论著

文章编号:1000-5404(2012)13-1304-06

# 脂多糖预处理对 GSK-3 功能活性的影响

陈太忠[1],张 艳[2],熊 弢[1],徐发良[2],龚建平[2],余 正[1] (402160 重庆 永川,重庆医科大学附属永川医院普外科[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科[2])

[摘要] **目的** 探讨脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)耐受和糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase 3, GSK-3)抑制剂对其功能活性的影响。**方法** 雄性健康SD大鼠36只,随机数字表法分为对照组(NC)、LPS耐受组(ET)和LiCl处理组(LiCl),每组12只;LPS耐受组(ET)于第1、2、3天接受0.015、0.030和0.060 mg/kg LPS腹腔注射;LiCl处理组(LiCl)同样时间点腹腔注射2.5 mol/L LiCl 0.25 ml,饮水含3 mmol/L LiCl;对照组每天腹腔注射磷酸盐缓冲液(PBS)0.25 ml;处理结束后每组再按是否接受致死量LPS(10 mg/kg)攻击而分为LPS攻击前和LPS攻击后2个亚组,LPS攻击后组按10 mg/kg腹腔注射LPS,LPS攻击前亚组等体积的PBS腹腔注射,12 h后取材。按照[γ-32P]放射性掺入法、用液体闪射仪检测肝组织GSK-3激酶总活性, RT-PCR法检测GSK-3α、GSK-3β mRNA表达,Western blot法分析GSK-3α/β、pGSK-3α/β蛋白表达,考马斯亮蓝法测定Calpain活性,激光共聚焦显微镜下观察GSK-3亚细胞定位状况。**结果** LPS攻击后ET组GSK-3活性显著低于NC组LPS攻击前水平[(1 311 ± 57),$P = 0.023\ 5$],其他各组在LPS攻击前后差异无显著性。LPS耐受、LiCl预处理和LPS攻击未导致GSK-3α和β的mRNA表达变化和GSK-3α和β的总蛋白表达变化($P > 0.05$)。LPS攻击前,NC、ET和LiCl组GSK-3α磷酸化无显著增加($P > 0.05$),但LPS攻击后,LiCl组GSK-3α磷酸化显著增加[(3.07 ± 0.62),$P < 0.05$]。LPS攻击前,ET和LiCl组GSK-3β磷酸化比NC组显著增加[ET(1.49 ± 0.26);LiCl(2.05 ± 0.43),$P < 0.05$];但LPS攻击后,只有LiCl组GSK-3β磷酸化显著增加[(1.54 ± 0.32),$P < 0.05$]。同时,LPS耐受动物经大剂量LPS攻击后肝组织GSK-3α严重降解。LPS攻击导致各组与LPS攻击前比较Calpain显著升高[NC(2.78 ± 0.53);ET(2.45 ± 0.22);LiCl(2.39 ± 0.86), $P < 0.05$],但组间比较没有显著差异($P > 0.05$)。GSK-3亚细胞定位分析,LPS耐受时胞核内聚集的GSK-3减少,并主要集中于细胞质内;在不同浓度LiCl刺激下,胞核GSK-3也可减少,但不显著;在大剂量LPS攻击下,胞核GSK-3减少,主要集中于细胞质内和胞核周围。**结论** LPS耐受和GSK-3抑制剂LiCl预处理均可导致GSK-3功能活性改变,但影响和机制并不完全相同,LPS耐受的机制可能与抑制GSK-3激酶活性、诱导GSK-3磷酸化、促进GSK-3α裂解并诱导GSK-3从胞核向细胞质转移有关。

[关键词] 脂多糖;内毒素耐受;糖原合成酶激酶-3;肝损伤

[中图法分类号] R329.26; R345; R364.5 [文献标志码] A

# Effect of LPS pretreatment on GSK-3 functional activity in rats

Chen Taizhong[1], Zhang Yan[2], Xiong Tao[1], Xu Fangliang[2], Gong Jianping[2], Yu Zheng[1] ([1]Department of General Surgery, Yongchuan Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS) tolerance and glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitor on GSK-3 functional activity. **Methods** A total of 36 male healthy SD rats were randomly divided into control group (NC), LPS tolerance group (ET) and LiC1 treatment group (LiC1), with 12 rats in each group. ET group was established through intraperitoneal injection at 0.015, 0.030 and 0.060 mg/kg on the first, second and third day. LiC1 group was also received intraperitoneal injection of 0.25 ml LiCl of 2.5 mol/L at the same time point, while the drinking water contained 3 mmol/L LiCl. NC group was intraperitoneally injected PBS 0.25 ml every day. Then each group was divided into the LPS after attack group and the LPS before attack group on the basis that whether lethal dose LPS (10 mg/kg) was accepted. In the LPS after attack group, the rats received 10 mg/kg LPS intraperitoneal injection, and the LPS before attack group took the same volume of PBS intraperitoneal injection. After 12 h of last injection, the rats were killed to collect the liver tissues. Total activity of GSK-3 in the liver tissue was detected by [γ-32P]

[基金项目] 重庆市卫生局重点项目(2011-1-083);重庆永川区软科学研究项目(YCSTC,2011BE5013);重庆医科大学附属永川医院项目(YJYB2011019)

[通信作者] 余 正,E-mail: yuzheng196094@163.com

incorporation. mRNA expression of GSK-3α and GSK-3β was detected by RT-PCR, and expression of GSK-3α/β and pGSK-3α/β was measured by Western blotting. Calpain activity were analyzed by Coomassie brilliant blue staining. The distribution of GSK-3 in the sub-cells RAW264.7 were observed by laser scanning confocal microscopy. **Results** Attack of LPS resulted in a significant decrease in GSK-3 kinase activity of liver tissue in ET-group (1 311 ± 57, $P = 0.023\ 5$), while there was no significant difference in other groups before and after the attack of LPS ($P > 0.05$). The mRNA expression and the total protein expression of GSK-3α and β had no statistically significant effect on LPS tolerance group and LiCl pretreatment group before and after the attack of LPS ($P > 0.05$). Before the LPS attack, GSK-3α phosphorylation in the NC, ET and LiCl groups had no significant increase ($P > 0.05$). But after LPS attack, GSK-3α phosphorylation in LiCl group was significantly increased (3.07 ± 0.62, $P < 0.05$). Before the LPS attack, GSK-3β phosphorylation of ET and LiCl groups was significantly increased compared with the NC group (ET: 1.49 ± 0.26, LiCl: 2.05 ± 0.43, $P < 0.05$). But after LPS challenge, only GSK-3β phosphorylation of the LiCl group was increased (1.54 ± 0.32, $P < 0.05$). Meanwhile, the GSK-3α in the ET group was seriously degraded after large dose of LPS attack. LPS attack obviously enhanced the Calpain activity in each group (NC: 2.78 ± 0.53; ET: 2.45 ± 0.22; LiCl: 2.39 ± 0.86, $P < 0.05$ when compared with the LPS before attack group), but there was no outstanding difference between groups ($P > 0.05$). The GSK-3 subcellular positioning analysis showed that the GSK-3 gathered in the cell nucleus decreased during the tolerance, which mainly focused in the cytoplasm. With the stimulation of LiCl at different concentrations, the cell nucleus GSK-3 was also declined, but not substantially. With large dose of LPS attack, t GSK-3 was decreased in the cell nucleus, and mainly concentrated in the cytoplasm and surrounding the cell nucleus. **Conclusion** LPS tolerance and LiCl pretreatment may change the functional activity of GSK-3, but the influence and mechanism are not totally equivalent. The mechanism of LPS tolerance may be connected with restraining GSK-3 kinase activity, inducing GSK-3 phosphorylation, promoting GSK-3α cracking, and inducing GSK-3 to transfer from cell nucleus to cytoplasm.

[**Key words**] lipopolysaccharide; endotoxin tolerance; glycogen synthase kinase 3; liver injury

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-083), the Project of Soft Science Research of Yongchuan District of Chongqing (YCSTC2011BE5013), and the Project of Yongchuan Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (YJYB2011019). Corresponding author: Yu Zheng, E-mail: yuzheng196094@163.com

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通过 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)激活单核-巨噬细胞诱导炎症反应[1];大量炎症介质可引发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、脓毒症和感染性休克,导致组织损伤和多器官功能障碍[2-3]。肠源性 LPS 在导致炎症损伤的同时,也诱导内毒素耐受并减轻器官损伤。内毒素耐受[4-6](endotoxin tolerance)是指机体或细胞接受小剂量脂多糖(LPS)预处理后能耐受大剂量 LPS 攻击,它是天然免疫系统最重要的内源性保护机制。目前认为内毒素耐受与 TLR4 信号转导负调控密切相关,TLR4 通过 MyD88 依赖途径激活 PI3K/Akt,抑制 NF-κB,负性调控 TLR4 信号转导,维持免疫平衡[7]。因此,PI3K/Akt 是诱导炎症负调控和 LPS 耐受的关键途径,但其下游的分子信号机制尚未完全阐明。最近发现[8-10] PI3K/Akt 下游信号分子糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase 3, GSK-3)在 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)信号转导及炎症、休克、脓毒症和多器官损害中具有重要作用,是炎症相关疾病治疗的关键靶标。然而 GSK-3 在 LPS 耐受及 LPS 预处理减轻组织器官损伤过程中的作用机制还不清楚。根据相关研究[11-12]和已证明大剂量 LPS 腹腔注射可诱导肝损伤,LPS 耐受和 GSK-3 抑制剂(LiCl)具有相似的肝保护效应:①减轻肝组织损伤;②改善肝功能;③抑制炎症反应。尽管这两种干预措施的交汇点(cross-talk)可能在 GSK-3,但目前还缺乏直接的实验依据。因此,本实验通过观察肝组织 GSK-3 激酶活性、基因和蛋白表达、抑制性磷酸化以及 GSK-3 亚细胞定位状况,探讨 LPS 耐受和 GSK-3 抑制剂对 GSK-3 功能活性的影响和机制,初步阐明 GSK-3 在 LPS 耐受及 LPS 预处理减轻组织器官损伤中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

健康雄性、体质量(200 ± 10)g SD 大鼠 36 只由重庆医科大学实验动物中心提供;脂多糖 LPS 购自美国 Sigma 公司;氯化锂(LiCl)采用国产分析纯,总蛋白提取 Kit 购自上海申能博采生物科技有限公司;Protease inhibitor cocktail 购自上海申能博

采生物科技有限公司;细胞质/细胞核蛋白提取 Kit 购自上海申能博采生物科技有限公司;蛋白定量 Kit 购自上海申能博采生物科技有限公司;[γ-32P]ATP 购自北京市福瑞生物工程公司;RNA 快速提取 Kit 购自北京百泰克生物技术公司;RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司(中国大连);兔抗 pGSK-3αβ/小鼠抗 GSK-3αβ 试剂购自美国 Cell Signaling Technology 有限公司。

### 1.2 实验分组

36 只雄性健康 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组(NC)、LPS 耐受组(ET)和 LiCl 处理组(LiCl),每组 12 只;大鼠适应性喂养 1 周后进行预处理,LPS 耐受组(ET)于实验日程第 1、2、3 天依次接受 0.015、0.030 和 0.060 mg/kg LPS 腹腔注射;LiCl 处理组(LiCl)同样时间点每天腹腔注射 2.5 mol/L LiCl 0.25 ml,饮水含 3 mmol/L LiCl;对照组预处理,大鼠适应性喂养 1 周,每天腹腔注射磷酸盐缓冲液(PBS) 0.25 ml;预处理结束后每组再按是否接受致死量 LPS(10 mg/kg)攻击而分为 LPS 攻击前和 LPS 攻击后 2 个亚组, LPS 攻击后亚组大鼠接受 10 mg/kg LPS 腹腔注射,LPS 攻击前亚组接受等体积的 PBS 腹腔注射,连续观察 12 h 后麻醉、活杀、取材。

### 1.3 肝组织 GSK-3 酶活性分析

首先取肝组织称量、匀浆,-80℃低温保存待检测。人工合成基于 eIF2B 序列的 GSK-3 底物 16 肽并经 HPLC 纯化和 MS 鉴定,按照[γ-32P]放射性掺入法、用液体闪射仪测定 GSK-3 的激酶总活性。

### 1.4 基因定量分析

提取肝组织总 RNA 并进行完整性鉴定、纯度分析和核酸定量。按序列 NM_001031667.1 和 NM_019827.6 分别设计引物 GSK-3α 上游引物:5′-AAACGAGGGAACTGGTGG-3′,下游引物:5′-TCAGGTGGTGTCCGAGATT-3′和 GSK-3β 上游引物:5′CAACAAGGGAGCAAA-3′,下游引物:5′-GCGTGAGGAGGGATAAGG-3′以 GAPDH 为内参照基因(NM_008084.2),人工合成相应引物, GAPDH3′上游引物:5′-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3′,下游引物:5′-GGTCGGTGTGAACGGATTTG-3′采用两步法 RT-PCR 进行 GSK-3α(长度 706 bp)、GSK-3β(长度 309 bp)mRNA 半定量分析。

### 1.5 总蛋白、蛋白磷酸化和蛋白裂解分析

采用 Western blot 法。提取肝组织总蛋白并用 Bradford 法定量,用 10% SDS-PAGE 分离总蛋白,湿转法将蛋白质转移到 PVDF 膜,以 GSK-3α/β、pGSK-3α/β 和 β-actin 等第一抗体杂交,化学发光法检测免疫复合物。用 Quantity One 4.4 软件进行蛋白半定量分析。以酪蛋白为底物,按照考马斯亮蓝法在 96 孔板上用全自动酶标仪测定 Calpain 活性[13]。

### 1.6 GSK-3 亚细胞定位分析

培养 RAW264.7 细胞,ET 组经 0、10、100、1 000 ng/ml 的 LPS 刺激 12 h,LiCl 组经 0、10、25 和 50 mmol/L 的 LiCl 预处理 12 h 后 LPS(1 μg/L)刺激,对照组用 PBS 替代,12 h 后以 GSK-3 单克隆抗体进行免疫荧光染色,DAPI 核复染,在激光共聚焦显微镜下观察 GSK-3 亚细胞定位状况。

### 1.7 统计学分析

应用 SPSS 17.00 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 LPS 和 LiCl 预处理对肝组织 GSK-3 总活性的影响

LPS 攻击前,NC、ET 和 LiCl 组 GSK-3 活性组间比较无显著差异($P>0.05$);LPS 攻击后,各组间比较也无显著差异($P>0.05$)。LPS 攻击后,ET 组 GSK-3 活性显著低于 NC 组 LPS 攻击前水平[(1 311±57),$P=0.023\ 5$],但作为阳性对照的 LiCl 组,GSK-3 活性在 LPS 攻击后与 NC 组攻击前后均不差异($P>0.05$),提示在 LPS 耐受时 GSK-3 活性的抑制并不完全由抑制性磷酸化介导

### 2.2 GSK-3 基因表达变化

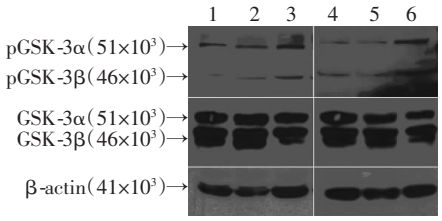
LPS 攻击前后,GSK-3α、β mRNA 表达组间比较及组内比较均无显著变化($P>0.05$)。见表 1。

**表 1 LPS 攻击前后肝组织 GSK-3αβ mRNA 水平分析**($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | GSK-3α | | GSK-3β | |
|---|---|---|---|---|
| | LPS 攻击前 | LPS 攻击后 | LPS 攻击前 | LPS 攻击后 |
| NC 组 | 1.00±0.00 | 1.03±0.11 | 1.00±0.00 | 1.20±0.30 |
| ET 组 | 1.09±0.13 | 1.17±0.13 | 1.21±0.21 | 1.29±0.26 |
| LiCl 组 | 1.35±0.14 | 1.39±0.26 | 1.43±0.19 | 1.45±0.30 |

### 2.3 GSK-3 蛋白水平变化

2.3.1 GSK-3 蛋白表达 LPS 攻击前后,各组 GSK-3α 和 GSK-3β 总蛋白表达量组间和组内比较均无显著差异($P>0.05$),提示 LPS 和 LiCl 预处理不改变 GSK-3 蛋白表达(图 1,表 2)。




1:LPS 攻击前 NC 组;2:LPS 攻击前 ET 组;3:LPS 攻击前 LiCl 组;4:LPS 攻击后 NC 组;5:LPS 攻击后 ET 组;6:LPS 攻击后 LiCl 组

**图 1 Western blot 检测 LPS 攻击前后肝组织 GSK-3α、β 蛋白表达**

**表 2 Western blot 检测 LPS 攻击前后肝组织 GSK-3αβ 蛋白表达灰度比值**($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | GSK-3α | | GSK-3β | |
|---|---|---|---|---|
| | LPS 攻击前 | LPS 攻击后 | LPS 攻击前 | LPS 攻击后 |
| NC 组 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| ET 组 | 1.02±0.25 | 0.91±0.18 | 1.11±0.13 | 1.04±0.21 |
| LiCl 组 | 1.13±0.21 | 0.94±0.17 | 1.06±0.22 | 0.90±0.18 |

2.3.2 GSK-3 磷酸化(pGSK-3)分析 LPS 攻击前,各组 GSK-3α 磷酸化无显著增加($P>0.05$),但 LPS 攻击后,LiCl 组 GSK-3α 磷酸化显著增加($P<0.05$)。LPS 攻击前,ET 和 LiCl 组 GSK-3β 磷酸化比 NC 组显著增加($P<0.05$);但 LPS 攻击后,只有 LiCl 组 GSK-3β 磷酸化显著增加($P<0.05$),见表 3。

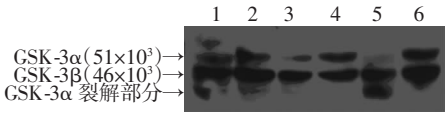
**表 3 Western blot 检测 LPS 攻击前后肝组织 pGSK-3αβ 蛋白表达灰度比值**($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | pGSK-3α | | pGSK-3β | |
|---|---|---|---|---|
| | LPS 攻击前 | LPS 攻击后 | LPS 攻击前 | LPS 攻击后 |
| NC 组 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| ET 组 | 1.02±0.26 | 1.48±0.33 | 1.49±0.26[a] | 0.90±0.23 |
| LiCl 组 | 1.17±0.37 | 3.07±0.62[a] | 2.05±0.43[a] | 1.54±0.32[a] |

a:$P<0.05$,与 NC 组比较

### 2.4 GSK-3α 被部分裂解

ET 组大鼠接受 LPS 攻击后，GSK-3α 出现比 NC 和 LiCl 组严重的裂解，而 GSK-3β 裂解并不明显（图 2）。




1：LPS 攻击前 NC 组；2：LPS 攻击前 ET 组；3：LPS 攻击前 LiCl 组；4：LPS 攻击后 NC 组；5：LPS 攻击后 ET 组；6：LPS 攻击后 LiCl 组

**图 2 LPS 攻击后 ET 组 GSK-3α 蛋白裂解分析**

### 2.5 肝组织 Calpain 活性分析

本研究检测了 LPS 攻击前后肝组织 Calpain 活性，发现 LPS 攻击前，各组 Calpain 活性无显著差异（$P>0.05$），LPS 攻击后虽然各组肝组织 Calpain 活性均显著增加［NC（2.78±0.53）；ET（2.45±0.22）；LiCl（2.39±0.86），$P<0.05$］，但组间比较无显著差异（$P>0.05$），提示尽管大剂量 LPS 攻击可导致 Calpain 活性增强，但这种活性的增强与 LPS 或 LiCl 预处理效应无关。

### 2.6 GSK-3 亚细胞定位分析

发现 RAW264.7 巨噬细胞正常状态 GSK-3 定位于细胞质和细胞核，以细胞质分布为主。LPS 耐受时，胞核内聚集的 GSK-3 减少，并主要集中于细胞质内；而在不同浓度 LiCl 刺激下，也可见胞核 GSK-3 减少，但不如 LPS 耐受和 LPS 攻击后的减少明显；在大剂量 LPS 攻击下，胞核 GSK-3 也减少，GSK-3 主要集中于细胞质内和细胞核周围。见图 3。

## 3 讨论

从理论上讲，LPS 耐受可能通过激活 PI3K/Akt 导致 GSK-3 抑制性磷酸化，从而产生功能活性改变[14-15]。但目前没有直接证据表明 LPS 耐受能改变 GSK-3 的功能活性，并因此而产生器官保护效应[16]。本实验采用 LPS 预处理诱导 LPS 耐受后观察肝组织 GSK-3 功能活性改变。氯化锂（Lithium Chloride，LiCl）被广泛用于体内外研究，它能双重抑制 GSK-3 活性[17]：抑制 GSK-3 对底物的磷酸化修饰；阻止磷酸化 pGSK-3 去磷酸化而转变成活性 GSK-3。因此本研究中首选 LiCl 作为 GSK-3 抑制剂，作为考察 GSK-3 抑制剂保护器官功能的反向验证实验，着重对 GSK-3 基因和蛋白表达、抑制性磷酸化水平、蛋白分解状况以及亚细胞定位等方面进行考察。

### 3.1 LPS 耐受和 LiCl 预处理对 GSK-3 激酶活性的影响

发现在 LPS 攻击之前，各组动物肝组织 GSK-3 活性无显著差异，但 LPS 攻击之后 GSK-3 活性均有降低，其中 ET 组的降低具有统计学意义。提示 LPS 攻击

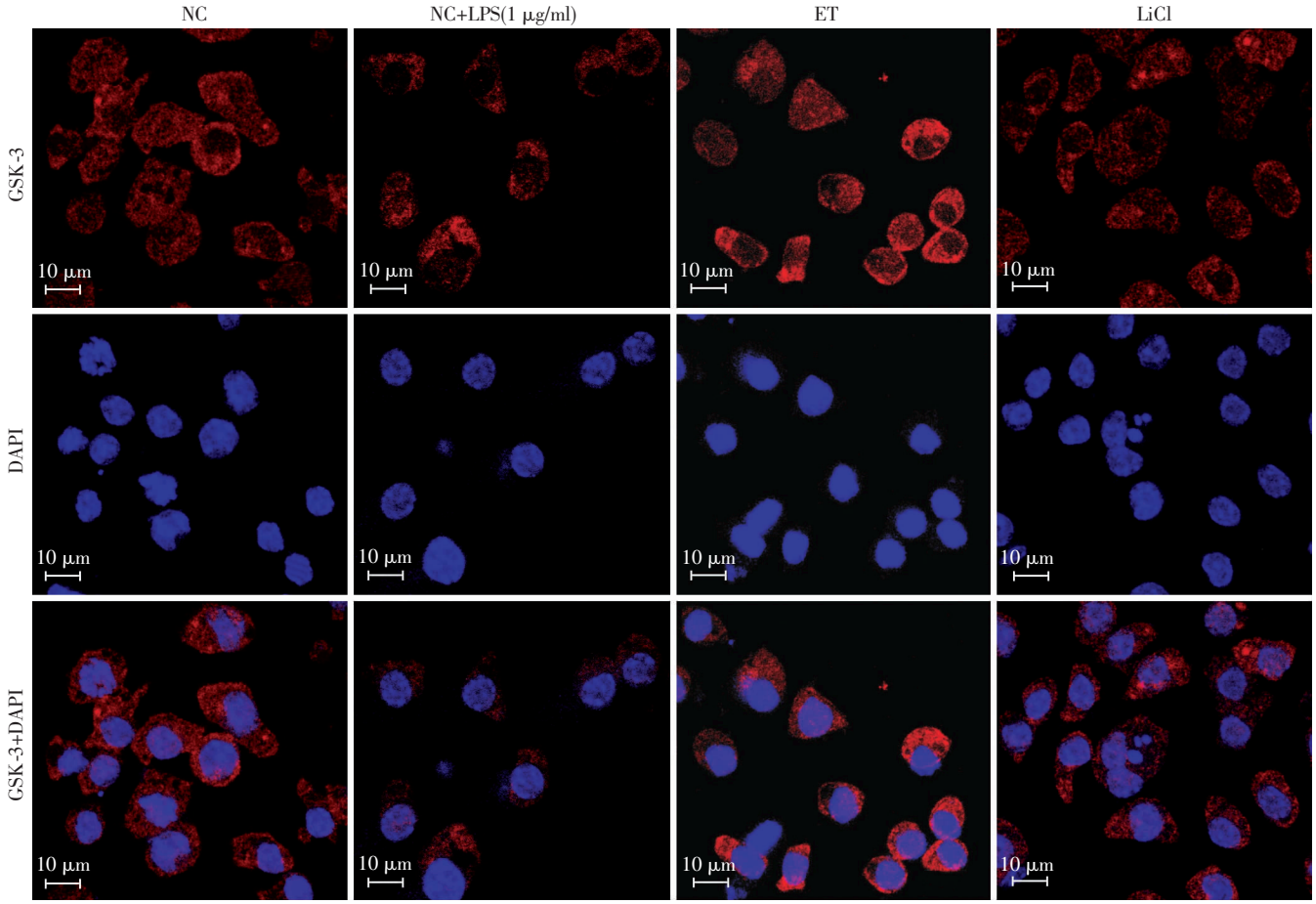



**图 3 激光共聚焦分析 RAW264.7 细胞不同处理因素对 GSK-3 亚细胞定位情况**

可抑制 GSK-3 活性,而 LPS 耐受强化了这种抑制效应[18]。但作为抑制性磷酸化的阳性对照,LiCl 预处理并未显著抑制 LPS 攻击导致的 GSK-3 活性改变,暗示 LPS 耐受导致的 GSK-3 活性抑制并不完全由抑制性磷酸化所介导。

### 3.2 LPS 耐受和 LiCl 预处理对 GSK-3 基因和蛋白的影响

关于基因和蛋白定量,我们在 LPS 预处理及同期 LiCl 阳性对照实验中,均未观察到 GSK-3 在基因和蛋白水平的表达变化。提示 GSK-3 功能活性调控可能不发生在转录因子水平, LPS 预处理导致的 GSK-3 激酶活性抑制并非基于基因和蛋白表达的调控。

我们在 GSK-3 两个亚型磷酸化分析中发现:在 ET 组,尽管 LPS 预处理及随后的 LPS 攻击均未导致 GSK-3α 磷酸化;但导致了 GSK-3β 磷酸化。同时,LiCl 阳性对照组在预处理及随后的 LPS 攻击中,均导致 GSK-3β 磷酸化,但只有 LiCl 预处理联合 LPS 攻击才导致了 GSK-3α 磷酸化。这提示,GSK-3α 和 β 对磷酸化抑制的敏感性存在差异,GSK-3β 更敏感而易于发生抑制性磷酸化。

此外,LPS 预处理和随后的 LPS 攻击均未导致 GSK-3α 显著磷酸化,但作为阳性对照 LiCl 却能在预处理联合 LPS 攻击后导致 GSK-3α 磷酸化。提示在本实验条件下,LPS 预处理或 LPS 耐受对 GSK-3 的磷酸化抑制弱于 LiCl。但问题在于,GSK-3 激酶活性的下降却见于 LPS 耐受动物。这些结果提示,LPS 耐受动物出现的 GSK-3 激酶活性下降并不完全由抑制性磷酸化所介导,LPS 耐受和 GSK-3 抑制剂导致 GSK-3 功能活性抑制的机制并不完全相同。

值得注意的是,LPS 预处理动物在接受大剂量 LPS 攻击后,出现 GSK-3α 的明显裂解(不是彻底降解),而 GSK-3β 以及其他实验组没有类似表现。这一结果提示,LPS 耐受时 GSK-3 激酶活性下降有可能跟 GSK-3α 严重裂解有关。新近发现[13] Calpain 能将 GSK-3α 和 β 部分裂解并在 Western blot 实验中出现相对分子质量为(40 ~ 42) × $10^3$ 的 GSK-3 片断,裂解反应发生在 GSK-3β 则增强 GSK-3 激酶活性,但发生在 GSK-3α 的 Calpain 裂解并不增加激酶活性。研究[19-21]表明,GSK-3 的彻底降解由 GSK-3 磷酸化、泛素化以及泛素-蛋白酶体系统完成,而 Calpain 对蛋白的初步裂解是发生于泛素-蛋白酶体上游的事件,并能促进蛋白酶体依赖的蛋白降解过程。因此,我们推测 LPS 耐受 LPS 攻击下 GSK-3α 严重裂解可能是 GSK-3α 被 Calpain 裂解、且将走向彻底降解进而降低 GSK-3 激酶活性的一个重要环节;尽管大剂量 LPS 攻击可导致 Calpain 活性增强,但这种活性的增强与 LPS 或 LiCl 预处理效应无关 。

### 3.3 LPS 耐受和 LiCl 预处理对 GSK-3 细胞亚定位的影响

资料[22-23]显示 GSK-3 主要定位在细胞质,但可进入细胞核、线粒体和生长锥(growth cone)等亚细胞结构,或与这些结构结合,活化状态的 GSK-3 可进入细胞核而发挥调控功能。本研究发现,正常状态 GSK-3 定位于细胞质和胞核,以细胞质分布为主。但在 LPS 耐受时,细胞核内 GSK-3 明显减少,主要集中于细胞质;在大剂量 LPS 攻击下,胞核 GSK-3 也显著减少,GSK-3 主要聚集于细胞质内、细胞核周围;在不同浓度 LiCl 刺激下细胞核 GSK-3 也有减少,但不如 LPS 耐受或攻击导致的减少明显。这提示,生理条件下,有部分活化状态的 GSK-3 存在于胞核;但 LPS 预处理或大剂量 LPS 攻击可导致 GSK-3 从胞核转移到细胞质。此外我们还发现,RAW264.7 对照细胞和 LiCl 处理细胞的细胞核内都有较多 GSK-3 分布。考虑到 LiCl 是 GSK-3 抑制性磷酸化的阳性对照,但 LiCl 组细胞 GSK-3 出核变化并不显著,提示 LPS 预处理或大剂量 LPS 攻击所导致的 GSK-3 出核转移,很可能是转录下调的一个征象,但出核机制可能难以完全用抑制性磷酸化来解释。

研究[24-26]表明:尽管无血清培养过程并不改变 GSK-3 表达量,但可导致非结合状态 GSK-3 增多,而诱导 GSK-3 向核内聚集;LiCl 处理不能抑制促凋亡刺激诱导的 GSK-3 核内转移。因此,LPS 预处理或大剂量 LPS 攻击所导致的 GSK-3 出核反应,可能是由于 LPS 刺激导致了 GSK-3 功能状态的改变或复合体性质的改变,从而增加了 GSK-3 与细胞质蛋白的结合率,导致核内 GSK-3 减少[27]。对照细胞和 LiCl 处理细胞核内都有较多 GSK-3 聚集的原因,可能与实验前 24 h 的无血清培养有关,而非单纯的 GSK-3 磷酸化抑制所为[21,28]。GSK-3 出核反应可能是 LPS 耐受抑制炎症的分子基础[29-30]。

综上所述,本实验发现,LPS 耐受和 LiCl 预处理均可导致 GSK-3 功能活性改变。LPS 耐受可抑制 GSK-3 活性、诱导 GSK-3 磷酸化、促进 GSK-3α 裂解并诱导 GSK-3 从细胞核向细胞质转移;而 LiCl 预处理可导致 GSK-3 抑制性磷酸化,但对 GSK-3 裂解和亚细胞定位的影响不如 LPS 耐受明显。LPS 耐受导致 GSK-3 活性下降的主要原因可能跟抑制性磷酸化和 Calpain 活性升高都有关。

尽管 LPS 和 LiCl 预处理改变了 GSK-3 功能活性,而这种功能活性的改变很可能是 LPS 耐受及其器官保护效应的分子基础。研究 LPS 和 GSK-3 抑制剂 LiCl 预处理对 GSK-3 功能活性的影响,有望阐明 GSK-3 在

内毒素耐受及其多器官保护效应中的作用机制，并为 GSK-3 抑制剂的临床应用提供实验依据。

## 参考文献：

[1] Xu F L, You H B, Li X H, *et al*. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells [J]. Am J Surg, 2008, 196(1): 139 – 148.

[2] Wei S D, Li J Z, Liu Z J, *et al*. Dexamethasone attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by downregulating glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in Kupffer cells[J]. Hepatol Res, 2011, 41(10): 989 – 999.

[3] Liu Z J, Liu X L, Zhao J, *et al*. The effects of SOCS-1 on liver endotoxin tolerance development induced by a low dose of lipopolysaccharide are related to dampen NF-kappaB-mediated pathway [J]. Dig Liver Dis, 2008, 40(7): 568 – 577.

[4] Liao R, Liu Z, Wei S, *et al*. Triggering receptor in myeloid cells (TREM-1) specific expression in peripheral blood mononuclear cells of sepsis patients with acute cholangitis [J]. Inflammation, 2009, 32(3): 182 – 190.

[5] Chen Y, Chen J, Liu Z, *et al*. Relationship between TH1/TH2 cytokines and immune tolerance in liver transplantation in rats[J]. Transplant Proc, 2008, 40(8): 2691 – 2695.

[6] Chen Y, Liu Z, Liang S, *et al*. Role of Kupffer cells in the induction of tolerance of orthotopic liver transplantation in rats [J]. Liver Transpl, 2008, 14(6): 823 – 836.

[7] Liu Z J, Yan L N, Li S W, *et al*. Glycine blunts transplantative liver ischemia-reperfusion injury by downregulating interleukin 1 receptor associated kinase-4[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(11): 1479 – 1486.

[8] Jope R S, Yuskaitis C J, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics[J]. Neurochem Res, 2007, 32(4/5): 577 – 595.

[9] Pengal R A, Ganesan L P, Wei G, *et al*. Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt[J]. Mol Immunol, 2006, 43(10): 1557 – 1564.

[10] Simon D, Medina M, Avila J, *et al*. Overcoming cell death and tau phosphorylation mediated by PI3K-inhibition: a cell assay to measure neuroprotection[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011, 10(2): 208 – 214.

[11] Sass G, Heinlein S, Agli A, *et al*. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis[J]. Cytokine, 2002, 19(3): 115 – 120.

[12] Neviere R R, Cepinskas G, Madorin W S, *et al*. LPS pretreatment ameliorates peritonitis-induced myocardial inflammation and dysfunction: role of myocytes[J]. Am J Physiol, 1999, 277(3 Pt 2): H885 – H892.

[13] Goni-Oliver P, Lucas J J, Avila J, *et al*. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(31): 22406 – 22413.

[14] Leffler M, Hrach T, Stuerzl M, *et al*. Insulin attenuates apoptosis and exerts anti-inflammatory effects in endotoxemic human macrophages[J]. J Surg Res, 2007, 143(2): 398 – 406.

[15] Hsu M J, Wu C Y, Chiang H H, *et al*. PI3K/Akt signaling mediated apoptosis blockage and viral gene expression in oral epithelial cells during herpes simplex virus infection[J]. Virus Res, 2010, 153(1): 36 – 43.

[16] Hazeki K, Nigorikawa K, Hazeki O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(9): 1617 – 1623.

[17] Jope R S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes[J]. Trends Pharmacol Sci, 2003, 24(9): 441 – 443.

[18] Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression[J]. J Leukoc Biol, 2005, 77(1): 3 – 15.

[19] Smith I J, Dodd S L. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle[J]. Exp Physiol, 2007, 92(3): 561 – 573.

[20] Powers S K. Calpain and caspase-3 are required for sepsis-induced diaphragmatic weakness[J]. J Appl Physiol, 2009, 107(5): 1369.

[21] Supinski G S, Wang W, Callahan L A. Caspase and calpain activation both contribute to sepsis-induced diaphragmatic weakness[J]. J Appl Physiol, 2009, 107(5): 1389 – 1396.

[22] Huang M, Kamasani U, Prendergast G C. RhoB facilitates c-Myc turnover by supporting efficient nuclear accumulation of GSK-3[J]. Oncogene, 2006, 25(9): 1281 – 1289.

[23] Jeong J H, Ryu D S, Suk D H, *et al*. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from Orostachys japonicus on modulation of signal pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells[J]. BMB Rep, 2011, 44(6): 399 – 404.

[24] Failor K L, Desyatnikov Y, Finger L A, *et al*. Glucocorticoid-induced degradation of glycogen synthase kinase-3 protein is triggered by serum- and glucocorticoid-induced protein kinase and Akt signaling and controls beta-catenin dynamics and tight junction formation in mammary epithelial tumor cells[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(10): 2403 – 2415.

[25] Dash P K, Johnson D, Clark J, *et al*. Involvement of the glycogen synthase kinase-3 signaling pathway in TBI pathology and neurocognitive outcome[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24648.

[26] Pedretti S, Raddatz E. STAT3α interacts with nuclear GSK3beta and cytoplasmic RISK pathway and stabilizes rhythm in the anoxic-reoxygenated embryonic heart[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(3): 355 – 369.

[27] Kaplan N A, Colosimo P F, Liu X, *et al*. Complex interactions between GSK3 and aPKC in Drosophila embryonic epithelial morphogenesis[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18616.

[28] Meares G P, Jope R S. Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis [J]. J Biol Chem, 2007, 282(23): 16989 – 17001.

[29] Wang Y, Weiss L M, Orlofsky A. Coordinate control of host centrosome position, organelle distribution, and migratory response by Toxoplasma gondii via host mTORC2[J]. J Biol Chem, 2010, 285(20): 15611 – 15618.

[30] Sui Z, Kovacs A D, Maggirwar S B. Recruitment of active glycogen synthase kinase-3 into neuronal lipid rafts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(4): 1643 – 1648.

（收稿：2011-11-16；修回：2012-01-31）

（编辑　吴培红）