

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220516002

郑爱, 赵粉线, 石影, 等. 丙烯腈致大鼠肝细胞损伤中 PI3K/AKT 信号通路的作用[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(2): 346-355

Zheng A, Zhao F X, Shi Y, et al. Role of PI3K/AKT signaling in acrylonitrile-induced hepatocyte injury in rats [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(2): 346-355 (in Chinese)

丙烯腈致大鼠肝细胞损伤中 PI3K/AKT 信号通路的作用

郑爱, 赵粉线, 石影, 郑蓉, 党瑜慧, 李芝兰*

兰州大学公共卫生学院, 兰州 730000

收稿日期: 2022-05-16 录用日期: 2022-08-09

摘要: 为探讨丙烯腈(acrylonitrile, ACN)致大鼠肝细胞损伤中 PI3K/AKT 信号通路的作用, 随机将 60 只雄性 SD 大鼠分为 5 组: 对照组, ACN 低、中、高剂量染毒组和干预组。分别给予玉米油、11.5 mg·kg⁻¹、23.0 mg·kg⁻¹、46.0 mg·kg⁻¹ ACN 和 300 mg·kg⁻¹ N-乙酰基半胱氨酸(NAC)+46.0 mg·kg⁻¹ ACN 灌胃染毒, 灌胃容积为 5.0 mL·kg⁻¹, 1 次·d⁻¹, 6 d·周⁻¹, 共 28 d。最后一次染毒 1 d 后, 大鼠麻醉心脏采血后处死, 取肝脏进行实验。(1)原位末端标记法(TUNEL)观察肝细胞凋亡水平;(2)定量逆转录聚合酶链反应法(qRT-PCR)检测 *pi3k*、*akt*、*bad*、*bcl-2*、*cyt c* 和 *caspase-3* 基因表达水平;(3)免疫印迹法(WB)检测 PI3K/AKT 信号通路和线粒体凋亡通路相关蛋白的表达水平。研究表明:(1)细胞凋亡方面。ACN 低、中剂量组凋亡细胞较对照组显著增多($P < 0.05$)。(2)mRNA 相对表达水平方面。与对照组相比, ACN 低剂量组 *bad*、*caspase-3* 显著升高($P < 0.05$), *bcl-2* 显著降低($P < 0.05$); ACN 中剂量组 *pi3k*、*bcl-2* 降低($P < 0.05$), *cyt c* 升高($P < 0.05$); ACN 高剂量组 *pi3k*、*bcl-2* 降低, *bad* 升高($P < 0.05$); ACN 各剂量组 *akt* 无显著差异($P > 0.05$); NAC 组 *bad* 较 ACN 高剂量组降低($P < 0.05$)。(3)蛋白相对表达水平方面。与对照组相比, ACN 低剂量组 pro-Caspase-3 降低, cleaved-Caspase-3 升高($P < 0.05$); ACN 中剂量组 PI3K、p-Bad 和 pro-Caspase-3 降低, Caspase-9、Bad、Bax 和 Cyt c 升高, Bcl-2/Bax 值降低($P < 0.05$); ACN 高剂量组 p-PI3K、p-AKT、Bcl-2、p-Bad 和 pro-Caspase-3 降低, Bad、Bax、Caspase-9、Cyt c 和 cleaved-Caspase-3 升高, Bcl-2/Bax 值降低($P < 0.05$); ACN 各剂量组 AKT 无显著差异($P > 0.05$)。与 ACN 高剂量组相比, NAC 组 PI3K、p-Bad 和 pro-Caspase-3 升高, Bax、Caspase-9 和 cleaved-Caspase-3 降低($P < 0.05$)。ACN 抑制 PI3K/AKT 信号通路及激活线粒体凋亡途径可能是大鼠肝细胞损伤的原因之一。

关键词: 丙烯腈; 大鼠; 细胞凋亡; PI3K/AKT 信号通路; 肝细胞

文章编号: 1673-5897(2023)2-346-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Role of PI3K/AKT Signaling in Acrylonitrile-induced Hepatocyte Injury in Rats

Zheng Ai, Zhao Fenxian, Shi Ying, Zheng Rong, Dang Yuhui, Li Zhilan*

School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Received 16 May 2022 accepted 9 August 2022

Abstract: To determine how acrylonitrile (ACN) affected the PI3K/AKT signaling in rat hepatocytes, sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups: control group, ACN low dose group (11.5 mg·kg⁻¹), ACN medium dose group (23.0 mg·kg⁻¹), ACN high dose group (46.0 mg·kg⁻¹) and intervention group by ga-

第一作者: 郑爱(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为卫生毒理学, E-mail: zhenga16@lzu.edu.cn

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: lizhl@lzu.edu.cn

vage administered with the volume of $5.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ once a day for 6 days a week for a total of 28 days, respectively. One day after the last gavage, rats were anesthetized for blood collection and sacrificed, and livers were harvested for additional assays. (1) Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) was used to detect apoptosis; (2) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction method (qRT-PCR) was employed to examine gene expression of *pi3k*, *akt*, *bad*, *bcl-2*, *cyt c*, and caspase-3; (3) Western Blot (WB) was utilized to measure the expression level of protein related to PI3K/AKT signaling pathway and mitochondrial apoptosis pathway. Results indicated: (1) ACN low and medium group present a significant apoptotic phenomenon compared to control group ($P < 0.05$). (2) mRNA level. In the ACN low dose group, *bad* and *caspase-3* were considerably upregulated ($P < 0.05$), while *bcl-2* was dramatically downregulated ($P < 0.05$); in ACN medium dose group, *pi3k* and *bcl-2* were decreased ($P < 0.05$), whereas *cyt c* was increased ($P < 0.05$). In the ACN high-dose group, *pi3k* and *bcl-2* decreased, while *bad* increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in *akt* between ACN dose groups ($P > 0.05$). *bad* in N-acetylcysteine (NAC) group was lower than that in ACN high-dose group ($P < 0.05$). (3) Protein level. Compared with the control group, pro-Caspase-3 was decreased and cleaved Caspase-3 was increased in the low-dose ACN group ($P < 0.05$); in ACN medium-dose group, PI3K, p-Bad, pro-Caspase-3 and Bcl-2/Bax were decreased, Caspase-9, Bad, Bax and Cyt c were increased ($P < 0.05$). In the ACN high-dose group, p-PI3K, p-AKT, Bcl-2, p-Bad, pro-Caspase-3 and Bcl-2/Bax were decreased, while Bad, Bax, Caspase-9, Cyt c, cleaved Caspase-3 were increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in AKT among the ACN dose groups ($P > 0.05$). Compared with the high-dose ACN group, PI3K, p-Bad and pro-Caspase-3 were increased in the NAC group, while Bax, Caspase-9, and cleaved Caspase-3 were decreased ($P < 0.05$). It is concluded that ACN may induce hepatocyte injury via PI3K/Akt signaling pathway and the activation of mitochondrial apoptosis pathway in rats.

Keywords: acrylonitrile; rats; cell apoptosis; PI3K/AKT signaling pathway; hepatocyte

丙烯腈(acrylonitrile, ACN)作为纤维、橡胶和树脂等高分子材料合成中的单体,在工业合成中具有重要地位^[1]。在我国 ACN 生产量大,是备受关注的工业毒物和环境污染物。在厨房橡胶用品、香烟、食品包装和医用塑料材料中均可检测到 ACN^[2-4]。

在职业、生活和环境中的都可以接触到 ACN,它可经皮肤、消化道和呼吸道吸收进入人体,吸收后靶器官为肝、肾和脑等。肝脏损伤的机制可能与 ACN 引起肝组织氧化损伤有关^[5];研究报道,PERK/eif2 α 信号通路激活引起的细胞凋亡可能是 ACN 导致肝细胞损伤的原因^[6]。

磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinases B, PI3K/AKT)信号通路激活后可抑制细胞凋亡的发生^[7-8],其参与细胞的存活、生长及凋亡等。AKT 是 PI3K 启动子的重要下游因子之一,激活的 PI3K 可活化 AKT,之后通过对下游底物的磷酸化来调控细胞发挥不同的功能^[9]。PI3K/AKT 信号通路被激活后,磷酸化 Bad 的丝氨酸残基^[10],使其与 Bcl-2 和 Bcl-xL 的异源二聚体分离,可抑制细胞凋亡^[11-12]。研究表明,活性氧

(reactive oxygen species, ROS)在细胞内的增加可激活酪氨酸磷酸酶,使 AKT 去磷酸化,导致下游的相关蛋白失活,起到促进凋亡的作用^[13];同时 AKT 激活后可以增加 ROS 的产生^[14]。以上研究表明,细胞内 ROS 的增加可抑制 PI3K/AKT 信号通路,进一步会激活细胞线粒体凋亡通路。本团队前期研究结果表明,ACN 亚急性染毒后,可改变大鼠肝组织脂质过氧化水平,引起肝损伤^[15]。

综上,ACN 可引起肝组织氧化损伤,而 ROS 可抑制 PI3K/AKT 信号通路而进一步激活线粒体凋亡途径引起细胞凋亡,因此,本研究主要探讨 PI3K/AKT 信号通路在 ACN 引起的大鼠肝细胞损伤中的作用及机制,为 ACN 的毒性作用研究提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 动物及其分组

60 只 SD 雄性大鼠,体质量 $180 \sim 220 \text{ g}$, SPF 级,购自甘肃中医药大学医学动物实验中心,动物合格证编号 SCXK(甘)2015-0002,实验设施合格证编号 SYXK(甘)2015-0005。大鼠适应性饲养 1 周后,

依体质量随机分成对照组、3个不同剂量 ACN 染毒组和干预组,每组 12 只。对照组给予玉米油灌胃,低、中、高剂量染毒组分别给予 $11.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $23.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $46.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ACN 灌胃,干预组先给予抗氧化剂 N-乙酰基半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC) $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃 30 min 后,再用 $46.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ACN 染毒(文中简称为 NAC 组)。每只大鼠灌胃容积为 $5.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每隔 2 d 称体质量调整灌胃剂量,灌胃 $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$, $6 \text{ d} \cdot \text{周}^{-1}$,连续 28 d。ACN 染毒剂量依据本团队前期系列研究设定。研究通过了兰州大学公共卫生学院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂和仪器

ACN(分析纯,纯度 >99%,天津凯信,中国),NAC(Amresco, USA),BCA 试剂盒(Thermo, USA),BSA、RIPR 裂解液和 PMSF(北京索莱宝有限公司,中国),彩色蛋白预染 Marker(Thermo, USA),ECL 发光液(上海碧云天生物科技公司,中国),TUNEL 试剂盒(武汉博士德生物有限公司,中国),PI3K 一抗(兔抗鼠)、p-PI3K 一抗(兔抗鼠)、AKT 一抗(兔抗鼠)、p-AKT 一抗(兔抗鼠)、Bad 一抗(兔抗鼠)、p-Bad 一抗(兔抗鼠)(Cell Signalway Technology, USA),Bax 一抗(兔抗鼠)、Bcl-2 一抗(兔抗鼠)、Caspase-9 一抗(兔抗鼠)、HRP 标记山羊抗兔二抗、GAPDH 一抗(兔抗鼠)(Signalway Antibody, USA),Cyt c 一抗(兔抗鼠)、Caspase-3 一抗(兔抗鼠)(Cell Signalway Technology, USA),Trizol 试剂(Thermo, USA),cDNA 反转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒(TaKaRa, Japan),PI3K、AKT、Bad、Bcl-2、Caspase-9、Cyt c 和 Caspase-3 引物(TaKaRa, Japan),DEPC(Sigma, USA)。超低温高速离心机(Microfuge 22R, Beckman coulter, USA),电泳仪及凝胶成像系统(ChemiDoc XRS+, Bio-Tek, USA),PCR 扩增仪(iQ5 Multicolor, Bio-Tek, USA),PCR 测定仪(NANODROP 2000c, Bio-Tek, USA),光学显微镜(U-RFL-T, Olympus, Japan)。

1.3 TUNEL 法检测大鼠肝细胞的凋亡水平

取肝组织切片脱蜡、水化后,蛋白酶 K 37°C 消化 10 min, TBS 洗 3 次。加封闭液, 37°C 放置 30 min。加生物素化抗地高辛抗体, 37°C 放置 30 min, TBS 洗 3 次。加 SABC, 37°C 放置 30 min, TBS 洗 4 次。DAB 显色,水洗,苏木素轻度复染后,水洗,烘干,封片。光学显微镜下观察细胞凋亡情况,方法细节详见文献[16]。

1.4 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

切取肝组织 70 ~ 100 mg,加 4°C 预冷 Trizol 液,

震荡 30 s, -80°C 冰箱过夜。研磨样品,加 4°C 预冷氯仿,剧烈震荡 15 s, 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,留上清,取 350 μL ,加入 4°C 预冷异丙醇,震荡,静置 10 min, 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清。白色沉淀中加入用 0.1% DEPC 配制的 75% 乙醇,摇匀, 4°C 、 $7\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min,弃上清。沉淀物中加入 4°C 预冷 0.1% DEPC 水,摇匀。取 1 μL ,选择 A_{260}/A_{280} 的比值在 1.8 ~ 2.2 之间的样品进行反转录实验,剩余样液用 0.1% DEPC 水稀释备用,方法细节详见文献[16]。

选择 20 μL 反转录体系,反录条件为: 37°C 、15 min, 85°C 、5 s。得到 cDNA 模板, -80°C 冰箱保存备用。扩增体系选定为 25 μL ,引物如表 1 所示。PCR 反应: 95°C 预变性 30 s $\rightarrow$ 95°C 变性 10 s、 60°C 退火 30 s、 72°C 延伸 30 s,共 50 个循环 $\rightarrow$ 60°C 熔解 15 s,共 71 个循环。采用 Pfaffl 法分析目的基因 mRNA 的相对表达。

计算公式如下:

$$\text{扩增效率: } E = (R_{n,A}/R_{n,B})^{1/(C_{t,A}-C_{t,B})-1}$$

式中: A、B 表示在扩增曲线上任意选取的 2 个点; $R_{n,A}$ 、 $R_{n,B}$ 为 A、B 这 2 点对应的荧光值; $C_{t,A}$ 和 $C_{t,B}$ 为 A、B 这 2 点对应的 C_t 值。

$$\text{mRNA 相对表达水平: Ratio} = E_1^{\Delta C_{t1}}/E_0^{\Delta C_{t0}}$$

式中: ΔC_{t1} 表示对照组目的基因与实验组目的基因的 C_t 值之差; ΔC_{t0} 表示对照组内参基因与实验组内参基因的 C_t 值之差; E_1 表示目的基因的扩增效率; E_0 表示内参基因(β -actin)的扩增效率。

1.5 Western Blot 法检测蛋白表达

取大鼠肝组织 100 ~ 200 mg,按肝脏湿质量(g): RIPA 裂解液(mL)为 1 : 10 加入对应体积经 4°C 预冷的 RIPA 裂解液,冰水浴研磨成匀浆; 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,留上清。将蛋白浓度定为 $4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,密封,煮沸 5 min,取出冷却后置 -80°C 冰箱备用,方法细节详见文献[16]。

通过制胶 $\rightarrow$ SDS-PAGE 凝胶电泳 $\rightarrow$ 转膜 $\rightarrow$ 封闭 $\rightarrow$ 一抗孵育 $\rightarrow$ 二抗孵育 $\rightarrow$ 曝光,保存目的蛋白条带。用 Image J 分析软件(美国 NIH 公司)进行灰度分析,公式如下:

目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值

1.6 统计分析

采用 SPSS 22.0(美国 IBM 公司)进行实验结果分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析(One-

Way ANOVA), 方差齐用 LSD-t 检验, 方差不齐用 Dunnett' T3 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 (Results)

2.1 TUNEL 法检测大鼠肝细胞的凋亡

如图 1 所示, ACN 低、中剂量组凋亡细胞较多。ACN 低、中剂量组凋亡细胞数较对照组显著增多($P<0.05$); NAC 组与 ACN 高剂量组相比凋亡细胞数无显著差异($P>0.05$)。

2.2 ACN 对大鼠肝脏 PI3K/AKT 信号通路的影响

2.2.1 ACN 对大鼠肝脏 PI3K/AKT 通路相关基因的影响

如图 2 所示, mRNA 相对表达水平检测结果显示, ACN 中、高剂量组较对照组 *pi3k* 表达水平显著降低($P<0.05$); *akt* 表达水平 ACN 各剂量组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。 *pi3k* 和 *akt* 表达水平 NAC 组与 ACN 高剂量组相比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2.2 ACN 对大鼠肝脏 PI3K/AKT 通路相关蛋白的影响

免疫印迹法(WB)测定蛋白相对表达水平, 如图 3 所示, PI3K 表达水平 ACN 中剂量组较对照组显著降低($P<0.05$); p-PI3K、p-AKT 表达水平 ACN 高剂量组较对照组显著降低($P<0.05$)。 AKT 表达水平 ACN 各剂量组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。

PI3K 表达水平 NAC 组与 ACN 高剂量组相比较显著升高($P<0.05$)。

2.3 ACN 对大鼠肝细胞凋亡的影响

2.3.1 ACN 对大鼠肝细胞凋亡相关基因的影响

mRNA 相对表达水平检测结果如图 4 所示, *bad*、*caspase-3* 表达水平 ACN 低剂量组较对照组显著升高($P<0.05$), *bcl-2* 表达水平 ACN 低剂量组较对照组水平显著降低($P<0.05$); *cyt c* 表达水平 ACN 中剂量组较对照组显著升高($P<0.05$), *bcl-2* 表达水平 ACN 中剂量组较对照组显著降低($P<0.05$); *bad* 表达水平 ACN 高剂量组较对照组显著升高, *bcl-2* 表达水平 ACN 高剂量组较对照组显著降低($P<0.05$)。 *bad* 表达水平 NAC 组较 ACN 高剂量组显著降低($P<0.05$)。

2.3.2 ACN 对大鼠肝细胞凋亡相关蛋白的影响

WB 测定蛋白相对表达水平结果如图 5 所示, pro-Caspase-3 表达水平 ACN 低剂量组较对照组显著降低($P<0.05$), cleaved-Caspase-3 表达水平 ACN 低剂量组较对照组显著升高($P<0.05$); p-Bad、pro-Caspase-3 表达水平 ACN 中剂量组较对照组显著降低($P<0.05$), Bad、Bax 和 Caspase-9、Cyt c 表达水平 ACN 中剂量组较对照组显著升高($P<0.05$), Bcl-2/Bax 值 ACN 中剂量组较对照组显著降低($P<0.05$); p-Bad、Bcl-2 和 pro-Caspase-3 表达水平 ACN 高剂量组较对照组显著降低($P<0.05$), Bad、Bax、Caspase-9、

表 1 各基因引物序列及扩增长度
Table 1 Primer sequence and product size of each gene

基因名称 Genes	引物 Primers	引物序列 Sequences	扩增长度/bp Product size/bp
<i>pi3k</i>	Forward	5'-AGCTCCTGGAAGCCATTGAGAA-3'	177
	Reverse	5'-AGTCGGCGAGATAGCGTTTGA-3'	
<i>akt</i>	Forward	5'-ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA-3'	126
	Reverse	5'-GCCCTTGCCAGTAGCTTCA-3'	
<i>bad</i>	Forward	5'-CCAGAGTTTGAGCCGAGTGAG-3'	130
	Reverse	5'-GCTGCTGCTGAACGATGCT-3'	
<i>bcl-2</i>	Forward	5'-GACTGAGTACCTGAACCGGCATC-3'	135
	Reverse	5'-CTGAGCAGCGTCTTCAGAGACA-3'	
<i>cyt c</i>	Forward	5'-TGATCCTTTGTGGTGTGACCAG-3'	146
	Reverse	5'-GACCATGGAGGTTTGGTCCAGT-3'	
<i>caspase-3</i>	Forward	5'-GAGACAGACAGTGGAAGTACGATG-3'	147
	Reverse	5'-GGCGCAAAGTGACTGGATGA-3'	
<i>β-actin</i>	Forward	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	150
	Reverse	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	

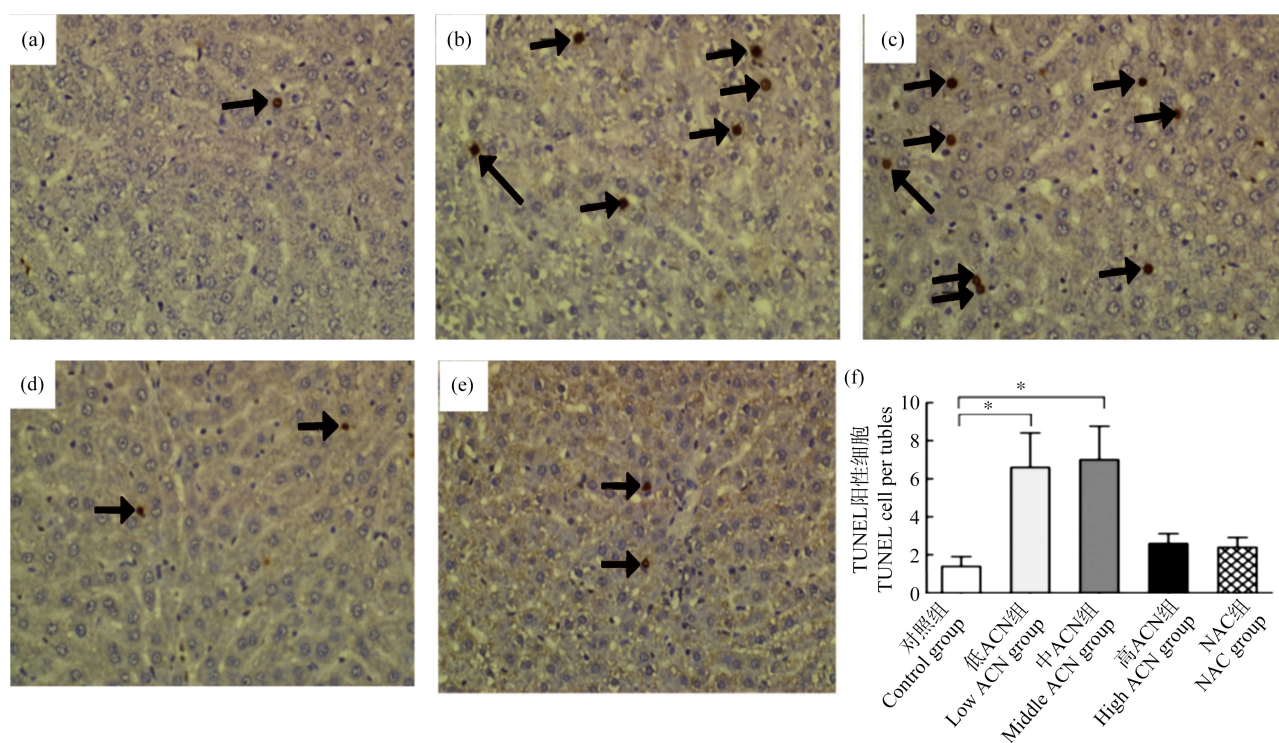


图1 丙烯腈 (ACN) 致大鼠肝组织中细胞的凋亡水平 (TUNEL 染色切片) (放大倍数:400×)

注:与对照组相比, * $P < 0.05$; 图(a)为对照组, 图(b)为低 ACN 组 ($11.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 图(c)为中 ACN 组 ($23.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 图(d)为高 ACN 组 ($46.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 图(e)为 N-乙酰基半胱氨酸(NAC)组 ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NAC + $46.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ACN), 图(f)为凋亡阳性细胞数; 凋亡小体在图中以箭头标示, 随机选取 5 个视野计数凋亡小体个数, 取平均值。每组样本量为 3。

Fig. 1 Acrylonitrile (ACN)-induced apoptosis in rat liver tissue (TUNEL staining) (magnification: 400×)

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; (a) shows the control group, (b) shows the low ACN group ($11.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), (c) shows the middle ACN group ($23.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), (d) shows the high ACN group ($46.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), (e) shows the N-acetylcysteine (NAC) group ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NAC + $46.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ACN), (f) shows the number of apoptotic positive cells; apoptotic bodies were marked by arrows in the figure; five visual fields of each film were randomly selected to count the number of apoptotic bodies, and the average value is taken; $n = 3$.

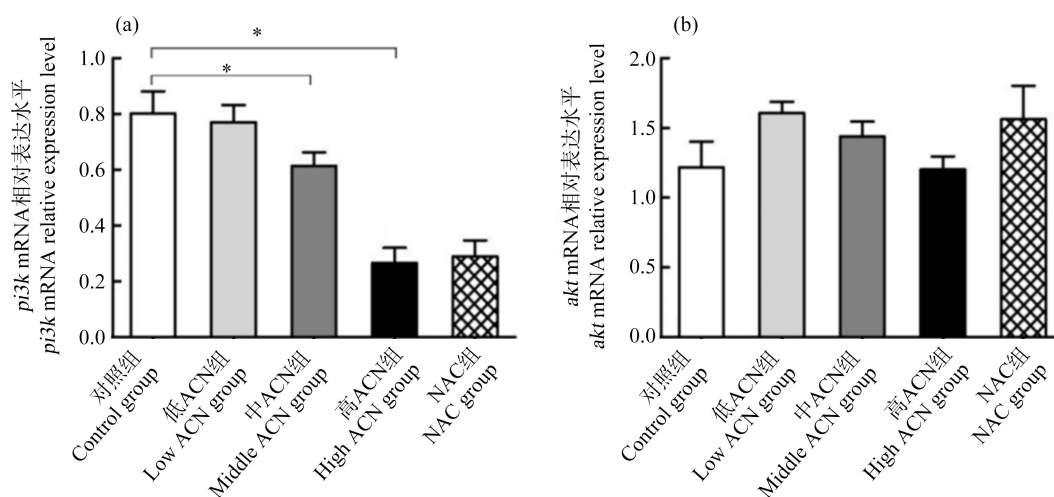


图2 ACN 对大鼠肝脏 *pi3k* 和 *akt* mRNA 相对表达水平的影响 ($n = 6$)

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$; 图(a)为 *pi3k* mRNA 相对表达水平, 图(b)为 *akt* mRNA 相对表达水平。

Fig. 2 Effect of ACN on the relative expression level of *pi3k* and *akt* mRNA in rat liver ($n = 6$)

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; (a) shows the relative expression level of *pi3k* mRNA, and (b) shows the relative expression level of *akt* mRNA.

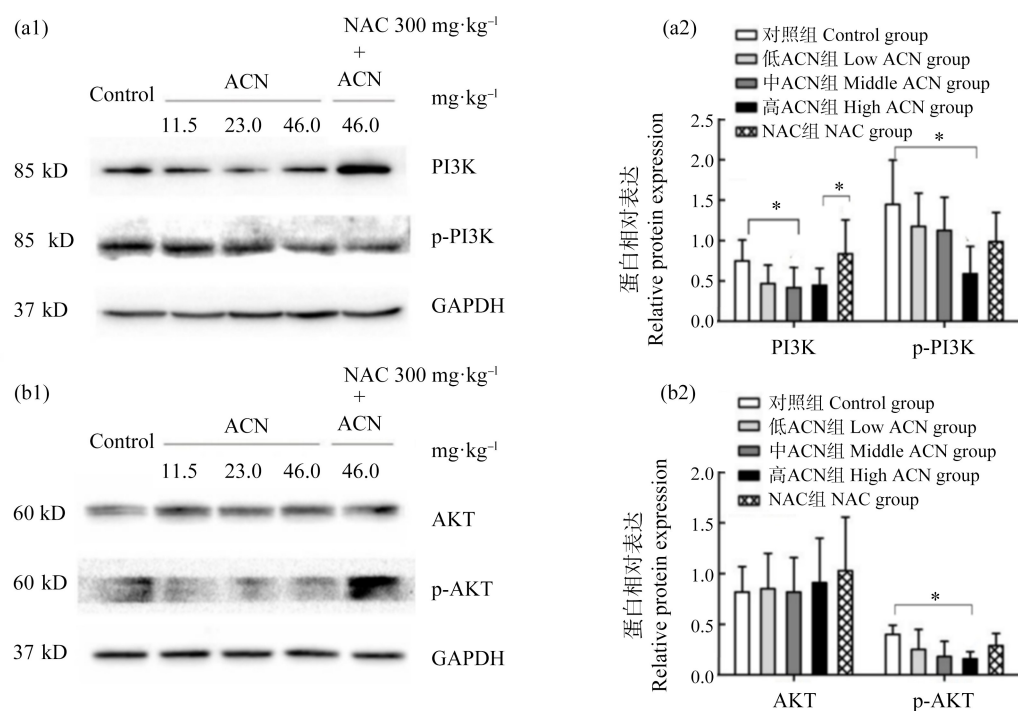


图3 ACN对大鼠肝脏PI3K/AKT通路相关蛋白的相对表达的影响($n=6$)

注:与对照组相比,*表示 $P<0.05$;图(a1)、(b1)分别为PI3K、p-PI3K和AKT、p-AKT蛋白条带,图(a2)、(b2)分别为PI3K、p-PI3K和AKT、p-AKT蛋白相对表达量。

Fig. 3 Effect of ACN on the relative expression of PI3K/AKT pathway related proteins in rat liver ($n=6$)

Note: Compared with the control, * represents $P<0.05$; (a1) show PI3K and p-PI3K protein bands, and (b1) show AKT and p-AKT protein bands; (a2) and (b2) show the relative expression levels of PI3K and p-PI3K, AKT and p-AKT proteins respectively.

Cyt c 和 cleaved-Caspase-3 表达水平 ACN 高剂量组较对照组显著升高($P<0.05$), Bcl-2/Bax 值 ACN 高剂量组较对照组显著降低($P<0.05$)。p-Bad、pro-Caspase-3 表达水平 NAC 组较 ACN 高剂量组显著升高($P<0.05$), Bax、Caspase-9 和 cleaved-Caspase-3 表达水平 NAC 组较 ACN 高剂量组显著降低($P<0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

3.1 ACN 诱导大鼠肝细胞发生凋亡

本研究中,大鼠 ACN 染毒 28 d 后,肝细胞凋亡增多。进一步检测发现,与对照组相比较,肝细胞 *bcl-2* mRNA 相对表达水平在 ACN 低、中、高剂量组都显著降低;*bad* mRNA 相对表达水平在 ACN 低、高剂量组显著增高;*caspase-3* mRNA 相对表达水平在 ACN 低剂量组显著增高;*cyt c* mRNA 相对表达水平在 ACN 中剂量组显著增高。WB 结果显示,与对照组相比较,肝细胞 pro-Caspase-3 蛋白相对表达水平在 ACN 低、中、高剂量组都显著降低;cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达水平在 ACN 低、高剂量组显著增高;Bad 蛋白相对表达水平在 ACN 中、高剂

量组显著增高;Bax 蛋白相对表达水平在 ACN 中、高剂量组显著增高;Caspase-9 蛋白相对表达水平在 ACN 中、高剂量组显著增高;Cyt c 蛋白相对表达水平在 ACN 中、高剂量组显著增高;p-Bad 蛋白相对表达水平在 ACN 中、高剂量组显著降低;Bcl-2 蛋白相对表达水平在 ACN 高剂量组显著降低;Bcl-2/Bax 比值在 ACN 中、高剂量组均显著降低。这说明,ACN 可使肝细胞中抑制凋亡的相关因子的表达受到抑制,促凋亡的相关因子表达激活,这与 TUNEL 检测发现凋亡细胞增多的结果相吻合。但在本实验条件下,不同凋亡相关因子的 mRNA 相对表达水平和蛋白相对表达水平对 ACN 剂量的敏感性有所不同。

NAC 是氨基酸 L-半胱氨酸和谷胱甘肽(GSH)的乙酰化前体物质,其生物活性归因于巯基,与此同时由于乙酰基取代了氨基,其可以清除细胞内 ROS。赵乾龙等^[17]报道,NAC 可通过抗氧化对 ACN 引起的睾丸细胞损伤有保护作用。张瑞萍等^[18]发现 NAC 干预后可拮抗 ACN 诱导大鼠脑组织发生氧化应激;罗波艳等^[19]报道,NAC 可降低 ACN

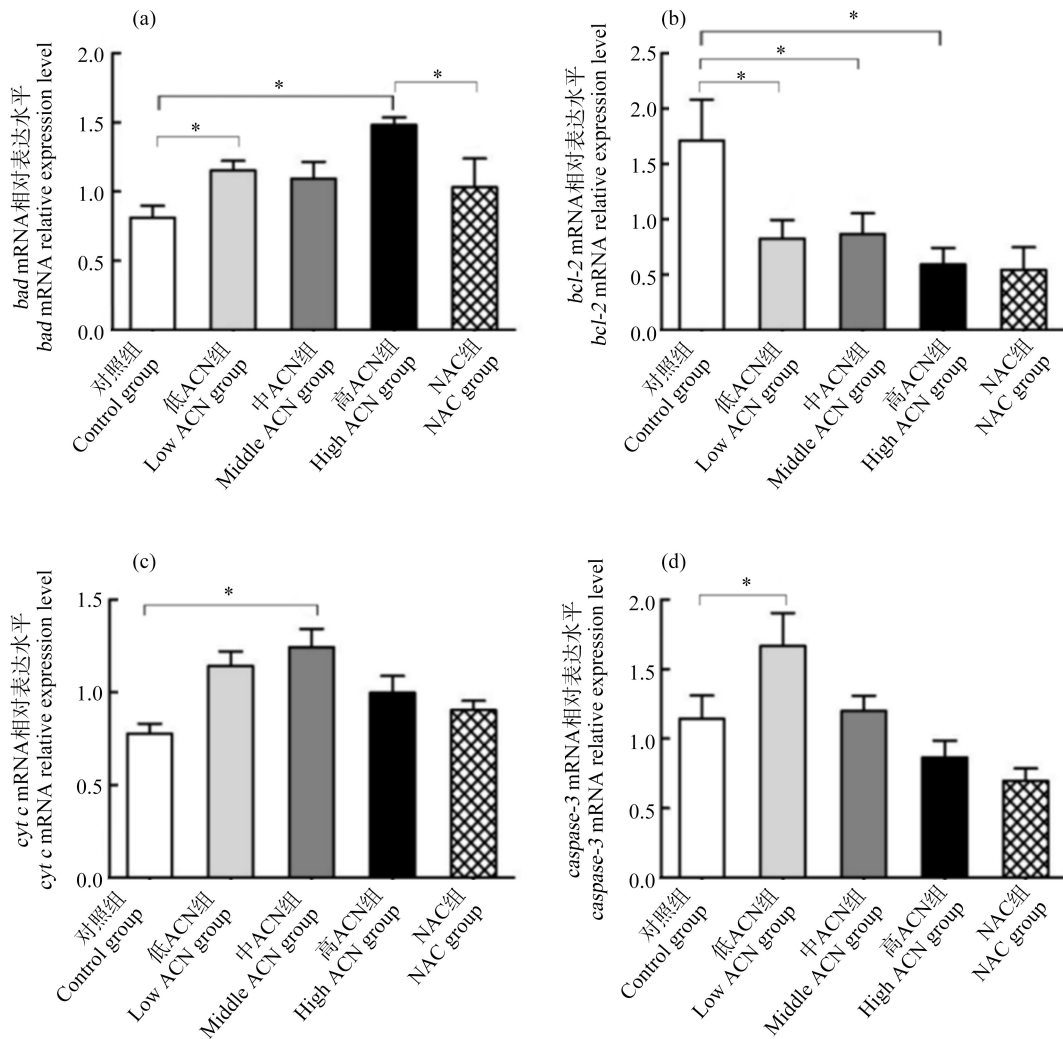


图 4 ACN 对大鼠肝脏 *bad*、*bcl-2*、*cyt c* 和 *caspase-3* mRNA 相对表达水平的影响 ($n=6$)

注:与对照组相比,*表示 $P<0.05$;图(a)为 *bad* mRNA 的相对表达水平,图(b)为 *bcl-2* mRNA 的相对表达水平,图(c)为 *cyt c* mRNA 的相对表达水平,图(d)为 *caspase-3* mRNA 的相对表达水平。

Fig. 4 Effect of ACN on the relative expression levels of *bad*, *bcl-2*, *cyt c* and *caspase-3* mRNA in rat liver ($n=6$)

Note: Compared with the control, *represents $P<0.05$; (a) shows the relative expression level of *bad* mRNA, (b) shows the relative expression level of *bcl-2* mRNA, (c) shows the relative expression level of *cyt c* mRNA, (d) shows the relative expression level of *caspase-3* mRNA.

诱导的大鼠脑组织氧化应激水平;潘丽等^[6]发现 NAC 干预后可逆转 ACN 诱导的大鼠肝组织中丙二醛(MDA)含量升高、GSH 含量降低和超氧化物歧化酶(SOD)活性降低的变化,一定程度上减轻了肝组织的氧化损伤。本研究中,与 ACN 高剂量组相比, NAC 组 *bad* mRNA 相对表达水平显著降低, p-Bad、pro-Caspase-3 蛋白相对表达水平显著增高, Bax、Caspase-9 和 cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达水平显著降低。这表明 NAC 给予后对大鼠肝细胞凋亡具有一定的保护作用,进一步验证了氧化应激参与了 ACN 所致的大鼠肝细胞凋亡。

3.2 PI3K/AKT 信号通路在 ACN 所致大鼠肝细胞凋亡中的作用

Suo 等^[20]研究发现激活 PI3K/AKT 通路, Caspase-3 的活化可被抑制,可以起到抗氧化和抗凋亡的作用。研究报道,在 PI3K/AKT 通路中,激活的 PI3K 可以活化 AKT,从而使 Bad 蛋白磷酸化, Bcl-2、Bcl-xL 被释放出或两者结合被阻断并与 Bax 结合形成二聚体,起到抑制细胞凋亡的作用^[21];磷酸化的 Bax 可以直接与 Bcl-2 形成二聚体,起到抗凋亡的作用;活化的 AKT 可使 Caspase-9 磷酸化,发挥抑制凋亡的作用^[22]。

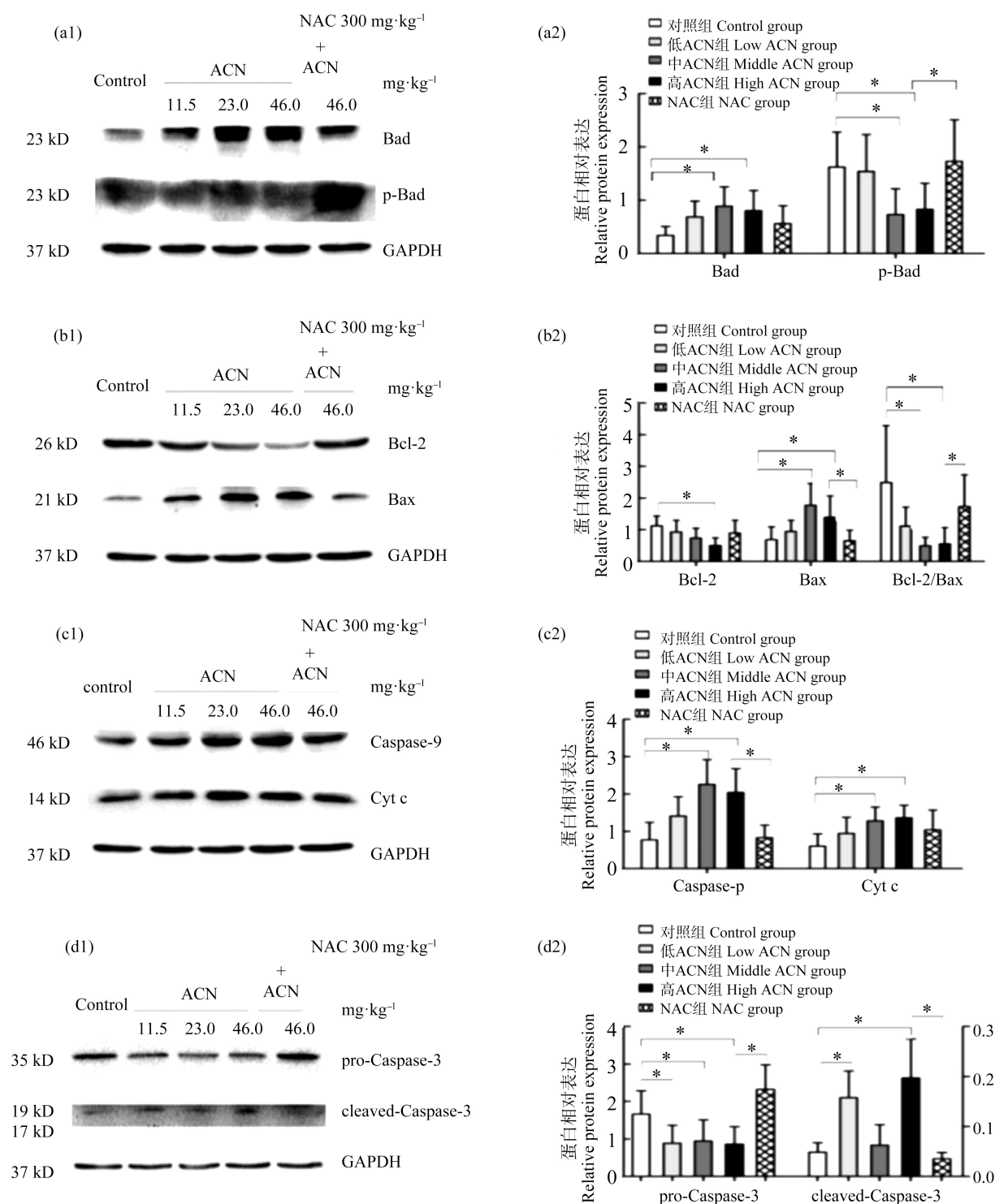


图5 ACN对大鼠肝脏细胞凋亡相关蛋白表达的影响($n=6$)

注:与对照组相比,*表示 $P<0.05$;图(a1)、(b1)、(c1)、(d1)分别为Bad和p-Bad、Bcl-2和Bax、Caspase-9和Cyt c、pro-Caspase-3和cleaved-Caspase-3的蛋白条带,图(a2)、(b2)、(c2)、(d2)分别为Bad和p-Bad、Bcl-2和Bax、Caspase-9和Cyt c、pro-Caspase-3和cleaved-Caspase-3蛋白相对表达量。

Fig. 5 Effect of ACN on the expression of apoptosis-related proteins in rat liver cells ($n=6$)

Note: Compared with the control, * represents $P<0.05$; (a1) show Bad and p-Bad protein bands, (b1) show Bcl-2 and Bax protein bands, (c1) show Caspase-9 and Cyt c protein bands, (d1) show pro-Caspase-3 and cleaved-Caspase-3 protein bands; (a2), (b2), (c2) and (d2) show the relative expression levels of Bad and p-Bad, Bcl-2 and Bax, Caspase-9 and Cyt c, pro-Caspase-3 and cleaved-Caspase-3 proteins respectively.

本研究结果显示,与对照组相比,ACN 中剂量组 *pi3k* mRNA 相对表达水平显著降低,PI3K 蛋白相对表达水平显著降低;ACN 高剂量组 *pi3k* mRNA 相对表达水平显著降低,p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平显著降低。这提示中剂量 ACN 染毒影响了 *pi3k* mRNA 和蛋白表达,高剂量 ACN 染毒影响了 *pi3k* mRNA 和 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达;ACN 中、高剂量组各指标的变化未同步显示出“一致性”,有待于今后深入研究。NAC 组 PI3K 蛋白相对表达水平较高剂量 ACN 组显著增高,显示出在给大鼠抗氧化剂处理后,可减轻 ACN 对 PI3K 蛋白相对表达水平的抑制。这提示 ACN 对大鼠肝脏的过氧化使 PI3K/AKT 信号通路抑制,进而促进了肝细胞的凋亡。

在本实验条件下,大鼠肝组织产生了病理学改变,血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶活性升高,肝组织过氧化氢酶活性降低,谷胱甘肽含量降低,丙二醛含量升高。ACN 可引起大鼠肝脂质过氧化水平升高,NAC 可减轻 ACN 引起的大鼠肝脏氧化损伤^[15]。因此,ACN 诱导的氧化应激、PI3K/AKT 信号通路的抑制和线粒体凋亡途径的激活可能是 ACN 致大鼠肝细胞损伤的主要机制。

通信作者简介:李芝兰(1962—),女,学士,教授,主要研究方向为环境与健康。

参考文献(References):

- [1] Cole P, Mandel J S, Collins J J. Acrylonitrile and cancer: A review of the epidemiology [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 52(3): 342-351
- [2] Poustková I, Poustka J, Babička L, et al. Acrylonitrile in food contact materials - Two different legislative approaches: Comparison of direct determination with indirect evaluation using migration into food simulants [J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2007, 25(5): 265-271
- [3] Nazaroff W W, Singer B C. Inhalation of hazardous air pollutants from environmental tobacco smoke in US residences [J]. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 2004, 14(Suppl 1): S71-S77
- [4] Ventura K, Eisner A, Adam M. Determination of acrylonitrile in materials in contact with foodstuffs [J]. *Central European Journal of Public Health*, 2004, 12 Suppl: S86-S89
- [5] 马国燕, 金娜, 李福轮, 等. 丙烯腈对小鼠肝组织脂质过氧化反应的影响[J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(5): 357-360
- Ma G Y, Jin N, Li F L, et al. Effects of acrylonitrile on lipid peroxidation in the liver tissues of mice [J]. *Journal of Toxicology*, 2011, 25(5): 357-360 (in Chinese)
- [6] 潘丽, 魏倩, 高霞, 等. 丙烯腈诱导的氧化应激对大鼠肝脏内质网应激信号通路的影响[J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(2): 77-83
- Pan L, Wei Q, Gao X, et al. Effects of acrylonitrile-induced oxidative damage on endoplasmic reticulum stress signaling pathway in rats' liver [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(2): 77-83 (in Chinese)
- [7] Mendoza M C, Er E E, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, 36(6): 320-328
- [8] Lam L, Hu X Y, Aktary Z, et al. Tamoxifen and ICI 182,780 increase Bcl-2 levels and inhibit growth of breast carcinoma cells by modulating PI3K/AKT, ERK and IGF-1R pathways independent of ER α [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2009, 118(3): 605-621
- [9] West K A, Sianna Castillo S, Dennis P A. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance [J]. *Drug Resistance Updates*, 2002, 5(6): 234-248
- [10] Chong Z Z, Li F Q, Maiese K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease [J]. *Progress in Neurobiology*, 2005, 75(3): 207-246
- [11] Schürmann A, Mooney A F, Sanders L C, et al. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(2): 453-461
- [12] Datta S R, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. *Cell*, 1997, 91(2): 231-241
- [13] Valera A, Pujol A, Gregori X, et al. Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis [J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1995, 9(11): 1067-1078
- [14] Nogueira V, Park Y, Chen C C, et al. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(6): 458-470
- [15] 郑爱, 赵粉线, 石影, 等. 丙烯腈亚急性染毒致大鼠肝损伤及其可能机制探讨[J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(1): 10-14
- [16] 郑爱. PI₃K/AKT 信号通路在丙烯腈诱导的大鼠肝细胞凋亡中的作用[D]. 兰州: 兰州大学, 2019: 1-37
- [17] 赵乾龙, 罗波艳, 潘丽, 等. 丙烯腈诱导的氧化应激对

- 大鼠睾丸 NF- κ B 信号通路的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(4): 155-160
- Zhao Q L, Luo B Y, Pan L, et al. Effects of oxidative stress induced via acrylonitrile on NF- κ B signaling pathway in rats testis [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(4): 155-160 (in Chinese)
- [18] 张瑞萍, 魏倩, 高霞, 等. 丙烯腈暴露通过 NF- κ B 信号通路诱导大鼠脑组织氧化应激[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 186-194
- Zhang R P, Wei Q, Gao X, et al. Acrylonitrile exposure induced oxidative stress in rat brain tissues through the NF- κ B signaling pathway [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 186-194 (in Chinese)
- [19] 罗波艳, 张瑞萍, 王珂, 等. 丙烯腈暴露对大鼠脑组织损伤及 iNOS/p38 MAPK 信号通路关键蛋白表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 84-90
- Luo B Y, Zhang R P, Wang K, et al. The effects of acrylonitrile-exposure on brain tissue and the key protein expression of iNOS/p38 MAPK signaling pathway in rats [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(2): 84-90 (in Chinese)
- [20] Suo L D, Kang K, Wang X, et al. Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in rats [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104043
- [21] Song G, Ouyang G L, Bao S D. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2005, 9(1): 59-71
- [22] Yang P, Zhao J Y, Hou L Y, et al. Vitamin E succinate induces apoptosis via the PI3K/AKT signaling pathways in EC109 esophageal cancer cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(2): 1531-1537 ◆