· 实验研究 ·

蓝莓对大鼠肝纤维化 PI3K-Akt 信号通路影响*

丁艳菊，陆爽，吴君，程明亮

摘　要：目的　观察磷脂酰肌醇 -3 激酶/蛋白激酶（PI3K/Akt）信号通路在猪血清所致的免疫性大鼠肝组织纤维化中作用及蓝莓影响。**方法**　60 只健康雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、蓝莓原浆低、中、高剂量组（每天灌胃给予 0.25、0.50、1.00 mL/100 g）及复方鳖甲软肝片组（每天灌胃 0.054 g/100 g），每组 10 只，除对照组外，其余各组均采用每周二、五腹腔注射猪血清复制大鼠肝纤维化模型，共 12 周；测定大鼠肝脏指数及血清丙氨酸转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST），观察肝组织病理学改变，采用免疫组织化学、Western blot 法检测肝组织 Akt1、磷酸化 Akt1（p-Akt1）表达。**结果**　与对照组比较，模型组大鼠肝脏指数（0.58 ± 0.02）明显升高（$P < 0.01$），肝纤维化明显；与模型组比较，蓝莓高剂量组大鼠肝指数（0.37 ± 0.06）明显降低（$P < 0.01$），肝纤维化程度明显减轻；与对照组比较，模型组大鼠肝组织中 Akt1、p-Akt1 蛋白表达量［分别为（0.99 ± 0.09）、（0.81 ± 0.06）］明显增加（$P < 0.01$）；与模型组比较，蓝莓高、中剂量组大鼠肝组织中 Akt1、p-Akt1 蛋白表达量［分别为（0.39 ± 0.13）、（0.42 ± 0.15）与（0.44 ± 0.06）、（0.43 ± 0.12）］明显下调（$P < 0.01$）。**结论**　蓝莓对大鼠免疫性肝纤维化发生发展过程具有干预作用，其机制可能与 PI3K/Akt 信号通路激活有关。

关键词：蓝莓；肝纤维化；磷脂酰肌醇 -3 激酶/蛋白激酶（PI3K/Akt）；信号通路

中图分类号：R 151.3　**文献标志码：**A　**文章编号：**1001-0580(2017)05-0747-04　DOI：10.11847/zgggws2017-33-05-16

Effect of blueberry on PI3K/Akt signaling pathway in rats with hepatic fibrosis

DING Yan-ju, LU Shuang, WU Jun, et al (*Department of Infectious Diseases*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang*, *Guizhou Province* 550004, China)

Abstract: Objective　To observe the change in phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway in rats with hepatic fibrosis induced by porcine serum immunization and to explore the effect of blueberry on the change of the signaling pathway. **Methods**　Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a normal control group, a hepatic fibrosis model group, three blueberry treatment groups (at dosages of 0.25, 0.50, and 1.00 ml juice/100 g body weight by gavage daily), and a Compound Biejiaruangan Troche (CBT, an traditional Chinese patent medicine made mainly of *Carapax Trionycis*, *Panax notoginseng*, *Radix Paeoniae Rubra*, *Ophiocordyceps sinensis*, and *Forsythia suspense*, at dose of 0.054 g/100 g body weight by gavage daily). All the rats, except for those of the normal control group, were injected intraperitoneally with porcine serum twice a week (on second and fifth weekday) for 12 weeks to establish hepatic fibrosis model; the rats of blueberry and CBT group were administered, respectively, with blueberry juice and CBT simultaneously. All the rats were sacrificed by the end of 12-week treatment. Liver index, serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined. Pathological changes in the hepatic tissue were observed with hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of protein kinase B (Akt1) and phosphorylated Akt1 (p-Akt1) were detected with immunohistochemistry and Western blot. **Results**　Compared with in the normal control group, the liver index (0.58 ± 0.02) increased significantly ($P < 0.01$) and liver fibrosis was obvious in the liver fibrosis model; while, the liver index (0.37 ± 0.06) was significantly lower ($P < 0.01$) and liver fibrosis was alleviated in the blueberry treatment groups compared to those in the liver fibrosis model group. Compared with hepatic fibrosis model group, the expression of Akt1 (0.99 ± 0.09) and p-Akt1 (0.81 ± 0.06) were significantly increased in the liver fibrosis model group (both $P < 0.01$) compared to those in the control group; whereas the expressions of Akt1 (0.39 ± 0.13 and 0.42 ± 0.15) and p-Akt1 (0.44 ± 0.06 and 0.43 ± 0.12) were significantly decreased in the moderate and high dose blueberry treatment groups compared to those in the liver fibrosis model group (both $P < 0.01$). **Conclusion**　Blueberry can impact the development of immune hepatic fibrosis in rats and the effect may be related to the activation of PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: blueberry; liver fibrosis; phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B; signaling pathway

肝纤维化是由各种慢性肝损伤引起的持续伤口愈合反应所致的一种肝脏病理性改变[1]，肝星状细胞（hepatic stellate cells, HSC）的活化和细胞外基质（extracellular matrix, ECM）的沉积为其中心环

* **基金项目：**贵州省科技厅社会攻关项目（黔科合 SY[2010]3017）
作者单位：贵州医科大学感染病学教研室，贵州 贵阳 550004
作者简介：丁艳菊（1989 -），女，湖北人，硕士在读，研究方向：肝纤维化的防治。
通讯作者：陆爽，E-mail：Lushuang73@163.com
数字出版日期：2016 -5 -19 16:16
数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160519.1616.044.html

节[2]。近年来对肝纤维化形成过程中信号通路的研究倍受关注。磷脂酰肌醇 3 激酶/ 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路就是其中重要的一条,可通过调节细胞外机质降解、HSC 活化、肝窦毛细血管化等参与肝纤维化的形成[3-4]。蓝莓属杜鹃花科越桔属,小浆果类蓝色水果,因其富含花青素,多酚类和黄酮类化合物而具有降血压、抗癌、改善记忆力等作用,具有强抗氧化性[5-9]。研究表明蓝莓可增强机体抗氧化能力,抑制大鼠 HSC 增殖、活化及诱导 HSC 凋亡从而对大鼠肝纤维化发挥一定的干预作用[10-15]。本研究采用猪血清复制大鼠肝纤维化模型,观察大鼠肝组织中 PI3K/Akt 信号通路变化,旨在探讨蓝莓对免疫性大鼠肝纤维化干预作用及机制。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*实验动物*　健康雄性清洁级 SD 大鼠 60 只,体重(180 ± 20) g,购于贵州医科大学动物实验中心,许可证号:SYXK(黔)2015 - 0001;普通饲料喂养,自然采光,自由饮水,实验前适应性喂养 1 周。

1.2　*主要试剂与仪器*　蓝莓(含有花青苷、绿原酸、黄酮素、亚麻油酸、白藜芦醇等化学成分,100 g 蓝莓含总花青苷 558.3 mg)由贵州省麻江县蓝莓生产基地提供, - 20 ℃储存,使用时鲜榨汁[11];复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司);无菌猪血清(北京燕生政博生物科技有限公司);protein kinase B (Akt1)、phosphorylated Akt1 (p-Akt1)抗体(美国 Santa Cruz 公司);β-actin 抗体、羊抗兔二抗(美国 Abmart 公司);免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺显色试剂盒(北京中杉金桥公司);蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物公司);electrochemiluminescence (ECL)化学发光试剂(成都百乐公司)。全自动荧光酶标仪(美国 Beckman 公司);微量移液器(美国 Eppendorf 公司);电泳仪(美国 Bio-rad 公司);X 射线曝光盒(北京华瑞森科技有限公司);瞬时离心机(中国科析仪器有限公司)。

1.3　*动物分组与处理*　60 只健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为对照组、模型组、蓝莓原浆高、中、低剂量组及阳性对照组,每组 10 只,除对照组外,其余各组大鼠每周二、五腹腔注射无菌猪血清,0.5 mL/只,造模同时蓝莓原浆高、中、低剂量组大鼠分别每天灌胃给予蓝莓原浆 1.00、0.50、0.25 mL/100g,阳性对照组大鼠每天给予复方鳖甲软肝片(0.054 g/100g)灌胃[14];12 周末股动脉放血处死大鼠,留取血清,测定肝脏指数,取相同部位肝组织用 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,行苏木素伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE),剩余肝组织 - 80 ℃保存。

1.4　*指标与方法*

1.4.1　肝脏指数测定　肝脏指数 = 肝脏湿重/体重 ×100%。

1.4.2　生化指标检测　血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)采用生化分析仪按试剂盒说明书操作。

1.4.3　大鼠肝组织中 Akt1、p-Akt1 表达定位检测　采用免疫组织化学法,大鼠肝组织切片常规脱蜡、水化,高压热修复,一抗 4 ℃过夜,二抗室温孵育 20 min,二氨基联苯胺溶液显色,蒸馏水冲洗、复染、脱水、透明封片,光镜下观察棕黄色区域为阳性;每张切片随机选取 5 个高倍视野(×400),观察阳性表达的定位及阳性表达细胞数占细胞总数的百分比。

1.4.4　大鼠肝组织中 Akt1、p-Akt1 表达量检测　采用 Western blot 法,按照试剂盒说明书提取蛋白并定量,取蛋白样品 40 μg,12% 聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl-polyacryl gradient gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,一抗(1∶200)4 ℃孵育过夜,二抗(1∶10 000)室温摇床孵育 2 h, ECL 曝光显影, Gel Doc EQ 凝胶成像仪扫描, Quantity One 软件分析结果;以 β-actin 作为内参照,用目标蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示目标蛋白相对表达量。

1.5　*统计分析*　计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,分析前先检查方差齐性,方差齐时采用最小显著差法,方差不齐时采用 Tamhane′s 法;等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　*蓝莓对大鼠肝脏指数及血清 ALT、AST 水平影响(表 1)*　与对照组比较,模型组大鼠肝脏指数明显升高,差异统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,中、高剂量蓝莓组及阳性对照组大鼠肝脏指数明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);各组大鼠血清 ALT、AST 水平无明显变化。

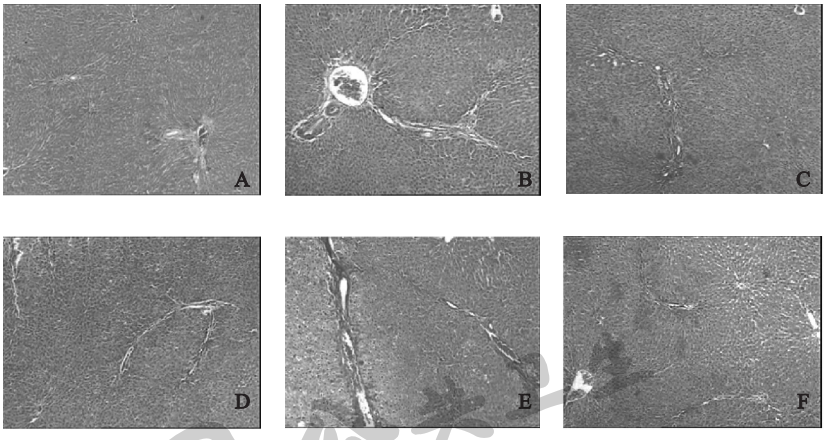
表 1　蓝莓对大鼠肝脏指数及血清 ALT、AST 水平影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mL/100 g)	肝脏指数	ALT(U/L)	AST(U/L)
对照组	0.32 ± 0.03	57.44 ± 12.06	143.50 ± 20.22
模型组	0.58 ± 0.02[a]	66.48 ± 7.65	160.66 ± 23.69
蓝莓　1.00	0.37 ± 0.06[b]	61.59 ± 7.99	145.35 ± 28.64
0.50	0.36 ± 0.02[b]	61.77 ± 13.37	156.35 ± 28.66
0.25	0.53 ± 0.02[a]	66.29 ± 8.62	159.90 ± 28.32
阳性对照组	0.35 ± 0.06[b]	60.91 ± 15.99	143.62 ± 23.64

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与模型组比较,b $P < 0.01$。

中国公共卫生 CPH

2.2　蓝莓对大鼠肝组织结构影响(图 1)　HE 染色结果显示,对照组大鼠肝脏组织结构正常,肝小叶结构清楚,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状分布,汇管区及肝组织内无胶原纤维增生(图 1A);模型组大鼠肝实质广泛破坏,肝索排列紊乱,汇管区纤维结缔组织增生,胶原纤维向肝实质延伸,分割正常肝组织,形成假小叶,纤维化明显(图 1B);高、中剂量蓝莓组及阳性对照(复方鳖甲软肝片)组大鼠肝纤维化程度明显减轻(图 1C、D、F);低剂量蓝莓组大鼠肝纤维化程度基本同模型组(图 1E)。

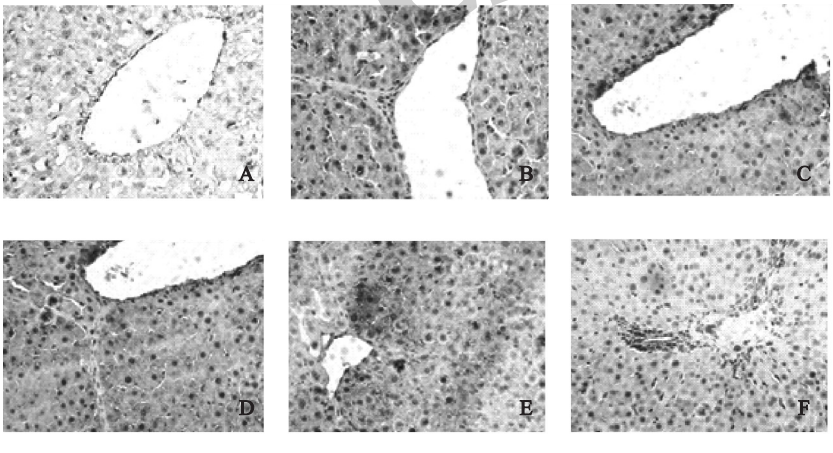


注:A:对照组;B:模型组;C、D、E:蓝莓高、中、低剂量组;F:阳性对照(复方鳖甲软肝片)组。

图 1　蓝莓对大鼠肝组织病理学影响(HE, ×40)

2.3　蓝莓对大鼠肝组织中 Akt1、P-Akt1 蛋白表达影响

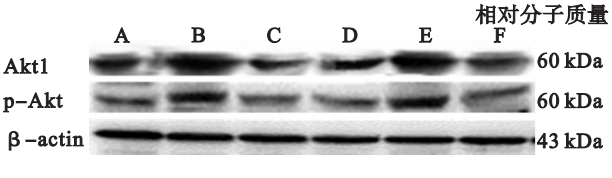
2.3.1　蓝莓对大鼠肝组织中 Akt1 蛋白定位表达影响(图 2)　免疫组化结果显示,对照组大鼠肝组织中有少量 Akt1 阳性表达或者不表达(图 2A);模型组大鼠肝组织中 Akt1 阳性表达明显增加,其阳性表达位于肝细胞及间质细胞的胞浆中(图 2B);高、中剂量蓝莓组大鼠肝组织中 Akt1 阳性表达较模型组明显减少(图 C、D)。



注:A:对照组;B:模型组;C、D、E:蓝莓高、中、低剂量组;F:阳性对照(复方鳖甲软肝片)组。

图 2　蓝莓对大鼠肝组织中 Akt1 的表达影响(免疫组化)

2.3.2　蓝莓对大鼠肝组织中 Akt1、p-Akt1 蛋白表达量影响(图 3、表 2)　与对照组比较,模型组大鼠



注:A:对照组;B:模型组;C、D、E:蓝莓高、中、低剂量组;F:阳性对照(复方鳖甲软肝片)组。

图 3　蓝莓对大鼠肝组织 Akt1、p-Akt1 的表达量影响(蛋白印迹)

表 2　蓝莓对大鼠肝组织中 Akt1、p-Akt1 蛋白表达水平影响($x \pm s$, $n = 10$)

组别(mL/100g)	Akt	p－Akt
对照组	0.37 ± 0.04	0.30 ± 0.05
模型组	0.99 ± 0.09[a]	0.81 ± 0.06[a]
蓝莓　1.00	0.39 ± 0.13[b]	0.42 ± 0.15[b]
0.50	0.44 ± 0.06[b]	0.43 ± 0.12[b]
0.25	0.92 ± 0.06[a]	0.72 ± 0.07[a]
阳性对照组	0.38 ± 0.03[b]	0.40 ± 0.03[b]

注:与对照组比较,a $P < 0.01$,与模型组比较,b $P < 0.01$。

肝组织中 Akt1、p-Akt1 蛋白表达量明显增高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与模型组比较，高、中剂量蓝莓组大鼠肝组织中 Akt1、p-Akt1 蛋白表达量明显降低，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

3 讨　论

PI3K/Akt 信号通路是一种信号级联放大反应，在细胞存活与分化、细胞生长、运动和凋亡、肿瘤等多种生理病理过程中发挥着至关重要作用[16-19]。PI3K 能特异性催化磷酯酰肌醇 3 位羟基磷酸化，产生具有第二信使作用的肌醇物质的激酶，募集和激活下游靶物质，从而启动一系列信号级联反应[20-21]，丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（Akt）是 PI3K 下游的一个重要靶激酶，p-Akt 是 Akt 的活化状态，Akt 只有转化成 p-Akt 才能发挥生物学效应，活化的 Akt 进一步激活或抑制其下游靶蛋白，进而调节各种生理病理过程[22]。肝纤维化导致大多数慢性肝病及并发症，一直是临床肝脏病学研究的中心环节，是一个亟待解决的难题[23]。PI3K/Akt 信号通路在 HSC 的活化、增殖及凋亡中发挥着重要作用[24]。本研究结果显示，模型组大鼠肝组织纤维化明显，蓝莓高、中剂量组大鼠肝纤维化程度明显减轻；模型组大鼠肝组织中 Akt 及 p-Akt 蛋白水平较对照组明显增加，而蓝莓原浆高、中剂量组大鼠肝组织中 Akt 及 p-Akt 蛋白水平较模型组明显下调。提示，PI3K/Akt 信号通路参与了肝纤维化的发生发展过程，蓝莓对免疫性肝纤维化过程具有一定干预作用，其机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路，降低 Akt 及 p-Akt 蛋白表达水平有关。

参考文献

[1] Lambrecht J, Mannaerts I, van Grunsven LA. The role of miRNAs in stress-responsive hepatic stellate cells during liver fibrosis[J]. Front Physiol, 2015, 6: 209.

[2] Mehal W, Imaeda A. Cell death and fibrogenesis[J]. Semin Liver Dis, 2010, 30: 226-231.

[3] 潘澎，刘绍能. PI3K/Akt 信号通路与肝纤维化[J]. 临床肝胆病杂志，2013，29(5)：389-396.

[4] Voloshenyuk TG, Landesman ES, Khoutorova E, et al. Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF-β1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling[J]. Cytokine, 2011, 55: 90-97.

[5] Kristo AS, Kalea AZ, Schuschke DA, et al. A wild blueberry-enriched diet (*Vaccinium angustifolium*) improves vascular tone in the adult spontaneously hypertensive rat[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(22): 11600-11605.

[6] Wiseman W, Egan JM, Slemmer JE, et al. Feeding blueberry diets inhibits angiotensin II-converting enzyme (ACE) activity in spontaneously hypertensive stroke-prone rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2011, 89(1): 67-71.

[7] Zu XY, Zhang ZY, Zhang XW, et al. Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum L.*) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(19): 2714-2719.

[8] Malin DH, Lee DR, Goyarzu P, et al. Short-term blueberry-enriched diet prevents and reverses object recognition memory loss in aging rats[J]. Nutrition, 2011, 27(3): 338-342.

[9] Liu Y, Zhang D, Hu J, et al. Visible light-induced lipid peroxidation of unsaturated fatty acids in the retina and the inhibitory effects of blueberry polyphenols[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(42): 9295-9305.

[10] 王豫萍，程明亮，吴亚云，等. 蓝莓对大鼠肝星状细胞增殖、活化的影响及机制探讨[J]. 中华医学杂志，2010，90(35)：2504-2508.

[11] 陆爽，程明亮，李宏，等. 蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠细胞色素 P4502E1 表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2012，20(7)：497-502.

[12] 李宏，杨勤，程明亮，等. 蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 TLR4、TLR9 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志，2012，20(18)：1609-1615.

[13] 陆爽，程明亮，李宏，等. 蓝莓对大鼠免疫性肝纤维化超微结构及 CYP2E1 表达的影响[J]. 中华中医药杂志，2012，27(4)：885-889.

[14] 陆爽，程明亮，杨德猛，等. 蓝莓对大鼠肝星状细胞 T6 凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中华医学杂志，2015，95(31)：2560-2564.

[15] 王豫萍，程明亮，关丽，等. 蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠 HGF 表达的影响[J]. 中国公共卫生，2012，28(8)：1051-1054.

[16] Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer[J]. Front Oncol, 2014, 4: 64.

[17] 施凤，朱萱. NOX 介导的 MAPK、PI3K/Akt 信号通路与肝纤维化的研究进展[J]. 世界华人消化杂志，2012，20：2685-2690.

[18] Zhang J, Yu XH, Yan YG, et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma[J]. Clinica Chimica Acta, 2015, 444: 182-192.

[19] Yang B, Jia QA, Ren ZG, et al. The herbal compound Songyou Yin (SYY) inhibits hepatocellular carcinoma growth and improves survival in models of chronic fibrosis via paracrine inhibition of activated hepatic stellate cells[J]. Oncotarget, 2015, 6: 37.

[20] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8): 550-562.

[21] Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters[J]. Oncogene, 2008, 27(50): 6473-6488.

[22] Sun Y, Kaneko S, Li XK, et al. The PI3K/Akt signal hyperactivates Eya1 via the SUMOylation pathway[J]. Oncogene, 2015, 34: 2527-2537.

[23] Robert S, Ramon B. Liver fibrosis[J]. Semin Liver Dis, 2015, 35: 95-96.

[24] 胡晓霞，王艳，王晋星一. 汉丹肝乐对大鼠肝纤维化 PI3K/Akt 信号通路的影响及意义[J]. 世界华人消化杂志，2014，22(14)：1915-1920.

收稿日期： 2016-02-17　　（解学魁编辑　韩仰欢校对）