

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.09.002

文章编号: 1005-8982(2017)09-0008-05

Akt/GSK-3 β 通路介导调控莱菔硫烷减轻 心脏移植缺血再灌注损伤的研究*

伊雪¹, 杨学慧², 杨述亮², 石莺¹, 郭鹏宇², 王耕银²,
陈乃耀², 高木火³, 高毅哲³, 李占清³

[1. 厦门医学院 病理与病理生理学教研室, 福建 厦门 361008; 2. 华北理工大学附属医院 胸心外科, 河北 唐山 063000; 3. 福建省厦门市第二医院 (厦门医学院附属医院) 胸心外科, 福建 厦门 361021]

摘要:目的 探讨蛋白激酶 B (Akt)/糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 信号通路对莱菔硫烷 (SFN) 预处理减轻大鼠心肌冷缺血再灌注损伤 (IRI) 的作用机制。**方法** 64 例健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: IRI 组、SFN 组、阻滞剂 LY294002+IRI (LY+IRI) 组、阻滞剂 LY294002+SFN 预处理 (LY+SFN) 组, 将冷藏于心肌保护液 (组氨酸-色氨酸-酮戊二酸盐液) 9 h 的供体心脏移植到受体大鼠的腹腔, 复制同种大鼠异体异位心脏移植模型, 术后 24 h 取供体心脏心肌组织, 采用免疫组织化学法 (IHC) 和 Western blot 检测 Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)、GSK-3 β 、磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β) 蛋白的表达。**结果** IHC 法和 Western blot 检测各种蛋白结果显示, 与 IRI 组比较, SFN 组 p-Akt 和 p-GSK-3 β 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。应用阻滞剂 LY294002 后, SFN+LY 组与 LY+IRI 组的 p-Akt 和 p-GSK-3 β 蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** SFN 能通过 Akt/GSK-3 β 信号通路减轻心脏移植心肌冷缺血再灌注损伤。

关键词: 蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶-3 β 通路; 莱菔硫烷; 心脏移植; 冷缺血再灌注损伤

中图分类号: R654.2

文献标识码: A

Sulforaphane preconditioning attenuates myocardial cold ischemia reperfusion injury of heart transplantation of rats through Akt/GSK-3 β signaling pathway*

Xue Yi¹, Xue-hui Yang², Shu-liang Yang², Ying Shi¹, Peng-yu Wu², Geng-yin Wang²,
Nai-yao Chen², Mu-huo Gao³, Yi-zhe Gao³, Zhan-qing Li³

[1. Department of Pathology and Pathophysiology, Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361008, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, the Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Hospital of Xiamen (the Affiliated Hospital of Xiamen Medical College), Xiamen, Fujian 361021, China]

Abstract: Objective To explore the role of Akt/Gsk-3 β signaling pathway in sulforaphane (SFN) protecting rats from cold myocardial ischemia-reperfusion injury during heart transplantation. **Methods** Sixty-four health male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 4 groups, i.e. ischemia reperfusion injury group (IRI group), sulforaphane group (SFN group), LY294002+ ischemia reperfusion injury (LY+IRI group), and LY294002+ sulforaphane group (LY+SFN group). Isogenic heterotopic heart transplantation model was estab-

收稿日期: 2015-10-12

* 基金项目: 福建省自然科学基金 No. 2016D014; 福建省医学创新课题 No. 2015-CXB-47; 福建省厦门市科技惠民项目 No. 3502Z2016 4057)

[通信作者] 李占清, E-mail: zhanqingli@163.com

lished according to Li's method. Donor hearts stored in histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for 9 h were transplanted into the abdominal cavities of recipient rats to establish rat models of heterotopic heart transplantation. Akt, p-Akt, GSK-3 β and p-GSK-3 β protein expressions in the grafts were detected by immunohistochemistry and Western blot 24 h after reperfusion. **Results** Compared with the IRI group, p-Akt and p-GSK-3 β levels increased in the SFN group ($P < 0.05$). After using blocker LY294002, there was no significant difference in the expression of p-Akt or p-GSK-3 β between the LY+SFN group and the LY+IRI group ($P > 0.05$). **Conclusions** SFN reduces cold ischemia reperfusion injury in heart transplantation of rats through activating Akt/ GSK-3 β signaling pathway.

Keywords: Akt/Gsk-3 β signaling pathway; sulforaphane; heart transplantation; cold ischemia reperfusion injury

心脏移植缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是不可避免的。如何减轻心脏移植的缺血再灌注损伤,提高患者远期存活率是目前研究的焦点之一。前期研究发现,莱菔硫烷 (Sulforaphane, SFN) 通过抗凋亡、抗氧化作用能减轻心脏移植供体心脏冷缺血再灌注损伤^[1-2],但机制不甚清楚。蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) / 糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 通路作为细胞内重要信号通路在心肌缺血再灌注损伤中的保护作用已得到证实^[3-9]。然而,Akt/GSK-3 β 通路在 SFN 减轻心肌缺血再灌注损伤的作用机制还不得而知。故本实验拟通过复制大鼠异体异位心脏移植模型,探讨 SFN 是否通过 Akt/GSK-3 β 通路减轻供体心脏冷缺血再灌注损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

近交系健康雄性 SD 大鼠 64 例 (北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXX 京2011-007), 体重 220~250 g, SPF 清洁级。SFN 购于美国 LKT 实验室, LY294002 (PI3K 阻滞剂) 购自美国 Cayman 公司, 组氨酸-色氨酸-酮戊二酸盐液 (histidine-tryptophan-ketoglutarate, HTK) 购自德国克勒化学试剂公司, PV-600 免疫组织化学二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥公司, 兔 Akt、磷酸化 Akt (以下简称 p-Akt) 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司。GSK-3 β 、磷酸化 GSK-3 β (以下简称 p-GSK-3 β) 多克隆抗体均购自香港 Affinity 公司, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶剂购于美国 Sigma 公司。

1.2 模型复制

按照李占清等^[10]描述的方法进行动物模型复制。步骤如下:① 麻醉。10%水合氯醛 3~4 ml/kg 腹腔注

射, 麻醉 SD 大鼠。② 供体心脏制备。用 4℃ 生理盐水 35 ml 和 HTK 液 15 ml 先后对供体心脏进行冲洗并取出置于 20 ml 4℃ HTK 液中保存 9 h。③ 受体移植。将供体心脏的升主动脉、肺动脉分别与受体大鼠的腹主动脉、下腔静脉端侧吻合, 开放循环, 心脏复跳, 检查无出血后关腹。④ 标本采集。移植后 24 h 处死动物, 取其供体心脏的心肌组织, 一部分石蜡包埋待组织学和免疫组织化学检测, 一部分置于 -80℃ 深低温冰箱中冷冻待 Western blot 检测。

1.3 实验分组

64 例健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组 (每组供、受体各 8 例), ① IRI 组: 受体在移植前 24 h 经尾静脉注射 1% DMSO 0.3 ml; ② SFN 组 (莱菔硫烷预处理组): 受体在移植前 24 h 经尾静脉注射 SFN 溶于 DMSO 溶剂) 2.5 mg/kg; ③ LY+IRI 组 (阻滞剂 LY294002+IRI 组): 受体于注射 1% DMSO 前 30 min 及移植前 30 min 分别经鼠尾静脉注射 LY294002 (溶于 1% DMSO) 0.3 mg/kg, 余同 IRI 组; ④ LY+SFN 组 (阻滞剂 LY294002+ 菔硫烷预处理组): 受体于注射 SFN 前 30 min 及移植前 30 min 分别经鼠尾静脉注射 LY294002 0.3 mg/kg, 余同 SFN 组。

1.4 检测指标

1.4.1 免疫组织化学法 immunohistochemistry, IHC) 半定量分析 Akt、p-Akt、GSK-3 β 及 p-GSK-3 β 蛋白表达 按照试剂盒说明书, 采用 PV-6001 免疫组织化学二步法检测 Akt、p-Akt、GSK-3 β 及 p-GSK-3 β 的蛋白表达。石蜡切片常规脱蜡至水, 放入沸腾的柠檬酸盐缓冲液中抗原热修复 5 min, 3% 过氧化氢阻断内源过氧化物酶后磷酸盐缓冲液 phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 次, 3 min/次, 分别滴加兔多克隆抗体 Akt (1:50)、p-Akt (1:50)、GSK-3 β (1:200)、p-GSK-3 β (1:200), 置于 4℃ 冰箱冷冻过夜, 次日滴加 PV-6001 试剂, 37℃ 温箱孵育

40 min, PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次, 行二氨基联苯氨显色 5~6 min 后蒸馏水充分洗涤, 再行苏木素复染 1 min 后流水冲洗 30 min, 常规乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片; 用已知阳性组织切片作为阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照, 光镜下观察, 心肌细胞胞质中出现棕黄色颗粒为阳性表达。于 400 倍镜下, 每张切片取 5 个视野, 按照伊雪等^[6]的免疫组织化学评分法, 结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色程度进行评分, 取均值表示该蛋白表达。

1.4.2 Western bolt 检测 Akt, p- Akt, GSK- 3 β 及 p- GSK- 3 β 蛋白表达 蛋白提取: 取出冷冻供体心脏组织, 切取 100 mg 放入冰上已编号的离心管 (eppendorf tubes, EP) 管中, 加入混匀的细胞裂解液 1 ml, 用匀浆器打碎, 置于 4 $^{\circ}$ C、11 000 r/min 离心 10 min, 并用微量枪析出上清液备用。应用聚氰基丙烯酸正丁酯法蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度 A 液: B 液 =50: 1, 混匀) 并用上样缓冲液配平, 配制 12% 分离胶注入制胶玻璃板待凝固, 再次注入 5% 浓缩胶并插梳子, 凝固后拔出梳子并滴加上样蛋白 (50 μ g/ 孔), 放入电泳槽进行电泳, 用电转仪将蛋白转至聚偏氟乙烯膜, 三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 tris buffered saline and tween 20, TBST) 清洗 3 次, 5 min/ 次, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 再次 TBST 液清洗 3 次, 10 min/ 次, 孵一抗并 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 次日 TBST 液清洗 3 次, 15 min/ 次, 孵二抗 2 h, TBST 液清洗 3 次, 15 min/ 次, 并显影, 待 β -actin (1: 10 000) 检测平衡后, 依次检测 Akt、P- Akt、GSK- 3 β 、p- GSK- 3 β 蛋白表达 (均 1: 1 500), 应用 Image JV 1.47H 软件进行条带灰度值测定。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 应用单因素方差分析 (One-way, ANOVA), 若方差齐则两两比较用 LSD- t

检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植后 24 h 供体心脏心肌组织 Akt、p-Akt、GSK-3 β 及 p-GSK-3 β 蛋白表达

各组 Akt、GSK- 3 β 蛋白表达比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($F=0.086$ 和 0.493 , $P=0.951$ 和 0.691); 各组 p- Akt、p- GSK- 3 β 蛋白表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=48.482$ 和 12.805 , $P=0.000$)。SFN 组与 IRI 组的 p- Akt 和 p- GSK- 3 β 蛋白表达比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。应用阻滞剂 LY294002 后, LY+IRI 组与 SFN+LY 组的 p- Akt 和 p- GSK- 3 β 蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1 和图 1、2。

2.2 Western bolt 检测移植后 24 h 供体心脏心肌组织 Akt、p-Akt、GSK-3 β 及 p-GSK-3 β 蛋白表达

各组 Akt、GSK- 3 β 蛋白表达比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($F=0.076$ 和 0.120 , $P=0.971$ 和 0.946); 各组 p- Akt、p- GSK- 3 β 蛋白表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=5.881$ 和 18.064 , $P=0.020$ 和 0.001)。SFN 组与 IRI 组的 p- Akt 和

表 1 移植后 24 h 供体心脏心肌组织 Akt、p-Akt、GSK-3 β 及 p-GSK-3 β 蛋白表达比较 (IHC)
($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	Akt	p- Akt	GSK- 3 β	p- GSK- 3 β
IRI 组	4.25 \pm 0.16	5.30 \pm 0.37 ¹⁾	4.77 \pm 0.33	4.37 \pm 0.31 ¹⁾
SFN 组	4.32 \pm 0.23	7.27 \pm 0.40 ^{2,3)}	4.94 \pm 0.24	5.29 \pm 0.35 ^{2,3)}
LY+IRI 组	4.27 \pm 0.26	5.00 \pm 0.38 ¹⁾	4.95 \pm 0.21	4.47 \pm 0.22 ¹⁾
LY+SFN 组	4.27 \pm 0.16	5.25 \pm 0.36 ¹⁾	4.85 \pm 0.36	4.43 \pm 0.24 ¹⁾
F 值	0.086	48.482	0.493	12.805
P 值	0.951	0.000	0.691	0.000

注: 1) 与 SFN 组比较, $P<0.05$; 2) 与 IRI 组比较, $P<0.05$; 3) 与 LY+SFN 组比较, $P<0.05$

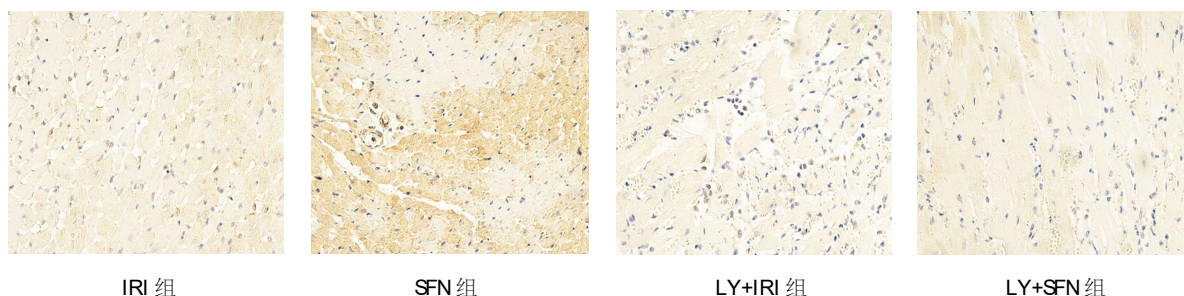


图 1 心脏移植后 24 h 各组供体心脏心肌组织 p-Akt 蛋白的表达 (IHC \times 400)

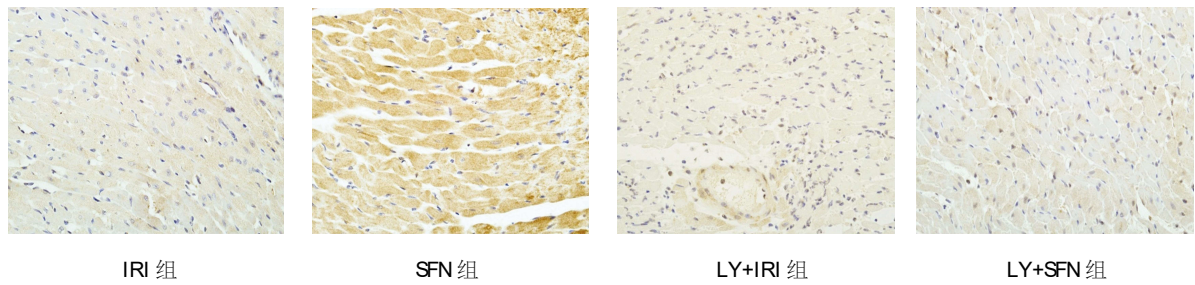


图2 心脏移植后24h各组供体心脏心肌组织p-GSK-3β蛋白的表达(IHC×400)

p-GSK-3β 蛋白表达比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。应用阻滞剂 LY294002 后,LY+IRI 组与 SFN+LY 组的 p-Akt 和 p-GSK-3β 蛋白表达比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表2和图3。

表2 移植后24h供体心脏心肌组织Akt、p-Akt、GSK-3β及p-GSK-3β蛋白表达比较(Western bolt) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	Akt	p-Akt	GSK-3β	p-GSK-3β
IRI 组	1.21± 0.05	1.00± 0.06 ¹	1.12± 0.15	0.96± 0.23 ¹
SFN 组	1.25± 0.09	1.53± 0.03 ^{2,3}	1.15± 0.16	1.75± 0.06 ^{2,3}
LY+IRI 组	1.21± 0.04	0.98± 0.08 ¹	1.16± 0.10	0.97± 0.17 ¹
LY+SFN 组	1.23± 0.09	0.98± 0.11 ¹	1.09± 0.15	0.98± 0.18 ¹
F值	0.076	5.881	0.120	18.064
P值	0.971	0.020	0.946	0.001

注:1)与SFN组比较, $P < 0.05$;2)与IRI组比较, $P < 0.05$;3)与LY+SFN组比较, $P < 0.05$

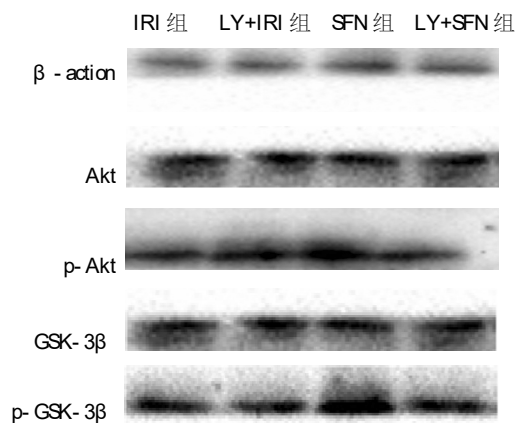


图3 心脏移植后24h供体心脏心肌组织Akt、p-Akt、GSK-3β及p-GSK-3β蛋白表达(Western bolt)

3 讨论

GSK-3β 作为细胞内 PI3K/Akt 信号通路主要的下游靶分子,属丝/苏氨酸蛋白激酶家族,GSK-3 有2种高度同源异构体(GSK-3α、GSK-3β)。

GSK-3α 主要调节肝糖原代谢;GSK-3β 主要调节骨骼肌、心脏糖原合酶的代谢。目前研究发现,GSK-3β 具有调节细胞功能、物质代谢及维持细胞骨架完整性的作用^[7-9]。对于 GSK-3β 的调节主要是通过 GSK-3β 的磷酸化、非磷酸化状态及与 GSK-3β 结合蛋白的相互作用而实现。GSK-3β 的激活主要是通过 N-末端的丝氨酸残基 Ser9 的磷酸化实现,但激活后 GSK-3β 的生物活性却明显降低甚至丧失,即磷酸化 GSK-3β 处于失活状态。GSK-3β 的激活受体多种激酶的调节,其中最主要是来自于上游 Akt 的调节^[10-11]。因此,许多对细胞存活起调节作用的因子能够通过 PI3K/Akt 信号转导通路的介导作用于 GSK-3β,使其磷酸化,从而抑制其生物学活性,最终达到促细胞生存的目的。大量研究发现,预处理、后处理及药物处理等均可通过激活 PI3K/Akt 信号通路进而使 GSK-3β 磷酸化失活,从而对 IRI 的心肌起保护作用^[10-14]。因此激活 PI3K/Akt/GSK-3β 信号转导通路将是保护 IRI 组织及细胞的新思路。根据本实验结果,SFN 可能是通过激活 Akt,失活下游靶因子 GSK-3β,从而对心肌的冷 IRI 起保护作用。因此笔者认为在心脏移植中,SFN 可能是通过激活 Akt/GSK-3β 信号通路对心肌冷 IRI 起保护作用。但 SFN 抗凋亡、抗氧化化作用的机制尚需进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] 李占清,伊雪,邬鹏宇,等. 莱菔硫烷对大鼠移植冷缺血再灌注的保护作用[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2014, 30(4): 234-237.
- [2] 王帅,伊雪,邬鹏宇,等. Sulforaphane 抗凋亡对移植大鼠心脏的保护作用[J]. 医学研究生报, 2014, 27(2): 157-159.
- [3] WU Q L, SHEN T, SHAO L L, et al. Ischemic postconditioning mediates cardioprotection via PI3K/GSK-3β/β-catenin signaling pathway in ischemic rat myocardium[J]. Shock, 2012, 38(2): 165-169.
- [4] WU N, ZHANG X, GUAN Y, et al. Hypercholesterolemia abro-

- gates the cardioprotection of ischemic postconditioning in isolated rat heart: roles of glycogen synthase kinase-3 β and the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 69(1): 123-130.
- [5] WANG Y, LI X, WANG X, et al. Ginsenoside R_d attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via Akt/GSK-3 β signaling and inhibition of the mitochondria-dependent apoptotic pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): DOI: 10.1371/journal.pone.0070956.
- [6] 伊雪, 崔翔宇, 邬鹏宇, 等. N-乙酰半胱氨酸对大鼠心脏移植缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 27(10): 1234-1239.
- [7] DOBLE B W, WOODGREET J R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(7): 1175-1186.
- [8] RAHMAN S, LI J, BOPASSA J C, et al. Phosphorylation of GSK-3 β mediates intralipid-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury[J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(2): 242-253.
- [9] ZHAI P, SCIARRETTA S, GALEOTTI J, et al. Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion[J]. *Circ Res*, 2011, 109(5): 502-511.
- [10] PARK E S, KANG J C, KANG D H, et al. 5-AIQ inhibits H₂O₂-induced apoptosis through reactive oxygen species scavenging and Akt/GSK-3 β signaling pathway in H9C2 cardiomyocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 268(1): 90-98.
- [11] ZHAI P, SADOHIMA J. Glycogen synthase kinase-3 β controls autophagy during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 138-139.
- [12] FANG N X, YAO Y T, SHI C X, et al. Attenuation of ischemia reperfusion injury by sevoflurane postconditioning involves protein kinase B and glycogen synthase kinase 3 beta activation in isolated rat hearts[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 3763-3769.
- [13] BHARTI S, GOLECHHA M, KUMARI S, et al. Akt/GSK-3 β / eNOS phosphorylation arbitrates safranal-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(6): 719-727.
- [14] JUNG I S, LEE S H, YANG M K, et al. Cardioprotective effects of the novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor KR-32560 in a perfused rat heart model of global ischemia and reperfusion: involvement of the Akt-GSK-3 β cell survival pathway and antioxidant enzyme[J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(8): 1241-1251.

(童颖丹 编辑)