

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.19.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 19-0001-06

基础研究·论著

1, 25-(OH)₂D₃对肺纤维化大鼠中PI3K、AKT、mTOR表达的影响及其机制研究*

董洪亮¹, 刘乃国¹, 苗双², 郑静¹, 倪娜¹, 王楠¹, 成苗青¹

(滨州医学院附属医院 1. 临床医学实验室, 2. 肿瘤研究中心, 山东 滨州 256603)

摘要: **目的** 观察 1, 25-(OH)₂D₃ 对特发性肺纤维化 (IPF) 大鼠中 PI3K、AKT、mTOR 表达的影响, 并探讨其对 IPF 的作用机制。 **方法** 90 只雄性 SD 大鼠随机分为模型组、治疗组及对照组, 每组 30 只。模型组和治疗组按 5 mg/kg 的剂量气管内注射博来霉素, 复制肺纤维化模型, 对照组注入无菌生理盐水 (200 μl/只)。注射后第 2 天起, 治疗组腹腔注射 1, 25-(OH)₂D₃ (2 μg/kg), 模型组和对照组分别腹腔注射 1, 25-(OH)₂D₃ 溶剂 (200 μl/只) 和无菌生理盐水 (200 μl/只), 均隔天 1 次。各组于第 14、21 和 28 天分别处死 10 只, 检测各组大鼠肺组织中羟脯氨酸的含量, 实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 和免疫组织化学方法分别从 mRNA 水平和蛋白质水平检测肺组织中 PI3K、AKT、mTOR 的表达。 **结果** 模型组和治疗组大鼠肺组织羟脯氨酸的含量, PI3K、AKT、mTOR 3 种基因的转录表达和蛋白质表达量, 在第 14、21 和 28 天均高于对照组 ($P < 0.05$), 且治疗组中的上述指标, 在各时间又均低于模型组 ($P < 0.05$)。 **结论** IPF 的发生发展过程中, PI3K-AKT-mTOR 通路具有重要作用, 1, 25-(OH)₂D₃ 对 IPF 有一定的治疗作用, 其机制可能是通过抑制 PI3K-AKT-mTOR 通路发挥其治疗作用。

关键词: 1, 25-(OH)₂D₃; 大鼠; 特发性肺纤维化; PI3K-AKT-mTOR 通路

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on expressions of PI3K, AKT and mTOR in rats with idiopathic pulmonary fibrosis and its mechanism*

Hong-liang Dong¹, Nai-guo Liu¹, Shuang Miao², Jing Zheng¹, Na Ni¹, Nan Wang¹, Miao-qing Cheng¹
(1. Clinical Medical Laboratory, 2. Cancer Research Center, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou, Shandong 256603, China)

Abstract: Objective To observe the effect of 1,25-(OH)₂D₃ on expressions of PI3K, AKT and mTOR in rats with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), and to investigate its mechanism. **Methods** Ninety male SD rats were randomly divided into a model group, a treatment group and a control group (30 in each group). Bleomycin (5 mg/kg) was injected into the trachea of the rats to establish the model of pulmonary fibrosis in the model group and the treatment group, while the control group was injected with sterile physiological saline (200 μl for each). From the 2nd day, the rats in the treatment group received intraperitoneal injection of 1,25-(OH)₂D₃ (2 μg/kg), and the rats in the model group and the control group were given the solvent (99.9% propylene glycol and 0.1% ethanol, 200 μl per rat) and sterile physiological saline (200 μl per rat) respectively by intraperitoneal injection, once every other day. Ten rats were sacrificed randomly on the 14th, 21st and 28th day in each group. The hydroxyproline content of the lung tissues of the rats in each group was measured. The mRNA and protein expression levels of PI3K, AKT and

收稿日期: 2017-09-25

* 基金项目: 滨州医学院科技计划与科研启动基金 (No: BY2015KJ39); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (No: 2017WS548)
[通信作者] 刘乃国, E-mail: liunaiguo1966@163.com; Tel: 15954328362

mTOR were tested by real-time PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results** The hydroxyproline content of the lung tissues, the mRNA and protein expression levels of PI3K, AKT and mTOR were obviously increased in the model group and the treatment group compared with those in the control group on day 14, 21 and 28 ($P < 0.05$). However, all the above indicators in the treatment group were reduced significantly compared with those of the model group on day 14, 21 and 28 ($P < 0.05$). **Conclusions** The PI3K/AKT/mTOR pathway plays an important role in IPF. 1,25-(OH)₂D₃ has certain therapeutical effect on IPF, perhaps it plays a role through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords: 1,25-(OH)₂D₃; SD rat; pulmonary fibrosis; PI3K/AKT/mTOR pathway

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 是一种慢性炎症性间质性肺疾病, 病因不明, 是一种常见的致命性肺部疾病, 目前尚无有效的治疗方法^[1-3]。因而探索其发病机制, 寻求新的有效的治疗措施是非常必要的。

有研究发现, PI3K-AKT-mTOR 通路与心脏纤维化、肝脏纤维化, 以及肾脏纤维化等纤维化疾病发病机制有关^[4-6]。也有报道称该通路可能与肺纤维化发病有关^[7-8]。活性维生素 D₃ [(1, 25-(OH)₂D₃] 能够通过影响 Wnt 通路改善博来霉素所致的小鼠肺纤维化^[9], 提示 1, 25-(OH)₂D₃ 可能对肺纤维化有一定的治疗作用。但是 1, 25-(OH)₂D₃ 在大鼠 IPF 中是否对 PI3K-AKT-mTOR 通路有影响尚未见报道。

本研究旨在探讨大鼠 IPF 发生过程中, 肺组织中 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的变化及 1, 25-(OH)₂D₃ 对此通路的影响, 评价 1, 25-(OH)₂D₃ 对大鼠 IPF 的干预作用, 为揭示肺纤维化的发生机制和探讨新的治疗措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及引物

90 只 6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠购自鲁抗医药实验中心 (许可证号: SCXK 鲁 2013000), 博来霉素 (日本化学株式会社生产, 15 mg/支, 批号: 030201), 1, 25-(OH)₂D₃ 购自德国 Sigma 公司, HiFi Script Quick gDNA Removal cDNA Kit、Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix 购自北京康为世纪生物科技有限公司, 超敏二步法免疫组织化学检测试剂 (PV-9001/2)、DAB 试剂盒 (ZLI-9019) 购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

应用 Primer (version 5.0) 软件, 根据大鼠 PI3K、AKT、mTOR 的基因序列, 分析设计特异性引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。内参基因 GAPDH 的引物由上海生工生物工程技术有限公司

司, 引物序列见表 1。

表 1 所用引物序列

名称	引物序列	长度 /bp
PI3K	正向: 5'-CTTGCCTCCATTACACACCTCT-3'	97
	反向: 5'-GCCTCTAATCTTCTCCCTCTCCTTC-3'	
AKT	正向: 5'-TGCTCTCGTGAGCGCGTGT-3'	159
	反向: 5'-CCGTTATCTTGATGTGCCCGTC-3'	
mTOR	正向: 5'-GCAAGAATTGACACGCCAG-3'	149
	反向: 5'-TTGTTGGCTGCATTGTGACG-3'	

1.2 动物实验分组

90 只 200 g 左右雄性 SD 大鼠, 随机分为模型组、治疗组、对照组, 每组各 10 只。大鼠腹腔注射 4% 水合氯醛 (200 ~ 300 μl/只) 进行麻醉后, 模型组和治疗组采用单次气管内注射博来霉素 (5.0 mg/kg) 的方法进行肺纤维化模型的复制^[10], 对照组气管内注射生理盐水 (200 μl/只)。自第 2 天起, 模型组腹腔注射 1, 25-(OH)₂D₃ 的溶剂 (200 μl/只, 0.1% 乙醇和 99.9% 的丙二醇), 1 次 /2 d; 治疗组腹腔注射 1, 25-(OH)₂D₃ [按体重 2 μg/kg, 1, 25-(OH)₂D₃ 溶于 0.1% 乙醇和 99.9% 的丙二醇]^[11], 1 次 /2 d; 对照组腹腔注射生理盐水 (200 μl/只), 1 次 /2 d。各小组于第 14、21 和 28 天分别处死 10 只大鼠, 取肺组织进行后续试验。

1.3 肺组织羟脯氨酸含量的检测

SD 大鼠处死后, 取肺组织 100 mg, 采用碱水解法, 根据羟脯氨酸检测试剂盒说明书进行操作, 每个样品重复检测 3 次, 取其平均值。

1.4 Real-time PCR 法检测 PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达

1.4.1 肺组织总 RNA 的提取及 cDNA 的合成
Trizol 法提取大鼠肺组织总 RNA, 用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度和浓度, 以 OD_{260/280} 在 1.8 ~ 2.0

为标准。用 HiFi Script Quick gDNA Removal cDNA Kit 进行逆转录。合成的 cDNA 保存于 -80℃, 备用。

1.4.2 Real-time PCR 检测 以 GAPDH 作为内参基因, 用 Real-time PCR 对肺组织中 *PI3K*、*AKT*、*mTOR* 的表达进行相对定量。反应体系: 12.5 μl 2× Maxima SYBR Green Mix, 1 μl Forward Primer, 1 μl Reverse Primer, 模板 1 μl, RNase-free Water 补足至 25 μl。扩增反应条件: 95℃ 10 min, 变性 95℃ 10 s, 退火 60℃ 10 s, 延伸 72℃ 15 s, 40 个循环。所得数据用 2^{-ΔΔCt} 法进行统计分析。

1.5 免疫组织化学法检测 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达水平

各组肺组织, 4% 多聚甲醛固定 48 h 后, 进行修块、脱水、透明、石蜡包埋; 组织切片 (4 μm) 经常规脱蜡至水后, 进行抗原修复 (95℃, 10 min), 去除内源性辣根过氧化酶 (3% H₂O₂ 甲醇溶液, 处理 20 min); 滴加一抗, 4℃ 过夜, 洗涤; 滴加相应二抗, 37℃。孵育 1 h, 洗涤; DAB 显色, 苏木素复染; 最后脱水、透明、封片。操作过程中设阴性对照, 以 1% PBS 代替一抗。光镜下进行组织观察、拍照, 以胞质浆内出现明显的棕黄色颗粒或斑块为阳性表达。Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统进行图像分析。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点肺组织羟脯氨酸含量比较

实验第 14、21 和 28 天对检测到的各组羟脯氨酸

(HYP) 的含量进行方差分析, 结果显示: 第 14 天 HYP 含量差异有统计学意义 ($F = 15.536, P = 0.003$); 第 21 天 HYP 含量差异有统计学意义 ($F = 39.964, P = 0.000$); 第 28 天 HYP 含量差异有统计学意义 ($F = 73.524, P = 0.000$)。两两比较采用 LSD-*t* 检验, 模型组和治疗组的 HYP 含量均比相应时间对照组的 HYP 含量高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗组在各时间点的 HYP 含量比相应时间模型组的 HYP 含量低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠肺组织中羟脯氨酸含量比较

($n = 10, \mu\text{g/mg}, \bar{x} \pm s$)

组别	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	481 ± 102	452 ± 127	475 ± 129
模型组	832 ± 137 ¹⁾	1 025 ± 74 ¹⁾	1 182 ± 75 ¹⁾
治疗组	650 ± 70 ¹⁾²⁾	820 ± 128 ¹⁾²⁾	858 ± 85 ¹⁾²⁾
<i>F</i> 值	15.536	39.964	73.524
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

2.2 各组大鼠肺组织中 PI3K、AKT 及 mTOR mRNA 表达比较

实验第 14、21 和 28 天, 模型组和治疗组中 *PI3K*、*AKT* 及 *mTOR* 的 mRNA 相对表达量均高于相应时间的对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 治疗组在各时间, 上述 3 个基因的 mRNA 相对表达量均低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 各组大鼠肺组织中 PI3K、AKT 及 mTOR 蛋白表达的比较

蛋白 *PI3K*、*AKT* 及 *mTOR* 在各组肺组织中, 主要在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞、成纤维细胞和肌

表 3 各组大鼠肺组织中 *PI3K*、*AKT* 及 *mTOR* 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>PI3K</i>			<i>AKT</i>			<i>mTOR</i>		
	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
模型组	1.45 ± 0.13 ¹⁾	1.72 ± 0.34 ²⁾	2.01 ± 0.27 ²⁾	1.45 ± 0.23 ¹⁾	1.72 ± 0.44 ²⁾	2.01 ± 0.31 ²⁾	1.39 ± 0.24 ¹⁾	1.92 ± 0.32 ²⁾	2.46 ± 0.53 ²⁾
治疗组	1.29 ± 0.14	1.37 ± 0.26 ¹⁾	1.64 ± 0.38	1.29 ± 0.14	1.37 ± 0.23 ¹⁾	1.64 ± 0.40	1.24 ± 0.31	1.54 ± 0.39	1.73 ± 0.33
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
<i>F</i> 值	41.023	17.214	11.076	9.636	8.776	17.901	35.810	23.131	15.422
<i>P</i> 值	0.028	0.000	0.000	0.033	0.000	0.001	0.010	0.003	0.007

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与治疗组比较, $P < 0.05$

成纤维细胞中有明显表达。

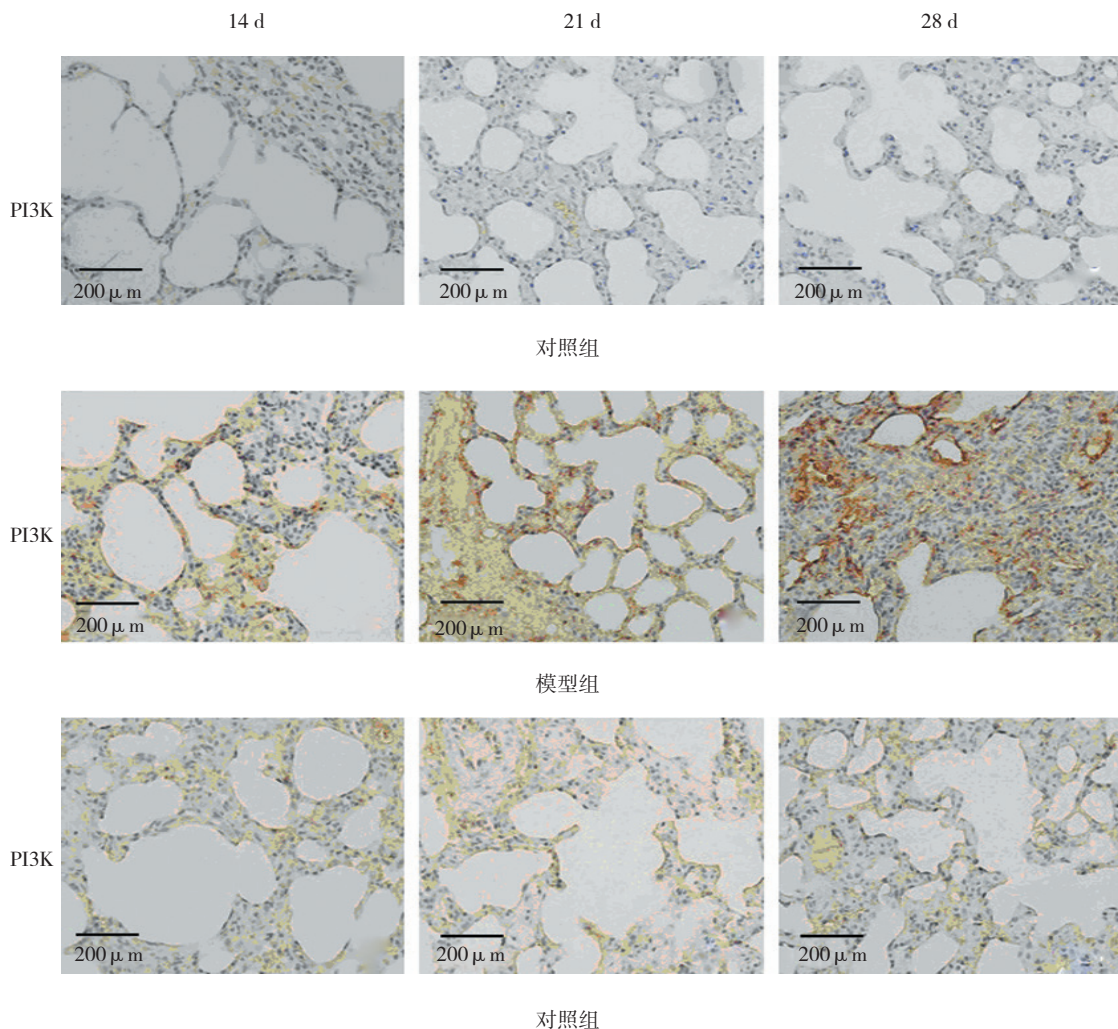
实验第 14、21 和 28 天，对检测的 3 个基因的蛋白质表达量进行方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两两比较采用 LSD- t 检验，模型组和治疗组在

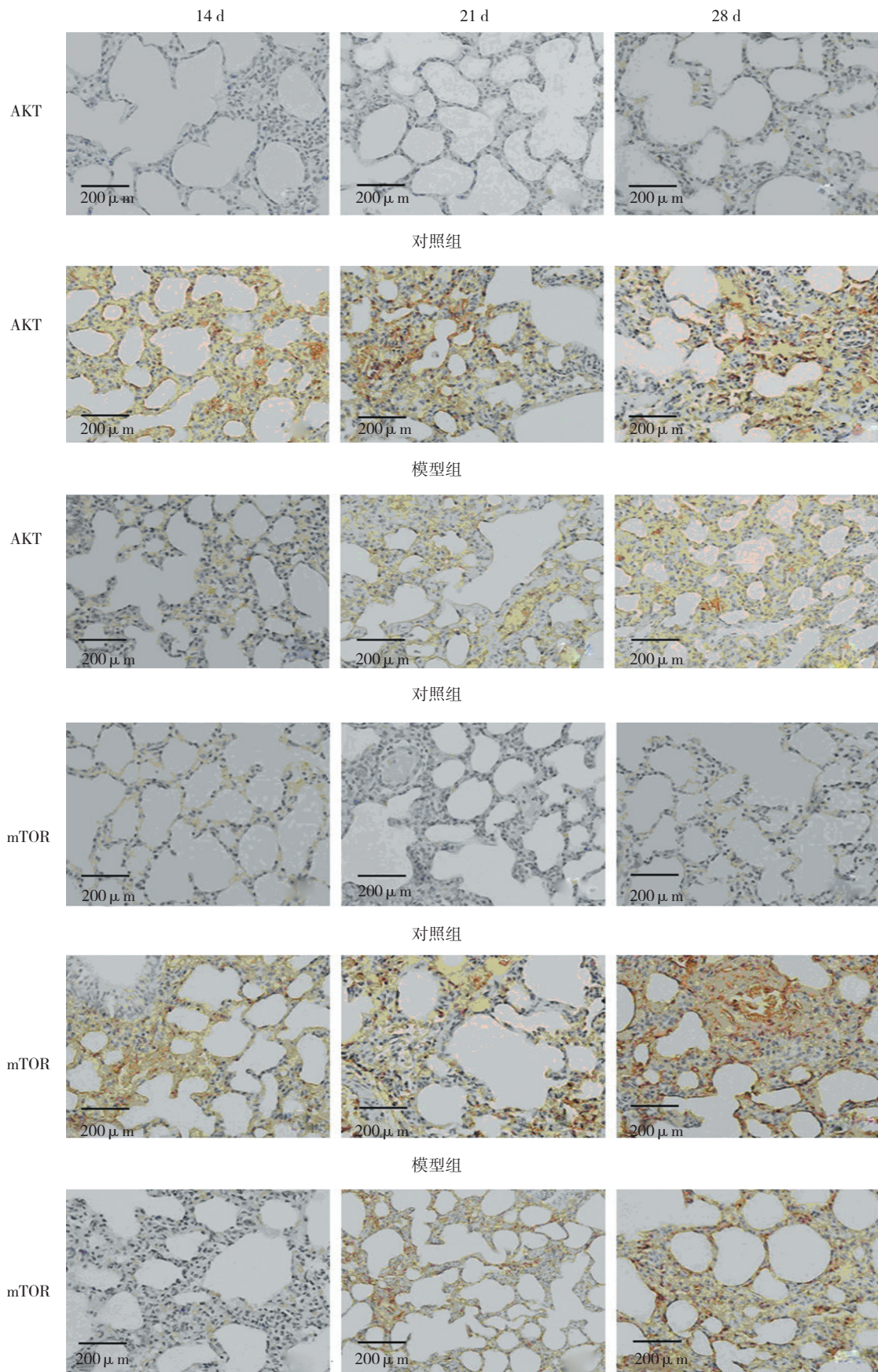
各时间 PI3K、AKT、mTOR 3 种蛋白的表达量均高于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，治疗组在各时间的 3 种蛋白的表达量均低于模型组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4 和附图。

表 4 各组大鼠肺组织中 PI3K、AKT 及 mTOR 蛋白的表达 (积分吸光度 IA, $\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K ($\times 10^4$)			AKT ($\times 10^4$)			mTOR ($\times 10^4$)		
	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
模型组	$5.657 \pm 2.53^{1)}$	$6.411 \pm 1.89^{1)}$	$7.133 \pm 2.48^{1)}$	$5.421 \pm 2.43^{1)}$	$5.834 \pm 1.79^{1)}$	$6.605 \pm 2.41^{1)}$	$4.892 \pm 1.21^{1)}$	$5.913 \pm 2.30^{1)}$	$6.861 \pm 1.33^{1)}$
治疗组	$4.492 \pm 2.44^{1)2)}$	$5.267 \pm 1.22^{1)2)}$	$5.841 \pm 2.18^{1)2)}$	$3.490 \pm 1.84^{1)2)}$	$4.121 \pm 2.09^{1)2)}$	$5.042 \pm 2.87^{1)2)}$	$4.032 \pm 1.29^{1)2)}$	$4.543 \pm 1.08^{1)2)}$	$5.433 \pm 1.43^{1)2)}$
对照组	2.357 ± 1.03	2.431 ± 0.74	2.563 ± 1.45	1.997 ± 0.76	2.232 ± 1.22	2.193 ± 1.77	2.007 ± 0.76	2.132 ± 1.23	2.126 ± 1.25
F 值	13.442	10.544	7.852	21.132	8.768	7.991	24.674	19.709	9.508
P 值	0.004	0.012	0.000	0.009	0.000	0.031	0.027	0.006	0.002

注：1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$





附图 PI3K、AKT 及 mTOR 在各组大鼠肺组织中的表达

3 讨论

IPF 发病隐匿, 至今仍然缺乏有效治疗方法, 诊断后的平均寿命仅为 2 ~ 3 年^[12-13]。HYP 含量是评价肺纤维化程度的金标准。本研究中, 模型组肺组织 HYP 含量在实验第 14、21 和 28 天均高于对照组; 而治疗组中肺组织 HYP 的含量在上述 3 个时间点均低于模型组。提示 1, 25-(OH)₂D₃ 对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化有一定的干预效果。

PI3K 是磷脂激酶家族中重要一员, 其活化产物 PIP3 能够激活 AKT 蛋白, 进一步磷酸化 mTOR 的 Ser2448 位点激活 mTOR, 从而增强细胞的生长与分化^[14]。已有研究报道 PI3K-AKT-mTOR 通路参与多种器官的纤维化, 本研究发现, 在实验第 14、21 和 28 天, 模型组肺组织中, PI3K、Akt、mTOR 3 种基因在 mRNA 水平和蛋白质水平均高于对照组; 免疫组织化学结果显示, 各组肺组织中 PI3K、AKT、mTOR 3 种蛋白在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞、成纤维细胞和肌成纤维细胞中有阳性表达, 模型组各类细胞中阳性信号强于对照组。有研究报道, 肺泡 II 型上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞及肌成纤维细胞在肺纤维化的发生发展过程中起重要作用^[15], 以上定量定位结果都提示 PI3K-AKT-mTOR 通路与大鼠肺纤维化的发生与发展有着密切联系。

给予 1, 25-(OH)₂D₃ 进行干预后, 发现在实验第 14、21 和 28 天, 治疗组肺组织中 PI3K、AKT、mTOR 3 种基因在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达均低于模型组。免疫组织化学结果显示, 在上述 3 个时间点, 治疗组中 3 种蛋白在肺泡 II 型上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞及肌成纤维细胞的表达信号也弱于模型组。说明在大鼠肺纤维化发生、发展过程中, 1, 25-(OH)₂D₃ 对 PI3K-AKT-mTOR 通路有一定的抑制作用。

综上所述, 在大鼠 IPF 的发生、发展过程中, PI3K-AKT-mTOR 通路起重要作用, 1, 25-(OH)₂D₃ 对大鼠 IPF 有一定的治疗作用, 其作用机制与抑制 PI3K-AKT-mTOR 通路有关。

参 考 文 献:

[1] KUN H, XIAOWEN K, XINYAN W, et al. Conversion of bone marrow mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial

cells reduces pulmonary fibrosis by decreasing oxidative stress in rats[J]. Mol Med Rep, 2014, 11(3): 1685-1692.

- [2] CHERESH P, KIM S J, TULASIRAM S, et al. Oxidative stress and pulmonary fibrosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(7): 1028-1040.
- [3] SERGEW A, BROWN K K. Advances in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2015, 20(4): 537-552.
- [4] LIAN H, MA Y, FENG J, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor induces heart interstitial fibrosis via an Akt/mTOR/p70s6k pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44946-44946.
- [5] PATSENKER E, SCHNEIDER V, LEDERMANN M, et al. Potent antifibrotic activity of mTOR inhibitors sirolimus and everolimus but not of cyclosporine A and tacrolimus in experimental liver fibrosis[J]. J Hepatol, 2011, 55(2): 388-398.
- [6] CHEN G, CHEN H, WANG C, et al. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33626-33626.
- [7] 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.
- [8] TULEK B, KIYAN E, TOY H, et al. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of sirolimus on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Clin Invest Med, 2011, 34(6): e341.
- [9] 张宗梅, 顾盼, 易祥华, 等. 骨化三醇对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的影响[J]. 中华结合和呼吸杂志, 2013, 36(11): 814-820.
- [10] RAMIREZ A, RAMADAN B, RITZENTHALER J D, et al. Extracellular cysteine/cystine redox potential controls lung fibroblast proliferation and matrix through upregulation of transforming growth factor-beta[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(4): 972-981.
- [11] SERGEW A, BROWN K K. Advances in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2015, 20(4): 537-552.
- [12] 孔勤, 陈民利. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(8): 74-80.
- [13] ZHAN Y, LIU R, WANG W. Total saponins isolated from Radix et Rhizoma Leonticis suppresses tumor cells growth by regulation of PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK pathways[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 10(41): 39-44.
- [14] 黄莺, 叶燕青, 施娟娟, 等. 肺纤维化形成过程中大鼠成纤维细胞对肺泡 II 型上皮细胞的影响[J]. 武汉大学学报, 2008, 29(4): 467-471.
- [15] 黄雁超, 李流云, 崔向清, 等. 巨噬细胞在肺纤维化的发病机制研究进展[J]. 重庆医学, 2015, 21(44): 2999-3001.

(张西倩 编辑)