

• 基础研究 •

脓毒症心肌抑制大鼠 PTEN-PI3K-Akt 信号通路的激活对心肌组织损伤及凋亡的影响

陈 伟 李 燚 赖 榕

【摘 要】 目的 探讨脓毒症心肌抑制大鼠心肌组织 PTEN-PI3K-Akt 信号通路的激活对大鼠心肌组织损伤及细胞凋亡的影响。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术构建脓毒症心肌抑制大鼠模型，并分成对照组、模型组及 BPV 干预组，每组 10 只。采用 RT-PCR 及 Western blot 检测心肌组织 PTEN-PI3K-Akt 信号通路关键因子磷酸酶与张力蛋白同源物 (PTEN)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、Akt-1、Cyclin D1 mRNA 及蛋白的表达，采用 TUNEL 法检测心肌组织细胞凋亡情况，采用 HE 染色观察不同组大鼠心肌组织结构。**结果** BPV 干预组 PTEN 基因的 mRNA 及蛋白表达量较模型组下降 ($P<0.05$)，同时 PI3K-Akt 信号通路 PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1 的 mRNA 及蛋白表达量上升 ($P<0.05$)；BPV 干预组心肌组织细胞的凋亡率低于模型组 ($P<0.05$)。正常组大鼠心肌细胞结构整齐，无病理迹象；模型组大鼠心肌细胞呈现脓毒症心肌抑制的典型损伤特征；BPV 干预组心肌损伤有所改善。**结论** 激活 PTEN-PI3K-Akt 信号通路有助于减少细胞凋亡，改善心肌损伤。

【关键词】 脓毒症；心肌损伤；BPV (pic)；PTEN-PI3K-Akt 信号通路

【中图分类号】 R63 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2024)07-0072-04

脓毒症是一种由感染引起的全身性炎症反应综合征，全球每年有超过 1 800 万严重脓毒症患者，每天约有 14 000 人死于其并发症^[1]。脓毒症常伴有心肌抑制，继而引起心功能不全和高死亡率，心肌细胞凋亡在脓毒症心肌抑制中扮演着重要角色^[2-3]。在人体中，磷酸酶与张力蛋白同源物 (PTEN) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 之间呈现动态平衡，PTEN-PI3K-Akt 信号通路是调控细胞生长、增殖和存活的关键途径，在心肌细胞凋亡的调控中具有重要作用^[4]。基于此，本研究拟采用 PTEN 基因特异性抑制剂 BPV (pic) 干预脓毒症心肌抑制大鼠，考察激活大鼠心肌组织 PTEN-PI3K-Akt 信号通路对大鼠心肌组织损伤及细胞凋亡的影响，探讨 PTEN-PI3K-Akt 信号通路诱导的细胞凋亡在脓毒症心肌功能障碍中的作用及机制。

1 资料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只，体重 (200±20) g，购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司，生产许可证号 SCXK (京) 2019-0004，饲养温度 22~26 °C、相对湿度 40%~70%。本实验过程严格按照《中国实验动物福利保护法》执行并

通过本院实验动物伦理委员会审批。

1.2 试剂与仪器 BPV (pic) (纯度≥98%，英国 Tocris Bioscience 公司)，水合氯醛 (昆山市石浦年沙助剂厂)，RNeasy Mini Kit (德国 Qiagen 公司)，High-Capacity cDNA 反转录试剂量、PBS 缓冲液、细胞裂解液 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)，TaqMan Universal PCR Master Mix (美国 ABI 公司)，DNA Marker (大连宝生物工程有限公司)，TUNEL 凋亡检测试剂盒 (瑞士 Roche 公司)，蛋白质定量试剂盒、转膜缓冲液、封闭液 (美国 Bio-Rad 公司)，PTEN、PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1、 β -actin 一抗、二抗、蛋白提取试剂 (美国 Sigma 公司)，QuantStudio PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司)，DYY-6C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)，Tanon-4200SF 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)，其余试剂均为国产分析纯。

1.3 脓毒症心肌抑制大鼠模型的构建 采用盲肠结扎穿孔术构建脓毒症心肌抑制大鼠模型。术前禁食 12 h，随后采用 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 麻醉大鼠；腹部备皮消毒，在腹部正中做一切口暴露

基金项目：2022 年福建省自然科学基金资助项目 (2022J011326)

作者单位：福建中医药大学附属福州中医院重症医学科，福州 350001

通信作者：赖 榕，Email: ohlesley@163.com

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.07.023

盲肠;用缝合线结扎盲肠近端,并在结扎远端用针刺造成穿孔,将盲肠回纳后分层缝合,关闭腹腔;术后用头孢曲松给予大鼠抗感染预防;待大鼠出现精神倦怠、躁动、呼吸和心率加快、直肠温度变化超过 1℃等脓毒症症状且心电图检测心率减慢、心肌收缩力减弱时则认为造模成功。假手术组只开腹分离盲肠,但不结扎及穿刺,盲肠回纳后关腹。正常组则不做任何处理。

1.4 实验分组干预 按照随机数字表将实验大鼠分为正常组、模型组和 BPV 干预组,每组 10 只。正常组大鼠按常规饲养方式饲养,其余大鼠均构建脓毒症心肌抑制大鼠模型,BPV 干预组在分组后即行腹腔注射 BPV (pic) (1 mg/kg,溶于 0.9%生理盐水),正常组及模型组予以注射同等剂量的生理盐水。分组处置 24 h 后,1.5%戊巴比妥麻醉大鼠,处死大鼠。剪取心脏组织,分离左室并将心脏组织剪切成 0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm 的组织块,用 4%多聚甲醛固定并分别保存于 4℃和-80℃条件下备用。

1.5 大鼠心肌组织 PTEN-PI3K-Akt 信号通路关键因子 mRNA 表达的测定 取大鼠心肌组织,加入 1 mL Trizol 试剂研磨使组织完全破碎;将研磨液转移至无 RNase 的离心管中,室温静置 5 min,使用 RNeasy Mini Kit 提取总 RNA,测定 RNA 浓度和纯度后,按照 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 说明书操作,将 RNA 逆转录为 cDNA。根据 TaqMan Universal PCR Master Mix 说明书,配置 PCR 反应体系,其中 PTEN 的引物序列为:上游引物 5'-CGGAATCACCATGACAGCCATCAT-3';下游引物 5'-GCGTCGACTTATCAGACTTTTGTAATT-3';PI3K 的引物序列为上游引物 5'-CAAAGCCGAGAACCTATTGC-3',下游引物 5'-TTGAGGGAGTCATTGTGCTG-3';Akt 的引物序列为上游引物 5'-TGGACTACTTGCCTCCGAG-3',下游引物 5'-CGCAGAACGTCTTCATGGTG-3';Akt-1 的引物序列为上游 5'-AAGAAGGAAGTCATCGTGG-3',下游引物 5'-GGACAGGTGGAAGAACAGC-3';Cyclin D1 的引物序列为上游引物 5'-AGAAGCTGTGCATCTACACCGACA-3',下游引物 5'-TGGAGGGCGGATTGGAAATGAACT-3'。将配置好的 PCR 反

应液加入孔板中,以 GAPDH 为内参基因,采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 PTEN、PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1 mRNA 的相对表达量。

1.6 大鼠心肌组织 PTEN-PI3K-Akt 信号通路关键因子蛋白表达的测定 取大鼠心肌组织,加入裂解液进行匀浆处理,冰上裂解,4℃、12 000 r/min 离心,取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,转膜 (300 mA、90 min);5%脱脂奶粉室温封闭 1 h;封闭结束后,分别加入 PTEN、PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1、 β -actin 的一抗,4℃孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,加入二抗 (稀释比例为 1:5 000),室温孵育 1 h;再次 TBST 洗膜后显影,通过化学发光成像系统对结果进行定量分析。

1.7 大鼠心肌组织细胞凋亡检测 按 TUNEL 凋亡检测试剂盒操作说明书对大鼠心肌组织细胞凋亡情况进行检测,样本经预处理,蛋白酶消化、制备 TUNEL 反应混合液、标记反应、显色、镜检,显微镜下被染成黄褐色的细胞被认定为是凋亡细胞,细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞×100%。

1.8 大鼠心肌组织的 HE 染色 取固定好的心肌组织块进行梯度酒精中脱水、二甲苯透明;石蜡包埋、冷却切片,苏木精-伊红染色,在显微镜下观察心肌组织的形态结构。

1.9 统计学方法 运用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行处理分析。所有计量数据均以均数±标准差表示。在比较不同组别数据时,采用单因素方差分析法,当各组方差齐时,选择 LSD-*t* 检验进行两两比较;若方差不齐,则使用 Dunnett's-*t* 检验进行差异分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 mRNA 相对表达量 在大鼠心肌组织 PTEN-PI3K-Akt 信号通路中,模型组大鼠 PTEN 的 mRNA 相对表达量高于对照组 ($P<0.05$),PI3K、Akt、Akt1、Cyclin D1 的 mRNA 相对表达量低于对照组 ($P<0.05$);BPV 干预组大鼠 PTEN 的 mRNA 相对表达量低于模型组 ($P<0.05$),PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1 的 mRNA 相对表达量高于模型组 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组 mRNA 的相对表达量 (n=10, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN	PI3K	Akt	Akt-1	Cyclin D1
对照组	0.784±0.038	0.934±0.044	1.327±0.157	1.345±0.132	1.266±0.121
模型组	1.526±0.179 ^①	0.526±0.037 ^①	0.638±0.126 ^①	0.648±0.103 ^①	0.535±0.095 ^①
BPV 干预组	1.012±0.182 ^{①②}	0.715±0.052 ^{①②}	0.974±0.119 ^{①②}	0.882±0.117 ^{①②}	1.132±0.119 ^②

注：与对照组比较，^① $P<0.05$ ；与模型组比较，^② $P<0.05$ 。

2.2 各组蛋白相对表达量 在大鼠心肌组织 PTEN-PI3K-Akt 信号通路中，模型组大鼠 PTEN 的蛋白相对表达量高于对照组 ($P<0.05$)，PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1 的 mRNA 相对表达量低于

对照组 ($P<0.05$)；BPV 干预组大鼠 PTEN 的 mRNA 相对表达量低于模型组 ($P<0.05$)，PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1 的 mRNA 相对表达量高于模型组 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组蛋白相对表达量 (n=10, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN	PI3K	Akt	Akt-1	Cyclin D1
对照组	3.47±0.52	2.144±0.109	6.52±2.41	11.33±3.14	7.54±2.18
模型组	17.62±3.43 ^①	1.237±0.095 ^①	2.45±1.02 ^①	5.75±1.23 ^①	3.21±1.07 ^①
BPV 干预组	9.64±2.65 ^{①②}	1.635±0.118 ^{①②}	4.37±1.35 ^{①②}	8.92±2.26 ^{①②}	6.92±1.96 ^②

注：与对照组比较，^① $P<0.05$ ；与模型组比较，^② $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠心肌组织细胞凋亡情况 TUNEL 染色结果显示，细胞凋亡率对照组 (9.51±1.24)%，模型组 (72.67±8.53)%，BPV 干预组 (21.35±4.58)%，模型组大鼠心肌组织的细胞

凋亡率高于正常组 ($P<0.05$)，BPV 干预组大鼠心肌组织的细胞凋亡率低于模型组 ($P<0.05$)。见图 1。

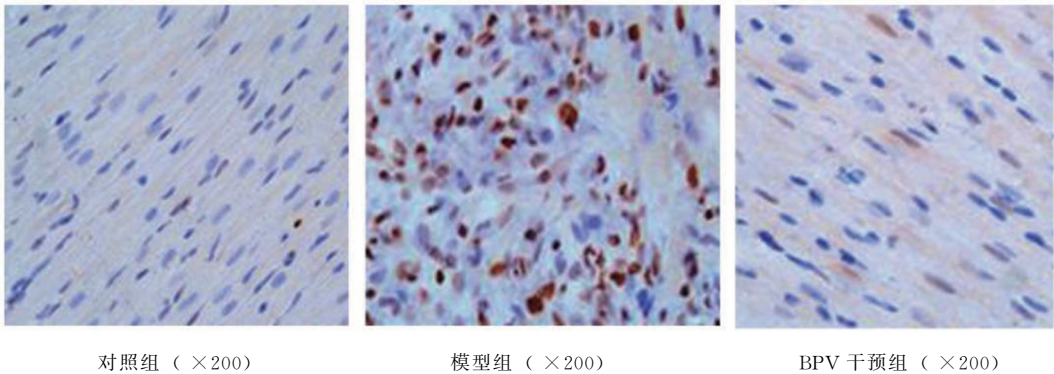


图 1 各组大鼠心肌组织细胞凋亡情况

2.4 各组大鼠心肌组织形态学改变 HE 染色结果显示，对照组大鼠心肌细胞排列整齐，胞质丰富，核圆形居中，无明显病理改变；模型组大鼠心肌细胞出现不同程度的损伤，包括细胞排列紊乱，胞质减少，核浓缩或碎裂，间质水肿和炎细胞浸润等脓毒症心肌抑制的典型病理表现；BPV 干预组大鼠心肌细胞的损伤程度较模型组有所减轻，细胞排列相对整齐，胞质较模型组丰富，核形态较正常，间质水肿和炎细胞浸润也有所改善。见图 2。

3 讨论

脓毒症作为一种由感染引发的全身性炎症反应综合征，死亡率较高，其通常会影 响多个器官的功能，其中就包括心肌组织损伤引起继发脓毒症心病 (sepsis induced cardiomyopathy, SIC)，这会进一步危及患者的生命，因此，深入探索脓毒症心肌损伤的发病机制，寻找有效的治疗策略，已成为当前研究的热点^[5]。

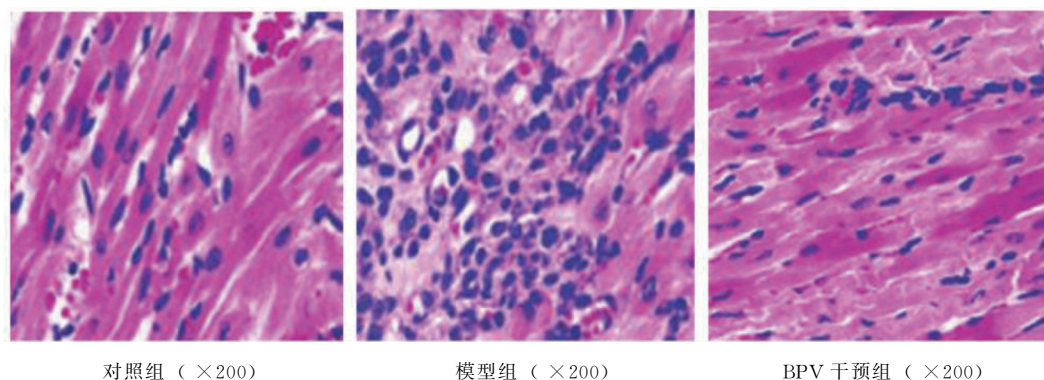


图 2 不同组大鼠心肌组织细胞的 HE 染色结果

目前,虽然 SIC 的发病机理尚不明确,但主要与异常的钙信号、线粒体功能障碍、心肌细胞炎症损伤、血流动力学改变、氧化应激等相关^[6],其中 PI3K-Akt 信号通路被认为与心肌细胞炎症损伤有关^[7]。PTEN 作为 PI3K-Akt 信号通路的上游负调控因子,其表达上调可以抑制 PI3K 的活性,进而抑制 Akt 的磷酸化和激活。在正常情况下,PI3K-Akt 信号通路的激活可以促进细胞存活和增殖,而 PTEN 则通过去磷酸化作用将其负调控在适当水平。SMITH 等^[8]发现在脓毒症状态下,心肌组织中 PTEN 的表达上调,导致 PI3K-Akt 信号通路受到抑制,细胞凋亡增加,进而加重心肌损伤。本研究通过 PTEN 的特异性抑制剂 BPV (pic) 干预脓毒症心肌抑制大鼠模型,结果表明 BPV (pic) 干预后,脓毒症大鼠的心肌组织损伤得到了改善,且干预组 PTEN 基因的 mRNA 及蛋白表达量较模型组下降,同时 PI3K-Akt 信号通路 PI3K、Akt、Akt-1、Cyclin D1 的 mRNA 及蛋白含量上升,心肌组织细胞的凋亡情况也得到了改善,这表明 PTEN-PI3K-Akt 信号通路与心肌组织细胞的凋亡密切相关,而 PTEN 特异性抑制剂 BPV (pic) 能通过 PTEN-PI3K-Akt 信号通路来调节心肌组织细胞的凋亡,改善大鼠心肌组织损伤,这与 WILLIAM 等^[9]的研究结果是基本一致的。本研究结果模型组的 HE 染色结果表明了脓毒症大鼠存在的心肌损伤,同时 BPV (pic) 激活 PTEN-PI3K-Akt 信号通路后,其心肌组织损伤得到了改善和修复。LI 等^[10]利用中医药的独特优势,发现某些中药成分能够通过调节 PTEN-PI3K-Akt 信号通路来保护心肌组织免受脓毒症的损伤,WANG 等^[11]通过综合分析国内外相关研究成果,提出了针对 PTEN-PI3K-Akt 信号通路的治疗策略,并通过实验验证了其有效性。

总之,脓毒症心肌损伤与 PTEN-PI3K-Akt 信号通路及细胞凋亡之间存在密切的联系,通过干预 PTEN-PI3K-Akt 信号通路有可能发现脓毒症心肌损伤新的治疗靶点。

参考文献

- [1] LI G, ZHANG L, HAN N, et al. Increased Th17 and Th22 cell percentages predict acute lung injury in patients with sepsis [J]. *Lung*, 2020, 198 (4): 687-693.
- [2] XIE J, WANG H, KANG Y, et al. The epidemiology of sepsis in chinese ICUs [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48 (3): 209-218.
- [3] 丁宣尹, 雷迁. 脓毒症心肌病发病机制研究进展 [J]. *实用医院临床杂志*, 2023, 20 (6): 182-185.
- [4] 卓萃, 史家欣. PI3K/AKT/mTOR 信号通路对脓毒症中细胞自噬的调控研究进展 [J]. *重庆医学*, 2019, 48 (11): 1927-1929.
- [5] 王会迟, 田璐, 郑毅, 等. 脓毒症合并心肌功能障碍患者心肌损伤, 血流动力学变化与心脏结构和功能的关系 [J]. *疑难病杂志*, 2023, 22 (1): 25-29.
- [6] 王凤新, 张博, 白秀萍. 脓毒症心肌损伤机制研究进展 [J]. *内科急危重症杂志*, 2018, 24 (5): 437-440.
- [7] FATTAHI F, KALBITZ M, MALAN E A, et al. Complement-induced activation of MAPKs and Akt during sepsis: role in cardiac dysfunction [J]. *FASEB J*, 2017, 31 (9): 4129-4139.
- [8] JOHN S, JANE D, ALICE B. The molecular mechanisms of sepsis-induced cardiomyopathy [J]. *Nature Medicine*, 2022, 28 (5): 1000-1010.
- [9] WILLIAM J, EMILY D, CHEN M, et al. Protective effects of BPV on cardiac function in a rat model of sepsis [J]. *Journal of the American Heart Association*, 2023, 12 (3): e022345.
- [10] LI H, WANG X M, ZHANG L. Cellular and molecular basis of myocardial dysfunction in sepsis [J]. *Circulation Research*, 2021, 128 (7): 935-950.
- [11] WANG M, ZHAO Y F, SUN L. Novel therapeutic strategies for treating sepsis-associated myocardial injury [J]. *Critical Care Medicine*, 2022, 50 (2): 220-230.