

AMP 依赖的蛋白激酶及 PI3K/Akt 信号途径在颈动脉狭窄形成过程中的变化

肖颖 陈实¹ 余文珍² 张永亮¹ 刘盛泽¹

(厦门大学附属福州市第二医院病理科 福建 福州 350007)

摘要 目的 观察 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)及 PI3K/Akt 信号途径在颈动脉狭窄形成过程中的变化。方法 取 SD 大鼠经高脂喂养 1 个月行颈总动脉球囊损伤术作为模型组($n=24$) ,继续喂养 14 d 后取损伤侧颈总动脉 ,行 HE 染色观测血管内皮损伤及内膜增生情况 ,应用荧光定量 PCR 法检测 AMPK 及 PI3K/Akt mRNA 水平 ,用 Western 印迹检测 p-AMPK、PI3K、p-Akt 蛋白水平 ,另取 8 只正常 SD 大鼠作为假手术组。结果 模型组大鼠血管内膜增生明显、管壁变厚;AMPK/PI3K/Akt mRNA 及蛋白水平较假手术组显著下降($P<0.01$)。结论 AMPK/PI3K/Akt 在颈动脉狭窄的病理生理进程中起到一定的作用。

关键词 颈动脉狭窄; AMP 依赖的蛋白激酶; PI3K; Akt

中图分类号 R543.4 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9202(2017)23-5794-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.23.019

颈动脉狭窄是导致缺血性脑血管病的重要原因之一 ,可引起脑卒中等疾病并导致相应的临床症状。颈动脉狭窄的形成机制比较复杂 ,颈动脉内膜粥样斑块的形成及血管内膜的损伤是其发生的重要病因^[1]。有报道 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)参与了缺血后血管重建 ,AMPK 是细胞的能量变化感受器 ,参与调节多种信号通路 ,如 PI3K/Akt 信号通路等。本文拟通过建立颈动脉狭窄动物模型 ,探讨 AMPK/PI3K/Akt 途径在颈动脉狭窄形成过程中的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 32 只 ,平均体质量(200 ± 20) g ,购自上海斯莱克实验动物有限公司 ,生产许可证: SCXK(沪)2007-0005。

1.2 仪器与试剂 手术显微镜 ,美国 World precision instruments; PCR 仪 ,ABI 7500 型; PCR 引物 ,生工生物工程(上海)有限公司合成; p-AMPK、PI3K、p-Akt 抗体 ,CST; 二喹啉酸(BCA)蛋白试剂盒 ,上海碧云天生物科技有限公司。

1.3 分组与处理 将大鼠随机分为假手术组 8 只 ,无高脂喂养 ,仅切开颈部皮肤分离基层无球囊损伤 模型组 24 只。模型组大鼠予高脂饲料 ,自制配方: 25%猪油 ,2%胆固醇 ,0.1%胆酸钠 ,72.9%基础饲料 ,喂养 1 个月 ,行颈动脉球囊损伤术 ,术在水瓶中加入苜蓿青霉素以通过饮水预防感染 ,并单笼喂养。全程观察大鼠的精神面貌、饮食及体重变化。14 d 后禁食不禁水处死大鼠 ,取术侧颈总动脉段 ,生理盐水洗净 ,取部分(假手术组 2 只 模型组 8 只)颈总动脉段放入 10%中性甲醛中固定 ,余下颈动脉段取出后迅速置于液氮中再转存 -70°C 备用。大鼠

颈动脉球囊损伤模型制备参照文献等^[2]方法稍进行改良 ,禁食 12 h ,麻醉后取左斜切位 ,在手术显微镜下分离血管直至颈总动脉分叉 ,在颈外动脉远心端下留线结扎 ,颈总动脉近心端及颈内动脉用动脉夹夹住 ,将球囊导管从颈外动脉近心端插入至颈总动脉起始部。注入约 0.1 ml 生理盐水使球囊充盈 ,然后缓慢来回推拉球囊导管以损伤颈动脉血管内皮。

1.4 血管内膜病理形态学观察 常规石蜡包埋切片后 ,行苏木精-伊红(HE)染色 ,在光学显微镜下观察血管内皮损伤程度、管壁厚度、内膜增生等情况。

1.5 实时荧光定量 PCR 法检测组织 AMPK、PI3K、Akt mRNA 的表达 按 Trizol 法提取各组大鼠颈动脉总 RNA ,并参照逆转录扩增试剂盒操作程序进行 cDNA 合成。扩增条件为: 95°C 2 min 变性 , 95°C ,10 s , 60°C ,30 s , 70°C ,30 s 扩增 40 个循环 ,获得各样本待测基因的 CT 值 ,各组间相对基因表达用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示。采用 ACTB 作为内参照 ,引物序列: ACTB 正义链 5': CT-GCGGGTATCCATGAGA3' ,反义链 5': TACCACCACT-GAGAACGATG3' ; AMPK-G8 正义链 5': ATGTCCTGCTTGATG-CACAC3' ;反义链 5'CTTCTGCTGAGCATAGTTG3' ; PI3K-G9 正义链 5': TTTGGATAACTTGCTTGTGAGATT3' ;反义链 5'CGACT-TGCCTATTCAGGTGCTT3' ; Akt-G10 正义链 5': GCCTCTTGC-CGGTATCGGTGT3' ;反义链 5'GCTGTATCTTGCTCAGGTGGT3'。

1.6 Western 印迹法检测组织 p-AMPK、PI3K、p-Akt 蛋白表达

将组织加入蛋白裂解液冰浴条件下匀浆 ,并按 BCA 法进行蛋白定量。配十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳胶 ,后将蛋白样品用此凝胶电泳进行分离 ,再转移到聚二偏氟乙烯(PVDF)膜上 ,用含 5% 脱脂奶粉封闭液室温轻摇漂洗 PVDF 膜 1 h ,将膜放入大小适宜的自封袋中 ,分别加入 1:(500~1 000) 稀释一抗 37°C 1 h ,取出 PVDF 膜 ,用 T-TBS 液洗 3 次 ,每次 10 min ,后加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗。室温 2 h ,取出 PVDF 膜 ,用 T-TBS 液洗 3 次 ,每次 10 min ,用光电学发光法(ECL)显色 ,曝光显影。以 β -actin 蛋白为内参照 ,计算各组 p-AMPK、PI3K、p-AKT 的相对表达量。

1.7 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析。

基金项目: 福州市科技计划项目(No.2012-S-155-4)

1 厦门大学附属福州市第二医院神经外科

2 福建中医药大学中西医结合学院

通讯作者: 陈 实(1974-) ,男 ,硕士 ,副主任医师 ,主要从事脑血管病研究。

第一作者: 肖 颖(1970-) ,男 ,副主任医师 ,主要从事临床病理学研究。

2 结 果

2.1 各组一般情况观察 假手术组大鼠未见有明显异常改变。模型组大鼠术后前 3 d 大鼠精神较差,后稍有好转,但毛发欠光泽,体重增长缓慢,未见感染死亡现象。

2.2 各组损伤侧颈动脉病理形态学观察 光镜下可见,假手术组血管壁完整,内、外弹力板完整连续,内膜光滑,中膜未见增厚;模型组颈动脉内皮细胞脱落,内膜明显不规则增生,增生的细胞核大、胞质丰富,类似平滑肌细胞,中膜增厚较明显。见图 1。

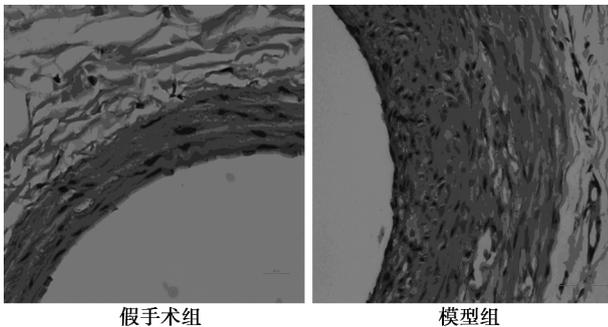


图 1 各组颈动脉病理变化(HE, $\times 400$)

2.3 各组颈动脉 AMPK、PI3K、Akt mRNA 表达比较 与假手术组比较,模型组 AMPK、PI3K、Akt mRNA 水平显著降低($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组 AMPK、PI3K、Akt mRNA 相对表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	AMPK	PI3K	Akt
假手术组	1.000 0 \pm 0.143 5	1.000 0 \pm 0.173 3	1.000 0 \pm 0.216 4
模型组	0.168 9 \pm 0.032 2	0.071 5 \pm 0.033 1	0.416 7 \pm 0.029 9
P 值	0.000	0.000	0.002

2.4 各组颈动脉 p-AMPK、PI3K、p-Akt 蛋白表达比较 模型组颈动脉球囊损伤术后 p-AMPK、PI3K 及 p-Akt 蛋白表达较假手术组明显减少($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

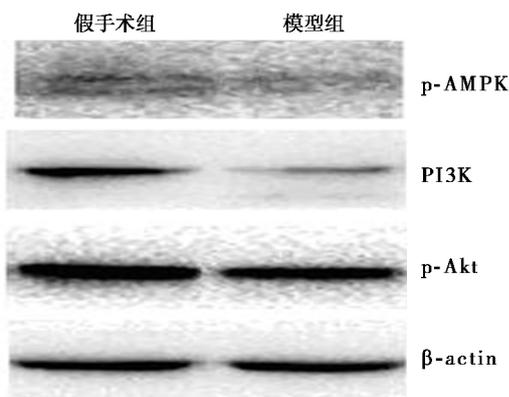


图 2 各组 p-AMPK、PI3K 及 p-Akt 蛋白表达

表 2 各组 p-AMPK、PI3K 及 p-Akt 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	p-AMPK	PI3K	p-Akt
假手术组	0.45 \pm 0.03	0.57 \pm 0.08	2.03 \pm 0.08
模型组	0.31 \pm 0.03	0.13 \pm 0.04	1.51 \pm 0.09
P 值	0.004	0.000	0.003

3 讨 论

AMPK 是一种细胞能量感受器,其激活可以调控细胞增殖、凋亡、迁移及肿瘤浸润等;最近研究表明其在血管重建中也起到了重要的作用^(3,4)。AMPK 激活后可以通过 AMPK-内皮型一氧化氮合酶(eNOS)-一氧化氮(NO)信号途径影响血管功能。内皮源性 NO 是血管生物学的一个关键分子,可促进血管内皮细胞增殖、降低血管张力和内皮细胞黏附⁽⁵⁾。研究表明 AMPK 的活化可以维持正常血管结构,AMPK 失活和血管内皮损伤密切相关,其表达缺失会导致血管内膜病变,且与动脉粥样硬化、高血压等疾病相关⁽⁶⁾;而当其激活后可导致炎症细胞对血管内皮的黏附减少,脂质积累减少,防止脂质氧化引起的炎症扩散,刺激负责细胞抗氧化防御基因的表达,促进 NO 的形成,并认为 AMPK 是血管内膜增生和再狭窄的治疗目标^(7,8)。Ki 等⁽⁹⁾对用 AMPK 激动剂对 PDGF 诱导血管内膜细胞增生 AMPK 可以抑制血管内膜的增生。通过激活 AMPK 可以有效地抑制血管平滑肌细胞的增殖⁽⁸⁾。AMPK 也可以通过 mTOR、p53、PI3K 三条通路参与细胞的增殖、凋亡从而调节血管内膜⁽¹⁰⁾。

PI3K/Akt 信号通路也参与细胞增殖与分化、凋亡等多种生理和病理过程。研究表明 PI3K 激动剂能够通过提高 Akt 和 eNOS 的磷酸化水平从而有效地激活 PI3K/Akt/eNOS 信号途径,而 PI3K 的抑制剂则抑制 eNOS 的活性;并且 PI3K/Akt 信号通路能够对血管内皮细胞的增殖和分化中起到重要的作用,其主要通过激活 eNOS 发挥作用⁽¹¹⁻¹³⁾。PI3K/Akt 也能作用于血小板源生长因子(PDGF)从而调节血管平滑肌细胞增殖、迁移及细胞凋亡。PI3K/Akt 与 AMPK 相互之间存在广泛的调整作用,两者之间主要表现为相互协同合作而不是相互拮抗⁽¹⁴⁾。研究表明 AMPK 通过复杂的方式调控 PI3K 信号通路,刺激该信号通路的活化,同样 Akt 也能反馈调整 AMPK 的磷酸化过程⁽¹⁵⁾。AMPK 和 PI3K/Akt 均能通过激活 eNOS 从而调控血管平滑肌细胞的增殖。有研究显示 AMPK 和 PI3K/Akt 在前列腺癌的细胞生长过程中,这两个信号通路相互作用对前列腺癌生长发生作用⁽¹⁶⁾。AMPK 和 PI3K/Akt 信号途径对缺血预处理的心肌细胞有协同保护作用,但是它们之间的具体关联机制有待进一步明确⁽¹⁷⁾。颈动脉再狭窄形成过程中两者之间可能相互作用,共同影响血管内皮细胞的增殖和分化。

本研究显示在颈动脉狭窄的形成过程中,AMPK/PI3K/Akt 表现失活,可能与动脉内膜的增生、血管狭窄形成有关。进一步明确这些信号通路在颈动脉狭窄形成过程的机制及相互作用机制及如何通过调整这些信号通路对于有效预防颈动脉内膜狭窄有着积极的意义。

4 参 考 文 献

1 林爱华,吴云虹,羊章礼,等. 颈动脉斑块中脂质比例与心血管危险

因素的相关性(J).中国老年学杂志 2014; 34(8) : 2066-7.

2 David AT. Histological and morphometric analyses for rat carotid artery balloon injury studies (J).Methods Mol Med 2007; 139(1) : 31-66.

3 Zhou DY ,Su Y ,Gao P ,et al. Resveratrol ameliorates high glucose-induced oxidative stress injury in human umbilical vein endothelial cells by activating AMPK (J).Life Sci 2015; 15(136) : 94-9.

4 Uemura Y ,Shibata R ,Kanemura N ,et al. Adipose-derived protein omentin prevents neointima formation after arterial injury (J).FASEB J 2015; 29(1) : 141-51.

5 缪惠宁 王艳飞 王雨水 等. 冠心病患者冠状动脉粥样硬化程度与颈动脉粥样硬化的相关性研究 (J).中国心血管病研究杂志 2014; 12(10) : 911-4.

6 Xu Q ,Si LY. Protective effects of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system (J).J Cell Mol Med 2010; 14(11) : 2604-13.

7 Ewart MA ,Kennedy S. AMPK and vasculoprotection (J).Pharmacol Ther 2011; 131(2) : 242-53.

8 Song P ,Wang S ,He C ,et al. AMPK α 2 deletion exacerbates neointima formation by upregulating Skp2 in vascular smooth muscle cells (J).Circ Res 2011; 109(11) : 1230-9.

9 Ki SH ,Lee JW ,Lim SC ,et al. Protective effect of nectandrin B a potent AMPK activator on neointima formation: inhibition of Pin1 expression through AMPK activation (J).Br J Pharmacol 2013; 168(4) : 932-45.

10 齐观云 李文林 石小玉. 磷酸腺苷依赖的蛋白激酶在自噬通路中作用的研究进展 (J).南昌大学学报(医学版) 2014; 2(54) : 78-82.

11 Gong X ,Shao L ,Fu YM ,et al. Effects of olmesartan on endothelial progenitor cell mobilization and function in carotid atherosclerosis (J).Med Sci Monit 2015; 21(26) : 1189-93.

12 Besler C ,Doerries C ,Giannotti G ,et al. Pharmacological approaches to improve endothelial repair mechanisms (J).Expert Rev Cardiovasc Ther 2008; 6(8) : 1071-8.

13 Dou J ,Li H ,Ma X ,et al. Osteocalcin attenuates high fat diet-induced impairment of endothelium-dependent relaxation through Akt/eNOS-dependent pathway (J).Cardiovasc Diabetol 2014; 13(74) : 1-12.

14 Ma H ,Guo R ,Yu L ,et al. Aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde (J).Eur Heart J 2011; 32(8) : 1025-38.

15 Memmott RM ,Dennis PA. Akt-dependent and-independent mechanisms of mTOR regulation in cancer (J).Cell Signal 2009; 21(5) : 656-64.

16 Choudhury Y ,Yang Z ,Ahmad I ,et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) as a potential therapeutic target independent of PI3K/Akt signaling in prostate cancer (J).Oncoscience 2014; 1(6) : 446-56.

17 Ji L ,Zhang X ,Liu W ,et al. AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning alleviated reperfusion injury (J).PLoS One 2013; 8(7) : e69910.

(2016-10-13 修回)

(编辑 苑云杰/曹梦园)

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体及其与 5 - Fu 联合用药对 T - 24 细胞生长的抑制作用

肖建华 董自强 游 艳¹

(三峡大学第一临床医学院泌尿外科 三峡大学泌尿外科研究所 湖北 宜昌 443003)

〔摘要〕 目的 研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL) 单独应用及其与传统化疗药物 5-氟尿嘧啶(5-Fu) 联合应用对体外培养人膀胱肿瘤 T-24 细胞生物学行为影响及可能机制。方法 倒置显微镜下观察不同浓度 TRAIL 作用不同时间后 T-24 细胞形态变化; MTT 法检测不同浓度 TRAIL 单独或 10 ng/ml TRAIL 联合不同浓度 5-Fu 不同时间后 T-24 细胞生存率; 流式细胞仪检测 T-24 细胞凋亡率。结果 TRAIL 单独应用时对 T-24 细胞生长抑制作用有限,显微镜下部分细胞出现形态学改变,作用 72 h 后,1、300、1 000 ng/ml 组细胞生存率分别(92. 52±3. 60) % ,(84. 63±5. 93) %和(79. 45±2. 04) %; 单用 200、400、600、800 及 1 000 μ mol/ml 5-Fu 时细胞生长抑制率分别为(10. 76±1. 78) % ,(14. 17±2. 75) % ,(28. 01±1. 66) % ,(20. 17±1. 68) %和(32. 53±3. 65) % 联合 10 ng/ml TRAIL 处理后 0、200、400、600、800 及 1 000 μ mol/ml 5-Fu 组细胞抑制率分别为分别为(3. 85±0. 88) % ,(8. 41±0. 74) % ,(16. 39±2. 72) % ,(26. 27±1. 72) % ,(28. 99±3. 36) %和(30. 18±1. 34) %; 10、100、1 000 ng/ml TRAIL 处理 48 h 后的细胞平均凋亡率为(3. 75±0. 31) % ,(7. 82±1. 07) % ,(7. 78±3. 15) %。结论 TRAIL 单用或联合其他化疗药物对 T24 细胞生长抑制作用有限,同 5-Fu 联合应用时不能明显增加 T-24 细胞对 5-Fu 的敏感性。

〔关键词〕 TRAIL; T-24; 联合用药; 生长抑制

〔中图分类号〕 R73-3 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9202(2017) 23-5796-03; doi: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2017. 23. 020

目前以手术治疗为主的综合治疗是膀胱癌的主要治疗方法。任何保留膀胱的膀胱癌手术均存在复发可能,所以术后需

定期做膀胱镜复查,化疗以预防膀胱癌的复发。而化疗药物常为一些毒性较高的药物,灌注后会出现诸如尿路刺激症状、血尿等药物毒副作用及厌食、恶心等胃肠道并发症,而即使早期膀胱肿瘤经尿道行肿瘤电切术后常规灌注化疗其复发率依然高达 50%以上^{〔1〕}。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL) 为肿瘤坏死因子(TNF) 超家族成员之一,参与身体自然防御,能诱导多种肿瘤细胞凋亡发生而对正常组织细胞的生长分化没有影响。同时,其还能增加多种肿瘤细胞对常用传统化疗药

1 三峡大学仁和医院

通讯作者:董自强(1964-) 男,教授,硕士生导师,主要从事泌尿外科常见疾病的诊治研究。

第一作者:肖建华(1987-) 男,硕士,主治医师,主要从事泌尿外科肿瘤治疗研究。