

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.003

PI3K/Akt 信号通路在严重烧伤大鼠血清诱导 BMSCs 迁移中的作用*

李茂华,滕苗,果磊[△]

(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科 400016)

[摘要] **目的** 探讨严重烧伤大鼠血清对骨髓间充质干细胞(BMSCs)迁移的影响及作用机制。**方法** 建立严重烧伤大鼠模型,并制备严重烧伤大鼠血清。实验分为正常培养组(含 10%胎牛血清,C组)、烧伤血清组(含 10%烧伤大鼠血清,B组)、烧伤血清+阻断剂组(含 10%烧伤大鼠血清+终浓度为 10 μmol/L 的 PI3K 信号通路抑制剂 LY294002,B+LY 组),MTT 法检测各组细胞活性;Transwell 小室检测各组细胞迁移情况;Western blot 检测各组细胞 p-Akt、Akt 蛋白表达;免疫荧光检测各组细胞微管结构。**结果** 与 C 组比较,B 组烧伤血清处理 24 h 后,BMSCs 细胞活性增高($P<0.01$),p-Akt 水平升高($P<0.05$),细胞微管结构出现解聚,迁移数量增高($P<0.001$);加入抑制剂后,与 B 组比较,B+LY 组 BMSCs 细胞活性降低($P<0.01$),迁移数量降低($P<0.001$),p-Akt 水平降低($P<0.05$),细胞微管结构变化不明显。**结论** 严重烧伤大鼠血清可促进 BMSCs 细胞迁移,可能与烧伤血清中细胞因子激活 PI3K/Akt 信号通路相关,进而引起 BMSCs 细胞微管结构变化,促进 BMSCs 迁移。

[关键词] 烧伤;间质干细胞;微管;迁移;PI3K/Akt;信号通路

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)27-3752-04

Role of PI3K/Akt signal pathway in BMSCs migration induced by serum of rats with severely burn*

Li Maohua, Teng Miao, Guo Lei[△]

(Department of Burn and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China.)

[Abstract] **Objective** To study the effects of severely burned rats serum on migration of BMSCs and mechanism. **Methods** Severely burned rats model was established, and the preparation of severely burned rats serum. Experimental groups: normal training group (containing 10% fetal bovine serum, group C), burn serum group (containing 10% burns in the rat serum, group B), burn serum + blockers (10% burns in the rat serum + final concentration of 10 μmol/L PI3K signaling pathway inhibitor LY294002 training, group B+LY). Activity of cells was examined with MTT; migration of cells was examined with Transwell chambers testing; protein expression of p-AKT/AKT was determined with Western blot; microtubule structure of cells was examined with immunofluorescence. **Results** Compared with group C, group B burn serum treatment after 24 h, BMSCs activity ($P<0.01$), p-AKT levels ($P<0.05$), increased migration quantity ($P<0.001$); cell microtubule structures appear rupture, after adding inhibitor, compared with group B, group B+LY BMSCs activity ($P<0.01$), to reduce the number of migration ($P<0.001$), p-lower AKT ($P<0.05$), cell microtubule structure similar to the normal group. **Conclusion** Severely burned rats serum can promote BMSCs migration, may burn serum cytokine activation of PI3K/AKT signal pathway, resulting in cell microtubule structure change, promote the migration of BMSCs.

[Key words] burns; mesenchymal stem cells; microtubules; migration; PI3K/Akt; signaling pathway

严重烧伤有别于一般创伤,损伤组织。以及免疫防御系统可分泌大量炎症介质、细胞因子和烧伤毒素。烧伤后,在毛细血管通透性增加导致全身循环血量下降以前,即可发生心肌缺血缺氧损害和心功能减退,从而诱发或加重烧伤休克,即“休克心现象”^[1],加重多器官损害,是导致患者死亡的主要原因。烧伤后各脏器结构、功能损伤修复,以及烧伤创面的愈合一直是临床救治的难点。

间充质干细胞(MSCs)是来源于发育早期中胚层和外胚层的一类成体干细胞,其取材简便、来源广泛,具有自我更新、快速增殖及多向分化潜能,且能分泌多种细胞因子,调节微环境,能够向损伤组织迁移,分泌细胞因子减缓全身及局部炎症,减少受损组织细胞的凋亡,促进血管生成,激活内源性干细胞,减轻器官组织功能紊乱,提高动物模型的生存率^[2],为烧伤临床

治疗开拓新的治疗方法。研究发现将载有绿色荧光蛋白(GFP)的人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)移植在烧伤小鼠创面,hBMSCs可向血管内皮样细胞分化,促进烧伤创面愈合^[3]。但严重烧伤时,损伤组织微环境对MSCs有何种影响,目前尚不明确。吕根法等^[4]研究发现烧伤血清作用下的心肌细胞存在PI3K/Akt和p38信号通路的交叉对话,并可能对心肌细胞产生调控作用。PI3K/Akt通路是膜受体信号向细胞内转导的重要途径,可被细胞因子和理化因素激活,具有调控物质代谢、基因表达、细胞迁移、增殖和存活等多种生物学功能。研究发现在BMSCs向胶质瘤的定向迁移过程中,PI3K信号通路发挥了作用^[5]。严重烧伤血清能否激活PI3K/Akt通路,促进BMSCs向损伤组织、细胞迁移,进而促进损伤组织修复、创面愈合,目前尚未见文献报道。

* 基金项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2013jcyjA10069) 作者简介:李茂华(1989—),硕士,研究方向为创面愈合与瘢痕防治。

[△] 通讯作者, E-mail: cqguolei@sina.com.

本实验拟采用严重烧伤大鼠血清模拟严重烧伤微环境培养 BMSCs, 观察烧伤血清对 BMSCs 活性、迁移的影响, 探讨 PI3K/Akt 通路在此过程中的作用。

1 材料与与方法

1.1 细胞、主要试剂及仪器 SD 大鼠 BMSCs 细胞株及 BMSCs 细胞完全培养基(广州赛业生物科技有限公司); 胎牛血清(FBS, Gibco, USA); MTT(碧云天生物技术研究); α -tubulin 单克隆抗体(Proteintech, USA); β -actin 单克隆抗体(Proteintech, USA); Akt 单克隆抗体(Abcam, USA); p-Akt 单克隆抗体(Cell Signaling, USA); 山羊抗兔 IgG 二抗(Proteintech, USA); FITC 标记荧光二抗(Proteintech, USA); LY294002(Santa Cruz, USA); HEPA Class 100 型 CO₂ 孵箱(Thermo, USA); M88 自动酶标仪(Thermo, USA); Fusion FX7 凝胶成像分析系统(VILBER Lour MAT, French), 激光共聚焦(LSM 510 META, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 严重烧伤大鼠血清的制备 取体质量 200~280 g 的雄性 SD 大鼠 30 只(第三军医大学实验动物中心提供), 参考文献[6], 制成 40% TBSA 的 III 度烫伤模型。伤后 6 h 在无菌操作下抽取腹主动脉血, 室温凝血, 4 °C 过夜, 使血凝块尽量收缩。吸出血清, 4 °C 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 56 °C 加热 30 min 以灭活补体。上清液分装, -20 °C 冻存备用。

1.2.2 实验分组 取第 3 代生长状态良好 BMSCs, 实验随机分为: 正常培养组(C 组)、烧伤血清组(B 组)、烧伤血清+阻断剂组(B+LY 组), 待细胞融合达 80%~90% 时, 加入无血清 BMSCs 细胞基础培养基饥饿同化 24 h, C 组加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 BMSCs 培养基, B 组加入含 10% 烧伤大鼠血清的 BMSCs 培养基, B+LY 组加入抑制终浓度为 10 μ mol/L 的 PI3K 信号通路抑制剂 LY294002+含 10% 烧伤大鼠血清的 BMSCs 培养基, 作用 24 h 后进行相应检测。

1.2.3 MTT 法检测 BMSCs 细胞活性 按 1.2.2 分组处理细胞, 以 2×10^5 个/200 μ L 接种于 96 孔板, 每组 6 个复孔, 24 h 后吸去培养液, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 MTT(5 mg/mL) 20 μ L, 继续培养 4 h, 弃上清液, 加入 150 μ L 甲基亚砷(DMSO)振荡 10 min, 用自动酶标仪在 570 nm 处测定吸光值(A), 本实验重复 3 次。

1.2.4 Transwell 小室检测细胞迁移 按 1.2.2 分组处理细胞, 调整细胞浓度为 4×10^4 个/400 μ L 接种于 Transwell 小室上室中, C 组 Transwell 小室下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的 BMSCs 细胞培养基, B 组下室内加入 600 μ L 含 10% 烧伤大鼠

血清的 BMSCs 细胞培养基, B+LY 组在 Transwell 上室加入抑制终浓度为 10 μ mol/L 的 PI3K 信号通路抑制剂 LY294002, 下室内加入 600 μ L 含 10% 烧伤大鼠血清的 BMSCs 细胞培养基, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱继续培养。24 h 后取出 Transwell 小室, 将上室培养基吸尽, 用棉签擦拭上室中的细胞, PBS 清洗 1 次, 并将小室置于 4% 多聚甲醛中室温固定 20 min, PBS 清洗 1 次, 结晶紫染色 30 min, PBS 清洗, 显微镜下观察小室半透膜下表面细胞并计数, 每组按照上下左右中随机选取 5 个视野, 取 5 个视野细胞总数的均数进行统计分析, 以迁移至小室半透膜下表面细胞个数的均数表示细胞的迁移能力。

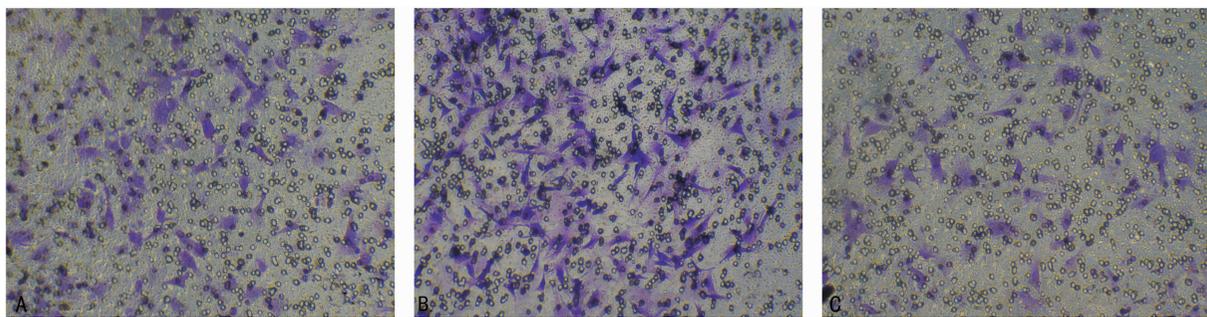
1.2.5 Western blot 检测 Akt、p-Akt 蛋白的表达 按 1.2.2 分组处理细胞, 收集细胞进行离心沉淀, 按总蛋白提取试剂盒说明书提供的方法提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μ g/孔蛋白进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 5% BSA 室温封闭 2 h, 分别加入 Akt(1:500)、p-Akt(1:500)抗体, 4 °C 过夜; 次日, TBST 洗膜 3 次, 加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔二抗, 37 °C 孵育 2 h, 化学发光、显影, 凝胶成像仪获取图像, Image J 软件进行灰度分析, 结果以 p-Akt 与 Akt 灰度值比值表示。本实验重复 3 次。

1.2.6 免疫荧光染色观察细胞微管结构 按 1.2.2 分组处理细胞, 以 1×10^5 个/mL 密度接种于无菌玻片的 24 孔板中, 24 h 后, 用 4% 的多聚甲醛室温固定细胞爬片 30 min, 0.1% Triton X-100 破膜 20 min, 5% 山羊血清 37 °C 封闭 30 min, 滴加兔抗大鼠的 α -tubulin 单克隆抗体(1:100), 4 °C 过夜; 滴加兔抗大鼠的 α -tubulin 单克隆抗体(1:100), 4 °C 过夜; 滴加荧光二抗(1:100), 37 °C 避光孵育 1 h, 滴加 DAPI(1:100), 37 °C 避光孵育 5 min, 抗荧光淬灭剂封片, 每步操作前均要用 PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min, 但血清封闭后不洗, 直接加一抗。激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对实验结果进行单因素方差分析, 组间比较用 LSD-*q* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测 BMSCs 活性 C 组、B 组、B+LY 组细胞活性分别为 1.76 ± 0.09 、 1.93 ± 0.06 、 1.57 ± 0.2 ($F=9.10$, $P<0.01$)。与 C 组比较, B 组细胞增多, 活性增高 ($t=3.50$, $P<0.01$); 加入抑制剂后, B+LY 组细胞活性较 B 组降低 ($t=3.80$, $P<0.01$)。



A: C 组; B: B 组; C: B+LY 组。

图 1 3 组 BMSCs 细胞迁移情况 ($\times 100$)

2.2 Transwell 小室检测细胞迁移 与 C 组比较, B 组每 100 倍视野下迁移至小室半透膜下表面的细胞增多 ($t=7.14, P<0.01$), B+LY 组迁移至小室半透膜下表面的细胞数量较 B 组明显减少 ($t=9.13, P<0.01$)。见图 1、表 1。

表 1 3 组 BMSCs 细胞迁移数比较 ($\bar{x}\pm s$, 个)

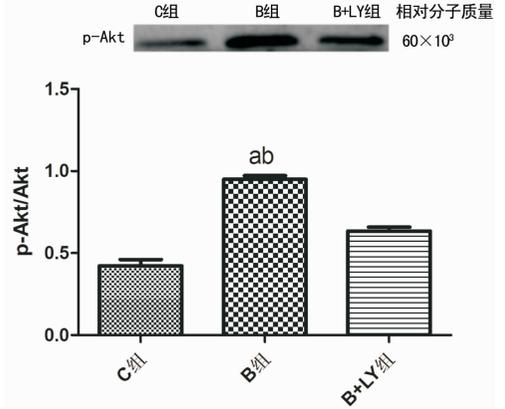
组别	样本数(n)	细胞迁移数
C 组	15	106.0±10.8
B 组	15	158.8±12.5 ^{ab}
B+LY 组	15	84.8±13.1
F		48.96
P		<0.01

^a: $P<0.01$, 与 C 组比较; ^b: $P<0.01$, 与 B+LY 组比较。

2.3 Western blot 检测 Akt、p-Akt 蛋白的表达 24 h 后, 各组 p-Akt/Akt 比值分别为 0.42 ± 0.04 、 0.95 ± 0.02 、 0.63 ± 0.02 , B 组细胞 Akt 磷酸化水平较 C 组增高 ($t=20.29, P<0.01$), 加入抑制剂后, B+LY 组细胞 Akt 磷酸化水平较 B 组

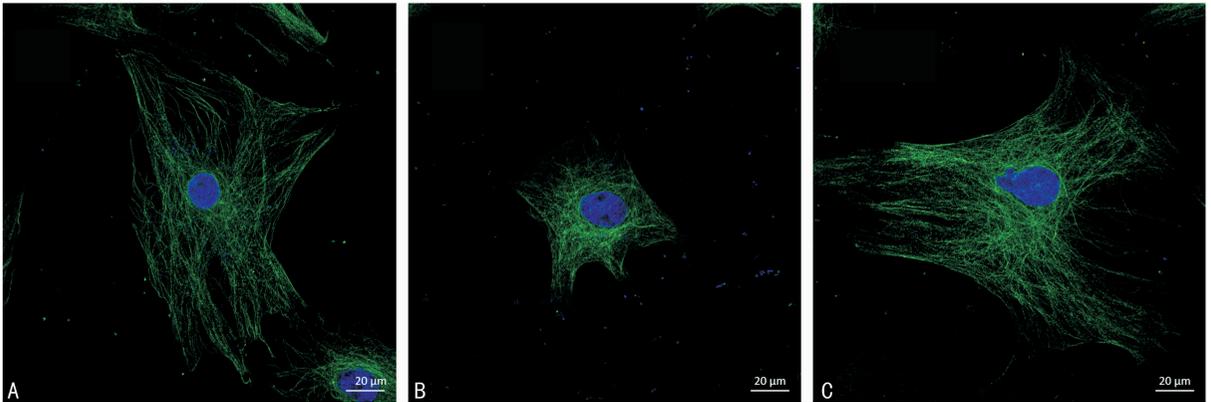
降低 ($t=16.68, P<0.01$), 见图 2。

2.4 免疫荧光染色观察细胞微管结构 C 组细胞微管以胞核为中心向四周呈放射状分布, B 组细胞微管出现解裂增多, 排列紊乱, B+LY 组微管结构与 C 组相似, 见图 3。



^a: $P<0.05$, 与 C 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 B+LY 组比较。

图 2 3 组 BMSCs 细胞 Akt 活化状态



A: C 组; B: B 组; C: B+LY 组。

图 3 3 组 BMSCs 细胞微管的分布及形态变化

3 讨论

严重烧伤后引起的脏器损害和功能下降, 特别是烧伤合并多器官功能障碍综合征, 是导致患者死亡的主要原因, 烧伤后各脏器结构和功能损伤的确切机制仍不完全明了, 严重烧伤一直是困扰医学界的难题。近年, 干细胞与组织工程学的飞速发展, 为大面积烧(创)伤的修复开辟了新的途径。目前已有研究表明 MSCs 可促进烧伤创面愈合, 胡克苏等^[7]将人脐带间充质干细胞(UC-MSCs)移植修复烧伤皮肤, 研究发现 UC-MSCs 移植治疗可能通过抑制皮损局部炎症反应, 减少淋巴细胞的浸润, 促进血管的再生和成纤维细胞的生长促进损伤皮肤的修复。此外, 研究将 BMSCs 移植到严重烧伤大鼠体内, 研究发现移植后 BMSCs 能够向受损肝组织定植, 对烧伤引起的肝损伤有明显的修复作用, 其机制可能与抑制细胞凋亡有关^[8]。MSCs 移植后, 其定向迁移至受损部位是其发挥作用的前提, 损伤组织分泌细胞黏附因子、趋化因子和生长因子等相互调节, 可影响 MSCs 的黏附、迁移。烧伤后患者血清中含有集落刺激因子、转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素生长因子-1(IGF-1)、表皮生长因子(EGF)等。

严重烧伤患者血清可显著刺激人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)快速增殖, 不引起细胞凋亡, 能减少细胞衰老^[9]。但严重烧伤血清能否促进 MSCs 迁移尚不清楚。

PI3K/Akt 信号通路最早被发现在胰岛素刺激及其应答的调控中起重要作用。随着研究的深入和下游底物的不断发现, PI3K/Akt 信号通路作为一条非常重要的细胞内信号转导通路被人们所认识。Akt 是 PI3K 信号通路的直接下游效应分子, PI3K 可被 PDGF、IGF、胰岛素、成纤维生长因子(FGF)、重组人 EGF、骨形态发生蛋白 2(BMP-2)等细胞因子与其受体结合而激活, 活化的 Akt 通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad^[10]、mTOR^[11]、Caspase9、NF- κ B、GSK-3、FKHR、p21Cip1 和 p27 Kip1 等, 进而调节细胞的增殖、分化、凋亡, 以及迁移等^[12]。研究发现, 用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 和 Wortmannin 可减弱 SDF-1 α 和 bFGF 诱导的 MSCs 迁移^[13-14]。

本实验以严重烧伤血清处理 BMSCs 模拟体内严重烧伤环境, 实验结果表明, 烧伤血清处理 24 h 后, BMSCs 细胞活力、细胞迁移数量较正常培养组增高, 且 p-Akt 水平增高, 表明严重烧伤血清可促进 BMSCs 细胞迁移, 且可激活 PI3K/Akt

信号通路。为进一步证实烧伤血清诱导 PI3K/Akt 信号通路活化是否参与 BMSCs 细胞的迁移,加入 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 后,BMSCs 细胞迁移能力明显受抑,表明严重烧伤血清可促进 BMSCs 细胞迁移,可能与其激活 PI3K/Akt 信号通路相关。此外,本实验还发现严重烧伤血清处理 BMSCs 后,BMSCs 细胞微管结构解聚/聚合动态失衡,发生解聚,同时细胞迁移能力增强,但用 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 作用后 BMSCs 细胞微管结构与正常培养组相似,且细胞迁移能力减弱,说明严重烧伤血清可能激活 BMSCs 细胞 PI3K/Akt 信号通路,进而影响细胞微管结构发生变化,使细胞骨架解聚/聚合的动态平衡被打破,朝解聚方向移动,以利于细胞迁移。

有研究表明,细胞迁移需要微管介导的细胞体的收缩、伸展等一系列过程,缺氧可使表皮细胞微管动力学发生变化,增强细胞迁移能力^[15]。PI3K/Akt 信号通路可影响许多细胞结构,特别是肿瘤细胞。核糖体蛋白 S6 激酶 [p70(S6K)] 是 PI3K/Akt 信号通路下游信号分子,p70(S6K)可通过肌动蛋白纤维交联蛋白调节细胞骨架动力学。过表达 p70(S6K)可促进卵巢癌细胞定向迁移^[16]。p70(S6K)可快速激活 Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1、细胞分裂周期蛋白 42 以及他们下游信号分子 p21 小 GTP 酶活化激酶 1^[16]。抑制 p70(S6K)可导致其下游蛋白表达下调及肌动蛋白骨架结构重组。但在严重烧伤环境下,严重烧伤血清中哪些物质激活 PI3K/Akt 信号通路,通过调控细胞微管骨架结构变化,进而促进细胞迁移能力的具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Huang YS, Jiaping Z, Xiaohui L. A serial studies on post-burn shock heart[J]. Burns, 2007, 33(Suppl 1): S14-S15.
- [2] Wannemuehler TJ, Manukyan MC, Brewster BD, et al. Advances in mesenchymal stem cell research in sepsis [J]. J Surg Res, 2012, 173(1): 113-126.
- [3] Xue L, Xu YB, Xie JL, et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(7): 1327-1336.
- [4] 吕根法, 陈璧, 张万福, 等. 烧伤血清作用下心肌细胞蛋白激酶 B 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路的交叉对话研究 [J]. 中华烧伤杂志, 2008, 24(4): 263-267.
- [5] 胡宜, 程鹏, 刘云会. 磷脂酰肌醇-3-激酶信号通路在骨髓间充质干细胞向胶质瘤定向迁移中的作用 [J]. 广东医学, 2014, 52(35): 507-510.
- [6] 郑军, 黄跃生, 黄晓元, 等. 反义 p38 α 基因转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞炎性因子的表达 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(23): 2097-2101.
- [7] 胡克苏, 祁俊, 蔡玉辉, 等. 人脐带间充质干细胞移植修复烧伤皮肤的机制 [J]. 江苏医药, 2014, 40(8): 759-761.
- [8] 陈浩, 尹飞, 孟春阳, 等. 骨髓间充质干细胞移植对严重烧伤大鼠肝损伤的修复作用及其机制 [J]. 吉林大学学报, 2014, 40(2): 219-223.
- [9] 刘玲英, 柴家科, 侯玉森, 等. 严重烧伤患者血清对人脐带 MSCs 生物学特性的影响 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2013, 27(7): 769-774.
- [10] Del Peso L, González-García M, Page C, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt [J]. Science, 1997, 278(5338): 687-689.
- [11] Agani F, Jiang BH. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(3): 245-251.
- [12] Misra UK, Pizzo SV. Activation of Akt/PDK signaling in macrophages upon binding of receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin to its cellular receptor: effect of silencing the CREB gene [J]. J Cell Biochem, 2004, 93(5): 1020-1032.
- [13] Liu H, Xue W, Ge G, et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 401(4): 509-515.
- [14] Rosova L, Dao M, Capoccia B, et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2008, 26(8): 2173-2182.
- [15] Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, et al. Oxygen in acute and chronic wound healing [J]. Br J Dermatol, 2010, 163(2): 257-268.
- [16] Ip CK, Cheung AN, Ngan HY, et al. p70 S6 kinase in the control of actin cytoskeleton dynamics and directed migration of ovarian cancer cells [J]. Oncogene, 2011, 30(21): 2420-2432.

(收稿日期: 2015-03-07 修回日期: 2015-06-13)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。