

PI3K/Akt 信号通路介导电针促进血管生成的研究进展

魏庆双¹ 孙忠人² 杨添淞² 李 佳¹ 郭恒瑞¹ 杨佳鹏¹

(1 黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150040; 2 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨, 150040)

摘要 有效的促进损伤的愈合是一项有意义且具有挑战性的工程, 许多临床工作者提出了不同的治疗手段, 其中, 电针旁刺是简便易行且行之有效的一种方法, 并且电针被认为可通过活化 PI3K/AKT 信号通路达到加速损伤组织愈合目的, 本文对 PI3K/Akt 信号通路介导电针促进血管生成进行了深入的研究。此研究将对糖尿病性皮肤损害, 老年性, 难治性溃疡等的中医电针治疗提供理论帮助。

关键词 电针; PI3K/AKT 信号通路; 损伤修复; 血管再生

Research Progress of PI3K/Akt Signal Transduction Pathway on Angiogenesis

Wei Qingshuang¹, Sun Zhongren², Yang Tiansong², Li Jia¹, Guo Hengrui¹, Yang Jiapeng¹

(1 Heilongjiang university of Chinese medicine, Harbin 150040, China; 2 The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract Effective wound healing has been a lasting and challenging topic in health care. Various strategies have been used to accelerate and perfect the healing process. One such strategy has involved the application of an exogenous electrical stimulus to chronic wounds with the aim of stimulating healing responses. The biology of electric stimulation to instigate healing, however, is very poorly understood. This study provides theoretical support to the treatment of diabetic skin lesions, senile and refractory ulcer with electric stimulation.

Key Words Electric field; PI3K/AKT signaling pathway; Injury repair; Angiogenesis

中图分类号: R245.31+9 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.03.040

电针刺激已被广泛应用于创伤的修复^[1-2], 临床上也取得了一定的疗效, 然而其作用的细胞机制需要我们进一步探索。伤口愈合对维持多细胞生物的完整性是至关重要的。血管再生是损伤修复中不可缺少的环节, 而这一过程取决于内皮细胞的迁移、增殖。在现有的所有研究中, 人们已经认识到, 切断一个上皮细胞层瞬间产生内源性电场, 对伤口愈合非常重要。此电场不仅影响再上皮化, 同时也促进了血管的重建。Zhao M 等^[3]发现, 在 75V/m 的电场中, 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)向负极定向迁移, 其细胞的长轴方向与电场垂直, 同时电场中的创面细胞发生了形态学改变: 细胞膜向负极突出, 而且胞内纤维状肌动蛋白在电场的影响下分布不均匀。电场强度越强, 这种现象越明显。Zhao M 等^[4]发现: 电信号通过激活 PI3K/AKT 信号通路实现控制损伤组织血管再生进程。PI3 激酶/蛋白激酶 b 在细胞的定向迁移中起到罗盘的作用。在无血清培养基中, 电场迅速而且特异性的激活了中性粒细胞和角质细胞的 PI3K/AKT 信号通路^[4]; 最显著的是, 在细胞的

迁移方向上, 此信号通路的激活是极性的。电场的极性反转时, 细胞膜突出的方向和细胞迁移的方向也随之反转^[5-6]; PI3K 基因缺失或者药理性抑制都会废除损伤修复中角膜上皮细胞和角质细胞的趋电性, 这些结果表明, 电场诱导的 PI3K 定向激活是细胞定向迁移的基础^[7]; 现在将 PI3K/Akt 信号通路与损伤修复血管再生综述如下。

1 PI3K/AKT 信号通路

1.1 PI3K 的结构与作用 PI3-K 是由 Whitman 等^[8]于 1988 年首次发现, 是一种脂类第二信使, 与细胞内信号转导有关。可被 G2 蛋白耦联受体或受体酪氨酸激酶激活, 具备脂类激酶、蛋白激酶活性, 负责使磷脂酰肌醇(PI)肌醇环上 3' 羟基发生磷酸化, 从而激活其下游靶点。可分为 3 种类型: I 型、II 型、III 型, 由各自作用底物不同而区分。I 型 PI3-k 可以磷酸化磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PI), 磷脂酰肌醇-4-磷酸(Phosphatidylinositol-4-bisphosphate, PI4P)和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PI-4,5-P2)但在细胞内

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(编号: ZD201315)

作者简介: 魏庆双(1985—), 男, 2012 级针灸推拿专业博士研究生

通信作者: 孙忠人(1960—), 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事针刺防治脑与脊髓神经疾病的研究, E-mail: 258079427@qq.com

却主要以 PI-4,5-P2 为主,此酶的产物主要是磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate,PI-3,4,5-P3)。II型PI3K主要能磷酸化PI及PI4P;III型PI3K仅能磷酸化PI,生成PI3P;上述3种类型均由催化亚基P110和调节亚基P85构成。P110共有P110 α 、 β 、 γ 、 δ 4种亚构体,其中 α 、 β 、 δ 3种主要存在于哺乳动物中,每一种亚基异构体均有四个结构域,分别为催化域、PIK结构域、C2结构域及Ras结构域,并通过N末端区与调节亚单位结合。P85有p85 α 、 β 、p55 α 、 ε 和p50 α 5种亚构体。静息状态下,调节亚基抑制催化亚基的活性;其受体的内源性酪氨酸激酶活性被胰岛素激活,导致自身磷酸化和胰岛素受体底物(Insulin-receptor Substrate,IRS)的酪氨酸磷酸化^[9],酪氨酸磷酸化的IRS通过自身SH2结构域招募到PI-3K的P85,从而解除对P110的抑制作用,使PI-3K活化^[10]。

1.2 Akt(PKB)的结构与作用 蛋白激酶(PKB)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,由于该激酶为反转录病毒Akt-8癌基因V-akt编码的蛋白质产物,所以称为Akt^[11],分子量为60 kDa,是蛋白激酶A(PKA)及蛋白激酶C(PKC)的高度同源物(PKA为68%,PKC为73%),因此又被命名为A/C相关激酶(RAC)。它是PI3K的一个下游靶点,Akt有3种亚型Akt1(PKB α)、Akt2(PKB β)和Akt3(PKB γ)。PKB α 与PKB β 和PKB γ 分别有近81%和83%的同源性。Akt主要由3个结构域构成,分别是N端AH/PH结构域(1-147)、中心催化结构域(148-411)及C端尾部区(412-480)^[12]。细胞受到胞外信号刺激后,PI3K的产物PIP3与Akt N端的PH结构域结合,使Akt的Ser124和Thr450位点磷酸化^[13],同时使PIP3依赖激酶(PIP3-dependent Kinase)PDK1、PDK2分别催化Akt的Thr308和Ser473磷酸化,从而引起级联反应。Akt1和Akt2在人体组织中普遍表达;而Akt3的表达主要在脑、肾、睾丸、骨骼肌等组织中^[14]。

1.3 PI3K/Akt的调控 PI3K/Akt信号通路主要参与细胞的增殖、分化和迁移,既有抗凋亡作用又有促凋亡作用。研究表明PI3K/Akt信号通路与癌症、孤独症、胰岛素抵抗、阿尔兹海默氏病、精神分裂等密切相关。除此之外,PI3K/Akt信号通路被证实还与血管内皮细胞的迁移有着密切的关系^[15]。PI3K/Akt信号通路主要调控途径有:1)通过抑制FKHR、NF- κ B、YAP,促进CREB、Mdm2等转录因子的活性,调控凋亡;2)抑制Bad和caspase-9磷酸化,抑制凋亡;3)抑制GSK-3活性,抑制凋亡;4)使eNOS的

Ser1177位点发生磷酸化,从而激活eNOS^[16]。

2 PI3K/AKT信号通路与损伤修复血管再生的关系

血管生成是伤口愈合的重要环节,是指血管内的成熟分化的内皮细胞增殖、迁移,最终以出芽的方式,从已存在的血管床中长出新的血管,或者由骨髓内的内皮祖细胞(Endothelial Progenitor Cell,EPC),经过迁移、增殖、分化形成新的血管。一氧化氮(NO)是一种强大的血管生成递质,具有调节血管生成因子的作用,能刺激血管生成^[17];Akt磷酸化及其下游eNOS的磷酸化是内皮细胞合成NO的重要途径^[18-19],在NOS作用下,以左旋精氨酸(L-Arg)为底物,利用氧生成NO和L-瓜氨酸,以非囊泡形式释放,NO易通过弥散出入质膜,直接进入相邻的细胞,在局部发挥作用,性质活泼,半衰期仅为3~6 s。内皮细胞的存活、增殖、迁移均离不开NO的调节。除此之外NO还被证实与内皮细胞和细胞外基质之间的黏附有关。已有研究表明,NO能促进VEGF和MMP的表达并抑制TIMP-1的表达,加速内皮细胞的增殖及细胞基质的降解。

有研究表明,在eNOS基因敲除或被抑制表达的鼠中,损伤愈合过程明显延长,在皮肤的损伤愈合过程的早期可有大量NOS的表达,活性明显增高,伤后10 d持续性产生,伤后14-35 d NOS活性基本趋于缓和^[20]。艾明等^[21]通过western blot技术在体外模型中研究明确,PI3K/Akt信号转导通路参与COX-2对血管内皮生长因子(VEGF)负向调控,这种调控可被选择性的COX-2抑制剂所抑制,并且这种抑制作用涉及到PI3K/Akt表达的变化。AKT抑制剂也已进入临床试验,哌立福辛和米替福辛在多发骨髓瘤和体外培养内皮细胞血管的形成中有明显的抗血管生成作用^[22-24]。

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在新生血管的形成和发展过程中起着重要的调控作用。IGF-1具有广阔的生物学功能,它是一种结构和功能都类似于胰岛素的多肽类神经营养因子,是可以使得细胞提前进入细胞复制前期的一种感受肽促进因子。研究表明其具体通路可能为,激活的IGF-1将进一步激活PI3K,增加磷脂酰肌醇-3,-4,-5三磷酸化水平,然后三磷酸化的磷脂酰肌醇-3,-4,-5结合到磷脂酰肌醇依赖激酶-1和Akt的血小板-白细胞C激酶底物同源性区域。从而开始Akt和一些其他信号分子如蛋白激酶C和A的磷酸化,再引起下游的反应^[25]。Yoshitomi等^[26]报道PI3K/Akt信号通路对于eNOS的磷酸化与激活关系密切。Liu

等^[27]报道在 MCAO 模型中使用氯沙坦,通过 PI3 K/Akt 信号通路磷酸化 eNOS 而改善缺血再灌注损伤。Dmitriy 等^[28]研究表明,脑缺血后 1 h 内内皮细胞释放 eNOS 增加,8 h 内达高峰。

3 小结与展望

皮肤损伤后瞬间产生内源性电场,对伤口愈合非常重要。此电场不仅影响再上皮化,同时也促进了血管的重建。在此电场的作用下,PI3K/Akt 信号通路发挥作用,内皮细胞发生增殖、迁移,参与损伤修复过程中的血管再生。同时,我们课题组近期研究观察到,在特定的电流条件下,电针傍刺对皮肤创伤后的血管重建有促进作用。这提示我们在一些慢性、难治性创面上,通过涉及 PI3K/Akt 信号通路的药物干预或者外加电刺激成为了加速其愈合的新的方式。而电针激活 PI3K/Akt 信号通路的细胞机制,目前尚待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Houghton PE, Kincaid CB, Lovell M. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance[J]. *Phys Ther*, 2003, 83(1): 17-28.
- [2] Franek A, Polak A, Kucharzewski M. Modern application of high voltage stimulation for enhanced healing of venous crural ulceration[J]. *Med Eng Phys*, 2000, 22(9): 647-55.
- [3] Zhao M, Bai H, Wang E, et al. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 3): 397-405.
- [4] Zhao M, Song B, Pu J, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN[J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 457-60.
- [5] Moulin VJ, Dubé J, Rochette-Drouin O, et al. Electric Potential Across Epidermis and Its Role During Wound Healing Can Be Studied by Using an Reconstructed Human Skin[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2012, 1(2): 81-87.
- [6] Huttenlocher A, Horwitz A R. Wound healing with electric potential[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(3): 303-4.
- [7] Zhao M, J Penninger, RR Isseroff. Electrical Activation of Wound-Healing Pathways[J]. *Adv Skin Wound Care*, 2010, 1: 567-573.
- [8] Whitman M, Downes CP, Keeler M, et al. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate[J]. *Nature*, 1988, 332(6165): 644-6.
- [9] 曹文, 石放雄. PI-3K/Akt 通路的下游因子磷酸二酯酶 3B 及其临床研究[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(6): 800-804.
- [10] Vanhaesebroeck B, M D Waterfield. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253(1): 239-54.
- [11] Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, et al. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(10): 4171-5.
- [12] SR Datta, A Brunet, ME Greenberg. Cellular survival: a play in three

- Akts[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(22): 2905-27.
- [13] 潘蓉蓉, 金永喜, 朱文宗. PI3K/Akt 信号通路介导的细胞凋亡机制研究进展[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2013, 23(1): 70-72.
- [14] Laine J, Künstle G, Obata T, et al. Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3743-51.
- [15] M A Messerli, D M Graham. Extracellular electrical fields direct wound healing and regeneration[J]. *Biol Bull*, 2011, 221(1): 79-92.
- [16] Yoshitomi H, Xu Q, Gao M, et al. Phosphorylated endothelial NOS Ser1177 via the PI3K/Akt pathway is depressed in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2011, 20(5): 406-12.
- [17] 余玲玲. 电针对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠海马区 VEGF、HIF-1 α 表达的影响[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009.
- [18] Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis[J]. *Development*, 2005, 132(13): 2943-54.
- [19] 吴德华, 姜桢, 缪长虹, 等. Apelin 通过 Akt/eNOS 机制促进肺血管内皮细胞一氧化氮释放[J]. *复旦学报: 医学版*, 2009, 36(1): 57-60.
- [20] 官大威, 赵锐, 杜宇. 皮肤损伤愈合中 NOS 的表达及 NO 的作用[J]. *法医学杂志*, 2004, 20(4): 244-246.
- [21] 艾明, 陈彬, 贺涛, 等. COX-2 通过 PI3K/Akt 通路调节氧诱导视网膜病变模型中视网膜新生血管的形成[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2009, 38(5): 655-659.
- [22] Garlich J R, De P, Dey N, et al. A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 206-15.
- [23] Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): 1851-63.
- [24] 赵婧, 屈艺, 母得志. PTEN/PI3K/AKT 信号节点与血管生成研究进展[J]. *广东医学*, 2010, 31(19): 2595-2597.
- [25] King J L, Guidry C. Muller cell production of insulin-like growth factor-binding proteins in vitro: modulation with phenotype and growth factor stimulation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(12): 4535-42.
- [26] Yoshitomi H, Xu Q, Gao M, et al. Phosphorylated endothelial NOS Ser1177 via the PI3K/Akt pathway is depressed in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2011, 20(5): 406-12.
- [27] Liu H, Liu X, Wei X, et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt-mediated eNOS phosphorylation[J]. *Brain Res Bull*, 2012, 89(1-2): 65-70.
- [28] Atochin DN, Clark J, Demchenko IT, et al. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases[J]. *Stroke*, 2003, 34(5): 1299-303.