

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.07.018

论著·实验研究

雷帕霉素逆转大鼠肺动脉高压的作用机制研究

余莉^{1,2} 范志宇³ 谢亮² 李春雨⁴ 秦超毅⁴ 刘丽筠² 刘瀚旻^{1,2}

(四川大学华西第二医院 1. 儿科心血管科;
2. 西部妇女儿童医学研究院肺血管重构研究室, 四川 成都 610041;
3. 新加坡陈笃生医院普通内科, 新加坡 308433;
4. 四川大学华西临床医学院, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨雷帕霉素(RAP)对大鼠肺动脉高压的作用,为临床药物治疗肺动脉高压的选择提供新思路。**方法** 将健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 50 只随机分为空白对照组、模型组、溶剂对照组、RAP 干预 1 组(术后 5 d 开始干预)和 RAP 干预 2 组(术后 35 d 开始干预)。左肺切除(PE)联合野百合碱(MCT)诱导肺动脉高压大鼠模型;造模后 5 d 分别给予溶剂对照组溶媒和 RAP 干预 1 组 RAP 肌肉注射;造模后 35 d 给予 RAP 干预 2 组 RAP 肌肉注射。测定各组平均肺动脉压(mPAP)和 RV/(LV+S)比值。苏木精-伊红染色观察各组右肺组织病理学改变。Real-time PCR 测定各组平滑肌 α 肌动蛋白(α -SMA)及平滑肌 22 α 蛋白(SM22 α) mRNA 的相对表达量。**结果** 模型组及溶剂对照组大鼠术后 35 d mPAP 明显高于空白对照组, RAP 干预 1 组及 RAP 干预 2 组大鼠的 mPAP 明显低于溶剂对照组($P<0.05$);模型组及溶剂对照组大鼠 RV/(LV+S)明显高于空白对照组, RAP 干预 1 组大鼠 RV/(LV+S)低于溶剂对照组($P<0.05$),而 RAP 干预 2 组大鼠 RV/(LV+S)与溶剂对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);右肺病理组织学 HE 染色可见模型组及溶剂对照组的肺动脉壁较空白对照组明显增厚,管腔狭窄, RAP 干预后可见增厚肺动脉壁有不同程度逆转; Real-time PCR 结果显示,模型组及溶剂对照组 SM22 α 及 α -SMA 基因相对表达量明显低于空白对照组, RAP 干预 1 组及 RAP 干预 2 组的 SM22 α 及 α -SMA 相对表达量高于溶剂对照组($P<0.05$)。**结论** RAP 可逆转肺动脉压力的升高及右心室肥厚程度,其作用机制可能为通过调节血管平滑肌细胞表型转换而实现。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(7): 731-735]

[关键词] 雷帕霉素;肺动脉高压;大鼠

Mechanisms for reversal of pulmonary hypertension by rapamycin in rats

YU Li, FAN Zhi-Yu, XIE Liang, LI Chun-Yu, QIN Chao-Yi, LIU Li-Jun, LIU Han-Min. Department of Pediatric Cardiology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Liu H-M, Email: myuxuan@163.net)

Abstract: Objective To investigate the effects of rapamycin (RAP) on pulmonary hypertension (PH) in rats, and to provide new insights into medication selection for the clinical treatment of PH. **Methods** Fifty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank control, PH model, solvent control, RAP 1, and RAP 2 groups. A rat model of PH was induced by left pneumonectomy (PE) and monocrotaline (MCT). At 5 days after PH model establishment, the solvent control group and the RAP 1 group received an intramuscular injection of solvent and RAP, respectively. At 35 days after PH model establishment, the RAP 2 group received an intramuscular injection of RAP. The mean pulmonary artery pressure (mPAP) and the right ventricle/left ventricle plus septum weight ratio (RV/LV+S) were measured in each group. Histopathological changes in the right lung were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. The relative expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and smooth muscle protein 22-alpha (SM22 α) in each group was determined using real-time PCR. **Results** At 35 days after surgery, the PH model and the solvent control groups had

[收稿日期] 2015-01-29; [接受日期] 2015-04-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81370220);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(博导类,20130181110056)。

[作者简介] 余莉,女,博士,主治医师。

[通信作者] 刘瀚旻,男,教授。

significantly higher mPAP and RV/LV+S than the blank control group, while the RAP 1 and the RAP 2 groups had significantly lower mPAP than the solvent control group ($P<0.05$). The RV/LV+S in the RAP 1 group was significantly lower than that in the solvent control group ($P<0.05$); however, there was no significant difference in RV/LV+S between the RAP 2 and the solvent control groups ($P>0.05$). HE staining in the right lung showed the substantially thickened pulmonary artery wall and narrowed arterial lumen in the PH model and the solvent control groups compared with the blank control group. Different degrees of reversal of the pulmonary artery wall thickening were observed after RAP administration. The results of real-time PCR revealed that the relative expression of α -SMA and SM22 α in the PH model and the solvent control groups was significantly lower than in the blank control group, while the relative expression of α -SMA and SM22 α in the RAP 1 and the RAP 2 groups was significantly higher than in the solvent control group ($P<0.05$).

Conclusions RAP can reverse the increase in pulmonary artery pressure and the right ventricular hypertrophy probably by regulation of the phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(7): 731-735]

Key words: Rapamycin; Pulmonary hypertension; Rats

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一组以肺血管阻力进行性增高为主要特征的临床病理表现^[1], 治疗手段有限, 各种对症药物治疗不理想, 预后差。雷帕霉素 (rapamycin, RAP) 是由链球菌属产生的一种大环内酯内抗免疫抗生素, 对多种类型细胞有免疫抑制作用和抗增殖作用, 是哺乳动物 RAP 靶体 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的特异性抑制剂, 而 mTOR 信号通路广泛参与细胞的生长、分化、增殖和衰老等生命活动^[2]。RAP 在临床上常被应用于抑制移植术后 T 淋巴细胞的增殖^[3]、肿瘤^[4]及冠状动脉支架植入后平滑肌细胞增殖所致的局部狭窄^[5], 研究证实 RAP 有抑制细胞增殖的作用。现有的研究表明重度 PH 所致的肺血管病变与肿瘤有相似的病理学表现, 即细胞失控性增殖^[6-7], 而 RAP 有抑制肿瘤细胞增殖的作用, 由此推测 RAP 可能有抑制肺血管平滑肌细胞增殖的作用, 该药物有应用于临床治疗 PH 的潜在可能性, 因此本文对 RAP 是否能影响大鼠 PH 及对肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscular cell, PASMC) 的作用进行探讨, 为临床药物治疗 PH 的可能性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 大鼠 PH 动物模型建立

50 只体重为 250~350 g 的健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购于四川大学实验动物中心, 随机分为空白对照组 (不做任何处理)、模型组、溶剂对照组、RAP 干预 1 组和 RAP 干预 2 组, 每组 10 只。参照刘斌等^[8]报道建立左肺动脉切除术 (pneumonectomy, PE) 联合野百合碱 (monocrotaline, MCT) 诱导的 PH 大鼠模型。SD 大鼠在腹腔注射

水合氯醛麻醉下行左肺 PE 术, 模型组于 PE 术后 7 d 在项背部皮下注射 MCT 1 次 (60 mg/kg); 溶剂对照组和 RAP 干预 1 组均于 PE 术后 5 d (MCT 皮下注射前 2 d) 开始, 分别给予 RAP 空白溶媒 (二甲基亚砜) 肌肉注射 (每日 1 次, 每次 1 mL/kg) 和 RAP 肌肉注射 (每日 1 次, 每次 5 mg/kg), 连续注射 30 d; RAP 干预 2 组于 PE 术后 35 d (MCT 皮下注射后 28 d) 开始, 给予 RAP 肌肉注射 (每日 1 次, 每次 5 mg/kg), 连续注射 14 d。

1.2 平均肺动脉压力的测定

除 RAP 干预 2 组于 PE 术后 49 d 测定平均肺动脉压 (mean pulmonary artery pressure, mPAP), 其余组均于 PE 术后 35 d 测定 mPAP。给予大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (400 mg/kg) 麻醉后, 经颈外静脉插管, 连接测压装置至 BIOPAC MP-150 十六导生理记录仪测定并记录 mPAP。

1.3 右心室肥厚程度指标

脱颈椎处死实验动物, 游离右心室 (right ventricular, RV)、左心室加室间隔 (left ventricular and septal, LV+S), 称重, 计算 RV/(LV+S) 比值, 反映右心室肥厚程度。

1.4 肺动脉组织病理学观察

处死动物后取出右肺组织, 冲洗, 10% 中性甲醛固定 48 h, 常规石蜡包埋、切片, 行苏木精-伊红 (HE) 染色。在 200 倍光镜下观察切片。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应

取右肺组织, 制成组织匀浆, 提取 RNA 并逆转录为 cDNA。参照 GenBank 基因数据库, 运用 Beacon designer2 软件分别设计平滑肌 α 肌动蛋白 (α smooth muscle actin, α -SMA)、平滑肌 22 α 蛋白 (smooth muscle 22 Alpha, SM22 α) 和内参 GAPDH 的 PCR 扩增引物序列, 分别为 SM22 α 上

游: 5'-AGACTGACATGTTCCAGACT-3', SM22 α 下游: 5'-GCTTTCTTCATAAACCCAGTTG-3', 片段长度 145 bp; α -SMA 上游: 5'-AGAACCACAGGCATTG-TTCT-3', α -SMA 下游: 5'-CGCTCAGTGAGGTCTT-CAT-3', 片段长度 149 bp; GAPDH 上游: 5'-AAGCTCATTTCTGCTGATGACA-3', GAPDH 下游: 5'-TCTTACTCCTTGGAGGCCATGT-3', 片段长度 114 bp。反应体系 (10 μ L): Mix 5 μ L, cDNA 1 μ L, 上下游引物各 0.1 μ L, ddH₂O 3.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。PCR 反应在 FTC2000 型荧光定量 PCR 仪上进行, 实时测定 PCR 荧光强度并确定扩增循环数 (Ct 值), 并换算为基因相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血流动力学改变

5 组大鼠 mPAP 比较差异有统计学意义 ($F=46.191, P < 0.01$)。模型组 (49.2 ± 6.1 mm Hg) 及溶剂对照组 mPAP (48.6 ± 7.0 mm Hg) 明显高于空白对照组 (31.1 ± 2.4 mm Hg) ($P < 0.01$), RAP 干预 1 组 (25.1 ± 2.1 mm Hg) 及 RAP 干预 2 组 (27.8 ± 4.2 mm Hg) mPAP 明显低于溶剂对照组 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 右心室肥厚程度比较

5 组大鼠 RV/(LV+S) 比较差异有统计学意义 ($F=678.845, P < 0.01$)。模型组及溶剂对照组 RV/(LV+S) 明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), RAP 干预 1 组 RV/(LV+S) 低于溶剂对照组 ($P < 0.01$), 而 RAP 干预 2 组 RV/(LV+S) 与溶剂对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.899$)。见图 2。

2.3 各组大鼠肺动脉病理组织学改变

右肺病理组织 HE 染色可见, 模型组及溶剂对照组的肺动脉壁较空白对照组明显增厚, 管腔狭窄, RAP 干预后可见增厚的肺动脉壁有不同程度逆转。见图 3。

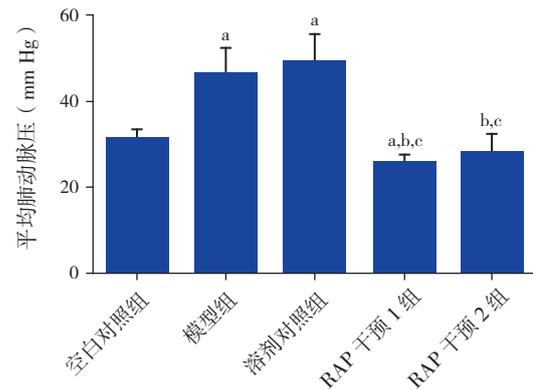


图 1 各组大鼠 mPAP 比较结果 a 示与空白对照组比较, $P < 0.05$; b 示与模型组比较, $P < 0.05$; c 示与溶剂对照组比较, $P < 0.05$ 。

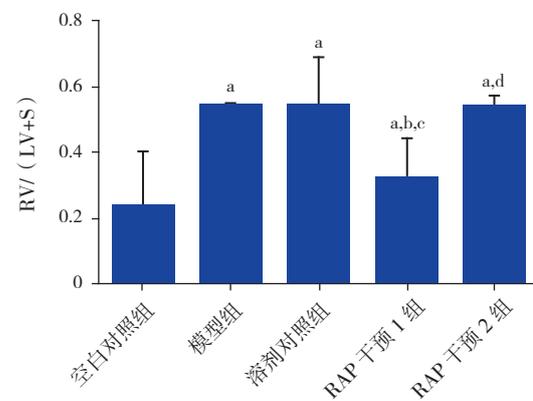


图 2 各组大鼠 RV/(LV+S) 比较结果 a 示与空白对照组比较, $P < 0.05$; b 示与模型组比较, $P < 0.05$; c 示与溶剂对照组比较, $P < 0.05$; d 示与 RAP 干预 1 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠 SM22 α 和 α -SMA mRNA 表达改变

5 组大鼠 SM22 α mRNA 相对表达差异有统计学意义 ($F=22.195, P < 0.01$)。模型组及溶剂对照组的 SM22 α mRNA 相对表达量低于空白对照组 (均 $P < 0.01$), RAP 干预 1 组的 SM22 α mRNA 相对表达量高于溶剂对照组 ($P < 0.01$), RAP 干预 2 组的 SM22 α mRNA 相对表达量与溶剂对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.059$)。5 组大鼠 α -SMA mRNA 相对表达差异有统计学意义 ($F=8.717, P < 0.01$)。模型组及溶剂对照组的 α -SMA mRNA 相对表达量低于空白对照组 (均 $P < 0.01$), RAP 干预 1 组的 α -SMA mRNA 相对表达量高于溶剂对照组 ($P=0.005$), RAP 干预 2 组的 α -SMA mRNA 相对表达量与溶剂对照组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.172$)。见图 4。

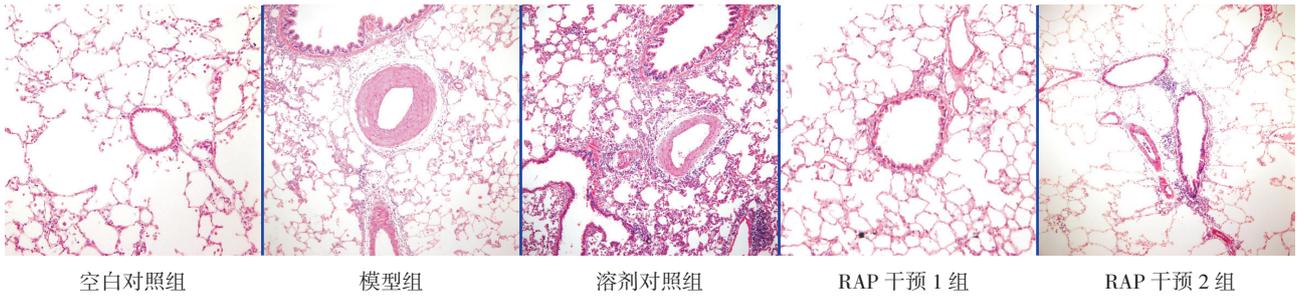


图3 右肺组织病理学 HE 染色结果 (×200) 空白对照组显示正常肺动脉。模型组可见肺动脉壁明显增厚, 细胞增多, 管腔狭窄。溶剂对照组肺组织病理改变与模型组相似。RAP 干预 1 组及 RAP 干预 2 组与模型组和溶剂对照组比较, 肺动脉壁变薄, 管腔扩大, RAP 干预 2 组变化程度小于 RAP 干预 1 组。

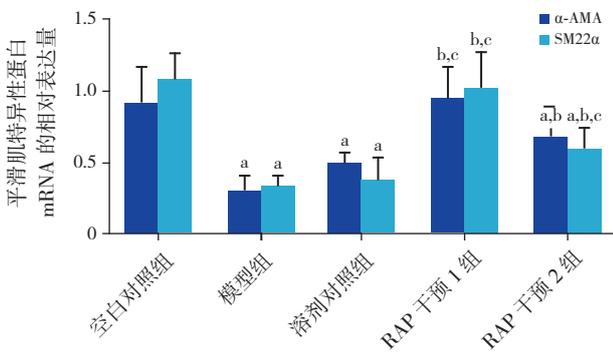


图4 各组间 α -SMA 及 SM22 α mRNA 相对表达量比较结果 a 示与空白对照组比较, $P < 0.05$; b 示与模型组比较, $P < 0.05$; c 示与溶剂对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

PH 是一组由肺血管平滑肌细胞增殖、新生内膜形成、细胞外基质增多而导致进行性增高的肺动脉压力及阻力为主要临床特点的综合征, 其发病机制复杂, 迄今为止仍不十分清楚, 故临床治疗多以对症为主, 目的是扩张肺血管, 防止血栓形成, 减轻右心后负荷, 改善症状及生活质量, 但效果均不理想^[9-11]。因而对 PH 发病机制的研究及相应针对性药物的甄选一直是心血管领域研究的重点。

本研究应用左肺切除术联合野百合碱注射成功建立大鼠 PH 模型, 模型组术后 35 d mPAP 明显高于空白对照组, 同时伴有右心室肥厚, RV(LV+S) 比值明显增高, 且病理组织学结果显示肺动脉壁细胞及基质成分增加, 管壁增厚, 管腔狭窄, 符合 PH 的病理改变^[12]。本研究采用了两种 RAP 干预方式, 即早期干预 (PH 形成前) 和晚期干预 (PH 形成后), 两种方式均能不同程度地减轻肺动脉

压力及肺血管壁的厚度。但早期 RAP 干预能使右心室肥厚程度减轻, 而晚期干预则不能, 推测其原因为早期干预可以减缓肺动脉压力和右心室后负荷的增加速度, 故心肌细胞肥厚程度较轻, 而晚期干预时肺动脉压力已经明显升高, 右心室肥厚已形成, 予 RAP 后虽能在一定程度上降低肺动脉压力, 但并不能逆转已经肥厚的心肌细胞。

RAP 能特异性抑制哺乳动物 mTOR^[13], mTOR 是一类非典型丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 属于磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 家族^[14], 它通过细胞内两种 mTORC 复合物 (mTORC1 和 mTORC2) 而调控 mTOR 信号通路。研究表明, 生长因子可以通过上调 PI3K-Akt 及 Ras/ERK (extracellular signal-regulated kinase) 信号通路途径激活 mTORC1, 促进蛋白质合成及细胞增殖^[15]。mTORC2 也能通过 PI3K 依赖的方式被生长因子激活^[16], 通过 PKCa 及 RhoGTPases 信号途径调控细胞的代谢、增殖及细胞骨架等生命活动^[17-18]。雷帕霉素可能通过抑制 mTOR 信号通路, 下调 PI3K 信号途径, 从而抑制细胞的增殖。

平滑肌 α 肌动蛋白 (α -SMA) 和平滑肌 22 α 蛋白 (SM 22 α) 是特异性平滑肌表达蛋白, 在收缩表型中呈高表达, 在合成表型中则呈低表达^[19-20], 合成表型的 PSMC 表现出增殖活性。本课题组前期研究证实 PI3K 信号可通过微丝解聚机制诱导 PSMC 由收缩表型向合成表型转换, 促进 PSMC 的增殖和 PH 形成^[21]。本研究发现, 模型组中 α -SMA 及 SM 22 α 两种基因表达量明显下降, 与这两种蛋白在 PAH 病理状态下的合成表型 PSMC 中的表达一致^[22]。RAP 干预后以上两个基因表达量有不同程度恢复, 提示 RAP 在减轻 PH 的过程中伴有 PSMC 表型的转化, 具有调节 PSMC 表型转化的

作用,推测RAP可能通过调节PI3K家族的mTOR信号通路而调控PASMC的增殖。

本研究使用了两种RAP干预方案,发现两种方案均能使mPAP明显下降,肺动脉壁厚度减轻。早期RAP干预可使 α -SMA及SM22 α 两种基因表达量上调,PASMC向收缩表型转化,而晚期干预的结果显示不能促使细胞发生表型转化,推测原因可能为:(1)晚期干预时间较短(14d),尚未能观察到细胞蛋白合成的变化。(2)当肺血管重构进展至较晚阶段后,RAP对PH的抑制作用并不仅仅依赖于调节细胞表型的转化,可能存在其他作用机制。

综上所述,本研究结果提示雷帕霉素能减缓或逆转由左肺切除术联合野百合碱诱导的大鼠PH,其作用机制可能是通过调节PASMC的表型转化,抑制PASMC的增殖实现的,对于较晚期PH的改善可能还存在其他调节机制。雷帕霉素可作为临床治疗PH的候选药物之一,其具体作用机制有待更深入的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(25 Suppl): D34-D41.
- [2] Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: One drug, many effects[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(3): 373-379.
- [3] Rao RD, Buckner JC, Sarkaria JN. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors as anti-cancer agents[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(8): 621-635.
- [4] Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, et al. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(2): 195-199.
- [5] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(23): 1773-1780.
- [6] Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 37-51.
- [7] McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1479-1491.
- [8] 刘斌,王献民,魏丽,等. 4种肺动脉高压动物模型肺血管重构模式的差异研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(2): 289-293.
- [9] Rosenblum WD. Pulmonary arterial hypertension: pathobiology, diagnosis, treatment, and emerging therapies[J]. *Cardiol Rev*, 2010, 18(2): 58-63.
- [10] 虞燕萍,黄先玫. 儿童肺动脉高压的药物治疗进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(3): 236-240.
- [11] Rao RD, Buckner JC, Sarkaria JN. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors as anti-cancer agents[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(8): 621-635.
- [12] Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2002, 45(3): 173-302.
- [13] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [14] Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(1): 49-54.
- [15] Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(5): 307-318.
- [16] Laplante M, Sabatini DM. Mtor signaling at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(pt 20): 3589-3594.
- [17] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of akt/pkb by the rictor-mTOR complex[J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-1101.
- [18] Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, et al. Ablation in mice of the mTORC components rictor, rictor, or mlst8 reveals that mTORC2 is required for signaling to akt-foxo and pdkalpha, but not s6k1[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(6): 859-871.
- [19] Han M, Dong LH, Zheng B, et al. Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling[J]. *Life Sci*, 2009, 84(13-14): 394-401.
- [20] Fan Z, Li C, Qin C, et al. Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscle cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(1): 12-19.
- [21] Rensen SS, Doevendans PA, Van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotype diversity[J]. *Neth Heart J*, 2007, 315(3): 100-108.
- [22] Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(8): 443-455.

(本文编辑:周勇)