

PI3K/Akt 信号通路对布鲁氏菌介导的细胞凋亡基因表达的影响

印双红¹, 张俊波^{2*}, 罗静², 冉辉², 李建新², 陆安法³, 郭飞⁴, 陈创夫⁵ (1. 铜仁学院护理学院, 贵州铜仁 554300; 2. 铜仁学院生物与农林工程学院, 贵州铜仁 554300; 3. 铜仁市动物疫病控制中心, 贵州铜仁 554300; 4. 石河子大学医学院, 新疆石河子 832000; 5. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832000)

摘要 [目的] 研究阻断 PI3K/Akt 信号通路对布鲁氏菌介导的细胞凋亡的影响。[方法] 用抑制剂 LY294002 (LY) 作用于细胞 1 h, 然后将布鲁氏菌 16 M 侵染细胞, 应用实时定量 PCR 检测 16 M 对巨噬细胞内凋亡相关基因 Caspase-3 活性和 *Bax* mRNA 表达的影响。[结果] 阻断 PI3K/Akt 信号通路可显著提高 16 M 介导的 caspase-3 活性和 *Bax* mRNA 水平。[结论] PI3K/Akt 信号通路可调控布鲁氏菌介导的细胞凋亡。

关键词 PI3K/Akt 信号通路; 布鲁氏菌; 细胞凋亡

中图分类号 S188⁺.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)09-162-02

Changes of Brucella Mediated Apoptosis Genes Expression Regulated by PI3K/Akt Signal Pathway

YIN Shuang-hong¹, ZHANG Jun-bo^{2*}, LUO Jing² et al (1. School of Nursing, Tongren University, Tongren, Guizhou 554300; 2. College of Biology and Agriculture and Forestry Engineering, Tongren, Guizhou 554300)

Abstract [Objective] To detect the changes of Brucella mediated apoptosis genes regulated by PI3K/Akt signal pathway. [Method] Inhibitor LY294002 (LY) was applied on cells for 1 h. Brucella 16 M was applied to infect the cells. Real time quantitative PCR was used to detect the effects of 16M on macrophage apoptosis related gene Caspase-3 activity and *Bax* mRNA expression. [Result] Blocking PI3K/Akt signal pathway could significantly enhance the Caspase-3 activity and *Bax* mRNA level mediated by 16M. [Conclusion] PI3K/Akt signal pathway can regulate the Brucella mediated apoptosis.

Key words PI3K/Akt signal pathway; Brucella; Apoptosis

布鲁氏菌病是一种严重危害人和家畜健康的人兽共患传染病^[1-2]。布鲁氏菌为革兰氏阴性的兼性胞内寄生菌, 其急性期的临床特点主要为恶寒、发热、关节和肌肉痛等; 人感染布鲁氏菌后造成骨关节、神经系统、生殖系统和免疫系统损害, 慢性期主要症状为骨关节病及包括神经系统在内的多系统多器官的损害, 患者一般会表现出神经-精神症状, 病程较长, 容易复发并再感染, 从而导致劳动力丧失。动物布鲁氏菌病的特点是生殖器官、胎膜及其他多种器官组织发炎、坏死和肉芽肿的形成, 引起流产、睾丸炎及关节炎等症状。布鲁氏菌病给人类健康和畜牧业和谐发展带来严重危害^[3]。因此, 研究布鲁氏菌及对宿主细胞的致病机制, 为布鲁氏菌疫苗研发和防控提供理论基础, 对于国民经济的发展和人民的安全具有重大意义。

PI3K/Akt 信号转导通路是重要的细胞生存通路之一, Akt 作为 PI3K/Akt 信号转导通路的关键分子, 在促进细胞生存、生长、增殖, 促进细胞运动、侵袭和转移, 抑制细胞凋亡方面起核心作用^[4]。PI3K/Akt 信号通路与肿瘤的发生发展密切相关, 在多种肿瘤组织有 Akt 的过度表达和活化。PI3K/Akt 信号通路还与一些病毒的生存繁殖密切相关, 然而, PI3K/Akt 信号通路与布鲁氏菌的生存关系如何, 目前尚

无相关报道。笔者研究阻断 PI3K/Akt 信号通路对布鲁氏菌介导细胞凋亡的影响, 有助于揭示布鲁氏菌的致病机制, 为抗布鲁氏菌药物的研制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞与质粒。牛种布鲁氏菌参考株 2308 和牛种布鲁氏菌疫苗株 RB51 由石河子大学人畜共患病实验室提供, 大肠杆菌 DH5a 由铜仁学院生物与农林工程学院细胞生物学实验室保存。

1.1.2 主要试剂。胎牛血清购自 GIBCO 公司; 酵母提取物 (Yeast Extract)、蛋白胨 (Tryptone)、NaCl 购自 Oxoid 公司; 琼脂糖购自上海生物工程有限公司; DMSO 购自索莱宝公司; LY 购自碧云天公司; Caspase-3 活性检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所; SYBR 染料购于罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 布鲁氏菌侵染小鼠巨噬细胞 RAW264.7。将 16M 用 PBS 洗脱菌体, 利用细菌比浊法计算数量, 按比例将菌悬液稀释 10 倍, 然后将菌悬液涂于固体培养基上, 置于 37 °C、10% CO₂ 培养箱中培养 3 d, 每个稀释浓度重复 3 次, 取平均值确定布鲁氏菌数目。以 50:1 (细菌个数: 细胞个数) 的比例, 用 16M 侵染 RAW264.7 细胞, 并将侵染后的 RAW264.7 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。

1.2.2 Caspase3 活性测定。先用抑制剂 LY (20 μmol/L) 与巨噬细胞作用 1 h, 然后将羊种布鲁氏菌侵染 RAW264.7 巨噬细胞, 按 50:1 (细菌个数: 细胞个数) 进行侵染细胞, 并将侵染的 RAW264.7 细胞继续置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, PBS 洗涤 3 次。用胰酶消化贴壁细胞, 并收集至备用的细胞培养液中。4 °C、1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 小心

基金项目 国家自然科学基金项目 (31502067); 博士科研启动基金项目 (txxyDH1504); 教育厅自然科学基金重点项目 (黔教合 KY 字 [2015] 411 号); 贵州省科技合作计划项目 (黔科合 LH 字 [2015] 7238 号, 黔科合 LH 字 [2015] 7236 号, 黔科合 LH 字 [2015] 7237 号); 省级重点学科项目 (黔学位办 [2013] 18 号); 杰出青年科技人才培养计划项目 (No. 2013ZRKXJQ06)。

作者简介 印双红 (1986-), 女, 贵州铜仁人, 讲师, 硕士, 从事感染免疫学方面研究。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事免疫遗传与抗病机理。

收稿日期 2016-03-14

吸除上清,同时确保尽量无细胞被吸除,PBS 洗涤一次。吸尽上清后,按照每 200 万细胞加入 100 μ L 裂解液的比例加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 min。然后制作标准曲线,按照操作说明,测定其活性。

1.2.3 LY 抑制试验。取对数生长期细胞,在 10% FBS 培养基中取 2 mL 细胞以 1×10^6 个/mL 密度接种于六孔培养板中。继续培养 6 h 后,加入 10、20、40 μ mol/L LY,1 h 后观察 pAkt(S473)和 pAkt(T308)的抑制状态。方法是将细胞混悬液立即置入液氮以终止作用,继以冰冻 PBS 洗涤细胞 3 次。细胞收集后,采用 1×10^6 个/50 μ L RIPA 提取总蛋白质,BCA 法测定总蛋白浓度。

1.2.4 Bax 基因引物设计。从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站 GenBank 上查找鼠的凋亡相关基因,设计引物。引物序列 Bax 上游 5'-GCCTTTTGTCTACAGGGTTTC-3', Bax 下游 5'-TTGCTGTCCAGTTCATCTCCA-3'; β -actin 上游 5'-GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT-3', β -actin 下游 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAAGA-3'。

1.2.5 Bax 基因表达检测。实时定量 PCR 反应体系 20 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。每组细胞每个时间点的细胞做 3 个重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对试验数据进行分析。

1.3 数据分析 使用 SPSS 17.0 数据统计软件对试验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 阻断 PI3K/Akt 信号通路对 16M 介导 caspase-3 活性的影响 先用抑制剂与细胞孵育 1 h,然后用 16M 侵染细胞 4、12 和 24 h,用试剂盒分别检测 caspase-3 的活性。结果表明,在 4、12 和 24 h,16M + LY 组细胞 caspase-3 的活性 (OD_{405})均显著高于对照组细胞 ($P < 0.05$) (图 1)。这表明抑制剂 LY 可提高 16M 介导的 caspase-3 活性,从而诱导 16M 介导的细胞凋亡,LY 可提高 16M 介导的凋亡主要依赖 caspase-3 的活性。同时,仅抑制剂 LY 作用于细胞并不改变 caspase-3 的活性,表明抑制剂 LY 本身不诱导细胞凋亡。

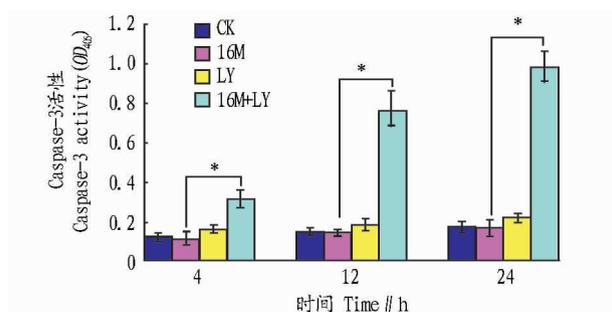


图 1 LY 阻断 PI3K/Akt 信号通路对 16M 介导的 caspase-3 活性的影响

Fig.1 Effects of LY blocking PI3K/Akt signal pathway on the 16M mediated caspase-3 activity

2.2 阻断 PI3K/Akt 信号通路对 16M 介导 Bax mRNA 表达量的影响 先用抑制剂 LY 与细胞孵育 1 h,然后用 16M 侵染细胞 4、12 和 24 h 后,Trizol 法提取细胞总 RNA,实时定

量 PCR 检测凋亡相关基因 *Bax* 的 mRNA 相对表达量。结果表明,在 4、12 和 24 h,16M + LY 组细胞中 *Bax* 的 mRNA 相对表达量显著高于对照组细胞 ($P < 0.01$) (图 2)。而 16M + LY 组细胞中 *Bax* 的 mRNA 相对表达量显著高于 16M 组细胞 ($P < 0.01$);在 4、12 和 24 h,16M 组细胞和 LY 组细胞中 *Bax* 的 mRNA 相对表达量与对照组均无显著差异 ($P > 0.05$)。这表明,在 4、12 和 24 h,抑制剂 LY 提高了 16M 介导的促凋亡基因 *Bax* 的 mRNA 水平。

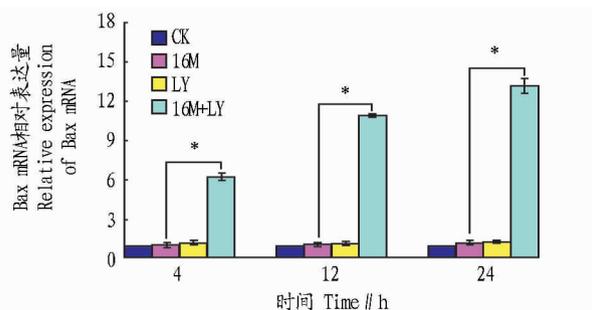


图 2 LY 阻断 PI3K/Akt 信号通路对 16M 介导的 *Bax* mRNA 表达量的影响

Fig.2 Effects of LY blocking PI3K/Akt signal pathway on the 16M mediated *Bax* mRNA expression

3 讨论

PI3K/Akt 信号通路与很多疾病有关^[5],在细胞内参与调控物质代谢、细胞增殖与存活等生物学行为。细胞凋亡是近年来的研究热点,细胞凋亡的信号转导途径为多种免疫疾病的研究提供了一个新的思路。细胞凋亡是一种由内源性多基因控制的、主动的程序化细胞死亡过程。目前,许多细菌(立克次氏体、脑膜炎双球菌、伤寒沙门菌)在宿主内的持续感染都与细胞凋亡密切相关^[6-8]。Akt 是 PI3K 最主要的靶酶,与多种细胞活动、物质代谢调节,尤其是与抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、介导细胞周期有密切关系^[9]。LY (PI3 Kinase Inhibitor) 是一个高度特异性的抑制剂,可以特异地抑制 PI3 kinase 的活性,但不抑制其他脂质和蛋白激酶活性。研究表明 LY 可以抑制 PI3K 依赖的 Akt 磷酸化和激酶活性,它通过和 ATP 竞争 PI3K 催化结构域的结合位点发挥作用^[10],从而有效抑制其下游蛋白 Akt 的磷酸化,已被广泛应用于信号转导通路的作用及靶向治疗的研究。

布鲁氏菌在宿主细胞中的复制和增殖受到多种因素的影响。为了在宿主细胞中复制和增殖,布鲁氏菌通过激活宿主细胞内信号通路控制宿主细胞的存活、凋亡和自噬,以逃避宿主免疫应答。研究表明,某些病毒为了更加有效地进行复制,通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制宿主细胞的早期凋亡、促进细胞自噬和抑制细胞免疫以延长在胞内的复制时间^[11-13],甲型流感病毒的 NS1 蛋白可与 PI3K 的 p85 β 亚基结合而激活 PI3K/Akt。但 PI3K/Akt 是否在布鲁氏菌感染中起作用尚未见报道。该研究表明,由于凋亡相关基因 *caspase-3* 和 *Bax* 的表达都发生变化,且这 2 个凋亡基因都属于线粒体通路上的关键分子,因此,该研究推测 PI3K/Akt 信号通路主

(下转第 240 页)

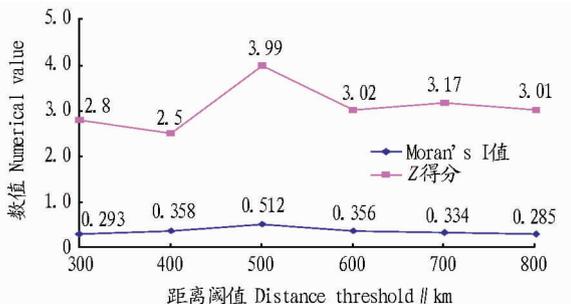


图1 不同距离阈值的空间自相关系数曲线

Fig.1 Spatial autocorrelation coefficient curve with different distance thresholds

地占用耕地显著的冷点区域,建设用地占用耕地占耕地面积减少比例的16%。

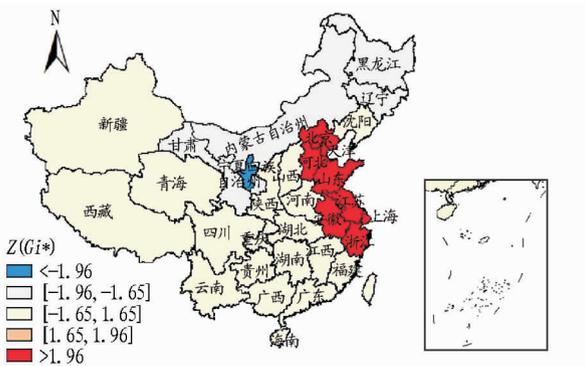


图2 1987~2010年全国32个省级行政区建设用地占用耕地热点分析结果

Fig.2 The analysis results of hot spots of cultivated land occupied by construction land in 32 provincial regions in China during 1987-2010

3 结论

该研究采用空间自相关分析和空间热点分析方法,对1987~2010年我国建设用地占用耕地占耕地面积减少的比率进行空间分析。

(1)在距离阈值为500 km时,建设用地占用耕地情况的

(上接第163页)

要通过线粒体通路发挥调控布鲁氏菌16M介导的细胞凋亡,其具体机制还有待于进一步探索。

参考文献

[1] LACERDA T L, CARDOSO P G, AUGUSTO D E ALMEIDA L, et al. Inactivation of formyltransferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice[J]. *Vaccine*, 2010, 28: 5627-5634.

[2] 尚德秋. 布鲁氏菌病及其防治[J]. *中华流行病学杂志*, 1998, 19(2): 67-68.

[3] OLSEN S C, PALMER M V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years[J]. *Vet Pathol*, 2014, 51: 1076-1089.

[4] WANG J, YUAN L, XIAO H, et al. Momordin Ic induces HepG2 cell apoptosis through MAPK and PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathways[J]. *Apoptosis*, 2013, 18: 751-765.

[5] TAO J J, CASTEL P, RADOSEVIC-ROBIN N, et al. Antagonism of EGFR and HER3 enhances the response to inhibitors of the PI3K-Akt pathway in triple-negative breast cancer[J]. *Sci Signal*, 2014, 7: 29.

[6] 刘婷婷, 马丽娜, 李凤云, 等. 伤寒沙门菌诱导巨噬细胞凋亡机制的探讨[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(3): 239-242.

空间自相关性最强, Global Moran's I 指数达到0.512, 表明我国建设用地占用耕地存在着较强的空间相关性。

(2)以500 km作为距离阈值构建空间距离权重矩阵, 利用局部 Getis-Ord Gi* 系数进行热点分析。北京、天津、河北、广东、江苏、安徽、上海和浙江8个行政区属于显著的热点区域, 建设用地占用耕地是耕地减少的主导因素, 占84.88%; 而宁夏属于冷点区域。

参考文献

[1] 赵晓丽, 张增祥, 汪潇, 等. 中国近30a耕地变化时空特征及其主要原因分析[J]. *农业工程学报*, 2014(3): 1-11.

[2] 刘纪远, 匡文慧, 张增祥, 等. 20世纪80年代末以来中国土地利用变化的基本特征与空间格局[J]. *地理学报*, 2014(1): 3-14.

[3] 马彩虹, 任志远, 李小燕. 黄土台塬区土地利用转移流及空间集聚特征分析[J]. *地理学报*, 2013(2): 257-267.

[4] TURNER B L, LAMBIN E F, REENBERG A. The emergence of land change science for global environmental change and sustainability[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2007, 104(52): 20666-20671.

[5] 任春颖, 张柏, 王宗明, 等. 松嫩平原西部农牧交错区土地利用变化及驱动力分析: 以吉林省通榆县为例[J]. *干旱区资源与环境*, 2010(6): 96-102.

[6] 管翔, 金晓斌, 潘倩, 等. 基于县域尺度的中国土地整治新增耕地空间差异分析[J]. *农业工程学报*, 2013(20): 226-233.

[7] 谢花林, 刘黎明, 李波, 等. 土地利用变化的多尺度空间自相关分析: 以内蒙古翁牛特旗为例[J]. *地理学报*, 2006(4): 389-400.

[8] 刘敏, 赵翠薇, 施明辉. 贵州山区土地利用变化多尺度空间自相关分析[J]. *农业工程学报*, 2012(20): 239-246.

[9] 马松增, 史明昌, 杨贵森, 等. 基于GIS的土地利用时空动态变化分析: 以塔里木盆地农垦区为例[J]. *水土保持研究*, 2013(1): 177-181.

[10] 李云亮, 谈俊忠. 基于GIS的岳阳县土地利用变化研究[J]. *测绘科学*, 2009(2): 216-218.

[11] TOBLER W R. A computer movie simulating urban growth in the Detroit region[J]. *Economic geography*, 1970, 46(2): 234-240.

[12] 戚晓鹏, 周脉耕, 胡以松, 等. 应用地理信息系统探测消化道癌症死亡率空间聚集性[J]. *地理研究*, 2010(1): 181-187.

[13] 胡庆武, 王明, 李清泉. 利用位置签到数据探索城市热点与商圈[J]. *测绘学报*, 2014(3): 314-321.

[14] 冯昕, 杜世宏, 舒红. 空间权重矩阵对空间自相关的影响分析: 以我国肾综合征出血热疾病为例[J]. *武汉大学学报(信息科学版)*, 2011(12): 1410-1413.

[15] 熊昌盛, 韦仕川, 栾乔林, 等. 基于Moran's I分析方法的耕地质量空间差异研究: 以广东省广宁县为例[J]. *资源科学*, 2014(10): 2066-2074.

[16] 陈江平, 张兰兰, 余远剑, 等. 利用空间自相关的中国内陆甲型H1N1流感疫情分析[J]. *武汉大学学报(信息科学版)*, 2011(11): 1363-1366.

[7] MENAKER R J, CEPONIS P J, JONES N L. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway[J]. *Infect Immun*, 2004, 72: 2889-2898.

[8] VOTH D E, HOWE D, HEINZEN R A. *Coxiella burnetii* inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages[J]. *Infect Immun*, 2007, 75: 4263-4271.

[9] MALIK S N, BRATTAIN M, GHOSH P M, et al. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 1168-1171.

[10] WALKER E H, PAEOLD M E, PERISIE O, et al. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY, quercetin, myricetin, and staurosporine[J]. *Mol Cell*, 2000, 6: 909-919.

[11] WEI L, ZHU S, WANG J, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway during porcine circovirus type 2 infection facilitates cell survival and viral replication[J]. *J Virol*, 2012, 86: 13589-13597.

[12] SOARES J A, LEITE F G, ANDRADE L G, et al. Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cow-pox virus infections is required for both host survival and viral replication[J]. *J Virol*, 2009, 83: 6883-6899.

[13] WANG P, GUO Q S, WANG Z W, et al. HBx induces HepG-2 cells autophagy through PI3K/Akt-mTOR pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372: 161-168.