心脏骨·呼吸疾病 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000891

磷酸酰肌醇 -3 激酶 γ 抑制剂 AS605240 对治疗呼吸机相关性肺损伤大鼠的影响

王红鸾[1],汪 俊[2],郭韶梅[2],蔡金莲[2],付 强[2],喻 杰[2],李秋根[2]
(1. 南昌大学研究生院,南昌 3300062;2. 江西省人民医院二部呼吸内科,南昌 330006)

【摘 要】**目的**:建立呼吸机相关性肺损伤(ventilator associated lung injury,VALI)大鼠模型,了解磷酸酰肌醇-3 激酶 γ(phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase gamma,PI3Kγ)小分子抑制剂 AS605240 对其的影响,探讨可能的作用机制。**方法**:将 30 只 SD 大鼠随机均分为 3 组:对照组、VALI 模型组和 AS605240 处理组。对照组不作机械通气处理;VALI 模型组行大潮气量(40 ml/kg)机械通气;AS605240 处理组,机械通气前 10 min 静脉预注 AS605240 20 mg/kg。大鼠机械通气 4 h 后放血处死,计算肺湿干重(W/D)比值。收集肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid,BALF),测定其总蛋白含量并行白细胞(WBC)计数。采用酶联免疫吸附法测定血清肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素(interleukin,IL)-6、IL-8 及 IL-10 的细胞因子浓度,比色法测定血清和 BALF 中超氧化物歧化酶(superoxide dismu-tase,SOD)活性及丙二醛(methane dicarboxylic aldehyde,MDA)浓度。**结果**:(1)与对照组相比,AS605240 处理组与 VALI 模型组其 W/D、WBC 计数、总蛋白含量均升高(均 $P<0.05$);AS605240 处理组与 VALI 模型组相比,AS605240 组 W/D、WBC 计数、TP 含量均降低(均 $P<0.05$)。(2)与对照组相比,AS605240 处理组与 VALI 模型组大鼠 BALF 和血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 水平和 MDA 活性均明显升高、而 IL-10 和 SOD 浓度则明显降低(均 $P<0.05$)。与 VALI 模型组相比,AS605240 组 BALF 及血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 和 MDA 活性降低,IL-10 和 SOD 浓度增高(均 $P<0.05$)。**结论**:AS605240 能够有效防治 VALI,其机制可能与抑制各种炎性因子、抑制肺部微循环通透性的增加及减少内脂质过氧化等有关。

【关键词】磷酸酰肌醇-3 激酶 γ;呼吸机相关性肺损伤;炎性细胞因子;氧自由基
【中图分类号】R563.9 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-07-10

Intervention effect of PI3Kγ inhibitor AS605240 on ventilator associated lung injury in rats

Wang Hongluan[1], *Wang Jun*[2], *Guo Shaomei*[2], *Cai Jinglian*[2], *Fu Qiang*[2], *Yu Jie*[2], *Li Qiugen*[2]
(*1. Graduate School of Nanchang University; 2. Department of Respiratory, the Second Division, Jiangxi Provincial People's Hospital*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of PI3Kγ inhibitor AS605240 pretreat-ment in a rat model of ventilator associated lung injury(VALI) and its possible mechanisms. ***Methods***: Thirty male SD rats were randomly divided into 3 groups: control group, VALI model group, and AS605240 treatment group. No mechanical ventilation was conducted in control group; mechanical ventilation with 40 ml/kg tidal volume was applied in VALI model group; intravenous injection of 20 mg/kg AS605240 was employed in AS605240 treatment group at 10 min before the mechanical ventilation. The animals were sacrificed by exsanguinations at the end of 4 h mechanical ventilation. The lungs were removed, and the wet to dry weight ratio(W/D) was measured. Broncho alveolar lavage fluid (BLAF) was obtained for determination of total protein(TP) contents and WBC counts. The levels of tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin(IL)-6, IL-8 and IL-10 in the serum and BALF were detected by enzyme linked immunosorbent assay. The levels of SOD and MDA were detected by colorimetric method. ***Results***: W/D, WBC counts, TP content were increased in AS605240 treatment group and VALI model group compared with those of control group(all $P<0.05$). W/D, WBC counts, TP content were lower in AS605240 treatment group than in VALI model group(all $P<0.05$). Levels of TNF-α, IL-6, IL-8 and MDA in serum and BALF were significantly increased in VALI model group and AS605240 treatment group than in control group; but the levels of IL-10 and SOD were significantly decreased(all $P<0.05$). Compared

作者介绍:王红鸾,Email:13517003319@1163.com,研究方向:肺部感染,机械通气。
通信作者:李秋根,Email:hlwangxie@126.com。
基金项目:江西省科技厅资助项目(编号:20111BBG700202);江西省自然基金资助项目(编号:2011ZBAB204023)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160318.1154.022.html (2016-03-18)

with those of VALI model group, the levels of TNF-α, IL-6, IL-8 and MDA in serum and BALF were decreased, but IL-10 and SOD were increased in AS605240 treatment group (all $P<0.05$). ***Conclusion***: Pretreatment with AS605240 can effectively treat VALI in rats through suppressing the generation of oxygen free radicals and the release of inflammatory cytokines. Its mechanism may be inhibition of variety of inflammatory factors, inhibition of pulmonary microcirculation permeability and decrease in lipid peroxideation, etc.

【Key words】phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase gamma; ventilator associated lung injury; inflammatory cytokines; oxygen free radicals

随着机械通气在广泛临床上使用，呼吸机相关性肺损伤（ventilator associated lung injury，VALI）的发病率亦相应升高。许多研究认为 VALI 除了肺机械性损伤外，肺炎症性损伤也可加重 VALI。磷酸酰肌醇-3 激酶 γ（phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase gamma，PI3Kγ）是 PI3K 的一种特殊的异构体，其生理功能与中性粒细胞聚集和激活相关，因而许多学者认为以 PI3Kγ 作为靶点治疗炎症性疾病可获良好效果。考虑生物性损伤在 VALI 的发生发展中的重要作用，推测 PI3Kγ 抑制剂在 VALI 的防治中可能有效。本研究通过建立 VALI 小鼠动物模型，探讨 PI3Kγ 抑制剂对 VALI 的影响及其作用机制，现报导如下。

1 材料与方法

1.1 材料及动物分组

雄性大鼠 30 只，清洁级，体质量 240~290 g，购自上海复旦大学医学院实验动物学部，PI3Kγ 抑制剂 AS605240 购自美国 sigma 公司。采用随机数字表法将大鼠平均分为 3 组，每组 10 只。A 组为对照组，不行机械通气；B 组为大潮气量通气组，机械通气时潮气量 40 ml/kg；C 组为 AS605240 处理组。

1.2 VALI 模型建立

大鼠实验前晚禁食，自由饮水，实验室温度控制在 24 ℃~26 ℃之间。麻醉采用 20%的乌拉坦溶液腹腔注射（1 ml/100 g），取仰卧位，切开气管插入气管导管，妥善固定，连接小动物呼吸机。参数设置为[1]：呼吸频率 40 次/min，潮气量 40 ml/kg，吸呼比为 1:1，吸入氧浓度为 21%，呼气末正压为零。其中 AS605240 处理组在机械通气前 10 min 静脉预注 AS605240 20 mg/kg。3 组大鼠均行股静脉切开置管，并以 2 ml/h 的速度持续静脉滴注生理盐水。

1.3 观察指标

经过 4 h 机械通气后，以放血法处死大鼠，同时从股动脉收集动脉血，开胸，结扎右主支气管，用 2 ml PBS 缓慢灌洗左支气管肺泡 3 次，收集肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF），其回收率不小于 80%；收集的动脉血与收集的 BALF 分别于 1 500 r/min 离心 10 min，取上清存入-80 ℃的低温冰箱中待测。将右肺中上叶冻存于液氮中，右肺下叶称湿重，然后放入 70 ℃干燥箱中烤干至恒重，称干重，计算肺组织的肺湿干重（W/D）比值。BALF 中总蛋白的测定采用考马斯亮蓝染色法；PBS 稀释 BALF 沉渣后显微镜下行白细胞（WBC）计数。大鼠肺组织中丙二醛（methane dicarboxylic aldehyde，MDA）含量及氧化物歧化酶（superoxide dismu-tase，SOD）活性测定按照 sigma 公司试剂盒步骤进行。酶联免疫吸附法测定血清肿瘤坏死因子-α（tumornecrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素（interleukin，IL）-6、IL-8 及 IL-10 炎性细胞因子的浓度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理，计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较行单因素方差分析，组间两两比较采用 Bofferoni 法，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 各组大鼠 BALF 中总蛋白含量及 WBC 计数，肺湿干重比值的比较

与 A 组相比，B 组总蛋白含量、WBC 计数、W/D 比值均升高（均 $P<0.01$）；与 B 组相比，C 组总蛋白含量、WBC 计数、W/D 比值均降低（均 $P<0.05$）；但 C 组与 A 组相比，总蛋白含量、WBC 计数、W/D 比值也均升高（均 $P<0.05$），见表 1。

表 1 3 组中 BALF 中总蛋白含量及 WBC 计数及 W/D 的比较（$\bar{x} \pm s, n=10$）

Tab.1 Comparison of total protein content, WBC count and W/D in BALF in three groups（$\bar{x} \pm s, n=10$）

组别	总蛋白(g/L)	WBC(×10⁹)	W/D值
A组	45.8 ± 10.2	2.5 ± 1.3	4.0 ± 0.1
B组	80.6 ± 12.8	9.4 ± 3.4	5.8 ± 0.1
C组	60.4 ± 8.3	4.9 ± 2.1	4.8 ± 0.1
*F*值	27.127	21.475	782.450
*P*值	0.000	0.000	0.000
A/B	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000
C/A	*P*:0.003	*P*:0.008	*P*:0.000
C/B	*P*:0.001	*P*:0.002	*P*:0.000

表 2 3 组血清中氧自由基活性和炎性细胞因子浓度的比较（$\bar{x}\pm s, n=10$）

Tab.2 Comparison of oxygen free radical activity and inflammatory cytokines concentration in serum in three groups（$\bar{x}\pm s, n=10$）

组别	TNF-α (pg/ml)	IL-6(pg/ml)	IL-8(pg/ml)	IL-10(pg/ml)	SOD(kU/L)	MDA(μmol/L)
A组	49.9 ± 15.1	9.1 ± 2.4	5.2 ± 1.6	181.6 ± 58.4	502.2 ± 98.5	1.7 ± 0.4
B组	90.6 ± 16.9	18.4 ± 3.8	9.3 ± 2.4	89.6 ± 38.5	322.9 ± 31.4	6.7 ± 1.8
C组	68.6 ± 17.2	13.4 ± 2.8	7.2 ± 1.8	111.6 ± 47.6	382.2 ± 48.5	3.7 ± 0.3
F 值	15.385	23.181	10.916	9.675	19.167	53.144
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	*P*:0.000	0.000
A/B	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000
C/A	*P*:0.019	*P*:0.001	*P*:0.017	*P*:0.008	*P*:0.004	*P*:0.000
C/B	*P*:0.010	*P*:0.003	*P*:0.024	*P*:0.008	*P*:0.002	*P*:0.000

表 3 3 组 BALF 中氧自由基活性和炎性细胞因子浓度的比较（$\bar{x}\pm s, n=10$）

Tab.3 Comparison of oxygen free radical activity and inflammatory cytokines concentration in three groups（$\bar{x}\pm s, n=10$）

组别	TNF-α (pg/ml)	IL-6(pg/ml)	IL-8(pg/ml)	IL-10(pg/ml)	SOD(kU/L)	MDA(μmol/L)
A组	188.9 ± 16.3	9.8 ± 2.3	7.2 ± 1.8	141.3 ± 48.2	412.9 ± 56.6	17.4 ± 3.4
B组	490.6 ± 17.4	17.4 ± 3.8	15.3 ± 2.2	49.6 ± 27.6	242.9 ± 26.2	46.4 ± 6.9
C组	268.6 ± 16.3	13.6 ± 2.5	10.2 ± 2.8	91.5 ± 38.3	303.7 ± 38.5	33.7 ± 4.8
F 值	879.104	16.672	31.608	13.890	41.394	76.905
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A/B	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000	*P*:0.000
C/A	*P*:0.019	*P*:0.022	*P*:0.007	*P*:0.008	*P*:0.000	*P*:0.000
C/B	*P*:0.010	*P*:0.022	*P*:0.000	*P*:0.023	*P*:0.003	*P*:0.000

2.2 各组大鼠血清中氧自由基活性和炎性细胞因子浓度的比较

B 组较 A 组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 水平和 MDA 活性均明显升高，SOD 和 IL-10 浓度则明显降低（均 $P<0.01$）。与 B 组相比，C 组血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 和 MDA 活性降低，SOD 和 IL-10 浓度则升高（均 $P<0.05$）。C 组和 A 组相比，大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 水平和 MDA 活性均有所升高，SOD 和 IL-10 浓度则降低（均 $P<0.05$），见表 2。

2.3 各组大鼠 BALF 中氧自由基活性和炎性细胞因子浓度的比较

与血清中各组大鼠氧自由基活性和炎性细胞因子浓度的比较相似，B 组大鼠 BALF 中 TNF-α、IL-6、IL-8 和 MDA 活性均明显高于 A 组和 C 组，但 IL-10 和 SOD 浓度则明显降低（均 $P<0.01$）。C 组和 A 组相比，大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 水平和 MDA 活性均有所升高，SOD 和 IL-10 浓度则降低（均 $P<0.05$），见表 3。

3 讨 论

机械通气在临床上应用日渐广泛，致使 VALI的发病率亦逐渐升高，在治疗肺部疾患的同时机械通气也可以加重肺部损伤[2]，对许多重症患者的治疗及预后有明显的影响。加重肺部损伤的机制可能因机械通气时，肺部的血管内皮细胞和上皮细胞的压力感受器受到机械力的牵引，激活细胞释放炎症因子及化学趋化物等，从而产生炎症反应，引发活性氧和蛋白水解酶的释放及中性粒细胞的浸润，最终造成肺毛细血管的损伤及肺泡表面活性物质的减少，导致肺损伤的发生[3-4]，所以 VALI 与生物性损伤相关[5]。由此推测，如能人为对 VALI 中的炎症进程进行阻断，或能减少呼吸机相关性肺损伤的发生率。国内有学者通过乌斯他丁抑制炎症介质释放从而使其对 VALI 具有保护作用，这说明炎症反应在 VALI 的发生发展中具有重要作用[1]。

PI3Ks 家族参与多种信号通路，对细胞的增殖、分化和迁移等起调节作用，在肿瘤发生、发展方面也起着重要作用[6]。PI3Kγ 是 PI3K 的一种特殊的异构体，与中性粒细胞聚集和激活相关。敲除 PI3Kγ 基因可以抑制中性粒细胞的聚集和活化，同时可以损伤 T 淋巴细胞和巨噬细胞的功能，故而认为在治

疗炎症性疾病方面 PI3Kγ 为有效靶点[7]。许多研究证实 PI3Kγ 抑制剂能控制多种炎症性疾病的进程，夏梦玲等证实 PI3Kδ/Akt 通路与支气管哮喘发作的炎性机制相关[8]。Medina-Tato DA 等研究表明PI3Kγ 抑制剂对 COPD 的抗炎治疗有一定的作用[9]。

本研究根据文献成功制备了大鼠 VALI 模型，并观察了多种炎性指标。其中 SOD 反映机体清除氧自由基的能力，MDA 反应体内脂质过氧化程度，WBC 计数反映整体炎症水平，肺组织 W/D 的变化反映肺泡血管通透性变化及肺水肿的程度。实验结果发现：B 组 W/D、BALF 中 WBC 计数、总蛋白及MDA 含量却明显高于 A 组，而 SOD 活性较 A 组明显降低，这表明这种通气方法能导致肺损伤的发生。与 B 组相比，C 组总蛋白含量、WBC 计数、W/D 比值均降低，这表明 PI3Kγ 抑制剂 AS605240 能够抑制肺部微循环通透性的增加并减轻肺水肿，从而减轻肺组织的机械损伤。但 C 组与 A 组相比，BALF 中总蛋白含量、WBC 计数、W/D 比值也均升高（均 $P<0.05$）。这表明 PI3Kγ 抑制剂 AS605240 的应用未能完全抑制肺部炎症反应，可能尚有其它炎性机制参与其中。

许多研究表明炎症细胞因子与 VALI 的发生发展密切相关，通过诱发促炎因子 TNF-α、IL-6、IL-8 等的释放及减少抗炎因子 IL-10 的分泌，可明显加重肺组织的生物性损伤[10]。本研究表明，B 组较 A 组大鼠血清及 BALF 中 TNF-α、IL-6、IL-8 活性水平均明显升高，IL-10 浓度则明显降低。提示大潮气量机械通气可以诱导肺组织促炎因子的过表达，并激活全身炎症反应，直接及间接加重肺部损伤。且抗炎因子表达减少，抗炎因子及促炎因子失衡，进一步加重肺组织损伤。与 B 组相比，C 组血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 浓度均降低，IL-10 浓度则升高。表明 AS605240 预先处理后，大鼠 BALF 和血清中炎性细胞因子显著降低，而抗炎因子明显升高，说明AS605240 可以抑制机械通气诱导的促炎因子的表达并增加抗炎因子的表达，维持大鼠体内抗炎因子和促炎因子之间的平衡，从而减少肺组织损伤。C 组和 A 组相比，大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 水平均有所升高，SOD 和 IL-10 浓度则降低，表明 AS605240 的应用未能完全抑制肺部促炎因子的产生，促炎因子及抗炎因子之间仍有失衡，因而可能尚有其他炎性机制参与其中。

综上所述，PI3Kγ 抑制剂 AS605240 预先给药通过抑制肺内炎性细胞因子的释放和氧自由基的生成，从而减轻大鼠 VALI，因而 PI3Kγ 有望成为预防及治疗 VALI 有效靶点，为临床治疗及预防 VALI 提供了新的理论基础。但 AS605240 并不能完全抑制 VALI 的炎症反应，这表明可能尚有其它炎性机制参与其中，这也是今后研究的重要方向。

参 考 文 献

[1] 付笑飞，刘东雷，王建军. 乌司他丁预先给药对大鼠呼吸机相关肺损伤的影响[J]. 华中科技大学学报（医学版），2010，10(5)：688-690.

[2] Müller-Redetzky HC, Felten M, Hellwig K, et al. Increasing the inspiratory time and I:E ratio during mechanical ventilation aggravates ventilator-induced lung injury in mice[J]. Crit Care, 2015, 19(1): 131-143.

[3] 吴海玲，李文志，林献忠，等. 外源性肺表面活性物质对呼吸机相关性肺损伤大鼠炎性反应的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2012，32(5)：610-612.

[4] Held H, Boettcher S, Hamann L, et al. Ventilation induced chemokine and cytokine release is associated with activation of NF-κ Band blocked by steroids[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3): 711-716.

[5] 戴惠军，潘灵辉，林 飞，等. 肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 9-髓样分化因子 88 信号通路在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究[J]. 中华危重病急救医学，2014，26(5)：289-293.

[6] 姜海广，陆瑞祺，吴巨钢，等. 基质细胞源性因子-1α/CXC 趋化因子受体-4 轴经 PI3K/Akt 通路对胃癌细胞 CD133 表达的调控作用[J]. 中华实验外科杂志，2012，29(3)：378-380.

[7] 瞿 梅，沈 薇. PI3K/Akt 对饱和脂肪酸诱导肝细胞脂变内质网应激及脂性凋亡的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2015，23(3)：194-199.

[8] 夏梦玲，徐 慧，葛翔挺，等. 烟雾暴露通过 PI3Kδ/Akt 通路对支气管哮喘小鼠气道 HDAC2 的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志，2015，38(1)：76-78.

[9] Medina-Tato DA, Ward SG, Watson ML, et al. Phosphoinositide 3-kinase signaling in lung disease: leucocytes and beyond[J]. Immunology, 2007, 121(8): 448-461.

[10] Kern S, Skoog I, Borjesson-Hanson A, et al. Higher CSF interleukin-6 and CSF interleukin-8 in current depression in older women. Results from a population-based sample[J]. Brain Behav Immun, 2014, 41(10): 55-58.

（责任编辑：冉明会）