

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00848

# Akt、Bad 在大鼠肝缺血再灌注中的变化及作用

## Changes of Akt and Bad during liver ischemia/reperfusion in rats and their roles

徐磊<sup>1</sup>, 李克华<sup>1</sup>, 李向农<sup>2</sup>

1. 徐州市中医院, 南京中医药大学徐州附属医院普通外科, 徐州 221003

2. 徐州医学院附属医院普通外科, 徐州 221002

**[摘要]** 目的: 研究 PI3K-Akt 信号转导系统成员 Akt1、Bad 在大鼠肝缺血再灌注 (IR) 后的激活规律, 探讨该通路在 IR 损伤中的作用。方法: 将 60 只 SD 雄性大鼠随机分成 4 组: 空白对照组 (Sham)、缺血再灌注组 (IR)、溶剂对照组 (DMSO)、阻断剂组 (LY), 于复灌 0、0.5、1、2、4 h 各不同时间点取材, 应用免疫组化和免疫印迹法测定肝组织中 Akt1、p-Akt1 等信号蛋白的表达; H-E 染色观察肝组织显微结构; 同时测定血清肝功酶水平。结果: IR 组大鼠在各复灌时间点上都显示明显肝细胞损伤, 并随复灌时间延长加重; 肝细胞胞质内有 p-Akt1 (Thr-308) 表达, 并在复灌 0.5 h 达到高峰。应用 PI3K 特异性阻断剂 LY294002 后, 大鼠 p-Akt1 (Thr-308) 表达在复灌 0.5 h 较 IR 组明显减少 ( $P < 0.01$ ), 但血清肝功酶指标在复灌 4 h 才明显升高 ( $P < 0.01$ ); 同时, LY294002 使 Akt1 下游底物 Bad (Ser-136) 磷酸化水平降低、细胞损伤加重。结论: 在缺血再灌注过程中 PI3K-Akt 信号转导通路的激活对肝脏起到了一定的保护作用。

**[关键词]** 再灌注损伤; PI3K-Akt 信号通路; 肝

**[中图分类号]** R 575 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0848-03

肝缺血再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 损伤是肝脏外科常见的病理生理过程。以往的研究显示, 多种信号通路参与或介导了 IR 对肝细胞的损伤过程。而 PI3K-Akt 作为一个独立于其他信号转导通路的全新信号系统, 被认为与细胞存活直接相关<sup>[1]</sup>。该信号系统家族成员 Akt 作为该通路中的核心分子, 在抗凋亡、促进细胞存活的过程中是一个重要的媒介<sup>[2]</sup>。本研究通过大鼠肝 IR 模型观察 IR 对肝细胞中 PI3K-Akt 信号系统部分成员磷酸化的影响, 旨在探讨该信号转导通路在大鼠肝脏 IR 过程中的作用。

### 1 材料和方法

**1.1 动物分组** 清洁级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 250~280 g, 由徐州医学院实验动物中心提供。将大鼠随机分成空白对照组 (Sham,  $n=6$ )、IR 组、溶剂二甲亚砷 (DMSO) 对照组、阻断剂组 (LY) 4 组, 其中, IR 组按复灌时间 0、0.5、1、2、4 h 再分为 5 个亚组; DMSO、LY 组选择复灌 0.5、4 h 分为 2 个亚组, 每个亚组  $n=6$ 。大鼠术前禁食 12 h, 自由饮水。采用 Ohmori 法<sup>[3]</sup>制备大鼠肝 IR 模型。LY 组和 DMSO 组分别于缺血前 30 min 经阴茎背静脉注射溶解于 DMSO 的 LY294002 (1.5 mg/kg) 及相应体积的 DMSO。

**1.2 肝功能测定** 于不同复灌时间点取下腔静脉血 2 ml 存于事先分装有肝素的 Eppendorf 管中, 离心取上清置 -20℃ 冰箱保存, 用日本 Olympus AU1000 型全自动生化分析仪同批检测血清天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平。

**1.3 免疫印迹** 于预定时间点快速切除肝左外叶, 用锐利刀片切取肝组织块 (小于 1 cm×1 cm), 以下操作均在冰水浴中进行; 匀浆, 4℃ 下 800×g 离心 15 min, 小心移取上清液。以牛血清白蛋白 (BSA, fraction V) 为标准蛋白, 用比色法测定蛋白含量。取等量蛋白样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 转膜, 3% BSA 封闭, 加入一抗, 4℃ 过夜。洗膜后加入羊抗兔 IgG-AP (二抗), 37℃ 反应 2 h, 洗膜。以 NBT/BCIP 显色, 水洗终止反应。以 Image J 分析软件 (Version 1.30v; Wayne Rasband, NIH, USA) 进行半定量分析处理。

**1.4 免疫组化** 如上切取小块肝组织, 置于 4% 复合甲醛中固定。石蜡包埋切片, 常规二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 先用 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温作用 6~8 min, 消除内源性辣根过氧化物酶活性, 后浸入配制好的柠檬酸/柠檬酸钠中, 95℃ 水浴 15 min。PBS 洗后用血清封闭, 室温 1 h 后 PBS 洗 3 次, 上一抗置于 4℃ 48~72 h。然后吸去一抗, PBS 洗 3 次, 以后的操作按 Vect ABC 试剂盒进行, 镜检。

**1.5 H-E 染色** 各组大鼠肝组织标本均作常规 H-E 染色, 光镜下观察病理变化。

**1.6 统计学处理** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 Sigma STAT 3.2 统计软件包进行单因素方差分析 (ANOVA), 多个实验组与 1 个对照组比较用最小显著差法 (LSD), 实验组之间比较采用  $q$  检验 (Newman-keuls test)。

### 2 结果

**2.1 血清肝功酶指标的变化** 与 Sham 组比较, IR 组大鼠

**[收稿日期]** 2008-02-25 **[接受日期]** 2008-04-29

**[作者简介]** 徐磊, 硕士, 主治医师, E-mail: xlx0731@126.com

血清 ALT、AST、LDH 水平随复灌时间延长而升高 ( $P < 0.01$ )。与 IR 组比较,LY 组大鼠的血清肝功酶指标在复灌 0.5 h 无显著性差异,但在复灌 4 h 则显著升高 ( $P < 0.01$ ,表 1)。

表 1 各组血清肝功酶的变化

[ $n=6, \bar{x} \pm s, z_B / (U \cdot L^{-1})$ ]

组别	丙氨酸转氨酶	天冬氨酸酶	乳酸脱氢酶
空白对照组	49.00±11.69	141.00±23.12	183.00±32.15
肝缺血再灌注组			
0 h	268.75±40.43**	485.25±75.65**	884.63±126.38**
0.5 h	279.25±43.99**	674.25±96.65**	1 268.57±176.65**
1 h	513.75±86.54**	824.65±114.00**	1 663.48±198.24**
2 h	789.25±108.56**	1 264.54±173.42**	2 564.24±319.26**
4 h	1 191.00±134.55**	1 504.52±187.74**	3 218.25±367.74**
二甲亚砷对照组			
0.5 h	282.56±45.23**	701.68±98.43**	1 231.86±169.51**
4 h	1 121.36±146.43**	1 489.72±176.96**	3 309.75±374.15**
LY294002 阻断剂组			
0.5 h	355.39±49.48**	786.36±115.15**	1 403.64±181.35**
4 h	1 904.33±213.85**△△	2 546.67±246.13**△△	4 162.35±324.36**△△

\*\*  $P < 0.01$  与空白对照组比较;△△  $P < 0.01$  与肝缺血再灌注 4 h 组比较

2.2 Akt1 磷酸化水平的变化 由表 2 可见,与 Sham 组比较,单纯缺血 1 h 后大鼠肝细胞质中 Akt1(Thr-308)磷酸化水平降低,但 IR 组在复灌 0.5、1、2 h 磷酸化水平均增强 ( $P < 0.01$ ),并于 0.5 h 达到高峰,至复灌 4 h 基本降至 Sham 组水平 ( $P > 0.05$ );但 Akt1 的表达没有变化。在复灌 0.5 h

时,LY 组大鼠肝细胞中的 p-Akt1(Thr-308)表达较 IR 组明显降低 ( $P < 0.01$ );但在复灌 4 h,其表达较 IR 组却无明显差异 ( $P > 0.05$ )。免疫组化显示,p-Akt1 的表达主要位于肝小叶汇管区附近的肝细胞质中(图 1)。

表 2 各组大鼠 Akt1 和 Bad 磷酸化水平的变化

(n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	Akt1	p-Akt1	Bad	p-Bad
肝缺血再灌注组				
0 h	1.08±0.05	0.89±0.12	1.08±0.08	0.77±0.03
0.5 h	1.12±0.07	1.95±0.22**	1.09±0.09	0.79±0.04
1 h	1.10±0.05	1.43±0.21**	1.09±0.10	1.02±0.06
2 h	1.04±0.06	1.36±0.20**	1.07±0.08	1.10±0.08
4 h	1.05±0.04	1.12±0.15	1.00±0.02	1.57±0.15**
二甲亚砷对照组				
0.5 h	1.14±0.08	1.87±0.34**	1.10±0.09	0.82±0.04
4 h	1.09±0.05	1.15±0.12	0.98±0.03	1.55±0.14**
LY294002 阻断剂组				
0.5 h	1.15±0.08	1.26±0.15**△△	1.04±0.15	1.01±0.02
4 h	1.03±0.03	1.04±0.09	1.06±0.05	1.12±0.08△△

\*\*  $P < 0.01$  与空白对照组比较;△△  $P < 0.01$  与同时时间点肝缺血再灌注组比较.各组表达量以 D 值与空白对照组 D 值的比值表示

2.3 Akt1 下游底物的变化 由表 2 可见 IR 组在复灌 2 h 后 p-Bad (Ser-136)蛋白开始表达,并呈现随复灌时间延长而逐渐增强的趋势;与 IR 组比较,LY 组大鼠肝组织中 p-Bad (Ser-136)蛋白表达在复灌 4 h 有明显下降 ( $P < 0.01$ );而总 Bad 的表达在各组之间并无差异 ( $P > 0.05$ )。

2.4 肝组织形态学改变 大鼠肝脏缺血后复灌 0、0.5、1、2、

4 h,组织形态学可见明显的肝损伤,而且损伤程度随复灌时间延长而加重。复灌 4 h 后,在 IR 组可见明显的细胞质空泡形成、血窦扩张淤血,肝细胞萎缩,细胞索紊乱,部分肝细胞坏死,核消失。LY 组大鼠损伤更为严重,4 h 时可见肝血窦内淤血,近汇管区肝细胞可见大片凝固性坏死,部分细胞呈核固缩表现(图 2)。

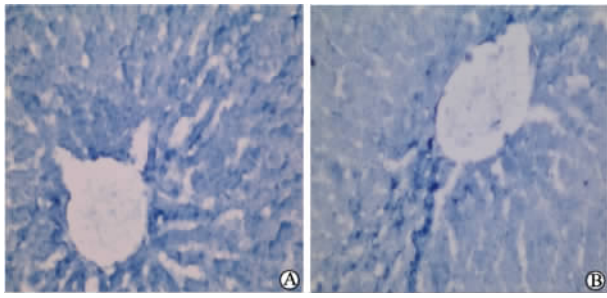


图1 肝缺血再灌注0.5 h组(A)与LY294002阻断剂0.5 h组(B)大鼠肝组织中p-Akt1(Thr-308)的表达  
Original magnification: ×400

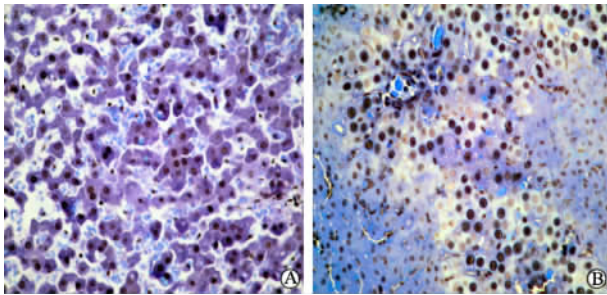


图2 肝缺血再灌注4 h组(A)与LY294002阻断剂4 h组(B)大鼠肝组织H-E染色结果  
Original magnification: ×400

### 3 讨论

本研究结果显示,大鼠肝脏经1 h缺血后分别复灌0、0.5、1、2、4 h,从肝脏酶学指标到组织形态学均提示有明显的肝脏损伤,而且损伤程度随复灌时间延长而加重,再次证实了IR对肝细胞损伤的规律。同时本实验发现,IR组大鼠肝组织中Akt1在缺血1 h后即明显活化,并在复灌0.5 h迅速达到高峰,其后随复灌时间延长磷酸化水平即开始下降。

在对Akt1下游底物Bad的检测中发现:p-Bad在复灌2 h开始表达,复灌4 h进一步增加。显示IR中Akt1的磷酸化相对比较短暂,也提示了Akt1对IR损伤的调节主要是通过下游底物的调控而起作用的。这与Harada等<sup>[4]</sup>报道的Akt1于复灌90~180 min后持续激活,并于120 min达到高峰有所不同。

本研究还发现,与同时时间点IR组大鼠比较,LY组大鼠在应用阻断剂LY294002后,肝细胞中p-Akt1、p-Bad的表达降低、肝功酶升高、肝细胞损伤加重。由此可以推测,PI3K-Akt信号通路系统在大鼠肝IR损伤种起到一定的调节作用。其可能的调节机制为<sup>[5]</sup>:IR中产生的损伤刺激信号使p-Bad去磷酸化并从14-3-3蛋白中释放出来,游离的Bad可与Bcl-X<sub>L</sub>结合形成异二聚体,Bcl-X<sub>L</sub>就丧失了维持线粒体外膜完整的功能,从而引起细胞损伤。但与之同时,IR也刺激了某些类生长因子信号的产生,首先通过细胞膜上的相关受体激活PI3K,产生的带有磷酸根的多磷酸肌醇脂,后者随即使Akt1的Thr308磷酸化并活化<sup>[6]</sup>。活化的p-Akt1进一步使下游底物中Bad的Ser-136磷酸化,后者继而被胞液中的14-3-3蛋白隔离并灭活。无活性的p-Bad解除了对Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>等抗凋亡蛋白的结合,游离的Bcl-X<sub>L</sub>则维持了细胞膜的完整性,促进了细胞存活。

因此,我们推测在IR损伤中,肝细胞内同时存在损伤和促存活两种力量的对抗,而该信号转导通路的激活显然对促进细胞存活有重要的作用。如何有效利用这种机制,提高该信号转导通路在促进肝细胞存活中的作用,将是减轻肝IR损伤十分有效的途径之一。

### [参考文献]

[1] 王望,王宪. 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B信号系统[J]. 国外医学:分子生物学分册,2000,22:45-49.  
 [2] 冯美江,丁新生. Akt与细胞生存[J]. 国外医学:分子生物学分册,2002,24:283-285.  
 [3] Ohmori M, Miyashita F, Uchida H, Kitoh Y, Tsuruoka S, Harada K, et al. Effect of erythromycin on ischemia-reperfusion injury of liver in rats [J]. Transplant Proc, 2000, 32: 811-814.  
 [4] Harada N, Hatano E, Koizumi N, Nitta T, Yoshida M, Yamamoto N, et al. Akt activation protects rat liver from ischemia/reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2004, 121: 159-170.  
 [5] Abe T, Takagi N, Nakano M, Furuya M, Takeo S. Altered Bad localization and interaction between Bad and Bcl-x<sub>L</sub> in the hippocampus after transient global ischemia [J]. Brain Res, 2004, 1009: 159-168.  
 [6] 杨章民,王一理,司履生. 磷脂酰肌醇-3激酶家族研究进展[J]. 国外医学:分子生物学分册,2003,25: 285-289.

[本文编辑] 孙岩