

靶向 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对成骨细胞自噬及线粒体功能的影响

福建省福州市第二医院骨科（福州 350007） 张 森 林 伟

【摘 要】 目的 探讨靶向 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对成骨细胞自噬及线粒体功能的影响。**方法** 通过体外培养成骨细胞，分为实验组和对照组，实验组用 VS-5584 处理成骨细胞，对照组不做处理，用 Real-time PCR 检测实验组以及对照组成骨细胞 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 的表达情况，Western blot 法检测 LC3-II、mTOR、p-mTOR、AKT、p-AKT 蛋白表达水平，Clark 氧电极法检测线粒体的功能并换算出 R3、R4、RCR、P/O 比值。**结果** 抑制成骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路后，与对照组比较，实验组的 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 量，p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平，R3、RCR、P/O 含量均下降，差异均有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；LC3-II 蛋白表达水平以及 R4 含量升高，差异均有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。**结论** 抑制成骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路后，能够促进细胞自噬，损伤线粒体功能。

【关键词】 PI3K/AKT/mTOR 信号通路；自噬；线粒体

【中图分类号】 R34 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)02-0129-03

骨的新陈代谢是破骨细胞吸收旧骨和成骨细胞形成新骨的动态平衡过程^[1]，近年来，随着分子生物学的发展，对基因及细胞信号传导通路的研究更加深入，研究者对基因表达与调控在骨科疾病中的作用更加重视，细胞凋亡与细胞自噬相关理论逐步成为研究焦点。自噬是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程，在正常机体内，细胞的自噬水平很低，当受到外界应激刺激时，细胞自噬程序被激活，从而对外界刺激进行抵御^[2]。细胞自噬涉及多条信号传导通路，目前大多针对哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）信号通路，即通过研究 mTOR 信号通路的上、下游信号通路，来确定调控细胞自噬的关键组成。但是关于靶向磷脂肌醇 3-激酶（PI3K）-蛋白激酶 B（AKT）-雷帕霉素靶蛋白（mTOR）信号通路对成骨细胞自噬的影响却少有研究。

本课题通过利用 Real-time PCR 检测实验组以及对照组成骨细胞 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 表达情况，Western blot 法检测微管相关蛋白轻链

3-II（LC3-II）、mTOR、磷酸化 AKT（phospho-AKT, p-AKT）、AKT、磷酸化（phospho-mTOR, p-mTOR）蛋白表达水平，Clark 氧电极法检测线粒体的功能并换算出呼吸Ⅲ态（R3）、呼吸Ⅳ态（R4）、呼吸控制率（RCR）、磷氧比值（P/O 比值）测定线粒体的呼吸功能，从而探讨 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对成骨细胞线粒体功能的影响及其在细胞自噬过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器：C57BL/6-J 雄鼠 [体质量（ 30 ± 5 ）g，生产许可证号：SCXK（沪）2010-0014，质量合格证号：0000419，来自第二军医大学实验动物中心]，VS-5584（上海皓元生物医药科技有限公司），DMEM 培养基（美国 Gibco 公司），胎牛血清（天津 TBD 公司），恒温细胞培养箱（美国热电 Thermo forma），Western blot 电泳仪（北京六一仪器厂产品），Western blot 相关试剂（购于美国 Amresco 公司和碧云天生物技术公司），Real-Time PCR 相关试剂和引物（宝生物有限公司），实时荧光定量 PCR 扩增仪（德国

Lighter Cycler 公司产品)。

1.2 成骨细胞的体外培养: 取出生 2~3 d 大的小鼠, 无菌条件下取颅盖骨, 去除骨膜和软组织, 取出骨片, 剪成约 1 mm×1 mm 大小的骨片; 将骨片加入气浴摇床中振荡消化; 吸取上清液, 丢弃骨片; 放入另一个离心管中离心收集细胞, 加入完全培养基重悬细胞, 将细胞悬液移入培养瓶中。

1.3 成骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的抑制和分组: 将细胞分为抑制信号通路组 (实验组)、对照组, 用 VS-5584 处理实验组成骨细胞 (VS-5584 对 PI3K/mTOR 信号转导通路有强大的抑制作用), 对照组成骨细胞不处理。

1.4 PI3K/AKT/mTOR 信号通路 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 的检测: 用 Real-time PCR 检测实验组以及对照组成骨细胞 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 的表达情况。样品扩增反应条件如下: 逆转录 1 个循环, 50 °C, 30 min; 预变性 1 个循环, 95 °C, 5 min; 变性、退火延伸共 40 个循环, 95 °C, 30 s, 55 °C, 在 55 °C 时采集荧光信号。引物序列 (由上海生工生物工程公司合成) 如下: AKT 上游引物 5'-ACTGCGCTGGACGATAGCTT-3', 下游引物 5'-AGGACAGCGTGGCTTCTCTC-3'; PI3K 上游引物 5'-GATGGCATGGCTTTAGATTG-3', 下游引物 5'-TCCCTGTTCTAGGTCCTGG-3'; mTOR 上游引物 5'-ATTCAGATCGCTGGCAGCCT-3', 下游引物 5'-CCCTGTGTTCAGCACCTCCA-3'。反应在 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 实验重复 3 次, 结果以 Ct 值形式得到。

1.5 Western blot 法检测 LC3-II、mTOR、p-mTOR、AKT、p-AKT 蛋白表达水平: 提取总蛋白并用 BCA 试剂盒测定蛋白总量。SDS-凝胶电泳后, 半

干转印至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 分别加入一抗 Anti-LC3-II、Anti-p-mTOR、Anti-mTOR、Anti-p-AKT、Anti-AKT、Anti-GAPDH (1:500), 4 °C 孵育过夜; 加入二抗 (1:5000), 室温孵育 1 h, 拍摄图像并进行半定量分析。

1.6 线粒体功能检测: 使用 Clark 氧电极法检测线粒体的功能^[3], 根据线粒体呼吸耗氧量换算出 R3、R4、RCR、P/O 比值。

1.7 统计学分析: 使用 SPSS 13.0 统计软件进行结果分析。计量资料以均数±标准差表示, 采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制对 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 的影响: 结果见表 1。与对照组相比, 实验组 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 量下降, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 成骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制对 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	AKT	PI3K	mTOR
实验组	0.796±0.038*	0.786±0.024*	0.849±0.039*
对照组	1.035±0.113	1.072±0.098	1.082±0.135

注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

2.2 Western blot 法检测 LC3-II、mTOR、p-mTOR、AKT、p-AKT 蛋白表达水平: 结果见表 2。与对照组比较, 实验组成骨细胞中 AKT、mTOR 蛋白表达水平无明显变化, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), LC3-II 蛋白表达水平上升, p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平下降, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 2 成骨细胞中 LC3-II、mTOR、p-mTOR、AKT、p-AKT 蛋白相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	LC3-II/GAPDH	AKT/GAPDH	p-AKT/GAPDH	mTOR/GAPDH	p-mTOR/GAPDH
实验组	1.709±0.048*	0.790±0.030	1.078±0.049*	1.065±0.185	0.763±0.177*
对照组	1.019±0.245	1.069±0.124	1.117±0.171	1.030±0.161	1.068±0.136

注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

2.3 成骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制对线粒体功能的影响: 结果见表 3。与对照组相比较, 实验组 R3、RCR、P/O 含量降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); R4 含量升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 3 实验组和对照组成骨细胞中线粒体功能的测定 ($\bar{x}\pm s$)

组别	R3[nmol/(mg·min)]	R4[nmol/(mg·min)]	RCR	P/O
实验组	14.25±1.23*	6.67±0.35*	2.12±0.16*	1.23±0.04*
对照组	16.59±1.16	5.01±0.19	3.61±0.19	2.83±0.08

注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

3 讨论

自噬是真核细胞内蛋白质分解、细胞器降解的重要途径之一,在调节代谢、维持细胞内稳态、去除损伤细胞器等方面发挥重要作用^[4]。研究表明,LC3-II 参与了自噬的形成,成为哺乳细胞中常见的自噬小体标记蛋白之一。线粒体作为真核细胞重要细胞器,其功能与氧化压力的升高、软骨细胞合成缺陷、炎症及软骨细胞死亡增加等因素密切相关。

PI3K-AKT-mTOR 信号通路是一条经典的抗凋亡和促存活的信号转导通路。mTOR 激酶是诱导自噬信号通路中关键的分子,负调控 mTOR 的通路如 p53 和 AMPK 促进细胞自噬,激活 mTOR 的通路如 MAPK、AKT 抑制细胞自噬^[5-6]。目前国内对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的研究多集中于癌症方面,研究发现肿瘤组织中 AKT 与 PI3K 的表达水平明显高于癌旁组织,但是对成骨细胞自噬及线粒体功能的影响却少有研究。本课题通过利用 Real-time PCR 检测实验组以及对照组成骨细胞 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 的表达情况,Western-blot 法检测 LC3-II 等蛋白表达水平,Clark 氧电极法检测线粒体的功能,从而探讨 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对成骨细胞线粒体功能的影响及其在细胞自噬过程中的作用机制。结果表明,抑制成骨细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路后,实验组 AKT、PI3K、mTOR 的 mRNA 量, p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平, R3、RCR、P/O 含量均下降,差异有统计学意义; LC3-II 蛋白表达水平以及 R4 含量升高,差异有统计学意义,为进一步研究自噬与骨科疾病之间的关系提供了一定的理论依据。抑制 AKT-mTOR 信号通路能够促进

细胞自噬的实验结果与其他研究一致;同时发现,抑制 AKT-mTOR 信号通路能够损伤线粒体功能,进一步证实线粒体损伤在骨科疾病病变中发挥了重要的作用。

综上所述,VS-5584 可以通过抑制 AKT-mTOR 信号通路促进细胞自噬,损伤线粒体功能。但是,本实验只是进行了细胞水平的实验,可进一步在小鼠疾病模型上进行实验。目前,PI3K/AKT/mTOR 信号通路已经是癌症新的药物靶点,随着对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路与成骨细胞之间关系的不断研究,有可能完成从量的积累到质的飞跃,发展成骨科疾病新的药物靶点,并最终应用于临床实践。

参考文献

- [1] Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-x (L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol [J]. Cell, 2011, 145 (1): 104-116.
- [2] 陈科,程汉华,周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能 [J]. 遗传, 2012, 34 (1): 5-18.
- [3] 谭华,简道林,吕竹均,等. 异丙酚对脓毒症大鼠肝线粒体呼吸功能的保护作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2005, 25 (10): 774-775.
- [4] 张石云,段振玲,徐琳,等. 顺铂诱导卵巢癌 SKOV3 细胞自噬和凋亡的研究 [J]. 现代妇产科进展, 2011, 20 (1): 45-47.
- [5] 齐亚莉,王俊,李岩,等. 自噬体的检测及其对肿瘤的作用 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14 (5): 780-782.
- [6] Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer [J]. J Clin Invest, 2008, 118 (9): 3065-3074.