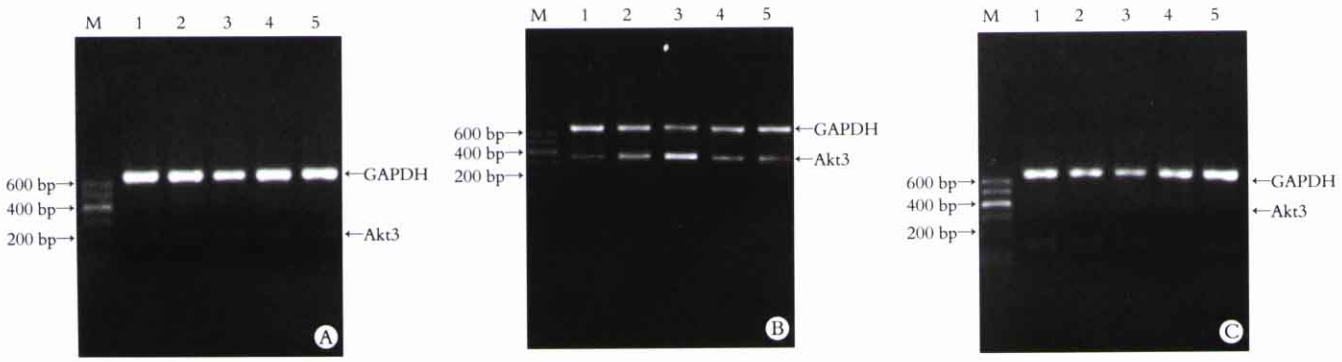


A：细胞质中与细胞长轴相平行的细丝状棕黄色免疫沉淀；
B：阴性对照中未见此沉淀

图 1　抗 α-SM-actin 免疫组化染色　（S-P × 100）

2.2　PASMC 中 Akt1、Akt2 和 Akt3 基因 mRNA 表达半定量分析

缺氧诱导下，Akt1、Akt2 和 Akt3 mRNA 表达逐渐升高，8h 到达高峰，后逐渐下降，24 h 恢复到常氧组水平。和 N 组比较，Akt1 的 H2、H8、H12、H24，Akt2 的 H8，Akt3 的 H8 的变化有显著性意义（$P<0.05$）。和 H2 组比较，Akt1、Akt2、Akt3 的 H8 组变化有显著性意义（$P<0.05$）。和 H8 组比较，Akt1 的 H12、H24，Akt2 的 H12，Akt3 的 H24 组变化有显著性意义（$P<0.05$）（表 2、图 2）。



A：Akt1；B：Akt2；C：Akt 3 mRNA；M：标准；1：24 h；2：12 h；3：8 h；4：2 h；5：N 组

图 2　Akt1、Akt2、Akt3 mRNA 在缺氧不同时相点的表达 RT-PCR 电泳结果

表2 缺氧对 Akt1、Akt2 和 Akt3 mRNA 表达的影响[$n=4$, ($\bar{x}\pm s$)%]

	不同时间点				
	N 组	H2 组	H8 组	H12 组	H24 组
Akt1	75.89 ±8.91	79.15 ±7.65[a]	105.02 ±9.21[ab]	74.46 ±7.84[ac]	68.14 ±0.08[ac]
Akt2	13.46 ±1.09	10.81 ±0.98	18.28 ±2.47[ab]	14.72 ±1.63[c]	15.32 ±1.14
Akt3	22.36 ±4.38	23.11 ±5.01	31.85 ±4.32[ab]	28.26 ±3.55[a]	24.25 ±2.75[c]

a: $P<0.05$, 与 N 组比较; b: $P<0.05$, 与 H2 组比较; c: $P<0.05$, 与 H8 组比较

3 讨论

Akt 是 1991 年发现的一种分子质量大约为 60×10^3 的蛋白激酶,因其具有与 PKA 和 PKC 同源的序列,也是 AKR8 小鼠自发胸腺瘤转化癌基因 v-akt 的产物,且能使 Ser/Thr 磷酸化,因此命名为 Akt/PKB。其家族成员主要包括 PKBα/Akt1、PKBβ/Akt2 和 PKBγ/Akt3,都含有一个 N-端 PH 域、一个激酶催化域和一个 c-端调节域;氨基端的调节区有一个保守序列——AH 结构域(Akt homology domain,1 ~ 147 氨基酸节段);激酶区位于 148 ~ 411 氨基酸节段之间,内有 ATP 的结合部位。PKB 的磷酸化发生于两个特殊位点:一个是激酶域的 THr308,另一个是位于调节域的 Ser473。

本研究结果显示 Akt1、Akt2、Akt3 mRNA 在 PASMC 常氧情况下均存在表达,在缺氧刺激诱导下,随着缺氧时间的延长出现不同程度的表达增强,在 8 h 出现到达高峰,后又逐渐下降。说明 Akt1、Akt2、Akt3 可能均参与了缺氧诱导 PASMC 异常分化和生长的调节。相对于 Akt2 和 Akt3,Akt1 的 mRNA 的表达量以及变化最明显,提示 Akt1 可能在其中起到更加重要的作用。既往认为 Akt3 存在严格的组织分布,主要分布于大脑和睾丸中。Kester 等利用 RT-PCR 法证实主动脉平滑肌细胞(SMCs)中 Akt1,Akt2,Akt3 三种亚型均有表达,本研究进一步证实在 PASMC 中也存在 Akt3 mRNA 的表达。

HPH 肺血管重建主要表现为内皮细胞损伤,PASMCs 肥大增殖,肌型血管中层增厚,其中 PASMCs 由收缩型向合成型转换,并从中膜迁移至内膜是缺氧肺血管重建的关键环节[4-9]。Akt 参与 PI3K 激活的细胞内信号通路与细胞分化、生长、凋亡和迁移等多种生物学活动密切相关[1,2]。激活后的 Akt 对含有丝氨酸/苏氨酸残基的底物磷酸化而发挥广泛的生物学效应,如 P21Cip、D1 (cyclinDl)、Bad、caspase9、forkhead、IkB, GSK3、eNOS、HIF-1、P70S6K 等,这些下游靶点在 PASMC 的分化和生长调控中起关键作用。结合本实验的研究结果可以初步推断出 Akt 家族可能是缺氧诱导肺血管重建中 PASMC 异常分化和生长的重要调节基因。

本研究仅检测了缺氧诱导 PASMC 的 Akt 家族 mRNA 变化情况,只初步证实 Akt 家族参与介导缺氧诱导 PASMC 异常分化和生长过程,因此值得在 Akt 蛋白水平上作进一步研究。另外缺氧肺动脉高压的信号传导通路可能是非常复杂的网络,因此 Akt 信号通路在其中的作用以及和其他信号通路的关系还需要进一步研究。

综上所述,Akt 家族(Akt1、Akt2、Akt3)可能均参与了缺氧诱导肺血管重建中 PASMC 异常分化、生长和迁移的调节,其中 Akt1 可能起更加重要的作用。

参考文献:

[1] BARMAN S A, ZHU S, HAN G, *et al*. cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle *via* cGMP-dependent protein kinase[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(6): L1004 - L1011.

[2] SUZUKI Y J, DAY RM, TAN C C, *et al*. Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2003,278(19): 17525 - 17531.

[3] 易 斌,钱桂生,白 莉,等. 不同方法培养大鼠肺动脉平滑肌细胞的差异[J]. 第三军医大学学报, 2004, 27(24): 2425 - 2427.

[4] TUDER R M, CHACON M, ALGER L, *et al*. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis [J]. J Pathol, 2001, 195(3): 367 - 374.

[5] WANG C C, GUREVITH I, DRAZNIN B. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways[J]. Diabetes, 2003, 52(10): 2562 - 2569.

[6] REISKE H R, KAO S C, CARY L A, *et al*. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration[J]. J Biol Chem, 1999, 274(18): 12361 - 12366.

[7] JIANG K, ZHONG B, RITCHEY C, *et al*. Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac[J]. Blood, 2003, 101(1): 236 - 244.

[8] SUZUKI Y J, DAY R M, TAN C C, *et al*. Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cell[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 17525 - 17531.

[9] ZHANG W M, YIP K P, LIN M J, *et al*. ET-1 activates Ca^{2+} sparks in PASMC: local Ca^{2+} signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(3): L680 - L690.

(编辑 王 红)