

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.03.001

· 基础研究 ·

保护素 DX 对类风湿关节炎大鼠模型中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响 *

庞琳烜¹ 李 颖¹ 李治琴² 杜望磊¹ 谢荣华¹ 丁 进^{1△}

(1 空军军医大学第一附属医院临床免疫科 陕西 西安 710032; 2 咸阳市第一人民医院风湿科 陕西 咸阳 712000)

摘要 目的: 研究保护素 DX(PDX)对类风湿关节炎(RA)大鼠模型的治疗作用及机制,及其对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响。**方法:** 通过皮下注射牛Ⅱ型胶原与弗氏完全佐剂诱导 RA 大鼠模型,建模后将 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组(n=12);正常 SD 大鼠;RA 组(n=12);RA 模型大鼠;低剂量 PDX 处理组(n=12, L-PDX 组):接受 10 $\mu\text{g/kg/d}$ PDX 治疗的 RA 模型大鼠;高剂量 PDX 处理组(n=12, H-PDX 组):接受 20 $\mu\text{g/kg/d}$ PDX 治疗的 RA 模型大鼠。各组大鼠治疗 4 周后,采用 ELISA 法检测血清中 IgA、IgG、IgM、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 的水平。通过苏木精伊红(HE)染色评价大鼠踝关节病变。通过免疫组化染色或 Western blot 检测滑膜组织中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、Bcl-2、Bax、LC3-I、LC3-II 和 Becline-1 的表达。**结果:** 与 RA 组相比, L-PDX 组和 H-PDX 组的关节炎指数(AI)评分均显著降低($P<0.05$),炎性细胞浸润、软骨破坏程度及滑膜上皮细胞增生减轻。与 RA 组相比, L-PDX 组和 H-PDX 组的血清 IgA、IgG 和 IgM 含量均降低($P<0.05$)。与 RA 组相比, L-PDX 组和 H-PDX 组的血清 TNF- α 和 IFN- γ 水平均降低, IL-4 和 IL-10 水平均升高($P<0.05$)。与 RA 组相比, L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠踝关节滑膜组织中的 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 和 Bcl-2 的蛋白相对表达量均降低,而 Bax、LC3-II/LC3-I 和 Becline-1 的蛋白相对表达量均升高($P<0.05$)。**结论:** 本研究表明 PDX 可有效减轻 RA 大鼠症状,其机制与调节 B 淋巴细胞活化和体液免疫、纠正 Th1/Th2 失衡、抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

关键词: 类风湿关节炎;保护素 DX;B 淋巴细胞;Th1/Th2 失衡;PI3K/Akt/mTOR 信号通路

中图分类号: R-33;R593.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2023)03-401-06

Effects of Protectin DX on PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis*

PANG Lin-xuan¹, LI Ying¹, LI Zhi-qin², DU Wang-lei¹, XIE Rong-hua¹, DING Jin^{1△}

(1 Department of Clinical Immunology, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Rheumatology, The First People's Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi, 712000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effect and mechanism of protectin DX (PDX) on rheumatoid arthritis (RA) rat model, and its effect on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Methods:** The RA rat model was induced by subcutaneous injection of bovine type II collagen and Freund's complete adjuvant. After modeling, SD rats were randomly divided into 4 groups: Control group (n=12): normal SD rats, RA group (n=12): RA model rats, low-dose PDX group (L-PDX, n=12): RA model rats treated with 10 $\mu\text{g/kg/d}$ PDX, high-dose PDX group (H-PDX, n=12): RA model rats treated with 20 $\mu\text{g/kg/d}$ PDX. After 4 weeks of treatment, the serum levels of IgA, IgG, IgM, TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 were detected by ELISA. Rat ankle joint lesions were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expressions of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR, Bcl-2, Bax, LC3-I, LC3-II and Becline-1 in synovial tissue were detected by immunohistochemical staining or Western blot. **Results:** Compared with RA group, the arthritis index (AI) scores of L-PDX group and H-PDX group were significantly decreased ($P<0.05$), and the infiltration of inflammatory cells, the degree of cartilage destruction and the proliferation of synovial epithelial cells were reduced. Compared with RA group, the serum IgA, IgG and IgM contents in L-PDX group and H-PDX group were all decreased ($P<0.05$). Compared with RA group, the serum levels of TNF- α and IFN- γ in L-PDX group and H-PDX group were decreased, and the levels of IL-4 and IL-10 were increased ($P<0.05$). Compared with RA group, the relative protein expressions of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR and Bcl-2 in the synovial tissue of the ankle joint of the rats in L-PDX group and H-PDX group were decreased, while the relative protein expressions of Bax, LC3-II/LC3-I and Becline-1 were increased ($P<0.05$). **Conclusion:** This study shows that PDX can effectively alleviate the symptoms of RA rats, and its mechanism is

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81701617)

作者简介:庞琳烜(1983-),女,主治医师,E-mail: Panglin1G@163.com

△ 通讯作者:丁进(1978-),女,博士,副主任医师,E-mail: dingjin1@foxmail.com

(收稿日期:2022-07-28 接受日期:2022-08-24)

related to regulating B lymphocyte activation and humoral immunity, correcting Th1/Th2 imbalance, and inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Key words: Rheumatoid arthritis; Protectin DX; B lymphocytes; Th1/Th2 imbalance; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R593.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)03-401-06

前言

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节慢性炎症为特征的自身免疫性疾病^[1]。目前临床中治疗 RA 的药物主要是抗风湿药物^[2],这些药物虽然具有良好的治疗效果,但也存在许多毒副作用,且长期用药效果不明^[3]。磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B/ 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/AKT/mTOR)信号通路是调节细胞增殖、凋亡和自噬的重要通路^[4]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 RA 中扮演重要角色,抑制该通路有助于降低 RA 模型大鼠足跖滑膜组织炎症和自噬^[5]。此外,抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可抑制 RA 大鼠软骨细胞增殖并加速细胞凋亡和自噬^[6]。保护素 D(Protectin D, PD)由二十二碳六烯酸(Docose Hexaenoic Acid, DHA)在脂加氧酶的作用下跨细胞合成^[7]。保护素 DX(Protectin DX, PDX)是保护素家族中的成员,具有广泛的抗炎特性^[8,9]。最近文献报道,PDX 可有效抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞的炎症,并抑制骨关节炎大鼠的软骨降解^[10]。本课题组推测 PDX 可能是治疗 RA 的潜在药物,因此,本研究探讨了对 RA 大鼠模型的治疗作用,并分析了其对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响,以期对 RA 的治疗提供新的候选药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 PDX (871826-47-0, $\geq 98\%$) 购自美国 Cayman 公司;牛 II 型胶原(F5881)购自美国 Sigma 公司;弗氏完全佐剂 (150497) 购自美国 Chondrex 公司;IgA ELISA 试剂盒(KA2506)、IgG ELISA 试剂盒(KA2507)和 IgM ELISA 试剂盒(KA2508) 购自台湾 Abnova 公司;TNF- α ELISA 试剂盒(ER1393)、IFN- γ ELISA 试剂盒(ER0012)、IL-4 ELISA 试剂盒(ER0041)和 IL-10 ELISA 试剂盒(ER0033)购自武汉菲恩生物科技有限公司;苏木精伊红(HE)染色试剂盒(C0105S)、RIPA 裂解液(P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010)、Quick-Block™ 封闭液(TBSTw)(P0231)、BeyoECL Plus(P0018M)购自碧云天生物技术研究;磷酸化(p)-PI3K(ab182651)、p-AKT(ab38449)、p-mTOR(ab84400)、Bcl-2(ab59348)、Bax(ab32503)和 β -actin(ab8226)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的 IgG 二抗(ab6721) 购自英国 Abcam 公司;PI3K(4249)、AKT(4691)、mTOR(2983)、LC3-I(4599)、LC3-II(3868)、Beclin-1(3495)一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.2 实验动物 8 周龄雄性无特定病原体(SPF)级 Sprague-Dawley(SD)大鼠(体重 280~330 g)由空军军医大学第二附属医院骨科实验室提供(许可证号:SYXK(陕)2020-007)。大鼠在 24℃、55%相对湿度、12 h/12 h 光暗循环照明的 SPF 级饲养室内饲养,不限制饮食。

1.2 方法

1.2.1 RA 动物模型建立和分组治疗 取 40 只 SD 大鼠 RA 动物建模。进行将牛 II 型胶原与弗氏完全佐剂按 1:1 的比例混合,在冰中制备乳剂。分别在大鼠右后足爪、背部、尾根三点皮下注射 0.1 mL 乳剂,7 d 后再次注射。第二次注射药物 14 d 后,对大鼠进行关节炎指数(Arthritis index index, AI)评分^[11],AI 评分规则如下:0 分:小趾关节、踝关节无炎症和红肿;1 分:小趾关节轻度红肿;2 分:小趾关节及足趾红肿;3 分:踝关节以下足趾全部红肿;4 分:全部足爪红肿甚至变形。AI ≥ 4 表示造模成功,取造模成功的大鼠用于后续实验。40 只建模的大鼠,共有 37 只建模成功,其中 1 只大鼠存在耳部外伤,未进行后续实验。

将 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组(n=12):正常 SD 大鼠;RA 组(n=12):RA 模型大鼠;低剂量 PDX 处理组(n=12, L-PDX 组):接受 10 $\mu\text{g/kg/d}$ PDX 治疗的 RA 模型大鼠;高剂量 PDX 处理组(n=12, H-PDX 组):接受 20 $\mu\text{g/kg/d}$ PDX 治疗的 RA 模型大鼠。PDX 用二甲基亚砜(DMSO)溶解。建模成功后, L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠分别腹腔注射 1 mL 10 和 20 $\mu\text{g/kg/d}$ 的 PDX, 对照组和 RA 组大鼠腹腔注射 1 mL 的 5% DMSO。各组大鼠均连续给药处理 4 周。

1.2.2 血清 IgA、IgG 和 IgM 的测定 治疗结束后, 各组大鼠眼眶取血,离心分离血清,采用 ELISA 法检测血清中 IgA、IgG 和 IgM 的含量,检测方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 血清炎症因子的测定 治疗结束后, 大鼠眼眶取血,离心分离血清,采用 ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 的水平,检测方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 苏木精伊红(HE)染色 治疗结束后,分离大鼠踝关节, PBS 洗涤后,用滤纸吸干,4%多聚甲醛固定 48 h, 10%的 EDTA 脱钙,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后切成 5 μm 切片,烘烤 1 h。脱蜡至水后切片用苏木精在 37℃ 染色 5 min,流水冲洗 10 min,在含 1%盐酸的酒精中浸泡 1-5 s,流水冲洗 10 min。之后,切片用 5%伊红重新染色 1~3 min,然后脱水封片,显微镜镜检。

1.2.5 免疫组化染色 治疗结束后,分离大鼠滑膜组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切成 5 μm 切片。然后常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水。切片在 3%过氧化氢溶液中孵育 15 min 阻断内源过氧化物酶活性,PBS 洗涤 3 次。加入 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)后,将切片放入高压锅中加热至 100℃。然后将切片用 5%正常山羊血清封闭 10 min。然后分别于 1:500 稀释的 p-PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 一抗在 4℃ 孵育过夜。第二天,切片在室温下与 1:500 稀释的 HRP 标记的 IgG 二抗孵育 1 h,然后用 PBS 洗涤 3 次。DAB 显色,自来水冲洗,苏木精复染,封片。置于显微镜下观察。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达水平 使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解滑膜组织中,通过 BCA 蛋白浓度测定试

剂盒测定蛋白浓度。使用 15% SDS-PAGE 电泳分离蛋白并转移到 PVDF 膜上。将膜在 QuickBlock™ 封闭液 (TBSTw) 中室温封闭 30 min, 并在 4℃ 下与 1:1000 稀释的 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、Bcl-2、Bax、LC3-I、LC3-II、Becline-1 和 β -actin 过夜孵育。然后在 TBST 中洗涤 3 次, 每次 15 min。接下来, 将样品与 HRP 标记的 IgG 二抗在室温下孵育 1 h, 并用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。将样品浸入 BeyoECL Plus 中显影 1 min。 β -actin 作为内参蛋白。

1.3 数据统计学分析

所有数据均使用 SPSS 22.0 软件进行分析。本研究中的连续变量数据均符合正态分布, 表示为平均值 $\pm$ 标准差。使用单因素方差分析及 LSD 检验评估多组之间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PDX 对 RA 大鼠关节炎指数 (AI) 评分和踝关节病变的影响

治疗结束后, 对照组大鼠的 AI 评分均为 0 分, RA 组均为 4 分。与 RA 组相比, L-PDX 组 (2.08 ± 0.79 分) 和 H-PDX 组 (1.67 ± 0.78 分) 大鼠的 AI 评分均显著降低 (见图 1)。HE 染色

结果显示, 对照组大鼠踝关节面光滑完整, 关节周围未见炎性细胞浸润、软骨损伤、滑膜上皮细胞增生及血管疙瘩形成。RA 组大鼠踝关节表面粗糙, 伴有炎性细胞浸润和软组织损伤, 关节滑膜上皮细胞明显增生。L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠关节面较 RA 组完整, 软骨破坏程度及滑膜上皮细胞增生较 RA 组减轻。见图 2。

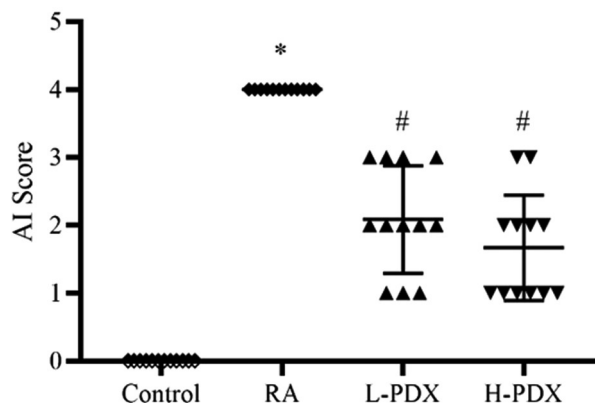


图 1 各组大鼠的关节炎指数 (AI) 评分

Fig.1 Arthritis Index (AI) scores of rats in each group

Note: compared with control group, * $P < 0.05$; compared with RA group, # $P < 0.05$.

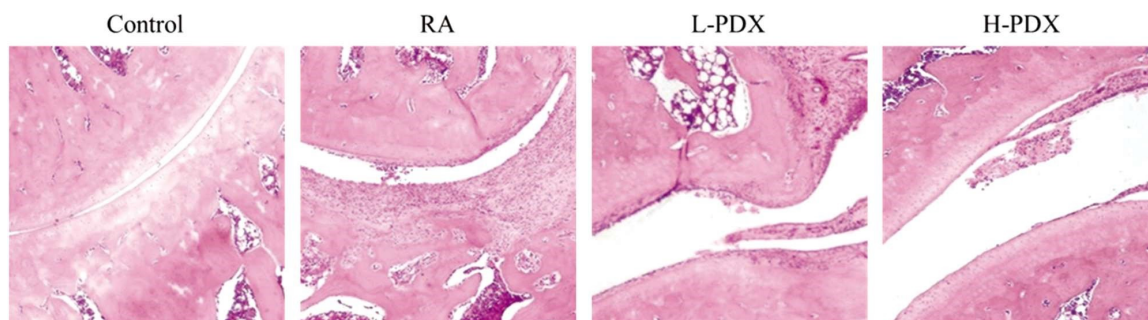


图 2 各组大鼠的踝关节 HE 染色 (放大 100 倍)

Fig.2 HE staining of ankle joints of rats in each group (100 $\times$)

2.2 PDX 对 RA 大鼠血清 IgA、IgG 和 IgM 含量的影响

各组大鼠的血清 IgA、IgG 和 IgM 含量检测结果显示, 与对照组相比, RA 组大鼠的血清中 IgA、IgG 和 IgM 含量均升高

($P < 0.05$)。与 RA 组相比, L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠的血清中 IgA、IgG 和 IgM 含量均降低, 呈现浓度依赖性降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠的血清 IgA、IgG 和 IgM 含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum IgA, IgG and IgM content of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	IgA ($\mu\text{g/mL}$)	IgG ($\mu\text{g/mL}$)	IgM ($\mu\text{g/mL}$)
Control	16.83 ± 0.72	23.05 ± 1.00	21.87 ± 0.83
RA	$21.82 \pm 0.93^*$	$27.84 \pm 1.36^*$	$25.33 \pm 0.92^*$
L-PDX	$18.22 \pm 1.02^\#$	$24.07 \pm 1.35^\#$	$22.14 \pm 1.80^\#$
H-PDX	$15.79 \pm 0.53^{*\#}$	$22.00 \pm 0.95^{*\#}$	$20.95 \pm 1.54^{*\#}$
F	122.172	55.257	24.498
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Note: compared with control group, * $P < 0.05$; compared with RA group, # $P < 0.05$; compared with L-PDX group, $^\#P < 0.05$.

2.3 PDX 对 RA 大鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 水平的影响

各组大鼠的血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 水平检测结果显示, 与对照组相比, RA 组大鼠的血清中 TNF- α 和 IFN- γ

水平均升高,IL-4 和 IL-10 水平均降低 ($P<0.05$)。与 RA 组相比,IL-4 和 IL-10 水平均升高,呈现浓度依赖性($P<0.05$)。比,L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠的血清中 TNF- α 和 IFN- γ 水平见表 2。

表 2 各组大鼠的血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 水平($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Serum TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

Groups	TNF- α (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
Control	43.91 $\pm$ 5.01	36.71 $\pm$ 3.96	202.75 $\pm$ 25.88	111.54 $\pm$ 8.83
RA	207.39 $\pm$ 23.90*	184.34 $\pm$ 18.47*	36.04 $\pm$ 6.07*	47.35 $\pm$ 8.03*
L-PDX	120.07 $\pm$ 18.38 [#]	104.59 $\pm$ 20.23 [#]	129.67 $\pm$ 18.23 [#]	77.26 $\pm$ 16.63 [#]
H-PDX	83.42 $\pm$ 12.63 ^{##}	59.16 $\pm$ 15.51 ^{##}	161.16 $\pm$ 20.21 ^{##}	89.51 $\pm$ 11.63 ^{##}
F	213.724	202.620	166.604	62.107
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: compared with control group, * $P<0.05$; compared with RA group, [#] $P<0.05$; compared with L-PDX group, ^{##} $P<0.05$.

2.4 PDX 对 RA 大鼠踝关节滑膜组织 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

免疫组化染色显示,与对照组相比,RA 组大鼠踝关节滑膜组织中 p-PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 阳性表达水平均升高。与 RA 组相比,L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠踝关节滑膜组织 p-PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 阳性表达水平均降低。Western blot 定量分析结果显示,与对照组相比,RA 组大鼠踝关节滑膜组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 的蛋白相对表达量均升高($P<0.05$)。与 RA 组相比,L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠踝关节滑膜组织中的 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 的蛋白相对表达量均降低,呈现浓度依赖性降低($P<0.05$)。见图 3。

2.5 PDX 对 RA 大鼠踝关节滑膜细胞凋亡的影响

各组大鼠踝关节滑膜组织中的 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达结果显示,与对照组相比,RA 组大鼠踝关节滑膜组织中的 Bcl-2 蛋白相对表达量升高,Bax 蛋白相对表达量降低($P<0.05$)。与 RA 组相比,L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠踝关节滑膜组织中的 Bcl-2 蛋白相对表达量降低,Bax 蛋白相对表达量升高,且呈现浓度依赖性升高($P<0.05$)。见图 4。

2.6 PDX 对 RA 大鼠踝关节滑膜自噬的影响

各组大鼠踝关节滑膜组织中的 LC3-II/LC3-I 和 Becline-1 的蛋白表达结果显示,与对照组相比,RA 组大鼠踝关节滑膜组织中的 LC3-II/LC3-I 和 Becline-1 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$)。与 RA 组相比,L-PDX 组和 H-PDX 组大鼠踝关节滑膜组织中的 LC3-II/LC3-I 和 Becline-1 蛋白相对表达量均升高,且呈现浓度依赖性升高($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

本研究中,10 和 20 $\mu\text{g/kg/d}$ 的 PDX 给药 4 周后,RA 大鼠的 AI 评分显著降低。HE 染色结果证实,PDX 减轻了 RA 大鼠的软骨组织损伤、炎性细胞浸润,抑制了滑膜上皮细胞增生。这些结果说明 PDX 可能是一种治疗 RA 的候选药物。PDX 属于保护素家族成员,其他文献已经证实了 PDX 的抗炎、抗氧化、免疫调节等作用^[9,12-15]。RA 是一种自身免疫性疾病,炎症是其发病的中心环节,RA 患者体内 T、B 淋巴细胞功能明显异常^[16]。据报道,血清 IgA、IgM、IgG 水平高表达预示着 RA 患者病情处于活动期^[17]。为了进一步揭示 PDX 治疗 RA 的可能机制,本研

究考察了 PDX 对免疫球蛋白的影响,结果显示,PDX 治疗显著降低了 RA 大鼠血清 IgA、IgG 和 IgM 含量。已知免疫球蛋白是 B 淋巴细胞活化和体液免疫的标志^[18]。本研究表明,PDX 可能通过调节 B 淋巴细胞活化和体液免疫来减轻 RA。

现有文献表明,Th1/Th2 失衡是引起 RA 炎症性损伤的重要免疫学机制,RA 患者的外周血以及关节积液中的 Th1 细胞因子(TNF- α 和 IFN- γ)水平明显升高,Th2 向 Th1 漂移,表现为 Th1 亚群优势^[19]。通过纠正 Th1/Th2 失衡可有效减轻 RA 患者的临床症状^[20]。本研究显示,PDX 治疗显著降低了 RA 大鼠血清 Th1 细胞因子(TNF- α 和 IFN- γ)水平,但升高了 Th2 细胞因子(IL-4 和 IL-10)水平,从而纠正了 Th1/Th2 失衡。由于 PDX 由 DHA 在脂加氧酶的作用下跨细胞合成^[7],而 DHA 具体调节 T 细胞免疫的功能,例如,DHA 促进非肥胖糖尿病小鼠 Th2 细胞分化,抑制 Th1 细胞分化,从而平衡 Th1/Th2 比例^[21]。因此,本研究推测 PDX 可能通过纠正 Th1/Th2 失衡从而在 RA 中发挥免疫调节作用。

滑膜增生是 RA 的主要病理现象之一,抑制 RA 滑膜细胞增生可有效缓解 RA 症状^[22]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路在生理和病理条件下对细胞生长和存活、细胞凋亡、基因组稳定性至关重要^[23,24]。研究表明,RA 大鼠足跖滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路异常激活,并且参与调节滑膜炎性反应和自噬^[5]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活可促进包括滑膜细胞在内的多种细胞增殖,并抑制细胞凋亡^[25]。本研究表明,PDX 治疗显著抑制了 RA 大鼠踝关节滑膜组织中的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活,并且降低了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,升高了促凋亡蛋白 Bax 的表达。该结果表明,PDX 可促进 RA 大鼠滑膜细胞凋亡。

本研究还表明,PDX 治疗显著升高了 RA 大鼠踝关节滑膜组织中的 LC3-II/LC3-I 和 Becline-1 蛋白表达水平。LC3-I/LC3-I 和 Becline-1 是两类自噬相关蛋白,受到 mTOR 的负调控^[26]。LC3 是自噬标志物,自噬形成时,LC3-I 会酶解掉一小段多肽转变为 LC3-II,LC3-II/LC3-I 比值升高表明自噬增强^[27]。Becline-1 是酵母自噬相关基因 ATG6 的哺乳动物同源基因,与 PI3K 复合体相互作用^[28]。已经证明 Becline-1 参与了自噬小泡和局部自噬蛋白的形成,并在自噬和细胞死亡的调节中发挥作用^[29]。细胞自噬是一把双刃剑,在正常机体中,自噬负责降解错误蛋白质或损伤细胞器以重新组建细胞。但过度的自噬则会对

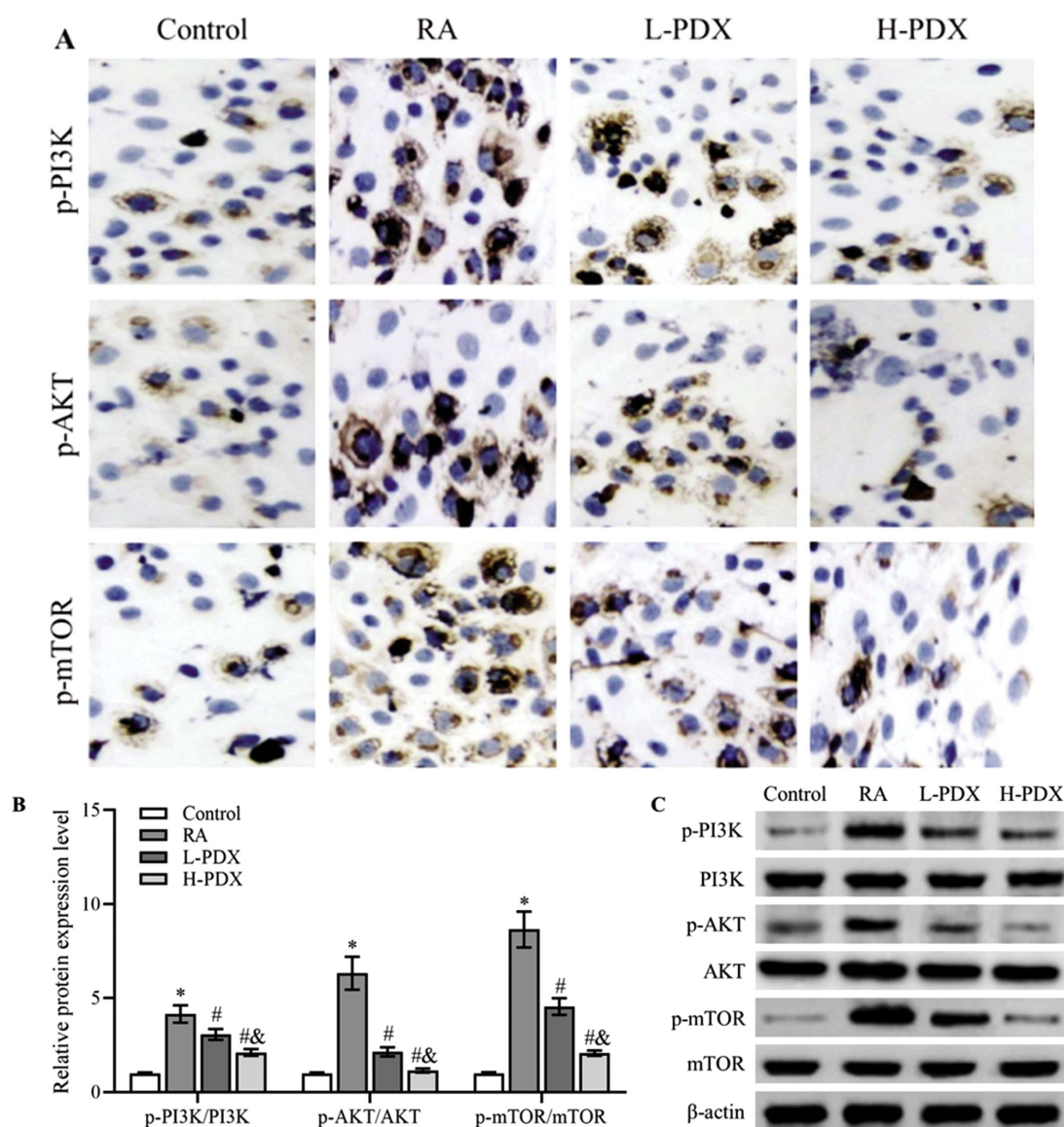


图3 大鼠踝关节滑膜组织中PI3K、AKT和mTOR的活化情况

Fig.3 Activation of PI3K, AKT and mTOR in rat ankle synovial tissue

Note: A: Immunohistochemical staining of p-PI3K, p-AKT and p-mTOR ($\times 400$); B: Proteins of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR Relative expression; C: Western blot images; compared with control group, $*P<0.05$; compared with RA group, $#P<0.05$; compared with L-PDX group, $&P<0.05$.

机体造成损伤。其他学者发现, RA 滑膜细胞内的自噬途径与滑膜增生相关^[30]。因此, 本研究提示 PDX 可能通过增强自噬来抑制 RA 滑膜增生, 从而减轻病变。此外, 多项文献证实, PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节 B 细胞功能, 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可改善 RA 大鼠模型的 B 细胞功能^[31]。

综上所述, 本研究表明 PDX 可有效减轻 RA 大鼠症状, 其机制与调节 B 淋巴细胞活化和体液免疫、纠正 Th1/Th2 失衡、抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。总之, PDX 在治疗 RA 方面具有良好的应用前景, 然而, 仍需要进一步从其他角度来论证 PDX 的确切治疗效果和机制。

参考文献(References)

- [1] Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 880
- [2] Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(3): 492-509
- [3] Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Jr., et al. 2015 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(1): 1-26
- [4] Malemud CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(9): 1137-1147
- [5] 郝锋, 吴立斌, 胡骏, 等. 艾灸对类风湿性关节炎模型大鼠足跖滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国针灸*, 2020, 40(11): 1211-1216
- [6] Feng FB, Qiu HY. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 1209-1220
- [7] Chen P, Fenet B, Michaud S, et al. Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(21): 3478-3484

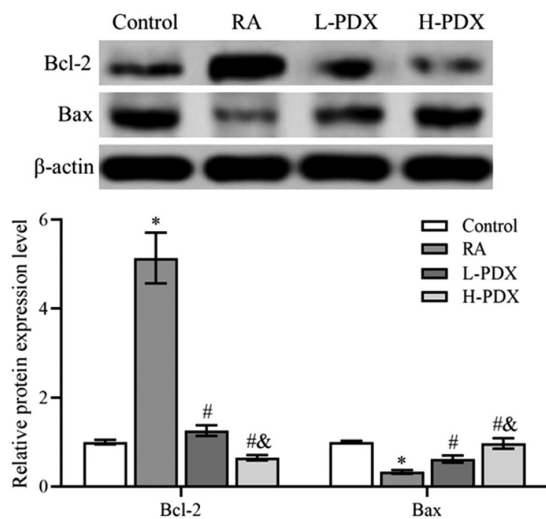


图4 大鼠踝关节滑膜组织中 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达

Fig.4 Protein expression of Bcl-2 and Bax in rat ankle synovial tissue

Note: compared with control group, * $P < 0.05$; compared with RA group, # $P < 0.05$; compared with L-PDX group, & $P < 0.05$.

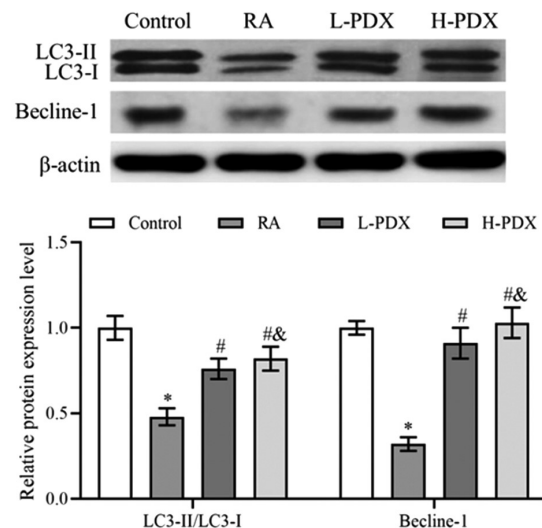


图5 大鼠踝关节滑膜组织中 LC3-II/LC3-I 和 Beclin-1 的蛋白表达

Fig.5 Protein expression of LC3-II/LC3-I and Beclin-1 in rat ankle

synovial tissue

Note: compared with control group, * $P < 0.05$; compared with RA group, # $P < 0.05$; compared with L-PDX group, & $P < 0.05$.

- [8] Xia H, Chen L, Liu H, et al. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 99
- [9] Zhuo XJ, Hao Y, Cao F, et al. Protectin DX increases alveolar fluid clearance in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(4): 1-13
- [10] Piao S, Du W, Wei Y, et al. Protectin DX attenuates IL-1 β -induced inflammation via the AMPK/NF- κ B pathway in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in a rat model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106043
- [11] 刘佳维. 基于 JAK-STAT 信号通路研究黄芪桂枝五物汤对类风湿关节炎的作用机制[D]. 太原: 山西中医药大学, 2019
- [12] Jin S, Sun S, Ling H, et al. Protectin DX restores Treg/T (h)17 cell balance in rheumatoid arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome via miR-20a[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 280
- [13] Lagarde M, Guichardant M, Bernoud-Hubac N. Anti-inflammatory and anti-virus potential of poxytrins, especially protectin DX [J]. *Biochimie*, 2020, 179: 281-284
- [14] Xia H, Ge Y, Wang F, et al. Protectin DX ameliorates inflammation in sepsis-induced acute lung injury through mediating PPAR- γ /NF- κ B pathway[J]. *Immunol Res*, 2020, 68(5): 280-288
- [15] Yang JX, Li M, Hu X, et al. Protectin DX promotes epithelial injury repair and inhibits fibroproliferation partly via ALX/PI3K signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23): 14001-14012
- [16] 尹耕, 文富强. 类风湿关节炎的炎症免疫机制及疾病活动性的评估[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(2): 267-271
- [17] 张淑丽. 类风湿关节炎患者 IgA, IgM, IgG 水平与病情活动的相关性[J]. *现代诊断与治疗*, 2021, 32(17): 2765-2767
- [18] Amri M, Sfar I, Ounallah HS, et al. Anti-CCP antibodies, rheumatoid factors and anti-keratin antibodies: clinical value in established rheumatoid arthritis[J]. *Tunis Med*, 2011, 89(3): 231-235
- [19] 任舒婷, 李玉生. Th1/Th2 失衡对于类风湿性关节炎炎症损伤的临床意义[J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22(9): 864
- [20] 朱阳春, 刘丹冰, 林琳, 等. 补肾通督胶囊对类风湿性关节炎患者 TH1/TH2 细胞平衡的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(7): 1451-1453
- [21] 李琳, 李晓曦, 毕欣芸, 等. n-3 多不饱和脂肪酸对 NOD 小鼠 T 细胞的免疫调节作用 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2019, 39(12): 1707-1711
- [22] 曹争明, 丁孝权, 黄越龙, 等. 依那西普抑制类风湿性关节炎滑膜炎并降低黏附相关分子表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(4): 511-515, 519
- [23] Sun K, Luo J, Guo J, et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(4): 400-409
- [24] Xu Z, Han X, Ou D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587
- [25] Wang Q, Yao X, Xu H, et al. Jinwu Jiangu Capsule affects synovial cells in rheumatoid arthritis through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Acta Biochim Pol*, 2021, 68(4): 641-646
- [26] Yeh PS, Wang W, Chang YA, et al. Honokiol induces autophagy of neuroblastoma cells through activating the PI3K/Akt/mTOR and endoplasmic reticular stress/ERK1/2 signaling pathways and suppressing cell migration[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1): 66-77
- [27] Runwal G, Stamatakou E, Siddiqi FH, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10147
- [28] Yang J, Gong Y, Cai J, et al. Chlorpyrifos induces apoptosis and autophagy in common carp lymphocytes by influencing the TCR γ -dependent PI3K/AKT/JNK pathway [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 99: 587-593
- [29] Ali Shah SW, Zhang S, Ishfaq M, et al. PTEN/AKT/mTOR pathway involvement in autophagy, mediated by miR-99a-3p and energy metabolism in ammonia-exposed chicken bursal lymphocytes [J]. *Poult Sci*, 2021, 100(2): 553-564
- [30] 洪永桃, 刘静, 邹倩. 自噬在类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮中的作用[J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(6): 49-52
- [31] 刘丹丹. EGCG 通过 BAFF 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节胶原性关节炎大鼠 B 淋巴细胞功能 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012