

小分子 RNA 干扰雷帕霉素靶蛋白基因表达对百草枯致大鼠肺纤维化的影响

杨文彬 赵小青 梁冉 陈达

271600 山东肥城,肥城矿业中心医院呼吸科(杨文彬、赵小青、梁冉);110000 辽宁沈阳,中国医科大学第四医院呼吸科(陈达)

通讯作者:赵小青,Email:1827214480@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.09.013

【摘要】 目的 探讨小分子 RNA 干扰雷帕霉素靶蛋白(mTOR)基因表达对百草枯致大鼠肺纤维化的影响。**方法** 体外培养人胚肾细胞 HEK-293,构建 mTOR 小干扰 RNA(mTOR-siRNA)表达质粒转染慢病毒,并以与 mTOR 基因无同源性的非特异性序列质粒作为对照。将 72 只健康雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为生理盐水(NS)对照组、百草枯模型组、mTOR 无关序列组、mTOR-siRNA 组,每组 18 只。经腹腔注射 20% 百草枯溶液 15 mg/kg 制备百草枯中毒动物模型,NS 对照组腹腔注射等量 NS;mTOR 无关序列组和 mTOR-siRNA 组大鼠分别经气道内注入滴度为 1×10^9 TU/mL 的慢病毒溶液 50 μ L,NS 对照组和百草枯模型组注入等量 NS。各组分别于 7、14、28 d 处死 6 只大鼠取肺组织,光镜下观察病理学改变及纤维化情况;采用碱水解法检测肺组织羟脯氨酸(HYP)水平;采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)分别检测肺组织 mTOR 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 光镜下显示,NS 对照组肺组织无明显病理学改变;百草枯模型组和 mTOR 无关序列组肺组织结构破坏,有大量炎性细胞浸润,并出现大量基质胶原及纤维组织增生,且随时间延长逐渐加重,符合百草枯致肺组织纤维化过程;而 mTOR-siRNA 组沉默 mTOR 基因后肺组织病理学及纤维化改变明显减轻。百草枯模型组和 mTOR 无关序列组肺组织 HYP 水平以及 mTOR mRNA 和 mTOR 蛋白表达量均呈时间依赖性持续升高,且明显高于 NS 对照组相应时间点;而 mTOR 无关序列组与百草枯模型组无明显差异。mTOR-siRNA 组沉默 mTOR 基因后能抑制百草枯中毒导致肺组织中 HYP 的生成,以及 mTOR mRNA 和 mTOR 蛋白的表达量升高,其值接近 NS 对照组水平,在 7 d 或 14 d 时与百草枯模型组出现统计学差异,并持续至 28 d[7 d:HYP(μ g/mg)为 1.13 ± 0.06 比 1.25 ± 0.07 ;14 d:HYP(μ g/mg)为 1.19 ± 0.09 比 1.29 ± 0.12 ,mTOR mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.99 ± 0.11 比 1.94 ± 0.12 ,mTOR 蛋白(灰度值)为 0.39 ± 0.08 比 0.75 ± 0.09 ;28 d:HYP(μ g/mg)为 1.28 ± 0.06 比 1.40 ± 0.05 ,mTOR mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 1.15 ± 0.13 比 2.85 ± 0.15 ,mTOR 蛋白(灰度值)为 0.45 ± 0.10 比 0.86 ± 0.12 ,均 $P < 0.05$]。**结论** 慢病毒介导的 mTOR-siRNA 可有效抑制百草枯中毒大鼠肺组织中 mTOR 表达,减轻百草枯致肺组织损伤和纤维化程度。

【关键词】 百草枯; 雷帕霉素靶蛋白; 肺纤维化; 慢病毒; 大鼠

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2013021059)

Effects of small RNA interference targeting mammalian target of rapamycin on paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats Yang Wenbin, Zhao Xiaoqing, Liang Ran, Chen Da

Department of Respiratory, Feicheng Mining Center Hospital, Feicheng 271600, Shandong, China (Yang WB, Zhao XQ, Liang R); Department of Respiratory, the Fourth Hospital of China Medical University, Shenyang 110000, Liaoning, China (Chen D)

Corresponding author: Zhao Xiaoqing, Email: 1827214480@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of small RNA interference targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) expression on paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods** Human embryonic kidney cells HEK-293 were cultured *in vitro*. The mTOR small interfering RNA (mTOR-siRNA) expression plasmid transfection lentivirus was constructed, and non-specific sequence plasmid with no homology to mTOR gene was set as the control. Seventy-two healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal saline (NS) control group, paraquat model group, mTOR unrelated sequence group, and mTOR-siRNA group, with 18 rats in each group. Paraquat poisoning animal model was reproduced by intraperitoneally injecting 20% paraquat solution 15 mg/kg, while the NS control group was intraperitoneally injected the same volumes of NS. Rats in the mTOR unrelated sequence group and mTOR-siRNA group were injected 1×10^9 TU/mL lentivirus solution 50 μ L into the airway, respectively, while in the NS control group and paraquat model group were injected the same volumes of NS. At 7, 14 and 28 days after treatment, 6 rats in each group were sacrificed respectively for lung tissue, the pathological changes and fibrosis of lung tissues were observed under light microscope. The levels of hydroxyproline (HYP) in lung tissues were determined by alkaline hydrolysis. The mRNA and protein expressions of mTOR in lung tissues were determined by reverse

transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. **Results** Under light microscope, there was no obvious pathological changes in the lung tissues in the NS control group, while in the paraquat model group and mTOR unrelated sequence group, lung tissue in rats were damaged, there were a lot of inflammatory cell infiltration, a large number of matrix collagen and fibrous tissues hyperplasia, and gradually increased with time, and it was consistent with paraquat-induced lung tissue fibrosis process. The pathological and fibrotic changes in lung tissue of mTOR-siRNA group were obviously reduced after silencing mTOR gene. The levels of HYP and the expression levels of mTOR mRNA and mTOR protein of lung tissues in the paraquat model group and mTOR unrelated sequence group were continuously increased in time-dependent manner, and they were significantly higher than those in the NS control group at all of the time points, but no significant difference was found between mTOR unrelated sequence group and paraquat model group. In mTOR-siRNA group, silencing mTOR gene could inhibit paraquat poisoning induced HYP increase in lung tissue, and the expressions increase in mTOR mRNA and mTOR protein, the values were close to the levels of NS control group, and the significant difference was found as compared with paraquat model group at 7 days or 14 days, and the change was maintained to 28 days [7 days: HYP ($\mu\text{g}/\text{mg}$) was 1.13 ± 0.06 vs. 1.25 ± 0.07 ; 14 days: HYP ($\mu\text{g}/\text{mg}$) was 1.19 ± 0.09 vs. 1.29 ± 0.12 , mTOR mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) was 0.99 ± 0.11 vs. 1.94 ± 0.12 , mTOR protein (gray value) was 0.39 ± 0.08 vs. 0.75 ± 0.09 ; 28 days: HYP ($\mu\text{g}/\text{mg}$) was 1.28 ± 0.06 vs. 1.40 ± 0.05 , mTOR mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) was 1.15 ± 0.13 vs. 2.85 ± 0.15 , mTOR protein (gray value) was 0.45 ± 0.10 vs. 0.86 ± 0.12 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** Lentivirus-mediated mTOR-siRNA could effectively inhibit the expressions of mTOR in lung tissues of paraquat-poisoned rats, and reduce the damage and fibrosis of lung tissues caused by paraquat.

[Key words] Paraquat; Mammalian target of rapamycin; Pulmonary fibrosis; Lentivirus; Rat

Fund program: Natural Science Foundation of Liaoning Province of China (2013021059)

百草枯是高效触杀型除草剂,在农牧业生产中广泛应用,但作为高毒性物质,是导致急性中毒事件的重要原因,可引起心、肝、肺、肾等多器官损伤,具有较高的致死率^[1]。研究表明,肺组织是百草枯主要作用靶器官,百草枯致肺损伤、呼吸衰竭是百草枯中毒患者的主要死亡原因^[2]。有研究者指出,百草枯致肺损伤的主要病理学改变是肺纤维化形成^[3]。雷帕霉素靶蛋白(mTOR)作为重要的信号转导分子,是多条信号转导通路中的关键性因子,与机体多种生理、病理过程关系密切,在调控细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、免疫、血管生成等过程中发挥重要作用^[4],同时参与调控胶原蛋白合成^[5],在调控肾间质纤维化中发挥重要作用^[6],亦参与肝纤维化发生发展过程^[7]。有研究表明,抑制 mTOR 信号通路可抑制特发性肺纤维化(IPF)的发生发展^[8]。目前有关 mTOR 在百草枯致肺纤维化发生发展中的作用尚未见报道。本研究利用 RNA 干扰(RNAi)技术靶向沉默 mTOR 基因,探讨其对百草枯致肺纤维化的影响,以期对相关机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及设备:人胚肾细胞 HEK-293 购自上海拜力生物科技有限公司,慢病毒包装试剂盒购自广州辉骏生物科技有限公司,百草枯标准品(纯度 99.3%)购自南京红太阳股份有限公司,含 mTOR 小干扰 RNA(siRNA)慢病毒质粒以及含 mTOR 无关序列慢病毒质粒均购自上海吉凯基因化学技术有限公司, Lipofectamine 脂质体转染试剂盒

购自美国 Roche 公司,0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清和 DMEM 培养液均购自美国 Gibco 公司,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,Masson 三色染色试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司,总 RNA 提取试剂盒(Trizol 法)购自美国 Invitrogen 公司,羟脯氨酸(HYP)测试盒购自南京建成生物工程研究所,多克隆抗 mTOR 抗体购自上海瑞齐生物科技有限公司,实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪购自美国 ABI 公司,凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 慢病毒构建:取 HEK-293 细胞接种于 6 孔板中,培养于含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱,待细胞融合度达到 80% 左右时分为两组,应用 Lipofectamine 脂质体转染试剂盒进行转染。mTOR 无关序列组转染含与大鼠源性 mTOR 基因均无同源性的非特异性序列质粒;而 mTOR-siRNA 组则转染含大鼠源性 mTOR-siRNA 序列质粒。转染后继续恒温培养 48 h,镜下观察。收集培养基上清,60 000 × g 离心 10 min,应用梯度稀释法对慢病毒滴度进行检测,病毒经浓缩后滴度为 2.3×10^{10} TU/mL。荧光显微镜下显示, mTOR 无关序列组和 mTOR-siRNA 组均可见到绿色荧光,感染效率均在 90% 以上。

1.3 实验动物及分组处理方法:72 只健康雄性 SD 大鼠购自河南省实验动物中心[合格证号:SCXK(豫)2011-0003],采用随机数字表法分为生理盐水(NS)对照组、百草枯模型组、mTOR 无关序列组和 mTOR-siRNA 组 4 组,每组 18 只。采用腹腔注射

20% 百草枯溶液 15 mg/kg 制备百草枯中毒动物模型^[9], NS 对照组腹腔注射等量 NS; 各组相应处理 4 h^[10]后, mTOR 无关序列组和 mTOR-siRNA 组大鼠分别经气道内注入滴度为 1×10^9 TU/mL 的慢病毒溶液 50 μ L, 而 NS 对照组和百草枯模型组则注入等量 NS。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 检测指标及方法: 各组分别于 7、14、28 d 取 6 只大鼠, 腹腔注射过量麻醉药物处死并留取肺组织, 左肺用 4% 多聚甲醛固定, 右肺保存于 -70°C 液氮中备检。

1.4.1 肺组织病理学观察: 取 4% 多聚甲醛固定的左肺组织, 经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后, HE 染色, 光镜下观察肺组织炎症及纤维化程度; 采用 Masson 三色染色, 光镜下观察肺组织胶原沉积情况。

1.4.2 肺组织 HYP 水平检测: 取 30~40 mg 大鼠右肺组织, 剪碎后制成组织匀浆, 采用碱水解法检测 HYP 水平, 严格按照试剂盒说明书步骤操作。

1.4.3 实时荧光定量 PCR 技术检测肺组织 mTOR 基因表达: 取右肺组织, 研磨后加入细胞裂解液进行裂解, 提取总 RNA, 应用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度, 以 260 nm 和 280 nm 处吸光度(A)值比值(A_{260}/A_{280}) ≥ 1.80 作为合格样品。用反转录试剂盒反转录为模板单链 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。mTOR、内参引物、干扰序列及阴性对照序列均由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。PCR 反应条件: 94°C 1 min, 92°C 30 s, 58°C 30 s, 75°C 30 s, 连续进行 38 次循环, 每个样品均设置 3 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析肺组织 mTOR 基因表达量。

1.4.4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺组织 mTOR 蛋白表达: 取右肺组织, 研磨后提取总蛋白, 用 BCA 法对获得的蛋白浓度进行检测。取 30 μ g 总蛋白, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 60 min。加入一抗多克隆抗 mTOR 抗体 (稀释比例 1:800), 4°C 孵育过夜, 膜漂洗后, 加入二抗, 室温下反应 120 min, 加入电化学发光 (ECL) 化学显影液, 暗室下显影 2 min, 拍照, 应用 Image J 图像分析软件对获得的目的蛋白及内参照进行灰度值分析, 以其比值作为目的蛋白的表达量。

1.5 统计学处理: 应用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 法对计量资料进行正态性检验, 正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织病理学改变

2.1.1 HE 染色结果 (图 1): NS 对照组大鼠肺组织无明显改变, 肺泡结构完整、大小均匀。百草枯模型组和 mTOR 无关序列组 7 d 时大鼠肺泡间隔充血, 有大量炎性细胞浸润; 14 d 时肺组织结构严重破坏, 出现成纤维细胞浸润, 但炎性细胞减少, 肺泡壁及间隔明显增厚; 28 d 时肺组织破坏进一步加重, 肺泡间隔明显增厚, 成纤维细胞、胶原纤维大量浸润。mTOR-siRNA 组各时间点肺组织纤维化改变较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组明显减轻。

2.1.2 Masson 染色结果 (图 2): NS 对照组大鼠肺组织无明显改变。百草枯模型组和 mTOR 无关序列组 7 d 时肺间质周围出现大量基质胶原及纤维组织增生; 14 d 时肺间质中基质胶原明显增多, 出现纤维组织增生; 28 d 时肺间质中深蓝色基质胶原明显增加, 出现大量纤维组织增生。mTOR-siRNA 组各时间点肺组织纤维化改变较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组明显减轻。

2.2 各组大鼠肺组织 HYP 水平变化 (表 1): 百草枯模型组和 mTOR 无关序列组大鼠肺组织 HYP 水平呈时间依赖性持续升高, 且明显高于 NS 对照组相应时间点 (均 $P < 0.05$); 而 mTOR-siRNA 组各时间点 HYP 水平较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组均明显降低 (均 $P < 0.05$), 后两组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

表 1 靶向沉默 mTOR 基因对百草枯致肺纤维化大鼠不同时间点肺组织 HYP 水平变化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	HYP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		
		7 d	14 d	28 d
生理盐水对照组	6	1.11 ± 0.05	1.14 ± 0.08	1.21 ± 0.07
百草枯模型组	6	1.25 ± 0.07^a	1.29 ± 0.12^a	1.40 ± 0.05^a
mTOR 无关序列组	6	1.23 ± 0.06^a	1.27 ± 0.10^a	1.39 ± 0.04^a
mTOR-siRNA 组	6	1.13 ± 0.06^{bc}	1.19 ± 0.09^{abc}	1.28 ± 0.06^{abc}

注: mTOR 为雷帕霉素靶蛋白, HYP 为羟脯氨酸, siRNA 为小干扰 RNA; 与生理盐水对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与百草枯模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与 mTOR 无关序列组比较, ^c $P < 0.05$

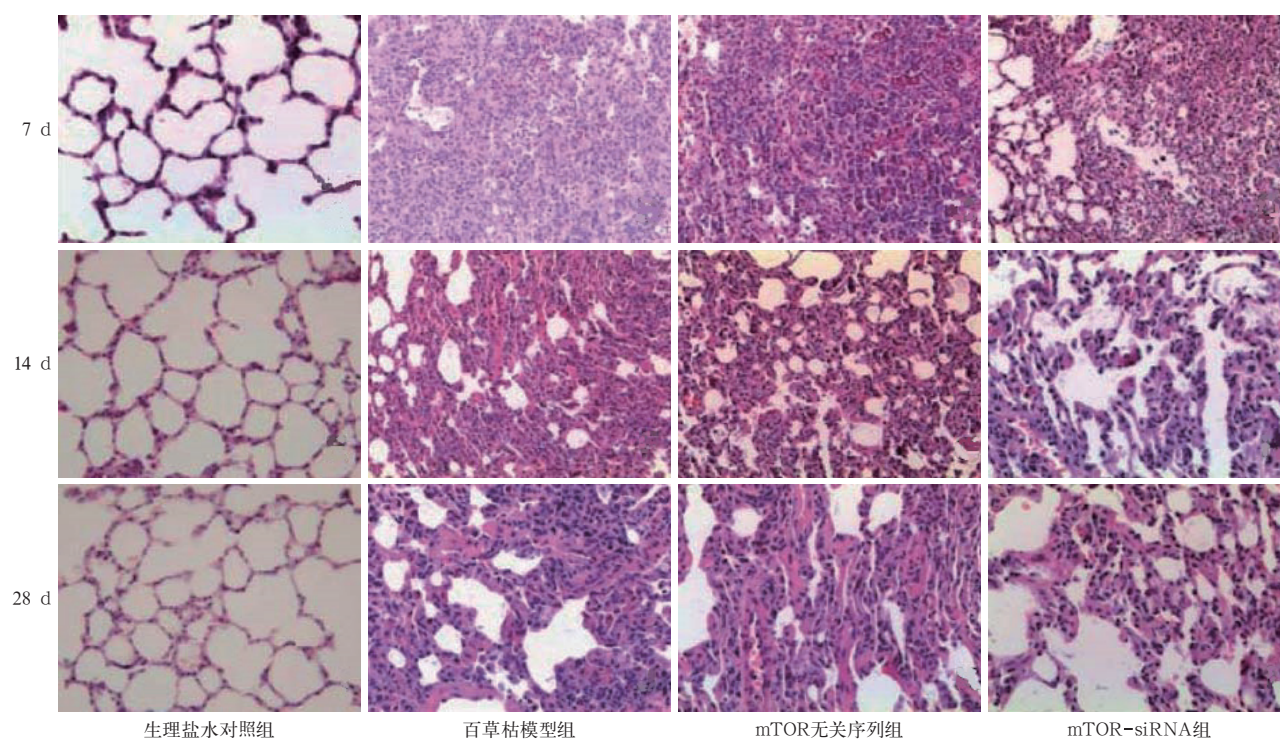


图1 光镜下观察各组大鼠不同时间点肺组织病理学改变 生理盐水对照组 7、14、28 d 大鼠肺泡结构正常,无出血、炎性细胞浸润。百草枯模型组和雷帕霉素靶蛋白(mTOR)无关序列组 7 d 时大鼠肺泡壁破坏、大小不均、结构紊乱,间质增厚,有大量白细胞和红细胞浸润;14 d 时肺泡间隔明显增厚,成纤维细胞、胶原纤维大量浸润;28 d 时肺泡结构严重破坏,肺泡壁明显增厚,出现大量纤维结缔组织。mTOR 小干扰 RNA(mTOR-siRNA)组各时间点大鼠肺组织病理学改变程度较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组明显减轻 HE 染色 高倍放大

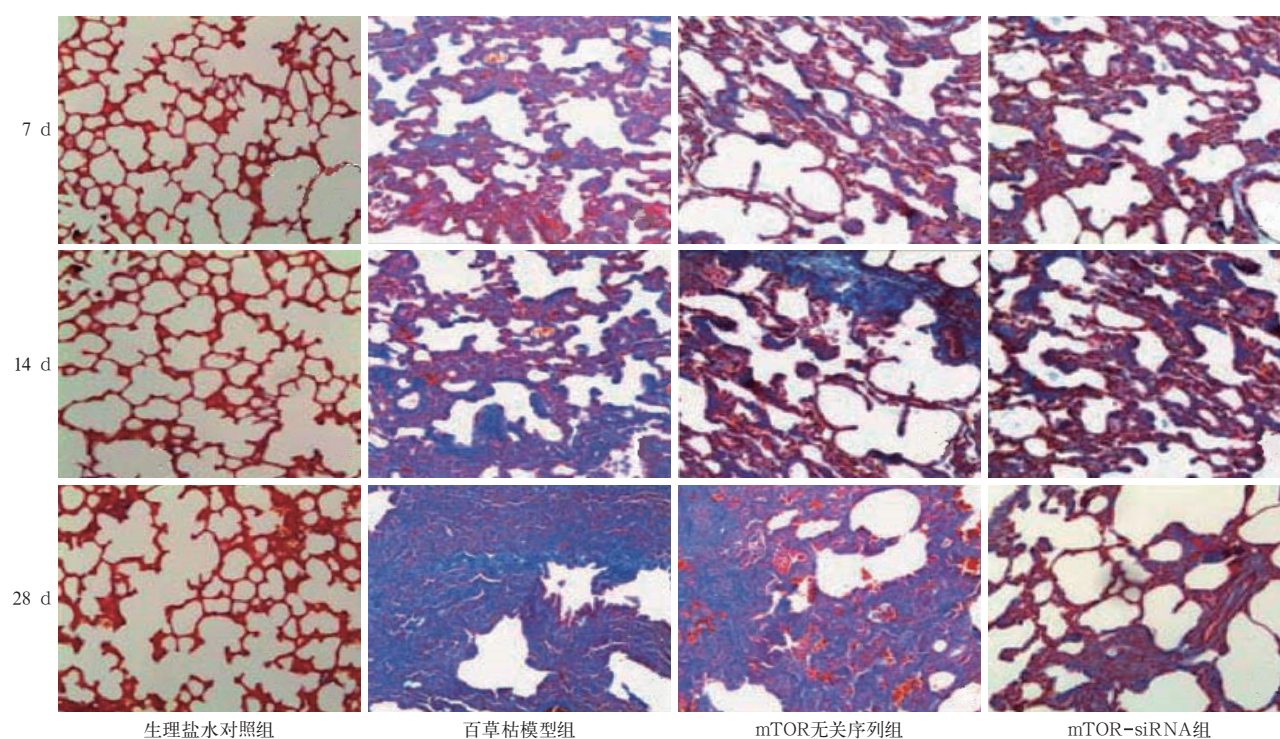


图2 光镜下观察各组大鼠不同时间点肺组织纤维化改变 生理盐水对照组 7、14、28 d 大鼠肺泡结构完整,未见明显纤维化改变。百草枯模型组和雷帕霉素靶蛋白(mTOR)无关序列组 7 d 时大鼠肺泡壁、肺泡间隔周围出现蓝染的胶原纤维;14 d 时肺间质中基质胶原显著增多,出现纤维组织增生;28 d 时肺间质中基质胶原显著增多,纤维组织增生更加明显。mTOR 小干扰 RNA(mTOR-siRNA)组各时间点大鼠肺组织纤维化程度较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组明显减轻 Masson 染色 高倍放大

2.3 各组大鼠肺组织 mTOR 基因表达水平变化 (表 2): 百草枯模型组和 mTOR 无关序列组大鼠肺组织 mTOR mRNA 表达量呈时间依赖性持续升高, 且明显高于 NS 对照组相应时间点 (均 $P < 0.05$); 而 mTOR-siRNA 组 14 d 和 28 d 时 mTOR mRNA 表达量较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组均明显降低 (均 $P < 0.05$), 后两组间无明显差异 (均 $P > 0.05$)。

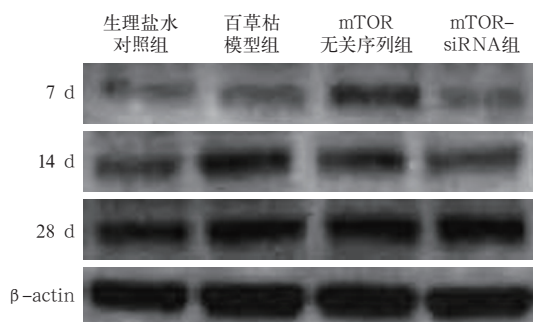
2.4 各组大鼠肺组织 mTOR 蛋白表达水平变化 (表 2; 图 3): 百草枯模型组和 mTOR 无关序列组大鼠肺组织 mTOR 蛋白表达量呈时间依赖性持续升高, 且明显高于 NS 对照组相应时间点 (均 $P < 0.05$); 而 mTOR-siRNA 组 14 d 和 28 d 时 mTOR 蛋白表达量较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组均明显降低 (均 $P < 0.05$), 后两组间无明显差异 (均 $P > 0.05$)。

表 2 靶向沉默 mTOR 基因对百草枯致肺纤维化大鼠不同时间点肺组织 mTOR mRNA 和蛋白表达变化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	mTOR mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
		7 d	14 d	28 d
生理盐水对照组	6	0.92 ± 0.09	0.93 ± 0.10	0.94 ± 0.08
百草枯模型组	6	1.89 ± 0.11 ^a	1.94 ± 0.12 ^a	2.85 ± 0.15 ^a
mTOR 无关序列组	6	1.92 ± 0.13 ^a	1.95 ± 0.14 ^a	2.87 ± 0.17 ^a
mTOR-siRNA 组	6	0.94 ± 0.10	0.99 ± 0.11 ^{abc}	1.15 ± 0.13 ^{abc}

组别	动物数 (只)	mTOR 蛋白 (灰度值)		
		7 d	14 d	28 d
生理盐水对照组	6	0.28 ± 0.07	0.34 ± 0.06	0.38 ± 0.09
百草枯模型组	6	0.51 ± 0.08 ^a	0.75 ± 0.09 ^a	0.86 ± 0.12 ^a
mTOR 无关序列组	6	0.50 ± 0.06 ^a	0.77 ± 0.11 ^a	0.88 ± 0.14 ^a
mTOR-siRNA 组	6	0.30 ± 0.09	0.39 ± 0.08 ^{abc}	0.45 ± 0.10 ^{abc}

注: mTOR 为雷帕霉素靶蛋白, siRNA 为小干扰 RNA; 与生理盐水对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与百草枯模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与 mTOR 无关序列组比较, ^c $P < 0.05$



mTOR 为雷帕霉素靶蛋白, siRNA 为小干扰 RNA,
β-actin 为 β-肌动蛋白

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组大鼠不同时间点肺组织 mTOR 蛋白表达

3 讨论

百草枯对人体毒性极大, 可通过呼吸道、皮肤、消化道进入人体而对机体组织器官造成不同程度的

损害。目前对百草枯的诊断和预后判定尚无特异性指标, 有研究表明, 百草枯中毒可诱导患者体内基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 基因表达, 对预后具有预测价值^[11]。肺组织是百草枯损伤的主要靶器官, 早期以炎症反应为主, 肺组织发生炎症反应时, 可导致急性肺损伤 (ALI)^[12], 表现为肺间质、肺泡有大量中性粒细胞、巨噬细胞浸润, 肺间质增厚^[13], 随后发生成纤维细胞、胶原纤维逐渐浸润, 导致肺纤维化^[14]。本研究在构建百草枯致肺纤维化模型时, 参考有关文献报道的结果^[15-16], 采用腹腔注射 20% 百草枯溶液 15 mg/kg 的方法建立百草枯中毒大鼠模型。肺组织病理学观察结果显示, 腹腔注射后前 7 d 是肺组织炎症反应期; 7 ~ 14 d 炎症逐渐消失而纤维化逐渐形成, 这也解释了大鼠 14 d 时症状有所减轻的原因; 14 ~ 28 d 则是纤维化逐渐加重和稳定期, 符合百草枯中毒动态变化过程。同时, 作为反映胶原含量变化及间接反映纤维化的指标 HYP^[17], 其变化亦随时间延长呈动态增加的趋势, 表明采用 20% 百草枯溶液 15 mg/kg 腹腔注射可稳定构建百草枯致肺纤维化大鼠模型。

目前, 百草枯导致肺组织纤维化的机制尚未完全清楚, 炎症反应、氧化应激、钙超载、肺泡细胞凋亡及间质转化、基质相关蛋白酶失衡等均可能参与了百草枯导致肺组织纤维化的过程^[18]。mTOR 作为非典型丝/苏氨酸蛋白激酶, 是磷酸肌醇-3 激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 (PI3K/AKT) 信号通路下游关键性效应蛋白, 在调控细胞增殖、凋亡、血管生成等生物学功能中发挥重要作用^[19]; 同时, 与癌症发生及纤维化性疾病发生关系密切^[20]。有研究表明, 雷帕霉素可通过抑制 mTOR 信号通路而阻止肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 诱导的大鼠肺组织纤维化^[21]。亦有研究表明, mTOR 信号通路抑制剂西罗莫司可拮抗博来霉素诱导的大鼠肺组织纤维化^[22]。本研究结果显示, 百草枯模型组大鼠肺组织 mTOR 蛋白和基因表达量均随染毒时间延长而逐渐升高, 且与肺组织病理学改变和 HYP 水平的变化趋势一致, 说明 mTOR 可能参与了百草枯致肺组织纤维化的过程。

本研究利用小分子干扰技术特异性沉默 mTOR 基因, 借助慢病毒载体, 特异性沉默百草枯中毒大鼠肺组织中 mTOR 基因表达, 结果显示, mTOR-siRNA 组大鼠肺组织中 mTOR 基因和蛋白表达量均明显低于百草枯模型组和 mTOR 无关序列组, 说明腹腔

注射携带有 mTOR-siRNA 基因的慢病毒可抑制小鼠肺组织 mTOR 基因表达。本研究病理学观察结果显示, mTOR-siRNA 组大鼠肺组织 7、14、28 d 时炎性细胞、成纤维细胞及胶原细胞浸润情况均较百草枯模型组和 mTOR 无关序列组明显减轻,说明下调 mTOR 基因表达可以减轻百草枯所致肺损伤及肺组织纤维化。

综上所述,采用小分子干扰和慢病毒感染技术特异性沉默 mTOR 基因,可有效抑制百草枯中毒大鼠肺组织 mTOR 表达,减轻百草枯所致肺组织损伤,改善肺组织纤维化程度,有望为百草枯致肺组织纤维化基因治疗提供新的靶位。

参考文献

- [1] 周登川, 凌祥, 周承藩, 等. 急性百草枯中毒患者病情及预后评价指标的研究进展 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2016, 34 (5): 393-395. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2016.05.027.
- [2] 王金柱, 孙仁华, 李莉, 等. 压力控制法与呼气末正压递增法肺复张对百草枯致急性肺损伤家猪血流动力学的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (10): 906-910. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.009.
- [3] Wang JZ, Sun RH, Li L, et al. Effects of pressure control and positive end-expiratory pressure incremental method lung recruitment maneuvers on haemodynamics in piglets with acute lung injury induced by paraquat [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (10): 906-910. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.009.
- [4] Sun B, Chen YG. Advances in the mechanism of paraquat-induced pulmonary injury [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20 (8): 1597-1602.
- [5] Pal B, Endisha H, Zhang Y, et al. mTOR: a potential therapeutic target in osteoarthritis? [J]. Drugs R D, 2015, 15 (1): 27-36. DOI: 10.1007/s40268-015-0082-z.
- [6] Ai F, Chen M, Yu B, et al. Berberine regulates proliferation, collagen synthesis and cytokine secretion of cardiac fibroblasts via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (10): 12509-12516.
- [7] 陈国纯, 刘虹, 王畅, 等. mTOR 通路调控肾间质成纤维细胞活化的机制 [J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28 (3): 226-231. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.03.014.
- [8] Chen GC, Liu H, Wang C, et al. Role of mTOR signaling in the activation of renal interstitial fibroblasts [J]. Chin J Nephrol, 2012, 28 (3): 226-231. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.03.014.
- [9] 吴长会, 沈敏, 李龙, 等. PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 信号通路在肝纤维化发生发展中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31 (11): 1928-1932. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.11.043.
- [10] Wu CH, Shen M, Li L, et al. Association between PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway and hepatic fibrosis [J]. J Chin Hepatol, 2015, 31 (11): 1928-1932. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.11.043.
- [11] 董洪亮, 刘乃国, 苗双, 等. 1, 25-(OH)₂D₃ 对肺纤维化大鼠肺泡 II 型上皮细胞中 Ca²⁺ 浓度和 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响 [J]. 医学研究生学报, 2016, 29 (10): 1040-1045. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2016.10.007.
- [12] Dong HL, Liu NG, Miao S, et al. Effects of 1, 25-(OH)₂D₃ on Ca²⁺ concentration and PI3K/AKT/mTOR pathway in type II alveolar epithelial cells of rat with pulmonary fibrosis [J]. J Med Postgrad, 2016, 29 (10): 1040-1045. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2016.10.007.
- [13] Lee SK, Ameno K, In SW, et al. Levels of paraquat in fatal intoxications [J]. Int J Legal Med, 1999, 112 (3): 198-200.
- [14] 苏艺伟, 朱伟, 韦拔雄, 等. 慢病毒介导 shRNA 干扰结缔组织生长因子表达对百草枯致肺纤维化的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2015, 33 (5): 359-362. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2015.05.013.
- [15] Su YW, Zhu W, Wei BX, et al. Effects of lentivirus-mediated shRNA interference on expression of connective tissue growth factor on pulmonary fibrosis induced by paraquat [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2015, 33 (5): 359-362. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2015.05.013.
- [16] 刘景艳, 郭玉娟, 宋永站, 等. 基质金属蛋白酶-9 对百草枯中毒患者预后的预测价值 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2017, 24 (2): 147-150. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.02.010.
- [17] Liu JY, Guo YJ, Song YZ, et al. The predictive value of matrix metalloproteinase-9 for prognosis of patients with paraquat poisoning [J]. Chin J of TCW WM Critical Care, 2017, 24 (2): 147-150. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.02.010.
- [18] 龚艳杰, 魏明, 涂玲, 等. 输血相关急性肺损伤对大鼠血浆和肺组织血管生成素-2 表达的影响 [J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8 (3): 175-180. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.015.
- [19] Gong YJ, Wei M, Tu L, et al. Expression of angiopoietin-2 in plasma and lung tissue of rats with transfusion-related acute lung injury [J]. Chin J Clin Pathol, 2016, 8 (3): 175-180. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.015.
- [20] 秦科, 邝晓聪, 孙煦勇, 等. 免疫抑制小鼠急性重症肺部感染中巨噬细胞亚型变化与乌司他丁调控效应 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4 (1): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.009.
- [21] Qin K, Kuang XC, Sun XY, et al. Alterations of macrophage subsets and the regulation of ulinastatin in the immunosuppressed mouse with severe pulmonary infection [J/CD]. Pract J Organ Transplant (Electron Version), 2016, 4 (1): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.009.
- [22] 陈锋, 熊伟, 赵煜. 圆盘状受体 1 在百草枯致肺纤维化中的表达 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (10): 891-895. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.006.
- [23] Chen F, Xiong W, Zhao Y. Expression of discoidin domain receptor 1 in the rat with pulmonary fibrosis induced by acute paraquat poisoning [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (10): 891-895. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.006.
- [24] Xiao ZW, Zhang W, Ma L, et al. Therapeutic effect of magnesium isoglycyrrhizinate in rats on lung injury induced by paraquat poisoning [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18 (3): 311-320.
- [25] Rao SS, Zhang XY, Shi MJ, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis by preventing Smad7 from deacetylation in rats [J]. J Thorac Dis, 2016, 8 (9): 2485-2494. DOI: 10.21037/jtd.2016.08.08.
- [26] Li L, Li D, Xu L, et al. Total extract of Yupingfeng attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Phytomedicine, 2015, 22 (1): 111-119. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.10.011.
- [27] 高峰, 余金花, 卫培峰. 活性炭加灶土土对急性百草枯中毒大鼠肺损伤治疗作用的机制研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (6): 581-584. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.06.006.
- [28] Gao F, Yu JH, Wei PF. A mechanism study on activated carbon with addition of furnace soil for treatment of rats with pulmonary injury caused by acute paraquat intoxication [J]. Chin J of TCM WM Crit Care, 2016, 23 (6): 581-584. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.06.006.
- [29] Pernice HF, Schieweck R, Kiebler MA, et al. mTOR and MAPK: from localized translation control to epileptogenesis [J]. BMC Neurosci, 2016, 17 (1): 73. DOI: 10.1186/s12868-016-0308-1.
- [30] 王芸, 李庆淑, 贾超, 等. 慢病毒介导的 BAG-1L 基因对缺氧状态下人神经母细胞瘤细胞的保护作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (3): 239-243. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.009.
- [31] Wang Y, Li QS, Jia C, et al. Protective effect of BAG-1L mediated by lentivirus in human neuroblastoma cells induced by hypoxia [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (3): 239-243. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.009.
- [32] Schramm C, Fine DM, Edwards MA, et al. The PTPN11 loss-of-function mutation Q510E-Shp2 causes hypertrophic cardiomyopathy by dysregulating mTOR signaling [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302 (1): H231-243. DOI: 10.1152/ajpheart.00665.2011.
- [33] Shao X, Li M, Luo C, et al. Effects of rapamycin against paraquat-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16 (1): 52-61. DOI: 10.1631/jzus.B1400229.

(收稿日期: 2017-03-09)