论著

文章编号:1000-5404(2006)06-0518-03

不同伤情血清可有效激活IEC-6细胞PI3K/Akt通路

王锋超,王 涛,艾国平,王军平,冉新泽,杜智勇,李 军,徐 辉,粟永萍 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 检测不同伤情血清对肠上皮细胞PI3K/Akt通路的激活。**方法** 将对数生长期的IEC-6细胞无血清培养基培养24 h后,加入单放、单烧和复合伤24 h大鼠血清,并设正常大鼠血清组和无血清组作对照,刺激12 h后检测细胞AKT磷酸化水平。利用SELDI(surfaced enhanced laser desorption/ionization)蛋白质芯片技术对单放、单烧、复合伤24 h大鼠血清差异蛋白进行筛选和分析。**结果** 单放、单烧和复合伤24 h大鼠血清刺激后的IEC-6细胞Akt磷酸化水平较正常大鼠血清刺激的高,其中烧伤组最高。单放组血清与单烧血清比较有11个差异峰,复合伤组与单烧组相比有6个差异峰。**结论** 单放、单烧和复合伤血清均可有效激活IEC-6细胞的PI3K/Akt通路,烧伤组最强,可能和烧伤组血清特殊变化有关。

关键词: PI3K/Akt;IEC-6;血清;烧伤;放射;复合伤;SELDI

中图法分类号: R322.45;R331.1;R394.3 **文献标识码:** A

Serum from rat exposed to radiation, burn, or combined injury can stimulate the PI3K/Akt pathway of IEC-6 cells

WANG Feng-chao, WANG Tao, AI Guo-ping, WANG Jun-ping, RAN Xin-ze, DU Zhi-yong, LI Jun, XU Hui, SU Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the activation of PI3k/Akt pathway of serum deprived IEC-6 cells by the serum of rats exposed to single radiation, burn or combined injury. **Methods** The IEC-6 cells were cultured in serum deprived media for 24 h, and stimulated by the serum of rats exposed to single radiation (^{60}Co γ ray at dose of 9 Gy), single burn (exposure to 5 kW tungsten-halogen light till whole body Ⅲ degree burn) or combined injury (burn first and radiation), and the cells stimulated by the serum from the normal rats and serum starved cells served as the control group. The total proteins of different group cells were extracted and the levels of phosphorylation of Akt were tested by Western blotting. The differentially expressed low mass proteins in the serums were detected by SELDI proteinchip technology, and primarily analyzed by related software as well as bioinformatic methods. **Results** The level of phosphorylation of Akt in the IEC-6 cells stimulated by serum from rats exposed to single radiation, single burn or combined injury was higher than in the cells stimulated by the serum from normal rats, in which the burn serum caused the highest level. As compared to burn rat serum, the serum of radiation and combined injury had 13 and 6 differentially expressed protein peaks respectively. **Conclusion** All the serums from rats exposed to different kinds of damage agents could activate the PI3K/Akt pathway of IEC-6 cells efficiently. The special components of burnt rat serum may contribute to the highest effect on the phosphorylation of Akt.

Key words: PI3K/Akt; IEC-6; serum; radiation; burn; combined injury; SELDI

肠上皮隐窝细胞对电离辐射等细胞毒损伤因素十分敏感,单纯的放射损伤或者烧伤以及核武器造成的放烧复合伤都能对小肠上皮造成损伤,不同伤情条件下,肠上皮隐窝细胞克隆存活和重建不同。我所早期的工作显示,复合伤较单放隐窝细胞恢复好,应用烧伤血清提取物能明显促进肠上皮细胞的损伤修复[1],这说明不同伤情条件下血清物质在损伤后肠上皮的抗凋亡和克隆重建中发挥重要作用。本实验显示不同伤情血清对体外培养的IEC-6细胞PI3K/Akt通路的激活不同,而此类信号通路的激活调控可能依赖

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30230360)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230360)

作者简介: 王锋超(1977-),男,河北省安平县人,博士研究生,助教,主要从事肠上皮辐射及炎症反应的分子机制方面的研究。电话:(023)68771720

通讯作者: 粟永萍,电话:(023)68752009, E-mail: suyping@yahoo.com

收稿日期: 2005-10-10;**修回日期:** 2005-12-09

于不同伤情血清的血清成分，所以我们又利用新近发展起来的蛋白质组技术手段 SELDI（surfaced enhanced laser desorption/ionization），对各种伤情的血清成分做了初步的比较分析。

1　材料与方法

1.1　材料

IEC-6 大鼠空肠肠上皮细胞株购自美国 ATCC，本所保存。M-PER™哺乳动物蛋白抽提试剂盒、Western blot 发光试剂盒、胶片均购自 PIRCE，Phospho-Akt（Ser473）多抗购自 Cell signaling Technology，Akt 多抗购自 Santa Cruze 公司。乙腈、三氟乙酸、尿素、CHAPS、DTT、Tris-HCl 和 OPG 均购自 Sigma 公司。WCX2 蛋白芯片购自美国 Ciphergen 公司。

1.2　大鼠致伤和血清的采集

健康雄性 Wistar 大鼠 16 只（SPF 级），购自重庆医科大学实验动物中心，体质量 220～250 g，随机分为正常对照组、烧伤组、放射伤组、复合伤组（4 只/组）。放射组大鼠采用 ^{60}Co γ 射线全身照射，吸收剂量为 9 Gy，吸收剂量率为 0.75 Gy/ min，照后 24 h 取股动脉血。烧伤选用 5 kW 的溴钨灯辐射至全身 15% Ⅲ度烧伤（经病理检查证实）。烧伤后即以生理盐水 40 mg/kg 经腹腔补液然后烧伤后 24 h 取股动脉血。复合伤组为先进行 15% Ⅲ度烧伤，再同时和放射组大鼠一同进行照射，照后 24 h 取股动脉血。各组血样本 4 ℃静置 60 min，待血凝块退缩，3 000 r/min，10 min，取血清分装，于 -70 ℃保存。

1.3　细胞培养及血清刺激分组

培养液组成：DMEM、10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素，3.17 g/L $NaHCO_3$，于 37 ℃、10 % CO_2 条件下培养。取对数生长的细胞，无血清培养 24 h 后，1 组收集细胞另外 4 组更换含 10% 来源于正常、单放、单烧、复合伤大鼠的血清，刺激 12 h 后收集细胞，PBS 清洗后离心，冻存于液氮备用。

1.4　总蛋白的提取

参照 Pirce 公司的 M-PER™哺乳动物蛋白抽提试剂盒操作手册。

1.5　Western blot 检测 Akt 和磷酸化 Akt 表达

Bradford 法测定蛋白浓度，细胞总蛋白上样 40 μl，12% SDS-PAGE 垂直凝胶电泳后，半干法转印到 PVDF 膜，TBST 清洗 5 min 后，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，加入相应的一抗（1∶1 000），4 ℃过夜孵育，间歇振荡，TBST 洗膜（5 min×3）后，加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗膜（5 min×3）后，ECL 增强发光，在暗室将膜贴在 X 线片下曝光，常规方法显影，定影。杂交信号在 BioRad 图像分析系统中进行光密度分析。

1.6　血清样本蛋白芯片实验步骤

将芯片安装于 Bioprocessor 上，芯片 A-H 点加入 150 μl 结合缓冲液（100 mmol 乙酸钠缓，pH 4.0，含 OPG），振荡室温下孵育 5 min，弃掉液体，重复 3 次。每点分别加入不同组别的经过前述处理过的样品 100 μl，振荡孵育 60 min，弃掉液体。用 150 μl 洗脱缓冲液（100 mmol 乙酸钠缓冲液，pH 4.0）洗涤芯片 3 次，每次 5 min，用双蒸水冲洗 1 次，卸去 Bioprocessor，待芯片表面自然晾干后，各点加两次 0.5 μl SPA，芯片表面干后，用蛋白质芯片阅读机（PBS Ⅱ型）进行蛋白质谱分析。

1.7　数据采集及结果分析

蛋白芯片采用蛋白质芯片阅读机（PBS Ⅱ型）读取数据。仪器每天用标准多肽和低于 200×10^3 的蛋白质标准分子校正，系统的质量偏差为 1%。检测芯片时蛋白质芯片阅读机设置如下：激光强度 230，检测敏感度 8，优化分子量范围（2～20）$\times10^3$，最高分子量 50×10^3，每个样品收集 50 个点，采用 Ciphergen proteinchip 3.02 版本的分析软件自动采集数据，采用 Biomarker Wizard 分析单放、单烧和烧放复合伤 24 h 大鼠血清的蛋白质谱差异。

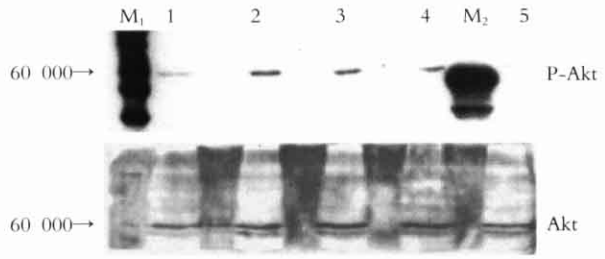
1.8　统计学分析

采用 Ciphergen proteinchip 3.02 分析软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　不同伤情伤后 24 h 大鼠血清对 24 h 饥饿 IEC-6 细胞刺激 12 h 后的 Akt 蛋白磷酸化水平影响

单烧血清、单放血清和复合伤血清在刺激 24 h 无血清培养的 IEC-6 细胞 12 h 后仍可检测到 Akt 较高水平的磷酸化，且均高于正常大鼠血清刺激组，血清饥饿组仅有微量信号（图 1）。吸光度值分析显示（图 2），单烧血清组 Akt 磷酸化水平最高，单放组次之，而复合伤组又低于单放组。图中的 M_1 为标记了生物素的蛋白分子量标准，箭头所示为 60×10^3，与目的条带为预期的分子量一致。M_2 为普通蛋白分子标准，但和所用一抗有交叉反应，有较强的显色。设立非磷酸化的 AKT 作为内参照，显示各组样本 Akt 总量无显著改变。



1：正常血清；2：烧伤血清；3：辐射损伤血清；4：复合伤血清；5：血清饥饿组；M_1：生物素标记蛋白分子量标准；M_2：普通蛋白分子量标准

图 1　各种伤情血清对 IEC-6 细胞 Akt 磷酸化的影响

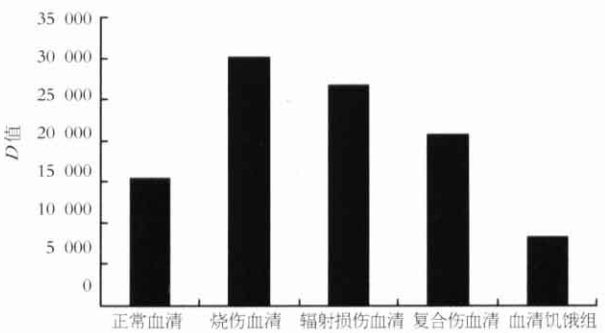


图 2　各种伤情血清对 IEC-6 细胞 Akt 磷酸化水平影响的光密度分析

2.2 单放、单烧和烧放复合伤大鼠血清组间差异比较

采用 Biomarker Wizard 软件对所有蛋白质谱进行标准化，然后分别分析单烧大鼠 24 h 与单放大鼠 24 h 和复合伤大鼠 24 h血清中蛋白质峰数目和相对强度。结果表明，绝大多数蛋白质峰数目和强度在 3 种血清中基本相同，但在 3 组之间仍有差别，其中 11 个蛋白质峰在单放和单烧血清，6 个蛋白质峰在复合伤和单烧血清的比较中具有统计学意义，因差异蛋白峰分布于多个蛋白分子量区间，此处有部分结果显示，图 3 为分子量在 4 600～4 900 各血清蛋白峰的差异。

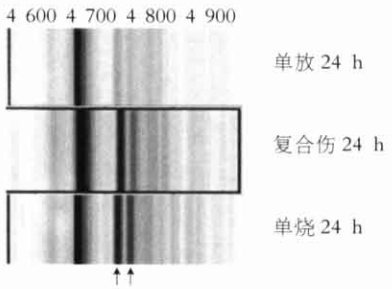


图3 差异蛋白峰 相对于单烧、单放和复合伤的 4 724 和 4 742 两种蛋白的变化(箭头)

3 讨论

小肠上皮尤其是隐窝增殖细胞是凋亡敏感细胞，电离辐射、细胞毒药物、致炎因子和创伤应激均可导致其损伤，这些刺激因素都可引起细胞信号通路的广泛激活，导致基因表达谱的剧烈改变[2,3]，决定细胞的存活与凋亡。我们早期研究发现 12～16 Gy 照射复合 15% Ⅲ度烧伤，和 12 Gy 照射复合 5%～25% 面积烧伤后的肠上皮再生修复都比单纯放射损伤好[1]。另外烧伤后血清及提取物促进肠上皮修复的作用较正常动物血清强，而放射动物血清的效果最弱。血清是机体在宏观水平上对组织细胞调控的重要介质，这些结果提示不同的伤情条件下血清成分变化可调控肠上皮细胞的存活与凋亡。

血清中起关键作用的是多种细胞因子，这些因子可作为配体，与靶细胞多种膜受体结合激活细胞内信号通路[4,5]，其中络氨酸激酶受体的磷酸化介导的 PI3K/Akt 途径的激活是细胞抗凋亡的重要途径。PI3Ks 复合物在细胞接受刺激后在细胞膜完成组装，经过一系列反应可使 AKT Thr308 和 Ser473 等位点磷酸化。激活的 AKT 对细胞存活的调节主要通过磷酸化下游靶分子，例如作磷酸化凋亡分子的活化，如 Bad、caspase29 。抑制 Forkhead 家族转录因子 AFX 与 FKHRL1 来降低促凋亡分子 Fas 配体与 Bim 的表达[6]。

本实验结果表明，单放、单烧和复合伤 24 h 大鼠血清刺激 12 h 后的 IEC-6 细胞 Akt 磷酸化水平较正常大鼠血清刺激高，其中烧伤组最高。说明不同伤情产生的大量细胞因子和血清物质可通过激活肠上皮细胞的 PI3K/Akt 通路来调节细胞的存活、代谢等行为，影响肠上皮细胞再群体化。烧伤以局部组织毁损和诱发的全身免疫应激反应为核心的，有别于单纯以细胞 DNA 为靶标的电离辐射损伤。我们曾经利用蛋白芯片技术检测烧伤 24 h 大鼠血清和正常大鼠血清相比的差别成分，筛选出 35 个差异蛋白[7]，因此推测各种伤情的血清成分可能存在显著差别，这些差别可能会导致肠上皮细胞 PI3K/Akt 等信号通路激活的不同。本实验中将烧放复合伤和单放血清分别与单烧血清相比较发现，单放血清和烧伤血清差异大，而复合伤血清和单烧血清组份较为接近，提示复合伤复合了单伤的特点，但又不是简单的加合。由我们的结果分析，复合伤血清相对于正常血清，其变化主要来源于烧伤因素。虽然在体情况下复合伤肠上皮再生修复比单纯放射损伤好，但是其血清物质激活肠上皮细胞的 PI3K/Akt 通路的能力与单放组接近。这提示血清物质对肠上皮细胞 I3K/Akt 通路的激活不是复合伤减轻效应的主要因素，还有其他信号通路以及局部微环境因素参与了调控。另外复合组血清激活 I3K/Akt 通路低于单烧组，说明辐射在一定程度上降低或改变了烧伤的全身性的免疫应激反应，改变了血清的因子谱，其中的机制是值得深入探讨的问题。

参考文献：

[1] 粟永萍，程天民，刘贤华. 放射损伤及放烧复合伤对小肠上皮损害的量效研究[J]. 第三军医大学学报，1994，16(5)：313－315.

[2] 王锋超，高京生，粟永萍，等. 大剂量辐射诱导 IEC-6 细胞差异表达基因消减 cDNA 文库的构建[J]. 第三军医大学学报，2004，26(1)：10－14.

[3] DENT P，YACOUB A，CONTESSA J，*et al*. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways[J]. Radiat Res，2003，159(3)：283－300.

[4] VAREDI M，LEE H M，GREELEY G H，Jr.，*et al*. Gene expression in intestinal epithelial cells，IEC-6，is altered by burn injury-induced circulating factors[J]. Shock，2001，16(4)：259－263.

[5] FRANKE T F，HORNIK C P，SEGEV L，*et al*. PI3K/Akt and apoptosis：size matters[J]. Oncogene，2003，22(56)：8983－8998.

[6] SONG G，OUYANG G，BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med，2005，9(1)：59－71.

[7] 王 涛，艾国平，章 波，等. 应用蛋白芯片技术从烧伤大鼠早期血清中快速筛选低分子量差异蛋白[J]. 第三军医大学学报，2005，27(12)：1259－1261.

(编辑 周 芳)