

引文格式:底煜,陈晓隆. 磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂 LY294002 对小鼠视网膜新生血管形成的抑制作用[J]. 眼科新进展, 2018, 38(3): 210-213. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2018. 0048

【实验研究】

磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂 LY294002 对小鼠视网膜新生血管形成的抑制作用[△]

底煜 陈晓隆

作者简介:底煜,女,1981年10月出生,河南人,博士,副主任医师。研究方向:眼底病。联系电话:18940257810; E-mail: diyu81@126.com; ORCID: 0000-0001-6664-2952

About DI Yu: Female, born in October, 1981. Doctor degree, associate chief physician. Tel: 18940257810; E-mail: diyu81@126.com; ORCID: 0000-0001-6664-2952

收稿日期: 2017-08-31

修回日期: 2017-10-06

本文编辑: 付中静

△基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 81600747); 辽宁省博士启动基金资助(编号: 201501020)

作者单位: 110004 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院眼科

Received date: Aug 31, 2017

Accepted date: Oct 6, 2017

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81600747); Startup Foundation for Doctors of Liaoning Province (No: 201501020)

From the Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Inhibitory effects of PI3K/AKT inhibitor LY294002 on retinal neovascularization in mice

DI Yu, CHEN Xiao-Long

[Abstract] Objective To explore the effects of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/serine-threonine kinase (AKT) signal pathway inhibitor LY294002 on retinal neovascularization (RNV) in oxygen-induced retinopathy (OIR) mice. **Methods** Totally 60 C57BL/6J mice were collected and randomly divided into the experimental group and control group, with 30 mice in each group. Then OIR model was induced by Smith methods. Rats in the experimental group were intravitreally injected with 0.5 μL LY294002, while the control group was given the same amount of phosphate buffer saline (PBS) one day before out of the incubator. Retinal sections with HE staining were applied to count the number of neovascular cell nuclei breaking through the inner limiting membrane, as well as the protein and mRNA expression of pAKT and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by immunohistochemistry and RT-PCR.

Results The number of retinal neovascular cell nucleus in the experimental group was obviously smaller than that in the control group ($P < 0.05$). The protein expression of pAKT and VEGF was weakly expressed, and the absorbance (A) value of the positive cells was decreased in the experimental group compared with the control group (all $P < 0.05$). The mRNA expression of AKT and VEGF was obviously decreased in the experimental group compared with the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The development of RNV in OIR mice can be markedly inhibited by LY294002 inhibiting PI3K/AKT pathway, and therefore LY294002 is expected to be an effective method for preventing vascular proliferative retinopathy.

[Key words] LY294002; phosphatidylinositol-3-kinase/serine/threonine kinase; oxygen-induced retinopathy; retinopathy of prematurity; retinal neovascularization

【摘要】 目的 探讨磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸激酶 (Serine/threonine kinase, AKT) 信号转导通路抑制剂 LY294002 对小鼠氧诱导视网

膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 的视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 形成的影响。**方法** 取 C57BL/6J 小鼠 60 只, 随机分为实验组和对照组, 每组各 30 只, 均制备 OIR 模型。小鼠出氧箱前 1 d 即鼠龄 11 d 时实验组玻璃体内注射 0.5 μL 的 LY294002, 对照组玻璃体内注射等体积的 PBS。病理切片计数突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数, 免疫组织化学和 RT-PCR 法检测 pAKT、VEGF 蛋白及 mRNA 的表达情况。**结果** 实验组小鼠新生血管内皮细胞核数为 (12.53 ± 1.71) 个, 较对照组 (25.31 ± 1.42) 个明显减少 ($P < 0.05$); 实验组小鼠 pAKT、VEGF 的蛋白表达呈弱阳性, 阳性细胞的吸光度值 $(9.12 \pm 1.35, 13.91 \pm 1.49)$ 均较对照组 $(15.11 \pm 2.17, 19.72 \pm 2.61)$ 明显下降 (均为 $P < 0.05$); 实验组小鼠 AKT、VEGF mRNA 相对表达量均较对照明显下降 (均为 $P < 0.05$)。**结论** LY294002 通过抑制 PI3K/AKT 信号转导通路, 可有效抑制小鼠 OIR 的 RNV 形成, LY294002 有望成为防治血管增生性视网膜病变的一种有效方法。

【关键词】 LY294002; 磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶; 氧诱导视网膜病变; 早产儿视网膜病变; 视网膜新生血管
【中图分类号】 R774.1; R779.7

[18] CLEARY PE, RYAN SJ. Experimental posterior penetrating eye injury in the rabbit. I. Method of production and natural history[J]. *Br J Ophthalmol*, 1979, 63(5): 306-311.
[19] STALMANS P, BENZ MS, GANDORFER A, KAMPIK A, GIRACH A, PAKOLA S, et al. Enzymatic vitreolysis with ocriplasmin for vitreomacular traction and macular holes [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(7): 606-615.

[20] JOHNSON MW. Posterior vitreous detachment: evolution and complications of its early stages[J]. *Am J Ophthalmol*, 2010, 149(3): 371-382.
[21] CLEARY PE, RYAN SJ. Method of production and natural history of experimental posterior penetrating eye injury in the rhesus monkey[J]. *Am J Ophthalmol*, 1979, 88(2): 212-220.

在早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)的发病机制中,视网膜新生血管(retinal neo-vascularization, RNV)形成一直是眼科学者的研究热点^[1],有许多具有促进作用的因子或通路被发现,但更多机制尚未被阐明。其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是与血管形成最为密切的细胞因子,有实验证明抑制 VEGF 信号途径能有效抑制新生血管形成^[2-3]。近来研究发现磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸激酶(Serine/threonine kinase, AKT)信号通路上调 VEGF,促进肿瘤新生血管的形成^[4]。我们前期研究表明,PI3K/AKT 与 ROP 关系密切,在小鼠氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型中,小鼠视网膜的病变与 PI3K/AKT 的表达水平有关^[5]。LY294002 是 PI3K/AKT 信号通路特异性阻断剂^[6],目前关于在 OIR 模型中应用 LY294002 阻断 PI3K/AKT 信号转导的研究较少。本实验采用玻璃体内注射 LY294002 作用于 ROP 小鼠模型,观察其对氧诱导小鼠 RNV 的抑制作用,为 ROP 防治提供新的突破口。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新生 C57BL/6J 小鼠 60 只,7 d 龄,体质量 5~7 g,由中国医科大学附属盛京医院实验动物中心提供。所有实验动物、实验操作和实验使用条件均遵循中华人民共和国国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》相关规定。

1.2 主要试剂与仪器 LY294002、ADP 酶购自美国 Sigma 公司;兔抗人 AKT、VEGF 多克隆抗体购自美国 Santa Cruze 公司;PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 生物工程有限公司;PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成;B201 光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 OIR 模型建立及分组 60 只 7 d 龄小鼠采用随机数字表法分为实验组和对照组,每组 30 只。两组均参照 Smith 等^[7]的方法建立 OIR 动物模型。实验组于小鼠出氧箱的前 1 d(鼠龄 11 d),在手术显微镜下,采用连接 30 G 针头的微量注射器自角膜缘后 0.5 mm 处缓慢注入右眼玻璃体内,注入 LY294002(美国 Sigma 公司)药液 0.5 μL,对照组于鼠龄 11 d 右眼玻璃体内注射等体积(0.5 μL)的 PBS。

1.4 造模后 RNV 内皮细胞核计数 两组各随机抽取鼠龄 17 d 小鼠 10 只,处死后摘除右眼球,固定 24~36 h,脱水,石蜡包埋,作 6 μm 厚的连续切片(切片方向与角膜和视神经连线的视轴线平行),每只眼球取 10 张切片作 HE 染色,随机、双盲法光学显微镜下计数突破视网膜内界膜的 RNV 内皮细胞核数,并取其平均值。

1.5 免疫组织化学法检测 pAKT、VEGF 蛋白的表达 两组中各随机抽取 10 张未经染色的切片,染色方法按 SABC 免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生

物工程公司)说明书进行^[8],PBS 代替一抗作为阴性对照,二氨基联苯胺(DAB)显色。pAKT、VEGF 蛋白阳性:细胞浆或细胞核内黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。400 倍光学显微镜下测定 pAKT、VEGF 阳性细胞的吸光度(A)值。

1.6 RT-PCR 检测 AKT、VEGF mRNA 的表达

两组各随机抽取鼠龄 17 d 小鼠 20 只,麻醉处死后分离小鼠右眼视网膜组织,用 Trizol 提取细胞总 RNA,引物由上海英骏生物技术有限公司合成,AKT 的引物序列:上游引物:5'-AGCAAACAGGCTCACAGGTT-3',下游引物:5'-TAAGTCCTCCCCATCTCCCT-3',扩增产物为 245 bp;VEGF 的引物序列:上游引物:5'-CCCGACAGGGAAGACAAT-3';下游引物:5'-TCTG-GAAGTGAGCCAACG-3',扩增产物为 131 bp;β-actin 为内参照,引物序列:上游引物:5'-GAGAGG-GAAATCGTGGCTGA-3',下游引物:5'-GCCTAGAA-GCATTTCGGTG-3',扩增产物为 518 bp。β-actin 作为内参,AKT、VEGF mRNA 的相对表达量为实验组目的基因表达量是对照组的倍数,即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值,而 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{实验组目的基因}} - Ct_{\text{实验组内参}}) - (Ct_{\text{对照组目的基因}} - Ct_{\text{对照组内参}})$ ^[2]。AKT、VEGF mRNA 相对表达量的抑制效率^[2] = (对照组 mRNA 相对表达量 - 实验组 mRNA 相对表达量)/对照组 mRNA 相对表达量 × 100%。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计学软件分析数据。数据以均数 ± 标准差表示,两组数据比较采用独立样本 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组突破视网膜内界膜的 RNV 内皮细胞核数

对照组组织切片可见数目不一的血管穿过内界膜进入玻璃体内,突破内界膜的 RNV 内皮细胞核数为 (25.31 ± 1.42) 个。实验组未见明显突破视网膜内界膜的 RNV 内皮细胞核,细胞核数为 (12.53 ± 1.71) 个,两组间差异有统计学意义(t = 5.781, P < 0.05;见图 1)。

2.2 两组小鼠视网膜组织 pAKT、VEGF 蛋白的表达 对照组视网膜在神经节细胞层、内丛状层、内核

图 1 鼠龄 17 d 小鼠视网膜 HE 染色(×400)。A:对照组;B:实验组

层、外丛状层和突破视网膜内界膜的新生血管均可见 pAKT、VEGF 的强阳性表达(图 2A-2B);实验组视网膜 pAKT、VEGF 蛋白在神经节细胞层、内丛状层、内核层和外丛状层的表达明显减弱(图 2C-2D)。对照组和实验组 pAKT 的 A 值比较差异有统计学意义($A_{\text{pAKT 对照组}} = 15.11 \pm 2.17$, $A_{\text{pAKT 实验组}} = 9.12 \pm 1.35$, $t = 5.272$, $P < 0.05$)。对照组和实验组 VEGF 的 A 值比较差异有统计学意义($A_{\text{VEGF 对照组}} = 19.72 \pm 2.61$, $A_{\text{VEGF 实验组}} = 13.91 \pm 1.49$, $t = 6.271$, $P < 0.05$)。

2.3 视网膜组织 AKT、VEGF mRNA 的表达变化

RT-PCR 检测结果显示,对照组小鼠视网膜组织中 AKT、VEGF mRNA 高表达,实验组较对照组表达下调,两组 AKT、VEGF mRNA 表达差异有显著统计学意义($t_{\text{AKT mRNA}} = 4.528$, $t_{\text{VEGF mRNA}} = 7.136$, 均为 $P < 0.05$;图 3)。AKT、VEGF mRNA 抑制效率分别为 32.51%、29.48%,差异无统计学意义($t = 1.631$, $P > 0.05$)。

图 2 免疫组织化学检测 17 d 小鼠视网膜中 pAKT、VEGF 蛋白的表达($\times 400$)。A:对照组 pAKT 高表达;B:对照组 VEGF 高表达;C:实验组 pAKT 低表达;D:实验组 VEGF 低表达

而抑制其活性,但不抑制 PKC、PKA、MAPK 等磷酸激酶的表达^[6],可见 LY294002 是 PI3K/AKT 通路研究的可靠工具。目前研究表明,LY294002 可显著抑制胃癌^[12]、大肠癌^[13]、肺癌^[14]、卵巢癌^[15]等肿瘤细胞的生长,但在 RNV 形成中的作用国内外少见报道。

本研究结果显示,实验组突破视网膜内界膜的 RNV 内皮细胞核数较对照组明显减少,pAKT、VEGF 蛋白及 mRNA 的表达水平较对照组显著下调,从病理学及分子生物学证明了玻璃体内注射 LY294002 能有效地抑制 ROP 模型鼠中 RNV 的发生。推断这可能与玻璃体内注射的 LY294002 能成功地进入产生 PI3K/AKT 的视网膜“靶”细胞有关,达到从“源头”切断 PI3K/AKT 产生的作用,起到明显抑制 RNV 的效果。

本研究通过免疫组织化学和 RT-PCR 检测结果显示,LY294002 可以抑制 AKT、VEGF 的表达,但不能完全抑制;同时,本研究从病理学方面也证明了 LY294002 尚不能完全抑制 RNV 的形成。这可能与多种因素有关,比如与 LY294002 的剂量、浓度等因素有关,还需进一步进行实验研究。目前已知在多种视网膜血管性疾病中 VEGF 显著高表达,可见 VEGF 是 RNV 形成的重要因素^[16-17]。本研究结果表明 LY294002 通过阻断 PI3K/AKT 信号通路下调视

图 3 两组 17 d 小鼠视网膜中 AKT、VEGF 的 mRNA 表达情况

3 讨论

PI3K/AKT 是细胞内重要的信号转导分子,参与了细胞的生长、存活、凋亡、细胞周期调控等多种生物学过程,与多种肿瘤的发生、发展密切相关。在 PI3K 的作用下,活化的 AKT 通过磷酸化作用使其下游靶蛋白激活或抑制,从而发挥其对细胞增殖、分化、葡萄糖代谢及迁移等的调节作用^[9-11]。

PI3K 特异性抑制剂 LY294002 易通过细胞膜,通过竞争性地抑制 PI3K 亚基中的 ATP 结合位点从

网膜 VEGF 的表达,进而抑制 RNV 的形成。

综上所述,本研究对全面阐述 RNV 的形成机制,从分子水平寻找 RNV 的关键性靶点,从而可能为视网膜血管性疾病的治疗提供新的候选基因。LY294002 有望成为临床上治疗 ROP 的安全有效、副作用少、经济实惠的一种药物。

参考文献

- [1] CHEN J, STAHL A, HELLSTROM A, SMITH LE. Current update on retinopathy of prematurity: screening and treatment [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2011, 23(2): 173-178.
- [2] YANG B, XU Y, YU S, HUANG Y, LU L, LIANG X. Anti-angiogenic and antiinflammatory effect of Magnolol in the oxygen-induced retinopathy model [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(1): 81-93.
- [3] XU HZ, LIU SZ, XIONG SQ, XIA XB. HIF-1 α siRNA reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2011, 13(8): 680-683.
许惠卓, 刘双珍, 熊思齐, 夏晓波. HIF-1 α 干扰 RNA 抑制早产儿视网膜病小鼠模型视网膜新生血管形成的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(8): 680-683.
- [4] KOON HW, SHIH DQ, HING TC, CHEN J, HO S, ZHAO D, et al. Substance P induces CCN1 expression via histone deacetylase activity in human colonic epithelial cells [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(5): 2315-2326.
- [5] DI Y, ZHANG YO, NIE QZ, CHEN XL. CCN1/Cyr61-PI3K/AKT signaling promotes retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(6): 1507-1518.
- [6] XU C, JIANG Z. Influence of PI3K inhibitor on the proliferation and related regulatory factors of gastric carcinoma cell SGC7901 [J]. *J Mod Med*, 2010, 38(3): 230-234.
许朝, 姜藻. LY294002 对胃癌细胞 SGC7901 增殖及相关调控因子的影响 [J]. 现代医学, 2010, 38(3): 230-234.
- [7] SMITH LE, WESOLOWSKI E, MCLELLAN A, KOSTYK SK, D'AMATO R, SULLIVAN R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101-111.
- [8] LIU Y, YUAN J. Expression of nuclear factor-kappa B in mice with oxygen-induced proliferative retinopathy [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2014, 34(12): 1101-1104.
- [9] 刘朕, 袁进. 核转录因子- κ B 在氧诱导血管增殖性视网膜病变小鼠中的表达 [J]. 眼科新进展, 2014, 34(12): 1101-1104.
MA J, LIU T, DONG X. Advanced glycation end products of bovine serum albumin-induced endothelial-to-mesenchymal transition in cultured human and monkey endothelial cells via protein kinase B signaling cascades [J]. *Mol Vis*, 2010, 9(16): 2669-2679.
- [10] SONG HP, HUANG YS, DANG YM, ZHANG DX, CHU ZG, ZHANG Q. PI3K/Akt signal pathway inhibits ischemia and hypoxia-induced myocardial apoptosis in rats [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2009, 31(1): 52-55.
宋华培, 黄跃生, 党永明, 张东霞, 褚志刚, 张琼. PI3K/Akt 信号途径抑制烧伤后大鼠缺血缺氧心肌细胞凋亡 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 52-55.
- [11] LI Y, WANG S, DAI ZG. The protective effect of AKT signaling pathway on sevoflurane preconditioning against oxygen-glucose deprivation injury in rat hippocampal slices [J]. *J Shihezi Univ(Nat Sci)*, 2013, 31(3): 346-348.
李燕, 王胜, 代志刚. AKT 在七氟醚后处理大鼠海马脑片缺氧无糖损伤中的作用 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2013, 31(3): 346-348.
- [12] MIAO ZF, WANG ZN, ZHAO TT, XU YY, WU JH, LIU XY, et al. TRIM24 is upregulated in human gastric cancer and promotes gastric cancer cell growth and chemoresistance [J]. *Virchows Arch*, 2015, 466(5): 525-532.
- [13] NAGAPPAN A, LEE WS, YUN JW, LU JN, CHANG SH, JEONG JH, et al. Tetraarsenic hexoxide induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt suppression and p38 MAPK activation in SW620 human colon cancer cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174591.
- [14] SANJIV K, CHEN CW, KAKADIYA R, TALA S, SUMAN S, WU MH, et al. PI3K inhibition augments the therapeutic efficacy of a 3a-aza-Cyclopenta[α]indene derivative in lung cancer cells [J]. *Transl Oncol*, 2014, 7(2): 256-266.
- [15] LIM W, SONG G. Inhibitory effects of delphinidin on the proliferation of ovarian cancer cells via PI3K/AKT and ERK 1/2 MAPK signal transduction [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1): 810-818.
- [16] LAMOKE F, LABAZI M, MONTEMARI A, PARISI G, VARANO M, BARTOLI M, et al. Trans-Chalcone prevents VEGF expression and retinal neovascularization in the ischemic retina [J]. *Exp Eye Res*, 2011, 93(4): 350-354.
- [17] YUAN LH, CHEN XL, DI Y, LIU ML. CCR7/p-ERK1/2/VEGF signaling promotes retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(6): 862-869.