

Pes1 通过 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路对胆汁淤积性肝病小鼠的作用

杨仁俊 汪婧 孙颀 张娜 孔德润

摘要 目的 探讨 Pescadillo 同源蛋白 1 (Pes1) 以及 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路中的蛋白在胆汁淤积性肝病小鼠中的表达及其对疾病的影响。方法 利用喂食 3,5-二乙氧基羰基-4- β -二氢-2- β -三甲基吡啶 (DDC) 的 C57BL/6 为实验组,正常喂饲的 C57BL/6 为对照组。首先测试小鼠血清中生化指标的水平。Western blot 法检测小鼠肝脏 Pes1 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (PKB/AKT)/糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β) 信号通路中蛋白的表达,同时采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 Pes1 mRNA 的表达水平。结果

血清中总胆汁酸 (TBA)、总胆红素 (TBIL)、碱性磷酸酶 (AKP)、 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT) 水平在胆汁淤积性肝病小鼠中高于对照组。Pes1 mRNA 和蛋白水平在胆汁淤积性肝病小鼠中均低于正常组小鼠,PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路中的磷酸化蛋白水平在胆汁淤积性肝病小鼠均明显低于对照组小鼠。结论 Pes1 在胆汁淤积性肝病小鼠中低表达,降低的 Pes1 使 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路失活,使其信号通路中 PI3K 和 AKT 的磷酸化蛋白水平依次降低,最终下调了磷酸化 GSK-3 β 的表达,使磷酸化 GSK-3 β 对肝细胞凋亡的抑制、减轻细胞损伤的作用减弱,进而加重了胆汁淤积性肝病的进程。

关键词 Pes1; 胆汁淤积性肝病; DDC 模型小鼠; PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路

中图分类号 R 575.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1511-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.003

胆汁淤积性肝病在人群及临床中非常常见,它可由各种原因引起的胆汁生成、分泌和排泄障碍,导致胆汁在肝内淤积,而引起的肝细胞、肝内外胆管一系列器质性损害和功能性异常的肝胆系统疾病^[1-2]。此病预后较差,无令人满意的治疗方案。Pescadillo 同源蛋白 1 (Pescadillo homologue 1, Pes1)

最初在斑马鱼的胚胎中被发现,与增殖阻断蛋白 1 (block of proliferation 1, BOP1) 和 WD 重复蛋白 12 (WD repeat domain 12, WDR12) 结合形成稳定的复合物,对于核糖体 60 S 亚基的合成至关重要^[3]。Pes1 是一种核仁蛋白,在鼠或人的正常胚胎发育和细胞周期调控中起重要作用。Pes1 在其基序中含有保守的乳腺癌易感基因末端结构域,考虑到此结构域作为响应 DNA 损伤反应的整合信号模块, Pes1 也可能参与 DNA 损伤和修复^[4]。糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 是已知在细胞凋亡信号传导中重要的丝氨酸/苏氨酸激酶^[5]。该研究以胆汁淤积性肝病小鼠为模型,研究 Pes1 以及 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路中的蛋白在胆汁淤积性肝病小鼠中的表达,旨在更好地了解 Pes1 以及 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路在胆汁淤积性肝病中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 20 只 6~7 周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠购自南京模式动物研究所。总胆汁酸 (total bile acid, TBA)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP)、 γ -谷氨酰转肽酶 (glutamyl transpeptidase, GGT) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; TR-Izol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录反应试剂盒、实时定量荧光 PCR (RT-PCR) 专用试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物购自上海生工生物工程股份有限公司; 多聚甲醛固定液、RIPA 裂解液以及超敏 ECL 化学发光试剂盒均购自上海碧云天生物技术研究所; Western blot 一抗 Pes1、 β -actin、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB)、磷酸化 Akt 丝氨酸 473 位点 (phospho-Akt ser473, p-Akt473)、磷酸化 Akt 苏氨酸 308 位点 (phospho-Akt thr308, p-Akt308)、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 均购自美国 abcam 公司; Western blot 二抗 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG) 均购自北京中

2019-06-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81271736); 2018 年重点研究与开发计划项目 (编号: 9021240204)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院消化内科, 合肥 230022

作者简介: 杨仁俊 男 硕士研究生;

孔德润 男 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: kongderun168@163.com

杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物造模与处理 所有小鼠在安徽医科大学动物中心饮食饮水,温度控制在 20~26℃,湿度控制在 50%左右,12 h 光照周期单笼喂养。所有小鼠适应环境,正常饮食饮水 1 周后,随机分组,每组 10 只。对照组 C57BL/6 喂食普通基础饲料 4 周,实验组 C57BL/6 喂养含有 0.1% 3,5-二乙氧基羰基-4,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶(3,5-diethoxycarbonyl-4,4-dihydrocollidine, DDC) 饲料 4 周。在实验麻醉之前先称量每只小鼠体质量,之后均先按小鼠每 0.1 ml/10 g 体质量腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,之后心脏取血获取血清,-80℃下保存;取肝脏用冰 PBS 清洗后立即在液氮中急速冷却,置 -80℃ 储存。

1.3 方法

1.3.1 肝脏病理学观察 取小鼠肝脏用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,做常规病理 HE 染色,在光学显微镜下观察组织病理变化。

1.3.2 小鼠血清生化指标检测 取小鼠血清,按照生化试剂测试盒说明书操作检测血清 TBA、TBIL、AKP、GGT 水平。

1.3.3 Western blot 用 RIPA 裂解液补充 1% 蛋白酶抑制剂和 2% 磷酸酶抑制剂的总混合物在冰上操作提取肝组织总蛋白。各蛋白样品通过 BCA 试剂盒测定浓度并用 RIPA 配制成相同浓度,将每蛋白质样品与上样缓冲液充分混合后,将其在 100℃ 金属浴下煮沸 10 min,使蛋白变性并在 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳,并以恒流 200 mA 将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭液封闭 1~1.5 h。之后的膜与 Pes1、β-actin、PI3K、p-PI3K、AKT、p-Akt473、p-Akt308、GSK-3β、p-GSK-3β 等一抗 4℃ 孵育过夜,用 TBST 清洗 3 次,每次 10 min,在室温下与二抗(1:5 000)孵育 1~1.5 h,再次用 TBST 清洗后显影,应用自动凝胶成像仪曝光显影采集图像。

1.3.4 RT-PCR 使用 TRIzol 试剂提取肝组织的总 RNA,然后测 RNA 浓度,利用反转录试剂盒反转录为 cDNA。按照说明书进行 RT-PCR 扩增 cDNA,以 β-actin 为内参,用 2^{-ΔΔCt} 法分析计算 mRNA 表达量。每次实验重复 3 次。Pes1 正向引物:5'-CCCACTGGGTCTTTGACTGT-3',反向引物:5'-ACGAAGGCTGAAAGATGTGG-3';β-actin 正向引物:5'-CTCTCCCTCACGCCATC-3',反向引物:5'-ACGCACGATTTCCCTCTC-3'。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad prism 软件分析

数据以得到对应图形,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间差异比较采用 *t* 检验,实验重复 3 次。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆汁淤积性小鼠及正常小鼠体质量检测 在喂养的 4 周内,DDC 模型小鼠随着喂食时间增加出现呆滞少动,皮肤黄染;对照组小鼠情况基本正常。解剖后 DDC 模型小鼠有腹膜黄染,肝脏色稍黄,质稍硬;正常组小鼠肝脏呈粉红色,光滑柔软。开始喂养时正常对照组小鼠体质量为(24.32 ± 0.19) g,与 DDC 组小鼠体质量(24.19 ± 0.46) 基本一致,差异无统计学意义。喂养 4 周后 DDC 小鼠体质量为(18.32 ± 1.13) g,与对照组正常 C57BL/6 小鼠(25.30 ± 0.94) g 比较,DDC 模型小鼠体质量明显减轻,差异有统计学意义(*t* = 4.83, *P* < 0.05)。见图 1。

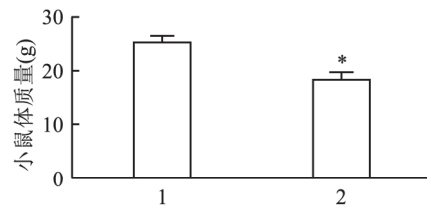


图 1 4 周后小鼠体质量变化

1: 对照组; 2: DDC 实验组; 与对照组比较: * *P* < 0.05

2.2 小鼠肝组织病理学观察 肝脏常规病理 HE 染色光学显微镜下显示,对照组小鼠肝组织结构基本正常,胆管周围基本无炎性细胞,而 DDC 模型小鼠肝组织中可见汇管区扩大,汇管区以及胆管周围大量炎性细胞浸润,胆管变形以及胆管增生。见图 2。

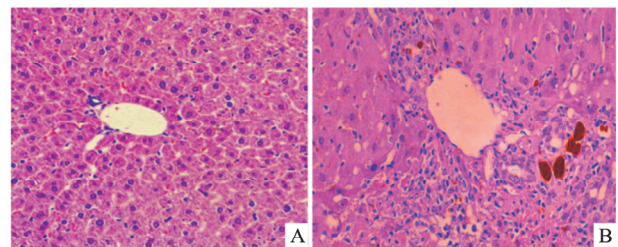


图 2 小鼠肝组织光学显微镜下表现 HE × 200

A: 对照组; B: DDC 实验组

2.3 小鼠血清生化指标水平 与对照组 C57BL/6 比较,胆汁淤积性肝病小鼠血清中 TBA 水平明显增加(*t* = 18.46, *P* < 0.01),见图 3A;胆汁淤积性肝病

小鼠血清中 TBIL 水平明显增加 ($t = 9.64, P < 0.01$) ,见图 3B; 胆汁淤积性肝病小鼠血清中 AKP 活力明显增加 ($t = 4.88, P < 0.01$) ,见图 3C; 胆汁淤积性肝病小鼠血清中 GGT 水平明显增加 ($t = 6.79, P < 0.01$) ,见图 3D。

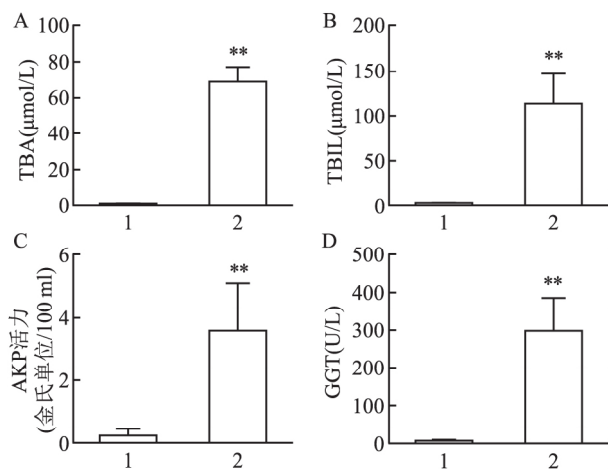


图3 小鼠血清生化指标的水平

A: TBA; B: TBIL; C: AKP 活力; D: GGT; 1: 对照组; 2: DDC 实验组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 胆汁淤积性小鼠以及正常小鼠肝脏中 Pes1 的表达水平 Western blot 和 RT-PCR 检测胆汁淤积性小鼠以及正常小鼠肝脏中 Pes1 蛋白以及 mRNA 的表达。GraphPad Prism 6.02 分析显示,胆汁淤积性小鼠肝脏中 Pes1 蛋白 ($t = 11.85, P < 0.01$) 及 mRNA ($t = 5.33, P < 0.01$) 的表达水平均低于正常小鼠肝脏组织,两者结果是一致的。见图 4。

2.5 胆汁淤积性小鼠中 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路中蛋白表达的水平 Western blot 法检测小鼠肝脏中 PI3K/AKT/GSK-3 β 蛋白的表达。与对照组比较,胆汁淤积性肝病小鼠即 DDC 模型小鼠肝脏中总的 PI3K 蛋白表达水平无明显变化,而 p-PI3K 呈低表达,与对照组比较明显降低,差异有统计学意义 ($t = 16.23, P < 0.01$) ,见图 5A; 两组小鼠肝脏中总的 AKT 蛋白表达水平无明显变化,而 DDC 小鼠肝脏中 p-Akt473、p-Akt308 呈低表达,与对照组比较明显降低,差异有统计学意义 ($t = 6.62, 8.62, P < 0.05$) ,见图 5B; 两组小鼠肝脏中总的 GSK-3 β 蛋白表达水平无明显变化,而 DDC 小鼠肝脏中 p-GSK-3 β 也是呈低表达,与对照组比较明显降低,差异有统计学意义 ($t = 9.10, P < 0.05$) ,见图 5C。

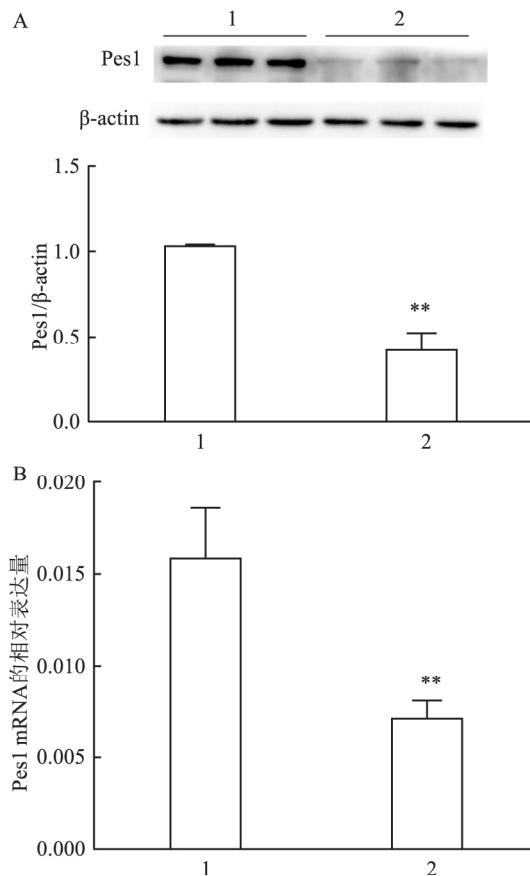


图4 小鼠肝脏中 Pes1 蛋白和 mRNA 的表达水平

A: Pes1 在肝脏中蛋白的表达; B: Pes1 在肝脏中 mRNA 的表达; 1: 对照组; 2: DDC 实验组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

胆汁淤积性肝病如常见的原发性硬化性胆管炎好发于青壮年男性,起病较隐匿,以进行性肝内和肝外纤维闭塞性胆管炎为特征,引起肝内大胆管节段性狭窄,胆管闭塞,最终可发展为肝硬化和肝衰竭^[6]。而小鼠 DDC 喂养是胆汁淤积性肝病的一种成熟模型,本研究中的 DDC 小鼠模型就是以肝内大胆管损伤为主要特点的原发性硬化性胆管炎的动物模型。随着造模时间的延长,出现胆管损伤、节段性胆管狭窄梗阻,长期持续性的胆汁淤积将进展为肝纤维化甚至肝硬化^[7]。因此,上述模型是研究胆汁淤积性肝病的发病机制和寻找治疗药物研究的理想模型。本研究旨在探讨 Pes1 以及 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路在胆汁淤积性肝病中的表达和作用,有助于将 Pes1 开发为胆汁淤积性肝病治疗的一个新靶点。

Pes1 不仅参与核糖体生物发生即制造核糖体的过程,对细胞生长、增殖和动物正常发育至关重要^[3],Pes1 还参与调节 DNA 损伤应答与修复。有

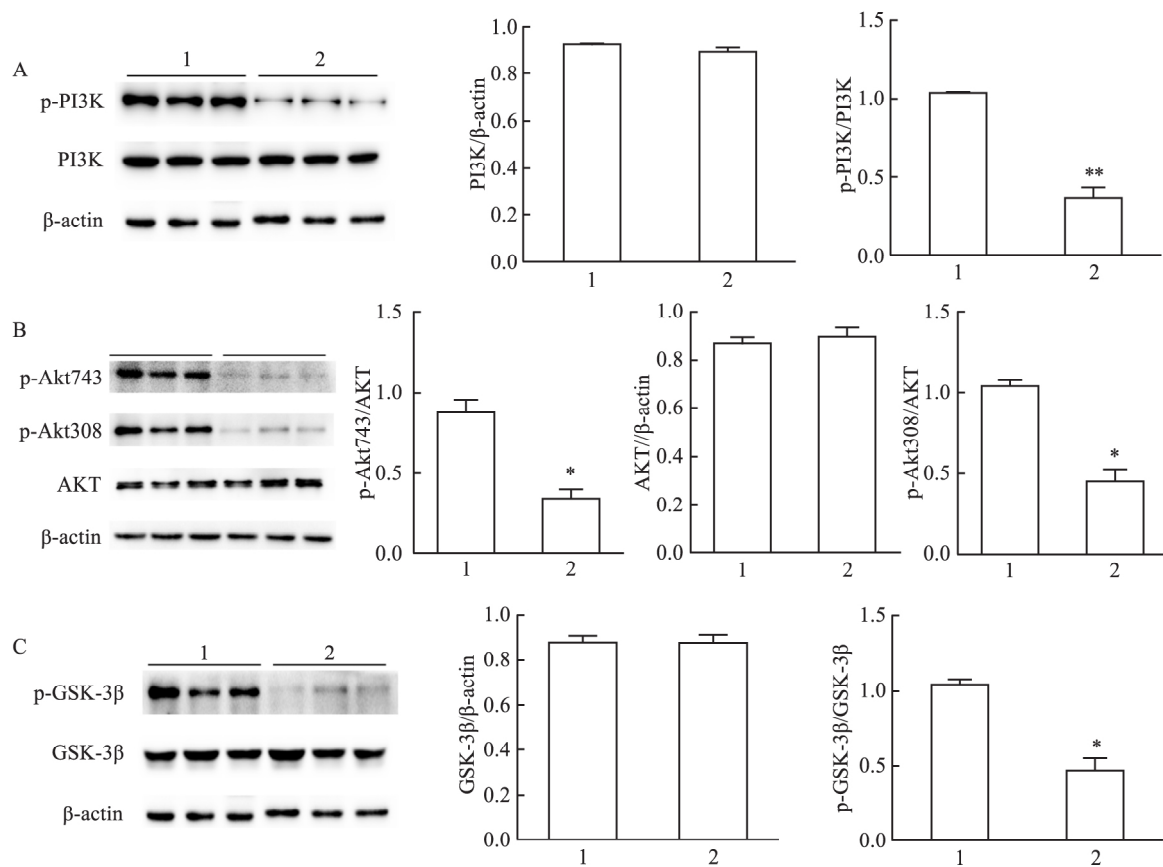


图5 两组小鼠中 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路中蛋白表达的变化

A: 肝脏中 PI3K、p-PI3K 的表达; B: 肝脏中 AKT 及其磷酸化蛋白的表达; C: 肝脏中 GSK-3β、p-GSK-3β 的表达; 1: 对照组; 2: DDC 实验组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

研究^[8-9]表明, Pes1 可直接结合 DNA 并调节基因转录, 是一种多功能蛋白质, 除了胚胎发育外, 还有助于多种生理过程。此外, Pes1 的沉默表达可以使 AKT /GSK-3β 信号通路失活^[10]。同时, 研究^[11-12]表明, PI3K/AKT/GSK-3β 信号传导通路在细胞中是广泛存在的, 通过调节多种与细胞代谢、生长、凋亡及分化等过程, 抑制细胞凋亡, 而且可保护肝细胞免受胆汁酸所诱导的细胞凋亡。GSK-3β 是一种多功能激酶, 不仅在糖原代谢中起作用, 还参与细胞凋亡, 且已知它是细胞程序性死亡的上游调节因子, 可促进 Caspase-3 活化, 活化的 Caspase-3 参与许多监管程序, 是细胞凋亡的“执行者”; GSK-3β 还会导致线粒体中细胞色素 C 释放, 进一步诱导细胞凋亡。活化的 AKT 通过磷酸化 GSK-3β 上的残基丝氨酸-9, 而抑制其生物活性, 即磷酸化 GSK-3β (p-GSK-3β) 是非活性的状态, 从而抑制了 Caspase-3 的活化以及细胞色素 C 的释放, 抑制肝细胞的凋亡, 并减少细胞损伤^[13-14]。

实验结果表明, 由于长期食用 DDC, 导致小鼠

胆汁淤积性肝病的发生, 胆汁淤积在排泄过程中出现异常, 致胆汁淤积性肝病小鼠血清中 TBA 等生化指标水平较对照组明显增加。另外, 在此研究中首次证明, 与对照组小鼠比较, Pes1 在胆汁淤积性肝病小鼠即 DDC 实验组中 mRNA 和蛋白均下调。同时, 在胆汁淤积性肝病小鼠中 p-PI3K、p-Akt473、p-Akt308、p-GSK-3β 蛋白较对照组表达水平降低, 而总的 PI3K、AKT、GSK-3β 无明显变化。结果表明在胆汁淤积性肝病中由于 Pes1 表达水平降低, 其机制是降低的 Pes1 使 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路失活, 由此依次降低 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平, 最终下调了磷酸化 GSK-3β 的表达, 使磷酸化 GSK-3β 对肝细胞凋亡的抑制、减轻细胞损伤的作用减弱, 从而进一步加重了胆汁淤积性肝病的发生发展, 提示 Pes1 可能是对胆汁淤积性肝病起到保护的作用, 这一发现为进一步了解和治疗胆汁淤积性肝病提供了新的见解。但是在细胞中和组织中增强 Pes1 的表达, 并通过经典的 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路, 使之起到对胆汁淤积性肝病的保护作用并改善治疗胆

胆汁淤积性肝病有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis[J]. *Semin Liver Dis* 2001 21(3): 351–72.
- [2] Pollock G, Minuk G Y. Diagnostic considerations for cholestatic liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol* 2017 32(7): 1303–9.
- [3] Hölzel M, Grimm T, Rohrmoser M, et al. The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing[J]. *Nucleic Acids Res* 2007 35(3): 789–800.
- [4] Maiorana A, Tu X, Cheng G, et al. Role of pescadillo in the transformation and immortalization of mammalian cells[J]. *Oncogene* 2004 23(42): 7116–24.
- [5] Jope R S, Johnson G V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3[J]. *Trends Biochem Sci* 2004 29(2): 95–102.
- [6] Trivedi P J, Corpechot C, Pares A, et al. Risk stratification in autoimmune cholestatic liver diseases: Opportunities for clinicians and trialists[J]. *Hepatology* 2016 63(2): 644–59.
- [7] Pollheimer M J, Fickert P. Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis[J]. *Clin Rev Allergy Immunol* 2015 48(2–3): 207–17.
- [8] Sikorski E M, Uo T, Morrison R S, et al. Pescadillo interacts with the cadmium response element of the human heme oxygenase-1 promoter in renal epithelial cells[J]. *J Biol Chem* 2006 281(34): 24423–30.
- [9] Maiorana A, Tu X, Cheng G, et al. Role of pescadillo in the transformation and immortalization of mammalian cells[J]. *Oncogene* 2004 23(42): 7116–24.
- [10] Li J, Yu L, Zhang H, et al. Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells[J]. *Cancer Sci* 2009 100(12): 2255–60.
- [11] Wu Q L, Shen T, Ma H, et al. Sufentanil postconditioning protects the myocardium from ischemia-reperfusion via PI3K/Akt-GSK-3 β pathway[J]. *J Surg Res* 2012 178(2): 563–70.
- [12] Johnston A, Ponzetti K, Anwer M S, et al. cAMP-guanine exchange factor protection from bile acid-induced hepatocyte apoptosis involves glycogen synthase kinase regulation of c-Jun NH2-terminal kinase[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011 301(2): G385–400.
- [13] Zhang W Q, Cui Y, Gao J L, et al. Recombinant osteopontin improves neurological functional recovery and protects against apoptosis via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway following intracerebral hemorrhage[J]. *Med Sci Monit* 2018 24: 1588–96.
- [14] Doble B W, Woodgett J R. GSK-3: tricks of the trade for a multitasking kinase[J]. *J Cell Sci* 2003 116(Pt 7): 1175–86.

Effect of Pes1 on mice with cholestatic liver disease via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway

Yang Renjun, Wang Jing, Sun Jie, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of proteins in Pescadillo homologue 1 (Pes1) and PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathways in mice with cholestatic liver disease and their effects on diseases. **Methods** C57BL/6 fed with 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) was used as the experimental group and normal C57BL/6 was used as the control group. The level of biochemical indicators in the serum of mice were first measured. Western blot was used to detect the expression of proteins in Pes1 and protein phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/AKT)/glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) signaling pathway in mouse liver, at the same time, the level of mRNA expression of the Pes1 was detected by Real time-PCR (RT-PCR). **Results** The levels of total bile acid (TBA), total bilirubin (TBIL), alkaline phosphatase (AKP) and γ -glutamyl-transpeptidase (GGT) in serum were higher in the mice with cholestatic liver disease than that in the control group. The levels of Pes1 mRNA and protein were lower in the mice with cholestatic liver disease than those in the control group. The phosphorylated protein levels in the PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway were significantly lower in the mice with cholestatic liver disease mice than those in the control group. **Conclusion** Pes1 is lower expression in mice with cholestatic liver disease, and decreased Pes1 inactivates the PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway, which leads to a decrease in phosphorylated protein levels of PI3K and AKT in the signaling pathway. Finally, the expression of phosphorylated GSK-3 β is down-regulated, and the inhibitory effect of phosphorylated GSK-3 β on hepatocyte apoptosis and the reduction of cell damage is attenuated, thereby aggravating the progression of cholestatic liver disease.

Key words Pes1; cholestatic liver disease; DDC model mouse; PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway