

基于 mTOR 通路和自噬探讨香菇多糖改善脓毒症小鼠肺损伤的作用机制

熊申明¹, 任章朋¹, 史梦婕¹, 杨宏富²

1. 新乡市中心医院(新乡医学院第四临床医院)重症医学科一区, 河南 新乡 453000

2. 郑州大学第一附属医院 重症医学科, 河南 郑州 450052

摘要: **目的** 探讨香菇多糖对脓毒症肺损伤小鼠自噬的影响及作用机制。**方法** 将 C57BL/6 小鼠分为假手术组、模型组、香菇多糖(100 mg/kg)组、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路激活剂 MHY1485(10 mg/kg)组、香菇多糖+MHY1485 组, 每组 15 只。除假手术组外, 其他组均按照盲肠结扎穿孔法构建脓毒症模型。造模成功后, 给予相对药物进行干预, 假手术组和模型组 ip 等体积的生理盐水。末次给药 24 h 后, 检测小鼠右肺中叶肺组织湿质量/干质量; ELISA 法检测小鼠肺泡灌洗液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平; 苏木素-伊红(HE)染色法检测肺组织病理变化; 透射电子显微镜(TEM)观察肺组织中自噬小体的形成; Western blotting 检测肺组织 Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3)、mTOR、磷酸化 mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)、p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)和磷酸化 p70S6K(phosphorylated p70S6K, p-p70S6K)蛋白表达情况。**结果** 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织结构破坏, 肺组织湿质量/干质量及肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和肺组织 p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), 自噬小体数量及肺组织 Beclin1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织损伤减轻, 肺组织湿质量/干质量及肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和肺组织 p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), 自噬小体数量及肺组织 Beclin1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), 而 MHY1485 组小鼠肺组织损伤加剧, 上述对应指标与香菇多糖组呈相反趋势($P < 0.05$); MHY1485 可减弱香菇多糖对脓毒症小鼠肺损伤的保护作用。**结论** 香菇多糖可能通过抑制 mTOR 通路激活自噬来发挥对脓毒症肺损伤小鼠的保护作用。

关键词: 香菇多糖; 脓毒症; 肺损伤; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路; 自噬

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)07-2071-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.016

Mechanism of lentinan on improving lung injury in septic mice based on mTOR pathway and autophagy

XIONG Shen-ming¹, REN Zhang-peng¹, SHI Meng-jie¹, YANG Hong-fu²

1. District 1, Department of Critical Care Medicine, Xinxiang Central Hospital (The Fourth Clinical Hospital of Xinxiang Medical College), Xinxiang 453000, China

2. Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of lentinan on autophagy in septic lung injury mice. **Methods** C57BL/6 mice were divided into sham group, model group, lentinan (100 mg/kg) group, mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway activator MHY1485 (10 mg/kg) group, lentinan + MHY1485 group, 15 rats in each group. Except for sham group, all other groups constructed sepsis models according to cecal ligation and perforation method. After the model was successfully built, the corresponding drugs were given for intervention, sham group and model group were ip same amount of normal saline. 24 h after the last administration, wet mass/dry mass of lung tissue in middle lobe of right lung of mouse was measured; ELISA method was used to detect interleukin-1 β (IL-1 β), (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in alveolar lavage fluid of mice; HE staining was used to detect lung tissue pathological changes; Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the formation of

收稿日期: 2021-12-24

基金项目: 2019 年河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190213)

作者简介: 熊申明(1981—), 男, 硕士, 主治医师, 从事重症医学方面研究。Tel: 18336062076 E-mail: xs1981m@163.com

autophagosomes in lung tissue; Western blotting was used to detect Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), mTOR, phosphorylated mTOR (p-mTOR), p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) and phosphorylated p70S6K (p-p70S6K) protein expression of lung tissue. **Results** Compared with sham group, lung tissue structure of mice in model group was destroyed, wet mass/dry mass of lung tissue, levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in alveolar lavage fluid, and protein expression levels of p-mTOR/mTOR, p-p70S6K/p70S6K in lung tissue were significantly increased ($P < 0.05$), number of autophagosomes and Beclin1, LC3-II/LC3-I protein expressions in lung tissue were significantly decreased ($P < 0.05$); Compared with model group, lung tissue damage of mice in lentinan group was reduced, wet mass/dry mass of lung tissue, levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in alveolar lavage fluid, and protein expression levels of p-mTOR/mTOR, p-p70S6K/p70S6K were significantly reduced ($P < 0.05$); The number of autophagosomes, and Beclin1, LC3-II/LC3-I protein expression in lung tissue were significantly increased ($P < 0.05$), while the lung tissue damage of mice in MHY1485 group was aggravated, and the corresponding indicators above showed an opposite trend to lentinan group ($P < 0.05$); MHY1485 attenuated the protective effect of lentinan on lung injury in septic mice. **Conclusion** Lentinan may play a protective effect on septic lung injury mice by inhibiting mTOR pathway and activating autophagy.

Key words: lentinan; sepsis; lung injury; mammalian target of rapamycin pathway; autophagy

脓毒症是临床实践中常见的急危重症,肺损伤是脓毒症患者最常见的伴随并发症^[1]。据报道,脓毒症引起的肺损伤涉及氧化应激、炎症、细胞焦亡和自噬等一系列指标的变化,而自噬在肺损伤中扮演着重要的角色^[2]。香菇多糖是从香菇子实体中提取的细胞壁葡聚糖,具有抗肿瘤、抗炎和免疫调节活性^[3-5]。已有研究报道,香菇多糖治疗脓毒症引起的肺损伤安全且有效^[6],但其具体作用机制尚不清楚。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路是调节自噬的关键通路,抑制该通路可激活自噬进而改善脂多糖诱导的大鼠脑炎症^[7]。因此,本研究基于 mTOR 通路探讨香菇多糖对脓毒症小鼠肺损伤的影响,旨在为脓毒症的临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 75 只,8 周龄,体重 20~22 g,购自广州锐格生物科技有限公司,许可证号 SCXK(粤)2021-0059。小鼠于 45%~55% 湿度和 12 h 光/暗循环的无菌笼中,适应性喂养 1 周。动物实验按照实验动物护理和使用指南进行,并经郑州大学第一附属医院动物伦理委员会批准(批号 2019-100802)。

1.2 药品与试剂

香菇多糖(质量分数 $\geq 98\%$,批号 190825)购自上海吉至生化科技有限公司;mTOR 通路激活剂 MHY1485(批号 190921)购自武汉纯度生物科技有限公司;白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 检测试剂盒(批号 191022)、IL-6 ELISA 检测试剂盒(批号 190817)、肿瘤坏死因子- α (tumor

necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒(批号 190711)购自南京森贝伽生物科技有限公司;兔源 Beclin1 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3)抗体、mTOR 抗体、磷酸化 mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)抗体、p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)抗体、磷酸化 p70S6K(phosphorylated p70S6K, p-p70S6K)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体及 HRP 标记的山羊抗兔二抗均购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.3 仪器

YP2002 型电子天平(北京巴古顿生物公司);3-18KS 型台式高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);DYCZ-25D 型蛋白电泳仪(北京六一仪器厂);IX53 型显微镜(日本 Olympus 公司);JEM-ARM300F 型透射电子显微镜(TEM,北京捷欧路科贸公司)。

2 方法

2.1 脓毒症模型的构建

随机选取 15 只小鼠作为假手术组,其余小鼠均按照文献方法^[8]利用盲肠结扎穿孔法建立脓毒症模型。小鼠 ip 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,然后沿腹部中线切开 1.5~2.0 cm 的切口以暴露盲肠,剥离肠系膜后,在盲肠末端的一半处用 4 号线结扎盲肠;用 21 号无菌针在结扎远端 1 cm 处进行盲肠穿孔,然后进行伤口缝合;术后,以 1 mL 37 °C 的生理盐水进行液体复苏。假手术组仅打开腹腔,游离盲肠,不结扎穿孔。观察小鼠一般情况,当小鼠出现活动减少、饮水减少、萎靡不振、呼吸急促等现象代表脓毒症小鼠模型构建成功。

2.2 分组及给药

小鼠造模成功 12 h 后, 将脓毒症小鼠随机分为模型组、香菇多糖 (100 mg/kg)^[9]组、MHY1485 (10 mg/kg)^[10]组、香菇多糖+MHY1485 组。各给药组 ip 相应药物 (10 mL/kg), 假手术组和模型组 ip 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 7 d。

末次给药 24 h 后, 每组选取 3 只小鼠用于肺组织湿质量/干质量的测定, 每组选取 3 只小鼠用于肺泡灌洗液的收集, 将剩余小鼠的肺组织分为 3 部分, 一部分用于自噬小体的观察, 一部分用于苏木素-伊红 (HE) 染色, 一部分用于 Western blotting 实验。

2.3 小鼠肺组织湿质量/干质量的测定

每组选取 3 只小鼠, 脱颈椎处死小鼠后, 完整取出肺组织, 取大鼠右肺中叶, 吸去表面水分, 称定湿质量, 60 °C 烘箱中烘干 48 h, 称定干质量, 计算肺组织湿质量/干质量。

2.4 ELISA 法检测小鼠肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平

每组选取 3 只小鼠, 脱颈椎处死, 打开胸腔, 结扎右肺, 在近端气管处向小鼠左肺泡内缓慢注入预冷的生理盐水, 然后缓慢抽出, 重复 4 次, 收集肺泡灌洗液后离心并收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.5 HE 染色检测小鼠肺组织病理变化

将肺组织固定在 4% 多聚甲醛中, 然后以石蜡包埋并切成 5 μ m 的切片, 将切片用苏木精染色 5 min, 伊红染色 3 min; 再将组织切片在梯度乙醇中脱水并用中性树脂密封, 于显微镜下观察小鼠肺组织病理变化, 并对炎性细胞浸润进行评分, 评分标准参照文献方法^[11], 0 分表示无炎症细胞浸润, 1 分表示轻度炎性浸润, 3 分表示中度炎性浸润, 5 分表示重度炎性浸润。

2.6 TEM 观察小鼠肺组织中自噬小体的形成

用戊二醛固定肺组织, 经梯度乙醇脱水后, 将肺组织包埋在环氧树脂中, 用切片将包埋的肺组织切片切成 50~70 nm 厚的切片, 用柠檬酸铅染色, 于 TEM 下观察自噬小体的形成情况。

2.7 Western blotting 法检测肺组织 Beclin1、LC3、mTOR、p-mTOR、p70S6K 和 p-p70S6K 蛋白表达

用 RIPA 裂解缓冲液裂解并提取肺组织总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测量蛋白质量浓度, 将等量的蛋白质样品经电泳、转膜、封闭后, 分别加入 Beclin1、LC3、mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 和

GAPDH 抗体 (1:1000), 4 °C 孵育过夜, 然后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 采用 ECL 化学发光试剂盒观察蛋白显色情况, 通过 Image J 软件分析条带灰度值。

2.8 统计分析

所有结果均表示为 $\bar{x} \pm s$, 使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两组间比较采用 snk-*q* 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠肺组织湿质量/干质量

如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织湿质量/干质量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织湿质量/干质量显著降低 ($P < 0.05$), MHY1485 组小鼠肺组织湿质量/干质量显著升高 ($P < 0.05$); 与香菇多糖组比较, 香菇多糖+MHY1485 组小鼠肺组织湿质量/干质量显著升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织湿质量/干质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Comparison of wet mass/dry mass of lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	湿质量/干质量
假手术	—	3.87 ± 0.34
模型	—	6.95 ± 0.67 [#]
香菇多糖	100	4.56 ± 0.42 [*]
MHY1485	10	9.26 ± 0.88 [*]
香菇多糖+MHY1485	100+10	6.45 ± 0.57 [△]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与香菇多糖组比较: [△] $P < 0.05$, 下表同

[#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs lentinan group, same as below tables

3.2 各组小鼠肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平

如表 2 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$), MHY1485 组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与香菇多糖组比较, 香菇多糖+MHY1485 组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.3 各组小鼠肺组织病理变化

如图 1 所示, 假手术组小鼠肺组织结构正常, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织结构破坏, 肺

表2 各组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α in alveolar lavage fluid of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	15.58 ± 1.08	11.75 ± 1.01	75.54 ± 6.84
模型	—	84.45 ± 5.27 [#]	70.63 ± 4.52 [#]	286.54 ± 9.84 [#]
香菇多糖	100	29.92 ± 2.11 [*]	23.34 ± 2.07 [*]	112.27 ± 7.58 [*]
MHY1485	10	123.34 ± 8.67 [*]	98.35 ± 7.08 [*]	345.59 ± 11.24 [*]
香菇多糖+MHY1485	100+10	76.63 ± 5.31 [△]	62.34 ± 4.11 [△]	243.34 ± 8.67 [△]

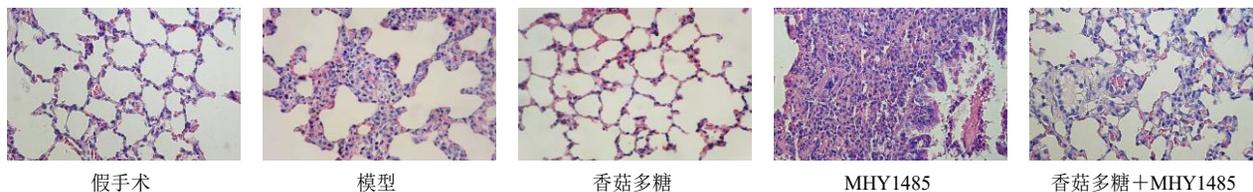


图1 各组小鼠肺组织 HE 染色结果 (HE, ×200)

Fig. 1 HE staining results of lung tissues of mice in each group (HE, × 200)

间质增厚, 有大量炎性细胞浸润; 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织损伤减轻, 炎性细胞浸润减少, 而 MHY1485 组小鼠肺组织损伤加剧; 与香菇多糖组比较, 香菇多糖+MHY1485 组小鼠的肺组织肺间质增厚和炎性细胞浸润加重。

如表3所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织炎症评分显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织炎症评分显著降低 ($P < 0.05$), MHY1485 组小鼠肺组织炎症评分显著升高 ($P < 0.05$); 与香菇多糖组比较, 香菇多糖+MHY1485 组小鼠肺组织炎症评分显著升高 ($P < 0.05$)。

3.4 各组小鼠肺组织中自噬小体形成情况

如图2所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织中自噬小体数量显著降低 ($P < 0.05$); 与模型

表3 各组小鼠肺组织炎症评分 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Lung tissue inflammation scores of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	炎症评分
假手术	—	0.00
模型	—	3.78 ± 0.21 [#]
香菇多糖	100	1.23 ± 0.12 [*]
MHY1485	10	4.72 ± 0.25 [*]
香菇多糖+MHY1485	100+10	3.21 ± 0.18 [△]

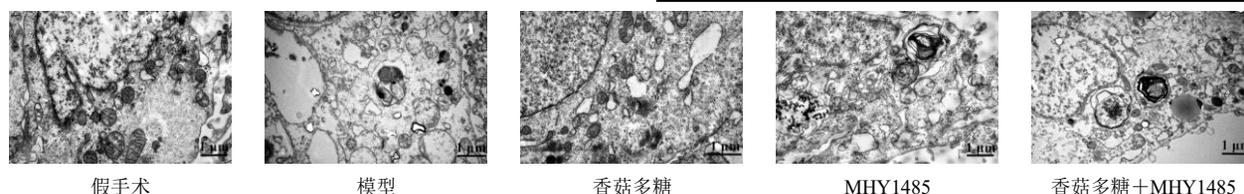


图2 TEM 观察各组小鼠肺组织中自噬小体的形成

Fig. 2 Autophagosome formation in lung tissue of mice in each group by TEM

组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织中自噬小体的数量显著增加 ($P < 0.05$), MHY1485 组小鼠肺组织中自噬小体的数量显著减少 ($P < 0.05$); 与香菇多糖组比较, 香菇多糖+MHY1485 组小鼠肺组织中自噬小体的数量显著减少 ($P < 0.05$)。

3.5 各组小鼠肺组织中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 表达情况

如图3和表4所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织中 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织中 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达

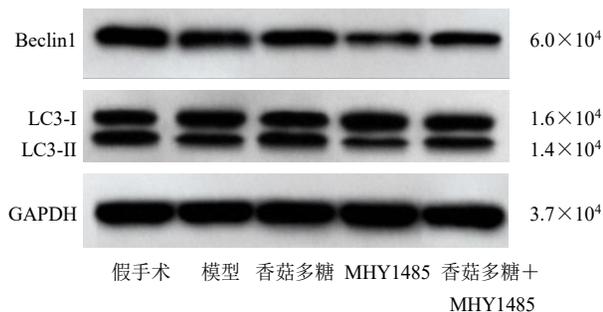


图3 各组小鼠肺组织中自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3 表达情况

Fig. 3 Autophagy-related proteins Beclin1 and LC3 expressions in lung tissue of mice in each group

表 4 各组小鼠肺组织中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Comparison of expression of autophagy-related proteins Beclin1 and LC3 in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		Beclin1/GAPDH	LC3-II/LC3-I
假手术	—	0.75±0.05	1.15±0.12
模型	—	0.34±0.02 [#]	0.63±0.04 [#]
香菇多糖	100	0.64±0.04 [*]	0.81±0.07 [*]
MHY1485	10	0.12±0.01 [*]	0.30±0.02 [*]
香菇多糖+MHY1485	100+10	0.45±0.03 [△]	0.56±0.03 [△]

水平显著升高 ($P < 0.05$), MHY1485 组小鼠肺组织中 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与香菇多糖组比较, 香菇多糖+MHY1485 组小鼠肺组织中 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.6 各组小鼠肺组织中 mTOR 通路相关蛋白表达情况

如图 4 和表 5 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织中 p-mTOR/mTOR 和 p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织中 p-mTOR/mTOR 和 p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), MHY1485 组小鼠肺组织中 p-mTOR/mTOR 和 p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与香菇多糖组比较, 香菇多糖+MHY1485 组小鼠肺组织中 p-mTOR/mTOR 和 p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

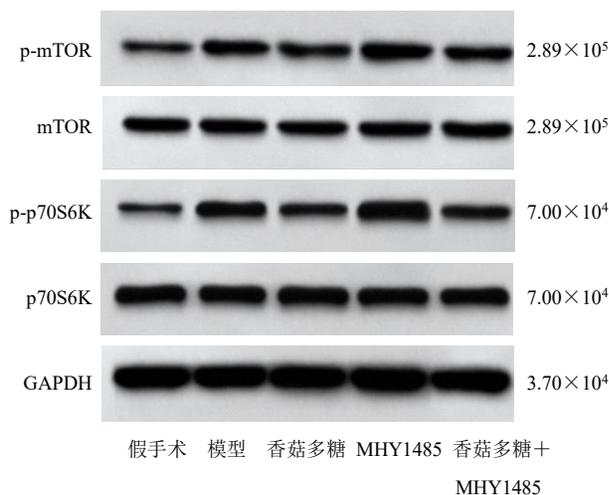


图 4 各组小鼠肺组织中 mTOR 通路相关蛋白表达情况
Fig. 4 mTOR pathway related protein expression in lung tissue of mice in each group

表 5 各组小鼠肺组织中 mTOR 通路相关蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 mTOR pathway-related protein expression in lung tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		p-mTOR/mTOR	p-p70S6K/p70S6K
假手术	—	0.18±0.01	0.26±0.02
模型	—	0.75±0.06 [#]	0.94±0.07 [#]
香菇多糖	100	0.34±0.03 [*]	0.46±0.04 [*]
MHY1485	10	0.98±0.07 [*]	1.25±0.11 [*]
香菇多糖+MHY1485	100+10	0.66±0.05 [△]	0.72±0.05 [△]

4 讨论

脓毒症是世界上最致命的疾病之一, 通常会致多器官衰竭, 主要由于不受控制的炎症反应引起。肺是脓毒症期间最脆弱和最关键的器官, 肺损伤是一种常见的脓毒症诱发的炎症性疾病^[12]。本研究通过盲肠结扎穿孔法构建脓毒症小鼠模型, 结果发现, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织湿质量/干质量以及肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高, 肺组织结构破坏, 肺间质增厚, 有大量炎性细胞浸润, 表明脓毒症模型小鼠肺组织破坏严重, 炎症反应剧烈, 肺功能异常。细胞自噬可以通过形成与溶酶体融合的双膜自噬体来非选择性或选择性地清除受损的蛋白质和细胞器^[13]。Beclin-1 和 LC3 是自噬的关键蛋白, Beclin-1 与 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶相互作用以启动自噬并参与涉及自噬体与溶酶体融合的后继步骤, LC3 有 LC3-I、LC3-II 2 种形式, 主要参与自噬体的形成^[14-15]。本研究发现, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织中自噬小体数量显著降低, Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达显著降低, 表明脓毒症模型小鼠肺组织中存在保护性自噬被抑制的现象。

香菇多糖是一种中药提取物, 对脓毒症具有一定的改善作用。研究发现, 香菇多糖对脓毒症大鼠急性肾损伤具有一定的保护作用, 其机制与抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的激活有关^[16]; 香菇多糖能有效改善脓毒症引起的肺水肿, 减轻肺损伤^[17]; 香菇多糖能有效改善脓毒症急性肾损伤小鼠的肾功能, 抑制肾组织细胞凋亡^[18]。本研究发现, 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织损伤减轻, 炎性细胞浸润减少, 小鼠肺组织湿质量/干质量及肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低, 自噬小体的数量及 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达显著升高, 表明香菇多糖可通过抑制炎症反

应, 促进保护性自噬来改善脓毒症小鼠的肺损伤。

mTOR 是一种进化上保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 参与多种生物过程, 包括细胞增殖、自噬、蛋白质合成和代谢, 抑制 mTOR 下游关键激酶 p70S6K 的激活可以促进自噬^[19]。据报道, 雷帕霉素可通过抑制 mTOR 和 p70S6K 的表达, 减轻炎症因子和氧化应激损伤, 从而对脂多糖诱导的急性肺损伤发挥保护作用^[20]; 蛇床子素对碘海醇所致肾损伤大鼠模型具有保护作用, 与其抑制 mTOR/p70S6K 信号通路活性, 激活自噬有关^[21]; 雷帕霉素通过抑制 mTOR/p70S6K 信号通路激活自噬减轻碘克沙醇糖尿病大鼠肾损伤^[22]。本研究发现, 与假手术组比较, 模型组小鼠肺组织中 p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著升高; 与模型组比较, 香菇多糖组小鼠肺组织中 p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著降低, 推测香菇多糖可能通过抑制 mTOR 通路激活自噬来发挥对脓毒症肺损伤小鼠的保护作用。为了验证该推测, 本研究利用 mTOR 通路激活剂 MHY1485 进行干预, 结果发现, 与模型组比较, MHY1485 组小鼠肺组织中 p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达水平显著升高, 小鼠肺组织损伤加剧, 肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高, 自噬小体的数量及 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 蛋白表达显著降低; 与香菇多糖组比较, 香菇多糖 + MHY1485 组小鼠对应指标与上述趋势相同, 证实香菇多糖可能通过抑制 mTOR 通路激活自噬来发挥对脓毒症肺损伤小鼠的保护作用。

综上所述, 香菇多糖可能通过抑制 mTOR 通路激活自噬, 从而发挥对脓毒症肺损伤小鼠的保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Luo S, Ding X F, Zhao S Q, *et al.* Long non-coding RNA CHRF accelerates LPS-induced acute lung injury through microRNA-146a/Notch1 axis [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(16): 1299.
- [2] Chen S, Ding R Y, Hu Z W, *et al.* microRNA-34a inhibition alleviates lung injury in cecal ligation and puncture induced septic mice [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1829.
- [3] Lv Q W, Gu Y P, Qi Y, *et al.* Effects of lentinan on NF- κ B activity in the liver of burn rats with sepsis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2279-2283.
- [4] 苏畅, 李小江, 贾英杰, 等. 香菇多糖的抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1499-1504.
- [5] 符映均, 高欣, 田振, 等. 香菇多糖对肿瘤微环境免疫调节作用的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(9): 2870-2875.
- [6] Masterson C H, Murphy E J, Gonzalez H, *et al.* Purified β -glucans from the Shiitake mushroom ameliorates antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*-induced pulmonary sepsis [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2020, 71(4): 405-412.
- [7] Li G M, Liu S S, Wang H L, *et al.* Ligustrazine ameliorates lipopolysaccharide-induced neurocognitive impairment by activating autophagy via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(6): 1711-1720.
- [8] 李云鹏, 杨玉丹, 郭胜存, 等. 萝卜硫素对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(8): 1106-1110.
- [9] 章静, 杨成伟, 王云, 等. 香菇多糖对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(10): 1463-1468.
- [10] Zhou J L, Yao W, Li C Y, *et al.* Administration of follicle-stimulating hormone induces autophagy via upregulation of HIF-1 α in mouse granulosa cells [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e3001.
- [11] 俞江灏, 周金山, 蒋晓宁, 等. 天麻素通过抑制 TLR4/ASK1 信号减轻脓毒症小鼠的肺脏炎症 [J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2520-2524.
- [12] Hwang J S, Kim K H, Park J, *et al.* Glucosamine improves survival in a mouse model of sepsis and attenuates sepsis-induced lung injury and inflammation [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(2): 608-622.
- [13] Wu Y, Yao Y M, Lu Z Q. Mitochondrial quality control mechanisms as potential therapeutic targets in sepsis-induced multiple organ failure [J]. *J Mol Med*, 2019, 97(4): 451-462.
- [14] Zhao Y, Feng X J, Li B, *et al.* Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by enhancing autophagy through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 128.
- [15] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [16] Li X P, Zhang W F, Li P, *et al.* The protective effect and mechanism of lentinan on acute kidney injury in septic rats [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14): 883.

- [17] 巫莉萍, 薛小燕, 温建东. 香菇多糖对脓毒症大鼠模型肺水代谢的影响研究 [J]. 江西医药, 2020, 55(8): 1061-1063.
- [18] 杨舒楠, 肖芳, 玄春月, 等. 香菇多糖对脓毒症小鼠急性肾损伤的影响 [J]. 华北理工大学学报: 医学版, 2017, 19(6): 443-446.
- [19] Sun X W, Wang D Y, Zhang T T, *et al.* Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy via AMPK-mTOR-P70S6K pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 84.
- [20] 佟雪超, 邵美琪, 陈达. 雷帕霉素对脂多糖诱导急性肺损伤的保护作用及可能机制研究 [J]. 解剖科学进展, 2021, 27(4): 421-424.
- [21] 李海川, 于洋, 周南, 等. 蛇床子素对碘海醇所致大鼠急性肾损伤的保护作用及可能机制 [J]. 解剖科学进展, 2021, 27(1): 5-8.
- [22] Wang Y, Zhang H Y, Pang T S, *et al.* Rapamycin improves renal injury induced by iodixanol in diabetic rats by deactivating the mTOR/p70S6K signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118284.

[责任编辑 李亚楠]