

磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B 信号转导通路在胰蛋白酶激活中性粒细胞中的作用

张成¹, 孙颖², 葛春林¹, 郭仁宣^{1Δ}

(1. 中国医科大学附属第一医院外科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 解放军第 201 医院妇产科)

[摘要] **目的:**探讨胰蛋白酶对中性粒细胞磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/PKB)信号转导通路的激活作用及 PI3K 抑制剂对其的影响。**方法:**应用 Western blot 技术检测特定浓度胰蛋白酶(40 nmol/L)作用中性粒细胞后及应用 PI3K 抑制剂 Wortmannin 和 LY294002 后的 p-PKB 活化情况;同时应用 ELISA 及 RT-PCR 技术检测细胞培养液及中性粒细胞内 TNF-α、IL-1β 蛋白和 mRNA 的变化。**结果:**40 nmol/L 胰蛋白酶作用中性粒细胞后 p-PKB 的水平显著高于对照组($P < 0.01$);TNF-α 和 IL-1β 蛋白的表达也出现了同样的趋势;预先应用 Wortmannin 或 LY294002 后完全阻断了胰蛋白酶对中性粒细胞 p-PKB 的激活作用,与胰蛋白酶刺激组比较差异显著($P < 0.01$);TNF-α 和 IL-1β 蛋白及 mRNA 也随着 p-PKB 活性的抑制而表达减弱。**结论:**胰蛋白酶能够激活中性粒细胞内 PI3K/PKB 信号转导通路,Wortmannin 及 LY294002 可以抑制胰蛋白酶对此通路的激活。

[关键词] 中性粒细胞;胰蛋白酶;磷脂酰肌醇 3 激酶;信号转导

[中图分类号] Q257 R34 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)01-0030-03

Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B induced by trypsin in neutrophils

ZHANG Cheng¹, SUN Ying², GE Chun-lin¹, GUO Ren-xuan^{1Δ}

(1. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, No. 201 Hospital of People's Liberation Army)

[Abstract] **Objective:**To investigate whether phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) signal transduction pathway could be activated rapidly by trypsin in neutrophils and whether LY294002 and wortmannin, PI3K inhibitors, could inhibit such effect of trypsin. **Methods:**The levels of phosphorylated PKB (p-PKB) and total PKB were examined by Western blotting in neutrophils after stimulation with 40 nmol/L of trypsin. The inhibitory effects of LY294002 and wortmannin on the activation of PKB induced by trypsin were observed. The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) protein and mRNA in the culture and neutrophils were determined by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcriptase polymerase chain reaction, respectively. **Results:**The level of p-PKB in neutrophils and the levels of TNF-α and IL-1β protein in the culture after stimulation with trypsin were significantly higher than those in normal controls ($P < 0.01$). Wortmannin and LY294002 could completely inhibit the activation of p-PKB induced by trypsin in neutrophils. With the inhibition of p-PKB, the levels of TNF-α and IL-1β protein and mRNA decreased. **Conclusion:**Trypsin could activate PI3K/PKB signal transduction pathway in neutrophils, and this action of trypsin is PI3K-dependent and could be inhibited or blocked by wortmannin and LY294002.

[Key words] neutrophil; trypsin; phosphatidylinositol 3-kinase; signal transduction

近年研究发现中性粒细胞表面的多种 G 蛋白偶联受体被激活后,细胞内磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号转导通路在调节细胞活化、趋化及凋亡方面发挥了重要作用。胰蛋白酶是另一种 G 蛋白偶联受体—蛋白酶活化受体-2(protease activated receptor, PAR-2)的主要配体^[1,2],重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)做为炎性反应的主要致病因素^[3],入血的胰蛋白酶可以直接激活中性粒细胞表面的 PAR-2。探讨

PAR-2 活化后的细胞内信号转导机制有助于深刻认识 SAP 炎性反应的实质。

1 材料与方法

1.1 中性粒细胞的分离与培养 全血采集自成年 SD 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,中国医科大学实验动物部提供。密度梯度离心法分离中性粒细胞。大鼠血肝素抗凝(25 U/ml)后加入 5%的葡聚糖至终质量浓度为 1%。混匀后室温下静置 40 min,吸取上层清液并置于淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 40 min,弃血浆层、单个核细胞层、分离液层,留下的即为中性粒细胞和残留红细胞,加入相当于细胞团块 9 倍体积的 0℃氯化铵溶液,混匀后在 0℃静置 7 min,溶

[基金项目] 辽宁省科技厅科技计划基金资助项目 (2001225001-17)

[作者简介] 张成(1971 -),男,副主任医师,博士。

Δ Corresponding Author's E-mail: cz1791@163.com

解残存的红细胞,1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清,留下的即为中性粒细胞。这种方法分离的中性粒细胞经台盼蓝染色证实存活率大于 95%,瑞氏染色证明纯度大于 98%。以 PBS 洗两次后将中性粒细胞混悬于 RPMI1640 培养液中(2 mmol/L L-谷氨酰胺和青、链霉素),调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。操作在无菌条件下进行。

1.2 实验分组 将培养的中性粒细胞分为 4 组,每组 15 ml,分为对照组、胰蛋白酶组、胰蛋白酶 + PI3K 抑制剂渥曼青霉素(Wortmannin)组、胰蛋白酶 + PI3K 抑制剂 LY294002 组,前两组分别给予等量的溶剂,而后两组分别给予 Wortmannin(终浓度为 200 nmol/L, Sigma 公司)和 LY294002(终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, Cell Signaling Technology 公司)预处理^[5],孵育 1 h 后,除对照组加入等量生理盐水外,其他 3 组分别加入胰蛋白酶(使终浓度为 40 nmol/L)^[4],再孵育 1 h。细胞在 CO₂ 培养箱中孵育(37℃,湿度 100%,5% CO₂ 和 95% 空气)。处理完提取上清液并收集中性粒细胞,提取总的 RNA 和胞浆蛋白待 RT-PCR 和蛋白印迹检测。

1.3 中性粒细胞蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)及磷酸化蛋白激酶(p-PKB)的活性检测 采用 Western blot 方法,取培养后的中性粒细胞加入细胞裂解液,2 000 $\times g$ 离心 20 min,收集上清液,考马斯亮蓝法进行蛋白定量。SDS-PAGE 分离样品(40 μg)后电转移至硝酸纤维膜上,封闭后,加入 PKB 1:1 000,(Cell Signaling Technology 公司产品)、二抗 1:2 000(HRP 标记的马抗小鼠 IgG)。电化学发光显影。照片在图像分析仪上进行分析定量,记录相应蛋白条带的平均光强度值,并计算 p-PKB 和 PKB 吸光度值的比值。

1.4 中性粒细胞 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的检测 (1)RNA 提取:将收集的各组中性粒细胞用 TRIzol 提取细胞 RNA。(2)反转录:采用 TaKaRa 公司试剂盒合成 cDNA。(3)PCR 扩增:大鼠 TNF- α 引物序列:上游 5'-GGCCACCACGCTCTTCTG-3',下游 5'-GCCATTGGCCAGGAGGGC-3',扩增片段 229 bp; IL-1 β 引物序列:上游 5'-AGAAGCTGTGGCAGC-TACCT-3';下游 5'-TTGGGATCCACACTCTCCAG-3',扩增片段 400 bp; β -actin 引物序列:上游 5'-GC-CAACCGTGAAAAGATG-3',下游 5'-CCAGGATA-GAGCCACCAAT-3',扩增片段 700 bp。PCR 反应按下列条件循环:94℃、2 min,预变性,然后 94℃、30 s,58℃、30 s,72℃、40 s,进行 30 个循环后,72℃ 10 min

延伸。反应完成后将 PCR 扩增产物(TNF- α 、IL-1 β 、 β -actin 的 cDNA)用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶用美国 Kodak 凝胶扫描分析系统扫描,计算目的基因与相对 β -actin 表达量的比值。

1.5 中性粒细胞培养液上清中 TNF- α 和 IL-1 β 的检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒购自晶美公司,严格按照说明书操作。

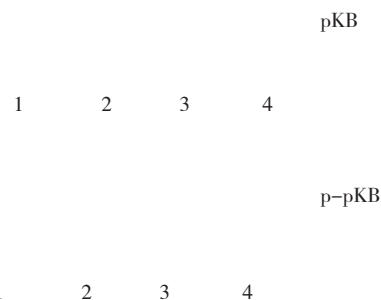
1.6 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析或 *t* 检验,经 SPSS 11.0 统计分析软件处理完成。

2 结果

2.1 中性粒细胞培养液上清中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量 与正常对照组比较胰蛋白酶刺激后培养液上清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高($P < 0.05$),Wortmannin 及 LY294002 组的 TNF- α 和 IL-1 β 含量与胰蛋白酶组比较显著降低($P < 0.01$),见表 1。

2.2 中性粒细胞 PKB 和 p-PKB 活性的变化 中性粒细胞在基础状态下 PKB 总蛋白表达丰富。但磷酸化水平较低,给予胰蛋白酶 40 nmol/L 刺激后磷酸化 PKB 迅速升高,与对照组比较明显增加($P < 0.01$);给予 Wortmannin 或 LY294002 阻断后,PKB 的磷酸化被明显抑制,与胰蛋白酶刺激组比较差异显著($P < 0.01$),(表 1,图 1)。

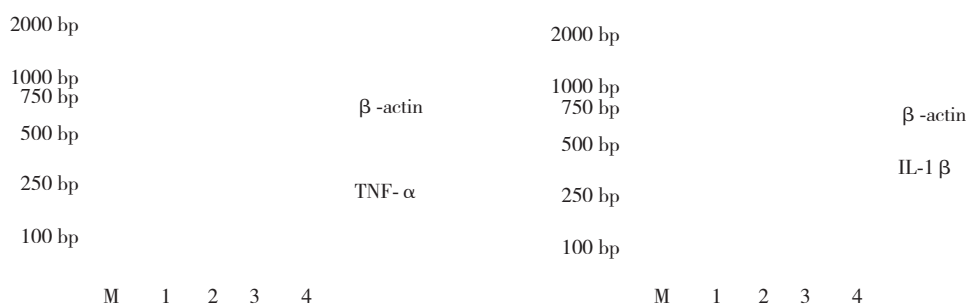
2.3 中性粒细胞 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 变化 对照组的中性粒细胞有少量 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达,胰蛋白酶作用中性粒细胞后 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达与对照组比较明显增加($P < 0.01$)。应用 Wortmannin 或 LY294002 预先阻断后,TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达与胰蛋白酶刺激组比较显著降低($P < 0.01$),(表 1,图 2)。



1:对照组;2:胰蛋白酶组;3:胰蛋白酶 + Wortmannin 组;4:胰蛋白酶 + LY294002

图 1 PKB 及 p-PKB 的 Western 印迹分析结果

Fig.1 Western blot of protein kinase B and phosphorylated protein kinase B



M: Maker; 1: 对照组; 2: 胰蛋白酶组; 3: 胰蛋白酶 + Wortmannin 组; 4: 胰蛋白酶 + LY294002

图 2 TNF-α 及 IL-1β mRNA 的 PCR 表达

Fig.2 PCR expression of TNF-α and IL-1β mRNA

表 1 各组 PKB 活性、TNF-α 及 IL-1β 的 mRNA 和蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Activity of PKB and expressions of TNF-α and IL-1β protein and mRNA ($\bar{x} \pm s$)

分 组	TNF-α (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	TNF-α mRNA	IL-1β mRNA	p-PKB/ PKB
对照	1.40 ± 0.47	6.12 ± 1.15	0.19 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.33 ± 0.03
胰蛋白酶	8.60 ± 1.15 ¹⁾	54.23 ± 10.05 ¹⁾	0.72 ± 0.06 ¹⁾	0.98 ± 0.11 ¹⁾	0.63 ± 0.08 ¹⁾
胰蛋白酶 + Wortmannin	2.58 ± 0.89 ²⁾	12.89 ± 3.02 ²⁾	0.32 ± 0.04 ²⁾	0.22 ± 0.04 ²⁾	0.28 ± 0.04 ²⁾
胰蛋白酶 + LY294002	1.59 ± 0.43 ²⁾	17.74 ± 2.05 ²⁾	0.33 ± 0.05 ²⁾	0.18 ± 0.02 ²⁾	0.39 ± 0.05 ²⁾

注: 1) 与对照组比较 $P < 0.01$; 2) 与胰蛋白酶组比较 $P < 0.01$

3 讨论

PAR-2 在体内分布广泛, 具有重要的生理及病理意义, 其能够通过特异性配体水解其细胞外区 N 端的特定片段使受体活化并激活细胞^[1]。研究发现胰蛋白酶是 PAR-2 最主要的配体(激活剂); 而中性粒细胞表面也表达大量的 PAR-2, 并能够被胰蛋白酶激活^[2]。生理状态下胰蛋白酶很难直接接触到血液中的中性粒细胞, 但在 SAP 这种特定的病理状态下, 胰蛋白酶可以直接接触到血液中的中性粒细胞。已有研究发现 SAP 时循环系统内有活性的胰蛋白酶达到了相当高的水平, 足以激活 PAR-2^[4]。由于 PAR-2 活化的特殊性及目前缺乏 PAR-2 的特异性拮抗剂^[1], 所以了解细胞活化后的细胞内信号转导机制就显得尤为重要。如果能够阐明胰蛋白酶激活中性粒细胞的细胞内信号转导问题, 就能更深入的了解 SAP 时过度炎症反应的起因及放大机制, 从而为其治疗提供新的切入点和理论依据。

PI3K 及其下游的蛋白激酶 B(PKB) 信号转导通路在中性粒细胞的活化、趋化和凋亡等方面发挥了重要的调节作用^[5]。PI3K 是一个普遍存在于体内各类细胞的异二聚体酯类激酶复合物, 共有 3 类, 其中 IB 型 PI3K 的 p110γ 与 p101 转接分子结合, 通过

与 G 蛋白偶联受体结合而活化。PKB 是 PI3K 产生的磷脂酰肌醇 3,4-P₂ 和磷脂酰肌醇 3,4,5-P₃ 的主要靶分子。PKB 可导致 IκBα 磷酸化, 致使 IκBα 与核因子 NF-κB 解离, 活化的 NF-κB 入核并结合到特定的启动子或促进子上并提高炎症介质基因的转录活性。多种 G 蛋白偶联受体的激动剂, 如 fMLP、IL-8 等都可以通过 PI3K/PKB 信号转导通路调节中性粒细胞的活化^[6,7]。

本实验采用重症急性胰腺炎时的血清胰蛋白酶浓度刺激体外分离出的中性粒细胞, 结果发现: 正常中性粒细胞中 PKB 总蛋白表达丰富, 而 PKB 的磷酸化水平较低; 细胞在受到胰蛋白酶刺激后磷酸化 PKB 迅速升高, 显著高于正常对照组, 同时 TNF-α 和 IL-1β 产量也明显增加。这表明中性粒细胞可以被胰蛋白酶直接激活并产生炎症介质, 同时也证明了 SAP 时胰蛋白酶不但是作为消化酶而存在, 也可以是直接激活中性粒细胞的促炎介质。

同时本实验的结果进一步发现, 应用 PI3K 的两种特异性抑制剂 Wortmannin 和 LY294002 后, 中性粒细胞在胰蛋白酶刺激后的 PKB 磷酸化被明显减弱, 炎症介质 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 和蛋白产量明显减少。这表明中性粒细胞表面的 PAR-2 被胰

(下转第 37 页)