

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.07.007

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190327.1054.053.html(2019-03-28)

PTEN 基因沉默对小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路的影响*周 龙^{1,2}, 王立林^{3 Δ} , 胡序怀¹, 李亚文²

(1. 广东省深圳市卫生健康发展研究中心 518000; 2. 南方医科大学附属深圳妇幼保健院麻醉科, 广东深圳 518000; 3. 广东省深圳市血液中心 518000)

[摘要] **目的** 探讨第 10 号染色体缺失性磷酸酶-张力蛋白同源物蛋白 (PTEN) 对小鼠原代肝细胞蛋白激酶 B/糖原合酶激酶-3 β (Akt/GSK-3 β) 信号通路的影响。**方法** 采用两步胶原酶灌注法分离小鼠原代肝细胞, 均分为 4 组: 阴性对照组 (NC-C 组)、阴性对照白细胞介素-6 (IL-6) 组 (NC-IL 组)、siR-996 对照组 (996-C 组)、siR-996 与 IL-6 组 (996-IL 组)。采用 HiPerFect 转染试剂将 siRNA-996 转入小鼠原代肝细胞, 24 h 后提取蛋白, 通过蛋白质印迹法 (Western blot) 检测各组 Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)、GSK-3 β 、磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β)、PTEN 蛋白水平。**结果** 在 PTEN 蛋白水平上, 与 NC-C 组相比, NC-IL 组升高 ($P < 0.05$), 996-C 组和 996-IL 组降低 ($P < 0.01$)。在 p-Akt/Akt 上, 与 NC-C 组相比, NC-IL 组降低 ($P < 0.05$), 996-C 组和 996-IL 组升高 ($P < 0.05$)。在 p-GSK-3 β /GSK-3 β 上, 与 NC-C 组相比, NC-IL 组降低 ($P < 0.05$), 996-C 组和 996-IL 组升高 ($P < 0.01$)。**结论** PTEN 基因沉默可逆转 IL-6 对小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路的抑制, 增强小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路的表达。

[关键词] PTEN 磷酸水解酶; 小鼠原代肝细胞; RNA 干扰; 蛋白激酶 B; 糖原合成酶激酶-3 β **[中图分类号]** R614 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)07-1107-03Effect of PTEN gene silencing on Akt/GSK-3 β signaling pathway in primary mouse hepatocytes*ZHOU Long^{1,2}, WANG Lilin^{3 Δ} , HU Xuhuai¹, LI Yawen²

(1. Shenzhen Health Development Research Center, Shenzhen, Guangdong 518000, China; 2. Department of Anesthesiology, Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital, Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518000, China; 3. Shenzhen Blood Center, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) on protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β (Akt/GSK-3 β) signaling pathway in mouse primary hepatocytes. **Methods** The mouse primary hepatocytes were isolated by two-step collagenase perfusion and divided into four groups on average: the negative control group (the NC-C group), the negative control IL-6 group (the NC-IL group), the siR-996 control group (the 996-C group) and the siR-996 and IL-6 group (the 996-IL group). siRNA-996 was transfected into mouse primary hepatocytes by HiPerFect transfection reagent. After 24 h culture, the protein was extracted, and the protein levels of Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β and PTEN in each group were detected by Western blot. **Results** Compared with the NC-C group, the level of PTEN protein increased in the NC-IL group ($P < 0.05$), while decreased significantly in the 996-C group and the 996-IL group ($P < 0.01$). Compared with the NC-C group, p-Akt/Akt was decreased in the NC-IL group ($P < 0.05$), while it was increased in the 996-C group and the 996-IL group ($P < 0.05$). Compared with the NC-C group, p-GSK-3 β /GSK-3 β was decreased in the NC-IL group ($P < 0.05$), while it was increased significantly in the 996-C group and the 996-IL group ($P < 0.01$). **Conclusion** PTEN gene silencing can reverse the inhibition of IL-6 on Akt/GSK-3 β signaling pathway in mouse primary hepatocytes, and enhance the expression of Akt/GSK-3 β signaling pathway in mouse primary hepatocytes.

[Key words] PTEN phosphohydrolase; mouse primary hepatocytes; RNA interference; protein kinase B; glycogen synthase kinase-3 β

胰岛素抵抗可严重影响危重患者的预后^[1-2], 丙泊酚是目前临床上最常用的静脉麻醉药, 广泛用于危

重患者的镇静或麻醉。丙泊酚可导致大鼠全身胰岛素抵抗^[3], 但其分子机制尚不清楚。笔者前期研究已

经发现,丙泊酚可引起小鼠原代肝细胞蛋白激酶 B (Akt) 和糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)磷酸化水平降低,抑制小鼠原代肝细胞磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/Akt/GSK-3 β 信号通路,抑制小鼠原代肝细胞糖原合成,从而引起小鼠原代肝细胞胰岛素抵抗^[4]。第 10 号染色体缺失性磷酸酶-张力蛋白同源物蛋白(PTEN)可从上游调节 PI3K/Akt 信号通路^[5-7],在先前研究的基础上^[4],笔者推测 PTEN 参与了丙泊酚所致的胰岛素抵抗。本实验将通过基因沉默,探讨 PTEN 对小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路的影响,旨在评估研究丙泊酚所致胰岛素抵抗分子机制时 PTEN 是否为一个值得验证的对象,为进一步探索丙泊酚引起胰岛素抵抗的分子机制提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

siRNA-996、阴性对照 siRNA(上海吉玛基因公司)。siRNA-996 序列:5'-GGU GUA UAC AGG AAC AAU ATT-3'(正义链),5'-UAU UGU UCC UGU AUA CAC CTT-3'(反义链);阴性对照 siRNA 序列:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'(正义链),5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'(反义链)。细胞培养试剂(美国 Invitrogen 公司),十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂(美国 Bio-Rad Laboratories 公司),HiPerFect 转染试剂盒(德国 Qiagen 公司),Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)、GSK-3 β 、磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β)、兔抗 PTEN 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)。雄性 C57BL/6 小鼠(8 周龄,22~32 g)由北京大学医学部实验动物科学部提供[许可证号:SCXK(京)2016-0010]。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

采用两步胶原酶灌注法分离小鼠原代肝细胞^[8-9],1 只小鼠能提供 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 个原代肝细胞,收集细胞于 50 mL 离心管中,800 r/min 离心 8 min,弃上清液,用细胞培养基重新悬浮,显微镜下台盼蓝染色观察活细胞,细胞计数,调整细胞密度,以适当浓度接种培养瓶,于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 实验分组

阴性对照组(NC-C 组):小鼠原代肝细胞中加入阴性对照 siRNA(终浓度 50 nmol/L)。阴性对照 siRNA 与 siR-996 有基本相同的碱基组成,但与靶 mRNA 无同源性。阴性对照 siRNA 进入细胞后不会引起基因表达的改变,能够反映 siRNA 进入细胞后对基因表达的非特异影响。阴性对照 IL-6 组(NC-IL 组):NC-C 组的基础上加入 IL-6(终浓度 10 ng/mL),用于检测 IL-6 对 Akt 和 GSK-3 β 磷酸化水平的影响。以及 IL-6 对 PTEN 蛋白表达的影响。siR-996 对照组(996-C 组):小鼠原代肝细胞中加入 siRNA-996(终浓度 50 nmol/L);siR-996 与 IL-6 组(996-IL 组):小鼠原代肝细胞中加入 siRNA-996 和 IL-6。

1.2.3 细胞转染

在转染的前 1 d 对小鼠原代肝细

胞换液,计数活细胞,调整细胞密度,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。按照 HiPerFect 试剂说明书,在 24 孔板中加入小鼠原代肝细胞(6×10^4 个/孔),用 DMEM 培养液(含 100 U/mL 青霉素、10% 胎牛血清)稀释至 500 μ L,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中。用无血清的 DMEM 培养液稀释 75 ng siRNA 至 5 nmol/L(终浓度),然后加入 3 μ L HiPerFect 转染试剂,室温下静置 10 min,将混合物缓慢加入培养皿中,混匀,置于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

1.2.4 蛋白检测

用 10% SDS-PAGE 分离细胞裂解液,再将其转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h。加入一抗(以 1:1 000 的浓度稀释),在摇床上缓慢摇动,孵育 3 h,如果一抗在室温下孵育效果不佳,可以改为在 4 °C 下过夜;TBS-T 洗膜,室温振摇 5 min,共洗涤 3 次,如果结果背景亮度较高可适当延长洗涤时间或增加洗涤次数。洗膜后加入以辣根过氧化物酶标记的相应二抗(以 1:3 000 的浓度稀释),与膜共同孵育 1 h,TBS-T 洗膜,室温振摇 5 min,共洗涤 5 次。在暗室中加入等体积混合发光缓冲液,均匀滴加到 PVDF 膜的蛋白面上,压 X 光胶片 1~10 min;显影、定影,用 Gel-Pro Analyzer 分析蛋白条带灰度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

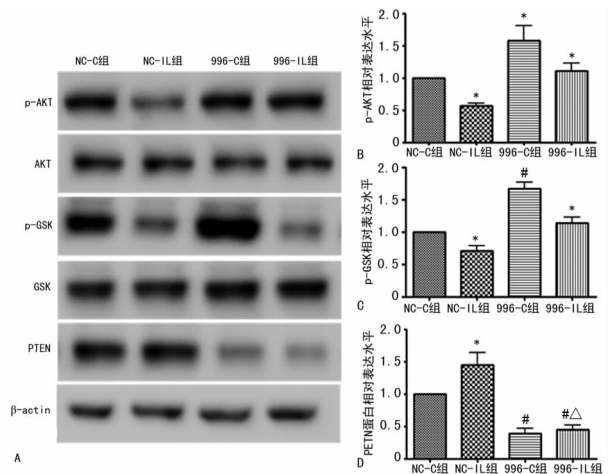
2 结 果

2.1 Akt 磷酸化水平

与 NC-C 组相比,NC-IL 组 Akt 磷酸化水平降低($P < 0.05$),996-C 组和 996-IL 组 Akt 磷酸化水平升高($P < 0.05$),见图 1A、B。

2.2 GSK-3 β 磷酸化水平

与 NC-C 组相比,NC-IL 组 GSK-3 β 磷酸化水平降低($P < 0.05$),996-C 组和 996-IL 组 GSK-3 β 磷酸化水平升高($P < 0.01$),见图 1A、C。



A: Western blot 分析的蛋白条带;B: IL-6 和 PTEN 基因沉默对 Akt 磷酸化水平的影响;C: IL-6 和 PTEN 基因沉默对 GSK-3 β 磷酸化水平的影响;D: IL-6 和 PTEN 基因沉默对 PTEN 蛋白表达的影响;*: $P < 0.05$, #: $P < 0.01$, 与 NC-C 组比较; Δ : $P < 0.05$, 与 996-C 组比较

图 1 PTEN 对小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路的影响

2.3 PTEN 蛋白水平 与 NC-C 组相比,NC-IL 组 PTEN 蛋白水平升高($P < 0.05$),996-C 组和 996-IL 组 PTEN 蛋白水平降低($P < 0.01$),996-IL 组 PTEN 蛋白水平高于 996-C 组($P < 0.05$),见图 1A、D。

3 讨 论

IL-6 是一种常见的细胞因子,有研究发现在 NCTC-1469 细胞中 IL-6 可抑制 Akt/GSK-3 β 信号通路,抑制糖原合成,引起 NCTC-1469 细胞胰岛素抵抗^[10]。IL-6 可通过诱导胰岛素受体底物-1(IRS-1)降解或增加 IRS-1 丝氨酸磷酸化来抑制胰岛素信号通路^[11]。在本实验中 IL-6 使小鼠原代肝细胞 Akt 磷酸化水平和 GSK-3 β 磷酸化水平都降低,表明 IL-6 可抑制小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路。

PTEN 于 1997 年被发现,是人类发现的第 1 个具有磷酸酶活性的抑癌基因,其编码的蛋白在细胞质中表现出双重特异性磷酸酶活性,PTEN 在细胞凋亡、细胞迁移、细胞周期阻滞过程中起关键性作用^[12-13]。PTEN 蛋白能够募集到细胞膜上行使脂质磷酸酶作用,还能使多种蛋白质磷酸化,从而干预多条信号途径转导,它还能在细胞核中对基因转录进行调控^[14-15]。PTEN 是 PI3K/Akt 信号通路的重要调节基因,结合到质膜上的 PTEN 可将 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)催化为 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2),从而抑制 PI3K/Akt 信号转导^[16]。本研究发现在小鼠原代肝细胞中 IL-6 可引起 PTEN 蛋白表达增强,进而抑制小鼠原代肝细胞 Akt 和 GSK-3 β 磷酸化,从而抑制 Akt/GSK-3 β 信号通路。而在小鼠原代肝细胞中 PTEN 基因沉默可抑制 PTEN 蛋白表达,使小鼠原代肝细胞 Akt 磷酸化水平和 GSK-3 β 磷酸化水平都升高,显示 PTEN 基因沉默可增强小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路转导。此外,PTEN 基因沉默还可逆转 IL-6 所致的 PTEN 蛋白表达水平升高,使原本受 IL-6 抑制的 Akt 和 GSK-3 β 磷酸化水平恢复到比抑制前更高的水平,表明 PTEN 基因沉默可逆转 IL-6 对小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路的抑制。

综上所述,PTEN 基因沉默可增强小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路转导,并可逆转 IL-6 对小鼠原代肝细胞 Akt/GSK-3 β 信号通路的抑制,在研究丙泊酚引起胰岛素抵抗的分子机制时 PTEN 是一个值得验证的作用靶点。

参考文献

[1] VANHOREBEEK I, GUNST J, VAN DEN BERGHE G. Critical care management of stress-induced hyperglycemia [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18:17.

[2] VAN DEN BERGHE G, WILMER A, HERMANS G, et al. Intensive insulin therapy in the medical ICU [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(5):449-461.

[3] YASUDA Y, FUKUSHIMA Y, KANEKI M, et al. Anesthesia with propofol induces insulin resistance systemically in skeletal and cardiac muscles and liver of rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(1):81-85.

[4] ZHOU L, WANG L, YANG B, et al. Protective effect of pretreatment with propofol against tumor necrosis factor--induced hepatic insulin resistance [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(1):289-294.

[5] DRIESSEN G J, IJSPEERT H, WENTINK M, et al. Increased PI3K/Akt activity and deregulated humoral immune response in human PTEN deficiency [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(6):1744-1747.

[6] YUE S, LI J, LEE S Y, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(3):393-406.

[7] BLEAU A M, HAMBARDZUMYAN D, OZAWA T, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3):226-235.

[8] SEGLENS P O. Preparation of isolated rat liver cells [J]. *Methods Cell Biol*, 1976, 13:29-83.

[9] CASCIANO D A. Development and utilization of primary hepatocyte culture systems to evaluate metabolism, DNA binding, and DNA repair of xenobiotics [J]. *Drug Metab Rev*, 2000, 32(1):1-13.

[10] DOU L, WANG S, SUI X, et al. MiR-301a mediates the effect of IL-6 on the AKT/GSK pathway and hepatic glycogenesis by regulating PTEN expression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(4):1413-1424.

[11] GIRAUD J, LESHAN R, LEE Y H, et al. Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine 302 correlates with increased insulin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(5):3447-3454.

[12] CHU E C, TARNAWSKI A S. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology [J]. *Med Sci Monit*, 2004, 10(10):RA235-241.

[13] LEE Y R, CHEN M, PANDOLFI P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(9):547-562.

[14] 韩杨,程克棣,朱平. 抑癌基因 PTEN 的研究进展 [J]. *国外医学(药学分册)*, 2006, 33(4):241-245.

[15] HADDADI N, LIN Y, TRAVIS G, et al. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):37.

[16] LESLIE N R, BENNETT D, LINDSAY Y E, et al. Redox regulation of PI3-kinase signalling via inactivation of PTEN [J]. *EMBO J*, 2003, 22(20):5501-5510.