[文章编号] 1007-3949(2008) 16-08-0597-03

·实验研究·

丝氨酸—苏氨酸蛋白激酶 2 蛋白表达在低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用

易 斌, 钱桂生, 白 莉, 王关嵩

(第三军医大学新桥医院全军呼吸研究所, 重庆市 400038)

[关键词] 病理学与病理生理学; 肺动脉平滑肌细胞; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; 低氧肺动脉高压

[摘 要] **目的** 通过观察低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 蛋白表达水平变化与低氧致肺动脉平滑肌细胞增殖的关系,探讨丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 在低氧肺血管重建中的调控作用。**方法** 组织块法培养肺动脉平滑肌细胞,采用蛋白印迹技术检测蛋白表达水平,采用甲基噻唑基四唑法、氚—胸腺嘧啶核苷掺入法检测肺动脉平滑肌细胞增殖。**结果** 低氧刺激肺动脉平滑肌细胞不断增殖,常氧下氚—胸腺嘧啶核苷掺入检测值为 0.372±0.059,随着低氧处理时间的延长氚—胸腺嘧啶核苷掺入检测值不断升高,其中低氧 12 h 达到 0.703±0.100,与常氧组比较差异显著;常氧下甲基噻唑基四唑检测值为 8374.39±545.31,随着低氧处理时间的延长,甲基噻唑基四唑检测值不断升高,低氧 24 h 达到 11208.35±678.82,与常氧组比较差异显著。各组均检测出丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 蛋白的表达,图像定量分析显示各组蛋白表达与细胞增殖改变密切相关。**结论** 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 信号通路可能在低氧肺动脉高压中调节肺动脉平滑肌细胞增殖。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Changes of Akt 2 Protein Expression in Cell Proliferation of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells induced by Hypoxia in Rats

YI Bin, QIAN Gui-Sheng, BAI Li, and WANG Guan-Song

(*Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing* 400038, *China*)

[KEY WORDS] Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell; Serine/Threonine Kinase 2; Hypoxia Pulmonary Hypertension

[ABSTRACT] **Aim** To observe the changes of serine/threonine kinase 2(Akt 2) protein expression in pulmonary arteriy smooth muscle cells (PASMC) induced by hypoxia in rats, and to investigate the value of Akt 2 signaling pathway in hypoxia pulmonary hypertension (HPH). **Methods** The pure PASMC was cultured by tissue-sticking methods. Akt 2 protein expressions were determined by Western blotting after PASMC were exposed to hypoxia for 2 h, 8 h, 12 h and 24 h respectively. The changes of PASMC proliferation were determined by MTT and ^{3}H-TdR incorporated way. **Results** The value of ^{3}H-TdR was 0.372±0.059 under normoxia. And accompanying the prolongation of hypoxia time, the value of ^{3}H-TdR kept heightening. It was 0.703±0.100 in 12 h and significantly different from normoxia group; The value of MTT was 8374.39±545.31 under normoxia. And accompanying the prolongation of hypoxia time, the value of MTT kept heightening. It was 11208.35±678.82 in 24 h group and significantly different from normoxia group. The protein of Akt 2 could be detected in all groups, and the expressive level of protein showed a possible relationship with PASMC prolferation. **Conclusion** The results suggest that Akt 2 signaling pathway may play an important role in the hypoxia pulmonary hypertension.

丝氨酸—苏氨酸蛋白激酶 2(serine-threonine kinase 2, Akt 2) 是近年来发现的一种原癌基因。既往研究主要集中在多种恶性肿瘤的发生、发展、侵袭与 Akt 2 的扩增、过表达和激酶活性相关性中。低氧肺动脉高压(hypoxia pulmonary hypertension, HPH) 中血管重建的细胞内信号传导通路的研究已经成为研究热点,主要集中在 STAT 途径、MLCK 途径和 PKC 途径。PI3K-Akt 途径与细胞分化、生长、凋亡和迁移等多种生物学活动密切相关[1,2], Akt 2 在其中的作用尚未有此方面的研究报道。本研究观察 Akt 2 蛋白水平在低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC) 增殖过程中的改变,旨在为低氧肺动脉高压发生的分子机制的阐明和防治提供进一步的理论基础。

[收稿日期] 2008-01-21 [修回日期] 2008-07-21

[基金项目] 国家自然科学基金(30400200, 30700347) 资助; 重庆市自然科学基金(2007) 资助

[作者简介] 易斌,博士,主治医师,主要从事缺氧肺动脉重建的信号转导机制研究,E-mail 为 yibin1974@163.com。钱桂生,教授,博士研究生导师,主要从事肺动脉高压的分子机制研究。通讯作者白莉,博士,副教授,主要从事低氧肺动脉重建的信号转导机制研究,E-mail 为 ybll@126.com。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

低糖 DMEM 培养基(PAA, 美国), D-Hanks 液

(Hyclone, 美国), 小鼠抗大鼠 α-SM-actin 单克隆抗体(BM002, 武汉博士德), 兔多克隆抗大鼠 Akt 2 总蛋白和磷酸化蛋白(NeoMarkers, 美国), SP 免疫组织化学试剂盒(SA1021, 武汉博士德), AMV 逆转录酶(Promega, 美国), Taq DNA 聚合酶、Oligo(dT)15、dNTP(北京鼎国生物技术发展公司), 其余试剂均为国产分析纯。自动常压缺氧孵箱(贺氏, 德国), Alpha Imager 凝胶成像分析系统(Alpha Innotech, 美国), PTC-200DNA 扩增仪(MT research, 美国)。

1.2 肺动脉平滑肌细胞的培养及分组

购自本校实验动物中心的 SD 大鼠, 体重 180~220 g, 无菌环境下迅速取出心肺组织, 在超净工作台直视下分离解剖肺主动脉主干。PASMC 的原代培养、传代、纯化、鉴定见参考文献[1]。第 4~9 代 PASMC 细胞用于实验。相同密度($10^6/cm^2$)接种后分为如下各组: 常氧(21% O_2)和低氧(3% O_2)处理 2 h、8 h、12 h、24 h。待细胞长至瓶底 80% 左右换含 0.1% 胎牛血清的 DMEM 培养基同步生长 24 h, 随后进行低氧处理。

1.3 Western blotting 检测

取生长在 50 mL 培养瓶中各时点细胞, 弃去培养液, 用 0.01 mmol/L PBS 液清洗, 冰预冷 350 μL RIPA 液(含 1% PMSF)裂解细胞, 15~30 min 后用细胞刮收获细胞, 转移至 EP 管中, 4℃、12 kg/min 离心 10 min, 取上清, 用紫外分光光度计进行蛋白定量, -70℃保存。取 30 μg 总蛋白进行 12% 分离胶和 5% 浓缩胶 SDS-PAGE 电泳; 随后将蛋白质电转印(恒流 40 mA, 电压上限 16 V, 转膜时间 70 min)至 PVDF 膜, 封闭 1 h; 然后加入封闭液 1∶500 稀释的兔多克隆抗大鼠磷酸化蛋白, 4℃过夜。取出 PVDF 膜, 用含 0.05% Tween-20 TBS 洗膜 5 min×3 次。重新置入 PVDF 膜, 加入封闭液 1∶1000 稀释的结合有 HRP 的二抗(羊抗兔)。取出 PVDF 膜, 用含 0.05% Tween-20 TBS 洗膜 5 min×3 次, 再用 TBS 洗膜 5 min。将膜置 DAB 显色液中显色, 至有清晰条带显出时放入清水中终止反应, 凝胶成像系统扫描存盘, Alpha Imager 图像分析仪测定杂交带的光密度值, 并进行条带的蛋白含量分析。

1.4 氚-胸腺嘧啶核苷掺入检测

各组细胞消化后, 制成 PASMC 细胞悬液, 进行细胞数计数, 调整细胞浓度为 2×10^7/L。分别取各组细胞接种于 96 孔培养板。每个时相点设 3 个重复孔。培养 2 天后进行低氧处理。分别在各时相点终止培养前 6 h 加入 1 μCi ^{3}H-TdR(1 μCi/孔), 在相应时相点终止培养, 弃去培养液, 冷 PBS 液终止掺入, 加入 0.25% 胰酶消化细胞, 使之脱离孔壁, 用多头细胞样品收集器收集细胞于玻璃纤维膜上, 生理盐水冲洗 3 次, 然后用 10% 三氯乙酸固定, 无水乙醇脱色, 80℃干烤 30 min, 放入闪烁液中, 于液体闪烁计数仪计数(以 cpm 表示)。

1.5 甲基噻唑基四唑比色实验

以每孔 10^3~10^4 个细胞将 PASMC 接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200 μL, 各组每个实验条件设 5 孔, 置 37℃、5% CO_2 培养 24 h 后进行低氧处理。到达时相点的细胞, 更换无血清培养基, 加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μL, 37℃常氧继续孵育 4 h。小心吸弃培养孔内上清液。每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物完全溶解。选择 490 nm 波长, 参照波长 280 nm, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(OD 值)。空白对照孔调零。以时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.6 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 低氧对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 总蛋白及其磷酸化蛋白表达的影响

低氧诱导下, Akt 2 总蛋白的表达逐渐升高, 8 h 到达高峰, 随后逐渐下降, 24 h 恢复到常氧组水平; Akt 磷酸化蛋白的表达亦逐渐升高, 8 h 到达高峰, 随后逐渐下降(表 1 和图 1)。

表 1. 低氧对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 总蛋白和磷酸化蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

分组	Akt 2 总蛋白	磷酸化 Akt 蛋白
常氧组	13.49±4.34	47.46±7.74
低氧 2 h	17.03±2.46^a	55.21±13.29^a
低氧 8 h	26.67±6.82^a	78.73±14.22^a
低氧 12 h	20.00±4.57^{ac}	56.38±19.23^{ac}
低氧 24 h	12.32±5.19^{abc}	41.46±12.32^{abc}

a 为 $P<0.05$, 与常氧组比较; b 为 $P<0.05$, 与低氧 2 h 组比较; c 为 $P<0.05$, 与低氧 8 h 组比较。

2.2 低氧对肺动脉平滑肌细胞增殖的影响

随着低氧时间的延长, ^{3}H-TdR 掺入量逐渐增加($P<0.05$), 低氧 24 h ^{3}H-TdR 掺入量最高。经过低氧处理后, 吸光度值明显升高, 且随低氧时间的延长, 吸光度值升高越明显($P<0.05$; 表 2)。

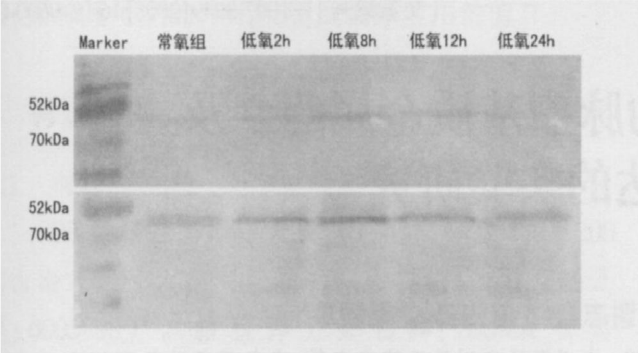

图 1. 低氧对不同时相点丝氨酸—苏氨酸蛋白激酶总蛋白及其磷酸化蛋白表达的影响

表 2. 低氧对肺动脉平滑肌细胞增殖的影响($n=4$)

分 组	MTT 值	^{3}H-TdR 掺入量
常氧组	0.372 ±0.059	8374.4 ±545.3
低氧 2 h	0.477 ±0.034^a	9066.7 ±528.2^a
低氧 8 h	0.650 ±0.071^{ab}	10749.3 ±873.6^{ab}
低氧 12 h	0.703 ±0.100^{ab}	11200.4 ±795.6^{ab}
低氧 24 h	0.680 ±0.080^{abc}	11208.4 ±678.8^{abc}

a 为 $P<0.05$, 与常氧组比较; b 为 $P<0.05$, 与低氧 2 h 组比较; c 为 $P<0.05$, 与低氧 8 h 组比较。

3 讨 论

PASMC 由收缩型向合成型转换, 并从中膜迁移至内膜异常增殖是低氧肺血管重建的关键环节[2-6]。Akt2 参与 PI3K 激活的细胞内信号通路与细胞分化、生长、凋亡和迁移等多种生物学活动密切相关[1,2]。激活后的 Akt2 对含有丝氨酸—苏氨酸残基的底物磷酸化而发挥广泛的生物学效应, 如 P21Cip、cyclin Dl、Bad、Caspase-9、forkhead、IkB、GSK3、eNOS、HIF-1 和 P70S6K 等, 这些下游靶点在 PASMC 的分化和生长调控中起关键作用。

本研究发现, 经过含 0.1% 胎牛血清静止 24 h 的 PASMC 常氧培养下几乎不增殖, 低氧处理 2 h 后 ^{3}H-TdR 掺入法即可检测到 DNA 合成量增加, MTT 法检测到细胞数目开始增多, 随着低氧时间的进一步延长, PASMC 增殖愈加显著, 提示低氧可以刺激生长静止的 PASMC 异常增殖。前期研究发现, 随着低氧时间的延长, PASMC 中 Akt 2 mRNA 表达逐渐增强, 在 8 h 到达高峰, 后又逐渐下降, 说明低氧刺激 PASMC 异常增殖的同时, Akt 2 基因表达增高, 提示 Akt 2 可能与低氧 PASMC 异常增殖密切相关[7]。Western blotting 检测发现低氧过程中 PASMC 总 Akt 2 蛋白和磷酸化 Akt 蛋白亦出现与其 mRNA 类似的变化, 进一步提示 Akt 2 可能参与了低氧 PASMC 异常分化和生长的调节。

Akt 与已发现的蛋白激酶 (protein kinase A, PKA) 和蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) 高度同源, 被分别命名为 PKBα/Akt1、PKBβ/Akt 2 和 PKBγ/Akt 3, 其家族成员都含有一个 N-端 PH 域、一个激酶催化域和一个 C-端调节域。其中 Akt 2 定位于 19q13.1-13.2, 是 Akt 家族中重要的亚型, 在多种组织中存在并参与调节细胞的增殖、迁移和凋亡。Akt 2 的主要作用是作为 PI3K 的下游底物, 能被 PI3K1A 和 PI3K1B 活化, 而后者又分别为 Tyr 激酶和 G 蛋白偶联受体所活化。当 PI3K 聚集到细胞膜上的受体旁时, 它们被活化, 并在 3-OH 位磷酸化 PIP2 生成第二信使 PIP3, 使 PKB 聚集到细胞膜, 并发生构象变化, 从而得以被 PDK1 磷酸化; PDK1 在活化环内使 Akt 2 磷酸化。提示 Akt 2 信号通路可能在低氧肺血管重建中调控 PASMC 增殖, 增强或抑制 Akt 2 可能对低氧肺动脉高压有防治作用。

本研究仅检测了低氧刺激 PASMC 增殖时 Akt 2 蛋白表达水平的变化情况, 只初步证实 Akt 2 参与介导低氧诱导 PASMC 异常分化和生长过程, 因此抑制 Akt 2 表达和活化之后对低氧刺激 PASMC 增殖是否存在影响值得进一步研究。另外低氧肺动脉高压的信号传导通路可能是非常复杂的网络, 因此 Akt 2 基因在其中的作用以及和其他信号通路的关系还需要进一步研究。

综上所述, Akt 2 可能均参与了低氧诱导肺血管重建中 PASMC 异常分化、生长的调节。

[参考文献]

[1] 易 斌, 钱桂生, 白 莉, 等. 不同方法培养大鼠肺动脉平滑肌细胞的差异[J]. 第三军医大学学报, 2005, **27** (24): 2 425-427.

[2] Tuder RM, Chacon M. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform, lesion in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis [J]. *J Pathol*, 2001, **195** (3): 367-374.

[3] Suzuki YJ, Day RM, Tan CC, et al. Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (19): 17 525-531.

[4] Wang CC, GureVith I, Draznin B. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways [J]. *Diabetes*, 2003, **52** (10): 2 562-569.

[5] 王智敏, 孙宁玲. GATA-6 基因在一氧化氮-环磷酸鸟苷依赖性蛋白激酶信号通路抑制血管平滑肌细胞表型转化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, **15** (9): 687-690.

[6] Jiang K, Zhong B, Ritchey C, et al. Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac [J]. *Blood*, 2003, **101** (1): 236-244.

[7] 易 斌, 钱桂生, 白 莉, 等. 缺氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞 Akt mRNA 表达的变化[J]. 第三军医大学学报, 2006, **28** (3): 192-194.

(此文编辑 文玉珊)