

· 基础研究 ·

佐剂关节炎大鼠滑膜血管新生与
PTEN/PI3K/AKT 信号传导通路的关系张晓军^{1,3}, 刘健², 万磊², 孙玥³, 王芳³, 齐亚军³, 黄传兵²

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 3. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038)

【摘要】 目的: 观察佐剂关节炎大鼠滑膜 PTEN/PI3K/AKT 通路及缺氧诱导因子(HIF-1 α)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达, 探讨类风湿关节炎血管新生的机制。方法: 30 只大鼠随机分成正常对照组和模型对照组, 模型对照组采用弗氏完全佐剂建立佐剂关节炎大鼠模型。造模成功后第 19 天, 采用酶联免疫吸附法检测大鼠 HIF-1 α 、VEGF、微血管密度(MVD)的表达, 采用 Western Blotting 检测滑膜 PTEN、PI3K、AKT 蛋白表达。结果: 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠足趾肿胀度、关节炎指数升高, 血清 MVD、VEGF、HIF-1 α 表达及滑膜 PI3K、AKT 升高, PTEN 降低。相关性分析显示, PI3K、HIF-1 α 与 MVD 呈正相关, VEGF、AKT 与足趾肿胀度呈正相关, PTEN 与关节炎指数呈负相关。HIF-1 α 与 VEGF 呈正相关, PI3K 与 AKT 呈正相关, PTEN 与 PI3K、AKT、VEGF 呈负相关。结论: 佐剂关节炎大鼠滑膜 PTEN/PI3K/AKT 通路表达失调是引起滑膜血管新生的机制之一。

【关键词】 关节炎, 类风湿; 滑膜; 血管内皮生长因子类; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.01.018

Relations of synovial angiogenesis and PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in rats with adjuvant arthritis ZHANG Xiao-jun, LIU Jian*, WAN Lei, SUN Yue, WANG Fang, QI Ya-jun, and HUANG Chuan-bing. *The First Hospital Affiliated to Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China

ABSTRACT Objective: To observe the change of PTEN/PI3K/AKT pathway, hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) in rats with adjuvant arthritis and to explore the mechanism of neovascularization in rheumatoid arthritis. **Methods:** Thirty rats were randomly divided into normal control group and model control group. The model control group were established the model of adjuvant arthritis using Freund's complete adjuvant. At 19 days after modeling, the expression of microvascular density (MVD), HIF-1 α , VEGF were detected by ELISA assay and PTEN, PI3K, AKT were detected by Western Blotting. **Results:** Compared with the normal control group, paw swelling, arthritic index were increased, and the expression of MVD, VEGF, HIF-1 α of serum, PI3K, AKT of synovial tissue were significantly increased, PTEN was significantly decreased in model control group. PI3K, HIF-1 α were positively correlated with MVD; VEGF, AKT were positively correlated with paw swelling; PTEN was negatively correlated with the arthritis index; HIF-1 α was positively correlated with VEGF; PI3K was positively correlated with AKT, PTEN was negatively correlated with PI3K, AKT, VEGF. **Conclusion:** Imbalance of PTEN/PI3K/AKT pathway in rats with adjuvant arthritis is one of the mechanisms of synovial neovascularization.

KEYWORDS Arthritis, rheumatoid; Synovial membrane; Vascular endothelial growth factors; Rats

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(1): 71-74 www.zggszz.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节侵蚀性炎症反应为特征的慢性自身免疫病。RA 基

本病理表现为滑膜炎和血管炎^[1], 滑膜炎和血管炎的持续存在可造成关节软骨和骨质破坏, 最终导致关节畸形。RA 关节腔是一个密封的内部环境, 由此造成的低氧可导致滑膜血管新生的形成。研究显示, RA 滑膜血管新生是导致其关节破坏的重要原因^[2]。RA 滑膜血管新生受细胞因子、信号通路等多种因素调节, 其中, 在众多信号传导通路中 PTEN/PI3K/AKT 与其密切相关。PI3K/AKT 通过激活激酶系统而逐渐磷酸化, 从而激活通路调控细胞因子, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,

基金项目: 国家中医药重点学科中医痹病学建设项目(编号: 200930); 安徽省科技厅科研计划项目(编号: 09020304046); 安徽省卫生厅中医药科研项目(编号: 2009ZY05)

Fund program: Buiding Project of Bi Disease of Traditional Chinese Medicine Supported by State Administration of Traditional Chinese Medicine(No.200930)

通讯作者: 刘健 E-mail: liujianahzy@126.com

Corresponding author: LIU Jian E-mail: liujianahzy@126.com

VEGF) 和缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor1 α , HIF-1 α) 的表达^[3]。而 VEGF 和 HIF-1 α 可直接参与导致滑膜血管新生的形成。PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) 为第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白的抑癌基因, 是 PI3K/AKT 通路的负调节因子。PTEN 通过抑制 PI3K/AKT 通路的激活^[4], 催化 PIP3 去磷酸化, 从而拮抗 PI3K/AKT 通路的活性, 抑制 VEGF 和 HIF-1 α 生成, 减少 RA 滑膜血管新生的形成。为进一步验证上述观点, 本研究采用弗氏完全佐剂 (Freund complete adjuvant, FCA) 复制佐剂关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 模型大鼠, 观察 AA 大鼠滑膜组织 PTEN/PI3K/AKT 活化及 VEGF、HIF-1 α 表达, 探讨 AA 大鼠滑膜血管新生的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 型大鼠 30 只, 安徽省实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(皖)2012-0004。实验大鼠通过伦理委员会审核通过, 清洁级标准饲养, 观察无异常者入组实验。

1.2 试剂

FCA: 美国 Sigma 公司出品, 批号: 103K8604。HIF-1 α 试剂盒: 美国 Bioworld 生物技术公司, 批号: 22061046-1。VEGF 试剂盒: 美国 santa cruz 生物技术公司, 批号: sc-507。微血管密度 (microvessel density, MVD) 试剂盒: 美国 santa cruz 生物技术公司, 批号: sc-376975。PTEN、PI3K、AKT 抗体: 美国 santa cruz 生物技术公司, 批号: sc-7974, sc-48637, sc-5298。

1.3 仪器与设备

台式高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司, 型号: Centrifuge 5424R。电泳仪: 美国 CBS 公司, 型号: EPS-300-IIV。凝胶图像分析仪: 美国 Bio-RAD 公司, 型号: GelDoc-It 310。

1.4 模型制备与分组

将大鼠随机分正常对照组和模型对照组, 每组 15 只。向模型对照组大鼠右足跖皮内注射 FCA 0.1 ml 致炎, 复制成 AA 大鼠模型^[5]。致炎后第 19 天开始检测各项指标。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 足跖肿胀度和关节炎指数的测算^[6] 足跖肿胀度采用足容积仪测量, 关节炎指数采用未病变趾累积积分法。足跖肿胀度 = $[(V_t - V_n) / V_n] \times 100\%$ (V_n 、 V_t 分别代表造模前后的容积)。致炎后第 12 天开始观察并记录全身关节病变程度, 每 3 天 1 次。根据未注射佐剂的足跖病变程度累积积分, 积分按照 5 级评分标准: 无红肿记为 0 分, 小趾关节红肿记为

1 分, 趾关节和足跖肿胀记为 2 分, 踝关节以下足爪肿胀记为 3 分。

1.5.2 血清 MVD、HIF-1 α 和 VEGF 表达的检测 采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清 MVD、HIF-1 α 、VEGF。具体步骤依照试剂盒操作。

1.5.3 滑膜组织 PTEN、PI3K 和 AKT 蛋白检测 制备滑膜组织蛋白样品, 取 15 μ g 总蛋白上样电泳、转膜, 封闭、孵育 PTEN、PI3K、AKT 一抗 (1:800 稀释) 2 h, 二抗孵育 1 h。用增强化学发光法显色, 曝光, 冲洗, 用扫描仪对胶片进行扫描、摄像。采用图像分析软件对条带进行分析处理, 计算各组条带的灰度值, 以条带与各组内参 β -actin 灰度值的比值做为滑膜 PTEN、PI3K、AKT 蛋白的表达量。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件分析数据, 计数资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 正常对照组和模型对照组间比较采用成组设计定量资料的 *t* 检验, 各检测指标的相关性分析应用多元相关性分析方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 足跖肿胀度和关节炎指数检测结果

关节炎模型复制前两组大鼠足跖肿胀度、关节炎指数无明显差异。模型复制后, 模型对照组大鼠足跖肿胀度、关节炎指数均高于正常对照组, 见表 1。

表 1 两组大鼠足跖肿胀度及关节炎指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	足跖肿胀度 (%)		关节炎指数 (分)	
		致炎前 1 d	致炎 19 d	致炎 12 d	致炎 19 d
正常对照组	15	1.76 \pm 0.24	7.69 \pm 2.42	0.09 \pm 0.03	0.13 \pm 0.04
模型对照组	15	1.74 \pm 0.31	26.36 \pm 8.23	1.38 \pm 0.29	7.19 \pm 1.76
<i>t</i> 值	-	0.197 6	8.477 6	20.228 8	15.566 9
<i>P</i> 值	-	0.844 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0

2.2 血清 MVD、HIF-1 α 和 VEGF 检测结果

与正常对照组比较, 模型对照组大鼠血清 MVD、HIF-1 α 、VEGF 升高, 见表 2。

2.3 滑膜组织 PTEN、PI3K 和 AKT 蛋白检测结果

与正常对照组比较, 模型对照组大鼠滑膜组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和蛋白表达量升高, 见图 1。

2.4 相关性分析结果

相关性分析显示, HIF-1 α 与 MVD 呈正相关, VEGF、AKT 与足跖肿胀度呈正相关, PTEN 与关节炎指数呈负相关, PI3K 与 MVD 计数呈正相关, 见表 3。HIF-1 α 与 VEGF 呈正相关, PI3K 与 AKT 呈正

相关, PTEN 与 PI3K、AKT、VEGF 呈负相关, 见表 4。

表 2 两组大鼠血清 MVD、HIF-1 α 和 VEGF 比较
($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Tab.2 Comparisons of the MVD, HIF-1 α and VEGF in serum between two groups ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	鼠数(只)	MVD	HIF-1 α	VEGF
正常对照组	15	32.6 \pm 7.27	47.9 \pm 9.82	43.8 \pm 7.85
模型对照组	15	39.2 \pm 8.73	66.3 \pm 10.02	76.2 \pm 9.43
<i>t</i> 值	-	2.695 5	5.079 4	10.227 2
<i>P</i> 值	-	0.010 2	0.000 0	0.000 0

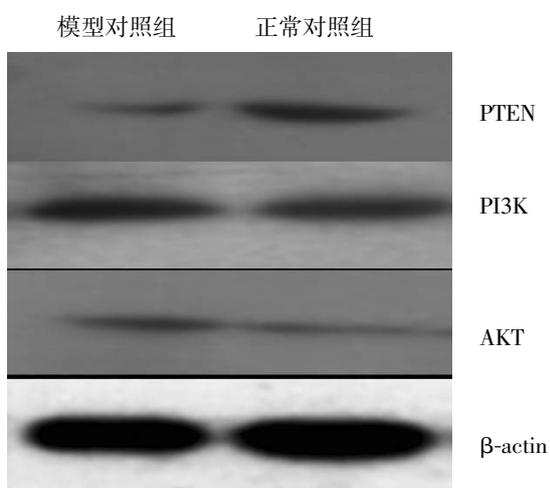


图 1 两组大鼠滑膜 PTEN、PI3K、AKT 表达比较
Fig.1 Comparison of PTEN, PI3K, AKT in synovium of rats between two groups

表 3 足趾肿胀度、关节炎指数、MVD 计数与 HIF-1 α 、VEGF、PTEN、PI3K、AKT 相关系数

Tab.3 Coefficient correlation between paw swelling, arthritic index, MVD and HIF-1 α , VEGF, PTEN, PI3K, AKT

指标	相关系数 <i>r</i>				
	HIF-1 α	VEGF	PTEN	PI3K	AKT
足趾肿胀度	0.183	0.602*	-0.445	-0.175	0.577*
关节炎指数	0.324	0.195	-0.579*	0.296	0.275
MVD 计数	0.576*	0.278	0.098	0.559*	0.361

注: **P*<0.05
Note: **P*<0.05

3 讨论

RA 的发生与 PI3K /AKT 通路的激活有关。激酶 AKT 结构中含有 1 个 N 端结构域、1 个激酶催化域和 1 个 C 端调节域, 其调节域富含氨基酸残基, 激酶催化域则含有 ATP 的结合部位, 从而能被磷酸化激活。AKT 的活化依赖上游 PI3K 的活化而使 AKT

表 4 各项指标间相关系数

Tab.4 Coefficient correlation among index

指标	相关系数 <i>r</i>					
	MVD	HIF-1 α	VEGF	PTEN	PI3K	AKT
MVD	-	0.183	0.602*	-0.445	-0.175	0.577*
HIF-1 α	0.183	-	0.582*	-0.367	0.106	-0.327
VEGF	0.602*	0.582*	-	-0.601*	0.402	-0.018
PTEN	-0.445	-0.367	-0.601*	-	-0.586*	-0.602*
PI3K	-0.175	0.106	0.402	-0.586*	-	0.590*
AKT	0.577*	-0.327	-0.018	-0.602*	0.590*	-

注: **P*<0.05
Note: **P*<0.05

发生磷酸化。因此, PI3K 在激活 AKT 过程中发挥重要作用。

PI3K /AKT 通路是 RA 滑膜血管新生的重要调节因子^[7]。PI3K 具有调节细胞新陈代谢、增殖、凋亡的作用, 是传递信号的重要信使, PI3K 参与 AKT 依赖性信号通路的活化^[8]。AKT 是 PIP3 的中心下游效应因子, PIP3 能逐渐磷酸化 AKT 蛋白, 活化后的 AKT 可磷酸化多种蛋白, 从而发挥其介导参与细胞生长、发育和血管调节作用的生物学效应。PI3K /AKT 的激活可参与组织细胞炎症反应的增强, 并导致低氧环境诱导的滑膜血管的分化、生长。本次研究发现, AA 大鼠在发生足趾肿胀和关节炎指数升高时, 其滑膜组织血管密度值明显上升, 而 PI3K、AKT 表达值也随之升高。说明 PI3K /AKT 信号传导通路的激活可能是关节低氧和滑膜血管新生的重要基因。PI3K-AKT 信号通路激活需要 PTEN 的调节作用, PTEN 是 PIP3 基因的负性调节蛋白。PTEN 具有双重磷酸酶活性而作用于 PI3K 酪氨酸残基, 从而使 PTEN 去磷酸化蛋白。PTEN 通过 PIP3 调节下游信号蛋白 AKT 功能的发挥, 参与抑制 RA 滑膜血管新生的生成。PTEN 在 PI3K /AKT 发挥生物学功能具体表现在信号通路转导中。PTEN 可以阻滞 PI3K /AKT 信号通路的激活, 抑制细胞周期和细胞生长。PTEN 通过控制活化 PIP3 来调控 AKT 的活性。PTEN 通过促使 PIP3 脱磷酸化, 降低胞内 PIP3 表达水平, 减少 PIP3 参与 AKT 活化的数量, 降低 AKT 及其下游激酶的活性, 抑制 PI3K /AKT 通路活化, 从而导致细胞死亡, 进而抑制 RA 滑膜血管新生的形成。研究证实, 敲除 PTEN 后 PI3K /AKT 通路具有诱导血管生成的能力^[9]。本研究发现, 在 AA 大鼠滑膜组织中 PTEN 表达降低。相关性分析显示, PTEN 与 PI3K、AKT 表达呈负相关, 提示在 AA 低氧环境的滑膜细胞 PI3K /AKT 信号传导过程中, PTEN 对信号通路的负性调节作用减弱也是 AA 发生滑膜血管新生的因

素之一。

VEGF、HIF-1 α 在 RA 滑膜血管新生中起直接诱导作用,滑膜血管生成与 VEGF 表达密切相关。VEGF 直接作用于滑膜血管内皮,刺激血管内皮细胞分裂、增殖,增加 RA 微血管通透性,导致 RA 血管新生形成。而 VEGF 的表达也受 PTEN/PI3K/AKT 通路的调节。研究表明 PI3K 与 VEGF 的表达上调和血管生成增加有关^[10]。过度表达 PI3K 和 AKT 可诱导 VEGF 转录增加,促进滑膜血管新生形成。PTEN 表达则可抑制 VEGF 受体 VEGFR2 与 PI3K 的结合,从而抑制滑膜血管新生的形成。PTEN 大量表达或采用 PI3K 抑制剂 LY294002 可使 VEGF 基因表达量减少,说明 PTEN/PI3K/AKT 的活性状态可调节 VEGF 的表达,进而决定是否促进或抑制滑膜血管血管的生成。HIF-1 α 是 VEGF 激活和滑膜血管新生形成的调节蛋白,HIF-1 α 的高表达可直接参与滑膜血管新生的形成。HIF-1 α 含有 A、B 两个亚基,在关节滑膜低氧状况下,外界炎症反应的不断刺激和低氧诱导,促使 HIF-1 α 表达量急剧升高并逐渐转移至细胞核中,HIF-1 α 亚基结合从而形成二聚体,进一步激活 VEGF 的转录,进而加重滑膜炎反应和血管新生形成。PTEN/PI3K/AKT 通路可调节 HIF-1 α 表达^[11]。PTEN 可直接与 HIF-1 α 结合使之降解,抑制细胞对缺氧应激的反应。本研究显示,AA 大鼠滑膜组织 PI3K、AKT 表达与 VEGF、HIF-1 α 呈正相关,PTEN 与 VEGF、HIF-1 α 呈负相关,说明 AA 大鼠滑膜中 PI3K/AKT 通路的激活可能可进一步促进 HIF-1 α 的表达,进而介导 VEGF 的转录活动。研究发现,采用 PTEN 和 PI3K 抑制剂后,可明显下调 AKT 及下游信号蛋白 HIF-1 α 的表达,并伴有 VEGF 的转录与翻译下调^[12]。本次研究结果与 Figlin 等^[13]研究结果一致。

总之,RA 滑膜血管新生与 PTEN/PI3K/AKT 信号传导通路密切相关,同时,细胞因子 VEGF、HIF-1 α 亦参与其中,作为滑膜血管新生的调节靶点,共同诱导促使 RA 滑膜血管新生的形成。因此,采用 PTEN/PI3K/AKT 作为治疗滑膜血管新生的出发点,增加 PTEN 表达,抑制/PI3K/AKT 通路的激活,减少 VEGF、HIF-1 α 对滑膜细胞的刺激,这将会为治疗 RA 提供新的思路和方法。

参考文献

[1] Chitnis N, Nagnur - Metha P, Sharma V, et al. Case of pulmonary

rheumatoid nodules in rheumatoid arthritis[J]. J Assoc Physicians India, 2012, 60:46.

- [2] Rabquer BJ, Koch AE. NK4 therapy: a new approach to target angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(5):119.
- [3] Du S, Wang S, Wu Q, et al. Decorin inhibits angiogenic potential of choroid-retinal endothelial cells by downregulating hypoxia-induced Met, Rac1, HIF-1 α and VEGF expression in cocultured retinal pigment epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2013, 116:151-160.
- [4] Kitagishi Y, Matsuda S. Diets involved in PPAR and PI3K/AKT/PTEN pathway may contribute to neuroprotection in a traumatic brain injury[J]. Alzheimers Res Ther, 2013, 5(5):42.
- [5] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:919-921.
- Xu SY, Bian RL, Chen X. Pharmacological Experimental Methodology[M]. 3rd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:919-921. Chinese.
- [6] 张钧田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 首都医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1998:1383.
- Zhang JT. Modern Pharmacology Experiment Methods[M]. Beijing: Beijing Medical College and Beijing Union Medical College Joint Publishing House, 1998:1383. Chinese.
- [7] Bhattacharya D, Singh MK, Chaudhuri S, et al. T11TS impedes glioma angiogenesis by inhibiting VEGF signaling and pro-survival PI3K/AKT/eNOS pathway with concomitant upregulation of PTEN in brain endothelial cells[J]. J Neurooncol, 2013, 113(1):13-25.
- [8] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis[J]. Front Mol Neurosci, 2011, 4:51.
- [9] Sun YY, Lin SH, Lin HC, et al. Cell type-specific dependency on the PI3K/AKT signaling pathway for the endogenous EPO and VEGF induction by baicalein in neurons versus astrocytes[J]. PLoS One, 2013, 8(7):E69019.
- [10] Tian T, Nan KJ, Wang SH, et al. PTEN regulates angiogenesis and VEGF expression through phosphatase-dependent and independent mechanisms in HepG2 cells[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(7):1211-1219.
- [11] Park JH, Lee JY, Shin DH, et al. Loss of Mel-18 induces tumor angiogenesis through enhancing the activity and expression of HIF-1 α mediated by the PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. Oncogene, 2011, 30(45):4578-4589.
- [12] Burrows N, Babur M, Resch J, et al. GDC-0941 inhibits metastatic characteristics of thyroid carcinomas by targeting both the phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) pathways[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(12):E1934-1943.
- [13] Figlin RA, de Souza P, McDermott D, et al. Analysis of PTEN and HIF-1 α and correlation with efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma treated with temsirolimus versus interferon-alpha[J]. Cancer, 2009, 115(16):3651-3660.

(收稿日期:2014-02-12 本文编辑:连智华)