

临床研究

Survivin 和 PI3K、AKT 在寻常型银屑病皮损角质形成细胞中的表达及其相关性

王昊¹, 冉立伟², 惠珂³, 王新阳³, 郑焱¹¹西安交通大学第二附属医院皮肤科, 陕西 西安 710004; ²首都医科大学附属北京朝阳医院西区皮肤科, 北京 100043; ³西安交通大学第一附属医院泌尿外科, 陕西 西安 710061

摘要:目的 探讨凋亡抑制蛋白 Survivin 和 PI3K、AKT 在寻常型银屑病(PV)进行期斑块状皮损角质形成细胞(KCs)中的表达水平及作用。方法 临床上收集 22 例 PV 患者进行期斑块状皮损以及 18 例正常皮肤组织。采用免疫组织化学、Western blot 和 real-time quantitative PCR 等方法检测 22 例 PV 患者进行期斑块状皮损和 18 例正常皮肤组织中 KCs 的 Survivin、PI3K 和 AKT 表达, 并分析它们在 PV 皮损 KCs 中的相关性。使用小干扰 RNA (siRNA) 在 HaCaT 细胞中沉默 AKT, 并通过 Western blot 实验检测 Survivin 的表达水平。结果 PV 皮损 KCs 中 Survivin、PI3K 和 AKT 的蛋白表达水平均高于正常皮肤组织。PV 皮损 KCs 中 Survivin 和 PI3K mRNA 表达成正相关($r=0.4510$; $P=0.0351$); PV 皮损 KCs 中 Survivin 和 AKT mRNA 表达成正相关($r=0.4423$; $P=0.0393$); 在 HaCaT 细胞中, 沉默 AKT 后可引起 Survivin 的表达下调。结论 凋亡抑制蛋白 Survivin 与 PI3K/AKT 信号通路可能参与了 PV 的发生与发展。

关键词: Survivin; PI3K; AKT; 寻常型银屑病

Expressions of survivin, PI3K and AKT in keratinocytes in skin lesions and their pathogenic role in psoriasis vulgaris

WANG Hao¹, RAN Liwei², HUI Ke³, WANG Xinyang³, ZHENG Yan¹¹Department of Dermatology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of Dermatology and Venereology, Jingxi Campus of Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100043, China; ³Department of Urology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To explore the role of survivin and PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of psoriasis vulgaris (PV). **Methods** Plaque-like lesions collected from 22 patients with PV in progressive stage and 18 normal control skin specimens were examined using immunohistochemical staining, Western blotting and real-time quantitative PCR for expressions of survivin, PI3K and AKT in the keratinocytes, and their correlation was analyzed. A small interfering RNA (siRNA) was used to knock down AKT in cultured HaCaT cells, and Western blotting was used to detect the changes in the expression of survivin. **Results** Compared with normal skin, PV lesions showed obviously up-regulated expressions of survivin, PI3K and AKT in the keratinocytes. Survivin expression was positively correlated with PI3K ($r=0.4510$, $P=0.0351$) and AKT ($r=0.4423$, $P=0.0393$) in the keratinocytes in PV lesions. In cultured HaCaT cells, siRNA-mediated knockdown of AKT caused down-regulation of survivin expression. **Conclusion** Survivin and PI3K/AKT signaling pathway may participate in the occurrence and progression of PV.

Keywords: Survivin; PI3K; AKT; psoriasis vulgaris

银屑病是临床常见的一种慢性复发的炎症性皮肤病, 超过 90% 的银屑病患者为寻常型银屑病(PV), 其组织病理表现主要为表皮角质增厚、真皮乳头层血管增生和炎症细胞浸润^[1-3]。然而, 银屑病的病因及发病机制

尚不完全清楚。存活素(Survivin)作为一种凋亡蛋白抑制因子(IAP), 广泛表达于各种肿瘤组织中, 如乳腺癌、口腔癌、肺癌和肝癌等^[4-7]。然而, 目前 Survivin 在银屑病中的表达水平仍存在争议。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路是肿瘤研究的热门信号通路, 它参与了肿瘤的增殖、转移、耐药以及凋亡抑制等过程^[8]。目前研究发现其与银屑病的发生发展可能相关^[9-10]。为进一步探索 Survivin、PI3K、AKT 在银屑病发病机制中的作用, 本研究在基因、蛋白、细胞水平并

收稿日期: 2017-10-04

基金项目: 国家自然科学基金(30960349)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30960349).

作者简介通信作者: 王昊, 副主任医师, 医学博士, 硕士生导师, E-mail: wanghaonyc@163.com

应用小干扰RNA(siRNA)策略,检测人银屑病皮损角质形成细胞(KCs)中Survivin、PI3K和AKT蛋白和mRNA的表达水平并探讨其相关性和意义。

1 材料和方法

1.1 临床资料

寻常型银屑病(PV)患者22例,均来自西安交通大学第二附属医院皮肤科门诊患者,患者均具有典型的临床症状及病理特征,符合PV进行期的诊断标准,其中男性12例,女性10例,年龄24~60岁,平均41.68岁;病程3月~22年,平均7.63年。以同期我院皮肤外科18例美容整形患者切除的正常皮肤组织作为对照组,其中男性10例,女性8例,年龄15~51岁,平均39.81岁。所有银屑病患者取材前3月未服用或外用糖皮质激素、免疫抑制剂及维A酸类药物,取材前2周内未使用任何药物治疗,且不伴有其他皮肤及系统疾病。所有标本取材均按常规皮肤活检手术进行。银屑病患者组与健康对照组在年龄、性别等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 免疫组织化学

采用EnVision二步法:65℃烤片,二甲苯脱蜡,酒精梯度水化,高压锅抗原修复5 min,阻断内源性过氧化物酶10 min,一抗(Survivin、PI3K、AKT均购买于北京博奥森生物公司)(浓度参考抗体说明书)孵育4℃过夜,二抗常温孵育30 min,DAB显色,苏木素复染,盐酸分化和氨水反蓝,酒精梯度脱水,二甲苯透明和中性树脂胶封片,最后再显微镜下观察和拍片。免疫组织化学染色评分:根据着色强度(无、弱、中等、强)分别评0、1、2、3分;根据阳性细胞百分比[(0~25)%、(25~50)%、(50~75)%、(75~100)%]分别评1、2、3、4分,总分为着色强度评分和阳性细胞百分比评分的乘积。

1.3 细胞培养

将HaCaT细胞株培养于含10%胎牛血清的1640培养基(Gibco)中,并将细胞置于37℃、5% CO₂的培养箱中进行培养。

1.4 siRNA转染

AKT siRNA(吉玛生物),siAKT序列为:正义链5'-UUGUAGCCAAUGAAGGUGCCA-3',反义链5'-GCACCUUCAUUGGCUACAATT-3',转染试剂X-tremeGENE siRNA transfection reagents购自Roche公司。将 1.5×10^5 HaCaT细胞种植于6孔细胞培养板。24 h后采用X-tremeGENE siRNA transfection reagents将2 μg/孔siRNA转染到细胞内,继续培养48 h后提取细胞总蛋白。

1.5 Western blot

常规提取组织和细胞总蛋白,使用10%的SDS-PAGE凝胶进行电泳分离蛋白,电泳后采用湿转的方法

将蛋白转移至PVDF膜上,5%脱脂牛奶常温封闭1 h,一抗(Survivin、PI3K、AKT和GAPDH均购买于北京博奥森生物公司)孵育4℃过夜,TBST洗涤3次,5 min/次,HRP标记的二抗(CST)常温孵育1 h,TBST洗涤3次,5 min/次,在暗室中将PVDF膜蛋白面浸入HRP-ECL发光液中,并使用ChemiDoc XRS成像系统显影。使用GAPDH作为内参。

1.6 Real-time PCR

使用Trizol试剂提取组织和细胞中的总RNA。使用PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real-time)反转录试剂盒对所提取的RNA进行反转录。将反应物混合后,放入MyCycler™普通PCR仪中进行反转录。当成功反转录为cDNA后,使用SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus)试剂盒进行Real-time quantitative PCR实验。其中引物序列为:Survivin,上游引物5'-CACCCCGGAGCGGATGG-3',下游引物5'-GTCATCTGGCTCCCAGCCTTC-3';AKT,上游引物5'-AGCGACGTGGCTATTGTGAAG-3',下游引物5'-GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT-3';PI3K,上游引物5'-TATTTGGACTTTGCGACAAGACT-3',下游引物5'-TCG AACGTACTGGTCTGGATAG-3';GAPDH,上游引物5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游引物5'-GAACCTGGAAGAGTCCGAAGTA-3'。其中GAPDH作为内参。

1.7 统计学方法

使用Graphpad Prism 5.0版本软件分析两组之间的差异(two-tailed student's *t*检验),采用Pearson correlation分析Survivin与PI3K、AKT表达的相关性。当 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学和Western blot检测

与正常皮肤相比,Survivin、PI3K和AKT蛋白在PV皮损组织KCs中表达上调(图1)。

2.2 Real-time quantitative PCR检测及相关性分析

Survivin和PI3K mRNA的表达呈正相关($r=0.4510$; $P=0.0351$);Survivin和AKT mRNA表达呈正相关($r=0.4423$; $P=0.0393$,图2)。

2.3 siRNA干扰技术

在HaCaT细胞中,沉默AKT可以下调Survivin的表达(图3)。

3 讨论

Survivin作为凋亡蛋白抑制因子(IAP)家族成员中抗凋亡作用最强的蛋白之一,目前广泛的在各种肿瘤组织中表达,如乳腺癌、口腔癌、肺癌和肝癌等^[4-7]。大量研

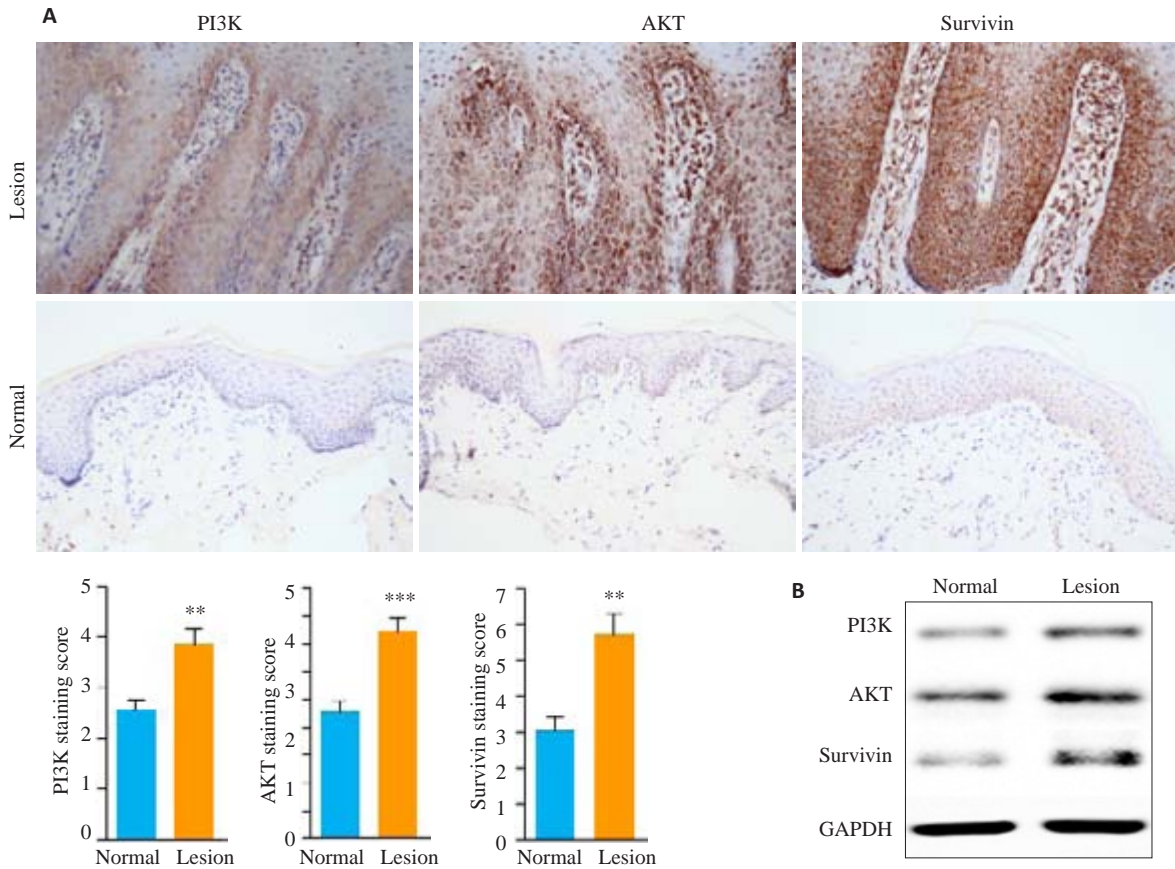


图1 Survivin、PI3K和AKT在PV皮损KC中的表达

Fig.1 Expression of survivin, PI3K and AKT in the keratinocytes in PV lesions. A: Immunohistochemical staining of survivin, PI3K and AKT in the keratinocytes in normal skin and PV lesions (Original magnification: × 400); B: Western blot analysis of survivin, PI3K and AKT in the keratinocytes in normal skin and PV lesions. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs normal skin.

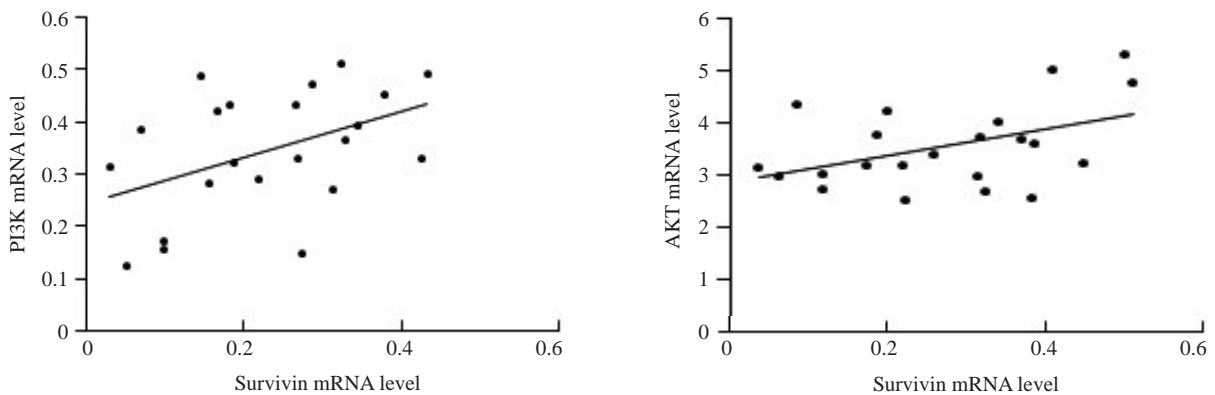


图2 PV皮损KC中Survivin、PI3K和AKT的相关性分析

Fig.2 Correlation analysis of survivin, PI3K and AKT in the keratinocytes in PV lesions. Left: Correlation analysis between survivin and PI3K mRNA; Right: Correlation analysis between survivin and AKT mRNA.

究发现Survivin在肿瘤中高表达且可以抑制肿瘤细胞的凋亡,从而促进肿瘤的发生、增殖和对放射治疗以及化学治疗的抵抗^[6, 11-13]。PV是一种慢性炎症性、增殖性皮肤病,角质形成细胞增殖过度和凋亡的缺失不足是PV发生发展的机制之一^[1-2]。目前有关Survivin在PV皮损中的表达水平尚有争议。Bowen等^[14]发现最先报

道Survivin在皮肤肿瘤和角质细胞增生皮损中表达增高,而在正常皮肤中表达较低。Simonetti等^[15]报道Survivin和血管内皮生成因子(VEGF)在PV皮损中均表达上调。同样,Wang等^[16]发现Survivin不仅在PV皮损中表达上调,且与抗菌肽 β -defensin-3表达呈正相关。然而,Gunduz K等^[17]报道PV皮损中survivin蛋白

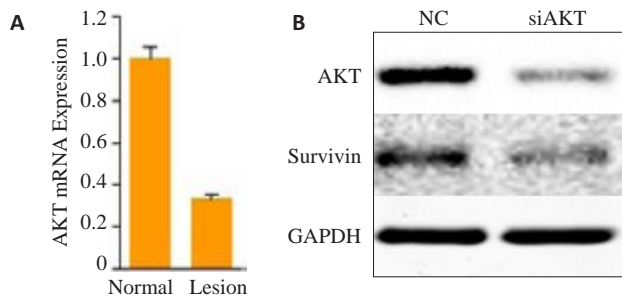


图3 PV皮损KCs中PI3K/AKT信号通路和Survivin的相关性
Fig.3 Correlation between PI3K/AKT signaling pathway and survivin in the keratinocytes in PV lesions. A: Real-time quantitative PCR of AKT in HaCaT NC and AKT-deficient sublines; B: Western blot analysis of AKT and survivin in HaCaT NC and AKT deficient sublines.

表达水平与正常皮肤中的表达水平没有差异。为了进一步明确 survivin 在 PV 皮损中的表达情况,我们在蛋白和 mRNA 水平上进行探究,发现 survivin mRNA 和蛋白水平在 PV 皮损中的表达水平均高于正常皮肤。

PI3K/AKT 信号通路在细胞生长、增殖等功能中起重要的作用^[18-19]。AKT 是 PI3K 下游的靶蛋白,可以通过磷酸化其下游 mTOR、Bad 等蛋白,从而调控细胞的增殖和凋亡^[20, 23]。大量研究证明,PI3K/AKT 信号通路在肿瘤增殖和凋亡异常中起到重要作用^[24-25]。在 PV 发生发展过程中,角质形成细胞的增殖和凋亡失衡起着重要的作用。Chamcheu 等^[9-10]发现在 Imiquimod 诱导的鼠 PV 样皮炎模型中,PI3K/AKT 信号活性是增强的,进一步发现抑制 PI3K/AKT 信号通路可以缓解 Imiquimod 诱导的鼠 PV 样皮损。Jeon 等^[26]报道抑制 PI3K/AKT 信号通路可以缓解皮肤的炎症反应。然而,PI3K 和 AKT 在人 PV 皮损中的表达尚不清楚。在我们的研究中发现,与正常皮肤相比,PV 皮损 KCs 中的 PI3K 和 AKT 的表达均上调,提示 PI3K/AKT 信号通路在 PV 发生发展中具有重要的作用。

PI3K/AKT 信号通路参与了肿瘤细胞的增殖和凋亡异常。然而,在 PV 中,尚不清楚 PI3K/AKT 信号通路是否参与了促进角质形成细胞(KCs)增殖、抑制 KCs 凋亡的过程。本研究检测了 PV 皮损中 Survivin、PI3K 和 AKT mRNA 的表达,并对 Survivin 和 PI3K 以及 Survivin 和 AKT 进行了相关性分析。我们发现 Survivin 和 PI3K 的表达呈正相关;Survivin 和 AKT 的表达也呈正相关,表明 PI3K/AKT 信号通路可能通过 Survivin 参与了 PV 皮损中 KCs 的凋亡受抑。另外,在体外细胞实验中,我们发现沉默 HaCaT 细胞 AKT 可以下调其 Survivin 蛋白的表达,提示 KCs 中 AKT 可以正向调控其 Survivin 的表达。

目前普遍认为,IL-23/Th17(白介素-23/辅助性T细胞17)轴的失调引起并加剧 PV 患者皮损中慢性炎症反

应^[27]。随着对银屑病发病机制研究的深入,人们发现各种细胞因子及炎性细胞、炎性介质在银屑病的发病中都不是单一发挥作用的,而是相互制约、相互影响,构成一个复杂的网络。在银屑病发病过程中,炎症、增殖与凋亡密切相关。

总之,我们的研究初步发现 Survivin 与 PI3K、AKT 在 PV 皮损 KCs 中蛋白表达均升高,并在 mRNA 表达水平呈正相关,沉默 KCs AKT 可以下调其 Survivin 蛋白的表达,表明 PI3K/AKT 信号通路可能通过凋亡抑制蛋白 Survivin 参与了 PV 的发生与发展,提示 Survivin 与 PI3K/AKT 信号通路可为银屑病治疗潜在的新靶点,可能为银屑病的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin [J]. *Eur J Dermatol*, 1999, 9(5): 413-25.
- [2] Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(3): 645-53.
- [3] Boehncke WH, Brembilla NC. Unmet needs in the field of psoriasis: pathogenesis and treatment [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017, [Epub ahead of print].
- [4] Huang Q, Zeng Y, Lin H, et al. Transfection with Livin and SurvivinshRNA inhibits the growth and proliferation of non-small cell lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7086-91.
- [5] Li SX, Yang YQ, Ding YP, et al. Impacts of survivin and caspase-3 on apoptosis and angiogenesis in oral cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3, B): 3774-9.
- [6] Taglieri L, De Iulii F, Giuffrida AA, et al. Resistance to the mTOR inhibitor everolimus is reversed by the downregulation of survivin in breast cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3, B): 3832-8.
- [7] Silke J, Vince J. IAPs and cell death [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 403: 95-117.
- [8] Guerrero-Zotano A, Mayer IA, Arteaga CL. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(4): 515-24.
- [9] Chamcheu JC, Chaves-Rodriguez MI, Adhami VM, et al. Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPAR beta/delta in Human Psoriasis and Imiquimod-induced Murine Psoriasisform Dermatitis Model [J]. *Acta DermVenereol*, 2016, 96(6): 854-6.
- [10] Chamcheu JC, Adhami VM, Esnault S, et al. Dual inhibition of PI3K/Akt and mTOR by the dietary antioxidant, delphinidin, ameliorates psoriatic features *in vitro* and in an Imiquimod-Induced Psoriasis-Like disease in mice [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(2): 49-69.
- [11] Lee EY, Gong EY, Shin JS, et al. Human breast cancer cells display different sensitivities to ABT-263 based on the level of survivin [J]. *Toxicol in vitro*, 2017, 46: 229-36.
- [12] Gu F, Li L, Yuan QF, et al. Down-regulation of survivin enhances paclitaxel-induced Hela cell apoptosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(15): 3504-9.
- [13] Zhang ZX, Wang TY, Liu ZQ, et al. Small interfering RNA target-

- ing of the survivin gene inhibits human tumor cell growth *in vitro* [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1, A): 35-42.
- [14] Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, et al. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and Hyperplasias[J]. *Am J Dermatopathol*, 2004, 26(3): 177-81.
- [15] Simonetti O, Lucarini G, Campanati AA, et al. VEGF, survivin and NOS overexpression in psoriatic skin: Critical role of nitric oxide synthases[J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 54(3): 205-8.
- [16] Wang F, Zhang X, Xia P, et al. Enhancement of mRNA expression of survivin and human beta-defensin-3 in lesions of psoriasis vulgaris[J]. *Eur J Dermatol*, 2016, 26(1): 28-33.
- [17] Gunduz K, Temiz P, Gencoglan G, et al. Expression of nuclear factor kappa B and survivin in psoriasis[J]. *ISRN Dermatol*, 2012, 2012: 257059.
- [18] Keppler-Noreuil KM, Parker VE, Darling TN, et al. Somatic overgrowth disorders of the PI3K/AKT/mTOR pathway & therapeutic strategies [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2016, 172(4): 402-21.
- [19] Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. *Development*, 2016, 143(17): 3050-60.
- [20] Hu BW, Lv X, Gao F, et al. Downregulation of DEPTOR inhibits the proliferation, migration, and survival of osteosarcoma through PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 4379-91.
- [21] Wang ZY, Zhou LQ, Zheng XT, et al. Autophagy protects against PI3K/Akt/mTOR-mediated apoptosis of spinal cord neurons after mechanical injury[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 656: 158-64.
- [22] Feng XN, Jiang JJ, Shi SH, et al. Knockdown of miR-25 increases the sensitivity of liver cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis *via* PTEN/PI3K/Akt/Bad signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6): 2600-10.
- [23] Ma YF, Qin HD, Cui YF. MiR-34a targets GAS1 to promote cell proliferation and inhibit apoptosis in papillary thyroid carcinoma *via* PI3K/Akt/Bad pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(4): 958-63.
- [24] Wang YY, Zhao M, Liu JY, et al. miRNA-125b regulates apoptosis of human non-small cell lung cancer *via* the PI3K/Akt/GSK3 beta signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1715-23.
- [25] Lin YT, Wang HC, Hsu YC, et al. Capsaicin induces autophagy and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): E1343.
- [26] Jeon YJ, Kim BH, Kim S, et al. Rhododendrin ameliorates skin inflammation through inhibition of NF-kappa B, MAPK, and PI3K/Akt signaling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1/3): 7-14.
- [27] Song HS, Kim SJ, Park TI, et al. Immunohistochemical comparison of IL-36 and the IL-23/Th17 axis of generalized pustular psoriasis and acute generalized exanthematous pustulosis[J]. *Ann Dermatol*, 2016, 28(4): 451-6.

(编辑:经 媛)