

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.29.002

PI3K/Akt 信号通路在转录水平调控 VCAM-1 表达*

贾圣男¹, 史家欣², 李小民^{1△}, 陈晓兵¹

(徐州医学院附属连云港医院:1. 急诊内科;2. 呼吸内科, 江苏连云港 222000)

[摘要] **目的** 探讨 PI3K/Akt 信号通路是否调控脂多糖诱导的人内皮细胞 VCAM-1 表达及机制。**方法** 脂多糖(LPS)10 μg/mL 刺激人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)0、6、12、24 h, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 VCAM-1 蛋白表达, 刺激 0、4、8、12 h 行 RT-PCR 检测 VCAM-1 mRNA; LPS(10 μg/mL, 后同)刺激 HUVEC 0、30、60、120 min 后, Western blot 检测 PI3K(磷脂酰肌醇-3 激酶)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、Akt、磷酸化 Akt(p-Akt)表达; PI3K 抑制剂 LY294002(10、50 μmol/L)、Akt 抑制剂 A6730(2、10 μmol/L)预处理细胞 1 h 后 LPS 刺激 12 h, Western blot 检测 VCAM-1 蛋白表达, 刺激 8 h 行 RT-PCR 检测 VCAM-1 mRNA; 加或不加抑制剂, LPS 刺激 8 h 加入放线菌素 D 抑制转录, 于 0、1、2、3、4 h 收细胞行 RT-PCR 检测 VCAM-1 mRNA, 计算 mRNA 半衰期。**结果** LPS 刺激 HUVEC(6、12、24 h)后 VCAM-1 蛋白表达增加($P < 0.05$), 12 h 达峰值, VCAM-1 mRNA 在刺激后也增加($P < 0.05$), 8 h 达峰值; LPS 刺激 HUVEC 后 p-PI3K、p-Akt 增加, p-PI3K 在刺激 30 min 达峰值($P < 0.05$), 以后逐渐下降, 120 min 与 0 h 接近($P > 0.05$), p-Akt 在刺激 30 min 明显增加, 60 min 达峰值, 120 min 仍高于 0 h($P < 0.05$); LY294002 下调了 p-Akt 表达($P < 0.05$), 同时降低 VCAM-1 蛋白、mRNA 合成($P < 0.05$); Akt 抑制剂也抑制 VCAM-1 蛋白、mRNA($P < 0.05$); PI3K、Akt 抑制剂均不影响 VCAM-1 mRNA 稳定性($P > 0.05$)。**结论** PI3K/Akt 信号途径在转录水平调控 VCAM-1 表达。

[关键词] PI3K/Akt 信号通路; 脂多糖; 人脐静脉血管内皮细胞; 血管细胞黏附分子**[中图分类号]** R392.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)29-4036-05

PI3K/Akt signaling pathway regulates VCAM-1 expression at the transcriptional level*

Jia Shengnan¹, Shi Jiaxin², Li Xiaoming^{1△}, Chen Xiaobing¹

(1. Department of Emergency Medicine; 2. Department of Respiratory Medicine, Lianyungang Hospital

Affiliated to Xuzhou Medical University, Lianyungang, Jiangsu 222000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of PI3K/Akt signaling pathway on lps induced vascular cellular adhesive molecular 1(VCAM-1) expression and its mechanism. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were treated with lipopolysaccharides(10 μg/mL) for 0, 6, 12, 24 h, the production of VCAM-1 protein was assessed by Western blot. HUVECs were incubated with LPS for 0, 4, 6, 8 h for the detection of VCAM-1 mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). HUVECs were incubated with LPS for 0, 30, 60, 120 min, the protein expression of PI3K, phospho-PI3K(p-PI3K), Akt and phospho-Akt(p-Akt) was assessed by Western blot. HUVECs were pretreated with different concentrations of PI3K inhibitor LY294002(10, 50 μmol/L) or Akt inhibitor A6730(2, 10 μmol/L) for 1 h, then they were incubated with LPS for 12 h, the effect of PI3K on VCAM-1 protein was detected by Western blot. The effect of PI3K inhibitor(10, 50 μmol/L) or Akt inhibitor(2, 10 μmol/L) on the mRNA expression of VCAM-1 was measured by RT-PCR. HUVECs were pretreated with or without LY294002(A6730) for 1 hour, incubated with LPS for 8 h, and then incubated with ActD 5 μg/mL for 0, 1, 2, 3, 4 h, collected the cells for the measure of VCAM-1 mRNA by RT-PCR, calculate the half-life of mRNA. **Results** The expression of VCAM-1 protein was significantly increased in LPS stimulated groups(6, 12, 24 h)(all $P < 0.05$), and the peak effect was observed at 12 h. The VCAM-1 mRNA levels also increased evidently after LPS incubation(all $P < 0.05$) and peaked at 8 h. LPS significantly induced p-PI3K and p-Akt, they peaked at 30 min($P < 0.05$) or 60 min ($P < 0.05$) respectively, at 120 min was higher than at 0 h($P < 0.05$). LY294002 reduced p-Akt(all $P < 0.05$) and VCAM-1(all $P < 0.05$) at protein and mRNA levels. A6730 also decreased VCAM-1 protein and mRNA(all $P < 0.05$). LY294002 and A6730 didn't affect mRNA half-life of VCAM-1(all $P > 0.05$). **Conclusion** The PI3K/Akt signaling pathway could transcriptionally regulates lps-induced vascular cellular adhesive molecular expression.

[Key words] PI3K/Akt signal pathway; lipopolysaccharides; human umbilical vein endothelial cells; vascular cellular adhesive molecular 1

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征, 按病情严重程度可分为脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克, 临床表现为器官功能障碍和(或)液体治疗无法逆转的低血压^[1]。随着人口

的老龄化、肿瘤发病率的上升, 由慢性阻塞性肺疾病、肺炎及恶病质引起的脓毒症发病率在不断升高, 每年全球新增数百万脓毒症患者, 其中, 超过 1/4 的患者死亡^[2]。革兰阴性细菌胞壁

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81300052); 中国博士后科学基金(2015M570420); 江苏省卫生和计划生育委员会资助课题(H201558); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20130402); 连云港科技局资助项目(SH1401)。 作者简介: 贾圣男(1989-), 硕士, 主要从事脓毒症炎症器官功能衰竭的基础及临床研究。 △ 通讯作者, Tel: 13775491099; E-mail: lyglxin@163.com。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是其主要致病成分。LPS 通过与细胞表面 Toll 样受体(TLR)相关受体结合,激活丝裂原激活蛋白激酶(MAPKs)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)一系列信号转导分子及转录因子,最终促进炎症因子白细胞介素(IL)-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 等的表达^[3-4]。而循环中的 LPS 还可诱导内皮细胞表达 VCAM-1, VCAM-1 不仅能够调节钙黏素黏附功能、内皮屏障功能及血管的通透性^[5],还可以介导中性粒细胞的聚集、浸润,到达炎症局部清除病原体,以及进一步激活免疫细胞释放炎症介质,促进炎症因子大量释放,导致炎症的级联放大^[6]。而 PI3K/Akt 信号通路是否能够调控 VCAM-1 的表达尚不完全清楚。因此,本研究拟探讨炎性刺激 LPS 作用于人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)后是否通过 PI3K/Akt(蛋白激酶 B)调控 VCAM-1 表达,来进一步研究其调节机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 HUVEC(中国科学院上海细胞所),RPMI1640 培养基(凯基,中国),胎牛血清(维森特,南美),LPS(Sigma, L4391),PI3K(P85)、Akt、Akt 磷酸化蛋白(ser473)、LY294002 均购自美国 CST 公司,PI3K 磷酸化蛋白(p-p85)(Abcam,美国),PI3K 抑制剂 LY294002、Akt 特异性抑制剂 A6730 均购自 Sigma 公司, β -actin 抗体(碧云天,中国),VCAM-1 抗体(武汉三鹰,中国),Primescript RT reagent Kit With gDNA Eraser (TAKARA,RR047A),PCR master mix(捷瑞,中国),BCIP/NBT 显色试剂盒、配胶试剂盒、蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂均购自中国碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 内皮细胞的培养 RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素),在 5% CO₂、37 °C 条件的培养箱中培养 HUVEC,胰酶消化法传代、冻存细胞,实验用第 2~6 代,倒置相差显微镜观察细胞的形态。

1.2.2 细胞培养与实验分组 取生长状态良好,传代 3~6 代,一定程度融合的细胞进行实验。实验分组为正常对照组(正常培养液孵育)、LPS 组(完全培养基中加入 10 μ g/mL LPS 孵育,作用 6、12、24 h)、PI3K 抑制剂组(不同浓度 LY294002 预处理 1 h,加入 LPS 刺激 8、12 h)、Akt 抑制剂组(不同浓度 A6730 预处理 1 h,LPS 作用 8、12 h)、放线菌素 D(ActD)对照组(LPS 刺激 8 h,加入 ActD,作用 0、1、2、3、4 h)、PI3K 抑制剂 + ActD 组(10 μ mol/L LY294002 预处理 1 h,LPS 刺激 8 h,加入 ActD,作用 0、1、2、3、4 h)、Akt 抑制剂 + ActD 组(2 μ mol/L A6730 预处理 1 h,LPS 刺激 8 h,加入 ActD,作用 0、1、2、3、4 h),分别收集各组细胞用于检测。

1.2.3 Western blot 检测 VCAM-1、PI3K、Akt、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、磷酸化 Akt(p-Akt)的表达 将 HUVEC 细胞用冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 遍,细胞刮刮下,1.0 mL PBS 悬浮,收集于 1.5 mL EP 管中,2 000 r/min,弃上清液,根据沉淀量加入含 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液,剧烈震荡 1 min,冰上放置 10 min,如此重复 3 次。待细胞充分裂解后,在 12 000 r/min,4 °C 条件下离心 15 min,分离出总蛋白后用 BCA 法测定蛋白浓度。按体积加入蛋白上样缓冲液,混匀后用沸水煮 10 min。按每孔 50 μ g 总蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,半干法转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别于 1:100 人源的 VCAM-1 单克隆抗体、1:1 000 人源 PI3K(p85)抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体,1:500 人源 p-PI3K 抗体和 1:3 000 人源 β -ac-

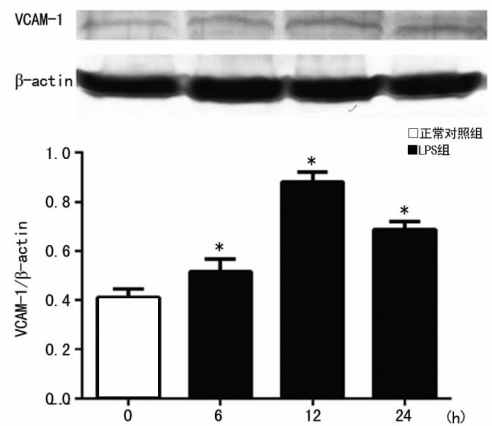
tin 抗体中 4 °C 过夜,洗膜,再以 1:500 稀释的 AP 标记的山羊抗兔孵育 2 h,BCIP/NBT 法显色。各目的蛋白的表达量用蛋白的 A 值与 β -actin 的 A 值的比值半定量表示,Image J 图像分析系统进行分析。

1.2.4 RT-PCR 检测 VCAM-1 mRNA 的表达 Trizol 试剂提取各组总 RNA,测定 RNA 浓度,取 2 μ g,应用 Primescript RT reagent Kit With gDNA Eraser 进行逆转录,按照 PCR master mix 试剂说明进行逆转录扩增,PCR 所用的引物由上海生物工程技术有限公司合成。VCAM-1 mRNA:上游引物 5'-CCC TTG ACC GGC TGG AGA TT-3',下游引物 5'-TGG GGG CAA CAT TGA CAT AAA GTG-3';GAPDH mRNA:上游引物 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3',下游引物 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。RT-PCR 的反应条件:预变性 94 °C 1 min,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s 循环 35 次,得到 cDNA 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,将电泳后的凝胶置于凝胶成像系统下拍照,利用 Image J 软件分析 DNA 条带灰度,目的 RNA 相对表达量 = 目的条带灰度值/内参条带灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计分析软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 诱导人脐静脉血管内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达 LPS 组刺激 HUVEC 6、12、24 h 后 VCAM-1 表达明显升高,在刺激 12 h 达高峰,随后下降,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



*: $P < 0.05$,与正常对照组比较。

图 1 LPS 刺激 HUVEC 后 VCAM-1 蛋白表达

2.2 LPS 刺激 HUVEC 后激活 PI3K/Akt 信号分子 LPS 刺激 HUVEC 30、60、120 min,PI3K、Akt 总蛋白与正常对照组比较均差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2A、2B。p-PI3K 在 30 min 明显高于正常对照组($P < 0.05$),60 min 较前降低,但仍高于正常对照组($P < 0.05$),120 min 与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2C。p-Akt 在细胞刺激 30 min 明显增多,60 min 进一步增加,120 min 下降,但仍高于正常对照组($P < 0.05$),见图 2D。

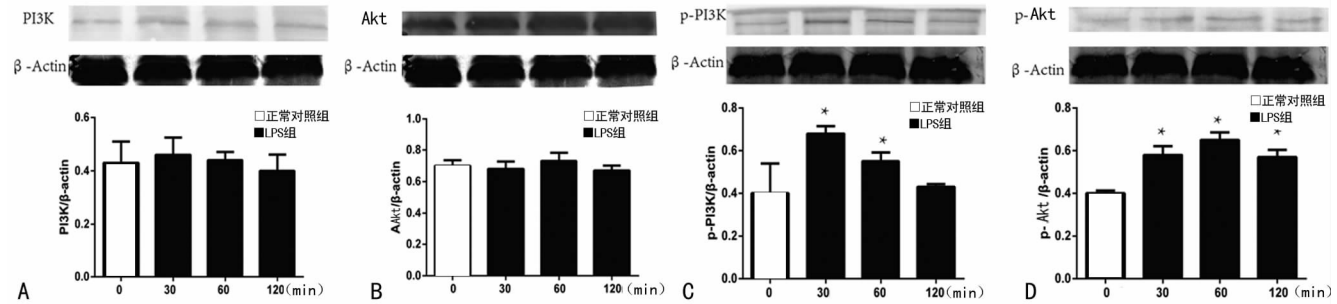
2.3 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制 p-Akt、VCAM-1 蛋白表达, Akt 抑制剂 A6730 抑制 VCAM-1 蛋白合成 LY294002 不同浓度(10、50 μ mol/L)均明显降低 p-Akt 表达,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且 50 μ mol/L LY294002 明显低于 10 μ mol/L LY294002,见图 3A。同时 LY294002(10、

50 $\mu\text{mol/L}$ 、A6730(2,10 $\mu\text{mol/L}$)均可减少炎症因子 VCAM-1 合成,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),加入高浓度抑制剂 VCAM-1 蛋白水平明显低于低浓度抑制剂($P < 0.05$),见图 3B,3C。

2.4 LPS 刺激及 PI3K 抑制剂 LY294002、Akt 抑制剂 A6730 对 HUVEC 表达 LPS 刺激 HUVEC 4、8、12 h,4 h 后 VCAM-1 mRNA 明显增多,8 h 达高峰,12 h 较前下降,但仍高于正常对照组($P < 0.05$),见图 4A。LY294002(10,50 $\mu\text{mol/L}$)减低 VCAM-1 mRNA 合成,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);加入 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 的 VCAM-1 mRNA 明显低于 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002($P < 0.05$),见图 4B。

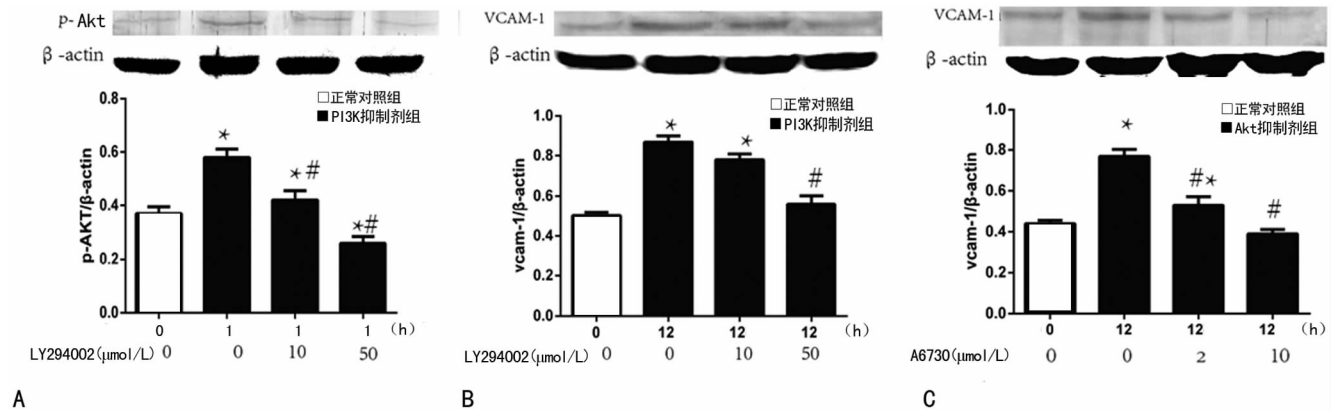
A6730(2,10 $\mu\text{mol/L}$)可明显降低 LPS 刺激的 HUVEC 表达 VCAM-1 mRNA,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);加入 2 $\mu\text{mol/L}$ A6730 的 VCAM-1 mRNA 含量明显高于 10 $\mu\text{mol/L}$ A6730($P < 0.05$)。

2.5 PI3K、Akt 对 VCAM-1 mRNA 稳定性的影响 设定 0 h 量为 100%,其他时间点值为与 0 h 的比值,应用 GraphPad Prism 软件 one phase decay 程序测定不同处理组之间 mRNA 的半衰期,结果发现 PI3K 抑制剂组、Akt 抑制剂组 VCAM-1 的半衰期分别为 160、157 min,与正常对照组(169 min)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 5D、5E。



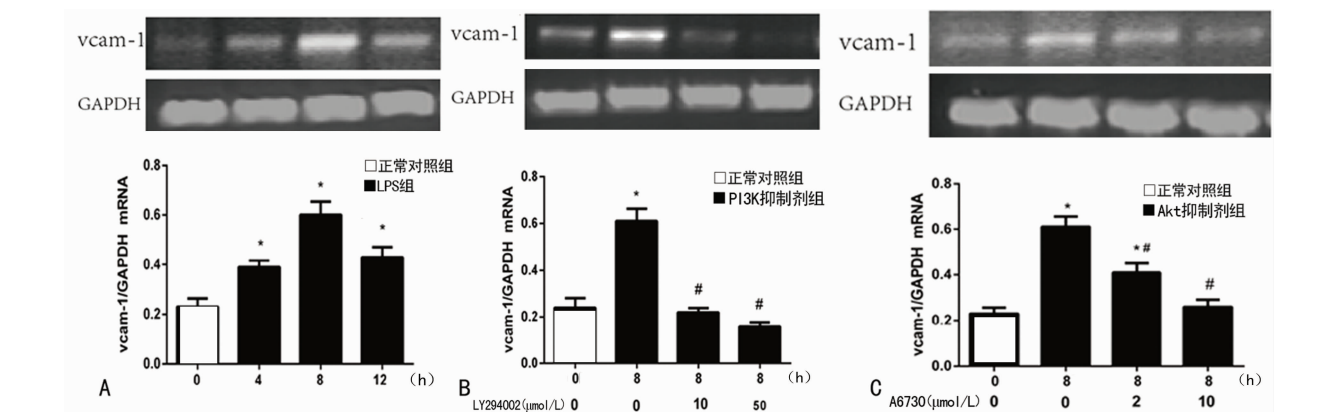
A:PI3K 总蛋白的表达;B:Akt 总蛋白的表达;C:p-PI3K 变化;D:p-Akt 变化;*: $P < 0.05$,与正常对照组比较。

图 2 LPS 刺激 HUVEC 后激活 PI3K/Akt 信号分子



A:p-Akt 表达变化 0 h 无 LPS 刺激,1 h 为 LPS 刺激 1 h,LY294002 10、50 $\mu\text{mol/L}$ 为不同浓度 LY294002 预处理 1 h 后 LPS 刺激 1 h;B:VCAM-1 蛋白表达变化。0 h 无 LPS 刺激,12 h 为 LPS 刺激 12 h,LY294002 10、50 $\mu\text{mol/L}$ 为不同浓度 LY294002 预处理 1 h 后 LPS 刺激 12 h;C:Akt 抑制剂 A6730 对 VCAM-1 表达的影响,处理方式同 B;*: $P < 0.05$,与正常对照组比较;#: $P < 0.05$,与 LPS 刺激 12 h 比较。

图 3 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制 p-Akt、VCAM-1 蛋白表达



A:RT-PCR 检测 VCAM-1 mRNA;B:10、50 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度 LY294002 预处理 1 h 后 LPS 刺激 8 h,RT-PCR 测 VCAM-1 mRNA 的变化;C:Akt 抑制剂 A6730 对 VCAM-1 mRNA 的影响;*: $P < 0.05$,与正常对照组比较;#: $P < 0.05$,与 LPS 刺激 8 h 比较。

图 4 LPS 刺激 HUVEC 不同时间及加入 PI3K 抑制剂、Akt 抑制剂后 VCAM-1 mRNA 的变化

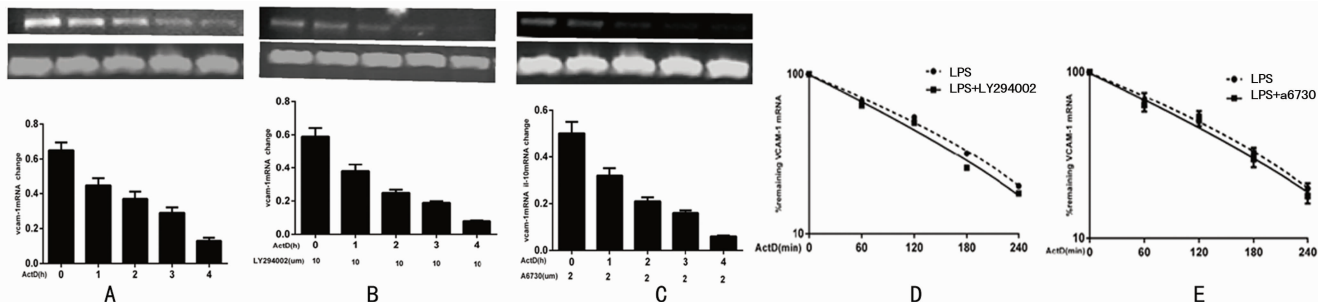


图 5 PI3K、Akt 对 VCAM-1 mRNA 稳定性的影响

A: LPS 刺激 8 h 加入 ActD (ActD 5 μg/mL) 于 0、1、2、3、4 h 收集细胞, RT-PCR 检查; B: PI3K 抑制剂对 VCAM-1 mRNA 稳定性的影响 LY294002 (10 μmol/L) 预处理 1 h 后 LPS 刺激 8 h, 后续处理同上; C: Akt 抑制剂对 VCAM-1 mRNA 稳定性的影响 A6730 (2 μmol/L) 预处理 1 h 后 LPS 刺激 8 h, 后续过程同 A; D、E: 利用 GraphPad 计算出的不同处理条件下 VCAM-1 mRNA 的半衰期。

3 讨论

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征, 机体过度放大的炎症反应是脓毒症的本质, 其主要致病成分 LPS 迅速大量激活免疫细胞, 激活 MAPKs、PI3K/Akt 信号转导通路, 合成 IL-6、IL-8、IL-12 等炎症因子, 最终过度增多的炎症因子对机体造成损害^[3-4]。而 PI3K/Akt 信号分子作为细胞质内一组脂质激酶, 在相关外部刺激激活跨膜受体后, 胞内区可募集 PI3K 至胞膜, 活化后的 PI3K 将磷脂酰肌醇-2-磷酸(PIP2)磷酸化形成磷脂酰肌醇-3-磷酸(PIP3), PIP3 作为第二信使活化下游蛋白激酶 B (PKB/Akt)、磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶 (PDK1)^[7]、Akt、PDK1 进一步活化糖原合成激酶-3 (GSK3)、哺乳动物雷帕霉素靶向的复合物 (mTOR) 下游分子^[8], 最终激活 NF-κB、AP-1、Nrf、STAT 等转录启动子, 促进大量合成炎症因子^[9]。而循环中的 LPS 也可诱导内皮细胞表达 IL-6、IL-8、MCP-1、VCAM-1 等一系列炎性介质^[10], 其中, VCAM-1 不仅介导中性粒细胞的聚集、浸润, 到达炎症局部清除病原体, 还可以进一步激活免疫细胞释放炎性介质, 导致炎症的级联放大^[6]。而信号途径 PI3K/Akt 是否可以调控 HUVEC 中 LPS 诱导的 VCAM-1 表达尚不完全清楚。笔者应用 LPS 刺激培养的人脐静脉血管内皮细胞株发现, LPS 刺激 HUVEC 后可激活 PI3K、Akt 信号分子, 诱导 p-PI3K、p-Akt 迅速增多, 并且也可以增加 VCAM-1 表达一直到刺激 24 h。可见在 HUVEC, 脓毒症刺激时也可激活 PI3K、Akt 信号分子, 并上调促炎介质 VCAM-1 表达。

在单核巨噬细胞株 THP-1 中, LPS 刺激可激活 PI3K、Akt, p-PI3K、p-Akt 表达增多, 伴炎性因子 IL-6、IL-10、IL-12 表达增多, 应用 PI3K、Akt 抑制剂后炎症因子表达下调^[11]。因此, 笔者认为 PI3K/Akt 可调节上述炎症因子的合成。同时, 本实验中笔者应用 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制 PI3K 活性后不仅降低了 LPS 诱导的 p-Akt 蛋白的增加, 还可以抑制 VCAM-1 蛋白的表达, 进一步应用 Akt 抑制剂发现也降低了 LPS 诱导的 VCAM-1 蛋白增加, 这就证明了 HUVEC 与 THP-1 细胞拥有同样的信号转导途径调控炎症介质的表达。为进一步明确 VCAM-1 基因水平的变化, 在 LPS 刺激 HUVEC 不同时间及 PI3K、Akt 抑制剂应用后行 VCAM-1 RT-PCR, 结果显示 PI3K/Akt 同样调控 VCAM-1 mRNA 表达, 这与上述蛋白测定的结果是一致的。

机体有效适度的免疫应答, 是外部因素刺激机体后, 免疫系统迅速大量合成炎症因子清除病原体, 而后免疫调节降低炎症因子的合成, 保持炎症反应的平衡^[12]。炎症因子的调节包括转录及转录后调节, 转录调节是通过调节基因状态、转录子、

增强子等调节由 DNA 合成 RNA 的过程, 转录后调节是在 RNA 合成后, 通过 5' 或者 3' 非转录区相关序列与 RNA 结合蛋白结合, 对 RNA 进行可变剪接、盖帽、加多聚 A 尾、调节 RNA 稳定性等一系列过程, 最终到达翻译成为蛋白^[13-14]。机体免疫系统被激活后, 不仅依靠转录调节方式迅速增加炎症因子合成, 还会以转录后调节方式调控信使 RNA 稳定性, 迅速调控炎症因子蛋白的合成增多或减少。而基因 3' 非翻译区的富含 AU 的序列 (ARE) 即 “AUUUA” 序列调节, 与相关 RNA 结合蛋白结合后调节 mRNA 的稳定性是一种常见转录后调节形式, 如 HuR、HuD 与之结合并增加 mRNA 稳定性, 而 TTP、AUF1 与之结合后加速了 mRNA 降解, 缩短 mRNA 半衰期^[15]。ARE 序列的转录后调节在炎症因子的调节中发挥重要作用, 在人和大鼠骨髓源性的巨噬细胞中发现, AUF1 可加速 LPS 诱导的 IL-6、IL-10、TNF mRNA 降解, 减少炎症因子蛋白表达。因此, 笔者检索 PUBMED 基因库, 发现在人 VCAM-1 基因 3' 非转录区含 2 个 “AUUUA” 序列, 而 PI3K/Akt 是否可以通过 ARE 依赖的转录后调节机制调控 VCAM-1 表达尚不明确, 笔者进一步在实验中测定对照组、PI3K 抑制剂组及 Akt 抑制剂组 VCAM-1 mRNA 半衰期, 结果发现 PI3K、Akt 并不显著改变 VCAM-1 半衰期。因此, 笔者明确了 PI3K/Akt 可以在转录水平调控 VCAM-1 表达, 而不是转录后调节。

综上所述, 本研究发现在 LPS 刺激 HUVEC 后可激活 PI3K/Akt 信号通路, p-PI3K、p-Akt 迅速增加, 并上调 VCAM-1 蛋白表达。应用 PI3K、Akt 抑制剂后发现二者可以浓度依赖性抑制 VCAM-1 蛋白表达, 也可以抑制 VCAM-1 mRNA 变化, 这与上述蛋白结果是一致的。进一步研究 PI3K/Akt 对 VCAM-1 mRNA 稳定性的影响发现, PI3K/Akt 并不显著改变 VCAM-1 mRNA 稳定性, 因此, 笔者认为 PI3K/Akt 可以通过转录水平调节方式调控 LPS 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达, 而不是转录后调节。然而本实验由于条件限制, 没能够进一步深入研究 PI3K/Akt 是通过哪些信号分子调控 VCAM-1 表达, 以及本实验材料是体外培养的细胞株, 可能与在体细胞会有不同, 还需要进一步研究。

参考文献

[1] Ghosh S. Comments on surviving sepsis guideline 2012 [J]. Critical care medicine, 2013, 41(12): e486-487.
 [2] Kramer RD, Cooke CR, Liu V, et al. Variation in the contents of sepsis bundles and quality measures. A systematic review [J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(11): 1676-

- 1684.
- [3] Liu HT, Huang P, Ma P, et al. Chitosan oligosaccharides suppress LPS-induced IL-8 expression in human umbilical vein endothelial cells through blockade of p38 and Akt protein kinases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(4): 478-486.
- [4] Wang H, Brown J, Gu Z, et al. Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3-beta-signaling pathways regulates the innate inflammatory response[J]. *J Immunol*, 2011, 186(9): 5217-5226.
- [5] Sarelius IH, Glading AJ. Control of vascular permeability by adhesion molecules[J]. *Tissue Barriers*, 2015, 3(1/2): e985954.
- [6] Qiu HN, Wong CK, Chu IM, et al. Muramyl dipeptide mediated activation of human bronchial epithelial cells interacting with basophils: a novel mechanism of airway inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 172(1): 81-94.
- [7] Fruman DA, Bismuth G. Fine tuning the immune response with PI3K[J]. *Immunol Rev*, 2009, 228(1): 253-272.
- [8] Nandan D, Camargo de Oliveira C, Moenrezakhanlou A, et al. Myeloid cell IL-10 production in response to leishmania involves inactivation of glycogen synthase kinase 3beta downstream of phosphatidylinositol-3 kinase[J]. *J Immunol*, 2012, 188(1): 367-378.
- [9] Kim MG, Yang JH, Kim KM, et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated Sestrin2 induction by AP-1, Nrf2, and the ubiquitin-proteasome system in macrophages[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 144(2): 425-435.
- [10] Mako V, Czucz J, Weiszhar Z, et al. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(10): 962-970.
- [11] Park SY, Park DAJ, Kim YH, et al. Schisandra chinensis alpha-iso-cubebenol induces heme oxygenase-1 expression through PI3K/Akt and Nrf2 signaling and has anti-inflammatory activity in porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11): 1907-1915.
- [12] Mino T, Takeuchi O. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2013, 29(1): 49-60.
- [13] Van Arensbergen J, Van Steensel B, Bussemaker HJ. In search of the determinants of enhancer-promoter interaction specificity[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(11): 695-702.
- [14] Hu W, Collier J. What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function[J]. *Cell Res*, 2012, 22(9): 1322-1324.
- [15] Komnenov D, Scipione CA, Bazzi ZA, et al. Pro-inflammatory cytokines reduce human TAFI expression via tristetraprolin-mediated mRNA destabilisation and decreased binding of HuR[J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114(2): 337-349.

(收稿日期: 2016-03-14 修回日期: 2016-05-18)

(上接第 4035 页)

- [4] 庞冲, 张腾月, 王长利. 肿瘤干细胞来源的 DC-CIK 对同源肿瘤细胞的杀伤作用[J]. *天津医药*, 2014, 10(10): 972-976.
- [5] Zhang Z, Zhao X, Zhang T, et al. Phenotypic characterization and anti-tumor effects of cytokine-induced killer cells derived from cord blood[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(1): 86-97.
- [6] 刘涛, 张旒娟, 何凤, 等. 脐血 CIK 细胞抗肿瘤研究及临床应用进展[J]. *现代生物医学进展*, 2014(2): 368-371.
- [7] Liu H, Li J, Wang F, et al. Comparative study of different procedures for the separation of peripheral blood mononuclear cells in cytokine-induced killer cell immunotherapy for hepatocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2299-2307.
- [8] Zhang Z, Wang LP, Zhao XL, et al. Pseudomonas aeruginosa injection enhanced antitumor cytotoxicity of cytokine-induced killer cells derived from cord blood[J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(8): 1057-1063.
- [9] 付庆国, 应可明, 朱林波. 肿瘤 HSP70 活化的 CIK 细胞杀伤作用研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2012, 18(7): 512-515.
- [10] He Q, Zhang H, Wang Y, et al. Purified anti-CD3 x anti-HER2 bispecific antibody potentiates cytokine-induced killer cells of poor spontaneous cytotoxicity against breast cancer cells[J]. *Cell Biosci*, 2014, 4: 70.
- [11] Wang L, Deng Q, Wang J, et al. Effect of CIK on multi-drug-resistance reversal and increasing the sensitivity of ADR in K562/ADR cells[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1778-1782.
- [12] Burris HA. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(4): 829-842.
- [13] Moloney TC, Hoban DB, Barry FP, et al. Kinetics of thermally induced heat shock protein 27 and 70 expression by bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Protein Sci*, 2012, 21(6): 904-909.
- [14] 江小霞, 张毅, 李秀森, 等. 间充质干细胞对 T 淋巴细胞转化的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2005, 30(2): 130-132.
- [15] Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(9): 1505-1513.

(收稿日期: 2016-03-12 修回日期: 2016-05-16)