

周倩扬,杨慧敏,李静,等. 雷帕霉素对 DDC 诱导小鼠原发性硬化性胆管炎的治疗效果研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (6): 9-15.

Zhou QY, Yang HM, Li J, et al. Therapeutic effect of rapamycin in DDC-induced primary sclerosing cholangitis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 9-15.

doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 06. 002

雷帕霉素对 DDC 诱导小鼠原发性硬化性胆管炎的治疗效果研究

周倩扬¹,杨慧敏¹,李 静¹,徐 娜¹,刘继鑫¹,张蓓蓓^{1,2},
于 倩^{1,2},郑葵阳^{1,2},颜 超^{1,2*}

(1.徐州医科大学病原生物学与免疫学教研室,江苏 徐州 221004;2.江苏省免疫与代谢重点实验室,江苏 徐州 221004)

【摘要】 目的 探讨雷帕霉素对 3,5-diethoxycarbonyl 1,4-dihydrocollidine (DDC) 诱导的小鼠原发性硬化性胆管炎 (PSC) 的治疗作用,并探讨其潜在的作用机制。**方法** 将 6~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为正常饮食组、DDC 饮食 (0.1% DDC) 造模组和 DDC 造模+雷帕霉素 (RAPA) 治疗组,腹腔注射雷帕霉素 (5 mg/kg 体重),每天注射 1 次,连续 7 d。苏木素-伊红 (HE)、Masson 染色检测肝病理及肝纤维化程度;免疫组化检测 CK19 和 Ki67,分析肝胆管增生程度;qRT-PCR 检测 *Il6*、*Tnfa*、*Il1b*、*Timp1*、*Tgfb* 和 *Col1* 基因表达情况;Western blot 检测 Akt/mTOR/NF-κB 信号通路蛋白活化情况。**结果** 与正常组相比,DDC 造模组小鼠肝有大量炎症细胞浸润和显著的胆管增生,其炎症 (*Il6*、*Tnfa* 和 *Il1b*) 和纤维化 (*Timp1*、*Tgfb* 和 *Col1*) 相关因子 mRNA 表达上调。而在雷帕霉素治疗组,DDC 饮食所致的小鼠肝炎症反应和胆管增生性损伤明显改善,炎症 (*Il6*、*Tnfa* 和 *Il1b*) 和纤维化 (*Timp1*、*Tgfb* 和 *Col1*) 相关因子 mRNA 水平降低,Akt、mTOR 和 NF-κBp65 蛋白磷酸化水平亦降低。**结论** 雷帕霉素可能通过抑制 Akt/mTOR/NF-κB 信号通路,改善 DDC 诱导的小鼠原发性硬化性胆管炎。

【关键词】 雷帕霉素;DDC;胆管损伤;Akt/mTOR/NF-κB 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 06-0009-07

Therapeutic effect of rapamycin in DDC-induced primary sclerosing cholangitis in mice

ZHOU Qianyang¹, YANG Huimin¹, LI Jing¹, XU Na¹, LIU Jixin¹, ZHANG Beibei^{1,2}, YU Qian^{1,2},
ZHENG Kuizhang^{1,2}, YAN Chao^{1,2*}

(1. Department of Pathogen Biology and Immunology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China.
2. Jiangsu Key Laboratory of Immunology and Metabolism, Xuzhou 221004)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of rapamycin on primary sclerosing cholangitis in C57BL/6J mice induced by 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) and to explore its potential mechanism. **Methods** 6~8-week-old female C57BL/6J mice were randomly divided into a normal diet group (healthy control group), a 0.1% DDC diet model group (DDC group), and a DDC with rapamycin treatment group (RAPA group). Rapamycin (5 mg/kg body

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81572019,81702027);江苏省自然基金面上项目 (BK20171176);中国博士后科学基金 (2018M640525);江苏省博士后科研资助计划 (2018K053B)。

[作者简介] 周倩扬 (1995—),女,硕士研究生,研究方向:病原生物学。E-mail: 542130184@qq.com

[通信作者] 颜超 (1984—),男,副教授、硕士生导师,研究方向:病原生物学。E-mail: yanchao6957@xzhum.edu.cn

weight) was injected intraperitoneally every day for 1 week. Hematoxylin-eosin and Masson staining were used to semiquantitatively evaluate the degree of pathological changes and liver fibrosis in liver tissues, respectively. Immunohistochemistry was used to detect CK-19 and Ki-67 and to quantitatively analyze the degree of biliary duct proliferation in liver tissues. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β) and fibrosis-related molecules (TIMP, TGF- β , and collagen I) at the mRNA level. Western blot was used to detect the expression of Akt/mTOR/NF- κ B signaling pathway proteins and their phosphorylation levels. **Results** Compared with the DDC group, the RAPA group showed a marked reduction in hepatic inflammation and biliary duct hyperplasia as well as amelioration of hepatic fibrosis. Inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β) and fibrosis-related molecules (TIMP, TGF- β , and collagen I) were significantly decreased; furthermore, the phosphorylation levels of Akt/mTOR/NF- κ B signaling pathway proteins were also remarkably decreased. After rapamycin treatment, bile duct injuries in the DDC group as indicated by expression of CK-19 and Ki-67 were also significantly improved. **Conclusions** Rapamycin can alleviate DDC-induced primary sclerosing cholangitis in mice by inhibiting the Akt/mTOR/NF- κ B signaling pathway.

【**Keywords**】 Rapamycin; 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine; bile duct injury; Akt/mTOR/NF- κ B signaling pathway

原发性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC) 是一种慢性胆汁淤积性肝病, 其主要表现为胆管周围炎症和纤维化, 可造成胆管阻塞、肝硬化、肝衰竭甚至胆管癌^[1-3]。遗传、环境、机体免疫等因素均可导致 PSC 的发生, 但 PSC 的致病机制尚不完全清楚, 目前尚无有效的治疗药物^[4]。因此, 寻找一种有效改善或治疗 PSC 的药物, 迫在眉睫。

DDC (3, 5-diethoxycarbonyl L 1, 4-dihydrocollidine, DDC) 是一种异源性毒物, 小鼠经喂饲 DDC 后, 可致胆管内栓塞, 最终形成胆管阻塞型胆汁淤积性肝损伤, 其在临床表现和发病机制上与 PSC 有诸多的相似之处, 因此 DDC 诱导的小鼠胆管损伤是研究 PSC 致病机制和相关药物研发较为理想的动物模型^[5]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of Rapamycin, mTOR) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在体内有 mTORC1 和 mTORC2 两种功能不同的复合体, 广泛参与细胞的增殖、生长和自噬等生物学过程, 雷帕霉素 (Rapamycin, RAPA) 是一种有效且特异性的 mTORC 抑制剂^[6]。有研究表明, 雷帕霉素可减轻 ConA 诱导的肝细胞坏死、炎细胞浸润及肝纤维化^[7]。因此, 本研究拟研究雷帕霉素对 DDC 饮食诱导的胆管损伤是否具有治疗作用, 并探讨其潜在的作用机制, 为临床治疗原发性硬化性胆管炎提供潜在药物。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 C57BL/6 雌性小鼠 15 只, 6~8 周, 体重

18~25 g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (浙) 2019-0001], 饲养于清洁级动物房, 自由摄食和饮水, 腹腔注射等操作在徐州医科大学实验动物中心屏障动物实验操作间 [SYXK (苏) 2016-0028] 进行, 实验动物使用、操作许可由徐州医科大学实验动物伦理委员会批准通过 (IACUC: (201801w003)), 动物护理和本研究的所有实验都遵循国家实验室动物中心和徐州医科大学实验动物中心的指导方针, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DDC (STBJ2468, 纯度 99%, 美国 Sigma 公司); 雷帕霉素 (上海碧云天公司); TRIzol (美国 Invitrogen 公司); 引物由上海捷瑞公司合成; FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 荧光 Mix (北京 TransGen Biotech 公司); 兔抗小鼠 CK19, Ki67 抗体 (美国 Abcam 公司); 兔抗小鼠 mTOR, P-mTOR, AKT, P-AKT (Ser473) 单克隆抗体 (杭州华安生物技术有限公司); 兔抗小鼠 p65, P-p65 单克隆抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司); 兔抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体、山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗 (武汉 ABclonal 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组与模型的建立

8 周龄清洁级雌性 C57BL/6J 小鼠平均体重 20 g 左右, 随机分为单独 DDC 饮食组、DDC 造模+雷帕霉素 (RAPA) 治疗组, 每组 5 只小鼠。治疗组每天

腹腔注射一次雷帕霉素(根据说明书,用 DMSO 溶药,用生理盐水稀释至 1 mg/mL,注射剂量为 5 mg/kg 小鼠体重),两组均连续注射一周,此期间每天对照组腹腔注射 0.1%二甲基亚砷(DMSO),最后一次注射 RAPA 后 24 h 进行取材及相关的检测,见图 1a。

1.3.2 HE 染色

小鼠肝组织于 4%中性甲醛中固定约 48 h 后经脱水、石蜡包埋制成组织石蜡切片,行苏木素 & 伊红(HE)及 Masson 染色,于光学显微镜下观察病变情况,对 HE 染色结果图进行病理学评分^[8],Masson 染色结果图用 Image J 进行定量分析。

1.3.3 免疫组化

微波处理(0.01 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液, pH6.0)石蜡切片(4 μm),用 5% BSA 室温封闭样本组织 30 min,使用单克隆小鼠抗 CK19、Ki67 抗体(稀释 1:100;Abcam),对照组滴加 1% BSA,置于湿盒中 4℃过夜。于第 2 天取出玻片,滴加预先按说明书稀释的二抗,将玻片置于湿盒中,放于 37℃温箱静置 30 min。配制 DAB 显色液,滴加于切片组织上,镜下观察显色变化。于玻片上滴加苏木素染色剂覆盖组织,室温静置 5~10 s,流水冲洗干净,脱水封片。于光学显微镜下观察阳性分布情况,并用 Image J 定量分析。

1.3.4 qPCR 检测 *Il6*、*Tnfa*、*Il1b*、*Timp1*、*Tgfb* 和 *Col1* 的 mRNA 表达水平

用 TRIzol 法按说明书步骤提取各组肝组织的总 RNA,将 RNA 逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增反应。以 *Gapdh* 作为内参,目的基因 mRNA 表达量用 2^{-ΔΔCt} 计算,引物序列见表 1。

1.3.5 Western blot

提取各组细胞总蛋白,用 BCA 法测浓度,每孔取 60 μg 蛋白样品上样进行 SDS-PAGE 电泳,用 BioRad 标准转膜装置进行湿式转膜,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,分别加入 mTOR、P-mTOR、AKT、P-

AKT(Ser473)、p65 或 P-p65 一抗 4℃冰箱摇床孵育过夜,洗膜,二抗孵育 1.5 h,加 ECL 显影液曝光显影,用 Image Lab 软件分析结果,将目的蛋白灰度值/对应内参蛋白灰度值的比值作统计学分析,实验重复 4 次。

1.4 统计学方法

实验数据经 SPSS 19.0 统计软件分析处理,呈正态分布的计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较用独立样本 *t* 检验,多组均数间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P*< 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAPA 可改善 DDC 饮食诱导的小鼠肝内胆管病理学特征

通过 HE 染色和 Masson 染色可见,正常组小鼠肝未见明显异常(图 1b、1c)。DDC 组小鼠胆管周围见及明显炎性细胞浸润,大量胶原纤维沉积,胆管异常增生,结构紊乱;而 RAPA 治疗组小鼠胆管周围炎性细胞浸润、胶原纤维沉积现象显著减轻,胆管增生有所缓解。通过定量分析进一步显示,与 DDC 组相比,RAPA 治疗组小鼠炎症病理评分明显降低(图 1d, *P*< 0.05),纤维沉积减少(图 1e, *P*< 0.01),差异有统计学意义。

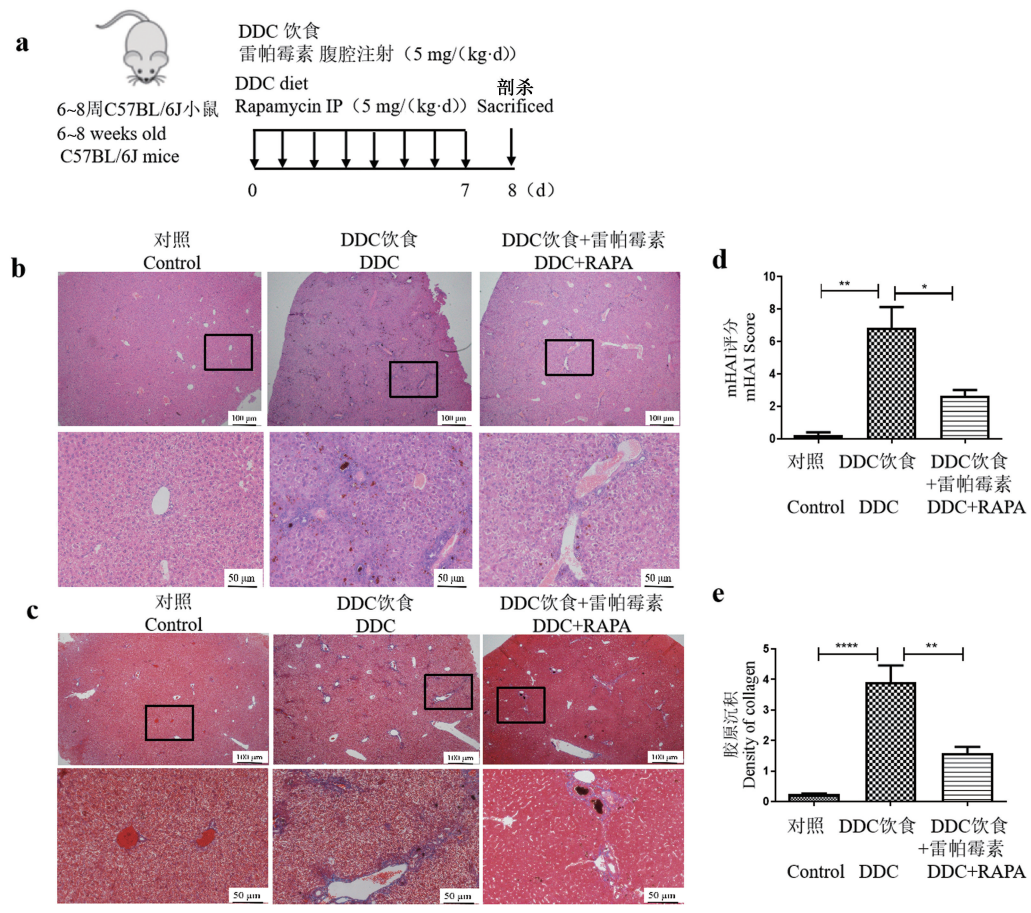
2.2 RAPA 可抑制 DDC 诱导的小鼠肝中胆管上皮细胞的增生

为了进一步证实 RAPA 抑制 DDC 诱导的胆管上皮细胞增生情况,我们通过免疫组织化学染色检测了胆管增生相关标志物 CK19、Ki67 的表达。如图 2 所示,与正常小鼠相比,DDC 饮食组小鼠肝 CK19(图 2a 和 2b; *P*< 0.01)、Ki67(图 2c 和 2d; *P*< 0.0001)的阳性分布区域明显增多。而 RAPA 处理后,CK19 阳性区域(*P*<0.01)和 Ki67 阳性区域(*P*< 0.001)明显降低,因此,RAPA 可显著抑制 DDC 诱导的胆管损伤。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers used in the study

基因名称 Gene name	上游引物序列(5'-3') Primer sense(F)	下游引物序列(5'-3') Primer antisense(R)
<i>Gapdh</i>	ACTCCACTCACGGCAAATTC	TCTCCATGGTGGTGAAGACA
<i>Tnfa</i>	CTTGTTGCCTCCTCTTTTGCTTA	CTTTATTCTCTCAATGACCCGTAG
<i>Il6</i>	TCACAGAAGGAGTGGCTAAGGACC	ACGCACTAGGTTTGCCGACTAGAT
<i>Il1b</i>	TGTGTTTTCTCCTTGCTCTGAT	TGCTGCCTAATGTCCCCTTGA AT
<i>Tgfb</i>	CCACCTGCAAGACCATCGAC	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGAC
<i>Timp1</i>	GCAACTCGGACCTGGTCATAA	CGGCCCCGTGATGAGAAACT
<i>Col1</i>	CAGGGTATTGCTGGACAACGTG	GGACCTTGTTTGCCAGGTTCA



注:a:造模示意图;b:各组小鼠肝 HE 染色;c:各组小鼠肝 Masson 染色;d:HE 染色病理学评分;e:Masson 染色图像定量分析(n=4);与相应组别比,* P< 0.05,** P< 0.01,**** P< 0.0001。

图1 小鼠肝组织病理学变化

Note. a, Modeling schematic diagram. b, HE staining. c, Masson staining of mice liver of each group. d, HE staining pathological score. e, Quantitative analysis of Masson staining (n = 4). Compared to the corresponding group, * P< 0.05, ** P< 0.01, **** P< 0.0001.

Figure 1 Pathological changes in liver tissue in mice

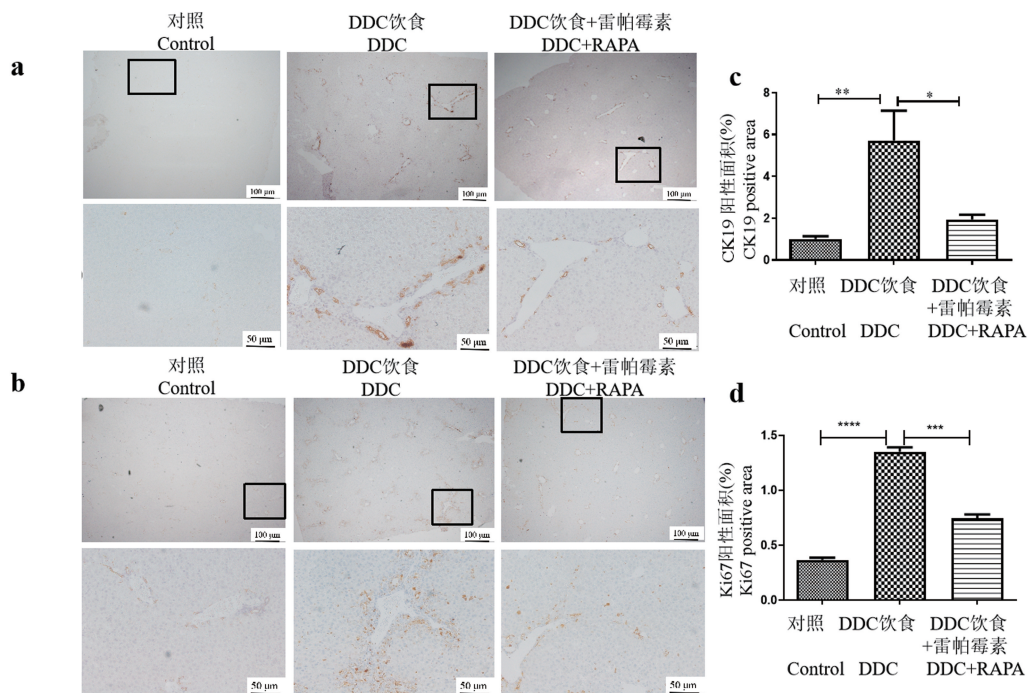
2.3 RAPA 可降低 DDC 饮食诱导小鼠肝炎症和纤维化相关因子的水平

我们进一步采用 qRT-PCR 检测了炎症 (*Il6*、*Tnfa* 和 *Il1b*) 和纤维化 (*Timp1*、*Tgfb* 和 *Col1*) 相关因子的基因水平。与正常小鼠相比,DDC 组中小鼠肝组织中 *Il6* (图 3a, $P< 0.0001$)、*Tnfa* (图 3b, $P< 0.01$)、*Il1b* (图 3c, $P< 0.001$) 及 *Timp1* (图 3d, $P< 0.0001$)、*Tgfb* (图 3e, $P< 0.0001$) 和 *Col1* (图 3f, $P< 0.0001$) mRNA 相对表达水平均明显升高,说明 DDC 饮食可引起小鼠肝炎症和纤维化,分别与结果 1 HE 染色中炎性细胞浸润和 Masson 染色中纤维沉积的病理结果相一致。而在 RAPA 干预后,这些炎症和纤维化相关因子的 mRNA 表达水平均明显降低(图 3a~3d, $P<0.01$),说明 RAPA 能减轻 DDC 引

起的小鼠肝炎症和纤维化。

2.4 RAPA 可能通过调控 Akt/mTOR/ NF-κB 信号通路抑制 DDC 诱导的胆管损伤

为了进一步探讨 RAPA 抑制 DDC 诱导的胆管损伤的分子机制,由于 RAPA 作为 mTOR 的抑制剂,与正常小鼠相比,给与 RAPA 之后总的 mTOR 不会发生改变,而磷酸化的 mTOR(P-mTOR)表达降低,这一现象已有文献报道^[9],而且单纯给与 RAPA 并不会激活 p65 和 P-p65^[10],因此我们进一步通过 Western blot 检测 DDC 组和 DDC+RAPA 组小鼠肝 mTOR、P-mTOR、AKT、P-AKT (Ser473)、p65 和 P-p65 活化情况。结果显示,与 DDC 组小鼠相比 RAPA 干预后,P-AKT (Ser473)、P-mTOR 和 P-p65 (图 4a)活化水平明显降低,差异具有统计学意义



注:a-b:各组小鼠肝中 CK19 的阳性分布;c-d: CK19、Ki67 表达的定量分析 ($n = 4$);与相应组别比, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

图 2 DDC 饮食导致各组小鼠肝中 CK19、Ki67 的表达变化

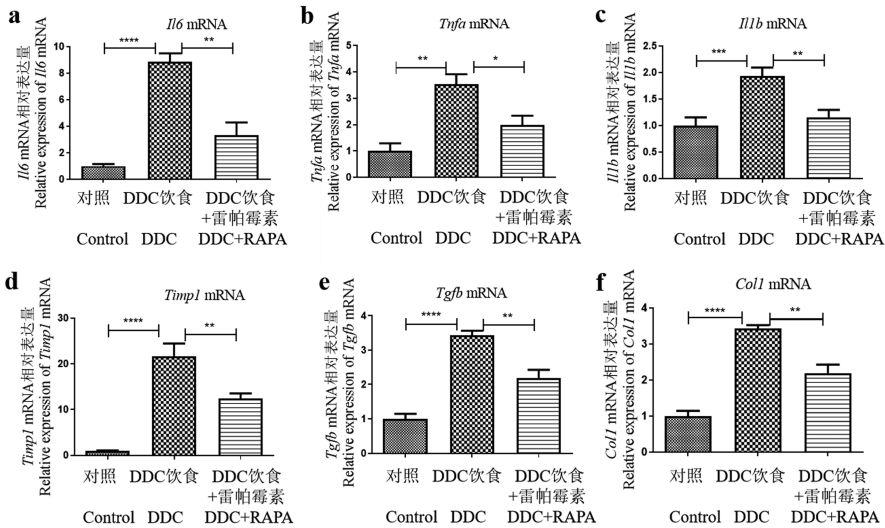
Note. a-b, Positive distribution of CK19 and Ki67 in the livers of each group of mice. c-d, Quantitative analysis of CK19 and Ki67 expression ($n = 4$). Compared to the corresponding group, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Figure 2 The DDC diet resulted in changes in expression of CK19 and Ki67 in the livers of each group of mice (图 4b~4d, $P < 0.05$)。上述结果提示:RAPA 可能通过调控 Akt/mTOR/ NF- κ B 信号通路改善 DDC 诱导的原发性硬化性胆管炎。

3 讨论

原发性硬化性胆管炎是一种罕见的慢性胆汁淤积性肝病,其特征是肝内或肝外胆管狭窄或两者兼有,并伴有胆周炎症和胆管纤维化。胆管和肝的炎症和纤维化会继之发展为胆汁生成或循环障碍,以及进行性肝功能障碍^[11-12]。DDC 饮食诱导的小鼠肝损伤模型是一种经典的进行性胆汁淤积性肝损伤模型,研究显示该模型导致的小鼠胆汁淤积性肝损伤,在发病机制和临床表现上均可模拟人类原发性硬化性胆管炎^[13]。有研究报道,DDC 饮食一周的小鼠,其肝即出现明显的胆管反应(ductal reaction, DR),表现为胆管上皮样增生并伴有炎症细胞浸润,随着 DDC 的持续作用,肝中出现大量炎症细胞浸润和成纤维母细胞活化,逐渐形成洋葱皮样胆管损伤^[14-16]。

本研究成功构建了 DDC 诱导胆汁淤积性胆管损伤动物模型,并深入揭示雷帕霉素对胆汁淤积性胆管损伤的作用及分子作用机制。本研究利用了 HE 染色及 Masson 染色法详细观察了各组小鼠肝病理变化情况,结果显示模型组小鼠肝胆管周有炎症细胞浸润和胆管增生,并伴随有胶原纤维的沉积,这与 Jansen 等^[17]的结果相一致。而 RAPA 治疗组胆管周炎症细胞的浸润明显减少,胶原纤维沉积现象明显减轻。证实 RAPA 可以减轻 DDC 诱导的小鼠肝炎性浸润,胆管增生和纤维化。细胞角蛋白(CK19)不存在于成体肝细胞中而主要存在于肝祖细胞和胆管上皮细胞(BECs)中,是最广泛使用的胆管细胞和肝祖细胞标记物^[18],也是胆管反应标志物^[19],Ki67 表达于活跃分裂的细胞核中^[20],是细胞增殖的标志物^[19-21],我们的结果显示,RAPA 治疗可以显著下调 DDC 饮食引起的 CK19 和 Ki67 的高表达,表明 RAPA 可以抑制胆管上皮细胞的增殖。已有的报道及我们的结果(图 1b~1c)均显示 DDC 饮食可诱导肝汇管区周围炎症细胞的浸润和胶原沉积^[22],故在本研究中,我们运用 qRT-PCR 进行进一步验证和补充,分析了相关炎症细胞因子 *Il6*、*Tnfa* 和 *Il1b* 的表达,RAPA 处理后可以明显降低这些促炎细胞因子的水平,肝纤维化相关指标 *Timp1*、

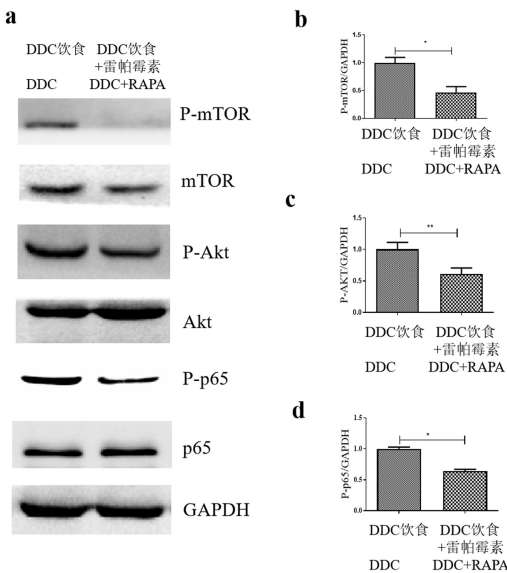


注:a-f:分别为 qRT-PCR 检测各组小鼠肝组织中 *Il6*、*Tnfa*、*Il1b*、*Timp1*、*Tgfb* 和 *Col1* 的 mRNA 相对表达变化 ($n=4$);与相应组别比, **** $P<0.0001$, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ 。

图 3 DDC 饮食诱导小鼠肝中 *Il6*、*Tnfa*、*Il1b*、*Timp1*、*Tgfb* 和 *Col1* 的 mRNA 表达变化

Note. a-f, Relative expression of *Il6*, *Tnfa*, *Il1b*, *Timp1*, *Tgfb* and *Col1* in liver tissues of mice in each group was detected by qRT-PCR, respectively ($n=4$). Compared to the corresponding group, **** $P<0.0001$, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$.

Figure 3 The DDC diet induced changes in mRNA expression in the mice livers of *Il6*, *Tnfa*, *Il1b*, *Timp1*, *Tgfb* and *Col1*



注:a: Western blot 检测各组小鼠肝组织中 AKT、P-AKT (Ser473)、mTOR、P-mTOR、p65 和 P-p65 蛋白表达变化;b-d: 对各蛋白表达的定量分析 ($n=4$);与相应组别比, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ 。

图 4 小鼠肝组织中 mTOR、P-mTOR、AKT、P-AKT (Ser473)、p65 和 P-p65 蛋白表达变化

Note. a, Expression of AKT, P-AKT (Ser473), mTOR, P-mTOR, p65 and P-p65 in liver of mice in each group was detected by Western blot. b-d, Quantitative analysis of protein expression ($n=4$). Compared to the corresponding group, ** $P<0.01$, * $P<0.05$.

Figure 4 Changes in protein expression in mTOR, P-mTOR, AKT, P-AKT(Ser473), p65 and P-p65 in mice liver

Tgfb 和 *Col1* 是小鼠进行性胆管纤维蛋白基因,可在一定程度上反映纤维化的发展^[14],在 RAPA 处理后也被抑制。已有文献研究表明,肝炎症反应能促进肝纤维化的发生、发展^[1-2],本研究发现在 DDC 喂食小鼠后,其肝中 NF- κ B p65 磷酸化水平及其下游炎症因子明显升高,且纤维化程度明显加重,而经 RAPA 治疗后,NF- κ B p65 磷酸化水平降低且炎症因子表达水平明显降低,并伴随肝纤维化程度得到也明显改善,这些结果显示 RAPA 可能通过抑制肝胆管炎症来改善 DDC 诱导的胆汁淤积性肝纤维化,但具体机制还仍需要进一步探讨。

NF- κ B 被认为是典型的促炎信号转导途径,p65 作为 NF- κ B 最常见的亚基组成形式,被磷酸化修饰后被转运到细胞核内促进促炎基因的表达,包括细胞因子,趋化因子和粘附分子^[23]。过度活化的 p65 可促进效应分子(如炎症因子)产生,导致炎症性疾病的发生、发展,因此,NF- κ B p65 信号通路已经成为药物研发的关键点^[10]。研究表明戊酸(EA)对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞具有抗炎作用,并且可以通过抑制 PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B 信号通路并抑制 LPS 诱导的炎症介质产生^[24]。还有研究表明 TIPE2 通过调节 Akt/mTOR /NF- κ B 信号轴促进人肺癌细胞的增殖,存活,侵袭和迁移^[25]。这些研究都证实了 Akt/mTOR/NF- κ B 信号通路在炎症和增生的发生发展中都起着关键作用,已知 mTOR 和

NF- κ B 都是 Akt 的下游效应子,通过 Akt 进行的信号传递可能会通过 mTOR 或 NF- κ B 在两个互斥和独立的方向上进行,mTOR 可通过反馈机制调节 Akt,还可以通过 mTOR 相关蛋白受体调节 Akt 来帮助 mTOR 调节 NF- κ B^[26]。本研究结果显示,在给与 RAPA 治疗后,P-mTOR、P-Akt、NF- κ B P-p65 的磷酸化水平降低,而总的 mTOR、Akt、NF- κ B p65 未见明显变化,说明 RAPA 作为 mTOR 的抑制剂能有效抑制 DDC 激活的 Akt/mTOR/NF- κ B 信号通路的磷酸化水平,从而改善由 DDC 诱导的胆管周围炎症,进而改善胆管损伤。

综上,我们研究了 RAPA 在 DDC 诱导的小鼠原发性硬化性胆管炎作用,结果显示 RAPA 可改善 DDC 饮食诱导的小鼠胆管损伤和炎症反应。本研究发现 RAPA 可能通过抑制 Akt/mTOR /NF- κ B 信号通路从而抑制炎症介质的产生,进而改善 DDC 诱导的小鼠胆管损伤。因此 RAPA 有望成为治疗胆汁淤积性胆管损伤的有效药物,本研究结果将为 PSC 患者临床治疗靶点和新型药物的研发提供一定的实验基础。

参考文献:

- [1] Tan S, Zhao J, Sun Z, et al. Hepatocyte-specific TAK1 deficiency drives RIPK1 kinase-dependent inflammation to promote liver fibrosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(25): 14231-14242.
- [2] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [3] Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, et al. Primary sclerosing cholangitis [J]. *Lancet*, 2018, 391(10139): 2547-2559.
- [4] Mattner J. Impact of microbes on the pathogenesis of primary biliary cirrhosis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC) [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1864.
- [5] Connolly AK, Price SC, Connolly JC, et al. Early changes in bile duct lining cells and hepatocytes in rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1988, 93(2): 208-219.
- [6] 汶文娟,唐少君,钟翎,等. mTOR 信号通路及其与阿尔茨海默病的关系 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(8): 70-75.
- [7] 李文文,孙朋,陈豆豆,等. 雷帕霉素对自身免疫性肝炎小鼠及肝纤维化的防治作用及其机制 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2016, 24(5): 368-374.
- [8] Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(4): 598-607.
- [9] 邓宇,李丽娜,王鹏帆,等. 雷帕霉素对大鼠肾缺血再灌注后心肌损伤的作用及机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 40-45.
- [10] Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and

- strategies for therapeutic manipulation [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 407-419.
- [11] Fricker ZP, Lichtenstein DR. Primary sclerosing cholangitis; a concise review of diagnosis and management [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(3): 632-642.
- [12] Karlsen T H, Folseaaas T, Thorburn D, et al. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(6): 1298-1323.
- [13] Masson MT, Villanova F, Greaves P. Histological demonstration of wheat germ lectin binding sites in the liver of normal and ANIT treated rats [J]. *Arch Toxicol*, 1986, 59(2): 121-123.
- [14] Fickert P, Stöger U, Fuchsichler A, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(2): 525-536.
- [15] Yan C, Shen LP, Ma R, et al. Characterization and identification of differentially expressed microRNAs during the process of the peribiliary fibrosis induced by *Clonorchis sinensis* [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 43: 321-328.
- [16] Yan C, Li XY, Li B, et al. Expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the livers of mice infected by *Clonorchis sinensis* [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2015, 9(10): 1147-1155.
- [17] Jansen PL, Ghallab A, Vartak N, et al. The ascending pathophysiology of cholestatic liver disease [J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 722-738.
- [18] Gujral JS, Liu J, Farhood A, et al. Reduced oncotic necrosis in Fas receptor-deficient C57BL/6J-lpr mice after bile duct ligation [J]. *Hepatology*, 2004, 40(4): 998-1007.
- [19] Yang C, Zhang J, Ding M, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy [J]. *Clin Transl Oncol*, 2018, 20(5): 570-575.
- [20] 宋亚中,徐央波,邓博,等. 厄洛替尼引起皮肤不良反应的小鼠模型建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(1): 16-21.
- [21] Penault-Llorca F, Radosevich-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update [J]. *Pathology*, 2017, 49(2): 166-171.
- [22] Hernández-Aquino E, Muriel P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(16): 1679-1707.
- [23] Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651.
- [24] Wang J, Zhang P, He H, et al. Eburicoic acid from *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill attenuates inflammatory responses through inhibiting LPS-induced activation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B pathways in RAW264.7 cells [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2017, 390(8): 845-856.
- [25] Bordoloi D, Banik K, Padmavathi G, et al. TIPE2 induced the proliferation, survival, and migration of lung cancer cells through modulation of Akt/mTOR/NF- κ B signaling cascade [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 836.
- [26] Corti F, Nichetti F, Raimondi A, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in biliary tract cancers: A review of current evidences and future perspectives [J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 72: 45-55.