

网络出版时间:2024-03-21 17:42:25 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.002

# 滑膜液中 PI3K/AKT/mTOR 信号轴介导巨噬细胞极化对膝关节炎促炎反应的作用

蒋总<sup>1</sup>,郭腾逊<sup>1</sup>,姚晓玲<sup>1</sup>,兰维娅<sup>1</sup>,唐芳<sup>2</sup>,马武开<sup>2</sup>,刘佳<sup>2</sup>

**摘要** 目的 已知 PI3K/AKT/mTOR 信号通路与膝关节炎(KOA)的进展有关,本研究旨在探讨 PI3K/AKT/mTOR 信号轴介导的巨噬细胞极化诱导是否是 KOA 进展的原因。方法 收集 KOA KL-II 与 KL-III 级患者与正常人的滑膜液,检测滑膜液中 M1 巨噬细胞(CD80、CD86)与 M2 巨噬细胞(CD163、CD206)百分比(M1/M2 比值),评估巨噬细胞极化细胞因子白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、转化生长因子(TGF)- $\beta$  在 KOA 滑膜液中的表达,并对 KOA 滑膜液中 PI3K/AKT/mTOR 信号轴关键分子 PI3K、AKT3、mTORC1 和诱导性一氧化氮合酶(iNOS)进行检测分析。结果 与正常人的滑膜液相比,KOA 患者中 M1 型巨噬细胞(CD80、CD86)百分比增加( $P < 0.01$ ),M1/M2 比值升高( $P < 0.001$ );KOA 组滑膜液中 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  表达也高于对照组( $P < 0.01$ ),KOA 组 IL-10、TGF- $\beta$  表达明显减少( $P < 0.01$ );KOA 组滑膜液中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中关键蛋白 PI3K、AKT3、mTORC1 及下游炎症因子 iNOS 高于对照组( $P < 0.01$ )。结论 在 KOA 滑膜液中,M1 型巨噬细胞极化占据主要地位,M1 巨噬细胞极化介导的炎症反应可能是滑膜炎产生的原因,同时 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能介导 M1 型巨噬细胞极化参与 KOA 炎症反应。

**关键词:** 膝关节炎;巨噬细胞极化;M1/M2;PI3K/AKT/mTOR 信号通路;滑膜液;炎症

中图分类号 R 684

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)03-0377-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.002

膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是多种因

2024-01-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160917);贵州省科技计划项目(编号:黔科合平台人才[2020]2202号、黔科合基础-ZK[2023]一般436);贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(编号:黔教合KY字[2022]262号);贵州省卫健委科技基金项目(编号:gzwkj2021-142);贵州中医药大学研究生教育创新计划自然科学项目(编号:YCXZRB202201)

作者单位:<sup>1</sup> 贵州中医药大学第二临床医学院,贵阳 550002

<sup>2</sup> 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科,贵阳 550003

作者简介:蒋总,男,博士研究生;

唐芳,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:64550932@qq.com

素介导的炎症性肌肉骨骼系统疾病,研究<sup>[1]</sup>表明滑膜炎与 KOA 密切相关,是 KOA 进展的主要因素,也可预测关节结构损伤。而巨噬细胞极化介导滑膜炎导致的滑膜肥大、增生和炎症细胞浸润是软骨退变的关键因素,也是 KOA 的主要致病因素<sup>[2]</sup>。抑制巨噬细胞极化减轻滑膜炎可能是延缓 KOA 进展的关键因素。

巨噬细胞极化可分为 M1、M2 两种,M1 型巨噬细胞极化产生白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等促进炎症反应,而 M2 极化产生 IL-4、IL-10 等抑炎因子<sup>[3]</sup>。M1 与 M2 型巨噬细胞比例失衡,特别是高表达 M1 型巨噬细胞极化介导的滑膜炎是导致 KOA 进展的主要因素之一,与 KOA 的严重程度显著相关<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>报道通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可抑制 KOA 的滑膜炎,保护关节软骨。因此,该研究旨在通过收集 KOA 患者以及正常人的滑膜液,分析 PI3K/AKT/mTOR 信号通路与巨噬细胞极化的关系,为临床防治 KOA 提供新见解。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 本研究 KOA 的滑膜液样本来自 2022 年 12 月—2023 年 1 月就诊于贵州中医药大学第二附属医院的女性患者[年龄 50~70(59.5 $\pm$ 7.0)岁]。KOA 诊断由风湿病医生根据 KOA(ICD-10 编码:M17.0)的诊断标准进行诊断,选取经放射学检查后根据 Kellgren-Lawrence(KL)分级为 II 级、III 级且有关节腔滑液的 6 名患者为 KOA 组。排除有其他自身免疫疾病相关的关节炎、代谢相关性关节炎、感染性关节炎、肿瘤相关关节炎、或近 3 个月有膝关节损伤病史的关节炎患者。同时通过年龄、身体质量指数(body mass index, BMI)匹配招募正常女性 3 人(50~70 岁)为对照组。于关节腔内注射灭菌注射用水,充分混匀后抽取膝关节滑膜液,严格按照无菌原则在密闭环境中进行。本研究经贵州中医药大学第二附属医院医学伦理委员会批准

(批号:KYW2022020),所有受试者在参与研究前均签署了书面知情同意书。

**1.1.2 主要材料与仪器** 一抗胞内磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)、p-AKT3、诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide, iNOS)、山头抗兔二抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:A0265、AP0854、A11016、AP0637、A3774、AS014);雷帕霉素靶蛋白 C1(mammalian target of rapamycin C1, mTORC1)(美国 CST,货号:2983T);PE 抗人-CD86、CD80、CD163、CD206(北京安诺伦生物科技有限公司,货号:B357748、B332514、B357816、B358504);IL-1、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) ELISA 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,货号:F0177-B、F0049-B、F0065-B、F0121-B、F1767-B);TRIzol(美国 invitrogen,货号:ab137872)RPMI-1640 培养基(上海源培生物科技股份有限公司,货号:L210KJ);RIPA 裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂、RNase and DNase AWAY(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号:P0013B、P1045、R0123);2  $\times$  T5 Fast qPCR Mix(SYBR Green 1)、Goldenstar<sup>TM</sup> RT6 cDNA Synthesis Kit Ver. 2(北京擎科生物科技股份有限公司,货号:TSE002、TSK302M)。精密恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:BPH-9042);蛋白电泳仪、蛋白湿转仪、实时荧光定量 PCR 仪、水平电泳槽、核酸蛋白凝胶成像仪、曝光仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司,型号:Mini-Sub Cell GT、Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell、IQ5、PowerPac Basic、Gel Doc XR +、732BR1158);酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号:cMAXPlus)。

## 1.2 方法

**1.2.1 流式细胞检测滑膜液中 M1、M2 型巨噬细胞标志物** 将 KOA 患者和健康对照组新鲜的滑膜液用 100 目细胞筛过滤后收集细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,收集重悬细胞加入 RPMI 1640 培养基悬浮后,加入 15 ml 淋巴分离液、重悬后细胞平铺到分离液液面上方,收集交界面的巨噬细胞,加入 5  $\mu$ l 巨噬细胞标记物(CD86、CD80、CD163、CD206),震荡混匀、室温下避光孵育 20 min、加入 1 ml PBS 混匀,1 000 r/min 离心 5 min,同时设置空白对照,加入 PBS 重悬细胞后上流式细胞仪检测。通过流式细胞术检测结果,将所有滑膜液中 M1 阳性细胞的平均百分比(CD80、CD86)除以 M2 阳性细胞(CD163、CD206)的平均百分比计算 M1/M2 比率,

以判定 KOA 滑膜液中巨噬细胞极化的类型。

**1.2.2 ELISA 检测滑膜液中 IL-1、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  表达** 根据 ELISA 试剂盒说明书,室温平衡试剂盒,稀释标准品封板后置于 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min,取出封板膜后弃去液体,加满洗涤液静置 30 s 后弃去洗涤液,重复 5 次,加入酶标试剂,再次 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min,加入洗涤液清洗 5 次,加入显色剂震荡混匀,37  $^{\circ}$ C 避光显色 10 min 后加入终止液,酶标仪中以 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度。

**1.2.3 RT-PCR 检测 PI3K、AKT3、mTORC1、iNOS mRNA 的表达** PI3K、AKT3、mTORC1 是 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发生细胞转录、增殖的关键因子,iNOS 是 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的关键下游因子,通过 RT-PCR 检测探索 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在滑膜液中的机制。按照 TRIzol 试剂盒提取滑膜液中总的 RNA,分光光度法计算各样本中 RNA 的浓度和纯度,按照试剂盒说明书进行反转录。在 PCR 仪中进行扩增,条件为 95  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环进行扩增,通过  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算相对表达量,引物序列列表见表 1。

表 1 引物序列表

引物名称	序列
PI3K	F: 5'-ATGAAGCCTTTGTGGCTGCT-3' R: 5'-CTTCAATGAGGCCAGAGCGA-3'
AKT3	F: 5'-CATTGTGCGAGAGACGGGT-3' R: 5'-GGCTGCATCTGTGATCCCTT-3'
mTORC1	F: 5'-CATGCTGGCAGTGGGACTAA-3' R: 5'-TTCAAAGCTGCCAAGCGTTC-3'
iNOS	F: 5'-CGCATGACCTTGGTGTGTTGG-3' R: 5'-CATAGACCTTGGGCTTGCCA-3'

**1.2.4 Western blot 检测 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT3、mTORC1、iNOS 蛋白表达** 将滑膜液装入 1.5 ml 离心管中 3 000 r/min 离心 5 min,洗涤 2 次后收集细胞,加入 RIPA 裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂充分裂解细胞后 13 000r/min 离心 20 min,进行电泳、转膜(转移时间根据蛋白分子量大小确定,1 kDa/min + 30 min),封闭,加入 1:1 000 的一抗 PI3K、p-PI3K、AKT3、p-AKT3、mTORC1、iNOS 和 GAPDH 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,冲洗 3 次后用加入 1:2 000 HRP 标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 h 后放入曝光仪中曝光检测,使用 GAPDH 作为内参,通过目标蛋白灰度值/内参总灰度值计算相对蛋白表达。

**1.3 统计学处理** 数据以均数  $\pm$  标准差表示,符合正态分布且方差齐的两组间比较使用 *t* 检验,否则

用 Mann-Whitney *U* 进行统计分析。所有统计资料使用 SPSS 25.0 进行统计分析,使用 GraphPad Prism 9 作图软件作图, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人口学特征** 纳入 KOA 的患者中 KL 分级 II 级和 III 级各 3 例,平均年龄为 59.5 岁,病程平均 30.3 个月,平均 BMI 为 23.9。对照组中年龄平均为 56.3 岁,平均 BMI 为 20.7。KOA 患者与正常受试者在 BMI、年龄上差异无统计学意义。见表 2。

表 2 研究人群的基本特征

特征	KOA ( <i>n</i> = 6)	对照组 ( <i>n</i> = 3)	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值
年龄(岁)	59.5 ± 7.0	56.3 ± 4.7	0.51	0.70
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.9 ± 2.3	20.7 ± 1.2	0.07	-2.11
KL-II/KL-III	3/3	-		
病程(月)	30.3 ± 10.6	-		

**2.2 不同滑膜液的镜下特点** KOA 组滑膜液外观呈淡黄色,稍浑浊,可见部分淋巴细胞(图 1A)。对照组为清亮、透明,未见明显细胞浸润(图 1B)。提示 KOA 患者滑膜液存在炎症性改变。

**2.3 M1 型巨噬细胞极化在 KOA 滑膜液中占主导作用** 通过流式细胞术检测巨噬细胞 M1 (CD80、

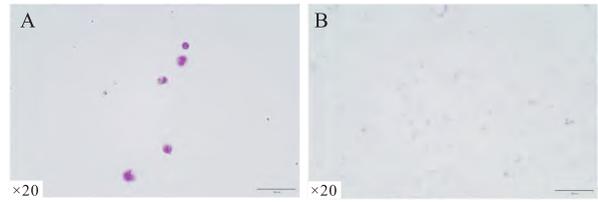


图 1 两组滑膜液的光学显微镜下图

A:KOA 组滑膜液的光学显微镜下图; B:对照组滑膜液的光学显微镜下图

CD86) 和 M2 (CD163、CD206) 在 KOA 患者与对照组的滑膜液巨噬细胞的状态发现, KOA 滑膜液中 CD80 与 CD86 细胞阳性率增加(均  $Z = -2.353$ 、 $-2.353$ , 均  $P < 0.001$ ), 而对照组中 CD163 与 CD206 细胞阳性率高于 KOA 组(图 2A) (均  $Z = -2.353$ 、 $-2.353$ , 均  $P < 0.01$ )。与对照相比, KOA 滑膜液样品细胞中的 M1/M2 比值更高( $t = 35.756$ ,  $P < 0.001$ ) (图 3)。提示在 KOA 中 M1 型巨噬细胞极化占有主导作用。

**2.4 不同组别滑膜液中细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10 和 TGF- $\beta$  的浓度比较** 在 ELISA 选定的细胞因子面板中, KOA 滑膜液中 M1 型巨噬细胞促炎因子 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达明显高于对照组细胞( $t = -35.728$ 、 $-17.679$ ,  $Z = -2.353$ , 均  $P < 0.001$ )。与之相反, M2 型巨噬细胞抑炎因子 TGF- $\beta$

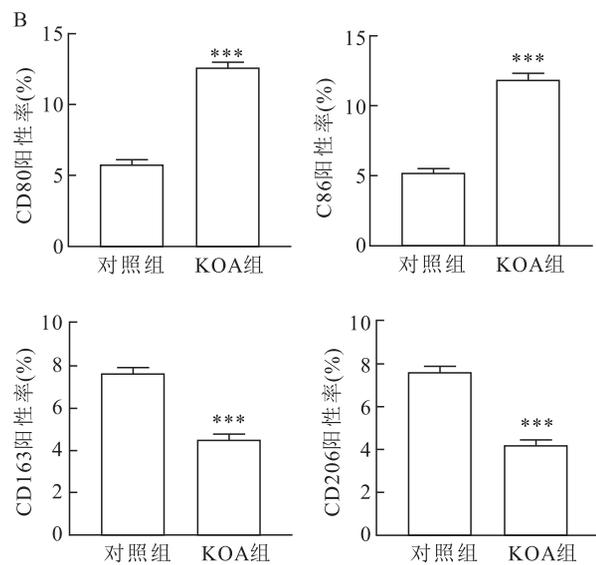
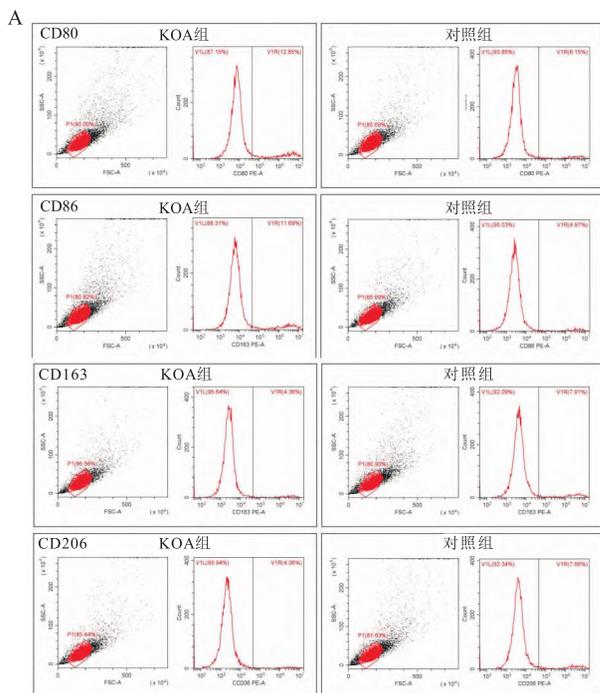


图 2 不同组别滑膜液中巨噬细胞标志物比较

A:巨噬细胞及其亚型的代表性散点图; B:巨噬细胞阳性百分比直方图;与对照组比较:\*\*\*  $P < 0.001$

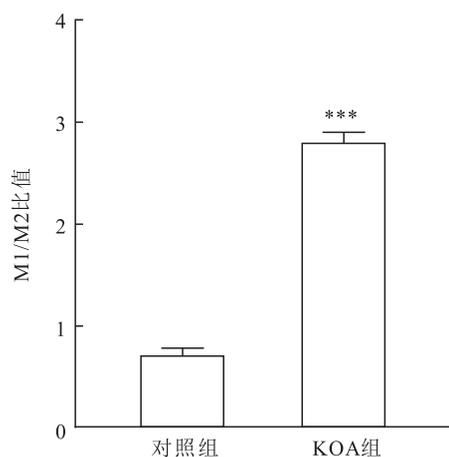


图3 两组 M1/M2 比值的比较  
与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

和 IL-10 在 KOA 滑膜液中低于对照组 ( $t = 214.452$ ,  $Z = -2.353$ , 均  $P < 0.001$ )。见图 4。这说明 M1 巨噬细胞极化在 KOA 滑膜液的炎症作用中起主要作用。

### 2.5 KOA 滑膜液中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路关键因子 PI3K、AKT3、mTORC1 mRNA 表达情况

通过 RT-PCR 进行检测发现 PI3K、AKT3、mTORC1 在 KOA 滑膜液中表达高于对照组 ( $Z = -2.353$ ,  $-2.353$ ,  $t = 4.869$ , 均  $P < 0.01$ ), 说明 PI3K/

AKT/mTOR 信号通路在 KOA 滑膜液中被激活。PI3K/AKT/mTOR 信号通路下游靶点因子 iNOS 在 KOA 滑膜液中表达也升高 ( $t = 7.360$ ,  $P < 0.01$ )。见图 5。说明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活介导下游炎症因子释放可能是 KOA 滑膜液炎症反应产生的主要原因。

### 2.6 KOA 滑膜液中 PI3K、AKT3、mTOR 和 iNOS 蛋白表达上调

Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, KOA 组滑膜液中 PI3K/AKT/mTOR 通路关键蛋白 PI3K、p-PI3K、AKT3、p-AKT3、mTORC1 均上调 ( $Z = -2.364$ ,  $-2.438$ ,  $t = -6.177$ ,  $Z = -2.438$ ,  $t = -7.965$ , 均  $P < 0.01$ ), 通路下游 iNOS 蛋白表达也上调 ( $t = -7.647$ ,  $P < 0.01$ ) (图 6)。

## 3 讨论

滑膜在维持关节软骨内稳态方面起着重要作用, 是关节功能正常的重要保障。随着研究的深入, 发现<sup>[6]</sup>滑膜炎伴随 KOA 的整个过程, 滑膜炎有可能是导致 KOA 发生的重要原因, 滑膜炎产生的炎症反应可以直接作用于关节软骨, 导致关节软骨结构发生改变, 加速关节退变的过程<sup>[6]</sup>。

巨噬细胞极化介导的滑膜炎导致滑膜增厚并伴有肥大和增生、血管密度增加、炎症细胞浸润(淋巴

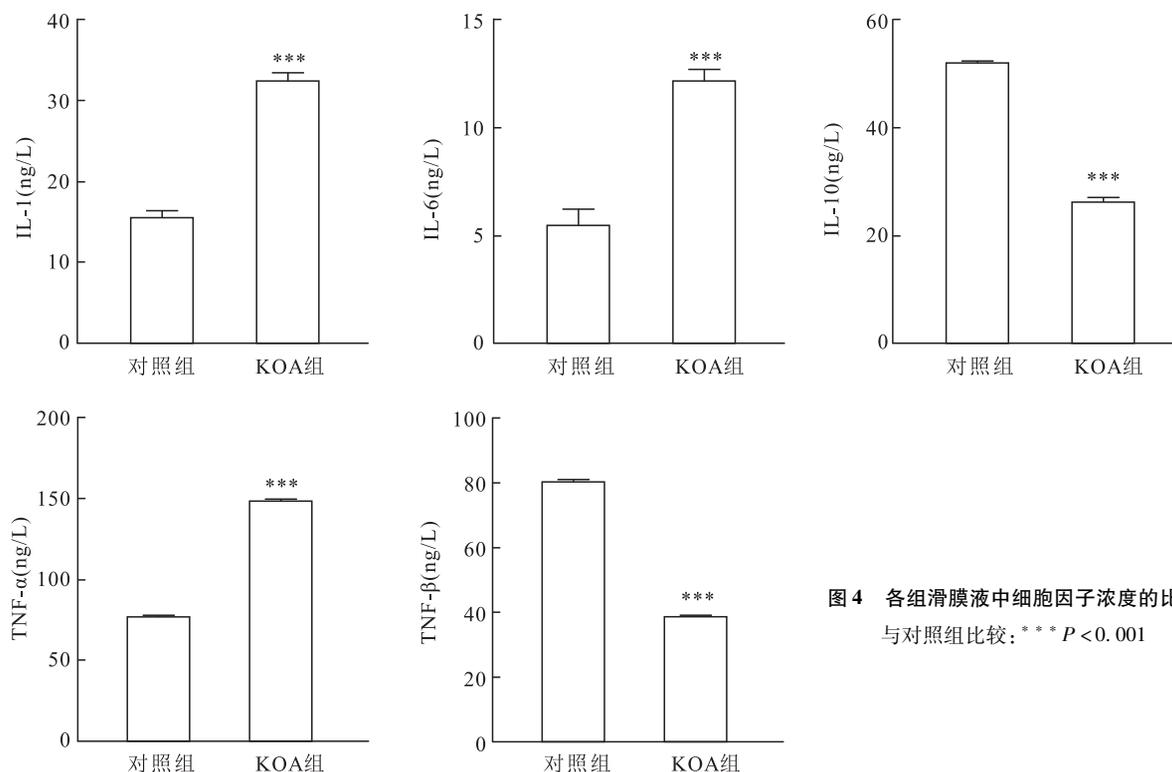


图4 各组滑膜液中细胞因子浓度的比较  
与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

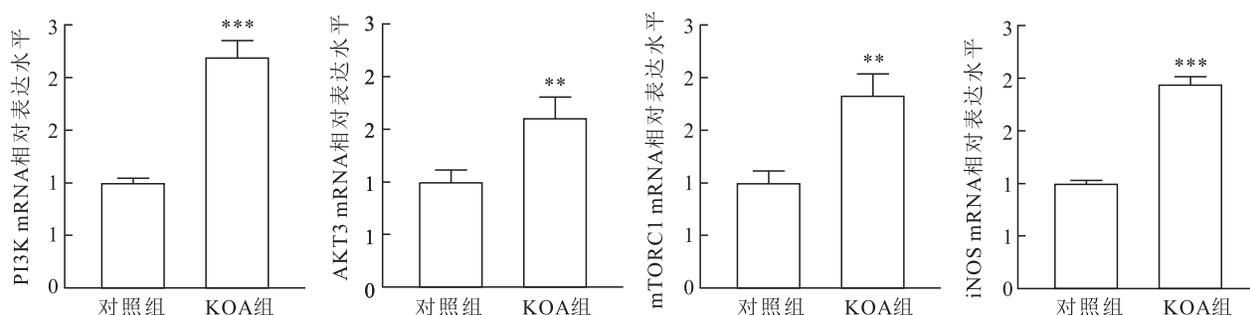


图5 PI3K/AKT/mTOR 通路关键因子 mRNA 相对表达的比较

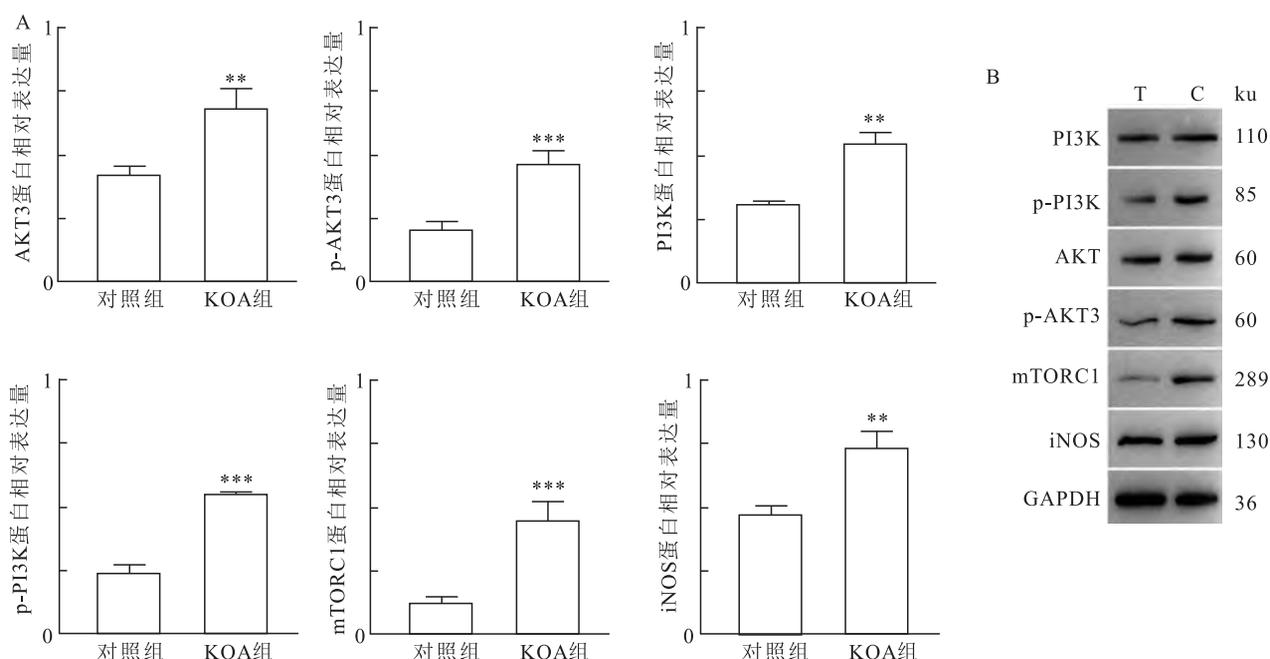
与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 

图6 两组滑膜液中蛋白相对表达及条带图

A: 关键蛋白及磷酸化相对表达水平; B: KOA 组与对照组不同蛋白条带图; C: 对照组; T: KOA 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

细胞和巨噬细胞)是 KOA 的共同特征<sup>[8]</sup>。早在 2015 年, Daghestani<sup>[9]</sup> 使用显像剂 99mTc-EC20 证明 KOA 患者体内滑膜巨噬细胞极化存在, 且其数量与 KOA 的严重程度和影像学改变密切相关, 通过动物实验也证明巨噬细胞极化可以促进骨关节炎的进展<sup>[10]</sup>, 表明巨噬细胞极化与 KOA 发病密切相关。李兵等<sup>[11]</sup> 通过关节内注射单碘乙酸溶液诱导 OA 大鼠模型发现, OA 大鼠模型组 M1/M2 比值明显升高, 通过双氯芬酸钠干预促进 M2 巨噬细胞极化下调 M1/M2 有利于减轻 OA 大鼠的疼痛和软骨退化。本研究发现 M1 型巨噬细胞极化在 KOA 中占有主要地位, M1/M2 比值升高, M1 型巨噬细胞极化标记物 CD80、CD86 阳性率增加, 提示 M1 型巨噬细胞极化介导的滑膜炎很可能是导致 KOA 软骨退变的主

要因素。

PI3K/AKT/mTOR 信号轴在细胞增殖与凋亡、转录和迁移过程中发挥关键作用, 同时也是巨噬细胞极化的关键因子, 活化后可抑制巨噬细胞向 M1 极化。PI3K 可被细胞因子、生长因子、激素等细胞外的各种信号激活<sup>[12]</sup>, 并与细胞内含有 PH 结构域的 AKT 和丙酮酸脱氢酶激酶 1 (phosphoinositide dependent kinase-1, PDK1) 结合, 促使 PDK1 磷酸化 AKT 蛋白从而导致 AKT 活化, 磷酸化的 AKT 可激活 mTOR, 活化的 mTORC1 激活 NF- $\kappa$ B 诱导 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 过表达, 使滑膜产生炎症并诱导 M1 型巨噬细胞极化, 进一步使软骨细胞损伤, 导致关节软骨退变及局部炎症级联反应从而导致 KOA 的发生<sup>[13]</sup>。其次, 活化的 mTORC1 可促使部分炎症

因子如 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、基质金属蛋白酶作用于巨噬细胞促进 M1 型巨噬细胞极化, M1 型巨噬细胞极化反过来可上调 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达导致关节软骨炎症反应、软骨破坏降解。最后, IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等的表达会使 PI3K/AKT/mTOR 通路负向调控 mTORC1 产生大量的炎症造成软骨退变, 软骨中高表达的 IL-1、IL-6 反过来又会促进 M1 型巨噬细胞极化<sup>[14]</sup>, 使“PI3K/AKT/mTOR 通路激活→M1 型巨噬细胞极化→炎症反应→PI3K/AKT/mTOR 通路激活”始终处于一个循环反应中, 最终导致 KOA 患者关节软骨退变。本研究显示 KOA 患者滑膜液中 PI3K、AKT3 和 mTORC1 表达升高且促炎因子 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  升高, 提示 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能与 KOA 的滑膜液产生相关, 并且可能与滑膜炎、巨噬细胞极化密切相关, 这与之前的报道相一致<sup>[15]</sup>。提示 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能调控巨噬细胞极化参与 OA 的发病。

综上所述, 本研究表明, 在 KOA 滑膜液中, M1 型巨噬细胞极化占据主要地位, M1 巨噬细胞极化介导的炎症反应可能是滑膜炎产生的主要原因, 同时 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活化可能介导了 M1 型巨噬细胞极化参与 KOA 炎症反应。今后的研究中, 可以进一步探索是否可以通过阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 抑制 M1 型巨噬细胞极化, 从而减轻滑膜炎, 达到治疗 KOA 的目的。

### 参考文献

- [1] Zhang J, Rong Y, Luo C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24):25138-52.
- [2] Li Y, Zhou Y, Wang Y, et al. Synovial macrophages in cartilage destruction and regeneration- lessons learnt from osteoarthritis and synovial chondromatosis [J]. *Biomedical Mater*, 2022, 17(1):012001.
- [3] Ryyti R, Hämäläinen M, Leppänen T, et al. Phenolic compounds known to be present in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea L.*) enhance macrophage polarization towards the anti-inflammatory M2 phenotype [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12):3045.
- [4] Liu, B, Zhang M, Zhao J, et al. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6):5009-14.
- [5] Hao F, Wang Q, Liu L, et al. Effect of moxibustion on autophagy and the inflammatory response of synovial cells in rheumatoid arthritis model rat [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42(1):73-82.
- [6] Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, et al. Synovial inflammation in osteoarthritis progression [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(5):258-75.
- [7] Sun H, Sun Z, Xu X, et al. Blocking TRPV4 ameliorates osteoarthritis by inhibiting M1 macrophage polarization via the ROS/NLRP3 signaling pathway [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(12):2315.
- [8] 魏松松, 徐斌, 汪昊, 等. IL-21 在骨性关节炎中的作用及机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(11):1829-33.
- [9] Daghestani H N, Pieper C F, Kraus V B. Soluble macrophage biomarkers indicate inflammatory phenotypes in patients with knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(4):956-65.
- [10] Zhang H, Lin C, Zeng C, et al. Synovial macrophage M1 polarization exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(10):1524-34.
- [11] 辛兵, 李志君, 王永升等. 双氯芬酸钠对骨关节炎大鼠模型软骨细胞炎症和滑膜巨噬细胞极化的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(2):129-34.
- [12] Miricescu D, Balan D G, Tulin A, et al. PI3K/AKT/mTOR signalling pathway involvement in renal cell carcinoma pathogenesis (Review) [J]. *Exp and Ther Med*, 2021, 21(5):540.
- [13] Choi M C, Jo J, Park J, et al. NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction [J]. *Cells*, 2019, 8(7):734.
- [14] Wang L, He C. Nrf2-mediated anti-inflammatory polarization of macrophages as therapeutic targets for osteoarthritis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:967193.
- [15] Zhang H, Cai D, Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(5):555-61.

## PI3K/AKT/mTOR in synovial fluid extends the proinflammatory response of macrophage polarization in knee osteoarthritis

Jiang Zong<sup>1</sup>, Guo Tengxun<sup>1</sup>, Yao Xiaoling<sup>1</sup>, Lan Weiya<sup>1</sup>, Tang Fang<sup>2</sup>, Ma Wukai<sup>2</sup>, Liu Jia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Second Clinical Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002;

<sup>2</sup>Dept of Rheumatology and Immunology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003)

**Abstract Objective** Given that the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is associated with the progression of knee osteoarthritis (KOA), this study aims to investigate whether the polarization induction of synovial macrophages

mediated by the PI3K/AKT/mTOR signaling axis is the cause of KOA progression. **Methods** The synovial fluid of KOA KL-II and KL-III patients and normal individuals was collected, and the percentage of M1 macrophages (CD80, CD86) and M2 macrophages (CD163, CD206) in the synovial fluid (M1/M2 ratio) was measured to evaluate the polarization of macrophage cytokines such as IL-1, IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$  Expression in KOA synovial fluid, and detect and analyze of key molecules PI3K/AKT/mTOR signaling axis PI3K, AKT3, mTORC1, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in KOA synovial fluid. **Results** Compared with the synovial fluid of normal individuals, the percentage of M1 macrophages (CD80, CD86) in KOA patients increased ( $P < 0.01$ ), and the M1/M2 ratio increased ( $P < 0.001$ ); The expression of IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  in the synovial fluid of the KOA group was also higher than that of the control group ( $P < 0.01$ ), while the expression of IL-10 and TGF- $\beta$  in the KOA group was significantly reduced ( $P < 0.01$ ); The key proteins PI3K, AKT3, mTORC1, and downstream inflammatory factor iNOS in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in the synovial fluid of the KOA group were higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** In KOA synovial fluid, M1 macrophage polarization plays a dominant role, and the inflammatory response mediated by M1 macrophage polarization may be the cause of synovitis. At the same time, the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway may mediate the polarization of M1 macrophages involved in KOA inflammatory response.

**Key words** knee osteoarthritis; macrophage polarization; M1/M2; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; synovial fluid; inflammation

(上接第 376 页)

estradiol secretion in human ovarian granulosa cells (KGN cell line). **Methods** The gene sequence of human SOX3 (NM\_005634.3) was searched in Gene-Bank, an NCBI database, and the target gene SOX3 was amplified by PCR, which was cloned into lentiviral vector pLV-EF1a-GFP-2A-Puro to obtain the overexpression lentiviral recombinant plasmid pLV-EF1a-GFP-2A-Puro-SOX3; the correctly sequenced overexpressed lentiviral recombinant plasmid as well as packaging plasmids (pGag/Pol, pRev, pVSV-G) were co-transfected into human embryonic kidney cell line (HEK 293T) cells (pLV-SOX3 group), and pLV-EF1a-GFP-2A-Puro and packaging plasmids (pGag/Pol, pRev, pVSV-G) were co-transfected into HEK 293T cells (pLV-NC group), the lentiviral particles of both groups were collected and the titers of the viruses were measured after 48 h of transfection, the lentiviruses of the two groups were infected into KGN cells, and the stably expressed cell lines were obtained after puromycin screening for 2 weeks; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the SOX3 mRNA and protein levels in the two groups; CCK-8 assay was used to detect the proliferative ability of the cells in the two groups; ELISA was used to determine the concentration of estradiol in the two groups. **Results**

The identification of PCR products and sequencing results showed that the SOX3 gene fragment was amplified successfully, and the enzyme digestion and sequencing results indicated that the construction of overexpression lentiviral recombinant plasmid was completed; green fluorescence could be detected after lentiviral infection of HEK 293T cells, which indicated that lentiviral packaging was successful; the lentivirus was screened by puromycin after lentiviral infection of KGN cells, and the cells were observed to express green fluorescence under the fluorescence microscope; RT-qPCR and Western blot assays both showed that the expression level of SOX3 in the pLV-SOX3 group was significantly higher than that in the pLV-NC group ( $P < 0.05$ ). CCK-8 assay results showed that the proliferation ability of the cells in the pLV-SOX3 group significantly increased compared with that in the pLV-NC group ( $P < 0.01$ ). ELISA results showed that estradiol concentration was elevated in the pLV-SOX3 group compared with the pLV-NC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of the transcription factor SOX3 can promote the proliferation and estradiol secretion of human ovarian granulosa cells KGN.

**Key words** SOX3; ovarian granulosa cell; lentiviral vector; proliferation; estradiol; green fluorescent protein