

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.15.001

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190621.1523.007.html(2019-06-24)

PI3K/Akt 信号通路对肺泡上皮钠通道 α 亚基表达的影响*邓 旺,李长毅,王导新[△]

(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科 400010)

[摘要] **目的** 探讨磷酸酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路对肺泡上皮钠通道 α 亚基(α -ENaC)表达的影响。**方法** 体外培养肺泡上皮细胞 A549,以不同浓度(2、20、200 mU/L)及不同作用时间(30、60、120 min)的胰岛素和 Akt 抑制剂 LY294002 干预。反转录-PCR 测定 α -ENaC mRNA,蛋白质印迹法测定 α -ENaC 蛋白和磷酸化(p-Akt)的表达。**结果** α -ENaC mRNA 和蛋白表达水平随胰岛素浓度增加而增加,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);p-Akt 水平也同步增加。 α -ENaC mRNA 和蛋白表达水平随胰岛素作用时间延长而增加,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);p-Akt 水平也同步增加。LY294002 作用后, α -ENaC mRNA、蛋白及 p-Akt 水平均下降($P < 0.05$)。**结论** 激活 PI3K/Akt 通路能上调 α -ENaC mRNA 和蛋白表达水平,有益于肺水肿液清除。

[关键词] 肺泡上皮细胞;钠离子通道;磷酸酰肌醇 3-激酶类;蛋白激酶类;信号通路;胰岛素

[中图法分类号] R563.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)15-2521-03

Effect of PI3K/Akt signaling pathway on the expression of epithelial sodium channel α subunit*DENG Wang, LI Changyi, WANG Daoxin[△]

(Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway on the expression of epithelial sodium channel α subunit (α -ENaC) in A549 cells. **Methods** Alveolar epithelial cells, A549 cells, were incubated with 2, 20 and 200 mU/L insulin for 120 min or 200 mU/L insulin for 30, 60 and 120 min or Akt inhibitor (LY294002), respectively. The expression levels of α -ENaC mRNA and protein and p-Akt level were determined by using RT-PCR and Western blot. **Results** The expression levels of mRNA and protein of α -ENaC elevated with the increase of insulin concentration, compared with those in the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). And the level of p-Akt increased consistently. The expression levels of mRNA and protein of α -ENaC increased with the prolongation of insulin treatment, compared with those in the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). And the level of p-Akt increased consistently. After treatment with LY294002, the expression levels of mRNA and protein of α -ENaC and p-Akt level decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Activation of PI3K/Akt signaling pathway up-regulates the expression of mRNA and protein of α -ENaC, which is beneficial for pulmonary edema clearance.

[Key words] alveolar epithelial cells; sodium channel; phosphatidylinositol 3-kinases; protein kinases; signaling pathway; insulin

肺泡上皮钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)表达于 I 型和 II 型肺泡上皮细胞,由 α 、 β 和 γ 3 个亚基组成。目前研究认为清除肺泡腔内水肿液的主要机制是通过 ENaC 完成钠离子从顶膜到基底膜侧主动转运过程^[1]。有效清除肺泡腔内过多的水肿液,维持肺泡腔相对干燥,是治疗急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)和决

定其预后的关键^[2]。研究显示, α -ENaC 基因敲除的小鼠因不能有效清除肺水肿液于出生后 40 h 死亡,因此 α -ENaC 可能是影响肺水肿液清除的主要亚基^[3]。磷酸酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号转导是一条能减轻 ARDS 肺水肿的保护性通路^[4]。但 PI3K/Akt 信号通路参与肺水肿液清除的机制是否通过调控 α -ENaC 的表达来实现目前尚不清楚。本研究

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81600058,81670071)。 作者简介:邓旺(1984—),主治医师,博士,主要从事呼吸危重症基础与临床方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:wangdaoxin1@163.com。

通过体外培养 A549 细胞(肺上皮细胞),探讨 PI3K/Akt 信号通路调控 α -ENaC 表达的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 肺上皮细胞 A549 及培养基 RPMI1640 购自重庆医科大学生命科学院。重组人胰岛素购自美国礼来公司。LY294002 购自美国 Sigma 公司。总 RNA 提取试剂盒和反转录 PCR(RT-PCR)试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。 α -ENaC 及 β -actin 购自英国 Abcam 公司。Akt 及磷酸化 Akt(p-Akt)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 A549 细胞培养于 RPMI1640 培养基中(含 10% 小牛血清),然后放入 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。胰蛋白酶消化传代,细胞贴壁 100% 开始干预。实验分组:对照组细胞在不含 10% 小牛血清的培养基培养;胰岛素组细胞在不含 10% 小牛血清的培养基中分别给予胰岛素 2、20、200 mU/L 培养 120 min,另加入胰岛素 200 mU/L 培养 30、60、120 min;LY294002 组细胞在不含 10% 小牛血清的培养基中加入胰岛素 200 mU/L 和 LY294002 10 μ mol/L(抑制 PI3K/Akt 通路^[5])培养 2 h。

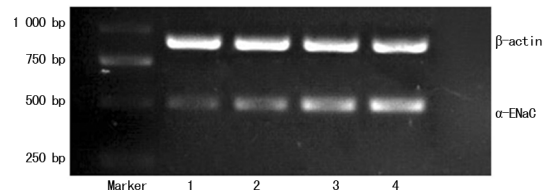
1.2.2 RT-PCR 检测 α -ENaC mRNA 表达 用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,按说明书进行。PCR 引物序列: α -ENaC(509 bp)上游引物 5'-TAC CCT TCC AAG TAT ACA CAG C-3',下游引物 5'-CAG AAG GAG ACT CCG AAT TAG T-3'; β -actin(871 bp)上游引物:5'-GTA CAA CCT TCT TGC AGC TCC T-3',下游引物:5'-ACA GGA TTC CAT ACC CAG GAA G-3'。PCR 反应条件:预变性 94 °C 1 min,变性 94 °C 30 s,退火 53 °C(α -ENaC)和 55 °C(β -actin)30 s,72 °C 1 min,30 个循环。PCR 产物 8 μ L 与上样缓冲液混匀,1.2% 琼脂糖上进行凝胶电泳。应用凝胶成像系统(Bio-Rad)成像,Quantity One 软件分析目的条带灰度,以目的条带与 β -actin 比值作为结果进行比较。

1.2.3 蛋白质印迹法检测 α -ENaC 蛋白表达 提取各组细胞蛋白,取 35 μ g 总蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,分别与 α -ENaC(1:300)、p-Akt(1:1000)、Akt(1:1000)、 β -actin(1:2000)抗体 4 °C 孵育过夜。然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1.5 h,电化学发光法(ECL)显色。凝胶成像系统扫描,Quantity One 软件分析目的条带吸光度值,以目的条带与 β -actin 比值作为结果进行比较。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

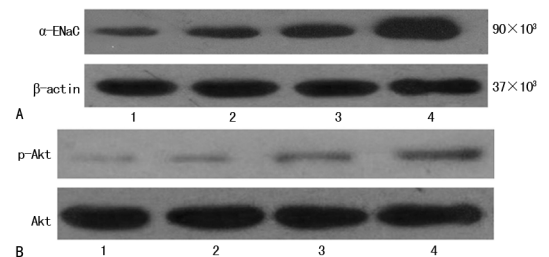
2.1 不同浓度胰岛素对 α -ENaC mRNA 表达的影响 2、20、200 mU/L 胰岛素作用 A549 细胞 2 h 后, α -ENaC mRNA 的相对表达水平分别为(0.331 \pm 0.032)、(0.588 \pm 0.014)、(0.739 \pm 0.029),随胰岛素浓度增加而增加,与对照组 α -ENaC mRNA 的相对表达水平(0.131 \pm 0.021)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



Marker: 标记物;1: 对照组;2: 胰岛素 2 mU/L 组;3: 胰岛素 20 mU/L 组;4: 胰岛素 200 mU/L 组

图 1 不同浓度胰岛素对 α -ENaC mRNA 表达的影响

2.2 不同浓度胰岛素对 α -ENaC 蛋白及 p-Akt 表达的影响 2、20、200 mU/L 胰岛素作用 A549 细胞 2 h 后, α -ENaC 蛋白表达水平分别为(1.043 \pm 0.079)、(1.239 \pm 0.092)、(1.924 \pm 0.056),随胰岛素浓度增加而增加,与对照组 α -ENaC 蛋白表达水平(0.820 \pm 0.037)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2A。p-Akt 水平随胰岛素浓度增加而增加,2、20、200 mU/L 胰岛素作用后 p-Akt 水平分别为(0.054 \pm 0.006)、(0.069 \pm 0.005)、(0.125 \pm 0.008),与对照组 p-Akt 水平(0.021 \pm 0.002)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2B。



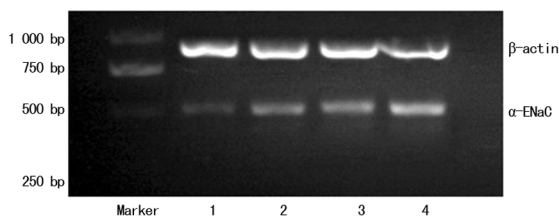
A: α -ENaC 蛋白表达水平;B: p-Akt 表达水平;1: 对照组;2: 胰岛素 2 mU/L 组;3: 胰岛素 20 mU/L 组;4: 胰岛素 200 mU/L 组

图 2 不同浓度胰岛素对 α -ENaC 蛋白及 p-Akt 表达水平的影响

2.3 胰岛素作用不同时间对 α -ENaC mRNA 表达的影响 200 mU/L 胰岛素作用 30、60、120 min 后, α -ENaC mRNA 的相对表达水平分别为(0.437 \pm 0.035)、(0.534 \pm 0.048)、(0.916 \pm 0.069),随胰岛素作用时间增加而增加,与对照组 α -ENaC mRNA 表达水平(0.818 \pm 0.008)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

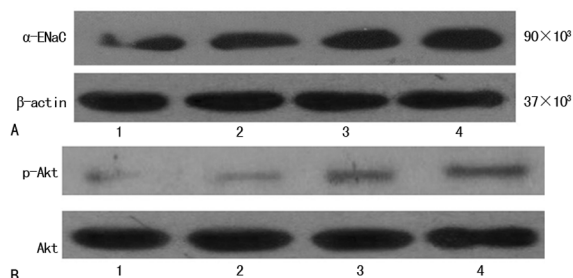
2.4 胰岛素作用不同时间对 α -ENaC 蛋白及 p-Akt 表达的影响 200 mU/L 胰岛素作用 30、60、120 min 后, α -ENaC 蛋白表达水平分别为(0.544 \pm 0.036)、(0.678 \pm 0.028)、(0.879 \pm 0.069),随胰岛素作用时间增加而增加,与对照组 α -ENaC 蛋白表达水平

(0.424 ± 0.042) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4A。p-Akt 水平随胰岛素作用时间增加而增加, 200 mU/L 胰岛素作用 30、60、120 min 后, p-Akt 水平分别为 (0.045 ± 0.006)、(0.089 ± 0.007)、(0.176 ± 0.027), 与对照组 p-Akt 水平 (0.019 ± 0.005) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4B。



Marker: 标记物; 1: 0 min; 2: 30 min; 3: 60 min; 4: 120 min

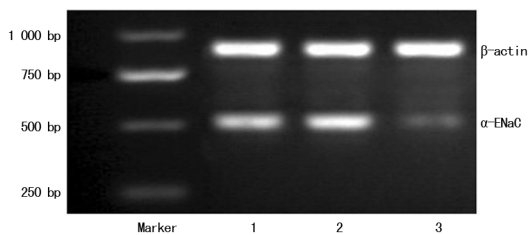
图 3 胰岛素作用不同时间对 α -ENaC mRNA 表达的影响



A: α -ENaC 蛋白表达水平; B: p-Akt 表达水平; 1: 0 min 2: 30min 3: 60min 4: 120min

图 4 胰岛素作用不同时间对 α -ENaC 蛋白及 p-Ak 表达水平的影响

2.5 LY294002 干预后对 α -ENaC mRNA 表达的影响 200 mU/L 胰岛素作用 A549 细胞 2 h 后, α -ENaC mRNA 相对表达水平高于对照组 [(0.689 ± 0.033) vs. (0.472 ± 0.048)], $P < 0.05$ 。10 μ mol/L LY294002 作用后, 明显抑制了 α -ENaC mRNA 的表达 [(0.176 ± 0.035) vs. (0.689 ± 0.033)], $P < 0.05$, 见图 5。

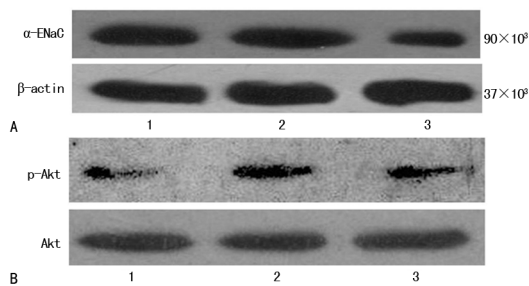


Marker: 标记物; 1: 对照组; 2: 胰岛素 200 mU/L 组; 3: LY294002 组

图 5 LY294002 干预后对 α -ENaC mRNA 表达的影响

2.6 LY294002 干预后对 α -ENaC 蛋白及 p-Akt 表达的影响 胰岛素 (200 mU/L) 作用 A549 细胞 2 h 后, α -ENaC 蛋白表达水平明显高于对照组 [(1.271 ± 0.064) vs. (0.773 ± 0.052)], $P < 0.05$]; 10 μ mol/L LY294002 作用后, 明显抑制了 α -ENaC 蛋白表达 [(0.354 ± 0.034) vs. (1.271 ± 0.064)], $P < 0.05$, 见图 6A。与对照组相比, 胰岛素作用后 p-Akt 水平明

显升高 [(0.144 ± 0.008) vs. (0.030 ± 0.005)], $P < 0.05$]; LY294002 作用后, 明显抑制了胰岛素引起的 Akt 磷酸化, p-Akt 水平降低 [(0.017 ± 0.004) vs. (0.144 ± 0.008)], $P < 0.05$, 见图 6B。



A: α -ENaC 蛋白表达水平; B: p-Akt 表达水平; 1: 对照组; 2: 胰岛素 200 mU/L 组; 3: LY294002 组

图 6 LY294002 干预后对 α -ENaC 蛋白及 p-Akt 表达水平的影响

3 讨 论

肺毛细血管通透性增加导致肺泡腔内大量水肿液形成是 ARDS 发生、发展的重要病理生理过程。学界对 ARDS 进行了大量的基础与临床研究, 但因其发病机制复杂, 目前仍然缺乏有效的治疗措施。研究显示, 上调 ENaC 的表达能有效清除肺泡腔内聚集的水肿液, 维持气体交换, 改善顽固性低氧血症, 对治疗 ARDS 具有重要意义^[7]。其中, α -ENaC 在肺泡上皮细胞中含量最高, 是维持钠水转运及肺水肿液清除的关键亚基。

PI3K 参与细胞生长、分化及代谢调节, 在细胞信号转导中发挥重要作用。Akt 是 PI3K 信号转导的下游中心环节, 同时也是胰岛素发挥效应的主要通路^[8-9]。研究显示, PI3K 参与调控胰岛素作用下的肾脏上皮细胞 ENaC 的表达, 但其下游的信号转导机制并没有阐明^[10]。PI3K/Akt 信号通路参与调控 ARDS 的炎性反应, 减轻肺水肿及肺损伤^[11]。但此通路是否调控 γ -ENaC 的 mRNA 和蛋白表达还未见相关报道。

本研究显示, 不同浓度的胰岛素 (2、20、200 mU/L) 分别干预 A549 细胞后, α -ENaC mRNA 和蛋白表达同步上调, 其变化趋势呈现剂量-效应依赖关系, 同时 Akt 磷酸化水平也同步增加。说明胰岛素激活 PI3K/Akt 信号通路后, α -ENaC 的基因转录及蛋白表达水平增加。同样, 经过胰岛素作用不同时间后, α -ENaC mRNA 和蛋白表达呈现时间-效应依赖性增加, Akt 磷酸化水平与 α -ENaC 表达变化趋势一致, 进一步证明了激活 PI3K/Akt 信号通路, 上调 α -ENaC 表达的作用。本实验中, 阻断 PI3K/Akt 通路后, α -ENaC mRNA 和蛋白表达下降, Akt 磷酸化水平也同步下降, 表明胰岛素通过激活 PI3K/Akt 通路上调 α -ENaC 的表达。研究结果从体外实验证明了 PI3K/Akt 信号通路调控 α -ENaC 表达的作用, 与前期体内研究结果一致^[12]。 (下转第 2527 页)

志, 2013, 22(8): 842-845.

- [2] KRUPICKOVÁ P, MORMANOVÁ Z, BOUCEK T, et al. Microvascular perfusion in cardiac arrest: a review of microcirculatory imaging studies[J]. *Perfusion*, 2018, 33(1): 8-15.
- [3] ADRIE C, MONCHI M, LAURENT I, et al. Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: implication of the protein C anticoagulant pathway[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(1): 21-28.
- [4] BISSCHOPS L L, POP G A, TEERENSTRA S, et al. Effects of viscosity on cerebral blood flow after cardiac arrest[J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(3): 632-637.
- [5] KOAMI H, SAKAMOTO Y, SAKURAI R, et al. Thromboelastometric analysis of the risk factors for return of spontaneous circulation in adult patients with out-of-hospital cardiac arrest[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175257.
- [6] GONG P, ZHANG M Y, ZHAO H, et al. Effect of mild hypothermia on the Coagulation-Fibrinolysis system and physiological anticoagulants after cardiopulmonary resuscitation in a porcine model[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67476.
- [7] 高飞, 严洁. 血栓弹力图监测亚低温治疗对心肺复苏患者凝血功能的影响[J]. *中国急救医学*, 2018, 36(11): 1019-1022.
- [8] BOTTIGER B W, MOTSCH J, BOHRER H, et al. Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis[J]. *Circulation*, 1995, 92: 2572.
- [9] HU C L, WEN J, LIAO X X, et al. Effects of therapeutic hypothermia on coagulopathy and microcirculation after cardiopulmonary resuscitation in rabbits[J]. *Am J Emerg Med*, 2011, 29(9): 1103-1110.
- [10] 郭权, 李永宁, 李润久. 心肺脑复苏早期应用肝素对重要脏器保护作用的研究综述[J]. *临床医药文献杂志*, 2017, 4(79): 15617.
- [11] PERROTT J, HENNEBERRY R J, ZED P J. Thrombolytics for cardiac arrest: case report and systematic review of controlled trials[J]. *Ann Pharmacother*, 2010, 44(12): 2007-2013.
- [12] 陈俞材, 方莲花, 杜冠华. 丹参水溶性化合物抗心肌缺血作用的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(2): 162-165.
- [13] 陶伍元, 邓柳霞, 张文武. 丹参酮 II A 磺酸钠对百草枯中毒大鼠肺组织 5-脂氧化酶表达的影响[J]. *中国急救医学*, 2017, 37(7): 659-663.
- [14] 陈金钟. 丹参注射液对大鼠心肌缺血的干预作用[D]. 西安: 第四军医大学, 2008.
- [15] 林熙, 祈洁珍, 邱鹏新, 等. 复方丹参注射液抗脂多糖诱导的兔弥漫性血管内凝血[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(3): 464-468.
- [16] 徐敏, 黄亮, 李闽云, 等. 复方丹参对急性肺损伤患者血小板活化因子表达及凝血功能的影响[J]. *中国急救医学*, 2010, 30(1): 31-34.

(收稿日期: 2019-02-18 修回日期: 2019-04-08)

(上接第 2523 页)

综上所述, PI3K/Akt 信号通路调控肺泡上皮细胞 α -ENaC 的表达, 对 ARDS 肺水肿液的清除起作用, 同时也为疾病治疗提供靶点。

参考文献

- [1] YANG C Y, CHEN C S, YIANG G T, et al. New insights into the immune molecular regulation of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 588.
- [2] SHARP C, MILLAR A B, MEDFORD A R. Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome[J]. *Respiration*, 2015, 89(5): 420-434.
- [3] MATALON S, BARTOSZEWSKI R, COLLAWN J F. Role of epithelial sodium channels (ENaC) in the regulation of lung fluid homeostasis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(11): L1229-1238.
- [4] 李雯, 戚迪, 陈兰, 等. Vaspin 通过 PI3K/Akt 通路发挥抗炎及血管内皮保护作用减轻脂多糖致急性呼吸窘迫综合征小鼠肺损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(3): 283-288.
- [5] XU C Q, LIU B J, WU J F, et al. Icariin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: involvement of PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 642(1/3): 146-153.
- [6] MATTHAY M A, ZEMANS R L, ZIMMERMAN G A, et al. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 14, 5(1): 18.
- [7] AZZAM Z S, SZNAJDER J I. Lung edema clearance: relevance to patients with lung injury[J]. *Rambam Maimonides Med J*, 2015, 6(3): e0025.
- [8] MA X, BAI Y. IGF-1 activates the PI3K/AKT signaling pathway via upregulation of secretory clusterin[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(6): 1433-1437.
- [9] HUANG X, LIU G, GUO J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-1496.
- [10] BLAZER-YOST B L, ESTERMAN M A, VLAHOS C J. Insulin-stimulated trafficking of ENaC in renal cells requires PI 3-kinase activity[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284(6): C1645-1653.
- [11] MA C, ZHU L, WANG J, et al. Anti-inflammatory effects of water extract of *Taraxacum mongolicum* hand. -Mazz on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 349-355.
- [12] 邓旺, 王导新, 邓嘉, 等. PI3K/Akt 信号通路上调急性肺损伤大鼠肺泡上皮钠通道表达[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(9): 1004-1008.

(收稿日期: 2019-03-08 修回日期: 2019-04-23)