

## · 基础研究 ·

## 大鼠腓肠肌内蛋白激酶 B 各亚型表达的年龄差异\*

张兵 夏春\*\* 陈福

(厦门大学医学院组织胚胎学教研室, 厦门 361005)

**【摘要】**目的 研究大鼠腓肠肌内蛋白激酶 B (Akt/PKB)各亚型伴随年龄变化的表达差异。方法 用反转录 PCR (RT-PCR)、免疫印迹 (western blotting)检测老年组 (30月龄)和青年组 (6月龄)大鼠腓肠肌内 Akt各亚型 mRNA 和蛋白表达,并统计分析比较。结果 (1)30月龄组大鼠腓肠肌内 Akt1 与 Akt2 的 mRNA 水平均高于 6月龄组 ( $t=7.124, P=0.000$ ;  $t=2.598, P=0.021$ ), Akt3 差异无显著性 ( $t=0.460, P=0.653$ )。 (2)两组间 Akt1 蛋白表达水平无显著变化 ( $t=0.469, P=0.646$ ), 30月龄组 Akt1 的 Thr308 磷酸化水平低于 6月龄组的表达, 有显著差异 ( $t=-9.861, P=0.000$ ); 30月龄组 Akt2 的蛋白水平高于 6月龄组的表达, 有显著差异 ( $t=7.522, P=0.000$ ); Akt3 蛋白表达在两组间无差异 ( $t=0.058, P=0.955$ )。结论 大鼠腓肠肌中 Akt 三种亚型伴随年龄改变表达存在差异, 推测 Akt 各亚型在此过程中可能发挥不同功效。

**【关键词】** Akt1; Akt2; Akt3; 大鼠; 腓肠肌; 萎缩

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2008)03-0273-03

**Expression of Protein Kinase B Isoforms in the Gastrocnemius Muscle of Rats at Different Ages** Zhang Bing\*, Xia Chun, Chen Fu\* Department of Histology and Embryology, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

**【Abstract】 Objective** To study the expression of protein kinase B (Akt/PKB) isoforms in the gastrocnemius muscle of rats at different ages. **Methods** The expression levels of mRNA and protein of three Akt isoforms in the gastrocnemius muscle of 30-month-old and 6-month-old rats were detected respectively by RT-PCR and Western blotting. Data were analyzed statistically. **Results** (1) The levels of Akt1 and Akt2 mRNA in the 30-month-old rats was significantly higher than those in the 6-month-old rats ( $t=7.124, P=0.000$ ;  $t=2.598, P=0.021$ ), however, no significant difference was found in the level of Akt3 mRNA between the two groups ( $t=0.460, P=0.653$ ). (2) The level of Akt-Thr308 phosphorylation in the 30-month-old rats was significantly lower than that in the 6-month-old rats ( $t=-9.861, P=0.000$ ), while the level of Akt2 protein in the 30-month group was significantly higher than that in the younger rats ( $t=7.522, P=0.000$ ). No significant differences were detected in the levels of Akt1 and Akt3 proteins between the two groups ( $t=0.469, P=0.646$ ;  $t=0.058, P=0.955$ ). **Conclusion** The expression levels of three Akt isoforms in the gastrocnemius muscle of rats change with age, suggesting that the three isoforms of Akt have different functions in the gastrocnemius muscle metabolism of rats at different ages.

**【Key Words】** Akt1; Akt2; Akt3; Rats; Gastrocnemius muscle; Atrophy

运动损伤治疗术后,例如交叉韧带重建术后萎缩的肌肉不能完全恢复,其原因很多,但肌肉组织自身的改变可能起主要作用。蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, Akt)作为一种人体重要的苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶,广泛分布于机体包括骨骼肌纤维在内的各种细胞中,分 Akt1、Akt2 和 Akt3 三种亚型,生物学功能以促进细胞生长、调节蛋白和糖原代谢为主<sup>[1-3]</sup>。文献已经证实伴随年龄增长骨骼肌出现明显的数目减少 (肌肉萎缩)以及蛋白和糖原代谢异常等,类似于术后的肌肉萎缩变化<sup>[4]</sup>。本文拟通过反转录 PCR (reversed transcript PCR, RT-PCR)和免疫印迹 (western blotting)等方法从 mRNA 水平和蛋白水平分别对青年组 (6月龄)和老年组 (30月龄)大鼠腓肠肌内 Akt 的三种亚型进行检测,揭示它

们在大鼠腓肠肌萎缩过程中的表达异同,为进一步了解骨骼肌伴随年龄增长发生萎缩的机制,进而为运动损伤治疗后的肌肉萎缩恢复提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

健康 SD (Sprague-Dawley)清洁级大鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号: SCXK (沪)2003-0003。按照国家啮齿类实验室动物饲养条件,饲养环境为室温 ( $18 \pm 2$ ),光照时间 12 h。6月龄 8只,体重 ( $203 \pm 21$ ) g; 30月龄 8只,体重 ( $454 \pm 32$ ) g。

## 1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 麻醉下取大鼠后小腿正中切

\* 基金项目:福建省自然科学基金计划资助项目 (C0310001)

\*\* 通讯作者 (厦门大学附属中山医院骨科,厦门 361004)

(厦门大学医学院抗癌研究中心,厦门 361005)

口,暴露并切取整块腓肠肌组织投入液氮冷冻保存。每只切取腓肠肌 50~80 mg,迅速加入 Tri Reagent (上海生工生物公司)高速研磨,12500 g离心 20 min,取上清液加入异丙醇,室温放置 15 min,4 13000 g离心 10 min,底部即为 RNA,用乙醇洗 2次,加入无核酸酶的水保存在 -80 备用。次日取部分 RNA 紫外分光光度计 (260 nm、280 nm)测定 RNA 浓度;0.8% SDS胶验证 RNA。

1.2.2 RT-PCR 在 20 μl 反应体系中加入 1 μl 随机引物 (200 ng/μl),1 μl Oligo dT (100 ng/μl),1 μg RNA,70 水浴 5 min,快速放到冰上震荡,加入 7 μl RT 混合液,44 水浴 2 min,再加入 1 μl SuperScripts II RT (上海生工生物公司),44 孵育 50 min,85~90 5 min 终止反应,获得 cDNA 放置 -80 备用。

1.2.3 扩增基因 (cDNA) 根据基因文库我们设计了 Akt 三种亚型引物并 PCR 扩增。Akt1:上游引物 5'-GGGGCCACGGA TACCAT-3',下游引物 5'-CCTCGGCCGCTCTGCTCTC-3',cDNA 稀释浓度 1 μg (反应体系 25 μl),循环数为 24,退火温度 58,片段大小 700 bp。Akt2:上游引物 5'-GGCCCCGGTACTTCCTTC-3',下游引物 5'-TAGCCCGTATCCACTCTTCCCTCTC-3',cDNA 稀释浓度 0.2 μg (反应体系 25 μl),循环数 24,退火温度 58,片段大小 700 bp。Akt3:上游引物 5'-AAGACA GACGGCTCA TTCA TA-3',下游引物 5'-TGCA GTCGA TCGGCTACTACAG-3',cDNA 稀释浓度 1 μg (反应体系 25 μl),循环数 24,退火温度 51,片段大小 700 bp。PCR 产物跑 2.5% SDS 胶,EB 染色,-凝胶成像仪 8900 拍照,每个样品以 18S 做内标,比较样品与内标差值,检验统计分析。

1.2.4 蛋白提取 切取冷冻的腓肠肌,加入蛋白提取液研磨制成匀浆,高速冷冻离心提取蛋白,根据 Bio-Rad 公司提供的蛋白浓度测定步骤,Mode B550 酶标仪测定蛋白浓度,放置 -80 备用。

1.2.5 western blotting 取 10 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,并转至 PVDF 膜;室温摇床封闭 2 h, TBST 缓冲液漂洗 3 次,分别结合 Akt 相关抗体 (Akt1、Akt2、Akt3、P-Akt1-Thr308) 4 摇床孵育过夜, TBST 漂洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的不同比例 (1:5000~1:10 000) 二抗,室温摇床孵育 2 h,结合化学发光剂暗室内 X 光底片感光成像,每次实验重复 3 次,内标为  $\beta$ -actin,并对结果扫描,比较样品与内标差值,检验统计分析。

## 2 结果

### 2.1 大鼠不同年龄组腓肠肌内 Akt 三种亚型 mRNA (cDNA) 水平检测

见表 1。30 月龄组腓肠肌内 Akt1、Akt2 的 mRNA 水平 (以 18S 为标准) 明显高于 6 月龄组;而 2 组间腓肠肌内 Akt3 的 mRNA 无显著差异。

### 2.2 大鼠不同年龄组骨骼肌内 Akt 三种亚型的蛋白表达水平检测

见表 2。2 组间 Akt1 的蛋白表达水平无明显改变。结合 Akt1 的 Thr308 位点磷酸化抗体检测到 30 月龄大鼠骨骼肌内 Akt1 的 Thr308 磷酸化水平明显低于 6 月龄组;结合 Akt2 抗体检测显示 30 月龄组大鼠骨骼肌内 Akt2 的蛋白表达水平明显高于 6 月龄组;结合 Akt3 抗体检测显示两组间 Akt3 的蛋白表达水平无显著差异。

表 1 不同月龄大鼠 Akt 三种亚型 mRNA 的比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s_x$ )

组别	Akt mRNA / 18S		
	Akt1	Akt2	Akt3
30月龄	0.5475 ± 0.0064	0.5391 ± 0.0333	0.1788 ± 0.0079
6月龄	0.3945 ± 0.0205	0.4382 ± 0.0200	0.1735 ± 0.0084
t 值	7.124	2.598	0.460
P 值	0.000	0.021	0.653

表 2 不同月龄大鼠 Akt1 及 Thr308 磷酸化、Akt2、Akt3 蛋白表达的比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s_x$ )

组别	Akt1	P-Akt1-Thr308	Akt2	Akt3
30月龄	0.9315 ± 0.0097	0.3577 ± 0.0206	0.7340 ± 0.0241	0.6250 ± 0.0157
6月龄	0.9228 ± 0.0158	0.6084 ± 0.0149	0.4492 ± 0.0292	0.6237 ± 0.0161
t 值	0.469	-9.861	7.522	0.058
P 值	0.646	0.000	0.000	0.955

## 3 讨论

近年信号分子在细胞代谢中的调节作用已引起广泛关注。正常状态下细胞外生长因子通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (PKB),活化胞膜上磷脂酰肌醇 2 磷酸 (PIP2)、磷脂酰肌醇 3 磷酸 (PIP3),使其与 Akt 的 PH 功能区结合,将 Akt 从胞质转位至胞膜,借助磷酸肌醇依赖激酶 1 (PDK1)、磷酸肌醇依赖激酶 2 (PDK2) 磷酸化 Akt 的特定苏氨酸 Thr、丝氨酸 Ser

位点。Akt 的 Thr 和 Ser 位点磷酸化是其具有活性的前提,三种亚型被激活的磷酸化位点分别为: Thr308/309/305, Ser473/474/472<sup>[11]</sup>,而且资料显示 Akt1、Akt2 和 Akt3 在细胞代谢过程中发挥不同作用,其中 Akt1 主要调控细胞生长调控<sup>[5,6]</sup>。例如 Akt1<sup>-/-</sup>小鼠表现为躯体生长缺陷<sup>[5]</sup>;酵母中 Akt 的同源基因 Sch9 的突变可以延长酵母的寿命<sup>[7]</sup>;尤其在骨骼肌内持续活化的 Akt1 可使体内和体外肌肉肥大,阻止去神经的肌肉萎缩<sup>[8]</sup>,即 Akt1 促进细胞

生长。现已知年龄增加可使骨骼肌数量减少,即骨骼肌萎缩是增龄后骨骼肌变化的主要特征<sup>[4]</sup>,那么,在这个过程中 Akt1变化如何?本研究结果显示30月龄腓肠肌内 Akt1的 mRNA水平明显高于6月龄组(表1),按一般规律推测同时 Akt1的蛋白表达水平也可能升高,但是结果却显示 Akt1蛋白表达并没有明显变化(表2)。Akt1的 mRNA表达和蛋白表达不一致最直接的原因可能是 Akt1翻译水平或翻译后调控所致。资料表明 Akt1翻译后调控重要的一步是其磷酸化,而 Thr308位点磷酸化是使其具有基本活性的关键<sup>[9]</sup>。本研究通过结合 Akt1的 Thr308位点磷酸化抗体检测其磷酸化,显示与6月龄相比30月龄 Akt1的 Thr308位点磷酸化出现下降(表2),从而提出这种可能:尽管随年龄增长骨骼肌萎缩过程中 Akt1的 mRNA水平增高,但 Akt1翻译后调控导致 Akt1的 Thr308位点磷酸化下降,进而影响 Akt1的基本活性以及生物学功能——细胞生长调节的发挥。推测 Akt1的 Thr308位点磷酸化下降可能是导致伴随年龄增长骨骼肌内细胞生长抑制、数量减少、发生萎缩的原因之一。是否 Akt1在翻译水平也被调控还需要进一步实验探讨。

已知随年龄增长机体内糖代谢障碍的出现率也随之升高,如老年人的糖耐量明显低于中、青年。导致糖耐量下降的原因很多,其中胰岛素抵抗(insulin resistance, R)是其原因之一,而骨骼肌是机体内胰岛素作用下利用葡萄糖的主要组织,也是产生外周性 R的重要部位。而三亚型中 Akt2主要和葡萄糖代谢相关<sup>[6]</sup>:例如 Akt2缺乏降低了葡萄糖的摄入使 Akt2<sup>-/-</sup>小鼠出现2型糖尿病症状;Akt2被阻断可导致小鼠 R出现<sup>[5,10]</sup>。这些资料表明, Akt2能够促进葡萄糖的摄入,从而防止 R出现,借此推测伴随年龄增长肌肉萎缩过程中骨骼肌内 Akt2表达可能会下降。但本研究显示青年组和老年组之间比较,大鼠腓肠肌内 Akt2的表达并没有降低;反之, Akt2的 mRNA以及蛋白表达水平提高(表1、2)。结合以往学者研究可能存在两种解释:一种是增龄状态下胰岛素代谢可能存在不依赖 PBK/Akt的途径, Akt2不参与增龄引发的 R,这个观点已有学者证实<sup>[11]</sup>。但最近几年有研究表明根据这个非依赖 PBK/Akt途径构建的一些组分 siRNA并不能阻止胰岛素作用<sup>[12]</sup>。另一种解释是 Akt2可能参与胰岛素代谢,但并不是胰岛素代谢所必需的。因为有学者研究得出:尽管 Akt2参与正常葡萄糖代谢,但并没有证据表明这种激酶是胰岛素信号途径所必需的<sup>[10]</sup>。要明确 Akt2在伴随增龄骨骼肌萎缩过程中的表达意义还需大量后续工作,这也为我们进一步研究提供了目标。而有关 Akt3的已有研究资料显示其缺乏可以导致脑内神经元大小变化<sup>[13]</sup>,但本研究结果表明增龄并没有导致骨骼肌内 Akt3的 mRNA和蛋白表达水平的改变(表1、2),可能 Akt3

并没有参与骨骼肌伴随增龄发生的一系列细胞活动。

总之,本研究通过对青年组(6月龄)和老年组(30月龄)大鼠腓肠肌内 Akt三种亚型 mRNA进行检测并统计分析比较;同时对 Akt三种亚型蛋白表达进行观察,结果证实 Akt三种亚型在此过程中表达存在差异,可能发挥不同作用: Akt1的 Thr308位点磷酸化水平变化可能与伴随年龄变化骨骼肌萎缩过程中细胞生长抑制相关;而 Akt2在骨骼肌年龄变化中表达差异的生物学意义尚需进一步的深入研究; Akt3可能不参与骨骼肌萎缩变化。这些数据可为进一步探讨肌肉萎缩中 Akt表达提供一定的依据。

### 参考文献

- Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381 - 395.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995, 378(6559): 785 - 789.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Gene Dev*, 1999, 13(22): 2905 - 2927.
- 张宏, 严隽陶. 老年骨骼肌减少症研究进展及展望. *中国康复*, 2003, 18(2): 115 - 117.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, et al. Akt1/PKB alpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38349 - 38352.
- Bae SS, Cho H, Mu J, et al. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*, 2003, 278(49): 49530 - 49536.
- Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, et al. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 2001, 292: 288 - 290.
- Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 1985 - 1996.
- O'Boole A, Moule SK, Lockyer PJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha activation of protein kinase B in WEHI231 cells is accompanied by increased phosphorylation of Ser473, but not Thr308. *Biochem J*, 2001, 359(Pt1): 119 - 127.
- Cho H, Mu J, Kim JK, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 2001, 292(5522): 1728 - 1731.
- Katsanakis KD, Pillay TS. Cross-talk between the two divergent insulin signaling pathways is revealed by the protein kinase B (Akt)-mediated phosphorylation of adapter protein APS on serine 588. *J Biol Chem*, 2005, 280(45): 37827 - 37832.
- Welsh GL, Hers L, Berwick DC, et al. Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(part2): 346 - 348.
- Stambolic V, Woodgett JR. Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(9): 461 - 466.

(收稿日期: 2007 - 08 - 21)

(修回日期: 2007 - 12 - 12)

(责任编辑: 王惠群)