

[文章编号] 1000-4718(2019)03-0506-09

抑制 mTOR 信号通路对幼鼠肺损伤时 p-AKT1 分子的影响及意义*

梁木林, 党红星, 鲁雪, 方芳, 刘成军[△], 许峰

(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:** 探讨抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在高体积分数氧(高氧)致 SD 幼鼠肺损伤时对磷酸化 AKT1 (p-AKT1) 分子的影响和意义。**方法:** 72 只 SD 幼鼠(3 周龄)随机分为空气 + 生理盐水组、高氧 + 生理盐水组、高氧 + OSI-027 组及高氧 + 雷帕霉素组($n = 18$), 分别构建动物模型。高氧选择 90% 氧气持续干预, 生理盐水、OSI-027 和雷帕霉素干预分别在观察期第 1、3、6、8、10 和 13 天时经腹腔注射给药。在造模第 3、7 和 14 天时取各组幼鼠进行体重测量、肺湿干重比(wet/drg weight ratio, W/D)计算、肺组织病理学检查、肺泡间隔宽度测定和肺损伤评分, 肺组织免疫组化和 Western blot 检测磷酸化 S6K1 (p-S6K1) 和 p-AKT1 的分布与水平。**结果:** 与空气组比较, 高氧组幼鼠体重明显下降($P < 0.05$), 肺损伤急性期肺 W/D 增高($P < 0.05$), 肺泡间隔宽度及肺损伤评分明显增加($P < 0.05$), 肺组织 p-S6K1 阳性细胞增多($P < 0.05$), 肺组织 p-AKT1 阳性细胞减少($P < 0.05$), p-S6K1 蛋白显著升高($P < 0.01$), p-AKT1 蛋白明显减低($P < 0.01$); 与高氧组比较, 高氧 + OSI-027 组的肺组织损伤减轻, 肺组织 p-S6K1 阳性细胞减少($P < 0.05$), p-AKT1 阳性细胞增多($P < 0.05$), p-S6K1 蛋白水平显著降低($P < 0.05$), p-AKT1 蛋白水平增加($P < 0.05$); 高氧 + 雷帕霉素组的肺损伤进一步加重($P < 0.05$), p-S6K1 阳性细胞减少($P < 0.05$), p-AKT1 阳性细胞增加($P < 0.05$), p-S6K1 蛋白水平显著降低($P < 0.05$), p-AKT1 蛋白水平显著增加($P < 0.05$)。与高氧 + 雷帕霉素组比较, 高氧 + OSI-027 组的肺组织损伤减轻($P < 0.05$), 肺组织 p-AKT1 阳性细胞减少($P < 0.05$), p-AKT1 蛋白水平降低($P < 0.05$)。**结论:** p-AKT1 参与了高氧肺损伤的发生发展, 其调控机制可能与抑制 mTOR 信号通路的活化有关。高氧肺损伤时, p-AKT1 蛋白水平下降, mTOR 抑制剂能增加 p-AKT1 蛋白水平, 但只有 mTORC1/2 双重抑制剂 OSI-027 能减轻高氧所致 SD 幼鼠的肺损伤及纤维化。

[关键词] 高氧; 肺损伤; 磷酸化 AKT1; 磷酸化 S6K1; mTOR 信号通路**[中图分类号]** R725.6; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.03.021

Effect of inhibiting mTOR signaling pathway on p-AKT1 molecule in lung of juvenile SD rats and its significance

LIANG Mu-lin, DANG Hong-xing, LU Xue, FANG Fang, LIU Cheng-jun, XU Feng

(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 of Pediatrics, Chongqing 400014, China. E-mail: liucwd@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of inhibiting mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway on phosphorylated AKT1 (p-AKT1) during lung injury induced by hyperoxygen in juvenile SD rats and its significance. **METHODS:** The SD rats (3 weeks old, $n = 72$) were randomly divided into air + saline group, hyperoxia + saline group, hyperoxia + OSI-027 group, and hyperoxia + rapamycin group ($n = 18$ in each group). The animal model was constructed by continuous intervention with a 90% volume fraction of oxygen, and normal saline, OSI-027 and rapamycin were administered by intraperitoneal injection at 1, 3, 6, 8, 10 and 13 d of the observation period. At 3, 7 and 14 d, the changes of the body weight, wet/drg weight ratio (W/D), lung histopathology, alveolar septal width and lung injury score were measured, and immunohistochemistry and Western blot were used to detect the distribution and protein levels of phosphorylated S6K1 (p-S6K1) and p-AKT1 in the lung tissues. **RESULTS:** Compared with air group, the body weight of

[收稿日期] 2018-05-09 [修回日期] 2018-08-09

* [基金项目] 重庆市基础与前沿研究计划项目(渝中科[2015]16号-13)

△通讯作者 Tel: 13983296275; E-mail: liucwd@163.com

the rats in hyperoxia group was significantly decreased ($P < 0.05$), the lung W/D was increased in the acute phase of lung injury ($P < 0.05$), and the alveolar septal width and lung injury scores were significantly increased ($P < 0.05$). The p-S6K1 positive cells in the lung tissues were increased ($P < 0.05$), p-AKT1 positive cells were decreased ($P < 0.05$), p-S6K1 protein was increased significantly ($P < 0.01$), and p-AKT1 protein was decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with hyperoxia group, the lung tissue injury in hyperoxia + OSI-027 group was alleviated ($P < 0.05$), p-S6K1 positive cells in the lung tissues was decreased ($P < 0.05$), p-AKT1 positive cells was increased ($P < 0.05$), p-S6K1 protein level was significantly decreased ($P < 0.05$), and p-AKT1 protein level was increased ($P < 0.05$). Hyperoxia + rapamycin further aggravated lung injury ($P < 0.05$), p-S6K1 positive cells decreased ($P < 0.05$), p-AKT1 positive cells increased ($P < 0.05$), p-S6K1 protein levels decreased significantly ($P < 0.05$), and p-AKT1 protein levels increased significantly ($P < 0.05$). Compared with hyperoxia + rapamycin group, the lung tissue damage was alleviated in hyperoxia + OSI-027 group ($P < 0.05$), p-AKT1 positive cells in the lung tissues were decreased ($P < 0.05$), and p-AKT1 protein level was decreased ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** p-AKT1 may be involved in the development of hyperoxia-induced lung injury, and its regulation mechanism may be related to the mTOR signaling pathway. In hyperoxia-induced lung injury, the protein level of p-AKT1 is decreased, and mTOR inhibitors increase the p-AKT1 protein. However, only the mTORC1/2 dual inhibitor OSI-027 alleviates the hyperoxia-induced fibrosis in juvenile SD rats.

[**KEY WORDS**] Hyperoxia; Lung injury; Phosphorylated AKT1; Phosphorylated S6K1; mTOR signaling pathway

高体积分数氧(高氧, hyperoxia)长时间持续吸入可引发儿童肺损伤^[1],高氧诱导的肺损伤在组织学上可分为急性期和慢性纤维化期2个阶段,2者的病理改变不同,即早期肺组织表现为炎症渗出和水肿,晚期则表现为肺泡明显增厚和成纤维细胞增生^[2]。肺损伤纤维化发生的主要机制是炎症损伤和损伤后异常修复^[3],但纤维化进展的机制尚不完全清楚,仍然缺乏有效手段干预纤维化^[4]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路参与调节细胞的存活与增殖,抑制mTOR对肺损伤及纤维化有潜在的治疗作用^[5]。本研究以3周龄SD幼鼠为研究对象,复制高氧肺损伤动物模型,探讨mTOR复合物1(mTOR complex 1, mTORC1)抑制剂雷帕霉素(rapamycin, Rapa)和mTORC1/2双重抑制剂OSI-027抑制mTOR信号通路对高氧肺损伤时磷酸化AKT1(phosphorylated AKT1, p-AKT1)分子的影响及其在高氧肺损伤纤维化中的作用。

材 料 和 方 法

1 实验动物

清洁级SD幼鼠(体重 $44.8 \text{ g} \pm 2.75 \text{ g}$,雌雄不限,3周龄),由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证编号为SCXK(渝)2018-0003,敷料、饲料和水源由重庆医科大学附属儿童医院动物房统一供应。本研究经重庆医科大学实验动物伦理委员会伦理审核批准。

2 主要试剂

抗兔p-AKT1单克隆抗体(批号ab81283)、抗兔磷酸化核糖体蛋白S6激酶1(phosphorylated ribosomal protein S6 kinase 1, p-S6K1)多克隆抗体(批号

ab131436)、抗鼠 β -actin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Abcam;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MedChemExpress;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)购自南京凯基生物公司;预染蛋白Marker(批号00215343)购自NEB;ECL发光试剂盒(批号BL520A)购自Thermo;PVDF膜购自Hybond。

3 主要方法

3.1 动物分组 将72只SD幼鼠(雌雄不限,3周龄)应用随机数字表法进行完全随机化分为:空气+生理盐水组[空气(air)组]、高氧+生理盐水组[高氧(hyperoxia)组]、高氧+OSI-027(hyperoxia OSI)组和高氧+雷帕霉素(hyperoxia Rapa)组,分别建立动物模型(各组 $n = 18$)。

3.2 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^[6]。高氧暴露各组SD幼鼠,置于自制塑料饲养氧箱($60 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$)中,饲养箱进气孔持续输入99.9%的高纯度医用氧气,维持氧体积分数为90%(CY-12C型数字测氧仪,浙江杭州建德市利达仪器厂),用钠石灰吸收二氧化碳,使其浓度 $< 0.5\%$ 。环境温度 $25 \text{ }^\circ\text{C} \sim 27 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度60%~70%。每天定时上午10:00开箱30 min,更换敷料并添加水和饲料。空气组置于同一室内空气($\text{FiO}_2 = 0.21$)中,饲养条件与高氧暴露各组相同,其中,空气组和高氧组经腹腔注射0.5 mL生理盐水,

高氧 + 雷帕霉素组经腹腔注射雷帕霉素 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[7], 高氧 + OSI-027 组经腹腔注射 OSI-027 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[8], 均用生理盐水稀释至总体积 0.5 mL 。按照每周 3 次的用法于第 1、3、6、8、10 和 13 天时一次性给药, 给药 1 h 后予高氧 ($\text{FiO}_2 = 0.90$) 或空气 ($\text{FiO}_2 = 0.21$) 暴露。高氧暴露第 1 天肺组织开始发生急性肺损伤病理改变, 因而药物干预选择高浓度氧暴露第 1 天作为研究高氧肺损伤的给药起始时点。

3.3 各组 SD 幼鼠的生存率、一般状况及体重 观察并记录各组 SD 幼鼠的精神、生长、存活、觅食、呼吸、活动度、刺激后反应; 体毛光泽、生长发育及体重变化等情况。

3.4 标本采集 各组 SD 幼鼠分别于建模第 3、7 和 14 天, 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, 碘伏消毒胸部皮肤, 沿中线剪开皮肤, 剪开胸腔 (注意避开胸腔壁内的血管), 然后用大头针将两侧胸壁固定在泡沫板上, 充分暴露心肺及纵膈组织, 用镊子从上纵膈处提起心肺及血管组织, 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°C 冰箱保存, 用于目标蛋白的检测; 取出右下肺测肺组织湿/干重比 (wet/dry weight ratio, W/D)。

3.5 肺组织 W/D 的测定 取右下肺放置吸水滤纸上蘸干表面血滞, 立即用电子秤 (万分之一分析天平) 称重记作肺湿重; 各称重后的右下肺, 用滤纸包好标记, 置于 70°C 烤箱内 48 h 后分别称重记作肺干重; 计算肺 W/D。

3.6 肺组织病理学检查 新鲜取材的左肺组织分别置于盛有 4% 多聚甲醛溶液固定 $24 \sim 72 \text{ h}$, 而后用流水冲洗固定肺组织, 脱水、透明、石蜡浸泡、包埋、切片、脱蜡、HE 染色和封片, 普通光学显微镜下观察肺组织病理学改变, 采集图像。

3.7 肺损伤的评分 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^[9], 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。肺损伤评分越高表示病变程度与病变范围越大。

3.8 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 (Media Cybernetics) 测定在 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。

3.9 免疫组化检测 p-AKT1 和 p-S6K1 在肺组织中的分布 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 ($\text{pH} 6.0$), 微波炉加热修复抗原; 滴加山羊血清封闭液, 室温 20 min ; 然后滴加 I 抗 (p-AKT1 抗体: $1:50$; p-S6K1 抗体: $1:100$), 4°C 过夜, 滴加生物素化 II 抗 (山羊抗兔工作液), 37°C 、 30 min ; DAB 室温显色; 蒸馏水洗涤; 苏木素轻度复染、脱水、透明、封片; 镜检并采集图像。然后进行免疫组化结果判定: 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 $3 \sim 4$ 个细胞。40 倍物镜头取图, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统检测其阳性信号平均吸光度以反映 p-AKT1 和 p-S6K1 蛋白表达相对含量, 平均吸光度越大, p-AKT1 和 p-S6K1 蛋白含量越高。

3.10 Western blot 法测定肺组织中 p-AKT1 和 p-S6K1 的蛋白水平 将 -80°C 冻存各组称重的肺组织剪碎后放入预冷的玻璃匀浆器中; 用移液管向每管中加入 0.5 mL 的含有蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液 [按 0.5 mL 裂解液加 $5 \mu\text{L}$ PMSF (50 mmol/L) 的比例加入摇匀至无结晶的 1% 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂 $5 \mu\text{L}$] 作为匀浆介质; 将盛有标本的匀浆器下端插入冰水混合物中, 上下转动捣杆数 10 次, 充分研磨, 尽量避免产生泡沫, 将组织块研磨至肉眼看不见, 冰上静置 30 min ; 用微量移液器将制备好的匀浆液转移至 1.5 mL 进口 EP 管中, 置于低温高速离心机中, 4°C 、 $12\,000 \times g$ 离心 30 min ; 小心吸取上清 (原始的总蛋白样本) 提取样品全蛋白分装于标记好的新 EP 管中; 置于 -80°C 保存备用。然后行 Western blot 法测定样品蛋白表达: BCA 法测定样品蛋白浓度, 热循环仪 95°C 蛋白变性, 配胶、上样、SDS-PAGE 后转膜, TBST buffer 稀释的 5% BSA 液封闭, 分别滴加 I 抗 [p-AKT1 ($1:2\,000$)、p-S6K1 ($1:200$) 和 β -actin ($1:5\,000$)] 4°C 孵育过夜, II 抗 ($1:5\,000$) 室温孵育 $2 \sim 3 \text{ h}$, ECL 显影、定影, 用 Bio-Rad ChemiDoc XRS + System 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。

4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。符合正态分布独立性的计量资料以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 计量资料的整体分析经正态性检验后采用无交互作用的双因素方差分析。组内和组间进一

步比较采用给定时间做各组两两比较, 给定组别做不同时间两两比较, 方差齐则采用 Tukey HSD 法检验, 方差不齐则采用 Dunnett's T3 法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 高氧及 mTOR 抑制剂对 SD 幼鼠一般状况、生存、生长和体重增长的影响

各组 SD 幼鼠均 100% 存活。空气组 SD 幼鼠精神饱满, 自主活动灵敏, 饮食好, 刺激后反应敏捷, 体毛整洁光滑, 呼吸平稳, 生长发育及体重增长良好; 与空气组比较, 高氧组各时点 SD 幼鼠精神欠佳, 活动减少, 饮食差, 刺激后反应迟钝, 体毛凌乱, 呼吸急促, 生长发育及体重增长缓慢 ($P < 0.05$); 与高氧组比较, 高氧 + 雷帕霉素组和高氧 + OSI-027 组第 3 和 7 天 SD 幼鼠一般状况大致相同, 体重增长亦缓慢, 差异无统计学显著性; 与高氧 + 雷帕霉素组比较, 高氧 + OSI-027 组第 3 和 7 天 SD 幼鼠体重差异无统计学显著性, 见表 1。

2 肺组织的病理学观察

第 3、7 和 14 天时空气组的肺结构正常, 无明显

表 1 各组 SD 幼鼠的体重变化

Table 1. The changes of the body weight in different groups on different days (g. Mean \pm SD. $n = 6$)

Group	Day 3	Day 7	Day 14
Air	55.3 \pm 6.5	78.8 \pm 7.7	118.9 \pm 6.3
Hyperoxia	48.0 \pm 2.7*	51.4 \pm 4.6*	67.1 \pm 5.4*
Hyperoxia Rapa	49.4 \pm 3.9	54.9 \pm 6.5*	74.5 \pm 3.0*
Hyperoxia OSI	50.2 \pm 1.5	47.4 \pm 5.0*	60.8 \pm 1.9*

* $P < 0.05$ vs air group.

炎症病变; 与空气组比较, 高氧组的肺组织表现程度不同的损伤, 肺泡隔增宽, 肺泡腔内及肺泡间隔可见炎性细胞渗出, 肺组织结构紊乱渐渐加重, 第 7 天时肺泡隔增宽达到高峰, 肺组织炎性渗出、水肿及大量肺泡萎陷, 第 14 天时肺泡隔仍增宽, 肺泡结构破坏, 渗出水肿慢慢消退, 成纤维细胞增生, 纤维组织呈条索样改变, 片状分布, 肺损伤纤维化表现明显; 与高氧组比较, 高氧 + 雷帕霉素组肺泡隔增宽更严重, 肺泡腔内及肺泡间隔炎性渗出更显著, 肺损伤纤维化表现更明显; 与高氧组和高氧 + 雷帕霉素组比较, 高氧 + OSI-027 组肺泡隔增宽程度降低, 肺泡腔内及肺泡间隔炎性渗出减轻, 肺损伤纤维化表现亦减轻, 见图 1。

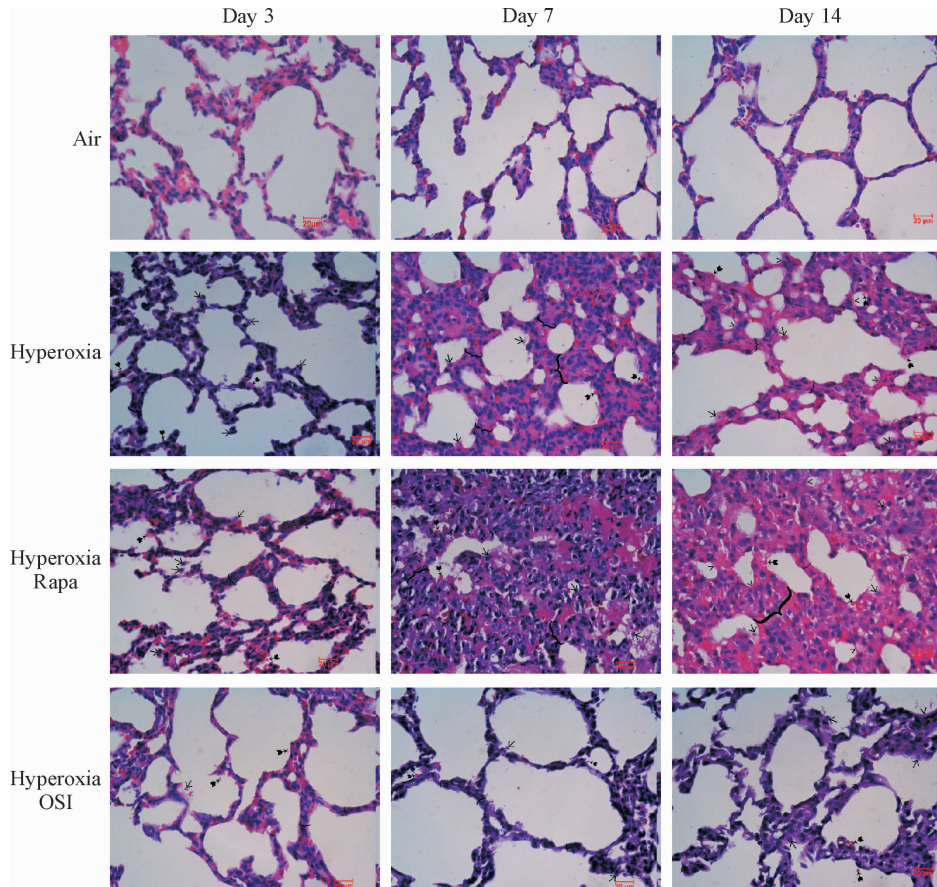


Figure 1. The pathological changes of lung tissue in juvenile SD rats from each group (HE staining, $\times 400$). \rightarrow : neutrophils in the alveolar space; \blacktriangleright : proteinaceous debris filling the airspaces; $\{$: alveolar septum thickness; $>$: proteinaceous debris filling the airspaces.

图 1 各组 SD 幼鼠肺组织病理学改变

3 肺组织 W/D 的变化

第3、7和14天空气组的肺W/D大致无改变。除空气组外,其余各组不同时点肺组织W/D变化有显著差异($F=25.836, P<0.01$),空气组肺W/D显著低于其它组($F=25.359, P<0.01$),从各时点看,除第14天外($F=2.61, P>0.05$),第3和7天各时点均以空气组为最低($P<0.01$),见表2。

表2 肺组织湿干重比的变化

Table 2. The changes of the wet and dry weight ratio (W/D) of the lung in different groups on different days (Mean ± SD. $n=6$)

Group	Day 3	Day 7	Day 14
Air	4.73 ± 0.13	4.75 ± 0.11	4.74 ± 0.17
Hyperoxia	5.08 ± 0.15**	5.41 ± 0.18**	4.93 ± 0.16
Hyperoxia Rapa	5.09 ± 0.13**	5.48 ± 0.17**	5.00 ± 0.20
Hyperoxia OSI	5.08 ± 0.19**	5.39 ± 0.14**	4.93 ± 0.15

** $P<0.01$ vs air group.

4 肺泡间隔宽度的变化

第3、7和14天随着生长发育,空气组肺泡间隔宽度逐渐呈增高趋势,但差异无统计学显著性;与空气组比较,高氧组的肺泡间隔宽度显著增加($P<0.05$),第7天时肺泡间隔宽度达到最高,而后降低,但第14天时肺泡间隔宽度仍显著增加($P<0.05$);与高氧组比较,高氧+雷帕霉素组肺泡间隔宽度显著增加($P<0.05$);与高氧组和高氧+雷帕霉素组比较,高氧+OSI-027组第3天时的肺泡间隔宽度无改变,第7和14天各时点高氧+OSI-027组肺泡间隔宽度显著降低($P<0.05$),见表3。

表3 各组SD幼鼠的肺泡间隔宽度

Table 3. The changes of the alveolar septum width in different groups on different days (μm . Mean ± SD. $n=6$)

Group	Day 3	Day 7	Day 14
Air	3.92 ± 0.26	4.14 ± 0.34	4.30 ± 0.37
Hyperoxia	5.37 ± 0.56*	11.42 ± 0.84*	7.71 ± 0.70*
Hyperoxia Rapa	5.55 ± 0.70*	14.98 ± 0.76* ^{&}	9.84 ± 0.70* ^{&}
Hyperoxia OSI	5.10 ± 0.53*	8.65 ± 0.90* ^{&@}	5.92 ± 0.78* ^{&@}

* $P<0.05$ vs air group; [&] $P<0.05$ vs hyperoxia group; [@] $P<0.05$ vs hyperoxia Rapa group.

5 肺损伤评分的变化

第3、7和14天空气组肺损伤评分的差异无统计学显著性;与空气组比较,高氧组的肺损伤评分增高($P<0.05$);与高氧组比较,高氧+雷帕霉素组的肺损伤评分增高($P<0.05$);与高氧组和高氧+雷帕霉素组比较,高氧+OSI-027组的肺损伤减轻($P<0.05$),见表4。

表4 各组SD幼鼠的肺损伤评分

Table 4. The changes of the lung injury score in different groups on different days (Mean ± SD. $n=6$)

Group	Day 3	Day 7	Day 14
Air	0.074 ± 0.021	0.066 ± 0.020	0.072 ± 0.019
Hyperoxia	0.335 ± 0.038*	0.593 ± 0.038*	0.797 ± 0.032*
Hyperoxia Rapa	0.413 ± 0.032* ^{&}	0.645 ± 0.023* ^{&}	0.908 ± 0.034* ^{&}
Hyperoxia OSI	0.289 ± 0.018* ^{&@}	0.535 ± 0.030* ^{&@}	0.735 ± 0.023* ^{&@}

* $P<0.05$ vs air group; [&] $P<0.05$ vs hyperoxia group; [@] $P<0.05$ vs hyperoxia Rapa group.

6 肺组织 p-AKT1 蛋白的分布

免疫组化结果显示,第3天时在高氧组SD幼鼠肺组织中 p-AKT1 基本为阴性,偶见阳性细胞;与空气组比较,第3、7和14天各时点在高氧组肺组织的上皮细胞、内皮细胞和间质细胞中 p-AKT1 阳性细胞减少($P<0.05$);与高氧组比较,第3、7和14天各时点在高氧+雷帕霉素组和高氧+OSI-027组中 p-AKT1 阳性细胞增多($P<0.05$);与高氧+雷帕霉素组比较,第3、7和14天各时点在高氧+OSI-027组的 p-AKT1 阳性细胞减少($P<0.05$),见图2、4。

7 肺组织 p-S6K1 蛋白的分布

在各组肺组织内皮细胞、上皮细胞和间质细胞中 p-S6K1 呈阳性表达;与空气组比较,第3、7和14天各时点在高氧组肺组织中 p-S6K1 的阳性表达增加($P<0.05$);与高氧组比较,第3、7和14天各时点在高氧+雷帕霉素组和高氧+OSI-027组肺组织中 p-S6K1 的阳性表达下降($P<0.05$);与高氧+雷帕霉素组比较,第3、7和14天各时点在高氧+OSI-027组肺组织中 p-S6K1 的阳性表达水平差异无统计学显著性,见图3、4。

8 肺组织 p-AKT1 和 p-S6K1 蛋白含量的变化

空气组随着生长发育时间的延长 p-AKT1 蛋白水平明显增加($P<0.05$),高氧组随着高氧暴露时间的延长 p-AKT1 的蛋白水平明显升高($P<0.05$)。与空气组比较,各时点在高氧组SD幼鼠肺组织中 p-AKT1 的蛋白水平降低($P<0.01$);与高氧组比较,各时点在高氧+雷帕霉素组和高氧+OSI-027组SD幼鼠的肺组织中 p-AKT1 的蛋白水平升高($P<0.05$);与高氧+雷帕霉素组比较,各时点在高氧+OSI-027组SD幼鼠肺组织中 p-AKT1 的蛋白水平降低($P<0.05$),见图5。

空气组随着生长发育时间的延长 p-S6K1 蛋白表达明显增加($P<0.05$),高氧组随着高氧暴露时间的延长 p-S6K1 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。与空气组比较,各时点 p-S6K1 在高氧组SD幼鼠肺组织

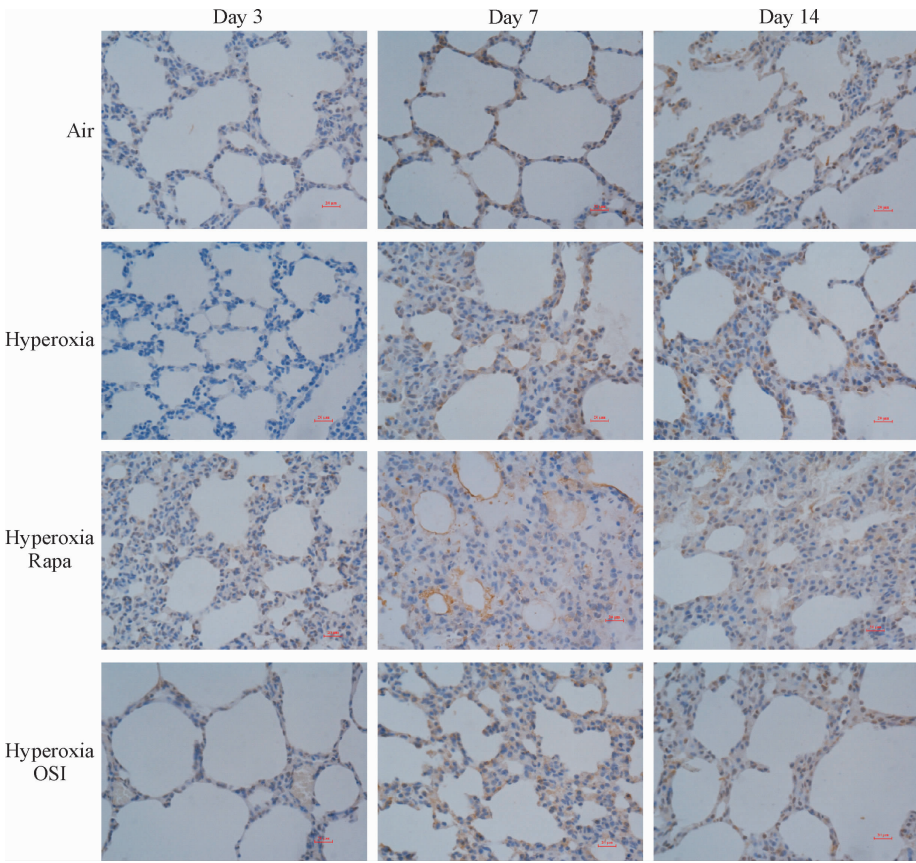


Figure 2. Distribution of p-AKT1 protein in each group (×400).

图 2 各组 p-AKT1 蛋白的分布

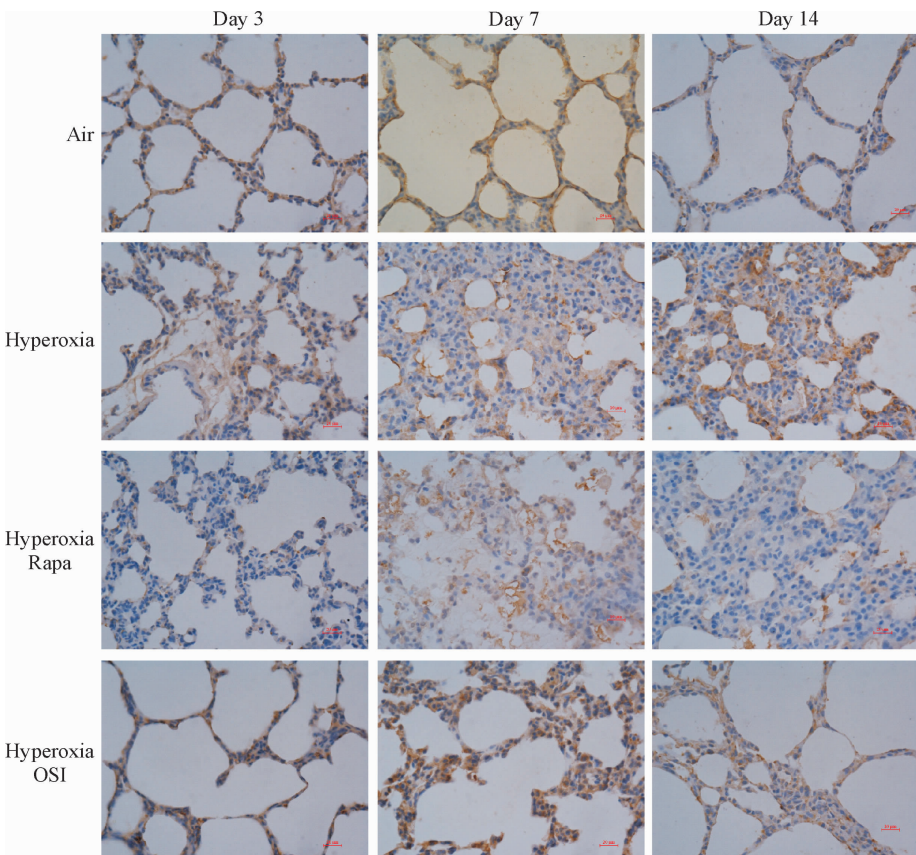


Figure 3. Distribution of p-S6K1 protein in each group (×400).

图 3 各组 p-S6K1 蛋白的分布

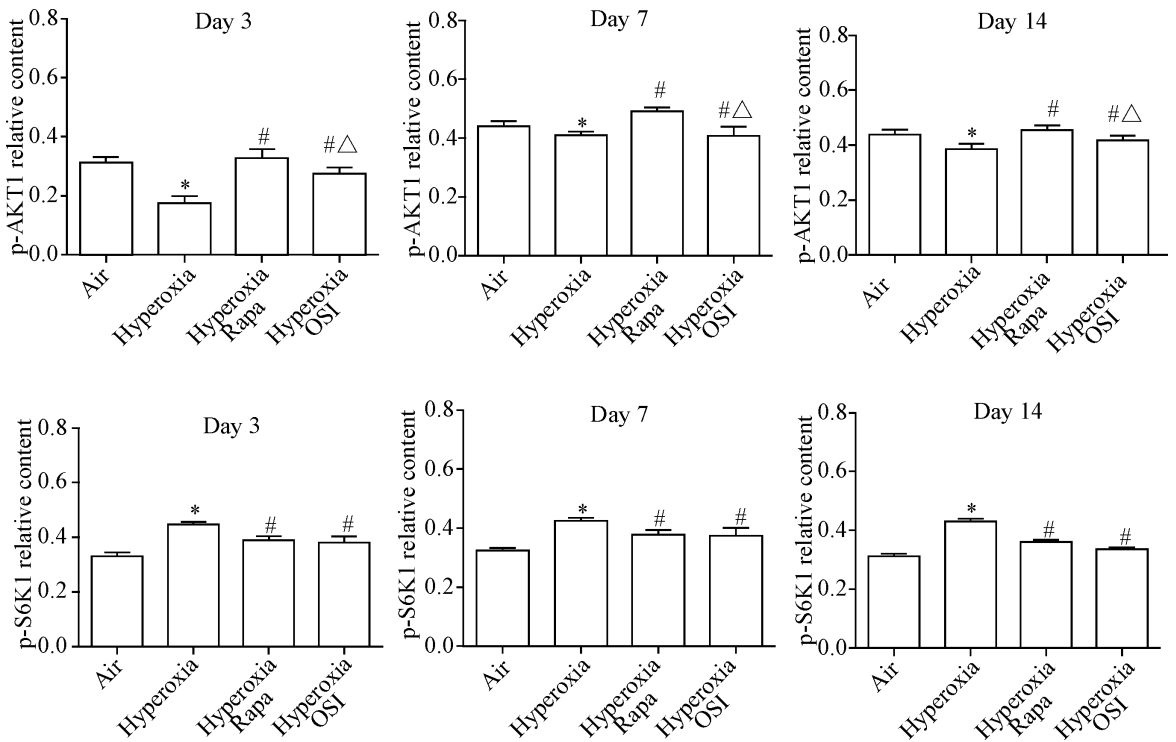


Figure 4. The relative protein levels of p-AKT1 and p-S6K1 in different groups on day 3, day 7 and day 14 were detected by immunohistochemistry. Mean \pm SD. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs air group; # $P < 0.05$ vs hyperoxia group; $\Delta P < 0.05$ vs hyperoxia Rapa group.

图 4 免疫组织化学检测第 3、7 和 14 天各组 p-AKT1 和 p-S6K1 蛋白的相对水平

中的表达量升高 ($P < 0.01$)；与高氧组比较,各时点 p-S6K1 在高氧 + 雷帕霉素组和高氧 + OSI-027 组 SD 幼鼠肺组织中的表达量降低 ($P < 0.05$)；与高氧 + 雷帕霉素组比较,各时点 p-S6K1 在高氧 + OSI-027 组 SD 幼鼠肺组织中表达量的差异无统计学显著性,见图 5。

讨 论

高氧肺损伤的复杂病理生理过程主要表现为弥散性肺炎及肺损伤后修复重建,其病理学特征主要是细胞的坏死和凋亡,伴中性粒细胞渗出的肺泡炎性水肿及晚期的肺间质增生和肺纤维化的发生发展。本研究组已在高氧肺损伤方面开展了大量的相关研究^[10]。本研究采用本实验室已成熟建立的高氧肺损伤动物模型^[11-12],病理学检查结果显示,高氧第 14 天时,肺损伤评分显著增加,已出现肺间质及成纤维细胞的增生。

mTOR 属于磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 蛋白家族,是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它被认为是调节细胞增殖、转分化、存活、生长、翻译、代谢及自噬的中心枢纽^[13]。mTOR 有功能不同的 mTORC1 和 mTORC2 2 个亚基。AKT1 是 mTORC2 信号通路重要的下游靶蛋白,

mTORC2 具有激活 AKT1 的功能;AKT1 又是 mTOR 的上游分子,可以激活 mTOR, mTORC1 下游信号转导通路:p-S6K1 蛋白激酶能被雷帕霉素强烈抑制,但是 4E-BP1 磷酸化和自噬激活却对雷帕霉素不敏感^[14]。由于 S6K1 是 mTORC1 的直接作用底物,因此,p-S6K1 被认为是 mTOR 通路下游的重要效应蛋白分子,其水平升高可反映 mTOR 信号通路的活化情况。mTOR 激活能促进基因转录和蛋白质合成,它在纤维化过程中扮演重要角色^[15]。激活的 AKT1 参与细胞凋亡、葡萄糖代谢和蛋白质合成过程,从而调节细胞的存活和增殖^[16]。因此,本实验中重点研究了肺组织 pS6K1 和 p-AKT1 2 种蛋白的表达水平。

AKT1 与 mTOR 存在以下关系:一方面,AKT1 可以直接使 mTOR 蛋白磷酸化而激活,促进相关蛋白的表达;另一方面,AKT1 可以间接使 mTOR 激活,激活的 AKT1 促进结节性硬化复合物 2 (tuberous sclerosis complex 2, TSC2) 发生磷酸化,抑制 TSC1/2 复合物的形成,从而阻碍其对 mTOR 的抑制作用,另外,AKT1 还可以磷酸化 PRAS40,抑制 PRAS40 对 mTOR 的负性调节作用^[17]。

有研究发现,雷帕霉素用于抗肿瘤治疗时,可导致 PI3K/AKT 及 Ras/Raf/ERK 信号通路的激活,出现耐药现象^[18]。正常状况下, mTORC1 活化导致

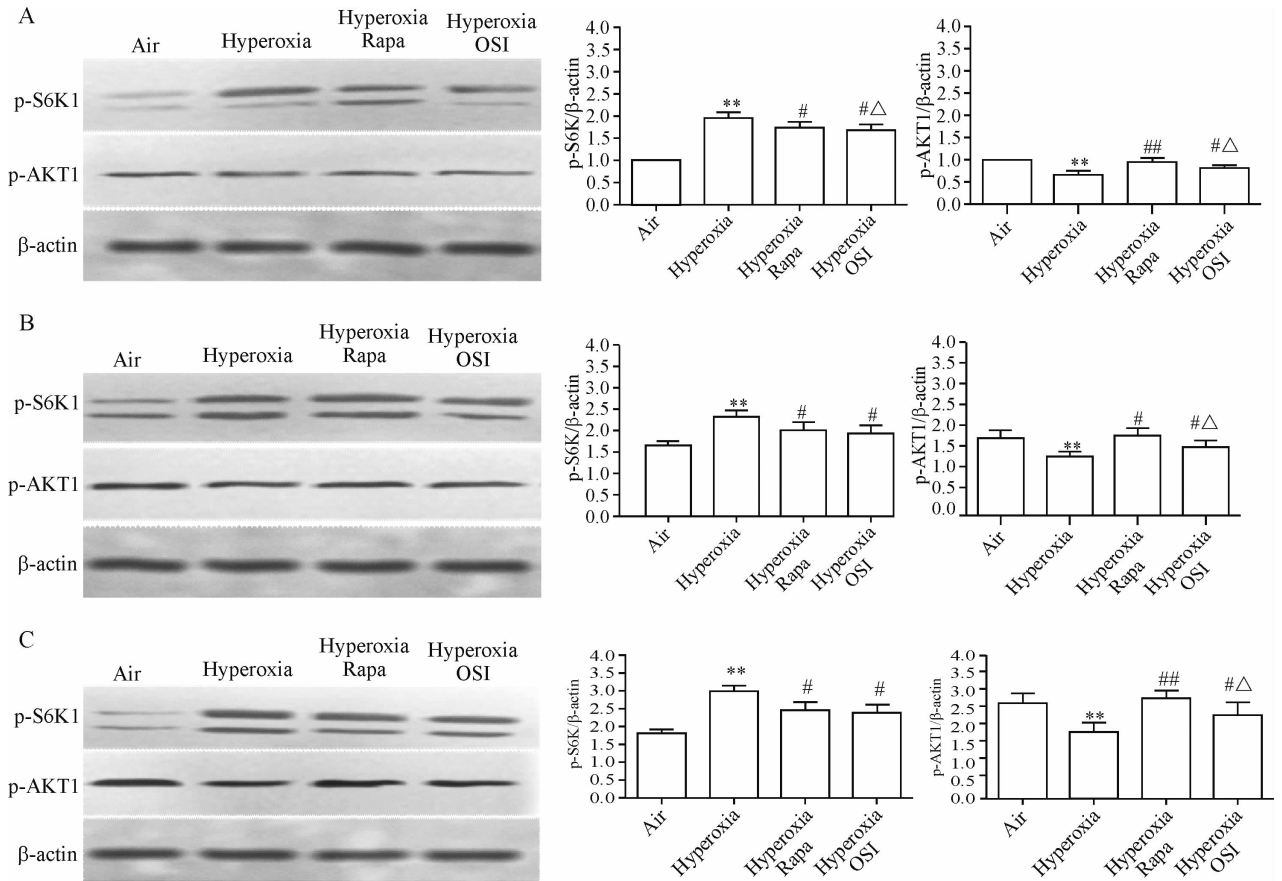


Figure 5. The relative protein levels of p-AKT1 and p-S6K1 in different groups on day 3 (A), day 7 (B) and day 14 (C) were detected by Western blot. Mean \pm SD. $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs air group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs hyperoxia group; $\Delta P < 0.05$ vs hyperoxia Rapa group.

图 5 Western blot 检测第 3、7 和 14 天各组 p-AKT1 和 p-S6K1 蛋白的相对水平

S6K1 活化,活化的 S6K1 可磷酸化 IRS-1,从而反馈抑制 PI3K 的活化;mTORC1 被抑制后,S6K1 活化水平降低,反馈抑制机制被打破,从而导致 PI3K 的激活,PI3K 激活后作用于下游的 AKT1 及 Ras/Raf/ERK,导致其活化^[19],从而减弱雷帕霉素抑制细胞增殖的效果。同时,mTORC2 对雷帕霉素不敏感,mTORC2 的活化能够激活 AKT1,通过下游一些信号通路,促进细胞存活与增殖^[20-21]。

本实验免疫组化与 Western blot 的结果显示相一致,空气组和高氧组随着生长发育时间的延长 p-AKT1 和 p-S6K1 蛋白表达明显增加;与空气组比较,各时点高氧组 SD 幼鼠高氧暴露后肺组织 p-S6K1 蛋白表达显著增高,而肺组织 p-AKT1 蛋白水平显著减少;与高氧组比较,各时点在高氧雷帕霉素组和高氧 OSI-027 组肺组织中 p-S6K1 表达明显减少,而肺组织中 p-AKT1 表达明显增多,提示高浓度氧可激活 mTOR/S6K1 信号途径,降低 AKT1 的磷酸化,抑制 mTOR 信号通路能升高 AKT1 的磷酸化。

综上所述,mTORC1 特异性抑制剂雷帕霉素不

能减弱高氧致 SD 幼鼠肺损伤纤维化的作用,mTORC1 和 mTORC2 双重抑制剂 OSI-027 能减轻高氧致 SD 幼鼠肺损伤纤维化的作用。本研究提示 p-AKT1 可能参与了高氧肺损伤的发生发展,激活 AKT1 有促进细胞存活与增殖的作用,其调控机制可能与 mTOR 信号通路有关。但细胞间复杂的信号网络通常伴有通讯串扰,单一信号通路的改变并不能完全阐明高氧肺损伤的发生发展机制。有关 p-AKT1 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] Doyle LW, Carse E, Adams AM, et al. Ventilation in extremely preterm infants and respiratory function at 8 years [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(4):329-337.
- [2] Wang Y, Yue S, Luo Z, et al. *N*-methyl-D-aspartate receptor activation mediates lung fibroblast proliferation and differentiation in hyperoxia-induced chronic lung disease in newborn rats[J]. *Respir Res*, 2016, 17:136.
- [3] Habel DM, Camelo A, Espindola M, et al. Divergent

- roles for clusterin in lung injury and repair[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15444.
- [4] Chambers RC, Mercer PF. Mechanisms of alveolar epithelial injury, repair, and fibrosis[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2015, 12(Suppl 1):S16-S20.
- [5] Kulkarni YM, Dutta S, Iyer AK, et al. A proteomics approach to identifying key protein targets involved in VEGF inhibitor mediated attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Proteomics*, 2016, 16(1):33-46.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Dang HX, Li J, Liu C, et al. CGRP attenuates hyperoxia-induced oxidative stress-related injury to alveolar epithelial type II cells via the activation of the Sonic hedgehog pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(1):209-216.
- [11] 党红星, 杨林, 王少华, 等. 高氧暴露下新生大鼠肺组织 Smo 和 Gli1 蛋白的表达和意义[J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(7):625-629.
- [12] 党红星, 杨林, 王少华, 等. CGRP 减轻高氧诱导的早产鼠肺泡 II 型细胞损伤及对 Gli1 表达的影响[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(1):49-54.
- [13] ur Rasool R, Rah B, Amin H, et al. Dual modulation of Ras-Mnk and PI3K-AKT-mTOR pathways: a novel c-FLIP inhibitory mechanism of 3-AWA mediated translational attenuation through dephosphorylation of eIF4E[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:18800.
- [14] Thoreen CC, Sabatini DM. Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely[J]. *Autophagy*, 2009, 5(5):725-726.
- [15] Felkin LE, Narita T, Germack R, et al. Calcineurin splicing variant calcineurin Abeta1 improves cardiac function after myocardial infarction without inducing hypertrophy[J]. *Circulation*, 2011, 123(24):2838-2847.
- [16] Ding XQ, Zhao S, Yang L, et al. The nucleocytoplasmic translocation and up-regulation of ING5 protein in breast cancer: a potential target for gene therapy[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47):81953-81966.
- [17] Moore SF, Hunter RW, Hers I. mTORC2 protein complex-mediated Akt (protein kinase B) serine 473 phosphorylation is not required for Akt1 activity in human platelets[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(28):24553-24560.
- [18] Burris HR. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(4):829-842.
- [19] Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9):3065-3074.
- [20] Abeyathna P, Kovacs L, Han W, et al. Calpain-2 activates Akt via TGF- β 1-mTORC2 pathway in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311(1):C24-C34.
- [21] Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, et al. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by *Pten* loss in mice[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(2):148-159.

(责任编辑: 陈妙玲, 罗 森)