论著

文章编号:1000-5404(2009)01-0052-04

PI3K/Akt 信号途径抑制烧伤后大鼠缺血缺氧心肌细胞凋亡

宋华培,黄跃生,党永明,张东霞,褚志刚,张 琼 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 PI3K/Akt 信号途径在烧伤后大鼠缺血缺氧心肌细胞凋亡中的作用及机制。**方法** 首先建立模拟烧伤的动物模型,通过 Western blot 观察 PI3K/Akt 信号途径的活化规律,TUNEL 实验观察烧伤大鼠心肌凋亡。然后建立离体培养的缺血缺氧心肌细胞模型,并分为对照组、单纯缺血缺氧组、LY294002 处理组或 IGF-1 处理组,应用 ELISA 观察缺血缺氧心肌细胞凋亡。并通过 DEVD 荧光检测 caspase-3 酶活性,RT-PCR 检测 p53、Bax 的转录活性。**结果** 烧伤后大鼠心肌组织内 PI3K 和 pAkt 表达逐渐增加,伤后 3 h 达高峰;烧伤 3 h 后,大鼠心肌细胞凋亡率显著增加;应用 LY294002 特异性抑制 PI3K/Akt 通路后,大鼠心肌细胞凋亡率较对照组增加更为显著($P<0.05$)。缺血缺氧导致体外培养心肌细胞凋亡增加,caspase-3 活性逐渐增强,p53、Bax mRNA 表达量逐渐升高;与单纯缺血缺氧组相比,应用 LY294002 阻断 PI3K/Akt 途径活化后,心肌细胞凋亡数量增加更显著($P<0.05$),caspase-3 活性增高更为明显($P<0.05$),p53、Bax mRNA 表达量均显著升高($P<0.05$);用 IGF-1 预先激活 PI3K/Akt 途径后,与单纯缺血缺氧组比较,心肌细胞 caspase-3 活性明显降低($P<0.05$)。**结论** PI3K/Akt 信号途径在缺血缺氧心肌细胞中具有抗凋亡作用,该作用与 PI3K/Akt 调控促凋亡基因 p53、Bax 的表达,抑制 caspase-3 凋亡反应有关,并为心肌缺血缺氧损害的临床防治提供新思路及实验依据。

关键词: PI3K/Akt;心肌细胞;凋亡;caspase-3;p53;Bax

中图法分类号: R322.11; R329.28; R644.02 **文献标识码:** A

PI3K/Akt signal pathway inhibits ischemia and hypoxia-induced myocardial apoptosis in rats

SONG Hua-pei, HUANG Yue-sheng, DANG Yong-ming, ZHANG Dong-xia, CHU Zhi-gang, ZHANG Qiong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role and mechanisms of the PI3K/Akt signal pathway in the apoptosis of rat cardiomyocytes after ischemia and hypoxia due to severe burn injury. **Methods** Burn models of full-thick 30% TBSA burn injury were established by scalding rat back in hot water. The activation of the PI3K/Akt signal pathway was observed by Western blotting, and myocardial apoptosis was assessed by TUNEL. Cultured rat cardiomyocytes under ischemic/hypoxic conditions were divided into the control group, the ischemia and hypoxia group, and the LY294002 or IGF-1 treatment group. The apoptosis of cardiomyocytes were assessed by ELISA. The caspase-3 activity was measured by DEVD fluorescence. The transcriptional activity of p53, Bax was assessed by RT-PCR. **Results** After severe burn, PI3K and pAkt expressions increased gradually in the rat myocardial tissue, and reached a peak at 3 h postburn. At 3 h postburn, the apoptosis increased significantly in rats. When the PI3K/Akt pathway was specifically inhibited by LY294002, the myocardial apoptosis increased significantly in the burn group as compared with the control group ($P<0.05$). Cultured cardiomyocytes after ischemia and hypoxia showed the following changes: increased apoptosis, gradually enhanced caspase-3 activity, gradually increased p53 and Bax mRNA expressions. Compared with the ischemia and hypoxia group, blockade of the PI3K/Akt pathway with LY294002 increased the number of apoptotic cardiomyo-

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB522601);国家自然科学基金重点项目(30430680);教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0712) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522601), the Key Program of National Natural Science Foundation of China (30430680) and the Funds for Innovation Research Team of Changjiang Scholars (IRT0712)

作者简介: 宋华培,男,重庆市人,博士,医师,主要从事烧伤早期心肌损害及保护方面的研究。电话:(023)68754148-8026,E-mail:shpmajor@hotmail.com

通信作者: 黄跃生,电话:(023)68754173,E-mail:hyues58@gmail.com

收稿日期: 2008-10-30;**修回日期:** 2008-11-29

cytes, caspase-3 activity, and p53 and Bax mRNA expression significantly ($P<0.05$). After activation of the PI3K/Akt pathway with IGF-1, caspase-3 activity decreased significantly ($P<0.05$), as compared with the ischemia and hypoxia group. **Conclusion** The PI3K/Akt signal pathway plays anti-apoptotic role in ischemic/hypoxic cardiomyocytes. PI3K/Akt pathway regulating p53 and Bax expression is probably the mechanism of anti-apoptosis, which can suppress the activity of caspase-3 and decrease the number of apoptotic cardiomyocytes.

Key words: PI3K/Akt; cardiomyocytes; apoptosis; caspase-3; p53; Bax

严重烧伤后,由于心肌自身的肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)激活,心肌局部血流量迅速减少,心肌细胞膜受体 β-AR 介导的信号转导系统及"分子开关 Gsα/Giα"变化致心功能受抑,使心肌在毛细血管通透性增加导致血容量显著下降之前,发生缺血缺氧损害。心肌细胞凋亡是烧伤早期休克和全身组织器官缺血缺氧的重要启动因素之一[1]。探讨减少烧伤早期心肌细胞凋亡的措施有重要临床意义。PI3K/Akt 是细胞内重要的信号转导分子,活化的 Akt 通过磷酸化作用进一步激活或抑制其下游靶蛋白,进而发挥调节细胞的增殖、分化、葡萄糖代谢以及迁移等作用[2-6]。PI3K/Akt 抑制细胞凋亡的作用及机制已有部分线索,但 PI3K/Akt 的活化能否抑制缺血缺氧心肌细胞凋亡及其信号通路尚不清楚,本研究对此进行了探讨。

1　材料与方法

1.1　烧伤动物模型的建立

健康 SD 大鼠共 25 只(3 月龄,体质量 200 ~ 250 g,雌雄不拘,由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),按完全随机化原则分为正常对照组(5 只),烧伤后 1、3、6、12、24 h 组,共 6 组(烧伤组各时相点 4 只)。烧伤模型制作按本所常规方法,1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,按大鼠体质量计算其背部 30% 体表面积大小,脱毛,将脱毛区置于(92 ± 1)℃ 水浴中 18 s,造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤(本研究通称烧伤)。烧伤后即按照 Parkland 公式腹腔注射复方林格液抗休克,分别在各时相点取动物左心室组织,立即置液氮中冷冻保存。

LY294002 干预实验:于烧伤前 1 h 经颈外静脉注射溶解于二甲亚砜(DMSO)的 LY294002(1.4 mg/kg),于烧伤后 3 h 取心肌组织做石蜡切片。

1.2　乳鼠心肌细胞培养及缺氧损伤实验

乳鼠心肌细胞分离采用组织胰酶消化法,纯化采用差速贴壁法和 BrdU 化学抑制法。用含有 DMEM-F12 和 FBS(20%)的混合培养基于 37 ℃培养箱。

对照组:心肌细胞于含 10% FBS + DMEM-F12 培养基中常规培养 5 d,实验当天弃培养液,PBS 洗 2 次,继续加 10% FBS + DMEM-F12 培养液后继续入孵箱常氧培养,细胞收集时间同缺血缺氧最长时间组。

缺血缺氧组:细胞培养至第 5 天,弃培养液,PBS 洗 2 遍,改用无糖 DMEM 培养液,置入缺氧密闭盒行缺氧培养(氧浓度 1%)。

LY294002 抑制组:缺氧前 1 h,在培养液中加入 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 (终浓度 50 μmol/L),余同缺血缺氧组。

IGF-1 处理组:缺氧前 1 h,在培养液中加入 PI3K/Akt 激活剂 IGF-1(终浓度 200 ng/ml),余同缺血缺氧组。

1.3　TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司(美国)。用甲醛将新鲜大鼠左心室心肌组织固定,石蜡切片;切片于染色盘中脱蜡、水化;蛋白酶 K 孵育;封闭内源性过氧化酶和增强细胞通透性;加 TUNEL 反应混合液;转换器-POD;加 DAB-底物溶液,于光学显微镜下观察计算心肌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。AI 计算方法:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞,计数 5 个高倍视野,分别计算凋亡细胞数和总细胞数。

AI = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%

1.4　ELISA^{PLUS}试剂盒法检测细胞凋亡

ELISA^{PLUS}试剂盒购自 Roche 公司(美国)。将心肌细胞用培养基稀释成 1×10^5/ml,加入到 25 cm^2 培养瓶中,于 5% CO_2,37 ℃ 常氧下培养。分别施加干预因素。各瓶加 200 μl 细胞裂解液,室温下孵育 30 min,200 r/min 离心 10 min。取上清液各 20 μl 于酶标板各孔中,另一孔加 20 μl 组蛋白-DNA 复合物作为阳性对照。各孔中加 80 μl 免疫反应混合物(生物素标记抗组蛋白抗体:过氧化物酶标记抗 DNA 抗体:孵育缓冲液 = 1∶1∶18,临用前配制),混匀,盖上封片,室温下振荡反应 2 h。倾去各孔内液体,加 250 μl 孵育缓冲液洗涤各孔,共洗 3 次。加 100 μl底物液,另加一孔底物液作为比色空白对照。于室温下振荡反应 10 min。采用双波长比色法(Bio-Rad 450 酶标仪,美国)测定(主波长 405 nm,参考波长 490 nm)。组蛋白-DNA 片段含量以吸光度表示。

1.5　心肌细胞 caspase-3 活性测定

取 10^6 心肌细胞(6 孔板),实验前换液,PBS 洗 1 遍。施加实验刺激因素后,细胞刮子刮取心肌细胞,400 × g 离心 10 min。50 μl 预冷的细胞裂解缓冲液重悬细胞,冰上孵育 10 min。4 ℃ 20 000 × g 离心 5 min,转移上清。取 50 μl 上清,加 50 μl 2 × 反应缓冲液/DTT 混合液和 1 μl DEVD-CHO 抑制剂,37 ℃ 水浴 30 min。加 50 μl 2 × 反应缓冲液/DTT 混合液至样本。加 5 μl 1 mmol/L caspase-3 底物(DEVD-AFC)到测试管,37 ℃ 水浴1 h,建立不加底物的平行对照。荧光检测仪(Du-640 Beckman,美国)测试水浴前后各管荧光值(激发波长 400 m,发射波长 505 nm)。计算 caspase-3 活性。

1.6　RT-PCR 检测 p53、Bax 表达

按 Tripure Isolation Reagent 说明书提取样本总 RNA,测定 RNA 浓度及纯度。采用 Primer 5.0 设计引物,引物由日本 TaKaRa 大连公司合成。RT-PCR 反应条件及扩增程序:按试剂盒说明书加入试剂、引物及 0.5 μg 样本总 RNA,反应总体积为

50 μl。取 10 μl 扩增产物于含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中常规电泳(80 V),凝胶扫描成像。四星图像分析软件分别计算目的基因和 β-actin 所对应电泳条带光密度值,以 β-actin 为内参照,以目的基因光密度值与 β-actin 光密度值的比值表示目的基因的表达丰度。

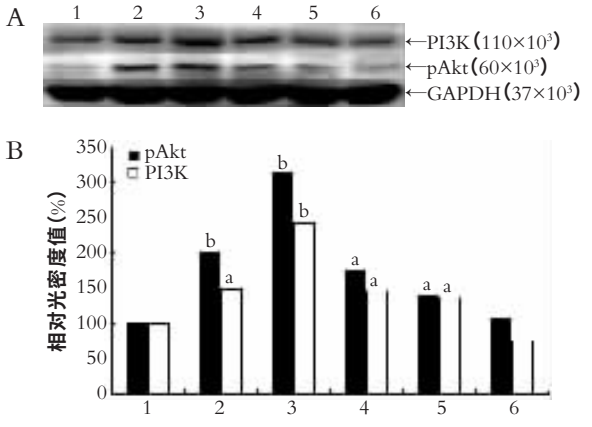
1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 烧伤大鼠心肌组织 PI3K/Akt 信号途径活化规律

正常大鼠心肌组织 PI3K 呈少量表达,烧伤后心肌组织内 PI3K 和 pAkt 表达逐渐增加,伤后 3 h 达高峰(图 1)。

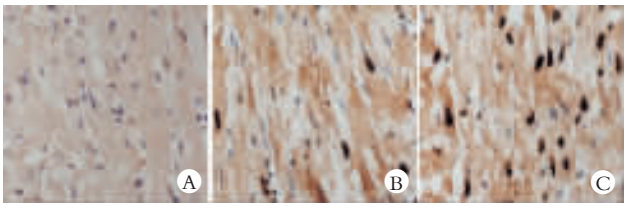


A: Western blot 检测大鼠烧伤后心肌组织 PI3K 蛋白表达变化;B: 定量分析结果 1: 对照组;2~6: 分别为烧伤后 1、3、6、12、24 h;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较

图 1 烧伤大鼠心肌组织 PI3K/Akt 的活化规律

2.2 PI3K/Akt 信号途径活化对烧伤大鼠心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 法检测细胞凋亡结果见图 2。烧伤 3 h 后,大鼠心肌细胞凋亡率显著增加,为(5.8±0.5)%;应用 LY294002 特异性抑制 PI3K/Akt 通路后,大鼠心肌细胞凋亡率[(9.4±0.7)%]较对照组增加更为显著($P<0.05$)。

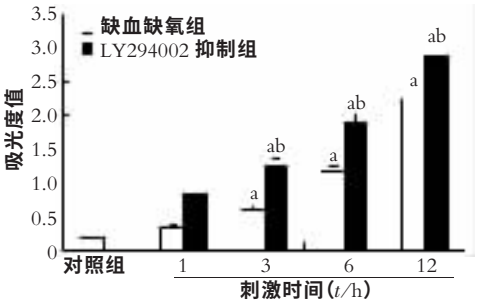


A: 对照组; B: 烧伤组; C: LY294002 干预组

图 2 烧伤大鼠心肌组织 PI3K/Akt 的抗凋亡作用 (TUNEL×400)

2.3 PI3K/Akt 信号途径对体外培养心肌细胞凋亡的影响

缺血缺氧使心肌细胞凋亡数量明显增加;应用 LY294002 预处理后,心肌细胞凋亡数量较单纯缺血缺氧组显著升高($P<0.05$, 图 3)。

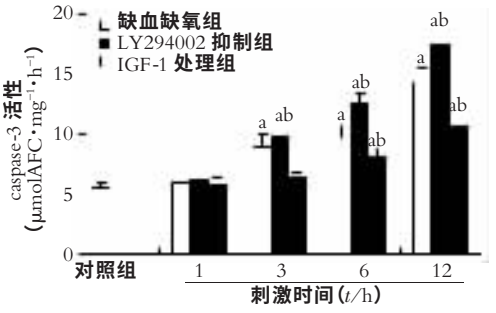


a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$, 与同时相缺血缺氧组比较

图 3 PI3K/Akt 信号途径对体外培养心肌细胞凋亡的影响

2.4 PI3K/Akt 信号途径对心肌细胞 caspase-3 活性的影响

常氧下,心肌细胞 caspase-3 活性较低;缺血缺氧 3 h 后心肌细胞 caspase-3 活性逐渐增强;应用 LY294002 预处理后,缺血缺氧心肌细胞 caspase-3 活性增高更为明显,且显著高于单纯缺血缺氧组($P<0.05$);预先使用 IGF-1 预处理后,心肌细胞 caspase-3 活性均明显低于同时相点单纯缺血缺氧组($P<0.05$, 图 4)。

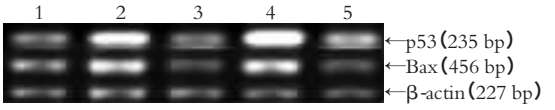


a: $P<0.05$, 与对照组比较; b: $P<0.05$, 与同时相缺血缺氧组比较

图 4 PI3K/Akt 信号途径对心肌细胞 caspase-3 活性的影响

2.5 PI3K/Akt 信号途径对 p53、Bax mRNA 表达的影响

正常大鼠心肌细胞 p53、Bax mRNA 仅有少量表达。缺血缺氧后 1、3 h,心肌细胞内 p53、Bax mRNA 表达量逐渐升高;应用 LY294002 预处理,缺血缺氧心肌细胞 p53、Bax mRNA 表达量均较同时相点单纯缺血缺氧组显著升高($P<0.05$, 图 5)。



1: 对照组; 2: LY294002 抑制组 1 h; 3: 缺血缺氧组 1 h; 4:LY294002 抑制组 3 h; 5: 缺氧缺血组 3 h

图 5 PI3K/Akt 调控促凋亡基因 p53、Bax 的转录活性

3 讨论

严重烧伤可诱导心肌细胞发生一系列损伤和抗损伤效应,其中必然伴有两类细胞信号转导通路的激活,一类信号通路主要参与心肌细胞凋亡(如 p38 激酶途径[7]),导致缺血缺氧损害;另一类则主要参与拮抗凋亡反应,减轻缺血缺氧损害。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)家族参与多种信号通路,具有调节细胞增殖、分化、存活和迁移等作用。本研究在烧伤动物模型显

示,严重烧伤早期 PI3K/Akt 途径即被激活。烧伤大鼠心肌组织 TUNEL 结果提示,该途径在缺血缺氧心肌中发挥抗凋亡的生物学作用。为深入了解 PI3K/Akt 途径在缺血缺氧心肌细胞中抗凋亡的具体分子机制,我们利用体外培养心肌细胞缺氧模型进行了一系列研究。结果显示,缺血缺氧导致体外培养心肌细胞凋亡增加,活力下降;而应用特异性抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/Akt 途径活化后,缺血缺氧心肌细胞凋亡数量增加更显著,细胞活力下降更明显;若用胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor, IGF-1)预先激活 PI3K/Akt 途径后[8-11],缺血缺氧心肌细胞凋亡数量显著减少(另文发表)。这些结果进一步证实 PI3K/Akt 途径的活化可抑制缺血缺氧心肌细胞凋亡。

Caspase-3 是 caspase 家族中重要的凋亡执行酶之一,在多种细胞凋亡中发挥重要作用[12-15]。一旦 caspase-3 被激活,细胞凋亡的发生将不可避免,故 caspase-3 活化也被称为凋亡发生的标志性生化事件。本实验结果表明,缺血缺氧使心肌细胞 caspase-3 活性升高,抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化,可使缺血缺氧心肌细胞 caspase-3 活性增加更显著;而 IGF-1 预先激活 PI3K/Akt 途径后,缺血缺氧心肌细胞 caspase-3 的活性有所下降,这提示 PI3K/Akt 可能通过抑制 caspase-3 的活化发挥抗凋亡作用,阻断 PI3K/Akt 的活化可消除这种抑制效应,使 caspase-3 的活化增加,启动后续凋亡反应。

以往研究表明,p53、Bax 等促凋亡基因参与细胞线粒体膜损伤[16,17],p53 还可影响 HIF-1 的表达水平和功能。HIF-1 需结合 P300 等辅助因子才能刺激其靶基因的转录。p53 可与 HIF-1 竞争结合 P300,从而抑制 HIF-1 刺激的转录。此外,p53 还可通过 Mdm-2 介导的蛋白酶解作用降解 HIF-1 的 α 亚单位,促进缺氧状况下 HIF-1α 的降解,从而削弱 HIF-1α 的抗凋亡作用[18,19]。本实验结果显示,缺血缺氧使心肌细胞内 p53、Bax 转录活性增加。抑制 PI3K/Akt 途径的活化,可使缺血缺氧心肌细胞中 p53、Bax 的转录活性增加更显著,说明缺血缺氧心肌细胞中 PI3K/Akt 信号途径的活化可通过抑制促凋亡基因 p53、Bax 的表达,增加线粒体膜稳定性,减轻膜损伤,同时增强 HIF-1α 的活性,发挥抗凋亡作用。

参考文献:

[1] Huang Y, Li Z, Yang Z. Roles of ischemia and hypoxia and the molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock[J]. Burns, 2003, 29(8): 828-833.

[2] Solit D B, Basso A D, Olshen A B, *et al*. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2139-2144.

[3] Yoon K, Jung E J, Lee S Y. TRAF6-mediated regulation of the PI3 kinase (PI3K)-Akt-GSK3beta cascade is required for TNF-induced cell survival[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(1): 118-121.

[4] Hirsch E, Ciraolo E, Ghigo A, *et al*. Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay[J]. Pharmacol Ther, 2008, 118(2): 192-205.

[5] Peviani M, Cheroni C, Troglio F, *et al*. Lack of changes in the PI3K/AKT survival pathway in the spinal cord motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 34(4): 592-602.

[6] Regula K M, Baetz D, Kirshenbaum L A. Nuclear factor-kappaB represses hypoxia-induced mitochondrial defects and cell death of ventricular myocytes[J]. Circulation, 2004, 110(25): 3795-3802.

[7] Huang Y, Zheng J, Fan P, *et al*. Transfection of antisense p38 alpha gene ameliorates myocardial cell injury mediated by hypoxia and burn serum[J]. Burns, 2007, 33(5): 599-605.

[8] Elke A D, Virginie B, Christel H, *et al*. Role of PI3K in mediating short- and long-term effects of IGF-1 on calcium handling in adult cardiac myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(6): S38.

[9] Kwon M J, Nam T J. A polysaccharide of the marine alga Capsosiphon fulvescens induces apoptosis in AGS gastric cancer cells *via* an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(8): 768-775.

[10] Stitt T N, Drujan D, Clarke B A, *et al*. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors[J]. Mol Cell, 2004, 14(3): 395-403.

[11] Jiang B H, Liu L Z. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784(1): 150-158.

[12] Chen D, Texada D E, Duggan C, *et al*. Caspase-3 and -7 mediate apoptosis of human Chang's conjunctival cells induced by enterovirus 70[J]. Virology, 2006, 347(2): 307-322.

[13] Ramanathan B, Wu H, Ross C R, *et al*. PR-39, a porcine antimicrobial peptide, inhibits apoptosis: involvement of caspase-3[J]. Dev Comp Immunol, 2004, 28(2): 163-169.

[14] Yang S A, Paek S H, Kozukue N, *et al*. Alpha-chaconine, a potato glycoalkaloid, induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells through caspase-3 activation and inhibition of ERK 1/2 phosphorylation[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(6): 839-846.

[15] Cao D X, Qiao B, Ge Z Q, *et al*. Comparison of burst of reactive oxygen species and activation of caspase-3 in apoptosis of K562 and HL-60 cells induced by docetaxel[J]. Cancer Lett, 2004, 214(1): 103-113.

[16] Lee D H, Kim C, Zhang L, *et al*. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(10): 2020-2033.

[17] Liu J, St-Clair D K, Gu X, *et al*. Blocking mitochondrial permeability transition prevents p53 mitochondrial translocation during skin tumor promotion[J]. FEBS Lett, 2008, 582(9): 1319-1324.

[18] Vleugel M M, Shvarts D, van-der-Wall E, *et al*. p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer[J]. Hum Pathol, 2006, 37(8): 1085-1092.

[19] Fels D R, Koumenis C. HIF-1alpha and p53: the ODD couple?[J]. Trends Biochem Sci, 2005, 30(8): 426-429.

(编辑　汪勤俭)