

文章编号:1005-6947(2007)10-0968-04

· 基础研究 ·

PI3K/PKB 信号转导通路在重症急性胰腺炎 胰腺损伤中的作用

张成, 栾正刚, 郭仁宣, 葛春林

(中国医科大学附属第一医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/PKB)信号转导通路对重症急性胰腺炎胰腺损伤的作用。方法 健康成年雄性SD大鼠30只,随机分为对照组、SAP组(S组)和SAP+wortmannin(S+W)组,每组10只。胆胰管内逆行注射法制作SAP模型。制模6h后取胰腺组织,检测各组含水量、MPO水平及病理改变;采用酶联免疫吸附法(ELISA)及RT-PCR技术检测胰腺组织TNF- α 和IL-1 β 的蛋白及mRNA的变化、蛋白印迹(Western Blot)法检测p-PKB的活性变化。结果 制模6h后S组和S+W组较对照组胰腺组织含水量增加($P < 0.01$),MPO水平明显升高($P < 0.01$);病理学发现胰腺明显出血、坏死和炎性细胞浸润;胰腺组织TNF- α 和IL-1 β 的蛋白及mRNA水平明显增加($P < 0.01$),p-PKB水平明显升高($P < 0.01$)。S+W组较S组胰腺组织水肿及病理改变减轻($P < 0.01$),MPO水平降低($P < 0.01$),同时TNF- α 和IL-1 β 的蛋白含量及mRNA表达减少($P < 0.01$),p-PKB水平降低($P < 0.01$)。结论 PI3K/PKB信号转导通路被激活是重症急性胰腺炎胰腺损伤的重要发病机制之一。

[中国普通外科杂志,2007,16(10):968-971]

关键词: 胰腺炎,急性坏死性;磷脂酰肌醇3激酶;蛋白激酶B;信号转导

中图分类号:R 657.51

文献标识码:A

Role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) signal transduction pathway in the injury of pancreas during severe acute pancreatitis

ZHANG Cheng, LUAN Zheng-gang, GUO Ren-xuan, GE Chun-lin

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To investigate the role of PI3K/PKB signal transduction pathway in the injury of pancreas during severe acute pancreatitis. **Methods** Thirty adult healthy SD rats were randomized into three groups: control group, SAP group (group S) and SAP + wortmannin group (group S + W). SAP models were established by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into pancreatic duct. Rats from each group were killed at 6 h after SAP models had been established. Pancreas water content, MPO and pancreatic histology were measured, meanwhile, protein and mRNA levels of TNF- α and IL-1 β in pancreas were examined by ELISA and RT-PCR respectively. Levels of phosphorylated PKB (p-PKB) and total PKB were examined by western blotting. **Results** Pancreatitis (group S and group S + W) resulted in elevated pancreas water content, increased MPO, and worsened histologic condition ($P < 0.01$). Protein and mRNA levels of TNF- α and IL-1 β from SAP rats were much higher than those in shams ($P < 0.01$). p-PKB activity presented similar tendency ($P < 0.01$). In S + W group pancreas water content markedly decreased, MPO reduced, and degree of pancreatic injury reduced ($P < 0.01$). At the same time, wortmannin inhibited the activation of p-PKB and decreased protein and mRNA levels of TNF- α and IL-1 β ($P < 0.01$).

收稿日期:2007-07-01; 修订日期:2007-10-09。

作者简介:张成,男,辽宁辽阳人,中国医科大学附属第一医院博士研究生,主要从事胰腺炎发病机制方面的研究。

通讯作者:葛春林 E-mail:cz1791@163.com

Conclusions The activation of PI3K/PKB is one important aspect of the signaling event that contributes to the injury of pancreas during severe acute pancreatitis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (10) : 968 - 971]

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing; Phosphatidylinositol 3-Kinase; Protein Kinase B; Signal Transduction

CLC number: R 657. 51

Document code: A

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 时胰腺组织常出现明显的出血、坏死及炎性细胞浸润, 并且产生大量炎性介质, 成为全身炎症级联反应的始动环节。近年发现, 磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 信号转导通路在脓毒败血症、过度机械通气等炎症反应过程中发挥了重要的调节作用, 抑制 PI3K 信号转导通路的激活可以明显减轻这些炎症反应^[1-2]。也有研究发现, 阻断 PI3K 转导通路可明显减弱蛙皮缩胆囊肽刺激胰腺细胞造成的胰蛋白酶原激活^[3-4]。基于此, 本课题拟通过研究 PI3K 信号转导通路在 SAP 胰腺损伤中的作用, 以了解 SAP 的发病机制。

1 材料与方 法

1.1 动物分组与 SAP 模型的建立

健康成年雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 250 ~ 300 g, 购自中国医科大学动物部。随机分为对照组、SAP 组 (S 组) 和 SAP + wortmannin (PI3K 抑制剂, Sigma 公司) 组 (S + W 组), 每组 10 只。大鼠实验前 12 h 禁食, 自由饮水。用 2% 戊巴比妥钠 [东北制药厂产品, 0.1 mL/100 g (体重)] 腹腔内注射麻醉后, 取上腹正中切口, 进入腹腔后提起十二指肠显露胰腺, 从乳头处的十二指肠壁进针, 逆行穿刺胆胰管并固定; 同时用动脉夹阻断胆胰管的肝门端, 以 0.2 mL/min 的速度向胆胰管内匀速注入体积分数为 5% 的牛磺胆酸钠 1 mL/kg (体重) (Sigma 公司); 注射后用动脉夹夹闭穿刺处 5 min, 以防药液溢出并保持胰管内压力, 然后关腹。对照组以相同给药途径注射等量生理盐水。S + W 组于制模前 4 h 腹腔注射 wortmannin 1.4 mg/kg^[5]; 对照组和 SAP 组制模前给予等量对应溶剂。各组大鼠在模型制成 6 h 后处死, 取胰腺组织待测。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 胰腺组织病理学检查 常规制作石蜡切片并 HE 染色。病理评分标准按 Kusske^[6] 法, 根据出血、坏死面积及炎性细胞浸润数量进行评分 (分别给予 0 ~ 4 分), 定量分析其病损程度。

1.2.2 胰腺湿/干重比率测定 将称重的大鼠胰腺于 160 °C 烘烤 24 h, 再称重, 计算湿/干重比率。

1.2.3 胰腺髓过氧化物酶 (MPO) 检测 严格按照试剂盒 (南京建成生物试剂公司) 说明书操作。

1.2.4 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测胰腺组织肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的含量 胰腺组织称重后, -20 °C 制成 10% 匀浆, 离心取上清液。具体步骤严格按说明书操作 (ELISA 试剂盒购自美国 Genzyme 公司)。

1.2.5 免疫印迹 (Western Blot) 检测胰腺组织 PKB 及 p-PKB 的活性 胰腺组织加入 4 倍体积细胞裂解液, 进行研磨和超声裂解, 10 000 r/min 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 μ g) 后电转移至硝酸纤维膜上, 封闭后, 加入一抗 (PKB 或 p-PKB) (1:1 000, Cell Signaling Technology 公司), 室温下免疫沉淀 1 h, 摇洗后加入标记二抗 (1:2 000), 室温下作用 2 h。增强化学发光 (ECL) 浸膜, 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 (OD), 并计算 p-PKB 和 PKB 吸光度值的比值。

1.2.6 逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测胰腺组织 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的变化

(1) RNA 提取: TRIzol 一步法提取 RNA。(2) 反转录: 采用 TaKaRa 公司试剂盒合成 cDNA。(3) PCR 扩增: 大鼠 TNF- α 引物序列上游为 5'-GGCCAC-CACGCTCTTCTG-3', 下游为 5'-GCCATTGGCCAG-GAGGCC-3', 扩增片段 229 bp。IL-1 β 引物序列上游为 5'-AGAAGCTGTGGCAGCTACCT-3'; 下游为 5'-TTGGGATCCCACTCTCCAG-3', 扩增片段 400 bp。 β -actin 引物序列上游为 5'-GCCAACCGT-GAAAAGATG-3', 下游为 5'-CCAGGATAGAGCCAC-CAAT-3', 扩增片段 700 bp。PCR 反应条件: 94 °C, 2 min, 预变性; 然后以 94 °C, 30 s, 58 °C, 30 s, 72 °C, 40 s, 进行 30 个循环后, 72 °C 10 min 延伸。反应完成后将 PCR 扩增产物 (TNF- α , IL-1 β 和 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。

1.3 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用单因素方差分析或 *t* 检验。数据经 SPSS11.0 统计分析软件处理完成。

2 结果

2.1 胰腺湿/干重比值及 MPO 的变化

与对照组比较, S 组的胰腺组织湿/干重比值和 MPO 水平明显升高 ($P < 0.01$)。S + W 组的升高趋势被明显抑制 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.2 胰腺组织学评分

S 组成模后大体可见胰腺明显肿胀、出血、坏死及血性腹水形成。S + W 组胰腺的肿胀、坏死及血性腹水明显减轻。显微镜下可见, S 组胰腺出现明显出血、灶状坏死和炎性细胞浸润, 而 S + W 组坏死及炎性细胞浸润明显减少 (表 1)。

表 1 3 组大鼠胰腺组织湿干重比值、MPO 及病理组织学的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	湿/干比值	MPO 活性(U/g)	病理学评分
对照	1.44 ± 0.22	0.25 ± 0.06	0.19 ± 0.03
S	2.81 ± 0.35 ¹⁾	0.91 ± 0.13 ¹⁾	9.72 ± 1.06 ¹⁾
S+W	1.93 ± 0.30 ²⁾	0.56 ± 0.05 ²⁾	4.32 ± 0.74 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.01$; 2)与 S 组比较, $P < 0.01$

表 2 3 组大鼠胰腺组织内 TNF- α , IL-1 β 蛋白及 mRNA 含量和 PKB 活性的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	TNF- α 含量(pg/mL)	IL-1 β 含量(pg/mL)	TNF- α mRNA 表达	IL-1 β mRNA 表达	p-PKB/ PKB 值
对照	42.4 ± 12.2	35.7 ± 7.6	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.39 ± 0.03
S	350.8 ± 91.7 ¹⁾	249.5 ± 58.4 ¹⁾	0.71 ± 0.06 ¹⁾	0.83 ± 0.11 ¹⁾	0.63 ± 0.08 ¹⁾
S+W	170.6 ± 55.3 ²⁾	83.0 ± 15.8 ²⁾	0.42 ± 0.04 ²⁾	0.25 ± 0.04 ²⁾	0.42 ± 0.06 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.01$; 2)与 S 组比较, $P < 0.01$

2.3 胰腺组织 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白的变化

与正常对照组相比, S 组胰腺组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高 ($P < 0.01$), 而 S + W 组 TNF- α 和 IL-1 β 含量显著低于 S 组 ($P < 0.01$) (表 2)。

2.4 胰腺组织 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的变化

对照组胰腺组织有少量 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达; S 组胰腺组织 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达较对照组明显增加 ($P < 0.01$)。而 S + W 组 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 转录水平显著低于 S 组 ($P < 0.01$) (表 2) (图 1)。

2.5 胰腺组织 PKB 和 p-PKB 活性的变化

对照组 PKB 总蛋白表达丰富, 但磷酸化水平较低。S 组 PKB 磷酸化迅速升高, 较对照组增加明显 ($P < 0.01$); S + W 组 PKB 的磷酸化被明显抑制, 与 S 组相比差异有极显著性 ($P < 0.01$) (表 2) (图 2)。

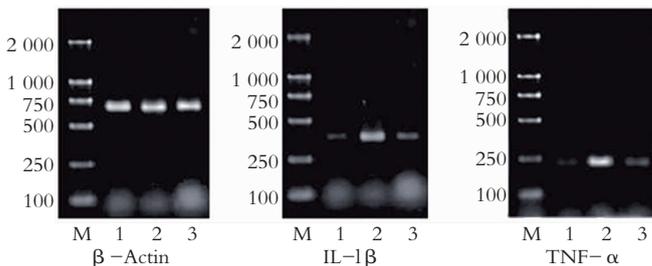


图 1 大鼠胰腺组织内 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达
1:对照组; 2:S 组; 3:S+W 组; M:marker

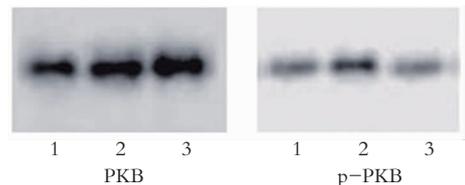


图 2 大鼠胰腺组织内 PKB 及 p-PKB 的表达变化
1:对照组; 2:S 组; 3:S+W 组

3 讨论

目前认为, 胰腺细胞内胰蛋白酶原的异位激活^[7]、钙离子的异常内流及核因子 NF- κ B 的过度活化^[8]是炎症早期的特征性病理改变。这些改变均与细胞内多种信号转导通路的活化密切相关。由于 PI3K/PKB 信号转导通路反应迅速, 使细胞能对致病因子的刺激及时反应, 因而在机体的炎症与免疫过程中发挥了关键作用。研究表明, 细

菌内毒素 (LPS)、过敏毒素 C5a 等可与各自受体结合, 通过 G 蛋白偶联受体的细胞内羧基端激活 PI3K/PKB 转导通路, 进而活化 NF- κ B; 此过程在炎症反应中发挥了核心的调节作用。

PI3K 是普遍存在于各种细胞的异二聚体酯类激酶复合物。研究显示, 细胞内 PI3K 活化后, PI3K 的产物磷脂酰肌醇 3, 4- P_2 和磷脂酰肌醇 3, 4, 5- P_3 可以直接激活 PI3K 的直接下游 PKB; 活化的 PKB 可以导致 I κ B α 磷酸化, 使 I κ B α 与核因

子 NF- κ B 解离, NF- κ B 被活化并入核, 结合到特定的启动子或促进子上, 进而提高炎症介质基因的转录活性^[9-10], 最终导致细胞产生大量的炎症细胞因子。

本实验显示, SAP 模型制成 6 h 后, 胰腺组织出现明显的水肿及坏死灶, 镜下可见大量炎症细胞浸润和局灶性坏死。这说明 SAP 模型建立成功。结果还发现, 正常胰腺组织中 PKB 总蛋白表达较为丰富, 但磷酸化 PKB 的水平较低, SAP 形成后 PKB 磷酸化显著高于正常对照组。表明 SAP 大鼠胰腺组织内 PI3K 信号转导通路显著活化并参与了炎症反应的产生。此外胰腺组织内 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 水平及蛋白含量在 S 组明显增加, 使用 PI3K 信号转导通路抑制剂 wortmannin 后, 胰腺组织内 PKB 的活化被明显抑制, 胰腺的病理组织学改变明显缓解, 坏死及炎症细胞浸润明显减少, 作为代表中性粒细胞浸润程度的 MPO 水平也显著降低, 胰腺的含水量明显减少, TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达及蛋白的含量也明显下降。说明 PI3K 信号转导通路调控了 SAP 时胰腺组织的炎症反应, 并调节了炎症介质 TNF- α 和 IL-1 β 的产生, 进而在 SAP 的全身炎症反应中发挥作用。

近期有研究发现, 用 PI3K 基因敲除鼠制成的胰腺炎模型, 胰腺组织内细胞坏死明显减少, 而作为保护性因素的细胞凋亡却明显增加, 同时胰腺及肺脏组织内中性粒细胞的浸润明显减少, 胰腺炎症反应明显减轻^[3]。Gukovsky I 等^[4]发现, PI3K γ p110 亚单位是调节胰腺细胞炎症反应的关键; 这种调节作用是通过通过对胰腺细胞钙离子内流、胰蛋白酶原激活及核因子活化的调控而发挥作用的。本研究显示 wortmannin 具有明显的减轻胰腺炎症反应的作用。此结果与之相符。这将有助于从新的角度认识 SAP 的发病本质, 并为采取积极的干预措施提供理论依据。

关于 SAP 时胰腺组织内 PI3K 信号转导通路被活化的机制仍不清楚。异位激活的胰蛋白酶^[11]、肠道细菌内毒素移位入血^[1]、氧自由基产生增多都可能直接活化 PI3K; 目前尚不明了这是

一种抑或多种刺激因素联合作用的结果。

参考文献:

- [1] Yum HK, Arcaroli J, Kupfner J, *et al.* Involvement of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil activation and the development of acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2001, 167 (11): 6601 - 6608.
- [2] Uhlig U, Fehrenbach H, Lachmann RA, *et al.* Phosphoinositide 3-OH kinase inhibition prevents ventilation-induced lung cell activation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169 (2): 201 - 208.
- [3] Lupia E, Goffi A, De Giuli P, *et al.* Ablation of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces the severity of acute pancreatitis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165 (6): 2003 - 2011.
- [4] Gukovsky I, Cheng JH, Nam KJ, *et al.* Phosphatidylinositide 3-kinase gamma regulates key pathologic responses to cholecystokinin in pancreatic acinar cells [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126 (2): 554 - 566.
- [5] Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108 (9): 1387 - 1395.
- [6] Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, *et al.* Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice [J]. *Surgery*, 1996, 120 (8): 284 - 289.
- [7] 何忠野, 郭仁宣, 谢成耀, 等. 硫酸软骨素对 ANP 大鼠胰腺细胞氧化应激损伤及细胞间连接的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (8): 590 - 594.
- [8] 张翼, 吕新生, 孙维佳, 等. 甘露对重症急性胰腺炎大鼠核因子- κ B 活化的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (10): 761 - 765.
- [9] Li Z, Jiang H, Xie W, *et al.* Role of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction [J]. *Science*, 2000, 287 (5455): 1046 - 1049.
- [10] Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation [J]. *Science*, 2000, 287 (5455): 1049 - 1053.
- [11] Namkung W, Han W, Luo X, *et al.* Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126 (7): 1844 - 1859.