

NVP-BEZ235 对低氧诱导下大鼠心肌及主动脉的影响

柴晓宇 许 萌 杨 雪 马纬麟 刘新民

【摘要】 目的:评价磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路双重抑制剂 NVP-BEZ235 对于低氧诱导下大鼠心肌及主动脉的影响。 方法:低氧组和 NVP-BEZ235 干预组置于实验室特制的低压低氧仓内饲养,对照组于常氧环境中饲养。NVP-BEZ235 干预组给予 35 mg/kg NVP-BEZ23 隔天灌胃,低氧组及对照组隔天给予生理盐水灌胃。21 d 后计算大鼠右心室质量(RVW)/体质量(BW)值;各组大鼠左心室心肌组织行苏木素伊红染色,并测量心肌血管数量及血管内径;胸主动脉行苏木素伊红染色、Russell Movat 染色及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)免疫组织化学染色;检测大鼠血清中血管内皮生长因子(VEGF)水平。 结果:(1)低氧组大鼠较对照组 RVW/BW 明显升高($P = 0.0002$),NVP-BEZ235 干预组大鼠较低氧组 RVW/BW 明显降低($P = 0.0021$)。(2)左室心肌组织 HE 染色可见低氧组大鼠心肌细胞排列紊乱,细胞间隙增宽;NVP-BEZ235 干预组心肌排列较整齐,细胞间距较较低氧组有所减小;3 组大鼠心肌血管数量及管径差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。(3)病理染色可见低氧组大鼠胸主动脉弹性纤维排列紊乱,局部胞浆空泡变;NVP-BEZ235 干预组大鼠胸主动脉的改变较低氧组有所减轻。低氧组大鼠胸主动脉管壁中层 α -SMA 表达较对照组不均匀增加;NVP-BEZ235 干预组大鼠胸主动脉 α -SMA 表达较低氧组相对减少。(4)低氧组大鼠血清 VEGF 水平较对照组明显升高($P = 0.0027$),NVP-BEZ235 干预组较低氧组 VEGF 水平明显降低($P = 0.0060$)。 结论:NVP-BEZ235 可以抑制低氧诱导下大鼠心肌及主动脉的改变,并抑制低氧诱导的血清 VEGF 的升高。

【关键词】 低氧;心肌;主动脉;血管内皮生长因子

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.04.009

Effects of NVP-BEZ235 on myocardium and aorta of hypoxia induced rats CHAI Xiaoyu, XU Meng, YANG Xue, MA Weilin, LIU Xinmin. Department of Geriatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

【Abstract】 Objective: To evaluate the effect of PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 on the myocardium and aorta of hypoxia induced rats. **Methods:** Male SD rats in the hypoxia group and NVP-BEZ235 intervention group were raised in the specific hypoxic incubator while the control group were raised in normoxia condition. NVP-BEZ235 intervention group received NVP-BEZ235 (35 mg/kg) by intragastric administration every two days while the control group and hypoxia group received saline. After 21 days, the right ventricular weights (RVW) and body weights (BW) were measured and calculated for the ratio of RVW/BW. The myocardium tissues were stained by hematoxylin-eosin, and the amount and internal diameters of myocardial vessels were measured. The thoracic aorta tissues were processed by hematoxylin-eosin, Russell Movat and α -SMA immunohistochemical staining. The

基金项目:国家自然科学基金(81270114)

作者单位:100034 北京大学第一医院老年科

通信作者:刘新民,Email:lxm2128@163.com

serum VEGF levels of rats were detected by ELISA. **Results:** (1) The RVW/BW ratio of hypoxia group was significantly elevated compared with control group ($P = 0.0002$) and the RVW/BW ratio was decreased in the NVP-BEZ235 intervention group when compared with hypoxia group ($P = 0.0021$). (2) The hematoxylin-eosin staining of left ventricular myocardial tissue of hypoxia group showed myocardial cells derangement and intercellular space widened; NVP-BEZ235 intervention group showed less myocardial derangement and intercellular space than hypoxia group. There was no significant difference of the quantity and internal diameter of myocardial vessels among groups (all $P > 0.05$). (3) The pathological staining of thoracic aortic showed elastic fibers derangement and local cytoplasmic vacuolation in hypoxia group, while the changes in NVP-BEZ235 intervention group were relatively less. The expression of α -SMA in the middle wall of thoracic aorta increased unevenly in hypoxia group while the expression of α -SMA in NVP-BEZ235 intervention group was less than hypoxia group. (4) The serum VEGF level of hypoxia group was significantly higher than control group ($P = 0.0027$) while the level of NVP-BEZ235 intervention group was lower than hypoxia group ($P = 0.0060$). **Conclusion:** NVP-BEZ235 could attenuate the changes of myocardium and aorta, and inhibit the increase of serum VEGF in hypoxia induced rats.

[Key words] Hypoxia; Myocardium; Aorta; Vascular endothelial growth factor

低氧条件下,心肌细胞相对缺血缺氧,可引起心肌肥厚、心室重构等改变^[1-3]。与肺动脉相比,主动脉对低氧刺激的反应较为缓和,但文献报道低氧对体外大鼠主动脉的收缩、舒张特性有影响^[1,4]。研究发现,磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路参与机体在低氧环境下的细胞增殖、凋亡及组织重塑等反应^[5],推测应用 PI3K/mTOR 抑制剂可以缓解低氧诱导的大鼠心肌及主动脉的变化。NVP-BEZ235 是新型 PI3K/mTOR 信号通路双重抑制剂,给药途径方便,目前用于多种肿瘤性疾病的临床 I / II 期研究^[6]。本研究旨在探讨 NVP-BEZ235 对低氧条件下大鼠心肌及主动脉管壁的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

SD 雄性大鼠(8 周龄)来源于北京大学第一医院动物实验中心。NVP-BEZ235 购于美国 Selleckchem 公司,血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 试剂盒购于四正柏生物有限公司,苏木素伊红(HE)染色试剂盒购于凯基生物技术有限公司, Russell Movat 染色试剂盒购于雷根生物技术有限公司,抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体购于美国 Abcam 公司,免疫组织化学试剂盒购于中杉金桥公司。

1.2 实验动物分组

18 只 SD 雄性大鼠随机分为低氧组、NVP-BEZ235 干预组和对照组,每组 6 只。低氧组和 NVP-BEZ235 干预组置于实验室特制的低压低氧

仓内饲养,实验动物吸入氧浓度约为 10%,对照组于常氧环境中饲养。NVP-BEZ235 干预组给予 35 mg/kg NVP-BEZ235 [溶剂为 N-甲基吡咯烷酮(NMP)/聚乙二醇(PEG300),体积浓度为 10%]隔天灌胃,低氧组及对照组隔天给予生理盐水灌胃。3 组大鼠置于同一饲养间,维持室内温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(40 ± 10)%,12 h 照明/非照明循环。21 d 后,5%戊巴比妥钠腹部注射麻醉动物后进行取材处理。

1.3 右心室质量(RVW)/体质量(BW)值的测定

称量取材前各组大鼠的 BW(g)和心室分离后的 RVW(mg),计算 RVW/BW 值,作为评估大鼠右心室肥厚程度的指标。

1.4 左心室心肌、胸主动脉组织化学染色

分离大鼠左心室心肌、胸主动脉,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋。切片后常规脱蜡至水,苏木素染色 10 min,冲洗后 1%盐酸酒精迅速返蓝,行伊红染色 1 min,常规透明后中性树脂封片固定,光学显微镜下观察 HE 染色情况。通过 ImageJ 软件分析大鼠左心室心肌 HE 染色图片,每组大鼠至少分析 15 张切片,对单位视野内血管外径为 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ 的心肌血管的数量及血管内径进行测量。

主动脉标本按照试剂盒说明书进行 Russell Movat 染色,标本常规脱蜡后经 Bouin 固定液处理 10 min,经阿利斯蓝染液、苏木素染液、臧品红染液、磷钨酸染液、藏红花染液等染色步骤后,常规透明中性树脂封片固定,光学显微镜下观察,其中弹力纤维染为黑色。

1.5 免疫组织化学染色检测胸主动脉 α -SMA 表达

大鼠胸主动脉石蜡标本常规脱蜡后置于免疫组织化学湿盒内,在灭活内源性过氧化物酶、柠檬酸钠热抗原修复及非免疫动物血清封闭后,加入 α -SMA—抗 4℃ 孵育过夜,二抗孵育后,采用 DAB 显色,苏木素复染切片 1 min 左右,1% 盐酸酒精分化,自来水冲洗返蓝,显微镜下观察染色情况并采集分析图像。

1.6 ELISA 法检测血清 VEGF 水平

收集大鼠血标本置于抗凝管中,低温离心(4℃,1 000 转/min)后取上层血清,于 -80℃ 保存备用。按照试剂盒说明书通过 ELISA 法检测大鼠血清 VEGF 水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差表示,两组间比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠右心室肥厚程度

大体观对照组大鼠心脏大小适中,右室壁厚度适中;低氧组大鼠心脏增大,右室壁厚度增厚;NVP-BEZ235 干预组大鼠较低氧组心脏右室壁增厚减轻。与对照组相比,低氧组大鼠 RVW/BW 明显升高[(1.64 \pm 0.12) mg/g 对 (0.69 \pm 0.04) mg/g, $P = 0.0002$];与低氧组相比,NVP-BEZ235 干预组大鼠 RVW/BW[(1.15 \pm 0.03) mg/g]明显降低($P = 0.0021$)。

2.2 大鼠左室心肌组织 HE 染色结果

左室心肌组织 HE 染色可见对照组大鼠心肌纤维排列整齐,细胞大小适中,间质中少见炎性细胞浸润;低氧组大鼠心肌细胞排列紊乱,细胞间隙增宽,心肌纤维结构不清晰且存在明显的溶解,胞质着色不均,间质可见炎性细胞浸润;NVP-BEZ235 干预组大鼠心肌纤维排列整齐,未见明显的心肌纤维溶解,细胞间距较低氧组有所减小。

单位视野下,对照组大鼠心肌血管内径为 10~50 μ m 的血管数量为(1.87 \pm 0.91)支,平均血管内径为(17.10 \pm 6.34) μ m;低氧组大鼠心肌血管内径为 10~50 μ m 的血管数量为(1.93 \pm 0.88)支,平均血管内径为(15.89 \pm 6.89) μ m;NVP-BEZ235 干预组大鼠心肌血管内径为 10~50 μ m 的血管数量为(2.26 \pm 0.96)支,平均血管内径为(16.23 \pm

6.23) μ m;各组大鼠心肌血管数量及管径比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.3 大鼠胸主动脉组织化染色结果及 α -SMA 表达情况

HE 染色及 Russell Movat 染色均可见对照组大鼠胸主动脉弹性纤维平滑连续且均匀延伸;低氧组大鼠胸主动脉弹性纤维排列紊乱且较对照组变细,平滑肌细胞退行性变,局部胞浆空泡变;NVP-BEZ235 干预组大鼠胸主动脉的改变较低氧组有所减轻,弹性纤维连续且平滑延伸。

主动脉平滑肌细胞特异性表达 α -SMA 蛋白。免疫组织化学染色结果显示,与对照组相比,低氧组胸主动脉管壁中层 α -SMA 表达不均匀增加;与低氧组相比,NVP-BEZ235 干预组大鼠胸主动脉 α -SMA 表达相对减少。

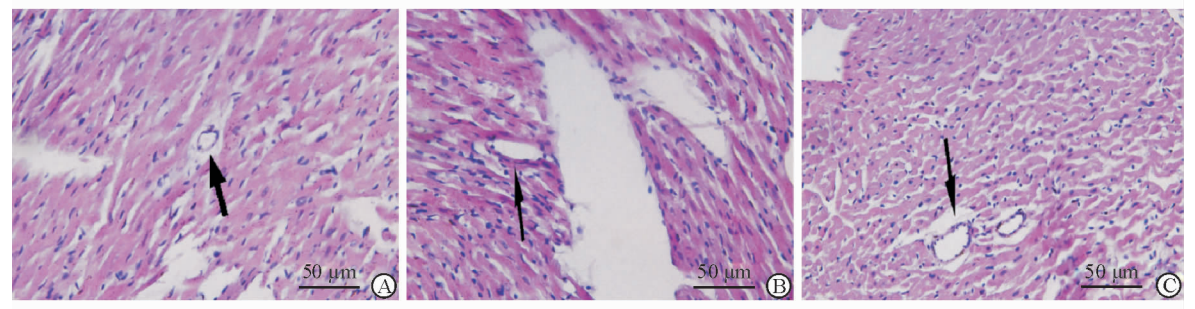
2.4 大鼠血清 VEGF 水平

与对照组相比,低氧组大鼠血清 VEGF 水平明显升高[(40.87 \pm 19.64) pg/mL 对 (8.60 \pm 3.56) pg/mL, $P = 0.0027$];与低氧组相比,NVP-BEZ235 干预组血清 VEGF 水平[(11.13 \pm 7.33) pg/mL]明显降低($P = 0.006$)。

3 讨论

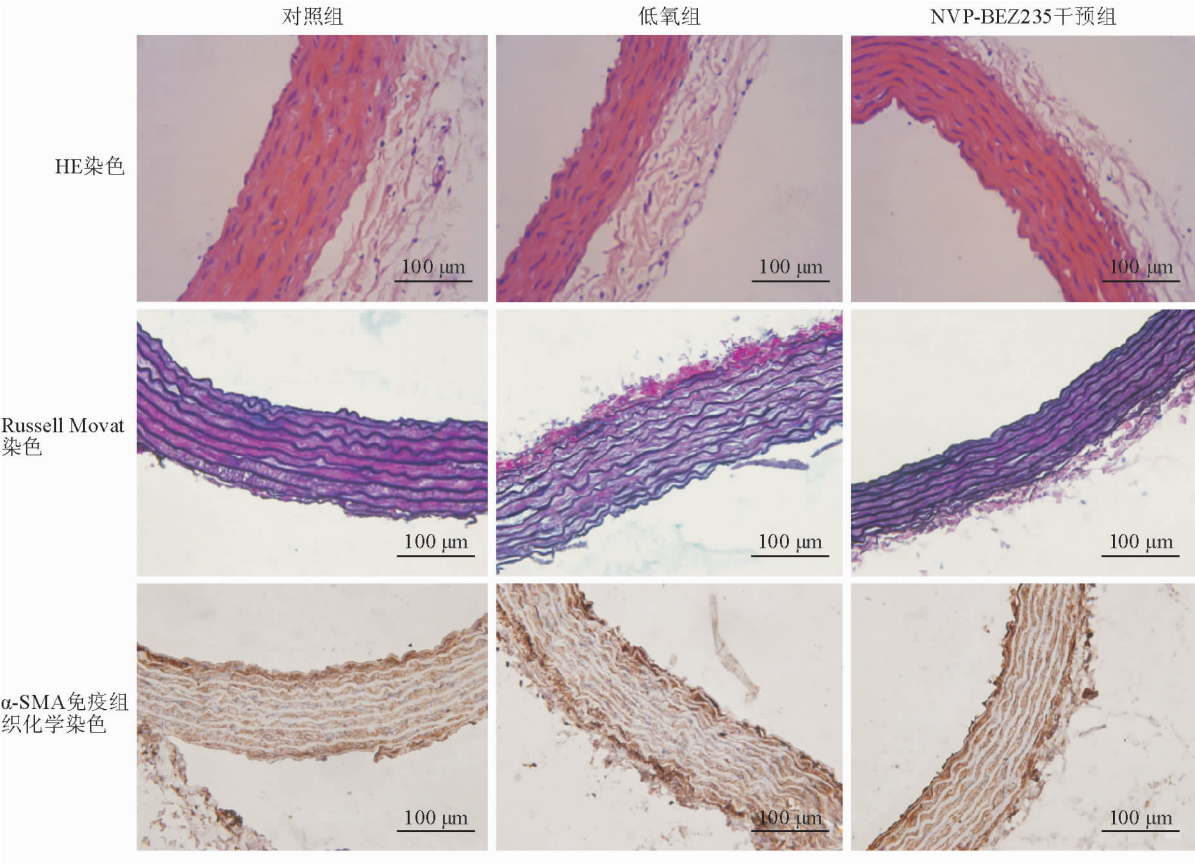
低氧可以刺激肺小动脉管壁肌化,肺动脉管壁中膜及外膜出现增生性改变,引起血管壁增厚,管腔面积减少,导致肺循环压力升高,加速肺血管和右心室重构^[7-8]。PI3K/mTOR 信号通路 with 细胞增殖、迁移、蛋白合成及血管生成等功能密切相关^[9],NVP-BEZ235 是 PI3K/mTOR 信号通路双重抑制剂,可通过对信号通路的双靶点抑制,解决部分因信号通路负反馈引发的药物效能降低问题^[6],对低氧引起的肺动脉高压及体循环改变有潜在的应用价值。在本研究中,低氧组大鼠在 21 d 低氧刺激后出现 RVW/BW 显著上升,提示低氧可以诱导大鼠右心室重构。NVP-BEZ235 干预组大鼠的右心室肥厚程度明显低于低氧组大鼠,可能与 NVP-BEZ235 通过 PI3K/mTOR 信号通路影响细胞增殖,从而缓解低氧诱导的右心室重构有关。

低氧还可以影响大鼠左室功能及室壁心肌的收缩舒张功能。适当的低氧环境训练可以提高心功能及心脏对缺血缺氧应激的适应能力,但慢性低压低氧可以引起左室功能受损^[10]。研究发现,慢性间歇性低氧可以导致左心室肥厚及体循环压力升高,也可以导致左心室心肌纤维伸缩性能降低^[1,10-11]。



注:A 为对照组;B 为低氧组;C 为 NVP-BEZ235 干预组;箭头指示心肌血管

图 1 3 组大鼠左室心肌组织 HE 染色结果(×200)



注:Russell Movat 染色弹性纤维被染为黑色;免疫组织化学染色 α-SMA 蛋白被染为棕色

图 2 3 组大鼠胸主动脉 HE 染色、Russell Movat 染色及免疫组织化学染色结果

在本研究中,低氧组大鼠在 21 d 慢性低压低氧刺激下,左室心肌细胞排列紊乱,细胞间隙增宽,心肌纤维结构改变,提示低氧可能导致左室功能下降;而 NVP-BEZ235 组大鼠左室心肌改变相对于低氧组大鼠有所减轻,提示 NVP-BEZ235 抑制 PI3L/mTOR 信号通路可能参与慢性低氧诱导的大鼠左室心肌变化。各组大鼠心肌血管的数量及管径等均未见明显变化,提示低氧条件对于冠状动脉的影响可能并不显著^[8]。

主动脉的弹性对于维持正常的体循环压力及功能至关重要。大动脉的弹性纤维主要由平滑肌

细胞产生^[12]。在本研究中对照组大鼠胸主动脉中膜层的弹力纤维及平滑肌细胞排列整齐,而低氧组平滑肌细胞增生,弹力纤维排列紊乱,胶原纤维增多,α-SMA 蛋白表达异常,核周出现空隙,这可能与胸主动脉中膜层平滑肌细胞和外膜层成纤维细胞异常增殖和分泌有关。而 NVP-BEZ235 组大鼠胸主动脉改变相对于低氧组大鼠有所减轻,提示 NVP-BEZ235 可能通过作用于 PI3K/mTOR 信号通路抑制低氧诱导下大鼠胸主动脉平滑肌的表型及分泌特性改变。

VEGF 具有诱导组织纤维化、促进血管内皮细

胞增殖及体内新生血管生成、增加血管通透性、维持血管形态及完整性的作用。在本研究中,低氧组大鼠血清 VEGF 水平显著升高,推测与内皮细胞及其他细胞功能异常有关,可能参与调控心肌及主动脉重构^[13]。而 NVP-BEZ235 可能通过抑制细胞的增殖及分泌功能来抑制 VEGF 的表达。

综上所述,NVP-BEZ235 可以抑制低氧诱导的大鼠右心室肥厚以及左心室心肌和主动脉改变,降低低氧诱导的血清 VEGF 水平的升高,其可能通过抑制 PI3K/mTOR 信号通路而发挥作用,具体机制仍有待进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] Wang H, Tian JL, Feng SZ, et al. The organ specificity in pathological damage of chronic intermittent hypoxia: an experimental study on rat with high-fat diet [J]. *Sleep Breath*, 2013, 17(3):957-965.
- [2] Douglas RM, Bowden K, Pattison J, et al. Intermittent hypoxia and hypercapnia induce pulmonary artery atherosclerosis and ventricular dysfunction in low density lipoprotein receptor deficient mice [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2013, 115(11):1694-1704.
- [3] Jain K, Suryakumar G, Prasad R, et al. Myocardial ER chaperone activation and protein degradation occurs due to synergistic, not individual, cold and hypoxic stress [J]. *Biochimie*, 2013, 95(10):1897-1908.
- [4] Carrasco-Martin C, Alonso-Orgaz S, De la Pinta JC, et al. Endothelial hypoxic preconditioning in rat hypoxic isolated aortic segments[J]. *Exp Physiol*, 2005, 90(4):557-569.
- [5] Li P, Oparil S, Feng W, et al. Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2004, 97(4):1550-1559.
- [6] Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7):1851-1863.
- [7] Nathan SD, Hassoun PM. Pulmonary hypertension due to lung disease and/or hypoxia[J]. *Clin Chest Med*, 2013, 34(4):695-705.
- [8] Nakada Y, Canseco DC, Thet S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 541(7636):222-227.
- [9] Zhang H, Gong Y, Wang Z, et al. Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PSMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(3):542-553.
- [10] Kholdani C, Fares WH, Mohsenin V. Pulmonary hypertension in obstructive sleep apnea: is it clinically significant? A critical analysis of the association and pathophysiology[J]. *Pulm Circ*, 2015, 5(2):220-227.
- [11] Hung MW, Kravtsov GM, Lau CF, et al. Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia[J]. *J Pineal Res*, 2013, 55(3):247-256.
- [12] Garat CV, Crossno JT, Sullivan TM, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling attenuates hypoxia-induced pulmonary artery remodeling and suppresses CREB depletion in arterial smooth muscle cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(6):539-548.
- [13] García-Román J, Ibarra-Sánchez A, Lamas M, et al. VEGF secretion during hypoxia depends on free radicals-induced Fyn kinase activity in mast cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 401(2):262-267.

(收稿:2017-02-06 修回:2017-06-05)

(本文编辑:胡晓静)