

基于缺氧诱导因子及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路诱导佐剂关节炎滑膜血管新生的实验观察

张晓军¹, 刘健², 万磊², 黄传兵², 黄旦¹, 齐亚军¹

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学第一附属医院)

[摘要] **目的** 观察佐剂关节炎大鼠滑膜血管 PI3K-AKT-mTOR 信号通路及缺氧诱导因子(HIF-1 α)、血管内皮细胞生长因子(VEGF-A)、滑膜微血管密度(MVD)表达。**方法** 采用随机数字表法将 30 只大鼠均分成两组:正常组,模型组,模型组采用弗氏完全佐剂建立佐剂关节炎模型。造模成功后 19 d,采用免疫组织化学法检测滑膜血管 MVD 表达,酶联免疫吸附法检测血清白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、HIF-1 α 、VEGF-A 表达,免疫印迹检测滑膜血管 PI3K-AKT-mTOR 通路蛋白表达。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠关节炎及 MVD 计数升高,血清 IL-6、VEGF、HIF-1 α 和滑膜血管磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B1(AKT1)、p-AKT1、哺乳动物雷帕霉素靶向蛋白(mTOR)表达显著升高,IL-10 降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** PI3K-AKT-mTOR 通路过度激活可能是引起滑膜血管新生的原因之一。

[关键词] 关节炎,实验性;血管生成诱导剂;信号传导;缺氧诱导因子 1, α 亚基;大鼠, Sprague-Dawley

中图分类号:R684.3 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2018.01.024

Experimental observation of PI3K-AKT-mTOR signaling pathway and HIF-1 α in synovial angiogenesis rats with adjuvant arthritis Zhang Xiaojun^{*}, Liu Jian, Wan Lei, Huang Chuanbin, Huang Dan, Qi Yajun(^{*} Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

Corresponding author: Liu Jian, Email: liujianahzy@126.com

[Abstract] **Objective** To observe the change of PI3K-AKT-mTOR signaling pathway, hypoxia inducible factor (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) of synovial tissue in rats of adjuvant arthritis. **Methods** 30 rats were randomly divided into two groups, normal control and model control group. The model control group were established by using Freund's complete adjuvant. The expression of microvascular density (MVD) were detected using immunohistochemical nineteen days after the modeling. Interleukin (IL) -6, IL-10, HIF-1 α and VEGF were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. PI3K, AKT1, p-AKT1, mTOR protein were detected by Western blotting. **Results** Compared with normal control group, paw swelling, arthritic index were increased and serum IL-6, VEGF, HIF-1 α of serum MVD, PI3K, AKT1, p-AKT1, mTOR of synovial vascular were significantly increased in model control group. There were positive correlation between HIF-1 α and MVD, VEGF-A, PI3K and MVD, p-AKT1 protein, and PI3K, p-AKT1 were positively correlated with VEGF-A, HIF-1 α , mTOR were positively correlated with VEGF-A, PI3K, AKT ($P < 0.05$). **Conclusion** Excessive activation of PI3K-AKT-mTOR pathway might be involved in the synovial angiogenesis in rats with adjuvant arthritis.

[Key words] Arthritis, experimental; Angiogenesis inducing agents; Signal transduction; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; Rats, sprague-dawley

类风湿关节炎(RA)炎症会造成关节变形、甚至残废,严重影响患者生存质量。RA病理本质为血管炎和滑膜炎^[1]。滑膜炎和血管炎的形成过程受多种因素调节,其中滑膜血管新生的形成与RA病理表现密切相关。研究发现新生血管生成不仅是维持滑膜细胞增生的必要条件,而且与滑膜炎程度有关^[2]。

RA滑膜血管新生机制复杂,近年来,磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路和缺氧诱导因子1- α (HIF-1 α)表达失衡成为研究的热点^[3]。HIF-1 α 是缺氧状态下滑膜血管生成的核心调控因子,HIF-1 α 可以通过合成一氧化氮使血管舒张,上调血管内皮生长因子(VEGF-A)表达使滑膜血管通透性

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81403388);安徽省科技厅项目(1604f0804030);安徽省自然科学基金(1508085QH159);安徽省高校自然科学基金重点项目(KJ2017A281)

作者简介:张晓军,副教授,Email:15375273226@163.com

通信作者:刘健,主任医师,教授,博士生导师,Email:liujianahzy@126.com

增加。而 VEGF-A 可以通过血小板衍生生长因子等一系列作用,诱导血管内皮细胞迁移和增生,产生细胞外基质,进而形成加重滑膜血管新生形成^[4]。哺乳动物雷帕霉素靶向蛋白(mTOR)是 HIF-1 α 的正性调节因子。PI3K-AKT-mTOR 信号通路可以导致 HIF-1 α 含量增加,进而促进滑膜血管新生形成。笔者通过弗氏完全佐剂(FCA)复制佐剂关节炎(AA)大鼠模型,通过观察 AA 大鼠滑膜血管新生表现,检测滑膜血管 PI3K-AKT-mTOR 通路及 HIF-1 α 表达,并分析 PI3K-AKT-mTOR 信号通路、HIF-1 α 与滑膜血管新生的关系,探讨 RA 滑膜血管新生的原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物 大鼠:SD 大鼠,由安徽省实验动物中心提供。实验动物经安徽中医学院第一附属医院和基础研究伦理委员会批准审核通过,清洁级标准饲养。

1.2 试剂 FCA:Sigma, USA,批号:116K8706;HIF-1 α : Bioworld 公司, USA,批号:22061046-1;VEGF-A 试剂盒:美国 santa cruz 生物技术公司,批号:sc-507;VEGF-A 试剂盒:圣塔克鲁兹公司, USA,批号:sc-1045;MVD 试剂盒:圣塔克鲁兹公司, USA,批号:sc-376975;白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)试剂盒:RD 公司, USA,批号:2013012205、2012100204。羊抗 PI3K、鼠抗 AKT1、兔抗 p- AKT1、兔抗 mTOR 抗体:圣塔克鲁兹公司, USA,批号: sc-48637、sc-5298、sc-135650、sc-8319;兔抗内皮抑素(ES):abcam 公司, USA,批号:ab01387。

1.3 仪器与设备 病理切片机:LEICA,德国,型号:2235;显微摄像系统:OLYMPUS,日本,型号:BX51T-32000-2;高速冷冻离心机:Sigma,德国,型号:2-16PK。电泳仪:美国 Amersham 公司,型号:EPS-301;凝胶图像分析仪:美国 Bio-RAD 公司,型号:Gel Doc XR。

1.4 方法

1.4.1 模型制备与分组 采用随机数字表法将 30 只大鼠均分为正常组和模型组。向模型组大鼠注射 FCA 0.1mL 致炎,复制成 AA 大鼠模型^[5],致炎后第 19 天开始检测指标。

1.4.2 血清 HIF-1 α 、VEGF-A、IL-6、IL-10 表达的检测 采用 ELISA 法检测大鼠血清 MVD、HIF-1 α 、VEGF-A。具体步骤依照试剂盒操作。

1.4.3 滑膜 MVD 测定 将各组大鼠无菌取双膝关节滑膜,常规制备石蜡包埋切片,行 SABC 法染色。采用山羊抗鼠 MVD 多克隆抗体标记血管内皮细胞(一抗浓度稀释比例 1:200),显微镜下观察各组血管新生情况。在 $\times 100$ 倍的视野下计数 3 个微血管

密集区的微血管数,取其平均值表示 MVD^[6]。

1.4.4 滑膜 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 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 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 一抗 2 h,分别采用抗羊、小鼠、兔二抗孵育 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 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 蛋白的表达量^[7]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计处理。观测数据主要为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较为成组 t 检验。相关性采用 PEARSON 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 足趾肿胀度、关节炎指数的变化 关节炎模型复制前,两组大鼠关节症状差异无统计学意义。致炎后,模型组关节症状均明显高于正常组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 两组大鼠足趾肿胀度及关节炎指数变化 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 (只) | 足趾肿胀度(%) | | 关节炎指数(分) | |
|-------|-----------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | | 致炎前 1 d | 致炎 19 d | 致炎 12 d | 致炎 19 d |
| 正常组 | 15 | 1.38 \pm 0.27 | 8.86 \pm 2.45 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 模型组 | 15 | 1.40 \pm 0.25 | 25.47 \pm 8.36 | 0.96 \pm 0.09 | 4.78 \pm 1.63 |
| t 值 | | 0.211 | 7.384 | 41.312 | 11.358 |
| P 值 | | 0.835 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

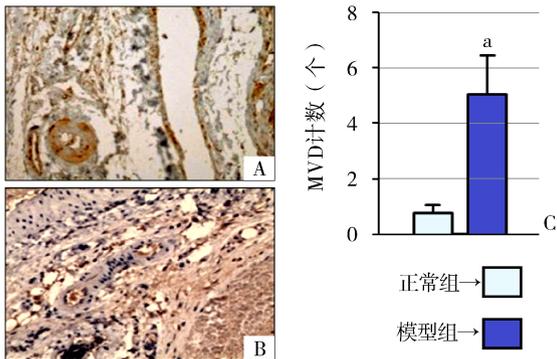
2.2 血清 HIF-1 α 、VEGF-A、IL-6、IL-10 变化 与正常组比较,模型组大鼠血清 IL-6、HIF-1 α 、VEGF-A 明显升高,IL-10 表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 两组大鼠血清 HIF-1 α 、VEGF-A、IL-6、IL-10 比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

| 组别 | 鼠数 (只) | HIF-1 α | VEGF | IL-6 | IL-10 |
|-------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 正常组 | 15 | 59.79 \pm 9.78 | 65.75 \pm 9.35 | 55.70 \pm 8.75 | 28.29 \pm 7.89 |
| 模型组 | 15 | 64.34 \pm 13.12 | 98.14 \pm 12.17 | 79.46 \pm 11.36 | 36.43 \pm 9.57 |
| t 值 | | 1.077 | 8.174 | 6.418 | 2.542 |
| P 值 | | 0.291 | <0.001 | <0.001 | 0.017 |

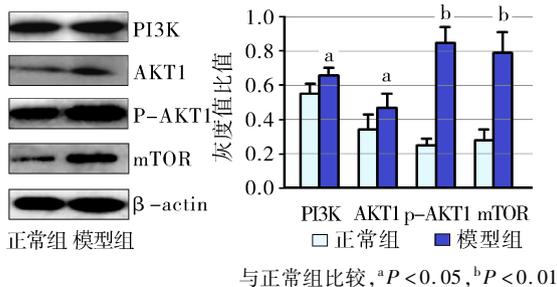
2.3 大鼠滑膜血管 MVD 计数比较 模型组大鼠滑膜组织新生血管丰富、数量多、密集,MVD 明显高于正常组($P < 0.01$)。见图 1。

2.4 大鼠滑膜组织 PI3K、AKT1、p-AKT1、mTOR 蛋白表达 与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织 PI3K、AKT1、p-AKT1、mTOR 均升高。见图 2。



A: 正常组 (SP 法, ×200), B: 模型组 (SP 法, ×200), C: 正常组和模型组 MVD 比较 (与正常组比较, ^a*P* < 0.01)

图1 两组大鼠滑膜血管微血管密度变化



与正常组比较, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01

图2 两组大鼠滑膜 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 比较

2.5 相关性分析 相关性分析显示, HIF-1α 与 MVD、VEGF-A 呈正相关, PI3K 与 MVD 计数、p-AKT1 蛋白呈正相关, PI3K、p-AKT1 与 VEGF-A、HIF-1α 呈正相关, mTOR 与 VEGF-A、PI3K、AKT 呈正相关(*P* < 0.05)。见表 3。

表3 两组观察指标的相关性分析(*r* 值)

| 指标 | MVD | HIF-1α | VEGF-A | mTOR | PI3K | AKT1 |
|--------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------|
| HIF-1α | 0.183 | | | | | |
| VEGF-A | 0.602 ^a | 0.582 ^a | | | | |
| mTOR | -0.445 | -0.367 | -0.601 ^a | | | |
| PI3K | -0.175 | 0.106 | 0.522 ^a | 0.586 ^a | | |
| AKT | 0.577 ^a | -0.327 | -0.018 | 0.602 ^a | 0.390 | |
| p-AKT1 | 0.317 | 0.537 ^a | 0.156 | 0.371 | 0.564 ^a | 0.402 |

注: 采用 PEARSON 相关性分析, ^a*P* < 0.05

3 讨论

PI3K/AKT 信号通路激活、HIF-1α、VEGF-A 表达失衡可能是滑膜血管新生的重要因素^[8]。PI3K/AKT 通路是 RA 滑膜血管新生的重要调节因子, HIF-1α 是调节氧稳态的转录因子, 能够调节 VEGF-A 表达, 进而诱发血管形成和血管通透性增加^[9-10]。PI3K/AKT 通路过度激活会促使 HIF-1α、VEGF-A 表达升高。PI3K/AKT 通路和 HIF-1α、VEGF-A 表达之间的连系

点是 mTOR。mTOR 是 PI3K/AKT 下游底物。PI3K/AKT 激活 mTOR 可以调节细胞增殖和生长。

PI3K 具有调节细胞新陈代谢、增殖、凋亡的作用。PI3K/AKT 通路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, 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 的活化而使 AKT 发生磷酸化。AKT 是 PI3K 的效应器, P-AKT 通常被认为是 PI3K 激活的标志。PI3K 激活后逐渐激活 AKT, 活化的 AKT 能够促进细胞增殖、抑制凋亡, 增加细胞因子的基因表达^[11]。因此, PI3K 激活 AKT 过程中滑膜血管新生发生的重要启动点。同时, 滑膜血管生成与 HIF-1α、VEGF-A 表达有关。HIF-1α 是 VEGF-A 激活和滑膜血管新生形成的调节蛋白, HIF-1α 的高表达可直接参与滑膜血管新生的形成。HIF-1α 可参与滑膜炎的发生、发展过程, HIF-1α 表达高低可反映关节炎的程度。VEGF-A、HIF-1α 在 RA 滑膜血管新生中起直接诱导作用。VEGF-A 可致血管内皮细胞分裂、增殖, 导致 RA 血管新生形成。PI3K/AKT 通路可调节 HIF-1α 表达, 进而诱导 VEGF-A 表达^[12]。同时, VEGF-A 的分泌也受 PI3K/AKT 通路的调节。本研究显示, AA 大鼠滑膜血管 PI3K、AKT 表达升高, 且 PI3K、p-AKT 与 VEGF-A、HIF-1α 呈正相关, 而 VEGF-A、HIF-1α 表达随之升高。说明 AA 大鼠滑膜中 PI3K/AKT 通路的过度激活可能会上调 HIF-1α、VEGF-A 的表达, 进而介导的转录活动, 促进滑膜血管新生形成。本次研究结果与文献^[13-14]研究结论一致。

mTOR 对滑膜细胞的增殖分化起作用。滑膜炎的进一步增加会使关节腔处于缺氧的微环境中, 处于缺氧状态的滑膜细胞通过新生血管生成, 导致滑膜细胞炎症细胞不断浸润, 恶性循环加重滑膜炎和关节炎程度。HIF-1α 是缺氧状态下调控关节腔微环境和滑膜血管新生的关键因子^[15]。mTOR 的激活可以明显增加 HIF-1α 蛋白的合成。mTOR 在 PI3K/AKT 通路过度激活后, 可引起 mTOR 通路的激活, 从而进一步导致 HIF-1α 升高, 加重滑膜炎和滑膜血管新生的形成。研究^[16]显示, mTOR 能增强缺氧诱导因子 HIF-1α 的表达, 而 HIF-1α 表达的增加, 会进一步促进与滑膜血管新生密切相关的 VEGF-A 表达, 加重滑膜血管新生的形成。笔者研究结果发现 AA 大鼠滑膜血管出现新生变化时, mTOR 蛋白表达升高, 同时, 滑膜血管 HIF-1α 和

VEGF 表达升高,相关性分析亦显示, mTOR 与 VEGF 表达呈正相关。提示 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 可能共同参与滑膜血管新生的过程。进一步联系 PI3K/AKT 蛋白表达发现, mTOR 表达与 PI3K、AKT 蛋白表达呈一定相关性。这说明 PI3K/AKT 信号传导通路的过度激活,可能会导致 mTOR 表达量增加,进而刺激 HIF-1 α 分泌升高,而 HIF-1 α 表达升高会增强其下游基因 VEGF-A 等的转录活性,促进滑膜新生血管生成。此结果与 Lin 等^[17] 研究结论相似。研究^[18] 表明, mTOR 可以增加 HIF-1 α 转录活性,增加 HIF-1 α 蛋白表达和合成; mTOR 还可促进热休克蛋白的表达,而热休克蛋白不但具有刺激滑膜炎性增加的作用,还具有抑制 HIF-1 α 蛋白的功能。

总之,根据以上研究结果,笔者推测 mTOR 一方面受 PI3K/AKT 信号通路诱导激活,一方面可以增加滑膜 HIF-1 α 蛋白的合成或抑制其降解,使得 HIF-1 α 蛋白水平增加,导致 VEGF-A 升高,从而通过促进滑膜新生血管生长,参与滑膜炎的过程和血管病变。

参考文献

[1] TANAKA Y. Pathological mechanisms in rheumatoid arthritis[J]. Nihon Rinsho, 2013, 71(7): 1147-1152.

[2] HWANG SR, SEO DH, AL-HILAL TA, et al. Orally active desulfated low molecular weight heparin and deoxycholic acid conjugate, 6ODS-LHbD, suppresses neovascularization and bone destruction in arthritis[J]. J Control Release, 2012, 163(3): 374-384.

[3] LI GQ, ZHANG Y, LIU D, et al. PI3 kinase/Akt/HIF-1 α pathway is associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 372(1/2): 221-231.

[4] SEN D, CHAPLA A, WALTER N, et al. Nuclear factor (NF)- κ B and its associated pathways are major molecular regulators of blood-induced joint damage in a murine model of hemophilia[J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(2): 293-306.

[5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 919-921.

[6] 张育, 周玮, 顾健, 等. 沙利度胺及氨甲蝶呤抗 CIA 大鼠滑膜血管新生及其作用机制的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2008, 12(5): 23-27.

[7] 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.

[8] CURY V, MORETTI AI, ASSIS L, et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2[J]. J Photochem Photobiol B, 2013, 125(4): 164-170.

[9] 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.

[10] WESTRA J, BROUWER E, VAN ROOSMALEN IA, et al. Expression and regulation of HIF-1 α in macrophages under inflammatory conditions; significant reduction of VEGF by CaMKII inhibitor[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2010, 11(1): 61.

[11] MATSUDA S, NAKANISHI A, WADA Y, et al. Roles of PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for pharmaceutical therapy[J]. Open Med Chem J, 2013, 7(1): 23-29.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] WESTRA J, BROUWER E, BOS R, et al. Regulation of cytokine-induced HIF-1 α expression in rheumatoid synovial fibroblasts[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1108: 340-348.

[16] AGANI F, JIANG BH. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(3): 245-251.

[17] LIN CH, LI CH, LIAO PL, et al. Silibinin inhibits VEGF secretion and age-related macular degeneration in a hypoxia-dependent manner through the PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway[J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(4): 920-931.

[18] SHIN JM, JEONG YJ, CHO HJ, et al. Melittin suppresses HIF-1 α /VEGF expression through inhibition of ERK and mTOR/p70S6K pathway in human cervical carcinoma cells[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69380.

(收稿日期: 2016-10-26)