

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.04.002

❖ 基础研究 ❖

PI3K/Akt 信号通路在 SLE 患者中性粒细胞胞外诱捕网形成中的作用

蒋瑶^{1,2,3}, 祝静², 邢艳²

(1. 川北医学院附属医院检验科; 川北医学院, 2. 医学检验系; 3. 转化医学研究中心, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨 PI3K/Akt 信号通路在系统性红斑狼疮 (SLE) 患者中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 形成中的作用。**方法:** 密度梯度离心法分离 6 例健康体检者外周血中性粒细胞 (PMN) 后, 瑞氏染色及台盼蓝拒染实验检测 PMN 的纯度及活性; 加入 PI3K/Akt 特异性抑制剂 LY294002 或 MK2206 的情况下, 荧光光度法检测经佛波酯 (PMA) 及 SLE 患者混合血清分别处理 PMN 90 min、120 min 后 NETs 的形成水平, 并分析各组 NETs 形成量的差异。**结果:** 分离得到的 PMN 纯度及活性均 > 95%, 满足体外细胞实验要求; 在 PMA 及 SLE 混合血清刺激 PMN 形成 NETs 过程中, 与对照组比较, 加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, NETs 生成水平降低 ($P < 0.05$); 加入 Akt 抑制剂 MK2206 后, NETs 形成减少 ($P < 0.05$)。在 PMN 自发形成 NETs 过程中, 与对照组比较, 加入 Akt 抑制剂 MK2206 后能抑制 NETs 形成 ($P < 0.05$), PI3K 抑制剂 LY294002 则无此作用 ($P > 0.05$)。**结论:** PI3K/Akt 信号通路调控 NETs 的形成过程, 进而参与 SLE 的发生发展。

【关键词】 系统性红斑狼疮; PI3K/Akt 信号通路; 中性粒细胞胞外诱捕网

【中图分类号】 R393 **【文献标志码】** A

The role of PI3K/Akt in the formation of neutrophil extracellular traps in SLE

JIANG Yao^{1,2,3}, ZHU Jing², XING Yan²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. Department of Laboratory Medicine; 3. Translational Medicine Research Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To explore the role of PI3K/Akt in the process of neutrophil extracellular traps (NETs) formation in systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods:** After polymorphonuclear neutrophils (PMNs) were separated by gradient density centrifugation from peripheral blood of 6 healthy donors, the purity and activity of PMNs were determined using Giemsa stain and the trypan blue exclusion assay. The level of NETs of PMNs treated 90 min and 120 min respectively by PMA or sera from SLE patients with or without PI3K/Akt specific inhibitor LY294002 or MK2206 were detected by fluorescence photometry, and the difference of NETs formation in each group was analyzed. **Results:** The purity and activity of PMNs isolated were over 95%, which could meet the requirements of subsequent experiments. During the process of PMNs to form NETs stimulated by PMA and sera from SLE patients, compared to the control group, the level of NETs decreased significantly after adding PI3K inhibitor LY294002 ($P < 0.05$), the level of NETs decreased after the addition of Akt inhibitor MK2206 ($P < 0.05$). In the process of spontaneous NETs formation of PMNs, compared with the control group, NETs formation was inhibited by Akt inhibitor MK2206 ($P < 0.05$), but not by the PI3K inhibitor LY294002 ($P > 0.05$). **Conclusion:** PI3K/Akt signaling pathway regulate the production of NETs, and furthermore may be involved in the initiation and progression of SLE.

【Key words】 Systemic lupus erythematosus; PI3K/Akt signaling pathway; Neutrophil extracellular traps

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种经典的全身性自身免疫性疾病, 在我国患病人数为全球之最, 患病率高达 (7.4 ~ 10)/10 万, 男女发病比例约为 1:9^[1]。SLE 可由遗传、激素、环境等多因素共同致病, 但其发病核心在于自身

抗原暴露、免疫耐受丧失, 从而导致体内免疫调控紊乱^[2]。而中性粒细胞作为启动固有免疫的一线细胞, 早期研究发现其凋亡异常可参与 SLE 发病^[3]。近年来发现, 中性粒细胞一种新的死亡形式—中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps,

NETs),可释放大量自身抗原参与 SLE 的发生。SLE 患者体内 NETs 过度产生,但其分子机制不清^[4]。PI3K/Akt 信号通路参与调控多种细胞功能,包括代谢、生长、增殖、存活等^[5]。研究^[6]发现,PI3K/Akt 信号通路的异常活化参与多种肿瘤发生发展,包括促进肿瘤细胞生长、浸润等,但 SLE 患者体内 NETs 过度产生是否受 PI3K/Akt 信号通路的调控目前尚不明确。本研究拟运用佛波酯(PMA)、SLE 混合血清、PI3K/Akt 抑制剂及二者联合刺激中性粒细胞,探讨其在 SLE 患者体内 NETs 形成中的作用,为 SLE 疾病防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 2019 年 2 月至 2019 年 12 月川北医学院附属医院就诊的 20 例 SLE 活动期患者,全部病例均符合 1997 年美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)修订的 SLE 分类诊断标准^[7],且所有研究对象无其他风湿性疾病及原发性急慢性疾病。SLE 患者疾病活动度评分采用 SLEDAI 评分标准^[8]。6 例健康体检者,均符合下列要求:(1)无 SLE 及其他自身免疫性疾病史和家族史;(2)无感染及慢性病史;(3)近期身体无任何不适。

1.1.2 试剂及主要仪器 PolymorphPrep™ 多型核细胞分离液购自挪威 axis-Ahield 公司;Sytox[®] Green Nucleic Acid Stain 购自美国 Invitrogen 公司;RPMI 1640 培养基购自中国博士德公司;LY294002(PI3K 抑制剂)、MK2206(Akt 抑制剂)购自中国碧云天公司;CD45-PerCP 购自美国 BD 公司;PMA 购自美国 sigma 公司;台盼蓝染色液(0.4%)购自中国 Solarbio 公司;瑞氏-姬姆萨染液购自珠海贝索生物公司;倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;流式细胞分析仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 中性粒细胞分离 采集健康体检者外周静脉血 10 mL,2 h 内用密度梯度离心法分离中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs),PBS 洗涤 3 次后,用 2 mL 细胞培养液 RPMI 1640 重悬细胞。

1.2.2 PMN 纯度及活性鉴定 取上述 10 μ L PMN 悬液均匀涂抹在玻片上,利用瑞氏-姬姆萨染液进行染色,自然风干后显微镜下计数 PMN 所占比例。取 100 μ L 上述 PMN 细胞悬液及 4 μ L CD45-PerCP 到流式管内,重复孵育-洗涤操作 3 遍后,PBS 重悬细胞后在流式分析仪上分析细胞纯度。取 90 μ L 上述 PMN 悬液与 10 μ L 浓度为 0.4% 台盼蓝溶液于 EP

管内混匀,后吸取 10 μ L 到牛鲍计数板上,显微镜下计数未蓝染细胞所占比例。

1.2.3 SLE 患者混合血清收集 采集 SLE 患者全血 4 mL 于无抗凝剂采血管内,8 h 内 250 g 离心 5 min 后留取上清,-80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.4 PI3K 抑制剂(LY294002)及 Akt 抑制剂(MK2206)处理 PMA 和 SLE 混合血清 吸取上述分离得到的 3×10^5 个 PMN 到 24 孔板,分为抑制组、抑制剂 + PMA 组、PMA 组及抑制组、抑制剂 + SLE 混合血清组、SLE 混合血清组,每组 3 个复孔,每孔 500 μ L。具体分组处理为:(1)抑制组:加入 10 μ M LY294002 或 25 nM MK2206;(2)抑制剂 + PMA 组:加入 10 μ M LY294002 或 25 nM MK2206 处理 30 min 后,再给予 2 nM PMA 刺激 90 min;(3)PMA 组:加入 2 nM PMA;(4)抑制剂 + SLE 混合血清组:加入 10 μ M LY294002 或 25 nM MK2206 处理 30 min 后,再加入 100 μ L SLE 混合血清刺激 120 min;(5)SLE 混合血清组:加入 100 μ L SLE 混合血清。在孵育结束前 30 min,各孔加入 5 μ M Sytox Green,孵育相应时间后,各组同步结束并上机检测各孔荧光强度。

1.2.5 PI3K 抑制剂(LY294002)及 Akt 抑制剂(MK2206)处理 PMN 吸取上述分离得到的 3×10^5 个 PMN 到 24 孔板,以不加入或加入 10 μ M LY294002 及 25 nM MK2206 分别作为对照组及处理组,每组 3 个复孔,每孔 500 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱培养 90 min 后上机检测各孔荧光强度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件及绘图软件 Graphpad Prism 8.0 对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 *t* 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分离的 PMN 纯度及活性

分离 PMN 后,经瑞氏染色在光学显微镜下分类计数 200 个白细胞,PMN 纯度 $> 95\%$;流式细胞术检测 PMN 纯度 $> 95\%$;台盼蓝拒染实验检测发现分离的 PMN 活性 $> 95\%$,达到体外细胞实验要求。见图 1。

2.2 LY294002 抑制 PMA 和 SLE 混合血清刺激 PMN 形成 NETs

PMN 在加入或不加入 PI3K 抑制剂 LY294002 或 PMA 刺激情况下,检测到各组 NETs 水平分别为:LY294002 组(168 ± 78.08)、LY294002 + PMA 组(310 ± 182.77)、PMA 组(840.20 ± 334.54),即

LY294002 能明显抑制 PMA 刺激的 NETs 形成 ($P = 0.005$); PMN 在加入或不加入 PI3K 抑制剂 LY294002 或 SLE 混合血清刺激的情况下, 检测到各组 NETs 水平分别为: LY294002 组 ($269.33 \pm$

141.51)、SLE 血清 + LY294002 组 (419.33 ± 196.83)、SLE 血清组 (703 ± 266.71), 表明 LY294002 能明显抑制 SLE 血清诱导的 NETs 形成 ($P = 0.004$)。见图 2。

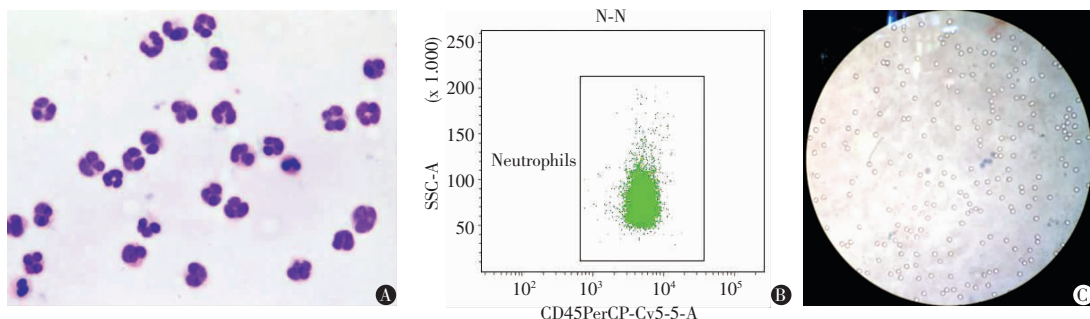


图 1 检测 PMN 的纯度及活性

A.PMN 经瑞士染色后的镜下图($\times 1\,000$); B.经 CD45 抗体标染后的 PMN 流式散点图; C.经台盼蓝染色后的 PMN($\times 400$)。

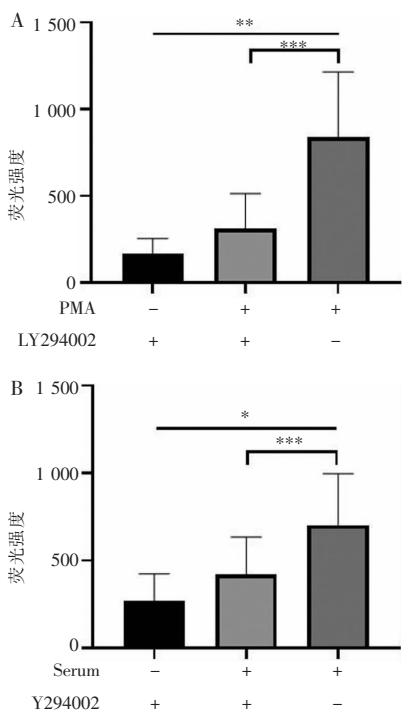


图 2 加入 LY294002 后 PMA、SLE 混合血清诱导 PMN 形成 NETs 的水平

A.LY294002 能明显抑制 PMA 刺激 NETs 形成; B.SLE 混合血清诱导 NETs 形成。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.3 MK2206 抑制 PMA 和 SLE 混合血清刺激 PMN 形成 NETs

PMN 在加入或不加入 Akt 抑制剂 MK2206 或 PMA 刺激的情况下, 检测到各组 NETs 水平分别为: MK2206 组 (130.20 ± 53.18)、MK2206 + PMA 组 (593 ± 224.93)、PMA 组 (842.60 ± 307.04), 即 MK2206 能明显抑制 PMA 刺激的 NETs 形成 ($P = 0.007$); PMN 在加入或不加入 Akt 抑制剂 MK2206 或 SLE 混合血清刺激的情况下, 检测到各组 NETs 水平分别为: MK2206 组 (279.33 ± 92.24)、MK2206

+ SLE 混合血清组 (500.67 ± 271.53)、SLE 混合血清组 (784.50 ± 348.28), 即 MK2206 能明显抑制 SLE 混合血清诱导的 NETs 形成 ($P = 0.009$)。见图 3。

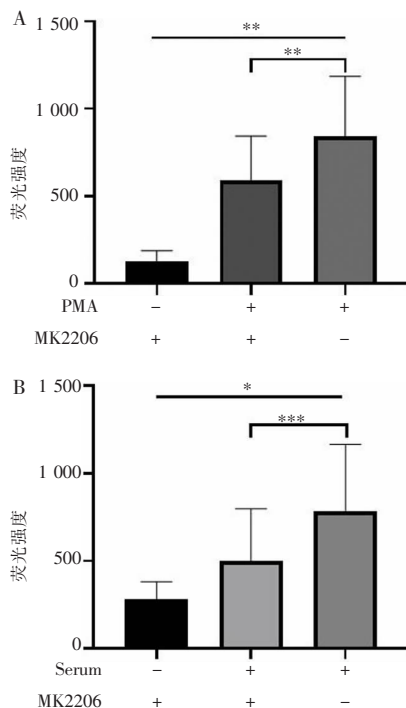


图 3 加入 MK2206 后 PMA、SLE 混合血清诱导 PMN 形成的 NETs 水平

A.MK2206 抑制 PMA 刺激 NETs 形成; B.SLE 血清诱导 NETs 形成。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.4 MK2206 抑制 PMN 自发形成 NETs

与对照组相比, Akt 抑制剂 MK2206 与 PMN 共培养 90 min 后的 NETs 水平降低 [(138.67 ± 52.11) vs. (210.33 ± 80.66) , $P = 0.03$], 表明 MK2206 能通过抑制 Akt 活化而减少 NETs 的自发形成; 但 PI3K 抑制剂 LY294002 无此作用 [$(168 \pm$

78.08) vs. (220.60 ± 87.03), $P = 0.15$], 表明在 PMN 自发形成 NETs 的过程中,有活化 Akt 的参与,但其上游调控蛋白可能不是 PI3K。见图 4。

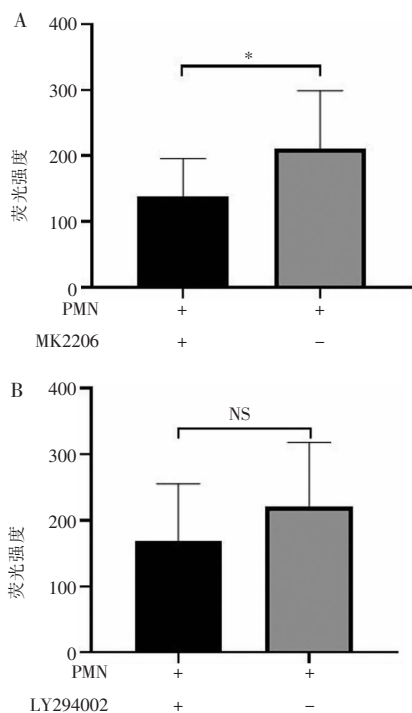


图 4 PI3K/Akt 抑制剂对 PMN 自发形成 NETs 的影响

A.MK2206 能明显抑制 NETs 自发形成;B.LY294002 不能抑制 NETs 自发形成。* $P < 0.05$ 。

3 讨论

SLE 是一种全身性自身免疫性疾病,可累及多个器官组织,以自身抗原暴露、免疫耐受缺失和免疫调控紊乱为特点,以免疫复合物沉积、结缔组织炎症和血管病变为基本病理改变。NETs 作为近年来发现的中性粒细胞的一种区别于凋亡和坏死的细胞死亡形式,其结构特点是以 DNA 为基本骨架,上面附着有多种蛋白酶和抗菌肽^[9]。基于 NETs 独特的结构特点,首先被发现在杀灭入侵的病原体方面具有重要作用,随后研究发现其可作为自身抗原而参与 SLE 发病^[10-11]。故可通过研究 NETs 形成的分子机制找到其关键信号分子,从而减少机体内 NETs 形成,为 SLE 的防治提供依据。

近年来,关于 NETs 形成相关分子机制研究已有报道,当抑制 TAK1、p38 MAPK 及 MEK 通路后中性粒细胞形成的胞外染色质细丝短,且几乎没有相互连接,但对染色质的释放影响较小,从而调控了 NETs 的早期形成,而 Syk 和 PI3K 蛋白抑制剂处理中性粒细胞后,几乎没有染色质排出,表明其参与了 NETs 的后期形成过程^[12]。有学者在此基础上进一步研究了相关靶点药物,Yao 等^[13]研究发现,中性

粒细胞弹性蛋白酶抑制剂 ONO-5046 能通过抑制 ROS 产生而减少 LPS 诱导的 NETs 形成,从而减轻炎症症状,此外,丙泊酚也可通过抑制 p-ERK 和 HOCl 产生而减少 PMA 诱导的 NETs 形成^[14]。故研究参与 NETs 形成的信号通路对疾病治疗药物的研发有重要意义。

21 世纪初有学者发现 NETs 参与了 SLE 的发病过程,本小组前期研究也发现 SLE 患者外周血中性粒细胞 NETs 形成增强,并可能与疾病的活动度相关^[15],但 SLE 患者体内 NETs 过度形成的分子机制仍不清。PI3K/Akt 信号通路参与调控多种细胞功能,包括代谢、生长、增殖、存活等,其异常活化不仅参与多种肿瘤的发生发展,还能通过导致胰岛素抵抗及影响骨骼肌、脂肪组织、肝脏、大脑等组织器官的作用而参与肥胖和 2 型糖尿病等代谢性疾病的发病过程^[4,16]。此外,还有学者发现脂多糖(LPS)可通过激活 PI3K/Akt 信号通路而促进中性粒细胞对大肠杆菌的吞噬作用^[17],LPS 是可刺激 NETs 形成的诱导剂,那么此过程也可能是 LPS 通过促进中性粒细胞形成 NETs 而达到增强其吞噬的功能。此外,PI3K/Akt 也是经典的抗凋亡通路蛋白,而 NETs 作为中性粒细胞的一种异于凋亡的细胞死亡形式,抗凋亡蛋白 PI3K/Akt 是否参与了这一过程? 据此,本实验研究发现在 NETs 经典强效诱导剂—PMA 的作用下,PI3K/Akt 特异性抑制剂—LY294002/MK2206 均可减少 PMA 刺激形成的 NETs,表明在 NETs 形成过程中有 PI3K/Akt 活化的参与。此外,还有研究^[18]发现,SLE 混合血清因含有大量炎症因子和自身抗体而可作为诱导 PMN 形成 NETs 的生理诱导剂,但参与其中的分子机制不明。本研究进一步探究了 PI3K/Akt 在 SLE 混合血清刺激 PMN 形成 NETs 中的作用,发现 PI3K/Akt 特异性抑制剂通过抑制 PI3K/Akt 信号蛋白的活化而参与 SLE 混合血清诱导的 NETs 形成。我们还发现当加入 Akt 抑制剂后,PMN 自发形成的 NETs 水平降低,但 PI3K 特异性抑制剂无此作用,表明 PMN 在自发形成 NETs 过程中有 Akt 的活化,但仍需进一步分析其上游调节蛋白。

综上所述,PI3K/Akt 抑制剂能抑制 PMA 及 SLE 混合血清刺激 PMN 形成 NETs,故推测 PI3K/Akt 参与了 SLE 患者体内 NETs 的形成。但 PI3K/Akt 在 SLE 患者体内 NETs 形成中的作用仍需进一步实验证实,其能否作为靶点药物还需进一步探索。

参考文献

[1] Leong PY, Huang JY, Chiou JY, et al. The prevalence and inci-

- dence of systemic lupus erythematosus in Taiwan: a nationwide population-based study[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5631.
- [2] Li J, Wu GC, Zhang TP, *et al.* Association of long noncoding RNAs expression levels and their gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15119.
- [3] Midgley A. Cellular localization of nuclear antigen during neutrophil apoptosis; mechanism for autoantigen exposure? [J]. *Lupus*, 2011, 20(6): 641 – 646.
- [4] Hasni Sarfaraz A, Gupta S, Davis M, *et al.* Phase 1 double-blind randomized safety trial of the Janus kinase inhibitor tofacitinib in systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3391.
- [5] Aoki M, Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407: 153 – 190.
- [6] Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 125 – 132.
- [7] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(9): 1725.
- [8] Gladman DD, Urowitz MB, Kagal A. Accurately describing changes in disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. *J Rheumatol*, 2000, 27(2): 377 – 379.
- [9] Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps—the dark side of neutrophils[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(5): 1612 – 1620.
- [10] Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 110(4): 797 – 808.
- [11] Döner T. SLE in 2011: Deciphering the role of NETs and networks in SLE[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(2): 68 – 70.
- [12] Tatsiy O, McDonald PP. Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2036.
- [13] Yao W, Chen J, Wu S, *et al.* ONO-5046 suppresses reactive oxidative species-associated formation of neutrophil extracellular traps [J]. *Life Sci*, 2018, 210: 243 – 250.
- [14] Chen MS, Lin WC, Yeh HT, *et al.* Propofol specifically reduces PMA-induced neutrophil extracellular trap formation through inhibition of p-ERK and HOCl[J]. *Life Sci*, 2019, 221: 178 – 186.
- [15] 蒋秋梅, 晏波, 苟静, 等. 系统性红斑狼疮患者中性粒细胞胞外诱捕网水平分析[J]. *中华风湿病学杂志*, 2017, 21(8): 542 – 546, 577.
- [16] Huang XJ, Liu GH, Guo J, *et al.* The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483 – 1496.
- [17] 张艺森, 王旭, 秦魏婷, 等. 脂多糖调控 PI3K/Akt 通路增强中性粒细胞吞噬功能[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2016, 26(5): 395 – 399.
- [18] Lee SY, Lee SH, Seo HB, *et al.* Inhibition of IL-17 ameliorates systemic lupus erythematosus in Roquin mice through regulating the balance of TFH cells, GC B cells, Treg and Breg [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5227.

(收稿日期: 2021 – 05 – 19

修回日期: 2021 – 11 – 28)