

基础研究

缺血后处理对肝缺血再灌注损伤后磷脂酰肌醇-3 激酶和细胞外信号调节激酶的影响和意义

朱宇麟¹, 李静², 吕毅³, 景桂霞¹西安交通大学医学院第一附属医院¹麻醉科,³肝胆外科, 陕西 西安 710061;²西安市红十字会医院麻醉科, 陕西 西安 710054

摘要:目的 观察缺血后处理对肝缺血再灌注后磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)和细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)表达的影响,探讨肝缺血后处理的作用机制。方法 采用大鼠70%肝缺血再灌注损伤模型,进行3次循环的再灌注1 min-阻断1 min的缺血后处理,观察假手术(S)组、LY294002+假手术(LY+S)组、PD98059+假手术(PD+S)组、缺血再灌注(IR)组、缺血后处理(IPO)组、LY294002+缺血后处理(LY+IPO)组和PD98059+IPO(PD+IPO)组的肝功能、细胞凋亡、Akt和ERK1/2磷酸化程度的变化。结果 缺血后处理能明显减轻缺血再灌注造成的肝功能损害,增加Akt和ERK1/2的磷酸化程度,应用LY294002或PD98059后都可以取消IPO的作用。结论 缺血后处理可能通过激活PI3K和ERK1/2减轻肝缺血再灌注损伤。

关键词:缺血再灌注损伤;缺血后处理;肝脏;磷脂酰肌醇-3 激酶;细胞外信号调节激酶1/2

中图分类号:R617 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)05-0677-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.05.020

http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120427.0914.006.html

Effect of ischemic postconditioning on phosphatidylinositol-3-OH kinase and extracellular signal-regulated protein kinase in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury

ZHU Yulin¹, LI Jing², LÜ Yi³, JING Guixia¹¹Department of Anesthesiology, ³Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, China; ²Department of Anesthesiology, Xi'an Red Cross Hospital, Xi'an 710054, China

Abstract: Objective To observe the effect of ischemic postconditioning on phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K) and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2(ERK1/2) in rats after hepatic ischemia reperfusion in rats and investigate the mechanism of ischemic postconditioning of the liver. **Methods** Three cycles of 1 min-off-1 min-on ischemic postconditioning regime were used in a rat model of 70% hepatic ischemia-reperfusion injury. The changes in the liver function, hepatocyte apoptosis, phosphorylation of Akt and ERK1/2 were assessed in rats treated with sham operation, LY294002+sham operation (LY+S), PD98059+sham operation (PD+S), ischemia reperfusion (IR), ischemic postconditioning (IPO), LY294002+ ischemic postconditioning (LY+IPO), or PD98059+ischemic postconditioning (PD+IPO). **Results** Ischemic postconditioning significantly alleviated hepatic ischemia-reperfusion-induced liver function injury and hepatocyte apoptosis and increased phosphorylation of Akt and ERK1/2. LY294002 and PD98059 antagonized the effects of ischemic postconditioning in the liver. **Conclusion** Activation of PI3K and ERK1/2 may mediate the protective effect of ischemic postconditioning against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats.

Key words: ischemia reperfusion injury; ischemic postconditioning; liver; phosphatidylinositol-3-OH kinase; extracellular signal-regulated protein kinase 1/2

磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)和细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)是细胞内两个重要的信号激酶,参与了细胞生长、代谢、炎症反应和凋亡等多种生物学事件。近年来发现它们也是缺血再灌注损伤保护措施的重要信号传导途径。缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO),即在长时间缺血恢复再灌注前,短时间内给予反复短暂再灌注/缺血处理,可以明显减轻缺血组织的缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)。IPO首先发现于心肌中^[1],随后在肝脏中也被证实同样有效^[2]。

已有研究证实PI3K和ERK1/2活化是心肌IPO作用的重要条件^[3],它们在肝脏IPO中是否也有相似作用尚未见有报道。本研究拟通过观察IPO对大鼠肝缺血再灌注损伤后PI3K、ERK1/2活性的影响,探讨肝脏IPO的细胞内信号转导机制。

1 资料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

本实验选用无特异性病原菌级别(SPF)成年、健康、雄性Sprague-Dawley大鼠,体质量220~260 g,购于西安交通大学医学院实验动物中心。普通喂养,自由进食,给予12 h亮暗间隔。LY294002(PI3K抑制剂)、PD

收稿日期:2012-01-25

基金项目:陕西省科技攻关项目(2008K14-02)

作者简介:朱宇麟,硕士,副教授, E-mail: zhuyulin2@163.com

98059(MAPKK抑制剂)(江苏碧云天生物技术研究所);兔抗 p-Akt 和 Akt 多克隆抗体和兔抗 p-ERK1/2 和 ERK1/2 单克隆抗体(美国 Cell Signalling);山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);TUNEL 凋亡试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所)。

1.2 实验分组

56 只大鼠随机分为 7 组,每组 8 只,分别为假手术(S)组、LY294002+假手术(LY+S)组、PD98059+假手术(PD+S)组、缺血再灌注(IR)组、缺血后处理(IPO)组、LY294002+缺血后处理(LY+IPO)组和 PD98059+IPO(PD+IPO)组

1.3 模型制备

SD 大鼠术前 12 h 禁食,自由饮水。术前 30 min 肌注阿托品 0.05 mg/kg,采用氯胺酮(120 mg/kg)腹腔内注射麻醉,左颈静脉插管用于补液或取血。IR 组参照 Nauta 等^[4]的方法略做改进制备大鼠肝缺血再灌注模型。大鼠麻醉后,经阴茎背静脉注入肝素钠 200 U/kg 进行肝素化,正中剖腹。分离肝十二指肠韧带,充分暴露第一肝门部,游离出支配肝中叶、左叶的肝蒂,包括门静脉,肝动脉及胆管。用无创小血管夹阻断中叶及左肝叶血流,造成 70% 肝脏缺血,但不阻断右肝叶血流。热缺血时间控制在 60 min,再灌注时间 6 h。S 组按上述方法仅行肝门游离后不阻断血管,然后关腹;LY+S 和 PD+S 组分别在完成手术后关腹前经静脉给予 LY294002 0.3 mg/kg 和 PD98059 5 mg/kg;IPO 组在 IR 组的基础上,于完全再灌注开始前,进行 3 次循环的再灌注 1 min-阻断 1 min 的处理(共 6 min),然后进行 254 min 再灌注。LY+IPO 和 PD+IPO 组在再灌注开始时经颈静脉分别给予 LY294002 0.3 mg/kg 和 PD98059 5 mg/kg,然后进行 IPO 和再灌注。各组手术结束缝合伤口,术后白炽灯照保暖至大鼠活动自如,术后 2 h 起恢复饮水,环境温度保持在 22 ℃ 左右。

1.4 标本收集

各组分别在缺血前和再灌注 6 h 两个时点,经左颈静脉插管取血 1 ml。再灌注 6 h 断颈处死动物,取相同部位肝左叶新鲜组织。

1.5 检测指标

1.5.1 血清丙氨酸转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST) 缺血后常温下 4000 r/min,离心 10 min,取血清,用全自动生化分析仪测定。

1.5.2 细胞凋亡指数(AI) 取新鲜肝左叶组织,按 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明进行染色,光镜下凋亡细胞胞核显棕黄色颗粒或碎片,每例标本的切片随机选取 5 个 400 倍视野,计算出平均每 100 个细胞中的凋亡细胞数,并以百分数表示作为凋亡指数(AI)。

1.5.3 蛋白激酶 B(Akt)和 ERK1/2 蛋白和磷酸化程度表达检测 采用 Western blot 法,所取肝组织按 3 μl/mg

加入组织裂解液,冰浴中制组织匀浆,14 000 g 离心 1 h,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。取已定量的上清液进行上样,上样量为 100 μg/孔。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电压 80 V。过浓缩胶,电压改为 120 V,至溴酚蓝到达分离胶底部时停止电泳。取出凝胶,将与 PVDF 膜置于 4 层滤纸(上下各 2 层)中间进行转膜,丽春红染色 8 min, TBST 反复清洗至无色。将 PVDF 膜放入平皿中,加入封闭液封闭。一抗分别采用抗 Akt 多克隆抗体(1:1000)、P-Akt、ERK 多克隆抗体(1:1000)、P-ERK 多克隆抗体(1:1000),二抗采用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG。分别以 1:500 封闭液稀释,加入显色底物进行 X 线曝光,底片经图像信号采集与分析系统进行结果分析。分别以 p-Akt/Akt 和 p-ERK1/2/ERK 光密度(D_i值)的百分比表示二者的磷酸化程度。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 14.0 统计学软件进行分析,计量资料以采用均数±标准差表示,组内比较采用重复测量设计的方差分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时点血清 ALT 和 AST 的变化

S、LY+S 和 PD+S 组再灌注 6 h 和缺血前血清 ALT 和 AST 无显著性差异($P > 0.05$),组间相比亦无显著性差异($P > 0.05$);IR、IPO、LY+IPO 和 PD+IPO 组再灌注后血清 ALT 和 AST 较缺血前都明显升高($P < 0.05$),也高于同时点的 S 组($P < 0.05$);但与 IR 组再灌注 6 h 相比,IPO 组的 ALT 和 AST 水平都明显下降($P < 0.05$),LY+IPO 和 PD+IPO 组则无显著性差异($P > 0.05$),而 LY+IPO 和 PD+IPO 组都明显高于 IPO 组($P < 0.05$,表 1)。

2.2 各组细胞凋亡指数的变化

S、LY+S 和 PD+S 组均无明显细胞凋亡(分别为 4.69±0.63;5.82±1.37;5.27±2.12),组间相比无显著性差异($P > 0.05$);IR、IPO、LY+IPO 和 PD+IPO 组的凋亡指数(分别为 37.23±7.62;14.58±3.59;29.58±9.14 和 27.47±8.79)较 S 组比都明显升高($P < 0.05$);与 IR 组相比,IPO 组的凋亡指数显著降低($P < 0.05$),而 LY+IPO 和 PD+IPO 组无显著性差异($P > 0.05$);LY+IPO 和 PD+IPO 组和 IPO 组相比,凋亡指数也显著升高($P < 0.05$),而二者之间相比无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 各组 Akt 和 ERK1/2 磷酸化程度的变化

LY+S 组 Akt 磷酸化程度与 S 组相比无明显差异($P > 0.05$);再灌注后各组 Akt 磷酸化程度都有所增高,但 IPO 组的 Akt 磷酸化程度明显高于 IR 组(89.56±9.43 vs 30.37±3.12)($P < 0.05$),而应用 LY294002 后,Akt 磷酸化程度明显受到抑制(19.5±2.5),与 IPO 相比有显著性

表1 各组ALT和AST的变化

Tab.1 Changes of ALT and AST in each group (U/L, Mean±SD, n=8)

组别		缺血前	再灌注 6 h
假手术组	ALT	61.25±12.35	70.25±14.63
	AST	129.38±31.23	138.03±28.51
LY294002+假手术组	ALT	70.21±17.23	74.61±11.64
	AST	136.48±39.75	147.48±34.82
PD98059+假手术组	ALT	63.92±13.47	69.30±9.22
	AST	146.46±50.69	160.35±65.51
缺血再灌注组	ALT	68.37±9.49	1035.75±453.37 ^{ab}
	AST	141.32±45.46	1275.38±305.05 ^{ab}
缺血后处理组	ALT	62.84±15.79	414.27±189.37 ^{abc}
	AST	137.37±47.69	526.62±350.37 ^{abc}
LY294002+缺血后处理组	ALT	62.84±15.79	1138.36±396.53 ^{abd}
	AST	143.58±54.24	1456.62±546.25 ^{abd}
PD98059+缺血后处理组	ALT	58.48±8.25	1187.56±452.23 ^{abd}
	AST	147.25±55.63	1446.25±435.46 ^{abd}

ALT: 血清丙氨酸转氨酶, AST: 谷草转氨酶; 与缺血前相比, ^aP<0.05; 与假手术组相比, ^bP<0.05; 与缺血再灌注组相比, ^cP<0.05; 与缺血后处理组相比, ^dP<0.05

差异(P<0.05,图1)。

PD+S组ERK1/2磷酸化程度与S组相比无明显差异(P>0.05);再灌注后IR和IPO组ERK1/2磷酸化程度都高于S组,IPO组的ERK磷酸化程度明显高于IR组(79.3±6.2 vs 37.3±3.6),应用PD98059后,PD+IPO组的ERK的磷酸程度明显降低(24.5±1.4),与S组相比无显著性差异(17.2±1.5)(P>0.05,图2)。

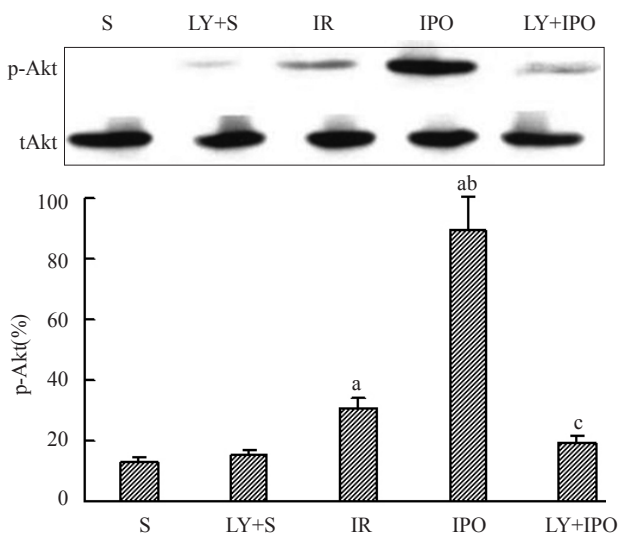


图1 各组Akt磷酸化程度比较

S: 假手术组; IR: 缺血再灌注; IPO: 缺血后处理, 与S组相比, ^aP<0.05; 与IR组相比, ^bP<0.05; 与IPO组相比, ^cP<0.01

Fig.1 Comparison of the phosphorylation level of Akt between the groups.

3 讨论

本研究显示肝缺血再灌注损伤(HIRI)后出现转氨酶升高和肝细胞凋亡增多,与以往的研究结果一致^[5],提示肝缺血再灌注模型制备成功。

本研究结果显示3次循环的再灌注1 min-阻断

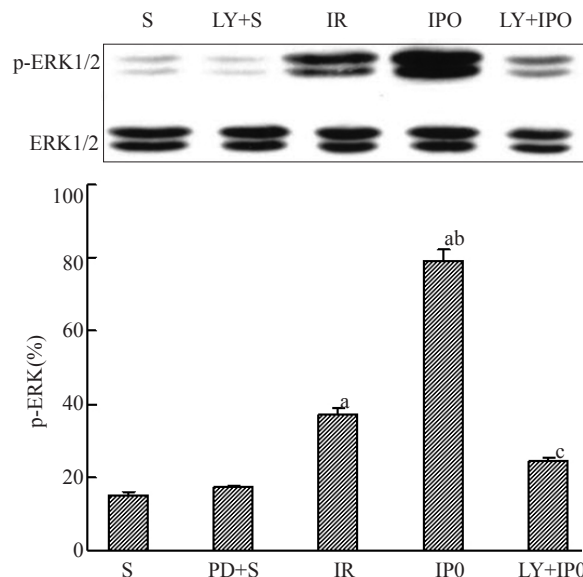


图2 各组ERK1/2磷酸化程度比较

与S组相比, ^aP<0.05; 与IR组相比, ^bP<0.05; 与IPO组相比, ^cP<0.05

Fig.2 Comparison of phosphorylation level of ERK1/2 between the groups.

1 min的IPO处理能减轻60 min 70%肝缺血再灌注引起的转氨酶升高和肝细胞凋亡作用,提示IPO对HIRI有保护作用,这与以往的研究结果一致^[2]。

细胞凋亡在HIRI后肝细胞死亡的主要方式之一^[6],但IPO通过何种途径抑制HIRI后肝细胞凋亡的机制还不清楚。在心肌的研究中提示,IPO在再灌注早期激活再灌注损伤挽救激酶途径,最后在线粒体水平或p70S6K发挥心肌保护作用^[7]。在心脏、神经组织和肾脏的研究中也提示,PI3K和ERK1/2在IPO中都起着重要的调节作用^[8]。本研究显示再灌注后即出现Akt和ERK1/2的磷酸化现象,而IPO使Akt和ERK1/2的磷酸化程度更高。分别在再灌注开始应用PI3K抑制剂

LY294002 和 ERK1/2 抑制剂 PD98059,不但使 IPO 引起的 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化现象受到抑制, IPO 对 IRI 的保护作用也消失,说明 PI3K 和 ERK1/2 的两个激酶的活化是肝脏对 HIRI 的自我保护机制,而保护程度的大小与磷酸化水平有关。研究也证实单纯 IR 时造成的 Akt 和 ERK1/2 活化并不足以提供心肌保护作用,必须使用药物或其它刺激使其加强^[9-10]。Izuishhi 等^[11]发现肝脏缺血预处理使 Akt1 磷酸化的水平更高、时程延长,而 Wortmannin 和 LY294002 则在阻断 P13K-Akt 信号系统的活化的同时,也完全抑制了缺血预处理的肝脏保护作用,由于 IPO 与缺血预处理具有很高的相似性,有理由推测 PI3K-Akt 可能也在肝脏 IPO 中发挥作用。

由于 LY294002 和 PD98059 本身具有一定细胞毒性作用,本研究设置的药物对照组 (LY294002 + S; PD98059 + S) 并没有出现明显的肝细胞损伤情况,提示本研究应用的剂量下所发生的肝功能等变化不是由 LY294002 和 PD98059 造成的。

本研究发现阻断 PI3K 和 ERK1/2 两个酶通路中的任何一条均能取消 IPO 的保护作用,提示肝 IPO 的作用需要两条酶通路的共同参与。但在心肌的研究中发现不同的研究对 PI3K 和 ERK1/2 在 IPO 中的作用不尽相同, Darling 等^[12]认为是 ERK1/2, 而不是 PI3K 参与 IPO 的信号转导途径,也有研究认为 RISK 途径的活化与致死性心肌 IRI 保护并无因果关系^[13]。至于 PI3K 和 ERK1/2 两条通路之间的关系,目前的研究结果也不尽相同。Yao 等^[14]发现七氟醚后处理后 PI3K 和 ERK1/2 两条通路相互独立,阻断其中一条并不影响另一条的活化,而另一项研究却发现缺血预处理中 PI3K 和 ERK1/2 之间存在相互“串话”现象,即抑制 PI3K 可以引起 ERK1/2 活化,反过来亦然^[15]。这种互相矛盾的结果尚难解释,可能与后处理的方法及所选动物种属不同有关。肝脏中是否也存在这种现象,需要更多的研究去证实。至于 PI3K 和 ERK1/2 激活后如何产生保护作用,目前还不十分清楚。有研究提示线粒体膜通透性转换孔 (MPTP) 可能是多种信号转导途径的终末效应器^[16]。我们也发现 IPO 通过抑制 MPTP 开放起到减轻 HIRI 的作用^[17]。PI3K 和 ERK1/2 在肝脏中是否也通过 MPTP 产生作用需进一步研究证实。

综上所述, IPO 对 70% 大鼠肝缺血再灌注损伤具有保护作用,这种作用可能通过激活 PI3K 和 ERK1/2 产生。

参考文献:

[1] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: com-

parison with ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): H579-88.

- [3] Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(13): 1934-8.
- [3] Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement pro-survival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(5): 893-907.
- [4] Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury[J]. *Ann Surg*, 1991, 213(2): 137-42.
- [5] Serracino-Inglott F, Habib N, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Surg*, 2001, 181(2): 160-6.
- [6] Chattopadhyay P, Wahi AK. Hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver transplantation model[J]. *Trends Biomater Artif Organs*, 2009, 23(1): 1-5.
- [7] Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection[J]. *Heart Fail Rev*, 2007, 12(3-4): 217-34.
- [8] Chen H, Xing B, Liu X, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat[J]. *Transpl Int*, 2008, 21(4): 364-71.
- [9] Yamashita K, Kajstura J, Discher DJ, et al. Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1[J]. *Circ Res*, 2001, 88(6): 609-14.
- [10] Omura T, Yoshiyama M, Shimada T, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases in *in vivo* ischemia/reperfused myocardium in rats[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(6): 1269-79.
- [11] Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, et al. Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway [J]. *Hepatology*, 2006, 44(3): 573-80.
- [12] Darling CE, Jiang R, Maynard M, et al. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(4): H1618-26.
- [13] Skyschally A, van Caster P, Boengler K, et al. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation[J]. *Circ Res*, 2009, 104(1): 15-8.
- [14] Yao YT, Fang NX, Shi CX, et al. Sevoflurane postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(10): 1320-8.
- [15] Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, et al. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(2): H971-6.
- [16] Cohen MV, Downey JM. Ischemic postconditioning: from receptor to end-effector[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(5): 821-31.
- [17] 朱宇麟, 李静, 吕毅, 等. 缺血后处理对大鼠肝缺血再灌注时肝细胞线粒体膜通透性转换和膜电位的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2011, 31(3): 364-7.

(编辑:吴锦雅)