

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001926

OSI-027 抑制 mTOR 信号通路减轻高氧诱导的幼鼠肺损伤

梁木林, 刘成军, 党红星

(重庆医科大学附属儿童医院重症医学科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)1/2 双重抑制剂 OSI-027 对高体积分数氧(高氧)致 sprague-dawley(SD)幼鼠肺损伤及纤维化的抑制作用。**方法:**72 只 3 周龄 SD 幼鼠随机分为空气+生理盐水、高氧+生理盐水、高氧+雷帕霉素和高氧+OSI-027 组, 分别建立动物模型(各组 $n=18$)。高氧干预采用 90% 氧气持续处理, 生理盐水、雷帕霉素、OSI-027 干预分别于观察期第 1、3、6、8、10、13 天经腹腔注射给药, 在造模第 3、7、14 天取各组幼鼠测量体质量变化、肺湿干重比(wet/dry ratio, W/D)、肺组织病理学检查、肺损伤评分、肺泡间隔厚度测定、肺组织免疫组化和蛋白印迹检测 mTOR 及磷酸化核糖体 S6 蛋白激酶(pS6K1)蛋白在肺组织的分布和表达。**结果:**从时间因素看, 各组幼鼠体质量($F_{\text{时间}}=297.098, P=0.000$)、mTOR 免疫组化($F_{\text{时间}}=379.978, P=0.000$)、mTOR($F_{\text{时间}}=166.991, P=0.000$)和 pS6K1($F_{\text{时间}}=122.676, P=0.000$)蛋白水平都随时间延长而增加。除空气组外, 其余各组肺损伤评分($F_{\text{时间}}=1410.362, P=0.000$)、肺泡间隔厚度($F_{\text{时间}}=356.312, P=0.000$)、pS6K1 免疫组化($F_{\text{时间}}=57.992, P=0.000$)都随时间延长而升高, 肺 W/D($F_{\text{时间}}=28.915, P=0.000$)第 3、7 天时升高, 第 14 天下降。从分组因素看, 体质量($F_{\text{分组}}=176.597, P=0.000$)空气组明显高于其他组, 肺 W/D($F_{\text{分组}}=28.484, P=0.000$)和肺泡间隔厚度($F_{\text{分组}}=296.223, P=0.000$)空气组明显低于其他组, 除第 3 天外, mTOR 免疫组化($F_{\text{分组}}=134.100, P=0.000$)高氧组明显高于其他组, pS6K1 免疫组化($F_{\text{分组}}=234.697, P=0.000$)、mTOR($F_{\text{分组}}=59.377, P=0.000$)和 pS6K1($F_{\text{分组}}=101.837, P=0.000$)蛋白印迹高氧组明显高于其他组, 肺损伤评分($F_{\text{分组}}=2420.076, P=0.000$)高氧雷帕组明显高于其他组, 高氧 OSI 组明显低于高氧组和高氧雷帕组。**结论:**高浓度氧可激活肺组织 mTOR 信号途径; mTOR 可能促进了高氧肺损伤纤维化的发生发展, 其调控机制可能与抑制 mTOR 信号通路的活化有关。mTOR 复合物 1/2(mTORC1/2)双重抑制剂 OSI-027 能减轻高氧致 SD 幼鼠肺损伤及纤维化。

【关键词】高体积分数氧; 肺损伤纤维化; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 雷帕霉素; OSI-027**【中图分类号】**R725.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-05-14

OSI-027 alleviates hyperoxia-induced lung injury in juvenile rats by inhibiting the mTOR signaling pathway

Liang Mulin, Liu Chengjun, Dang Hongxing

(Department of PICU, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory Pediatrics)

【Abstract】Objective: To investigate the inhibitory effect of the mammalian target of rapamycin(mTOR) 1/2 dual inhibitor OSI-027 on hyperoxia-induced lung injury and fibrosis in juvenile Sprague-Dawley(SD) rats. **Methods:** A total of 72 juvenile SD rats aged 3 weeks were randomly divided into air+normal saline group, hyperoxia+normal saline group, hyperoxia+rapamycin group, and hyperoxia+OSI-027 group, with 18 rats in each group. An animal model was established. Hyperoxia intervention was performed with 90% oxygen, and normal saline, rapamycin, and OSI-027 interventions were performed via intraperitoneal injection on days 1, 3, 6, 8, 10, and 13 of observation, respectively. On days 3, 7, and 14, the change in body weight, lung wet/dry(W/D) ratio, lung injury scores, and alveolar septal thickness were measured; lung histopathological examination was performed; immunohistochemistry and Western blot were used to evaluate the distribution and expression of mTOR and phosphorylated ribosomal S6 kinase(pS6K1) in lung tissue. **Results:** As for the factor of time, there were significant increases over time in body weight ($F_{\text{time}}=297.098, P=0.000$), immunohistochemistry of mTOR ($F_{\text{time}}=379.978, P=0.000$), mTOR

作者介绍: 梁木林, Email: 502238749@qq.com,
研究方向: 肺损伤。

通信作者: 党红星, Email: dhxdoc@163.com。

基金项目: 重庆市基础与前沿研究计划资助项目(编号: 渝中科[2015]16号-13)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.1043.048.html>
(2018-11-06)

($F_{\text{time}}=166.991, P=0.000$), and pS6K1 ($F_{\text{time}}=122.676, P=0.000$). All groups except the air+normal saline group had significant increases in lung injury scores ($F_{\text{time}}=1410.362, P=0.000$), alveolar septum thickness ($F_{\text{time}}=356.312, P=0.000$), and pS6K1 immunohistochemistry ($F_{\text{time}}=57.992, P=0.000$) over time, as well as an increase in lung W/D ratio on days 3 and 7 ($F_{\text{time}}=28.915, P=0.000$) and a reduction in lung W/D ratio on day 14. As for the factor of grouping, the air+normal saline group had a significantly higher body weight ($F_{\text{group}}=176.597, P=0.000$) and significantly lower lung W/D ratio ($F_{\text{group}}=28.484, P=0.000$) and alveolar septum thickness ($F_{\text{group}}=296.223, P=0.000$) than the other groups. At all time points except day 3, the hyperoxia+normal saline group had significantly higher mTOR immunohistochemistry ($F_{\text{group}}=134.100, P=0.000$), pS6K1 immunohistochemistry ($F_{\text{group}}=234.697, P=0.000$), mTOR ($F_{\text{group}}=59.377, P=0.000$), and pS6K1 ($F_{\text{group}}=101.837, P=0.000$) than the other groups; the hyperoxia+rapamycin group had significantly higher lung injury scores than the other groups ($F_{\text{group}}=2420.076, P=0.000$), and the hyperoxia+OSI-027 group had significantly lower scores than the hyperoxia+normal saline group and the hyperoxia+rapamycin group. **Conclusion:** A high concentration of oxygen can activate the mTOR signaling pathway in lung tissue; mTOR may promote the development and progression of hyperoxia-induced pulmonary fibrosis, possibly by inhibiting activation of the mTOR signaling pathway. OSI-027 can alleviate hyperoxia-induced lung injury and fibrosis in juvenile SD rats.

[Key words] hyperoxia; lung injury and fibrosis; mammalian target of rapamycin; rapamycin; OSI-027

氧疗是危重症患儿重要的治疗措施,但较长时间吸入高浓度氧在未发育成熟的婴儿可导致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)^[1-2]。高氧所致肺损伤早期表现为肺组织炎性渗出和水肿,晚期表现为肺间质纤维化和肺泡化过程受阻^[3]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路参与调节胶原蛋白的表达,控制细胞周期、细胞的存活与增殖,进而对损伤修复和纤维化的发生发展起着至关重要的作用^[4]。研究指出,抑制 mTOR 对肺损伤及纤维化有潜在的治疗作用^[5-6],但具体机制不明。本课题以 3 周龄 SD 幼鼠为研究对象,复制高氧肺损伤动物模型,观察 mTOR 信号通路的表达情况,并以 mTOR 复合物 1(mTORC1)抑制剂雷帕霉素和 mTORC1/2 双重抑制剂 OSI-027 干预,探讨其在高氧肺损伤纤维化中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级幼年 3 周龄 SD 大鼠,雌雄不限,体质量(44.80 ± 2.75) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,饲料、水源、敷料由重庆医科大学附属儿童医院动物房统一供应。本研究经过重庆医科大学实验动物伦理委员会伦理审核批准。

1.1.2 抗体和耗材 m-TOR 抗体(兔多克隆抗体,批号:ab2732)、pS6K1 抗体(兔多克隆抗体,批号:ab131436)、 β -actin 抗体(鼠单克隆抗体,批号:ab8226)、生物素化山羊抗鼠 IgG(H+L)(批号:ab6789)及生物素化山羊抗兔 IgG(H+L)(批号:ab6721)均购自英国 Abcam(上海)贸易有限公司;山羊抗兔

工作液(批号:SP-9001)、正常山羊血清(批号:ZLI-9021)及浓缩型 DAB 试剂盒(批号:K135925C)购自北京中山金桥生物有限公司;雷帕霉素(批号:R8140)购自北京索莱宝科技有限公司;OSI-027(批号:HY-10423/CS-0257)购自 MedChem Express(MCE 中国)公司;全蛋白提取试剂盒(批号:KGP2100)和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:KGP903)为南京凯基生物公司产品;预染蛋白 Marker(批号:00215343)购自美国 NEB 公司;ECL 发光试剂盒(批号:BL520A)来自美国 Thermo 公司;PVDF 膜为美国 Hybond 公司产品。

1.2 动物分组及高氧模型制备

1.2.1 动物分组 72 只 3 周龄幼年 SD 大鼠应用随机数字表法随机分为:空气+生理盐水组(空气组)、高氧+生理盐水组(高氧组)、高氧+雷帕霉素组(高氧雷帕组)和高氧+OSI-027 组(高氧 OSI 组),各组 $n=18$ 。

1.2.2 动物模型制备 采用本课题组原创的高氧致幼年大鼠肺损伤动物模型^[7]。高氧暴露各组 SD 幼鼠置于自制塑料饲养氧箱(60 cm × 50 cm × 40 cm)中,持续输入 99.9% 的医用氧气,维持氧体积分数为 90%(数字测氧仪 CY-12C 型,浙江杭州建德市利达仪器厂),钠石灰吸收二氧化碳,使其浓度 < 0.5%。环境温度 25 °C~27 °C,湿度 60%~70%。每天观察幼鼠的觅食、活动度、呼吸、存活等基本情况,监测体质量变化。空气组置于同一室内空气($FiO_2=0.21$)中,饲养条件与高氧暴露各组相同。药物干预:高氧+雷帕霉素组经腹腔注射雷帕霉素 [$1.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]^[8],高氧+OSI-027 组经腹腔注射 OSI-027 按 [$0.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]^[9],均经生理盐水稀释至总体积 0.5 mL;空气组和高氧组经腹腔注射 0.5 mL 生理盐水。于第 1、3、6、8、10、13 天定时给药,所有 SD 幼鼠每次给药后空气暴露 1 h,然后重新置于相应的高氧或空气条件。

1.3 各组 SD 幼鼠生存率、一般状态及体质量记录

观察各组 SD 幼鼠生存率;观察一般状态:精神状态;自主活动;饮食情况;刺激后反应;体毛光泽;呼吸情况(有无呼吸急促);生长发育体质量变化情况。

1.4 标本采集

各组 SD 幼鼠分别于建模第 3、7、14 天 ($n=6$) 取肺组织用于实验研究。各 SD 幼鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛 (3.5 mL/kg) 麻醉, 剪开胸腔 (注意避开胸壁内的血管), 充分暴露心肺及纵隔组织, 剪下肺叶。其中左肺浸入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 常规石蜡包埋切片, 行肺组织病理学检查及免疫组化检查; 右中上肺称重后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于目标蛋白的检测; 右下肺取出测肺湿/干重比 (wet/dry ratio, W/D)。

1.5 肺 W/D 的测定

取右下肺放置吸水滤纸上清除并蘸干表面血渍, 立即用万分之一分析天平称重记作肺湿重后用滤纸包好标记, 置于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤箱内 48 h 后分别称重记作肺干重, 计算 W/D。

1.6 肺组织病理学检查

各组新鲜取材的左肺组织分别置于 4% 多聚甲醛溶液固定 72 h, 然后用流水冲洗肺组织, 脱水、透明、石蜡浸泡、包埋、切片、脱蜡、HE 染色、封片, 普通光学显微镜下观察肺组织病理学改变并采集图像。

1.7 肺损伤评分、肺泡间隔厚度测定

1.7.1 肺损伤评分 HE 染色后的切片在显微镜下观察肺组织病理学改变。根据美国胸科学会 2011 年发布的肺组织损伤评分标准^[10], 按照: A. 肺泡腔嗜中性粒细胞浸润; B. 肺间质嗜中性粒细胞浸润; C. 透明膜; D. 肺泡腔渗出蛋白质碎屑; E. 肺泡间隔增厚进行肺损伤评分, 每张切片观察 20 个视野, 肺损伤评分 = $[20 \times (A) + 14 \times (B) + 7 \times (C) + 7 \times (D) + 2 \times (E)] / (\text{观察视野数} \times 100)$ 。采用双盲法由 2 人对每张切片独立评分, 计算平均值, 然后进行统计分析。

1.7.2 肺泡间隔厚度测定 用专业图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 测定 400 倍下肺泡间隔厚度, 每张切片观察 10 个视野, 每个视野随机测 3 个不同肺泡壁, 取平均值作为肺泡间隔厚度。

1.8 免疫组化检测 mTOR、pS6K1 在肺组织中的分布

1.8.1 免疫组化染色 固定肺组织经脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡, 室温下行 3% 甲醇- H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 10 min; 将切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0), 微波炉加热修复抗原; 滴加山羊血清封闭液, 然后滴加一抗 (mTOR 抗体: 1:200 或 pS6K1 抗体: 1:100), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; 滴加生物素化二抗 (山羊抗兔工作液), DAB 室温显色; 蒸馏水洗涤; 苏木素轻度复染、脱水、透明、封片; 最后镜检并采集图像。

1.8.2 免疫组化结果判定 胞核和 (或) 胞质呈现棕黄色或棕褐色为阳性细胞。每张切片随机取 10 个视野, 每个视野取 3 个分割块, 每个分割块用涂色方式每次分割 3~4 个细胞。40 倍物镜取图, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司), 分析检测其阳性信号平均光密度值以反映 mTOR、pS6K1 蛋白表达相对含量, 平均光密度值越大, mTOR、pS6K1 蛋白含量越高。

1.9 Western blot 检测肺组织中 mTOR、pS6K1 的蛋白表达

BCA 法测定样品蛋白浓度, 热循环仪 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 蛋白变性, 配胶、上样、SDS-PAGE 电泳后转膜, TBST Buffer 稀释的 5% BSA 液封闭, 分别滴加一抗 mTOR (1:1 000)、pS6K1 (1:200)、 β -actin (1:5 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 2~3 h, ECL 显影、定影, 用美国 BIO-RAD 公司 ChemiDoc XRS+Systems 凝胶扫描成像仪和 Image Lab 凝胶分析系统软件对蛋白条带进行分析处理。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白积分光密度值 / 内参积分光密度值。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件 (美国 IBM 公司) 进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料的整体分析经正态性检验和方差齐性检验后采用析因设计方差分析。若结果显示两因素有交互作用则分析各因素的简单主效应。组间两两对比采用 Bonferroni 法进行 P 值校正。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 高氧及 mTOR 抑制剂对 SD 幼鼠生存率、一般状态和体质量增长的影响

各组 SD 幼鼠生存率均为 100%。空气组 SD 幼鼠精神饱满, 自主活动灵敏, 饮食佳, 刺激后反应迅速, 体毛清洁光滑, 呼吸平稳, 生长发育及体质量增长良好。体质量变化从总的主效应看 ($P=0.000$), 时间和分组因素有交互作用, 从简单主效应看, 不同分组对体质量有影响 ($P=0.000$), 不同时间对体质量有影响 ($P=0.000$)。与空气组比较, 第 3、7、14 天高氧组 SD 幼鼠精神萎靡, 活动减少, 饮食差, 刺激后反应迟钝, 体毛凌乱, 呼吸急促, 生长发育及体质量增长缓慢 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 体质量统计 ($g, n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	55.50 \pm 5.04	78.60 \pm 6.32	116.90 \pm 6.40	306.325	0.000
高氧组	47.40 \pm 3.40 ^a	53.20 \pm 3.53 ^a	65.80 \pm 5.62 ^a	28.058	0.000
高氧雷帕组	48.80 \pm 2.97	54.60 \pm 4.38 ^a	72.80 \pm 3.38 ^{ab}	49.871	0.000
高氧 OSI 组	49.80 \pm 1.73	51.90 \pm 1.53 ^a	65.40 \pm 4.45 ^{ac}	22.640	0.000
F 值	3.977	51.672	194.145		
P 值	0.012	0.000	0.000		

注: $F_{\text{组别}}=176.597, P_{\text{组别}}=0.000; F_{\text{时间}}=297.098, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{交互}}=36.599, P_{\text{交互}}=0.000; a$: 与空气组比较, $P<0.05$; b : 与高氧组比较, $P<0.05$; c : 与高氧雷帕组比较, $P<0.05$

2.2 肺组织大体及病理学观察

2.2.1 肺组织大体观察 空气组各时间点肺组织外观大致正常,呈粉红色,表面光滑。高氧组第 3 天时肺组织颜色呈红色,第 7 天时颜色灰暗,肿胀发亮,可见散在的灶状出血点,第 14 天时外观呈灰白色,肿胀部分消退,出血点较少,局部表面可见大小不等的结节样改变并可见条索状凹沟,弹性差,硬度增加,呈现肺损伤纤维化表现。与高氧组比较,高氧+雷帕霉素组和高氧+OSI-027 组各时间点肺组织外观改变不明显,第 14 天时高氧+雷帕霉素组出血点增多,弹性更差,呈现更严重肺损伤纤维化表现。与高氧组和高氧+雷帕霉素组比较,高氧+OSI-027 组肺组织灶状出血点减少,弹性略差,硬度减低,肺损伤纤维化表现改善(图 1)。

2.2.2 肺组织病理学观察 空气组各时间点肺组织结构均正常,未见炎症病变。高氧组肺组织可见不同程度损伤,肺泡腔内及肺泡间隔炎性细胞渗出,肺泡间隔增厚,肺组织结构紊乱改变逐渐加重,第 7 天时肺组织炎症水肿及肺泡间隔增厚变形达到高峰,病灶内肺泡萎陷,第 14 天时炎症水肿逐渐消退,肺泡间隔仍增厚,肺泡结构破坏,成纤维细胞大量增生,纤维组织呈条索样瘢痕改变,斑片状分布,呈现明显肺损伤纤维化表现。与高氧组比较,高氧+雷帕霉素组肺泡腔内及肺泡间隔炎性细胞渗出更明显,肺泡间隔增厚加重,呈现更严重肺损伤纤维化表现。与高氧组和高氧+雷帕霉素组比较,高氧+OSI-027 组肺泡腔内及肺泡间隔炎性细胞渗出减少,肺泡间隔增厚减轻,肺损伤纤维化表现改善(图 2)。

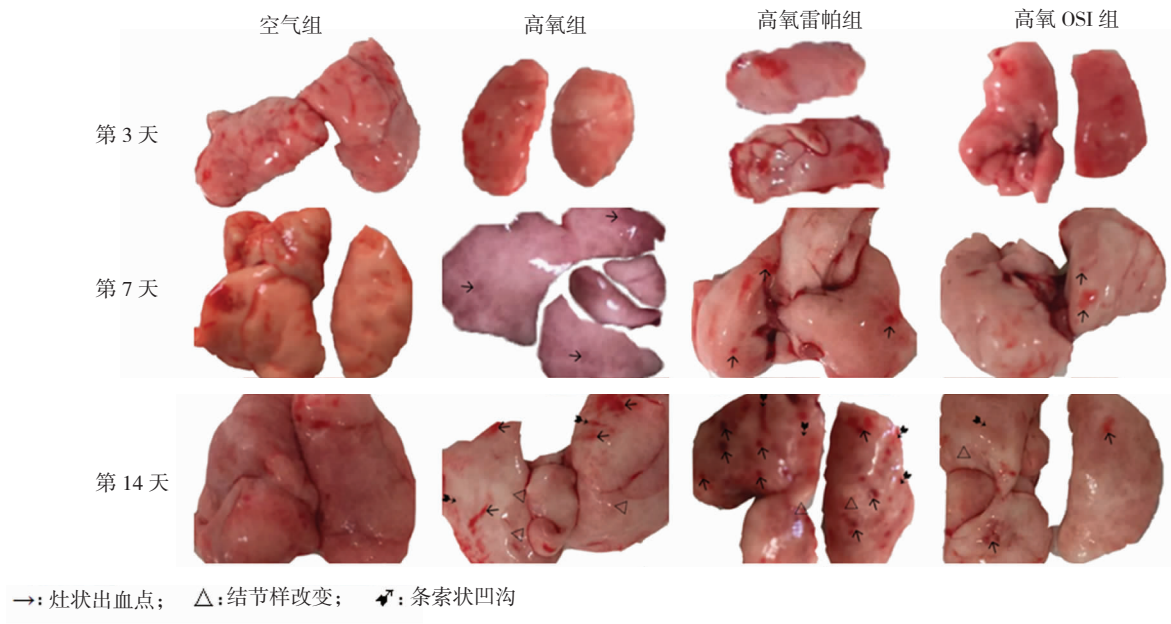


图 1 各组 SD 幼鼠肺组织大体图

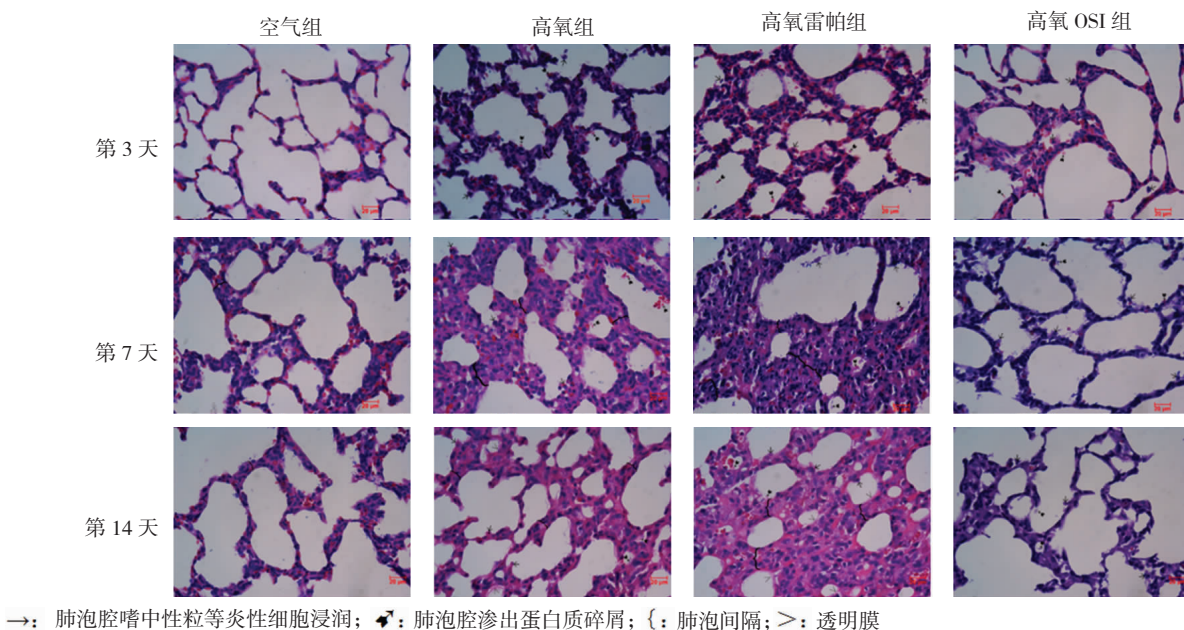


图 2 各组 SD 幼鼠肺组织病理学改变 (HE 染色,400 ×)

2.3 肺 W/D 的变化

肺 W/D 变化从总的主效应看($P<0.01$),时间和分组因素有交互作用。从简单主效应看,不同分组对肺 W/D 有影响($P<0.05$),除空气组外,不同时间对肺 W/D 有影响($P=0.000$)。与空气组比较,第 3、7 天高氧组肺 W/D 升高($P<0.01$)(表 2)。

2.4 肺泡间隔厚度的变化

肺泡间隔厚度变化从总的主效应看($P=0.000$),时间和分组因素有交互作用,从简单主效应看,不同分组对肺泡间隔厚度有影响($P=0.000$),除空气组外,不同时间对肺泡间隔厚度有影响($P=0.000$)。与空气组比较,第 3、7、14 天高氧组肺泡间隔厚度升高($P<0.01$);与高氧组比较,第 7、14 天高氧雷帕组肺泡间隔厚度升高($P=0.000$),第 7、14 天高氧 OSI 组肺泡间隔厚度降低($P=0.000$),见表 3。

2.5 肺损伤评分的变化

肺损伤评分变化从总的主效应看($P=0.000$),时间和分组因素有交互作用。从简单主效应看,不同分组对肺损伤评分有影响($P=0.000$)。除空气组外,不同时间对肺损伤评分有

影响($P=0.000$)。与空气组比较,第 3、7、14 天高氧组肺损伤评分升高($P=0.000$);与高氧组比较,第 3、7、14 天高氧雷帕组肺损伤评分升高($P<0.01$),第 3、7、14 天高氧 OSI 组肺损伤评分降低($P<0.01$),见表 4。

2.6 肺组织 mTOR 蛋白的分布

mTOR 免疫组化变化从总的主效应看($P=0.000$),时间和分组因素有交互作用。从简单主效应看,除第 3 天外,不同分组对 mTOR 免疫组化有影响($P=0.000$),不同时间对 mTOR 免疫组化有影响($P<0.01$)。与空气组比较,第 7、14 天高氧组 mTOR 免疫组化升高($P=0.000$);与高氧组比较,第 7、14 天高氧雷帕组和高氧 OSI 组 mTOR 免疫组化降低($P<0.01$)(图 3,表 5)。

2.7 肺组织 PS6K1 蛋白的分布

PS6K1 免疫组化变化从总的主效应看($P=0.000$),时间和分组因素有交互作用,从简单主效应看,不同分组对 PS6K1 免疫组化有影响($P=0.000$),除空气组外,不同时间对 PS6K1 免疫组化有影响($P=0.000$)。与空气组比较,第 3、7、14 天高

表 2 肺湿干重比 (W/D) 统计表 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	4.72 ± 0.11	4.74 ± 0.15	4.73 ± 0.16	0.022	0.000
高氧组	5.07 ± 0.15 ^a	5.38 ± 0.19 ^a	4.92 ± 0.17	11.926	0.000
高氧雷帕组	5.07 ± 0.16 ^a	5.49 ± 0.19 ^a	5.01 ± 0.21 ^a	14.589	0.000
高氧 OSI 组	5.06 ± 0.17 ^a	5.38 ± 0.17 ^a	4.92 ± 0.16	11.861	0.000
F 值	6.525	25.250	3.031		
P 值	0.001	0.000	0.036		

注: $F_{\text{组别}}=28.484, P_{\text{组别}}=0.000; F_{\text{时间}}=28.915, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{交互}}=3.161, P_{\text{交互}}=0.000; a$: 与空气组比较, $P<0.05$

表 3 肺泡间隔厚度 ($\mu\text{m}, n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	3.90 ± 0.24	4.12 ± 0.37	4.31 ± 0.38	0.621	0.541
高氧组	5.35 ± 0.59 ^a	11.34 ± 0.73 ^a	7.72 ± 0.65 ^a	139.510	0.000
高氧雷帕组	5.58 ± 0.65 ^a	14.97 ± 0.67 ^{ab}	9.78 ± 0.75 ^{ab}	339.182	0.000
高氧 OSI 组	5.08 ± 0.54 ^a	8.66 ± 0.87 ^{abc}	5.90 ± 0.76 ^{abc}	53.911	0.000
F 值	8.491	320.252	85.421		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注: $F_{\text{组别}}=296.223, P_{\text{组别}}=0.000; F_{\text{时间}}=356.312, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{交互}}=58.970, P_{\text{交互}}=0.000; a$: 与空气组比较, $P<0.05$; b : 与高氧组比较, $P<0.05$; c : 与高氧雷帕组比较, $P<0.05$

表 4 肺损伤评分 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	0.072 ± 0.019	0.065 ± 0.018	0.073 ± 0.016	0.197	0.822
高氧组	0.337 ± 0.032 ^a	0.592 ± 0.034 ^a	0.792 ± 0.021 ^a	610.965	0.000
高氧雷帕组	0.415 ± 0.023 ^{ab}	0.646 ± 0.017 ^{ab}	0.905 ± 0.027 ^{ab}	705.561	0.000
高氧 OSI 组	0.292 ± 0.015 ^{abc}	0.530 ± 0.019 ^{abc}	0.733 ± 0.019 ^{abc}	570.509	0.000
F 值	252.804	831.750	1 653.435		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注: $F_{\text{组别}}=2 420.076, P_{\text{组别}}=0.000; F_{\text{时间}}=1 410.362, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{交互}}=158.957, P_{\text{交互}}=0.000; a$: 与空气组比较, $P<0.05$; b : 与高氧组比较, $P<0.05$; c : 与高氧雷帕组比较, $P<0.05$

氧组 PS6K1 免疫组化升高 ($P=0.000$); 与高氧组比较, 第 3、7、14 天高氧雷帕组和高氧 OSI 组 PS6K1 免疫组化降低 ($P=0.000$) (图 4, 表 6)。

2.8 肺组织 mTOR、pS6K1 蛋白含量的变化

mTOR 和 PS6K1 蛋白印迹变化从总的主效应看 (均 $P <$

0.05), mTOR 和 PS6K1 蛋白印迹的时间和分组因素有交互作用。从简单主效应看, 不同分组对 mTOR 和 PS6K1 蛋白印迹有影响 (均 $P=0.000$), 不同时间对 mTOR 和 PS6K1 蛋白印迹有影响 (均 $P=0.000$)。与空气组比较, 第 3、7、14 天高氧组 mTOR 和 PS6K1 蛋白印迹升高 (均 $P=0.000$) (图 5, 表 7, 表 8)。

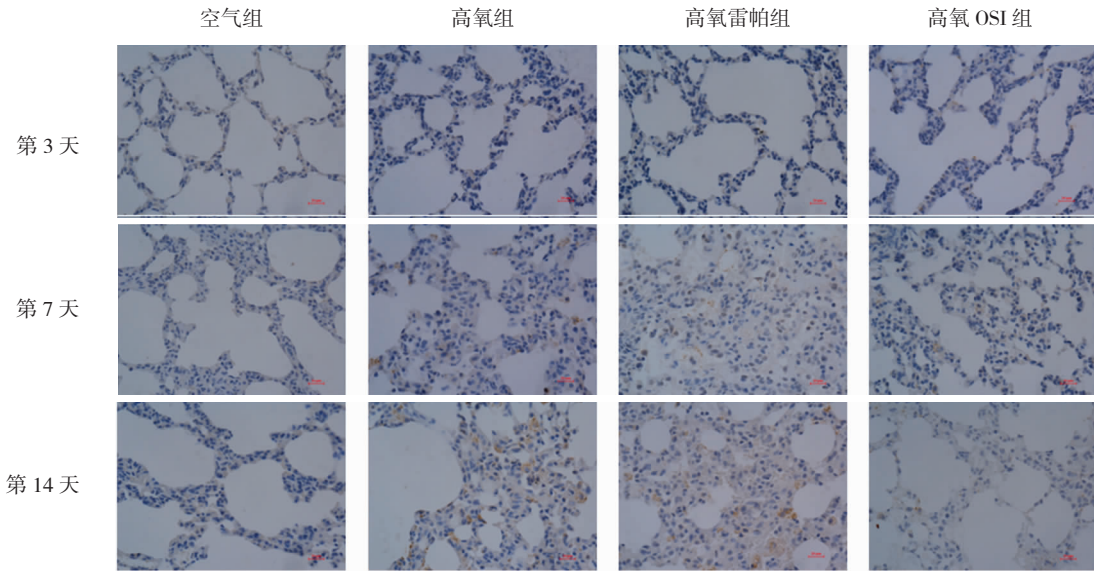


图 3 各组 mTOR 蛋白分布

表 5 肺组织 mTOR 蛋白相对含量 (阳性信号平均光密度值) ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	0.153 ± 0.026	0.169 ± 0.023	0.193 ± 0.015	6.822	0.002
高氧组	0.177 ± 0.018	0.300 ± 0.016 ^a	0.400 ± 0.017 ^a	212.633	0.000
高氧雷帕组	0.175 ± 0.015	0.234 ± 0.024 ^{ab}	0.359 ± 0.018 ^{ab}	150.466	0.000
高氧 OSI 组	0.165 ± 0.013	0.196 ± 0.014 ^{ac}	0.310 ± 0.022 ^{abc}	99.874	0.000
F 值	2.074	54.841	137.064		
P 值	0.113	0.000	0.000		

注: $F_{组别}=134.100, P_{组别}=0.000; F_{时间}=379.978, P_{时间}=0.000; F_{交互}=29.939, P_{交互}=0.000$; a: 与空气组比较, $P < 0.05$; b: 与高氧组比较, $P < 0.05$; c: 与高氧雷帕组比较, $P < 0.05$

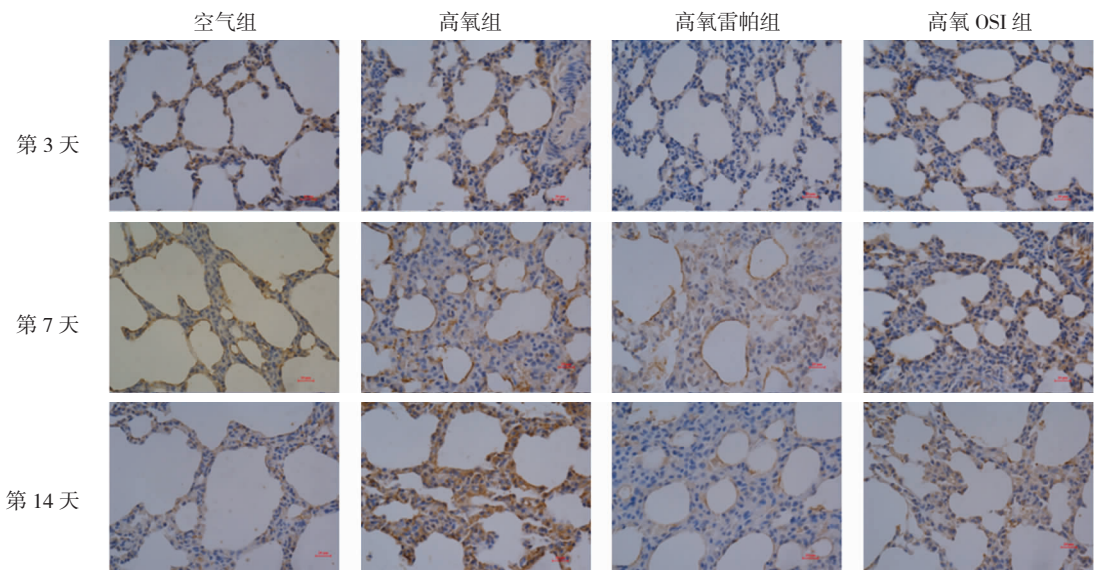


图 4 各组 PS6K1 蛋白分布

表 6 肺组织 pS6K1 蛋白相对含量 (阳性信号平均光密度值) ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	0.328 ± 0.012	0.335 ± 0.012	0.330 ± 0.011	0.375	0.689
高氧组	0.431 ± 0.012 ^a	0.450 ± 0.011 ^a	0.507 ± 0.011 ^a	41.577	0.000
高氧雷帕组	0.385 ± 0.014 ^{ab}	0.394 ± 0.015 ^{ab}	0.440 ± 0.010 ^{ab}	23.391	0.000
高氧 OSI 组	0.379 ± 0.025 ^{ab}	0.382 ± 0.024 ^{ab}	0.423 ± 0.012 ^{ab}	16.477	0.000
F 值	47.783	59.644	143.156		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注: $F_{组别}=234.697, P_{组别}=0.000; F_{时间}=57.992, P_{时间}=0.000; F_{交互}=7.943, P_{交互}=0.000$; a: 与空气组比较, $P<0.05$; b: 与高氧组比较, $P<0.05$; c: 与高氧雷帕组比较, $P<0.05$

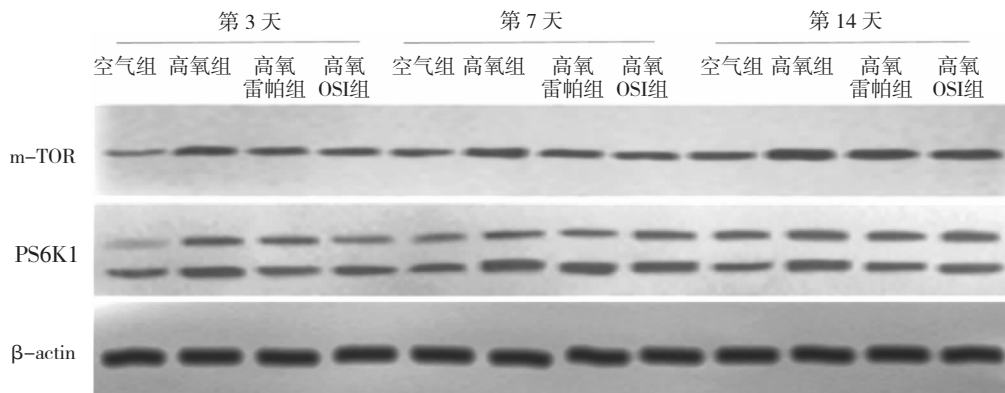


图 5 第 3、7、14 天各组 mTOR、PS6K1 蛋白印迹

表 7 第 3、7、14 天各组 mTOR 蛋白相对表达量 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	1.00 ± 0.00	1.55 ± 0.17	2.11 ± 0.19	44.580	0.000
高氧组	1.68 ± 0.15 ^a	2.58 ± 0.30 ^a	2.99 ± 0.19 ^a	64.399	0.000
高氧雷帕组	1.31 ± 0.16 ^b	2.00 ± 0.28 ^{ab}	2.20 ± 0.18 ^b	31.184	0.000
高氧 OSI 组	1.19 ± 0.18 ^b	1.97 ± 0.31 ^{ab}	2.09 ± 0.17 ^b	34.269	0.000
F 值	11.843	25.895	26.601		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注: $F_{组别}=59.377, P_{组别}=0.000; F_{时间}=166.991, P_{时间}=0.000; F_{交互}=2.481, P_{交互}=0.000$; a: 与空气组比较, $P<0.05$; b: 与高氧组比较, $P<0.05$; c: 与高氧雷帕组比较, $P<0.05$

表 8 第 3、7、14 天各组 PS6K1 蛋白相对表达量 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	F 值	P 值
空气组	1.00 ± 0.00	1.64 ± 0.13	1.79 ± 0.14	36.507	0.000
高氧组	2.08 ± 0.18 ^a	2.32 ± 0.14 ^a	2.98 ± 0.15 ^a	45.032	0.000
高氧雷帕组	1.75 ± 0.16 ^{ab}	2.02 ± 0.16 ^{ab}	2.43 ± 0.26 ^{ab}	24.019	0.000
高氧 OSI 组	1.66 ± 0.13 ^{ab}	1.92 ± 0.22 ^{ab}	2.36 ± 0.23 ^{ab}	26.433	0.000
F 值	42.385	16.621	49.042		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注: $F_{组别}=101.837, P_{组别}=0.000; F_{时间}=122.676, P_{时间}=0.000; F_{交互}=3.105, P_{交互}=0.000$; a: 与空气组比较, $P<0.05$; b: 与高氧组比较, $P<0.05$; c: 与高氧雷帕组比较, $P<0.05$

3 讨 论

氧疗作为低氧血症临床重要的治疗手段,能有

效改善患儿动脉血氧分压与血氧饱和度,防止重要脏器由于缺氧、酸中毒而导致的功能受损,但较高浓度和较长时间的持续氧疗可引起众多组织的高氧性损伤。肺是高氧性损伤最多累及的器官^[11]。理想

中的肺损伤由肺泡上皮细胞来修复,并恢复原有的结构和功能,而不是由肺成纤维细胞代替正常组织结构,这种异常修复导致后期肺纤维化的形成,以至于肺脏的结构和功能发生不可逆性的损害^[12]。

本研究利用 SD 幼鼠高氧肺损伤纤维化模型。研究发现,使用抑制剂雷帕霉素和 OSI-027 都未影响高氧 SD 幼鼠的生存率,而且对高氧所致 SD 幼鼠体重丢失没有加重的趋势。在高氧暴露第 3、7 天发现肺组织出现明显充血、水肿、出血及大量炎性细胞浸润等典型急性肺损伤病理改变,肺 W/D 明显增高,肺泡间隔厚度明显增厚,尤以高氧第 7 天表现更突出,而高氧第 14 天时,肺损伤评分明显增加,已出现肺间质及成纤维细胞的增生。因此,研究如何负性调控肺成纤维细胞激活与增殖是缓解肺损伤纤维化进程的重要方向。

mTOR 是在进化上保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,它是磷脂酰肌醇 3 激酶相关激酶(PIKK)家族的一个成员。mTOR 信号通路功能发挥需要 2 种独特的复合物:mTORC1 和 mTORC2。mTOR 是调节细胞的生长与增殖的重要因子^[13]。核糖体 S6 蛋白激酶(S6K1)是 mTOR 的直接作用底物,S6K1 活化可促进 5' 末端寡聚嘧啶结构的 mRNA 的翻译效率,促进细胞的生长和增殖^[14-15]。雷帕霉素与其相应的受体 FK 结合蛋白(FKBP-12)结合形成复合体,通过与 mTOR 结合导致 mTOR 失活,其下游信号转导通路:PS6K1 蛋白激酶被雷帕霉素强烈抑制,但是 4EBP1 和 mRNA 的翻译却对雷帕霉素不敏感^[16]。因此,PS6K1 被认为是 mTOR 通路下游的重要效应蛋白分子,其水平升高可反应 mTOR 信号通路的活化情况。

本实验免疫组化显示 mTOR 在空气组表达基本为阴性,高氧组第 3、7、14 天随着高氧暴露时间的延长,SD 幼鼠肺组织中 mTOR 逐渐出现阳性表达,PS6K1 阳性表达明显升高。Western blot 结果显示,mTOR、PS6K1 蛋白在高氧损伤肺组织表达明显增加,因此可以推论高浓度氧可激活肺组织 mTOR/PS6K1 信号途径。

本实验也观察到,与同时间点高氧组比较,使用 mTORC1 和 mTORC2 双重抑制剂 OSI-027 后,肺组织病理学形态有一定程度的改善,见炎症细胞浸润减少,渗出水肿减轻,肺泡间隔厚度明显下降,肺损伤评分减低,肺损伤纤维化表现改善,而使用 mTORC1 特异性抑制剂雷帕霉素后,肺组织病理学

形态未得到改善,炎症细胞浸润未见减少,渗出水肿无减轻,肺泡间隔厚度增加,肺损伤评分增高。目前肺损伤评分仍存在争议^[10],所以我们不能单独以肺损伤评分来判定肺损伤程度,应该在此基础上,综合病理等因素最终作出合理判断。

一般认为雷帕霉素特异性结合并阻断 mTORC1 的组装及活化^[17]。mTORC1 对雷帕霉素敏感,mTORC2 对雷帕霉素不敏感,且独立于 mTORC1,通过磷酸化多个底物调控细胞的生长和增殖。使用雷帕霉素或其类似物抑制 mTORC1,不仅不影响 mTORC2 的磷酸化活性,反而会同时通过 S6K1 和胰岛素受体底物(IRS-1)负反馈机制使得 AKT(Ser473)磷酸化增强,并激活 AKT 下游一些信号通路,使得细胞凋亡受抑、细胞增殖活跃^[18]。因而本研究结果初步提示雷帕霉素加重了 90% 氧气诱导的 SD 幼鼠肺损伤纤维化。有趣的是,本研究结果与之前的研究^[19-20]雷帕霉素能促进成纤维细胞凋亡、抑制成纤维细胞增殖的结果相反;与之前的研究^[21]雷帕霉素能加剧纤维化病变结果相一致。

雷帕霉素及其类似物对 mTORC2 几乎没有抑制作用^[22]。而一种新型的雷帕霉素类似物 OSI-027 不仅能有效抑制 mTOR 的催化亚基和 mTORC1 激酶下游磷酸化的 S6K1 和 4EBP1,而且能有效抑制 mTORC2 及其底物 AKT 的磷酸化^[23]。与雷帕霉素相比,OSI-027 的毒副作用低,能够同时快速有效地抑制 mTORC1 和 mTORC2,目前作为一种抗肿瘤药物处于 II 期临床实验。OSI-027 通过抑制 mTORC2 消除 AKT 的高活性状态,从而抑制肺成纤维细胞的生长增殖,具有更有效的抗增殖抑制纤维化的作用^[24]。因而本研究结果初步提示 OSI-027 减轻了 90% 氧气诱导的 SD 幼鼠肺损伤纤维化。本研究结果与之前的研究^[24]OSI-027 能更有效抗增殖抑制纤维化作用的结果相一致。

综上所述,本研究推测高氧可以激活 mTOR 信号通路,而 mTORC1 特异性抑制剂雷帕霉素对高氧肺损伤肺纤维化无明显的保护作用。mTORC1 和 mTORC2 双重抑制剂 OSI-027 对高氧肺损伤纤维化具有明显的保护作用,不仅为高氧肺损伤纤维化的发生发展提供了新的证据,而且有望为临床预防和治疗高氧肺损伤纤维化提供新的靶点。因本研究尚未涉及基因水平,有关 mTOR 在高氧肺损伤纤维化中的具体作用和机制,尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Zhang PX, Han CH, Zhou FJ, et al. Renin-angiotensin system and its role in hyperoxic acute lung injury[J]. Undersea Hyperb Med, 2016, 43(3): 239-246.
- [2] Helmerhorst HJ, Roos-Blom MJ, van Westerloo DJ, et al. Association between arterial hyperoxia and outcome in subsets of critical illness: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of cohort studies[J]. Crit Care Med, 2015, 43(7): 1508-1519.
- [3] Higgins RD, Jobe AH, Koso-Thomas M, et al. Bronchopulmonary dysplasia: executive summary of a workshop[J]. J Pediatr, 2018, 197: 300-308.
- [4] Thiagarajan V, Lee KW, Leong MK, et al. Potential natural mTOR inhibitors screened by in silico approach and suppress hepatic stellate cells activation[J]. J Biomol Struct Dyn, 2017[Epub ahead of print]. DOI: 10.1080/07391102.2017.1411295.
- [5] Lawrence J, Nho R. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in pulmonary fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): E778.
- [6] Xu Y, Tai W, Qu X, et al. Rapamycin protects against paraquat-induced pulmonary fibrosis: activation of Nrf2 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(2): 535-540.
- [7] Dang H, Wang S, Yang L, et al. Upregulation of Shh and Ptc1 in hyperoxia-induced acute lung injury in neonatal rats[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(2): 297-302.
- [8] Zhang J, Hu X, Wang S, et al. Protective effects of low-dose rapamycin combined with valsartan on podocytes of diabetic rats[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 13275-13281.
- [9] Mateo J, Olmos D, Dumez H, et al. A first in man, dose-finding study of the mTORC1/mTORC2 inhibitor OSI-027 in patients with advanced solid malignancies[J]. Br J Cancer, 2016, 114(8): 889-896.
- [10] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5): 725-738.
- [11] Carnesecchi S, Deffert C, Pagano A, et al. NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(10): 972-981.
- [12] Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic acute lung injury[J]. Respir Care, 2013, 58(1): 123-141.
- [13] Tee AR, Blenis J. mTOR, translational control and human disease[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(1): 29-37.
- [14] Yu KR, Park SB, Jung JW, et al. HMGA2 regulates the in vitro aging and proliferation of human umbilical cord blood-derived stromal cells through the mTOR/p70S6K signaling pathway[J]. Stem Cell Res, 2013, 10(2): 156-165.
- [15] Parrales A, López E, Lee-Rivera I, et al. ERK1/2-dependent activation of mTOR/mTORC1/p70S6K regulates thrombin-induced RPE cell proliferation[J]. Cell Signal, 2013, 25(4): 829-838.
- [16] Thoreen CC, Sabatini DM. Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely[J]. Autophagy, 2009, 5(5): 725-726.
- [17] Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, et al. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1804(3): 433-439.
- [18] Yap TA, Garrett MD, Walton MI, et al. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises[J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(4): 393-412.
- [19] Sun Y, Zhao S, Li X, et al. Local application of rapamycin reduces epidural fibrosis after laminectomy via inhibiting fibroblast proliferation and prompting apoptosis[J]. J Orthop Surg Res, 2016, 11(1): 58.
- [20] Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(8): 2476-2487.
- [21] Wu H, Chen J, Xu J, et al. Blocking rpS6 phosphorylation exacerbates Tsc1 deletion-induced kidney growth[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(4): 1145-1158.
- [22] Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB[J]. Mol Cell, 2006, 22(2): 159-168.
- [23] Gentzler RD, Altman JK, Plataniotis LC. An overview of the mTOR pathway as a target in cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(5): 481-489.
- [24] Mitra A, Luna JJ, Marusina AI, et al. Dual mTOR inhibition is required to prevent TGF-beta-mediated fibrosis: implications for scleroderma[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(11): 2873-2876.

(责任编辑:冉明会)