PI3K/Akt信号通路对气腹预处理大鼠肝脏的保护作用*

蒋天盛，李春来，袁洪涛
（贵阳市第一人民医院，贵州 贵阳 550001）

［摘 要］**目的**：观察气腹预处理后大鼠肝组织中磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B（PI3K/Akt）信号通路的变化。**方法**：健康SD大鼠30只，随机均分为假气腹组、气腹组和气腹预处理组；气腹组大鼠脐旁插入气腹针并连接SN/REF气腹机充入二氧化碳（CO_2）建立气腹模型（腹压保持在15 mmHg，持续90 min后解除气腹），气腹预处理组在建立气腹前先进行预处理（充气5 min，放气5 min，重复2次），其余同气腹组；假气腹组大鼠脐旁插入气腹针但不充入CO_2气体；实验结束后处死大鼠；取同一部位肝组织，采用Western Blot检测肝脏中Akt、p-Akt蛋白的表达，采用TUNEL法检测肝细胞凋亡。**结果**：与假气腹组比较，气腹组大鼠肝脏中Akt及p-Akt的表达显著减少，而肝细胞凋亡率则显著增加，差异具有统计学意义（$P<0.01$）；与气腹组比较，气腹预处理组大鼠肝脏中Akt及p-Akt的表达显著增高，而肝细胞凋亡率则明显较少，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**：PI3K/Akt信号通路可能参与了气腹预处理对大鼠肝组织的保护作用。

［关键词］模型，动物；气腹，人工；预处理；蛋白激酶B；大鼠，Sprague-Dawley
［中图分类号］R657.3 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2016）05-0564-03
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.05.017

Protective Effect of PI3K/Akt Signaling Pathway on Liver of Pneumoperitoneum Preconditioning Rats

JIANG Tiansheng, LI Chunlai, YUAN Hongtao
(*The First People's Hospital of Guiyang, Guiyang 550001, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To observe the change of PI3K/Akt signaling pathway in liver tissue of pneumoperitoneum preconditioning rats. **Methods**: 30 healthy SD rats were divided into sham pneumoperitoneum group, pneumoperitoneum group and pneumoperitoneum preconditioning group randomly, 10 rats in each group. Inserting the veress beside the navel of rats and connecting SN/REF pneumoperitoneum machine to insufflate CO_2 for 90 minutes to establish the pneumoperitoneum model, abdominal pressure maintained at 15 mmHg. The pneumoperitoneum preconditioning group was subjected to 5 min of insufflation and 5 min of deflation, repeat for 2 times, then following the same practice as pneumoperitoneum group. The rats of sham pneumoperitoneum group were inserted needles but not filling CO_2. Changes of PI3K/Akt signaling pathway were detected by western blot. The apoptosis of hepatocytes was detected by TUNEL. **Results**: Comparing with sham pneumoperitoneum group, the expression of total Akt and p-Akt of pneumoperitoneum group were significantly decreased ($P<0.01$), while the apoptosis of hepatocytes was increased; comparing with pneumoperitoneum group, the expression of total Akt and p-Akt of pneumoperitoneum preconditioning group were significantly increased ($P<0.05$), while the apoptosis of hepatocytes was decreased. **Conclusion**: PI3K/Akt signaling pathway may be involved in the protective effects of pneumoperitoneum preconditioning on liver tissue of rats.
［**Key words**］model, animal; pneumoperitoneum, artificial; preconditioning; protein kinase B; rats, Sprague-Dawley

*［基金项目］贵阳市卫生局科学技术计划项目［（2014）筑卫科技合同字第2号］
网络出版时间：2016-05-13 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160513.2115.040.html

近年来,腹腔镜手术过程中建立二氧化碳(CO_2)气腹所导致的腹腔脏器病理生理改变及其对脏器功能的影响正日益引起关注[1]。CO_2 气腹自身的压力会造成腹腔脏器组织缺血损伤,气腹缺血预处理对提高组织缺血耐受性的作用虽受到重视,但其保护作用的具体机制尚不清楚[2]。磷脂酰肌醇-3 激酶－蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路是体内调节细胞生长、分化、凋亡的关键信号通路之一,PI3K 可通过激活其下游效应分子 Akt,抑制促凋亡蛋白 Bad、Bax 和 caspase 的形成,从而达到抑制细胞凋亡的目的[3-4]。本研究通过模拟临床腹腔镜手术的操作环境,通过建立 CO_2 气腹及气腹预处理动物模型,初步探讨 CO_2 气腹预处理对大鼠肝组织中 PI3K/Akt 信号通路的影响及其对肝组织的保护作用。

1　材料与方法

1.1　动物、仪器与试剂

健康成年雄性 SD 大鼠 30 只,8～12 周龄体,质量 220～260 g,购自贵州医科大学实验动物中心;SN/REF 气腹机(美国 Stryker 公司);戊巴比妥钠购自上海西塘生物科技有限公司;兔抗大鼠 Akt、p-Akt 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; PVDF 膜及 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Millipore 公司;十二烷基硫酸钠、甘氨酸、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷及过硫酸铵购自北京鼎国公司;细胞凋亡检测试剂盒购自南京碧云天生物科技有限公司。

1.2　方法

1.2.1　分组及模型复制　30 只 SD 大鼠随机分为假气腹组、气腹组和气腹预处理组,每组各 10 只。采用 1% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉后,取仰卧位固定。脐周采用 75% 酒精消毒灭菌,参照文献[5]建立气腹模型。气腹组大鼠在脐旁插入气腹针并连接 SN/REF 气腹机充入 CO_2 建立气腹动物模型,腹压维持在 15 mmHg,持续 90 min后解除气腹;气腹预处理组在建立气腹前先进行预处理(CO_2 充气 5 min、腹压维持在 15 mmHg、放气 5 min,重复 2 次)后建立 CO_2 气腹,方法同气腹组;假气腹组仅在脐旁插入针头但不充入 CO_2。手术结束后 24 h(再灌注 24 h 后)处死大鼠,每只大鼠取相同部位肝组织于 4% 中性甲醛溶液中固定 48 h,剩余肝组织储存在 －80 ℃低温冰箱,统一进行 Western Blot 检测。

1.2.2　肝组织 Akt、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)蛋白表达　采用 Western Blot 法检测,取 0.1 g 肝组织提取总蛋白,经垂直电泳分离蛋白质后,采用全湿电转移进行转膜,将 PVDF 膜置于封闭缓冲液中 2 h。洗膜缓冲液洗膜 3 次,将 PVDF 膜与一抗稀释液(Akt 1∶1 000,p-Akt 1∶500)4 ℃孵育过夜。次日用洗膜缓冲液洗膜 3 次,PVDF 膜与二抗稀释液(1∶3 000)在室温下孵育 1 h, 洗膜缓冲液洗膜 3 次。加入增强化学发光试剂,暗室中反应1 min后将 PVDF 膜迅速封入保鲜膜中,Kodak 胶片进行显影、定影,并用清水冲洗晾干。

1.2.3　肝细胞凋亡检测　采用 TUNEL 法检测肝细胞凋亡, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.3　统计学处理

数据采用 SPSS 15.0 统计软件处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用方差分析,两两比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　肝脏组织中 Akt、p-Akt 蛋白表达

各组大鼠肝脏组织中 Akt、p-Akt 蛋白表达如表 1、图 1 所示,与假气腹组比较,气腹组大鼠肝组织中 Akt、p-Akt 的表达均显著减少($P<0.01$);与气腹组比较,气腹预处理组大鼠肝脏组织中 Akt、p-Akt 的表达均显著增加($P<0.05$)。

2.2　肝细胞凋亡

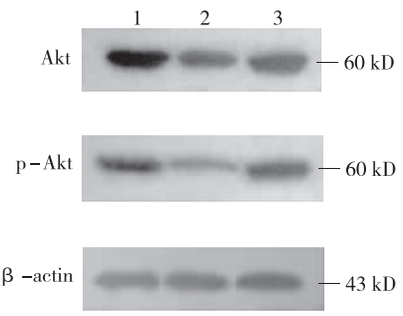
TUNEL 法检测肝细胞凋亡结果如表 1、图 2 所示,假气腹组大鼠肝脏内仅有少量肝细胞发生凋亡,而气腹组大鼠肝细胞凋亡率较假气腹组明显增加($P<0.01$);经气腹预处理组大鼠肝组织中细胞凋亡率较气腹组显著减少($P<0.05$)。

表 1　大鼠肝脏组织中总 Akt、p-Akt 水平及肝细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 1　Total level of Akt and p-Akt of experiment rats´liver tissue and hepatocytes apoptosis

组别	Akt/β-actin	p-Akt/β-actin	凋亡率(%)
假气腹组	2.01 ± 0.63	1.12 ± 0.24	0.09 ± 0.03
气腹组	0.75 ± 0.21[(1)]	0.47 ± 0.15[(1)]	0.31 ± 0.07[(1)]
气腹预处理组	1.32 ± 0.19[(2)]	1.07 ± 0.30[(2)]	0.14 ± 0.05[(2)]

[(1)] 与假气腹组比较,$P<0.01$;[(2)] 与气腹组比较, $P<0.05$



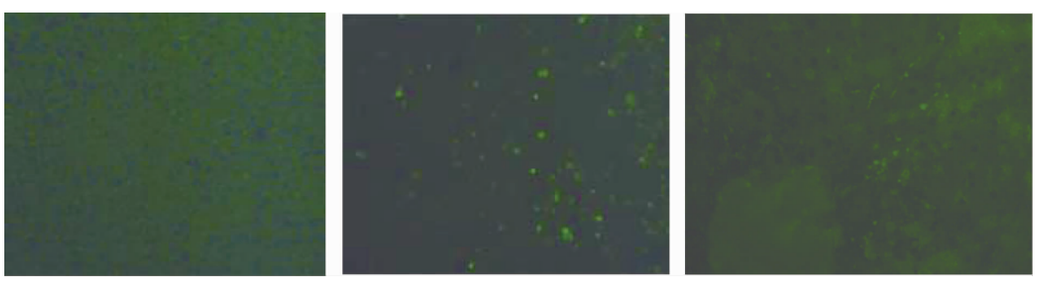
注:1 假气腹组; 2 气腹组; 3 气腹预处理组

图 1　3 组大鼠肝脏组织中 Akt、p-Akt 表达(Western Blot)

Fig. 1　Expression of Akt and p-Akt in liver tissue of 3 groups of rats(Western Blot)

3　讨论

腹腔镜手术过程中通常采用 CO_2 气腹技术来获得充分的操作空间。在建立 CO_2 气腹的过程中,由于腹腔压力快速增加,压迫内脏血管,使肝动脉、门静脉等血管阻力增加,血液灌流不足,从而导致肝脏的缺血损伤[6];当手术结束解除气腹后由于腹腔内压骤降,内脏血管阻力消除,肝脏血液灌流得以恢复。因此气腹过程实质上相当于肝脏缺血再灌注过程,其所引起的肝脏损伤已被大量研究所证实[7]。近年来有研究表明,气腹预处理有类似缺血预处理的作用,能有效减轻腹腔镜术中气腹所致的肝脏损伤。Ates 等[8]报道在建立大鼠 CO_2 气腹前,给予 5 min 的充气(15 mmHg)和 5 min 的放气可显著改善术中长时间气腹产生的缺血/再灌注损伤。PI3k/Akt 信号通路中的 PI3K 是生长因子受体超家族中的重要成员,而其下游效应分子 Akt 为 PKA 和 PKC 家族成员[9]。PI3k 活化后使 Akt 转位到细胞膜,催化其自身的 Ser124 和 Thr450 发生磷酸化而激活;此外 Akt 和 PDK-1 同时定位在细胞膜上,PDK-1 能进一步催化 Akt 的 Ser473 和 Thr308 发生磷酸化,从而使 Akt 完全活化[10]。磷酸化的 Akt(p-Akt)可以传递抗凋亡信号到其下游的效应分子,从而发挥对抗细胞凋亡,促进细胞生长增殖的作用[11]。



假气腹组　　气腹组　　气腹预处理组

图 2　3 组大鼠肝细胞凋亡(TUNEL, ×200)

Fig. 2　Hepatocytes apoptosis of 3 groups of rats

本研究通过模拟临床腹腔镜手术的操作环境,建立 CO_2 气腹及气腹预处理动物模型,观察各组大鼠肝脏组织中总 Akt 及 p-Akt 的表达情况。结果表明,气腹组大鼠肝组织中总 Akt 及 p-Akt 的表达较假气腹组显著减少,同时肝组织内细胞凋亡率显著增加,提示 PI3K/Akt 信号通路的抑制可能参与了 CO_2 充气和放气造成的肝组织缺血/再灌注损伤。而气腹预处理组大鼠肝组织中总 Akt 及 p-Akt 的表达较气腹组明显增多,同时肝组织内细胞凋亡率较气腹组有所减少,这充分表明气腹预处理能通过激活 PI3K/Akt 信号通路减少肝细胞凋亡来发挥减轻肝组织缺血-再灌注损伤的作用。

4　参考文献

[1] 包延丽,黄中华,梁宁,等. 气腹模型中预气腹与谷氨酰胺干预对肺损伤保护作用的研究[J]. 广西医学, 2011 (7):797-800.

[2] 于建宏,马加海,丁永波,等. 气腹预处理对气腹所致大鼠肾脏损伤的保护作用[J]. 山东医药, 2008(46):41-42.

[3] 刘友平,严冬梅,陈川宁,等. PI3K/Akt 调控内质网应激对 GRP78 的诱导[J]. 中国病理生理杂志, 2011(4):749-754.

[4] 张慧,姜咏梅,尹琳. PI3K/ AKT / GSK-3B 信号在脑缺血预处理中的作用及对海马细胞凋亡的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2011(4):408-412.

[5] 稽武,陈训如,周正东,等. CO_2 气腹对兔肝肾功能的影响机制[J]. 世界华人消化杂志, 1999 (10) : 897-899.

(下转第 569 页)

部位的小细胞癌 PAX5 蛋白，发现其阳性率为 79.2%。本研究采用 SP 法检测 56 例 NEN 中 PAX5 蛋白表达情况，分析 PAX5 表达与本组病例部分临床病理特征的关系；结果发现 PAX5 表达与肿瘤大小无明显关系（$P>0.05$），而与 Ki67 指数及肿瘤临床分期密切相关（$P<0.05$）；PAX5 的阳性表达在 Ki67 > 20% 的 NEN 病例高于 Ki67 ≤ 20% 的病例；在晚期 NEN 病例高于早期病例，这与 Panzuto 等[10]的研究结果基本一致。在 NEN 的诊断中，国际公认的最可靠的标记是 CgA、Syn 和 CD56 等[11]。本研究结果表明，PAX5 在 NEN 中有一定程度表达，表达与肿瘤增殖活性（Ki67 表达率）、TNM 分期有关。提示 PAX5 阳性表达可能是 NEN 病理诊断的重要补充。关于 PAX5 表达对 NENs 临床病理特征和预后的影响的机制有待于进一步的深入研究。

4　参考文献

[1] Scherubl H, Streller B, Stabenow R, et al. Clinically detected gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors are on the rise: epidemiological changes in Germany[J]. World J Gastroenterol, 2013 (47): 9012 - 9019.

[2] Starzynska T, Deptala A, Krolicki L, et al. Colorectal neuroendocrine neoplasms-management guidelines (recommended by the Polish Network of Neuroendocrine Tumours)[J]. Endokrynol Pol, 2013(6): 494 - 504.

[3] Fraenkel M, Kim M, Faggiano A, et al. Incidence of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a systematic review of the literature[J]. Endocr Relat Cancer, 2014 (3): 153 - 163.

[4] Santoro A, Bica MG, Dagnino L, et al. Altered mRNA expression of PAX5 is a common event in acute lymphoblastic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2009 (6): 686 - 689.

[5] Janczar K, Janczar S, Pastorczak A, et al. Preserved global histone H4 acetylation linked to ETV6-RUNX1 fusion and PAX5 deletions is associated with favorable outcome in pediatric B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res, 2015 (12): 1455 - 1461.

[6] Sica G, Vazquez MF, Altorki N, et al. PAX-5 expression in pulmonary neuroendocrine neoplasms: its usefulness in surgical and fine-needle aspiration biopsy specimens[J]. Am J Clin Pathol, 2008 (4): 556 - 562.

[7] 王乐民，张群，王晓虹. 支气管类癌的外科治疗及预后分析[J]. 中国医学工程，2013 (2): 80.

[8] Wang YH, Yang QC, Lin Y, et al. Chromogranin A as a marker for diagnosis, treatment, and survival in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm[J]. Medicine (Baltimore), 2014 (27): e247.

[9] Nguyen R, Jett K, Harris GJ, et al. Benign whole body tumor volume is a risk factor for malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1[J]. J Neurooncol, 2014 (2): 307 - 313.

[10] Panzuto F, Boninsegna L, Fazio N, et al. Metastatic and locally advanced pancreatic endocrine carcinomas: analysis of factors associated with disease progression[J]. J Clin Oncol, 2011 (17): 2372 - 2377.

[11] Al Omar SY, Marshall E, Middleton D, et al. Increased numbers but functional defects of CD56 + CD3 + cells in lunger cancer[J]. Int Immunol, 2012 (7): 409 - 415.

（2016-02-25 收稿，2016-04-30 修回）
中文编辑：吴昌学；英文编辑：刘　华

（上接第 566 页）

[6] 朱以祥，王卫星. 气腹预处理对腹腔镜手术大鼠肝脏保护作用的实验研究[J]. 微循环学杂志，2008 (1): 11 - 12.

[7] 李平，李巍. 气腹预处理对患者肝功能的保护作用[J]. 中国现代医生，2010 (2): 128.

[8] Ates E, Yilmaz S, Ihtiyar E, et al. Preconditioning-like amelioration of erythropoietin against laparoscopy-induced oxidative injury[J]. Surg Endosc, 2006 (5): 815 - 819.

[9] Rong R, Xijun X. Erythropoietin pretreatment suppresses inflammation by activating the PI3K/Akt signaling pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Exp Ther Med. 2015 (2): 413 - 418.

[10] 李娜，祝聪聪，肖永红，等. PI3K 抑制剂对四氯化碳刺激的肝星状细胞增殖和Ⅰ型胶原表达的影响[J]. 西安交通大学学报：医学版，2013 (2): 164 - 167.

[11] Jian J, Xuan F, Qin F, et al. Bauhinia championii flavone inhibits apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Drug Des Devel Ther, 2015(9): 5933 - 5945.

（2016-01-10 收稿，2016-04-22 修回）
中文编辑：吴昌学；英文编辑：赵　毅