

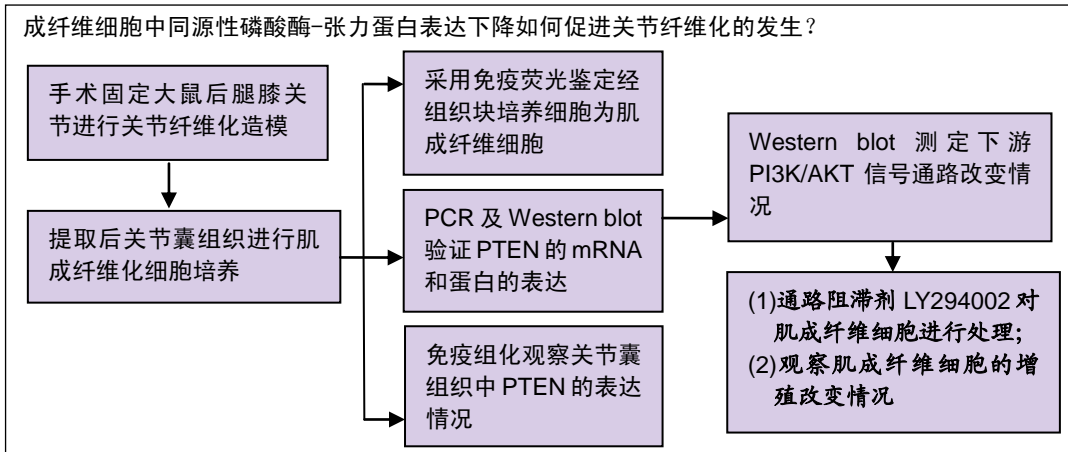
同源性磷酸酶-张力蛋白经PI3K/AKT通路调控关节纤维化肌成纤维细胞增殖

庄泽, 余东杰, 易小友, 肖大海, 江诗海, 何容涵, 王昆(中山大学附属第三医院关节创伤外科, 广东省广州市 510630)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0541

ORCID: 0000-0002-3312-4347(庄泽)

文章快速阅读:



庄泽, 男, 1984年生, 广东省普宁市, 汉族, 2014年中山大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事为关节置换、运动医学、四肢创伤及软组织修复方面的研究。

通讯作者: 王昆, 博士, 主任医师, 中山大学附属第三医院关节创伤外科, 广东省广州市 510630

文献标识码: B
稿件接受: 2018-04-02



文题释义:

PTEN 基因: 第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因, 位于 10 号染色体长臂, 是一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 编码由 403 个氨基酸组成的蛋白质, 可诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞, 抑制肿瘤发生, 目前已发现其在肾癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中存在表达缺失或低表达。近年来发现 PTEN 基因在肝、肺、肾的纤维化亦有抑制纤维增殖的作用。

关节纤维化: 关节周围发生骨折、开放性创伤等外力损伤后或者关节手术后关节邻近纤维组织的异常增生, 肌成纤维细胞异常增生, 患者术后出现关节活动屈伸, 旋转受限, 活动度丢失, 严重者出现关节僵硬, 影响正常生活质量和工作能力的一种病理改变。

摘要

背景: 研究显示大鼠关节纤维化中相关调控肌成纤维细胞表达的基因目前报导较少, 对抑癌基因同源性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog, PTEN)在关节纤维化组织的表达目前尚未见报道。

目的: 探讨关节纤维化大鼠关节囊组织中 PTEN 基因的表达变化及下游 PI3K/AKT 信号通路在大鼠关节纤维化中的作用。

方法: 膝关节固定法建立大鼠膝关节纤维化模型, 取膝关节后关节囊, 组织块培养法分离培养肌成纤维细胞。采用定量实时 PCR 检测 PTEN mRNA 的表达, 采用蛋白质印迹 Western Blot 方法检测肌成纤维细胞中胶原蛋白 1-A1、PTEN 蛋白的表达情况及下游 PI3K, AKT 通路的信号分子改变情况。再使用 PI3K/AKT 通路阻滞剂 LY294002 对肌成纤维细胞进行处理, 观察肌成纤维细胞的增殖改变情况。

结果与结论: 关节纤维化中 PTEN mRNA 及蛋白表达水平较对照侧下调($P < 0.05$)。PTEN 表达下调后, 下游 PI3K/AKT 通路的信号分子 PI3K, p-AKT 的表达水平出现上调($P < 0.05$), 肌成纤维细胞的细胞增殖活跃, 使用 PI3K/AKT 通路阻滞剂 LY294002 后细胞增殖受到抑制。提示纤维化关节中 PTEN 表达发生下调, 并由 PI3K/AKT 通路调控关节纤维化的发展。

关键词:

肌成纤维细胞; 关节; 纤维化; PTEN; PI3K/AKT 通路; 关节挛缩; 固定; 增殖; 组织构建

主题词:

纤维化; 成纤维细胞; 组织工程

中图分类号: R394.2

基金资助:

广东省医学科研基金项目(A2016066); 广东省中医药科学技术研究项目(20181061)

缩略语:

同源性磷酸酶-张力蛋白: phosphatase and tensin homolog, PTEN

Phosphatase and tensin homolog regulates arthrofibrotic myofibroblast proliferation via PI3K/AKT signaling pathways

Zhuang Ze, Yu Dongjie, Yi Xiaoyou, Xiao Dahai, Jiang Shihai, He Ronghan, Wang Kun (Department of Joint Traumatology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China)

Zhuang Ze, Master, Attending physician, Department of Joint Traumatology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wang Kun, MD, Chief physician, Department of Joint Traumatology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: There are few reports about the genes that regulate the expression of myofibroblasts in rats with arthrofibrosis. The expression of tumor suppressor gene phosphatase and tensin homolog (PTEN) in fibrosis tissues has not yet been reported.

OBJECTIVE: To investigate the expression of PTEN gene in articular capsule tissue in rats with arthrofibrosis and the significance of PI3K/AKT signaling pathway in arthrofibrosis.

METHODS: The rat model of arthrofibrosis was established by knee fixation, and the posterior articular capsule of knee joint was removed. Myofibroblasts were isolated and cultured by tissue explant method. The expression level of PTEN mRNA was detected by quantitative real-time PCR. The protein expression levels of COL1-A1, and PTEN in myofibroblasts and the signal molecules change in downstream PI3K/AKT signaling pathway were detected by western blot assay. The PI3K/AKT signal pathway specific blocker LY294002 was used to observe the changes of myofibroblast proliferation.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression levels of PTEN mRNA and protein in arthrofibrosis were significantly down-regulated compared with the normal articular group ($P < 0.05$). The down-regulated expression level of PTEN could up-regulate the expression levels of PI3K and AKT signaling molecules ($P < 0.05$) and enhanced the proliferation of myofibroblasts. After application of the PI3K/AKT blocker LY294002, the proliferation of myofibroblasts was inhibited. Our results suggest that there is a down-regulation in PTEN expression in articular capsule tissue of rats with arthrofibrosis, and PTEN regulates the development of articular capsule tissue fibrosis via PI3K/AKT signaling pathway.

Subject headings: Fibrosis; Fibroblasts; Tissue Engineering

Funding: the Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province, No. A2016066; a grant from the Scientific Research Project of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province, No. 20181061

0 引言 Introduction

关节纤维化是关节邻近纤维组织的异常增生, 可导致关节挛缩、关节活动功能显著受限。目前骨科常遇到的临床问题, 如关节周围骨折、关节周围开放性创伤、膝关节前后交叉韧带损伤等, 部分患者术后关节活动受限无不与关节纤维化相关, 活动度丢失严重影响了患者的生活质量和工作能力^[1-3]。关节纤维化认为与肌成纤维细胞过度增殖, 细胞外基质过度沉积相关, 目前对关节纤维化的发生机制目前尚未明确。

同源性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog, PTEN)基因, 人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因, 是具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 可诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞, 抑制肿瘤发生, 在多种肿瘤中存在表达缺失或低表达^[4-6], 近年来发现PTEN在肝、肺、肾的纤维化和瘢痕增殖上亦有抑制纤维化作用^[7-9]。PTEN基因在关节纤维化的发生是否发生表达变化尚未明确。PI3K/Akt信号通路是一条广泛参与细胞增殖、分化、细胞周期调控和细胞凋亡的重要信号通路, 活化的PI3K可产生第二信使PIP3, 进一步磷酸化AKT蛋白, 在细胞的增殖中发挥着调控作用。实验拟分析PTEN在纤维化关节中的表达情况, 并进一步分析下游PI3K/Akt信号通路的变化, 研究关节纤维化的发生机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年7月至2018年3月在中山大学实验动物中心及附属第三医院中心实验室完成。

1.3 材料

动物: 健康SPF级雄性SD大鼠15只, 鼠龄12周, 体质量250-300 g, 由中山大学实验动物中心提供, 动物使用许可证号: SCXK(粤)2012-0081。实验过程中对动物经动物伦理委员会批准, 处置符合动物伦理学标准。实验经中山大学动物伦理学委员会批准, 批准号:

[2018]02-165-01。

实验主要仪器与试剂: 鼠抗人PTEN单克隆抗体及HRP标记的羊抗兔抗体购自广州齐云生物有限公司, 动物组织DNA试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体购自英国Abcam公司, 二抗AlexaFlour488购自美国Invitrogen公司, BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天公司, 紫外分光光度仪购自美国贝克曼公司, 酶标仪MK3购自芬兰Thermo labsystems公司, PTC-220-PCR扩增仪购自美国Applied Biosystems公司, DMEM不完全高糖培养液、PBS、CCK-8法细胞增殖检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司, One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II购自大连TaKaRa生物工程公司, LY294002购自美国TargetMol公司, CCK-8试剂盒购自江苏凯基生物技术公司, 量角计购自美国Thermo Fisher scientific公司, 荧光显微镜德国Lecia公司, PVDF膜购自南京凯基生物公司, 酶标仪购自芬兰Thermo labsystems公司。

1.4 方法

1.4.1 动物模型建立 取15只雄性大鼠, 体积分数10%水合氯醛麻醉, 于右下肢股骨外侧近段、胫骨外侧远段分别钻孔, 用20 mm×5 mm×0.5 mm聚甲醛板及直径1.2 mm、长8 mm不锈钢螺钉将膝关节固定于屈曲130°处(图1)。其中聚甲醛树脂板及不锈钢螺钉由华南理工大学材料学院提供。左侧膝关节作为对照。造模后10周取出内固定物并分别测量关节固定组侧及对侧膝关节活动度, 对侧膝关节活动度作为对照。造模后18周再次测量膝关节活动度, 以确定手术效果是否稳定持久。该模型将术侧膝关节固定于屈曲位形成膝关节屈曲挛缩, 因此测量膝关节活动度以伸直角度表示, 量角计, 轴心位于股骨外侧髁, 两臂分别与股骨、胫骨长轴平行, 膝关节充分伸直计180°。

1.4.2 肌成纤维细胞的鉴定 取造模后大鼠膝关节后关节囊组织, 剪碎成1 mm×1 mm小块后, 加入II型胶原酶

于37 °C环境摇床上消化12 h,放入到含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养皿中,再置入培养箱中培养。3-5 d去除组织块,贴壁细胞用0.25%胰酶消化,再转至含体积分数10%胎牛血清DMEM培养液的培养皿中。将组织块培养所得细胞接种于6孔板,采用多聚甲醛固定,漂洗,加入血清封闭,倒去血清,加抗 α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(浓度为1:200),孵育过夜。洗涤后,再加入二抗AlexaFlour488(1:400),孵育,洗涤,最后,以4',6-二脒基-2-苯基咪唑(DAPI)行核染。通过荧光显微镜采集图片。

1.4.3 RT-QPCR法检测肌成纤维细胞中PTEN mRNA表达水平 用Trizol提取法收集按照上述方法培养的两侧关节囊组织肌成纤维细胞的总RNA,应用One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II试剂盒,采取20 μ L反应体系,其中PTEN引物:5'-AGA GCG TGC GGA TAA TGA CAA G-3' (上游); 5'-TGC TAG CCT CTG GAT TTG ATG G-3' (下游)。GAPDH引物:5'-AGG TGA AGG TCG GAG TCA ACG -3' (上游), 5'-AGG GGT CAT TGA TGG CAA CA -3' (下游)。反转录反应阶段设置42 °C 5 min, 95 °C 10 s。PCR反应阶段设置95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 循环40次。解离阶段设置95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。通过CT值计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,确定PTEN mRNA的相对表达水平。

1.4.4 免疫组化检测纤维化关节囊组织和正常关节囊组织中PTEN蛋白的表达水平 将从造模后大鼠两侧膝关节的关节囊取下来的组织进行石蜡包埋,切片后二甲苯脱蜡并梯度乙醇脱水;经高压修复处理后自然降至室温用0.3%内源性过氧化物酶孵育25 min,再用PBS洗5 min,共洗3次。5%牛血清白蛋白封闭室温30 min,倾去勿洗;加入一抗并4 °C过夜孵育,PBS冲洗;加入生物素标志二抗,室温孵育50 min,PBS冲洗。滴加辣根过氧化物酶标记的工作液孵育显色,显微镜下能清晰可见表达后PBS冲洗,苏木精复染,梯度乙醇脱水、二甲苯透明后中性树胶封固。PTEN以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应。显微镜采用至少5个随机下图像,用Image-Pro-Plus 6.0软件(美国Media Cybernetics公司)分析处理。

1.4.5 Western blot检测肌成纤维细胞中PTEN蛋白的表达水平 用蛋白裂解液提取大鼠正常两侧膝关节的关节囊组织总蛋白质,吸出后保存于-80 °C。应用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。制备10%丙烯酰胺的分离胶、浓缩胶,把蛋白样本置于100 °C水浴锅中加热,然后在冰水里冷却,离心,加入marker,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移蛋白至PVDF膜。脱脂牛奶室温封闭,室温1 h, TBST洗3次,每次10 min。加入一抗(胶原蛋白1-A、PTEN、PI3K、AKT、p-AKT), 4 °C摇床上孵育过夜, TBST洗3次。加入二抗,室温1 h, TBST洗3次。曝光显影,采集图像,使用图像分析软件ImageJ

进行灰度值分析,以目的条带灰度值与GAPDH为内参照的比值分析胶原蛋白1-A、PTEN、PI3K、AKT及p-AKT的蛋白表达水平。其中胶原蛋白1-A1的表达程度反映肌成纤维细胞的增殖情况。

1.4.6 在肌成纤维细胞中加入PI3K/Akt信号通路阻滞剂LY294002后用CCK-8法检测细胞的增殖变化 取按照1.4.2上述方法培养的肌成纤维细胞单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^3 - 5×10^3 L⁻¹,接种于3个96孔板(100 μ L/孔),每个96孔板均有8个孔为对照组,8个孔为实验组。实验组于接种第2天起加入能够阻断PI3K细胞信号传导通路的蛋白激酶抑制剂LY294002,分别在处理后的第2,4天,用10 μ L CCK-8试剂盒处理,记录酶标仪在450 nm波长测定各孔吸光度值,计算细胞抑制率(%)。细胞抑制率=(测试孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度) $\times 100\%$ 。

1.5 主要观察指标 ①肌成纤维细胞生长的形态变化;②PTEN蛋白及mRNA的表达情况以及PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达水平;③细胞增殖变化情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 21.0软件(美国IBM公司)进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用组间t检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验大鼠15只,关节囊标本取材前均成活,无死亡脱失。

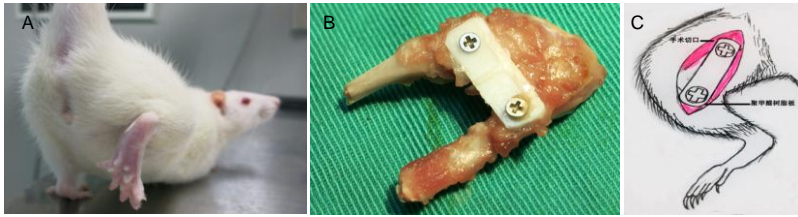
2.2 膝关节活动度 造模后10周取出内固定物后大鼠损伤侧膝关节活动度较对照侧明显下降($P < 0.05$);造模后18周时大鼠损伤侧膝关节活动度仍低于对照侧($P < 0.05$, 图2),说明实验方法能够获得稳定持久的大鼠膝关节纤维化模型。

2.3 肌成纤维细胞的鉴定结果 免疫荧光法检测显示组织块培养的细胞呈梭形,胞浆可见 α -平滑肌肌动蛋白阳性表达(图3),证实其为肌成纤维细胞。

2.4 正常关节囊细胞和纤维化关节囊肌成纤维细胞中PTEN mRNA及蛋白水平的表达差异 与正常侧相比,损伤侧关节囊中肌成纤维细胞PTEN mRNA水平表达均明显减低($P < 0.05$, 图4)。PTEN蛋白在正常关节囊组织中的表达率明显高于纤维化关节囊组织(图5)。

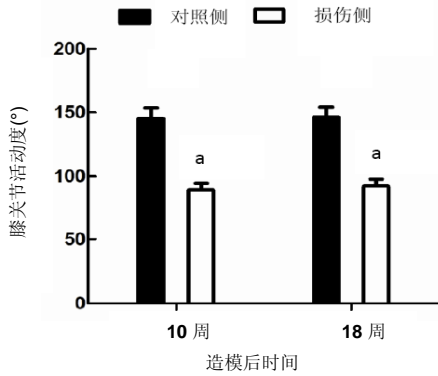
2.5 正常关节囊与纤维化关节囊组织中胶原蛋白1-A、PTEN、PI3K、AKT及p-AKT蛋白的表达水平差异 与对照侧相比,损伤侧纤维化关节囊中胶原蛋白1-A表达水平明显上升($P < 0.05$),而PTEN蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$),PI3K及p-AKT蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$),见图6,7,而AKT蛋白表达水平没有明显变化($P > 0.05$)。

2.6 LY294002对肌成纤维细胞增殖的影响 CCK-8检测结果显示,与对照侧相比,加入LY294002的肌成纤维细胞的增殖明显减弱($P < 0.05$, 图8)。



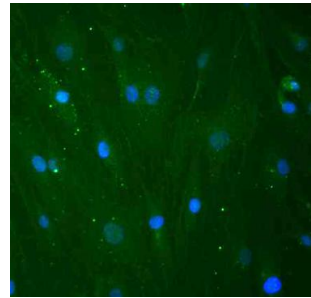
图注: 图中 A 为大鼠外观; B 为大鼠后腿关节固定情况; C 为手术示意图。

图 1 膝关节纤维化模型大鼠及手术简要示意图
Figure 1 A rat model of knee arthrofibrosis and schematic diagram of operation



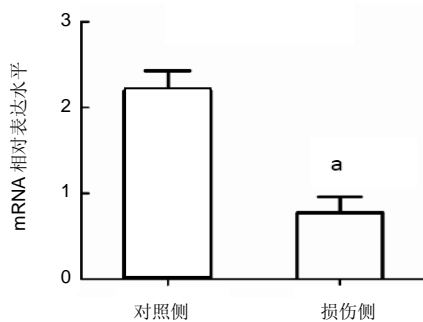
图注: 与对照侧相比, ^a $P < 0.05$ 。

图 2 膝关节纤维化模型大鼠膝关节活动度
Figure 2 Range of motion of the knee joint in the rat model of knee arthrofibrosis



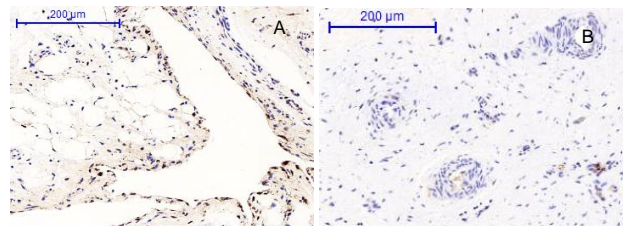
图注: 图中绿色为 α -平滑肌肌动蛋白阳性表达, 蓝色为细胞核。

图 3 免疫荧光法染色鉴定肌成纤维细胞、
Figure 3 Immunofluorescence staining of myofibroblasts



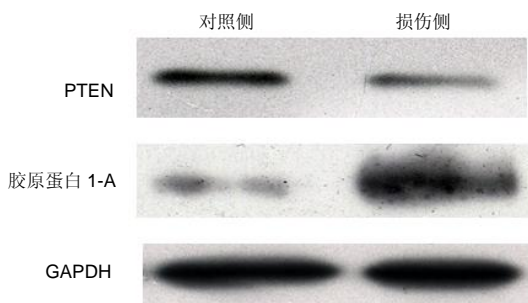
图注: 与对照侧相比, ^a $P < 0.05$ 。

图 4 正常关节囊细胞和纤维化关节囊肌成纤维细胞中 PTEN mRNA 的表达水平
Figure 4 PTEN mRNA expression level in the normal articular capsule cells and myofibroblasts in fibrotic articular of capsule tissue



图注: 图中 A 为正常关节囊, B 为纤维化关节囊。标尺长 200 μm 。
图 5 正常关节囊细胞和纤维化关节囊肌成纤维细胞中 PTEN 的表达水平(免疫组化染色)

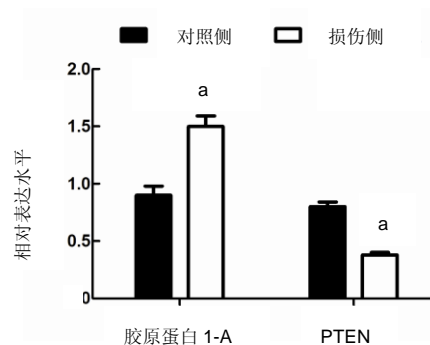
Figure 5 PTEN expression level in the normal articular capsule cells and myofibroblasts of arthrofibrosis (immunochemical staining)

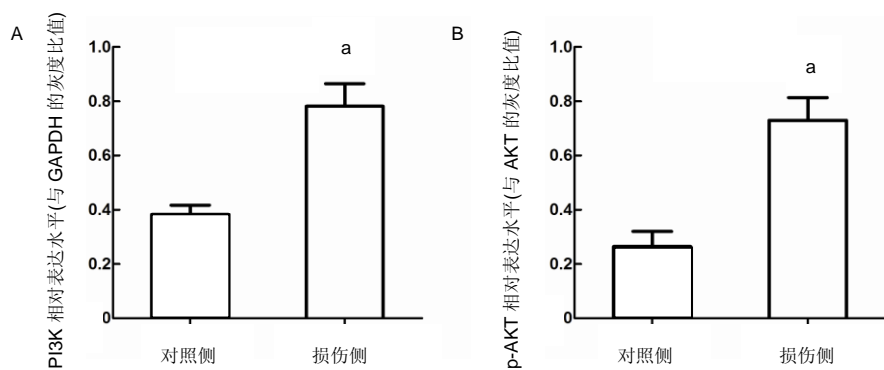


图注: 与对照侧相比, ^a $P < 0.05$ 。

图 6 正常关节囊与纤维化关节囊组织中胶原蛋白 1-A 及 PTEN 蛋白的表达水平(Weston-blot 检测)

Figure 6 Protein expression levels of COL1-A and PTEN in the normal and fibrotic articular capsule tissue detected by western blot assay

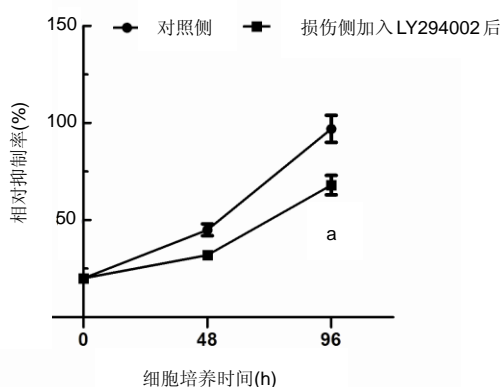




图注: 图中 A 为 PI3K, B 为 p-AKT。与对照侧相比, $^aP < 0.05$ 。

图 7 正常关节囊与纤维化关节囊组织中 PI3K 和 p-AKT 蛋白的表达水平 (Weston-blot 检测)

Figure 7 Protein expression levels of PI3K and p-AKT in the normal and fibrotic articular capsule tissue detected by western blot assay



图注: 与对照侧相比, $^aP < 0.05$ 。

图 8 关节纤维化肌成纤维细胞经 LY294002 处理细胞增殖的变化
Figure 8 Changes in the myofibroblast proliferation in fibrotic articular capsule tissue after treatment with LY294002

3 讨论 Discussion

关节纤维化是关节周围滑膜组织的过度纤维化^[10], 关节创伤、手术内固定干预、膝关节置换等是临床上常见的造成关节纤维化及关节僵硬的病因^[1-2]。关节纤维化僵硬后关节活动功能将明显受限, 影响了患者的生活质量和工作能力, 目前对于关节僵硬关节纤维化临床上有效治疗方法不多。目前研究表明, 关节纤维化是大量纤维结缔组织增生的结果, 胶原纤维作为其中的主要成分, 过度活化、增殖的肌成纤维细胞在纤维化过程中具有重要作用^[11-12]。研究调控肌成纤维细胞增殖的功能基因及调控分子机制对于认识关节纤维化, 进一步寻找治疗关节纤维化的方法具有重要作用。

关于关节纤维化的动物模型造模, 既往研究多采用大鼠关节内注射转化生长因子 β 进行模型诱导^[13-19], 与临床实际病例的创伤后关节纤维化存在发病机制的不同。作者采用聚甲醛板及螺钉对大鼠关节进行长时间的固定, 限制大鼠膝关节活动, 能有效模拟临床患者关节创伤、手术刺激、石膏固定制动等因素继发后期关节僵硬纤维化的实际情况, 所制作的动物关节损伤模型对关节损伤后导致关节纤维化更具有临床代表性。胶原蛋白1-A蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白是纤维化的标记性蛋白^[11-12], 实验中组织块培养后细胞行免疫荧光染色检测 α -平滑肌肌动蛋白阳性表达, 及从细胞提取蛋白行胶原蛋白1-A蛋白western-blot染色发现比对照组正常关节囊有明显差异均证明纤维化造模成功。

PTEN基因是人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因, 是一种肿瘤抑制基因^[4-6], 可使蛋白激酶、磷脂等相应位点去磷酸化起到调控细胞周期的作用。近年来发现PTEN在肝、肺、肾的纤维化和瘢痕增殖的研究中, 发现PTEN基因不同程度的表达下降, 并且认为PTEN表达下降与这些组织脏器纤维化的发生密切相关^[7-9]。实验证明在纤维化关节囊组织中PTEN的表达从mRNA转录到蛋白的翻译过程中都发生了下调, 且PTEN参与了关节纤维化中对肌成纤维细胞增殖的调控。

PI3K/AKT通路是一条在细胞代谢、增殖和细胞周期调控中起到重要作用的调控通路。PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 活化后产生第二信使PIP3, 能磷酸化胞内的AKT蛋白, 进一步再调控细胞内多种生物学过程。PTEN是PI3K/Akt信号通路的负性调控因子, 可将磷脂酰肌醇-3-磷酸去磷酸化生成磷脂酰肌醇-2-磷酸, 负性调控PI3K对细胞生物学活动的影响^[20-28]。实验发现纤维化关节囊中出现PTEN基因表达下调与AKT蛋白的磷酸化改变, 且PTEN基因表达下调与p-AKT表达上调呈相关关系。LY294002是一种PI3K/AKT信号通路的阻滞剂, 能够抑制PI3K/AKT通路激活。在纤维化关节囊的肌成纤维细胞中加入PI3K/AKT通路阻滞剂LY294002后, 原本增殖活跃的肌成纤维细胞出现了增殖受到抑制的表现, 验证了PI3K/AKT信号通路激活在纤维化关节肌成纤维细胞的增殖中起到调节促进细胞增殖的作用。在纤维化关节中, PTEN能负性调控PI3K/AKT信号通路, PTEN的表达下调, 激活了PI3K/AKT信号通路, 促进肌成纤维细胞生长、增殖, 促进关节纤维化的发生。

综上所述, 纤维化关节中的成纤维细胞中PTEN基因表达下降, 继而引起PTEN蛋白翻译表达下降, 激活了下游PI3K/AKT信号通路, AKT磷酸化成p-AKT, 促进肌成纤维细胞增殖, 促进了关节纤维化的发生。

作者贡献: 实验设计由第一作者完成, 实验实施由第一、二、三作者完成, 评估为所有作者完成。

经费支持: 该文章接受了“广东省医学科研基金项目(A2016066)”, “广东省中医药科学技术研究项目(20181061)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经中山大学动物伦理学委员会批准, 批准号[2018]02-165-01。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在水合氯醛麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Abdul N, Dixon D, Walker A, et al. Fibrosis is a common outcome following total knee arthroplasty. *Sci Rep*. 2015;5:16469.
- [2] Parikh SN, Myer D, Eismann EA. Prevention of arthrofibrosis after arthroscopic screw fixation of tibial spine fracture in children and adolescents. *Orthopedics*. 2014;37(1):e58-65.
- [3] Jaiswal SK, Sharma A, Gupta VK, et al. Curcumin Mediated Attenuation of Carbofuran Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Biochem Res Int*. 2016;2016:7637931.
- [4] Li X, Xie W, Xie C, et al. Curcumin modulates miR-19/PTEN/AKT/p53 axis to suppress bisphenol A-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Phytother Res*. 2014;28(10): 1553-1560.
- [5] Takashima M, Parsons CJ, Ikejima K, et al. The tumor suppressor protein PTEN inhibits rat hepatic stellate cell activation. *J Gastroenterol*. 2009;44(8):847-855.
- [6] Bawa-Khalife T, Yang FM, Ritho J, et al. SENP1 regulates PTEN stability to dictate prostate cancer development. *Oncotarget*. 2017;8(11):17651-17664.
- [7] Feng X, Jiang J, Shi S, 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. *Int J Oncol*. 2016;49(6):2600-2610.
- [8] Su D, Zhang CL, Gao YC, et al. Gene Expression and Correlation of Pten and Fbp4 in Liver, Muscle, and Adipose Tissues of Type 2 Diabetes Rats. *Med Sci Monit*. 2015;21: 3616-3621.
- [9] Parapuram SK, Shi-wen X, Elliott C, et al. Loss of PTEN expression by dermal fibroblasts causes skin fibrosis. *J Invest Dermatol*. 2011;131(10):1996-2003.
- [10] 卢国强. 创伤后的关节挛缩[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(39): 7345-7349.
- [11] He RH, Hu XF, Tan HC, et al. Surface modification of titanium with curcumin: a promising strategy to combat fibrous encapsulation. *J Mater Chem B*. 2015;3(10):2137-2146.
- [12] He R, Wang Z, Lu Y, et al. Chaperonin containing T-complex polypeptide subunit eta is a potential marker of joint contracture: an experimental study in the rat. *Cell Stress Chaperones*. 2015;20(6):959-966.
- [13] Watson RS, Gouze E, Levings PP, et al. Gene delivery of TGF- β 1 induces arthrofibrosis and chondrometaplasia of synovium in vivo. *Lab Invest*. 2010;90(11):1615-1627.
- [14] Hagiwara Y, Chimoto E, Takahashi I, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in the capsule in a rat immobilized knee model. *Ups J Med Sci*. 2008;113(2):221-234.
- [15] Piao S, Ryu JK, Shin HY, et al. Repeated intratunical injection of adenovirus expressing transforming growth factor-beta1 in a rat induces penile curvature with tunical fibrotic plaque: a useful model for the study of Peyronie's disease. *Int J Androl*. 2008;31(3):346-353.
- [16] Arnott JA, Nuglozeh E, Rico MC, et al. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is a downstream mediator for TGF-beta1-induced extracellular matrix production in osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2007;210(3):843-852.
- [17] Lee YT, Shao HJ, Wang JH, et al. Hyaluronic acid modulates gene expression of connective tissue growth factor (CTGF), transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human fibroblast-like synovial cells from advanced-stage osteoarthritis in vitro. *J Orthop Res*. 2010;28(4):492-496.
- [18] Venkatesan N, Tsuchiya K, Kolb M, et al. Glycosyltransferases and glycosaminoglycans in bleomycin and transforming growth factor- β 1-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(3):583-594.
- [19] Li J, Zhang W, Jiao R, et al. DIM attenuates TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5121-5128.
- [20] Wu KL, Wu CA, Wu CW, et al. Redox-sensitive oxidation and phosphorylation of PTEN contribute to enhanced activation of PI3K/Akt signaling in rostral ventrolateral medulla and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(1):36-50.
- [21] Kitagishi Y, Matsuda S. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging (Review). *Int J Mol Med*. 2013; 31(3):511-515.
- [22] Nozhat Z, Hedayati M. PI3K/AKT Pathway and Its Mediators in Thyroid Carcinomas. *Mol Diagn Ther*. 2016;20(1):13-26.
- [23] Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W, et al. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia*. 2011;25(7): 1064-1079.
- [24] Guo D, Teng Q, Ji C. NOTCH and phosphatidylinositol 3-kinase/phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling in T-cell development and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(7): 1200-1210.
- [25] Koromilas AE, Mounir Z. Control of oncogenesis by eIF2 α phosphorylation: implications in PTEN and PI3K-Akt signaling and tumor treatment. *Future Oncol*. 2013;9(7):1005-1015.
- [26] van Diepen MT, Eickholt BJ. Function of PTEN during the formation and maintenance of neuronal circuits in the brain. *Dev Neurosci*. 2008;30(1-3):59-64.
- [27] Wang X, Huang H, Young KH. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(12):1032-1049.
- [28] Chetram MA, Hinton CV. PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012; 32(4):190-195.