

· 肿瘤学研究 ·

肝脏缺血激活 PI3K/p-Akt2 信号通路并促进库普弗细胞向 M1 型巨噬细胞转化

华东旭¹, 王明明¹, 马国华¹, 张少鹏², 吴 泉², 汪 瀚^{1*}

¹南京医科大学附属江宁医院普外科, 江苏 南京 211100; ²南京医科大学第一附属医院肝移植中心, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 研究肝脏库普弗细胞(Kupffer cells, KCs)在肝脏缺血及再灌注过程中的转化转归及其在肝脏缺血再灌注损伤中的作用。方法: 制作小鼠肝脏不同缺血时间的模型, 用流式细胞术分析缺血后 KCs 数量, 体外培养中用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术分析炎症细胞因子的表达及巨噬细胞表面标记物的表达水平, 免疫印迹(Western blot)技术分析磷脂酰肌醇3-激酶/磷酸化蛋白激酶 B-2(PI3K/p-Akt2)信号通路的表达情况。使用 qPCR 技术分析 Akt2 抑制剂对 KCs 炎症细胞因子的表达及其表面标记物表达的影响, 另外小鼠肝脏缺血后再灌注 6 h, 通过肝脏切片 HE 染色及血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平等指标分析肝脏损伤情况。结果: 肝脏缺血后 KCs 数量减少, 而存活细胞在体外培养中, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后促炎症细胞因子的表达明显高于对照组($P < 0.05$), 且 M1 型巨噬细胞的表面标记物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达水平也高于对照组($P < 0.05$), 其细胞内的 PI3K/p-Akt2 通路被激活, 促进 KCs 向 M1 型巨噬细胞转化, 而 Akt2 抑制剂可阻断细胞转化过程, 减轻肝脏缺血再灌注损伤。结论: 小鼠肝脏缺血能激活 KCs 内 PI3K/p-Akt2 信号通路, 从而在炎症刺激下促进其向 M1 型巨噬细胞转化, 并加重肝脏缺血再灌注损伤。

[关键词] 库普弗细胞; 肝脏; 缺血再灌注损伤; 巨噬细胞; 转化

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1177-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20190815

Liver ischemia can activate PI3K/p - Akt2 signaling pathway and then promote the transformation of Kupffer cells into M1 macrophages

Hua Dongxu¹, Wang Mingming¹, Ma Guohua¹, Zhang Shaopeng², Wu Xiao², Wang Han^{1*}

¹Department of General Surgery, the Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211100;

²Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the transformation of Kupffer cells (KCs) in the process of liver ischemia and reperfusion and its role in liver ischemia-reperfusion injury. **Methods:** Mice models of liver ischemia at different time were established. Flow cytometry was used to analyze the number of KCs after ischemia. qPCR was used to analyze the expression of inflammatory cytokines and surface markers of macrophages. Western blotting was used to analyze PI3K/p-Akt2 signaling pathway. After using Akt2 inhibitor before ischemia, the cells were extracted for cell culture *in vitro*. The expression of inflammatory cytokines and surface markers of macrophages were analyzed by qPCR. In addition, liver injury was analyzed by HE staining of liver slices and serum alanine aminotransferase (ALT) after 6 hours of liver ischemia reperfusion in mice. **Results:** The number of KCs decreased after ischemia in liver, and the expression of pro-inflammatory cytokines in surviving cells stimulated by LPS was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$), and the expression level of iNOS, a surface marker of M1 macrophages, was also higher than that in control group ($P < 0.05$). The PI3K/p - Akt2 signaling pathway in the cells was activated, thus promoting the transformation of KCs to M1 macrophages after ischemia. The transformation can be blocked by Akt2 inhibitor, and it protects liver from ischemia-reperfusion injury. **Conclusion:** Liver ischemia in mice promotes the transformation of KCs to M1 macrophages through activating PI3K/p-Akt2 signaling pathway and aggravates liver ischemia-reperfusion injury.

[Key words] Kupffer cells; liver; ischemia-reperfusion injury; macrophages; transformation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1177-1182]

[基金项目] 国家自然科学基金(81571564, 91442117); 国家科技部 863 青年科学家专题(SS2015AA020932)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wanghanzy18@126.com

肝脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是肝脏手术如肿瘤切除、肝移植等术后造成肝脏损伤及功能障碍加重的主要原因之一。其中促炎性免疫活化反应是缺血再灌注损伤的非常重要的机制之一^[1-3]。库普弗细胞(Kupffer cells, KCs)是巨噬细胞的一种,由胚胎时期卵黄囊发育而来^[4],是定居在肝脏内的最主要的一群免疫细胞,其表面标记为F4/80⁺CD11⁻,而区别于骨髓来源的浸润性巨噬细胞,表面标记为F4/80⁺CD11⁺。KCs也通常被认为具有M2型巨噬细胞的功能,通常发挥着抗炎作用^[5],而浸润性巨噬细胞为M1型巨噬细胞,发挥着促炎作用,这两种细胞在肝脏炎性免疫反应中起着截然不同的作用^[6-8]。

M1和M2型巨噬细胞的极化需要在一定条件下才可以进行^[9]。蛋白激酶B(Akt)是机体内发挥生物学功能最为广泛的蛋白之一,参与细胞增殖、分化、凋亡,肿瘤发生发展,细胞炎性活化等部分或者整个过程,有研究显示磷酸化的Akt1和Akt2在一定条件下还可以影响巨噬细胞的极化方向,例如Akt1基因敲除细胞表现M1表型,Akt2基因敲除细胞表现M2表型^[10]。目前大部分基于KCs的研究重点都集中在缺血后的再灌注过程中,而再灌注过程会趋化招募来许多骨髓来源的巨噬细胞(F4/80⁺CD11⁺)进入肝脏^[6],从而影响对定居肝脏的KCs在缺血的过程中是否被激活及激活后如何转化转归的判断,忽略其在再灌注后的炎性免疫反应中发挥的作用。有研究证实了肝脏内部分KCs在缺血过程中RIP1通路被激活,最后走向了凋亡^[11]。这也是细胞在极端环境下的一种适应性改变,但是存活的细胞是否也发生了另外一种适应性改变,还是否是原来的KCs及是否还保持着原来的细胞功能仍不得而知。而本课题组预实验发现缺血后的KCs经脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后表达的炎性细胞因子水平有别于正常KCs,所以猜测缺血后的细胞发生了某种改变。若这群细胞及功能发生改变,那势必会在再灌注过程中发挥某种生物学作用,进而也会影响到相应肝脏疾病的预后及转归。

本研究应用流式细胞术、PCR及免疫印迹等技术分析肝脏缺血后的KCs转化转归等情况,及在缺血再灌注损伤中发挥的作用情况。

1 材料和方法

1.1 材料

8~10周龄野生型C57BL/6雄性小鼠(南京医科

大学实验动物中心)。严格按照国家卫生研究院公布的实验动物护理和使用指南中的建议进行。动物协议书由南京医科大学动物保护和和使用委员会(IACUC)批准。

胎牛血清、DMEM培养基、PBS、EDTA、TROZOL(Gibco公司,美国);蛋白抗体(Cell Signaling Technology公司,美国);SYBR Green PCR、目标引物、ELISA试剂盒(Invitrogen Corporation公司,美国);4-20%Mini-PROTEAN[®] TGX[™]胶、2×Laemmli样品缓冲液(BIO-RAD公司,美国),细胞培养皿、培养板(Corning,美国);IV型胶原蛋白酶(Sigma公司,美国);流式抗体CD11b-FICIT、F4/80-PE(eBioscience公司,美国);Akt2抑制剂(CCT128930, Selleck.cn公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠缺血及再灌注模型的建立

C57BL/6小鼠用乙醚麻醉。常规消毒并打开腹腔,用血管夹夹住左门静脉、肝动脉、胆管处,此时肝脏缺血面积约为70%,建立缺血模型。缺血相应时间后松开血管夹,关闭腹腔,再灌注6h后取出肝脏用于后续实验,从而建立缺血再灌注模型。

1.2.2 小鼠肝脏KCs提取

将小鼠脱臼处死,常规消毒,置于超净台中,打开腹腔,将准备好的灌注液从门静脉灌入,冲洗肝脏,从下腔静脉流出,继而用37℃IV型胶原蛋白灌注液灌注肝脏,取出肝脏置于有培养液的培养皿中划破肝脏包膜,并轻轻晃动后得到浑浊细胞悬液。再经过低速离心,裂红,冲洗,低速离心等步骤后得到相对纯净的非实质细胞,再置于培养基中培养30min,取贴壁细胞用于后续的实验。

1.2.3 KCs体外培养实验

将以上方法提取的细胞以相同的细胞密度(1×10^6 个/孔)种植于6孔培养板中,实验分3组:空白组、对照组和实验组,空白组细胞培养开始加入PBS,对照组为肝脏不缺血灌注提取出来的KCs,培养开始加入LPS,实验组为肝脏缺血90min后灌注肝脏提取出来的KCs,培养开始加入LPS,分别培养6h和24h,取培养液用ELISA试剂盒检测肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-6以及IL-10等细胞因子表达水平,取细胞用PCR和Western blot检测相关RNA和蛋白的表达水平。

1.2.4 小鼠体内抑制实验及体外细胞培养实验

体内实验中,在小鼠肝脏缺血之前向小鼠腹腔

注射 Akt2 抑制剂 CCT128930 (30 mg/kg) 以阻断 PI3K/p-Akt2 信号通路,设此为实验组;对照组注射上述未加入 Akt2 抑制剂的溶液,均缺血 90 min;设未缺血亦未注射抑制剂的为空白组;设缺血但未注射抑制剂组为正常组。分选出细胞用于体外培养,比较各组的肝脏损伤情况及炎性细胞因子的表达水平。在体外细胞培养实验中,动物实验仍设上述 4 组,缺血后提取巨噬细胞进行细胞培养,使用 LPS 刺激 6 h 后用 ELISA 试剂盒分析炎性细胞因子的表达水平。

1.3 统计学方法

本实验所得的数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据之间比较采用 GraphPad Prism5.0 软件中的 Student *t* 检验或 ANOVA 进行。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

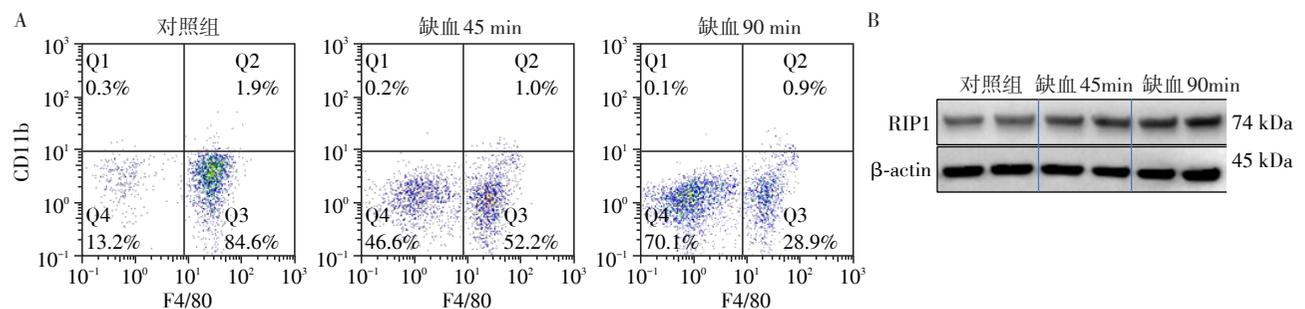
2.1 小鼠肝脏缺血后 KCs 数量减少而 RIP1 介导的坏死信号通路被激活

首先制作不同缺血时间(45 min、90 min)的动

物模型,然后灌注肝脏分选出非实质细胞,分别染色后用流式细胞仪进行检测,发现随着缺血时间的增加,F4/80⁺CD11⁻巨噬细胞(KCs)数量比例呈递减趋势(分别为 84.6%、52.2%、28.9%),而 F4/80⁻CD11⁻(死亡细胞)细胞比例依次增多,说明缺血时间越长,KCs 死亡的数量越多(图 1A)。然后验证了缺血后肝脏内 KCs 的凋亡通路表达情况,使用免疫印迹技术检测了 KCs 内的 RIP1 蛋白的表达,发现缺血后的肝脏 KCs RIP1 表达相对于对照组明显升高,且随着缺血时间的延长表达增多(图 1B),这也说明坏死的细胞数量增多。

2.2 体外炎性刺激缺血后 KCs 促炎细胞因子表达升高

上述实验已经对缺血后的 KCs 凋亡情况进行了验证,接下来对缺血后存活下来的 KCs 进行体外培养。在对照组和缺血组细胞培养液中加入 LPS(100 ng/mL)培养细胞 6 h 和 24 h 后,用 ELISA 检测培养液中的细胞因子表达情况,发现缺血组细胞表达的促炎性细胞因子例如 TNF- α 和 IL-6 均明显高于对照组 ($P < 0.05$),而抗炎性细胞因子例如 IL-10 表达水平



A:小鼠肝脏缺血 45、90 min 后的细胞群分布情况;B:小鼠肝脏缺血 45、90 min 后的 KCs RIP1 蛋白表达情况。分别与对照组(未缺血)相比较。

图 1 肝脏缺血不同时间后细胞分群及 RIP1 蛋白表达情况

Figure 1 Cell population and RIP1 protein expression after liver ischemia of different time

均低于对照组($P < 0.05$,图 2)。

2.3 体外炎性刺激缺血后 KCs 促其高表达 M1 型巨噬细胞表面标记物

已经发现了缺血后细胞与未缺血细胞的炎性细胞因子表达差异,于是猜想是否细胞类型及功能发生了改变。用流式细胞术检测了体外培养后细胞分群情况,发现缺血后的细胞于炎性刺激 6 h 后 F4/80⁺CD11⁺(M1 型)巨噬细胞数量增多,比例高达 37.9%,而 F4/80⁺CD11⁻巨噬细胞(KCs)数量减少(图 3A),说明部分 KCs 发生了向 M1 型巨噬细胞的转化,而未缺血细胞在炎性刺激后以及缺血后无炎性刺激均没有 F4/80⁺CD11⁺细胞比例增多(图 3A),说

明单纯炎性刺激 KCs 或者缺血不会明显促进细胞极性转变。另外使用 PCR 技术检测了细胞表型的表达情况,发现炎性刺激缺血后的 KCs, iNOS 的表达明显高于对照组($P < 0.05$),而 CD206、Arg1 的表达降低($P < 0.05$,图 3B)。而随着时间延长(6 h、24 h),两组之间的差异并没有明显变化,说明细胞的转化具有一定稳定性。

2.4 肝脏缺血激活 PI3K/p-Akt2 信号通路

接下来本课题组为探究 KCs 如何进行细胞极性转化,对细胞内的蛋白表达情况进行了系列检测,发现与对照组相比,存活的 KCs 在缺血后 p-Akt2 表达增高,p-Akt1 表达被抑制,而且缺血后的 KCs 在

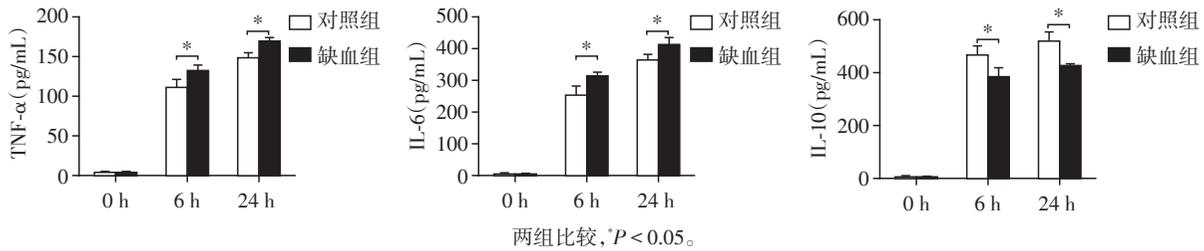
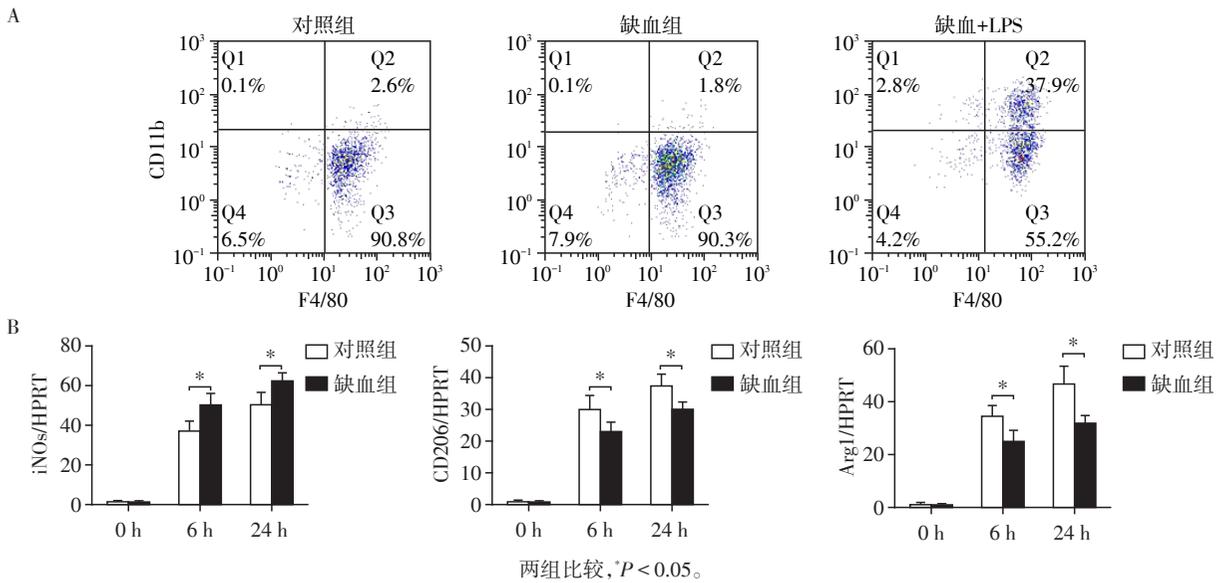


图2 肝脏缺血90 min KCs于体外培养不同时间时炎症细胞因子表达情况

Figure 2 Expression of inflammatory cytokines from KCs cultured *in vitro* at different times after 90 minutes of liver ischemia



A: 各组 KCs 不同条件培养 6 h 后的细胞分群情况; B: 未缺血与缺血后的 KCs 炎症刺激 6 h、24 h 的细胞表面分子表达情况。

图3 缺血对 KCs 表型的影响

Figure 3 Effect of ischemia on KCs phenotype

LPS 刺激 6 h 后 p-Akt2 表达进一步增多,而未缺血 KCs 内 p-Akt1 表达增多,相反 p-Akt2 表达被抑制,而各组总 Akt1/2 没有明显变化,PI3K 蛋白表达均增高(图4),说明 KCs 在炎症刺激下的细胞转化依赖于缺血环境下激活的 PI3K/p-Akt2 信号通路。

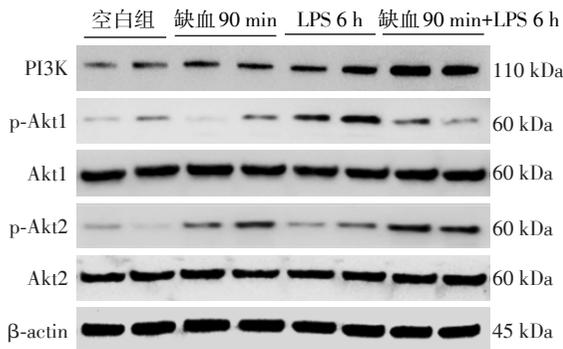


图4 肝脏缺血后 PI3K/p-Akt2 信号通路的表达情况

Figure 4 Expression of PI3K/p-Akt2 signaling pathway after liver ischemia

2.5 体内阻断 PI3K/p-Akt2 信号通路后 KCs 于炎症刺激下促炎细胞因子表达降低

体内实验中,在小鼠肝脏缺血之前向小鼠腹腔注射 Akt2 抑制剂以阻断 PI3K/p-Akt2 信号通路,首先验证了体内注射 Akt2 抑制剂对于阻断 Akt2 表达的效果,用免疫印迹技术检测了缺血后 KCs 的 Akt2 表达,发现实验组几乎没有 Akt2 表达(图5A),说明 Akt2 抑制剂用于小鼠体内实验有效。将分选出的细胞体外培养,在 LPS 刺激 6 h 后,用 ELISA 试剂盒检测各组炎症细胞因子的表达水平,发现实验组细胞表达的促炎性细胞因子如 TNF-α、IL-6 低于对照组,而抗炎性细胞因子 IL-10 的表达水平高于对照组 ($P < 0.05$,图5B),而正常组与对照组的差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 体内阻断 PI3K/p-Akt2 信号通路减轻了缺血再灌注损伤

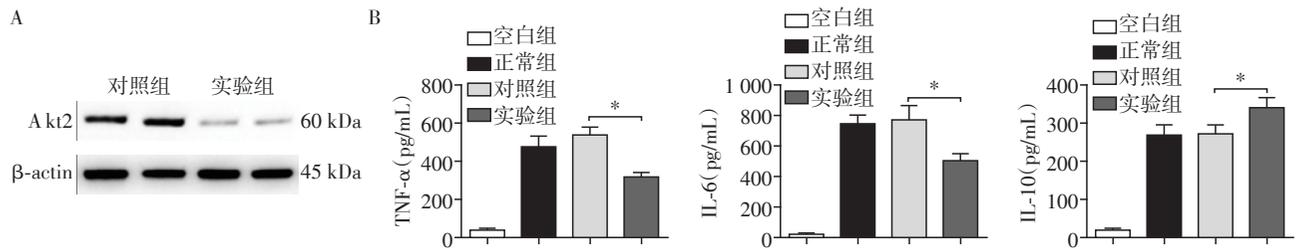
体外细胞培养实验中已经证实了 KCs 是通过

PI3K/p-Akt2信号通路向M1型巨噬细胞转化。在体内实验中,观察各组小鼠肝脏的损伤情况发现,使用Akt2抑制剂组小鼠肝脏损伤较对照组小(图6A),肝丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)结果显示实验组小鼠血液中ALT水平较对照组低(图6B),肝脏Suzuki评分中实验组也较对照组低(图6B),另外实验组肝脏表达的促炎性细胞因子如TNF- α 、IL-6低于对照组,而抗炎性细胞因子IL-10表达高于对照组(图6C),这些结果也与体外实验

结果相一致,说明KCs是通过PI3K/p-Akt2信号通路转化为M1型巨噬细胞,且在小鼠肝脏缺血再灌注过程中加重肝脏损伤。

3 讨论

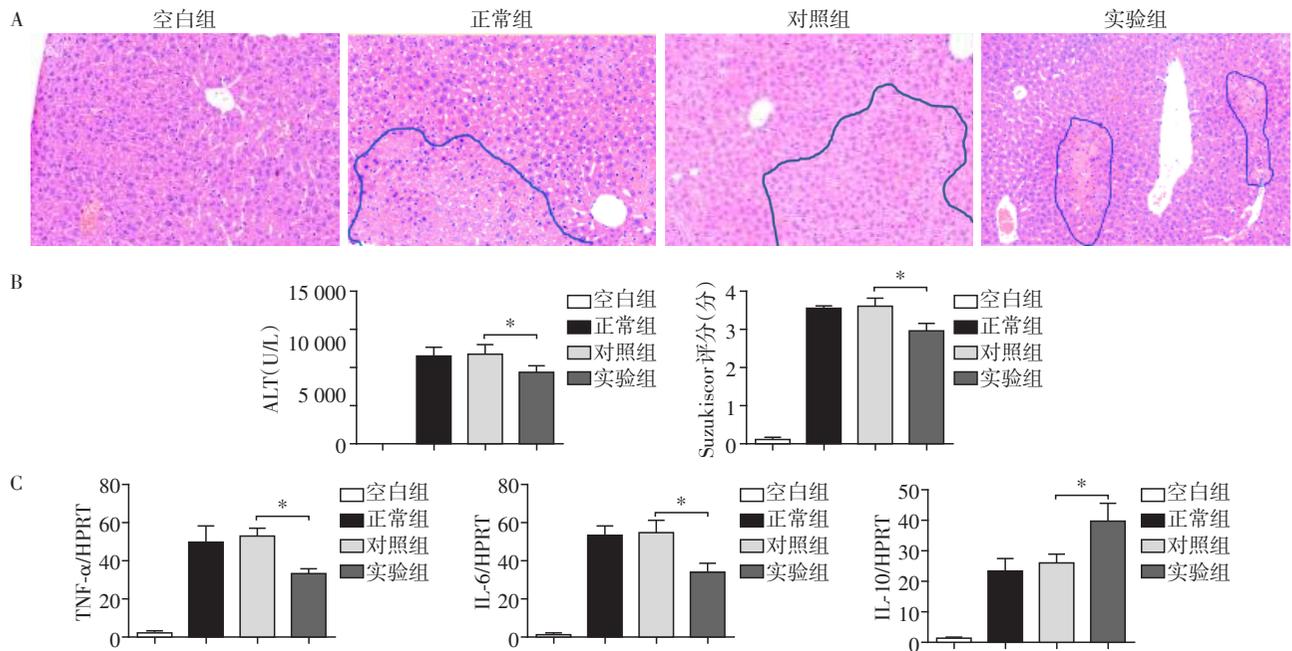
肝脏内KCs在肝脏炎症中的作用一直以来存在着争议,在不同的疾病过程中或者不同的炎症环境下都有着不同的抗炎或促炎作用^[2,6-7]。本课题主要研究在肝脏缺血及再灌注的过程中KCs发生着什么



A: Akt2抑制剂在动物体内发挥抑制作用的情况; B: Akt2抑制剂对缺血KCs的炎症细胞因子表达影响。两组比较, * $P < 0.05$ 。

图5 Akt2抑制剂对缺血后KCs转化的影响

Figure 5 Effect of Akt2 inhibitor on KCs transformation after ischemia



A: 不同处理的4组肝脏切片HE染色情况,蓝色线条圈出部分为损伤部位($\times 100$); B: 不同处理的4组血清ALT水平及肝脏损伤Suzuki评分情况; C: 不同处理的4组肝脏炎症细胞因子表达情况。两组比较, * $P < 0.05$ 。

图6 Akt2抑制剂对肝脏缺血再灌注损伤的影响

Figure 6 Effect of Akt2 inhibitor on liver ischemia-reperfusion injury

样的变化,以及在再灌注损伤中发挥着什么样的作用。美国加州大学洛杉矶分校肝脏中心的研究团队已经发现在肝脏缺血后,KCs数量不同程度减少^[11],本研究也得出相似的结果,通过流式细胞术分析缺

血不同时间后分选出的巨噬细胞发现,缺血时间越长,得到的KCs数量越少,而凋亡的KCs数量越多,说明缺血后的KCs一部分存活下来,一部分通过凋亡途径最终走向了死亡。这是在极端环境下部分

细胞不能通过适应性反应而被淘汰,另一部分细胞成功抵御了极端环境而生存下来,但是存活下来的细胞是否还是原来的KCs呢?这个不得而知。然而本研究团队在前期预实验中发现,在体外细胞培养中,缺血后的KCs相对于对照组,相同数量的巨噬细胞在LPS刺激后炎症细胞因子的表达差异有统计学意义。缺血后的巨噬细胞表达更高的促炎性细胞因子,例如TNF- α 、IL-6等,而IL-10等抗炎性细胞因子表达降低。这就不得不思考此时的KCs是否已经发生了M1型极化而表现出M1型细胞的功能。本研究团队于是检测了这群缺血后的细胞的表面标记物,研究结果又进一步验证了之前的猜想。实验证明缺血后的KCs部分在炎症环境下发生了M1极化或者正在向M1极化的过程中,其表面标记物iNOS表达升高,而CD206以及Arg1表达降低。相关文献报道Akt1/Akt2可以调控巨噬细胞的极化方向,Akt1基因敲除细胞表现为M1表型,Akt2基因敲除细胞表现为M2表型^[10];对细胞内信号通路的研究发现,缺血后的KCs向M1型巨噬细胞转化是通过PI3K/p-Akt2信号通路,且在缺血前阻断小鼠体内此信号通路,再分选出巨噬细胞体外培养,LPS刺激后促炎性细胞因子表达降低,且再灌注后小鼠肝脏损伤也较对照组减轻,说明阻断了KCs向M1型细胞的转化。

KCs在缺血后发生“叛变”而向M1型巨噬细胞转化,这在缺血再灌注损伤中无疑是雪上加霜,一般大家对缺血再灌注的研究都是作为一个连续过程进行研究,重点都放在了再灌注的损伤过程中,而本团队研究了再灌注前的缺血过程中KCs PI3K/p-Akt2信号通路被激活,而在再灌注过程中发生M1型巨噬细胞极化改变,加重肝脏缺血再灌注损伤。但是KCs发生这一“叛变”过程的根本原因仍不得而知,而且炎症刺激能进一步促进细胞转化的具体机制也仍不清楚,这需要更深入更全面的研究去发现这些机制。总之,本研究结果在一定程度上也为如何减轻肝脏缺血再灌注损伤过程提供了新的思路,例如如何保护KCs以及阻止其细胞数量的减少以保护肝脏从而减轻再灌注损伤,也给临床上减轻器官缺血再灌注损伤提供了新的方向。

[参考文献]

- [1] Zhou HM, Zhu JJ, Yue S, et al. The dichotomy of endoplasmic reticulum stress response in liver ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 2016, 100(2):365-372
- [2] Zhou HM, Wang H, Ni M, et al. Glycogen synthase kinase 3beta promotes liver innate immune activation by restraining AMP-activated protein kinase activation[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(1):99-109
- [3] 汪瀚, 翟原. 天然型调节性T细胞在胸腺内的分化发育机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(1):15-19
- [4] Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors[J]. *Nature*, 2015, 518(7540):547-551
- [5] Zheng QF, Bai L, Duan ZP, et al. M2-like Kupffer cells in fibrotic liver may protect against acute insult[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(20):3655-3663
- [6] Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5):306-321
- [7] Dong X, Liu J, Xu Y, et al. Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5):3835-3847
- [8] Kazankov K, Jorgensen SMD, Thomsen KL, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(3):145-159
- [9] Luo WJ, Xu QY, Wang Q, et al. Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:44612
- [10] Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(24):9517-9522
- [11] Yue S, Zhou HM, Wang XH, et al. Prolonged ischemia triggers necrotic depletion of tissue-resident macrophages to facilitate inflammatory immune activation in liver ischemia reperfusion injury[J]. *J Immunol*, 2017, 198(9):3588-3595

[收稿日期] 2019-04-13