

乙酰半胱氨酸抑制 mTOR/HIF-1 α 通路减轻慢性阻塞性肺疾病大鼠氧化应激的机制研究

杨博斐^{1,2} 宋雨薇^{1,2} 王茜茜^{1,2} 张蓝熙^{1,2} 秦燕勤^{1,2}

¹ 河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450046; ² 河南中医药大学 河南省中医药防治呼吸病重点实验室 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046

通信作者: 秦燕勤, Email: qinyanqin1990@126.com

【摘要】 目的 探讨乙酰半胱氨酸(NAC)调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)通路干预慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠氧化应激的作用机制。**方法** 按随机数字表法将 36 只 SD 大鼠分为正常组、COPD 模型组、NAC 处理组, 每组 12 只。采用香烟烟雾暴露联合肺炎克雷伯杆菌感染 8 周制备 COPD 大鼠模型。模型制备后给予 NAC 54 mg/kg 灌胃, 每日 1 次, 持续 8 周; 正常组和模型组给予等量纯水灌胃。采用苏木素-伊红(HE)染色法观察 NAC 对肺组织病理变化的影响。硫代巴比妥酸法(TBA)检测血清及肺组织中丙二醛(MDA)含量, 羟胺法检测血清及肺组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性, 比色法检测血清及肺组织中脂质过氧化物(LPO)、总抗氧化能力(T-AOC)水平。转录组学测序分析差异表达基因, 预测 NAC 抑制 COPD 氧化应激的潜在机制。分子对接观察 NAC 与 mTOR/HIF-1 α 通路关键蛋白的结合度。用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肺组织 mTOR/HIF-1 α 通路相关蛋白表达。**结果** 与正常组比较, COPD 模型组肺组织损伤, 平均肺泡数(MAN)减少, 肺泡平均截距(MLI)升高, 血清和肺组织中 MDA、LPO 水平增加, 血清 T-SOD 水平减少, 肺组织 T-AOC 降低。与 COPD 模型组比较, NAC 处理可改善 COPD 大鼠肺组织损伤, 降低血清和肺组织中 MDA、LPO 水平[血清 MDA(nmol/mg): 4.10 ± 2.27 比 8.06 ± 1.92 , 血清 LPO($\mu\text{mol/L}$): 1.88 ± 0.59 比 2.88 ± 0.82 , 肺组织 MDA(nmol/mg): 2.58 ± 1.11 比 4.03 ± 1.05 , 肺组织 LPO($\mu\text{mol/L}$): 5.98 ± 1.30 比 9.74 ± 3.58 , 均 $P < 0.05$], 升高血清中 T-SOD 活性(U/mg: 10.80 ± 0.53 比 9.66 ± 0.46 , $P < 0.05$)。转录组学分析结果显示, NAC 抑制 COPD 抗氧化应激与调控 HIF-1 α 通路有关; 分子对接结果显示, NAC 与 mTOR、p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)、HIF-1 α 有潜在结合活性。Western blotting 检测结果显示, NAC 处理可降低 COPD 模型大鼠肺组织 mTOR 在 Ser2448 位点、p70S6K 在 Ser371 位点的磷酸化水平[p-mTOR/mTOR(相对表达量): 1.46 ± 0.31 比 2.62 ± 0.30 , p-p70S6K/p70S6K(相对表达量): 2.15 ± 0.25 比 3.80 ± 0.73 , 均 $P < 0.05$], 降低 HIF-1 α 的表达[HIF-1 α /GAPDH(相对表达量): 0.82 ± 0.22 比 1.37 ± 0.25 , $P < 0.05$]。**结论** NAC 可通过抑制 mTOR/HIF-1 α 通路减轻 COPD 大鼠氧化应激。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病; 乙酰半胱氨酸; 氧化应激; mTOR/HIF-1 α 通路

基金项目: 国家自然科学基金(82104662); 河南省自然科学基金(252300420126)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20260107-00016

Study on the mechanism of N-acetylcysteine in alleviating oxidative stress by inhibiting the mTOR/HIF-1 α pathway in chronic obstructive pulmonary disease rats

Yang Bofei^{1,2}, Song Yuwei^{1,2}, Wang Xiqi^{1,2}, Zhang Lanxi^{1,2}, Qin Yanqin^{1,2}

¹Henan University of Chinese Medicine, Academy of Chinese Medical Sciences, Zhengzhou 450046, China; ²Henan University of Chinese Medicine, Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Disease Co-Constructed by Henan Province & Education Ministry of P.R. China, Zhengzhou 450046, China

Corresponding author: Qin Yanqin, Email: qinyanqin1990@126.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism by which N-acetylcysteine (NAC) regulates the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1 α (mTOR/HIF-1 α) pathway to intervene in oxidative stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Thirty-six SD rats were divided into the normal group, COPD model group and NAC treatment group by random number table method, with 12 rats in each group. The COPD rat model was established by cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella pneumoniae* infection for 8 weeks. After the model was prepared, NAC was administered by oral gavage at a dose of 54 mg/kg once daily for 8 weeks. The normal group and the COPD model group were given the same amount of pure water by gavage. The effect of NAC on the pathological changes of lung tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The content of malondialdehyde (MDA) in serum and lung tissue was detected by the thiobarbituric acid method (TBA), the activity of total superoxide dismutase (T-SOD) in serum and lung tissue was detected by the hydroxylamine method, and the levels of lipid peroxide (LPO) and total antioxidant capacity (T-AOC) in serum and lung tissue were detected by colorimetry. Transcriptomic sequencing was used to analyze differentially expressed genes and predict the potential mechanism by which NAC

inhibits oxidative stress in COPD. Molecular docking was used to observe the binding degree of NAC with the key proteins of the mTOR/HIF-1 α pathway. Western blotting was used to detect the expression of proteins related to the mTOR/HIF-1 α pathway in the lung tissue. **Results** Compared with the normal group, the mean alveolar number (MAN) in lung tissue decreased, the mean linear intercept (MLI) increased, the levels of MDA and LPO in serum and lung tissue increased, the level of T-SOD in serum decreased, and the T-AOC in lung tissue decreased in the COPD model group. Compared with the COPD model group, NAC could improve lung tissue damage in COPD rats, and reduce the levels of MDA and LPO in serum and lung tissue [serum MDA (nmol/mg): 4.10 ± 2.27 vs. 8.06 ± 1.92 , serum LPO ($\mu\text{mol/L}$): 1.88 ± 0.59 vs. 2.88 ± 0.82 , lung tissue MDA (nmol/mg): 2.58 ± 1.11 vs. 4.03 ± 1.05 , lung tissue LPO ($\mu\text{mol/L}$): 5.98 ± 1.30 vs. 9.74 ± 3.58 , all $P < 0.05$], increased T-SOD activity in serum (U/mg: 10.80 ± 0.53 vs. 9.66 ± 0.46 , $P < 0.05$). The results of transcriptomic analysis showed that the inhibition of antioxidant stress in COPD by NAC was related to the regulation of the HIF-1 α pathway. The results of molecular docking showed that NAC had potential binding activity with mTOR, p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), and HIF-1 α . The Western blotting data showed that NAC treatment could reduce the phosphorylation levels of mTOR at Ser2448 and p70S6K at Ser371 in the lung tissue of COPD model rats [p-mTOR/mTOR (relative expression level): 1.46 ± 0.31 vs. 2.62 ± 0.30 , p-p70S6K/p70S6K (relative expression level): 2.15 ± 0.25 vs. 3.80 ± 0.73 , both $P < 0.05$], decreased the expression of HIF-1 α [HIF-1 α /GAPDH (relative expression level): 0.82 ± 0.22 vs. 1.37 ± 0.25 , $P < 0.05$]. **Conclusion** NAC can alleviate oxidative stress in COPD rats by inhibiting the mTOR/HIF-1 α pathway.

[Key words] Chronic obstructive pulmonary disease; N-acetylcysteine; Oxidative stress; mTOR/HIF-1 α pathway

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82104662); Natural Science Foundation of Henan Province of China (252300420126)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20260107-00016

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以气道和(或)肺泡异常引起的慢性呼吸道症状及进行性气流受限为特征的异质性肺部疾病,气流受限不完全可逆^[1-2]。COPD 发病率、致残率、病死率高,现已成为全球第三大死亡原因^[3]。COPD 病理机制复杂,诸多证据表明,氧化应激是驱动 COPD 发生发展的重要机制^[4]。肺脏是较易受氧化应激攻击的靶器官之一,香烟烟雾和颗粒物等外源性刺激,以及免疫细胞和结构细胞产生的内源性氧化物都会引起 COPD 患者肺部氧化应激^[5]。同时,多种抗氧化酶在内外因素刺激下失活,抗氧化能力下降,进一步加重氧化-抗氧化失衡,造成肺组织损伤^[6]。此外,氧化应激还会促进慢性炎症反应,加剧 COPD 的进展^[7]。因此,抑制氧化应激和恢复氧化-抗氧化平衡可能是一种治疗 COPD 的有效策略。

研究发现,使用谷胱甘肽生成型抗氧化剂,如乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)、羧甲基半胱氨酸和厄多司坦等,可减少 COPD 患者的急性加重次数^[8]。NAC 主要作为祛痰剂,用于治疗慢性支气管炎、COPD 等疾病引起的痰液难以咳出的情况。与其他黏液调节药物不同, NAC 在临床前和临床报告中均被证实具有较好的抗氧化和抗炎活性^[9]。作为谷胱甘肽的前体, NAC 通过游离巯基中和体内的自由基可减轻氧化应激^[10-11],但其作用机制尚不清楚。

COPD 氧化应激机制复杂,涉及多条信号通路。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路是介导氧化应激的重要途

径。香烟烟雾、细菌及大气颗粒物等外源性刺激均可激活 mTOR,引起下游 p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)磷酸化,进而促进缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的蛋白合成及核转位,调节细胞增殖、迁移、自噬及蛋白质合成、营养物质代谢、生长因子信号转导等多种生物学过程^[12-13]。研究发现,抑制 mTOR 可以调节非缺氧和缺氧细胞中的 HIF-1 α 表达^[14],靶向 mTOR/HIF-1 α /糖酵解通路可抑制炎症反应,缓解急性肺损伤^[15]。本课题组前期研究结果显示, COPD 模型大鼠氧化应激水平显著升高, NAC 可有效抑制丙二醛(malondialdehyde, MDA)的产生,增强总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)活性^[16-17],但其作用还有待进一步研究。

本研究在前期研究的基础上,以香烟烟雾暴露联合细菌感染制备 COPD 大鼠模型,从病理变化、氧化-抗氧化失衡、mTOR/HIF-1 α 通路相关指标表达等方面,探讨 NAC 抑制 COPD 氧化应激的机制,旨在为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物: SPF 级 SD 大鼠 36 只,8 周龄,体重(200 $\pm$ 20)g,雌雄各半,购于河南省实验动物中心,实验动物许可证号:SYXK(豫)2015-0004,实验动物质量合格证号:41003100005517。饲养环境维持在(22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,日温差 $\leq 3^{\circ}\text{C}$,湿度维持在

50%~60%,采用 12 h/12 h 明暗交替照明。

1.1.2 香烟:红旗渠过滤嘴香烟,由河南中烟工业有限责任公司生产,烤烟型,焦油含量 11 mg,烟气烟碱含量 0.9 mg,烟气一氧化碳含量 11 mg。

1.1.3 细菌:肺炎克雷伯杆菌(菌株号:46117),由中国食品药品检定研究院中国医学细菌保藏管理中心提供。

1.1.4 主要药品与试剂:NAC 为海南赞邦制药有限公司产品,使用前将药片研成细粉,用纯水配制成 4 g/L 的混悬液。苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂由国药集团化学试剂有限公司提供;苏木素染色液由武汉赛维尔生物科技有限公司提供;MDA、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒和二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)、T-SOD 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所;10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测试剂盒、增强型化学发光超敏显色试剂盒购于上海雅酶生物医药科技有限公司;mTOR 一抗为美国 GeneTex 公司产品;磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)一抗、p70S6K 一抗为上海斯塔特生物科技有限公司产品;磷酸化 p70 核糖体蛋白 S6 激酶(phosphorylated p70 ribosomal protein S6 kinase, p-p70S6k)一抗、内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为美国 Cell Signaling Technology 公司产品;HIF-1 α 一抗为美国 GeneTex 公司产品;辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗为美国 ProteintechGroup 公司产品。

1.2 动物分组:采用随机数字表法将 36 只大鼠分为正常组、COPD 模型组、NAC 处理组,每组 12 只。

1.3 COPD 模型制备:采用香烟烟雾暴露联合反复细菌感染的方法复制 COPD 稳定期大鼠模型。第 1~8 周,对大鼠进行香烟烟雾暴露,烟雾浓度大于 3×10^{-3} ,每次 40 min,每日 2 次,间隔 3 h 以上;经鼻腔滴入 6×10^8 CFU/mL 的肺炎克雷伯杆菌菌液 0.1 mL,5 d 1 次。

1.4 大鼠分组处理:自第 9 周第 1 天起,NAC 组大鼠给予 NAC 灌胃 54 mg/kg,每日 1 次,持续给药 8 周;正常组和 COPD 模型组给予等量纯水灌胃。NAC 灌胃剂量采用等效剂量系数换算公式计算。 $D_{\text{大鼠}} = D_{\text{人}} \times (HI_{\text{大鼠}}/HI_{\text{人}}) \times (W_{\text{大鼠}}/W_{\text{人}}) \times 2/3$ 。式中,

D 代表剂量,HI 代表体型系数,W 代表体质量。每周称 1 次体质量,计算本周灌胃药量。

本实验中动物处置方法符合伦理学要求,实验过程通过河南中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审查批准(审批号:DWLL202103161)。

1.5 检测指标及方法:药物干预结束后取材,用 10% 戊巴比妥钠 0.4 mL/kg 麻醉大鼠后经腹主动脉采血,分离血清,并取肺组织。

1.5.1 肺组织病理观察:用 10% 多聚甲醛灌注左肺 20 min,固定 72 h,24 h 更换 1 次多聚甲醛。于肺门斜向上、向下 45° 切取约 3 mm 厚的组织进行石蜡包埋,切取 4 μ m 厚切片进行 HE 染色,用浓度梯度(75%、85%、95%、100%)乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光镜下观察肺组织病理变化,统计平均肺泡数(mean alveolar number, MAN),并计算肺泡平均截距(mean linear intercept, MLI)。

1.5.2 氧化应激相关指标检测:硫代巴比妥酸法检测血清及肺组织研磨液中 MDA 含量,羟胺法检测 T-SOD 活性,比色法检测 LPO、T-AOC 水平,操作均严格按照试剂盒说明书步骤进行。

1.5.3 转录组学分析:提取各组大鼠肺组织总 RNA,进行全基因组高通量测序,获取全基因组的表达数据,使用 DESeq2 软件进行分析,将识别出的显著差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析及基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA),筛选 NAC 可能的作用途径。

1.5.4 分子对接:从 PubChem 数据库下载 mTOR/HIF-1 α 通路关键蛋白 p70S6K、HIF-1 α 、mTOR 的结构;选定中心靶标,从 RCSB 数据库下载 NAC 结构;将受体文件导入 AutoDockTools 软件;用 PyMOL 软件删除水分子并向受体添加氢原子;通过 Autodockvina 软件进行分子对接;最后根据对接结果,使用 PyMOL 软件对具有良好结合能力的复合物进行可视化。

1.5.5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 mTOR/HIF-1 α 通路相关蛋白表达:每组随机选取 6 只大鼠,取 100 mg 肺组织,加入 RIPA 裂解液充分研磨,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上,封闭 2 h,依次进行一抗(1:1 000)、二抗(1:10 000)孵育。使

用增强型化学发光超敏显色试剂盒显色, BIO-RAD 凝胶成像系统曝光成像。采用 Image J 软件测定灰度值, 计算 p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 和 HIF-1 α /GAPDH 的相对表达量。

1.6 统计学处理: 实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。计量资料均呈正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD 法, 若方差不齐则先进行对数转换, 再采用 LSD 法。显著性水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 NAC 显著改善 COPD 大鼠肺组织病理损伤: 图 1 和表 1 结果显示, 正常组大鼠肺泡壁结构完整。COPD 模型组大鼠肺泡间隔断裂融合、肺泡腔变大, 肺气肿征象明显, 并伴有炎症细胞浸润; MAN 较正常组减少, MLI 较正常组增大 (均 $P < 0.05$)。与 COPD 模型组比较, NAC 处理组大鼠肺组织病理变化有所改善, 其 MAN 升高, MLI 降低 (均 $P < 0.05$)。

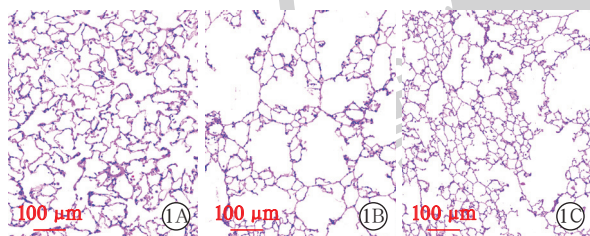


图 1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理变化 正常组 (A) 肺泡结构完整; 慢性阻塞性肺疾病模型组 (B) 肺泡断裂融合明显; 乙酰半胱氨酸处理组 (C) 肺泡结构有所改善 苏木素-伊红 (HE) 染色 低倍放大

表 1 各组大鼠 MAN、MLI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	MAN (个/mm ²)	MLI (μ m)
正常组	6	189.88 $\pm$ 10.59	44.77 $\pm$ 5.87
COPD 模型组	6	87.73 $\pm$ 15.24 ^a	90.02 $\pm$ 11.96 ^a
NAC 处理组	6	182.87 $\pm$ 17.32 ^b	40.75 $\pm$ 2.47 ^b
F 值		90.960	73.380
P 值		<0.001	<0.001

注: COPD 为慢性阻塞性肺疾病, NAC 为乙酰半胱氨酸, MAN 为平均肺泡数, MLI 为肺泡平均截距; ^a 与正常组比较, $P < 0.05$; ^b 与 COPD 模型组比较, $P < 0.05$

2.2 NAC 显著抑制 COPD 大鼠的氧化应激: 表 2 结果显示, 与正常组比较, COPD 模型组大鼠血清及肺组织中 MDA、LPO 水平均升高 (均 $P < 0.05$), 血清中 T-SOD 和肺组织中 T-AOC 水平均降低 (均 $P < 0.05$)。与 COPD 模型组比较, NAC 处理组大鼠血清及肺组织中 MDA、LPO 水平均降低 (均 $P < 0.05$), 血清中 T-SOD 水平升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清和肺组织中氧化应激指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	血 MDA (nmol/mg)	血 T-SOD (U/mg)	血 LPO (μ mol/L)	血 T-AOC (U/mg)
正常组	6	2.37 $\pm$ 0.80	10.74 $\pm$ 0.46	1.15 $\pm$ 0.27	0.24 $\pm$ 0.02
COPD 模型组	6	8.06 $\pm$ 1.92 ^a	9.66 $\pm$ 0.46 ^a	2.88 $\pm$ 0.82 ^a	0.24 $\pm$ 0.02
NAC 处理组	6	4.10 $\pm$ 2.27 ^b	10.80 $\pm$ 0.53 ^b	1.88 $\pm$ 0.59 ^b	0.21 $\pm$ 0.01
F 值		16.220	10.740	12.430	4.250
P 值		<0.001	0.001	<0.001	0.034

组别	动物数 (只)	肺 MDA (nmol/mg)	肺 T-SOD (U/mg)	肺 LPO (μ mol/L)	肺 T-AOC (U/mg)
正常组	6	2.26 $\pm$ 0.58	13.89 $\pm$ 2.72	4.39 $\pm$ 0.85	0.41 $\pm$ 0.01
COPD 模型组	6	4.03 $\pm$ 1.05 ^a	9.36 $\pm$ 3.23	9.74 $\pm$ 3.58 ^a	0.38 $\pm$ 0.02 ^a
NAC 处理组	6	2.58 $\pm$ 1.11 ^b	14.30 $\pm$ 5.59	5.98 $\pm$ 1.30 ^b	0.39 $\pm$ 0.02
F 值		5.976	2.762	8.898	4.985
P 值		0.012	0.095	0.003	0.022

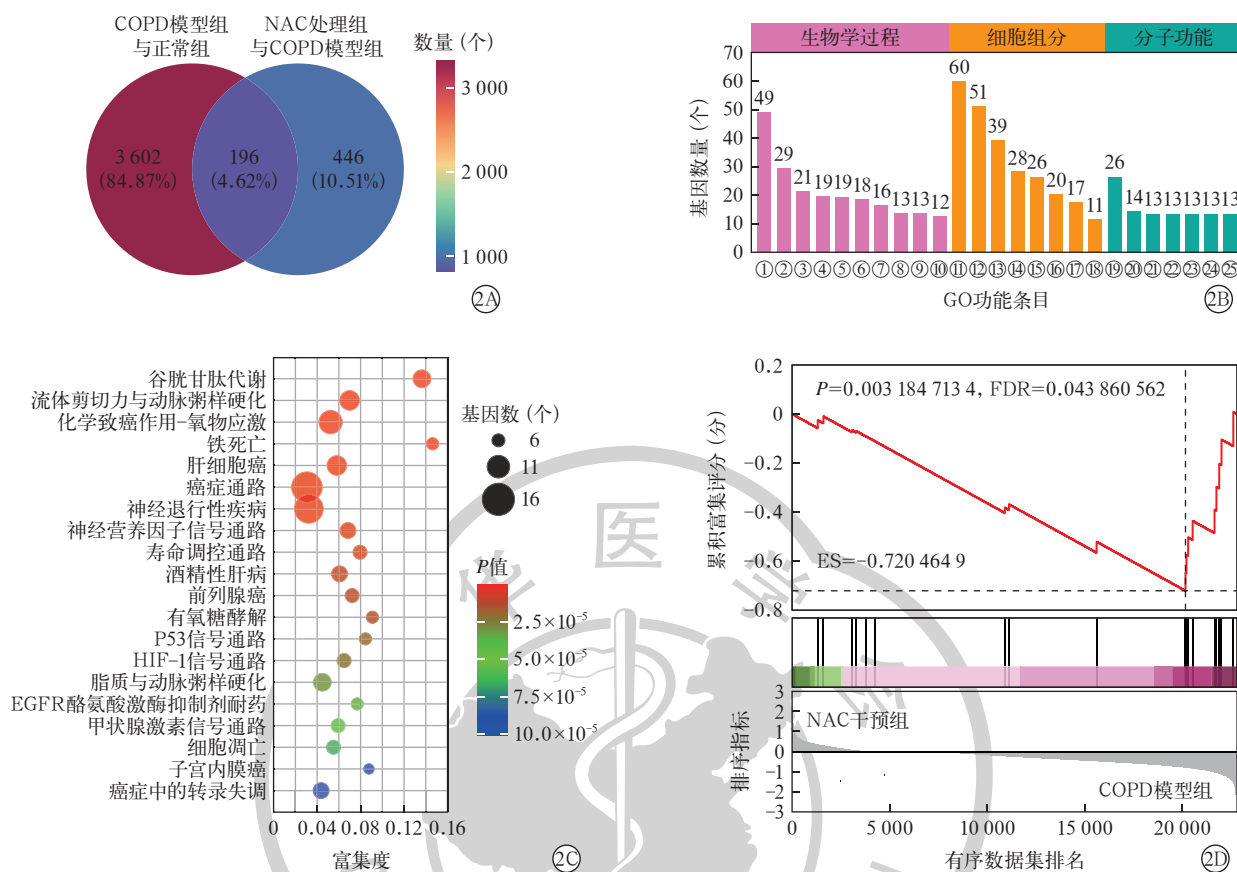
注: COPD 为慢性阻塞性肺疾病, NAC 为乙酰半胱氨酸, MDA 为丙二醛, T-SOD 为总超氧化物歧化酶, LPO 为脂质过氧化物, T-AOC 为总抗氧化能力; ^a 与正常组比较, $P < 0.05$; ^b 与 COPD 模型组比较, $P < 0.05$

2.3 转录组学分析: 各组大鼠差异表达基因分析结果显示, COPD 模型组与正常组鉴定出 3 798 个 DEG, NAC 处理组与 COPD 模型组鉴定出 642 个 DEG, 二者有 196 个交集基因 (图 2A)。

对这 196 个基因进行分析, GO 结果显示, NAC 显著调控的 DEG 主要富集于氧化应激相关的生物学过程 (图 2B); KEGG 通路富集分析发现, DEG 主要富集于谷胱甘肽代谢、铁死亡及 HIF-1 信号通路 (图 2C); GSEA 结果表明, 在 COPD 模型组中, 与抗氧化活性相关的基因表达上调, 而经过 NAC 药物干预后, 该基因集的活性被抑制, 表达下调至接近正常水平 (图 2D)。GSEA 分析不仅验证了“抗氧化活性”通路在 COPD 模型组中的重要性, 还精确地揭示了其变化方向即该通路在疾病模型中上调, 并被 NAC 所逆转。

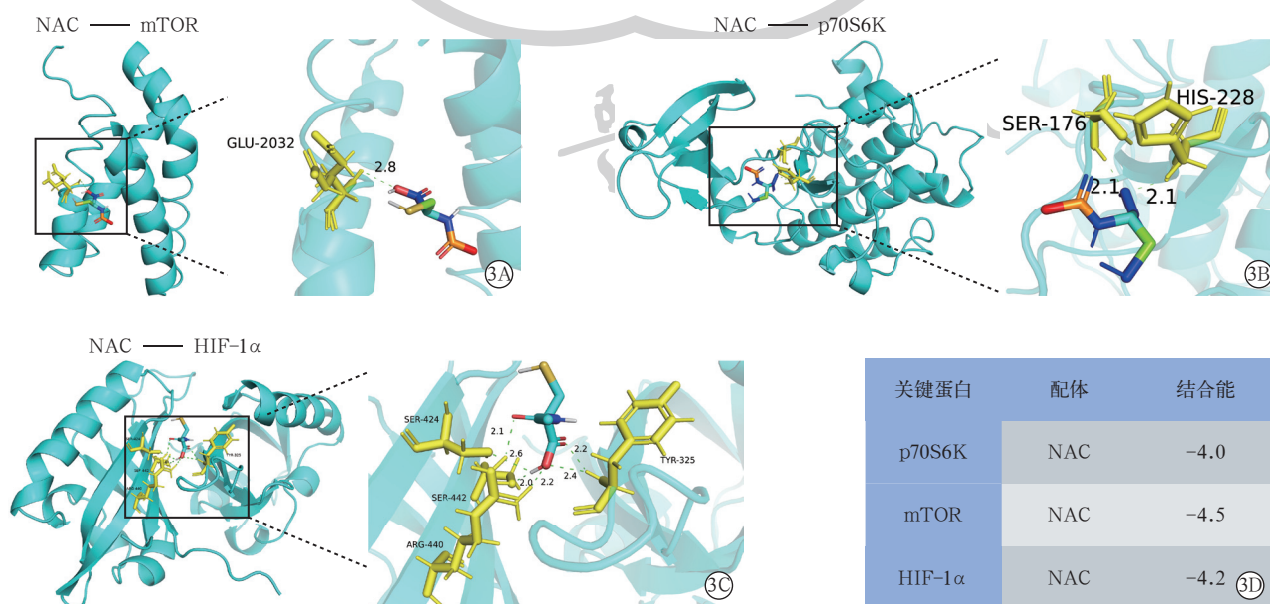
2.4 NAC 与 mTOR/HIF-1 α 通路关键蛋白有潜在结合活性: 对 mTOR/HIF-1 α 通路关键蛋白 mTOR、HIF-1 α 和 p70S6K 与 NAC 进行分子对接, 结果显示, 各关键蛋白与 NAC 结合能均小于 -4, 通过氢键结合到相应靶点的活性位点, 证明 mTOR/HIF-1 α 通路关键蛋白与 NAC 具有潜在结合活性, 见图 3。

2.5 NAC 调控 mTOR/HIF-1 α 通路相关蛋白表达: 图 4 和表 4 结果显示, COPD 模型组肺组织 mTOR 在 Ser2448 位点、p70S6K 在 Ser371 位点的磷酸化水平均较正常组升高 (均 $P < 0.05$), HIF-1 α 表达有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。NAC 处理组肺组织 p-mTOR、p-p70S6K 及 HIF-1 α 表达均较 COPD 模型组降低 (均 $P < 0.05$)。



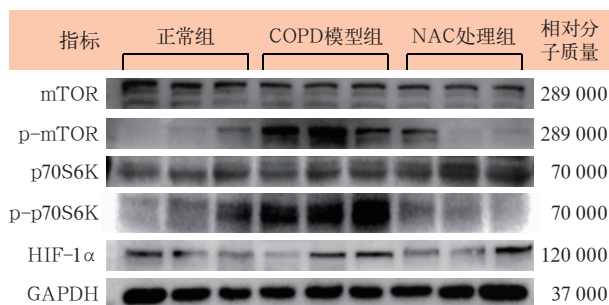
注: COPD 为慢性阻塞性肺病, NAC 为乙酰半胱氨酸, ① 为氧化应激反应, ② 为细胞氧化应激反应, ③ 为 RNA 聚合酶 II 介导转录的正向调控, ④ 为细胞凋亡过程负调控, ⑤ 为氧化还原过程, ⑥ 为细胞凋亡过程正调控, ⑦ 为 DNA 模板转录正向调控, ⑧ 为细胞低氧应答, ⑨ 为异源生物刺激应答, ⑩ 为细胞凋亡过程, ⑪ 为细胞质, ⑫ 为细胞核, ⑬ 为胞质溶胶 (细胞质基质), ⑭ 为内质网, ⑮ 为线粒体, ⑯ 为蛋白复合物, ⑰ 为细胞质核周区域, ⑱ 为神经元胞体, ⑲ 为相同蛋白结合位点 / 同源蛋白结合, ⑳ 为氧化还原酶活性, ㉑ 为泛素蛋白连接酶活性, ㉒ 为转录因子结合, ㉓ 为蛋白激酶结合, ㉔ 为蛋白质同源二聚化活性, ㉕ 为核苷酸结合, HIF-1 为缺氧诱导因子-1, EGFR 为表皮生长因子受体, FDR 为错误发现率, ES 为富集得分

图 2 各组大鼠差异表达基因的转录组学分析 2A 各组间差异表达基因的韦恩图 2B 基因本体 (GO) 功能富集分析 2C 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 2D COPD 模型组与 NAC 处理组特定基因表达变化的基因集富集分析



注: NAC 为乙酰半胱氨酸, mTOR 为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, p70S6K 为 p70 核糖体蛋白 S6 激酶, HIF-1α 为缺氧诱导因子-1α; 绿色虚线表示氢键, 黄色表示氢键作用基团, 蓝色表示 mTOR、p70S6K 或 HIF-1α

图 3 NAC 与 mTOR/HIF-1α 通路关键蛋白的结合活性 3A、3B、3C 分别为 NAC 与 mTOR、p70S6K、HIF-1α 的二维相互作用示意图 3D 关键蛋白与 NAC 的结合能



注: COPD 为慢性阻塞性肺疾病, NAC 为乙酰半胱氨酸, mTOR 为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α , p-mTOR 为磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, p70S6K 为 p70 核糖体蛋白 S6 激酶, p-p70S6K 为磷酸化 p70 核糖体蛋白 S6 激酶, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 4 蛋白质免疫印迹试验检测各组大鼠肺组织 mTOR/HIF-1 α 通路相关蛋白表达

表 4 各组大鼠肺组织 mTOR/HIF-1 α 通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	p-mTOR/ mTOR (相对表达量)	p-p70S6K/ p70S6K (相对表达量)	HIF-1 α / GAPDH (相对表达量)
正常组	3	1.00	1.00	1.00
COPD 模型组	3	2.62 $\pm$ 0.30 ^a	3.80 $\pm$ 0.73 ^a	1.37 $\pm$ 0.25
NAC 处理组	3	1.46 $\pm$ 0.31 ^b	2.15 $\pm$ 0.25 ^b	0.82 $\pm$ 0.22 ^b
F 值		33.260	30.470	6.185
P 值		<0.001	<0.001	0.035

注: COPD 为慢性阻塞性肺疾病, NAC 为乙酰半胱氨酸, mTOR 为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α , p-mTOR 为磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, p-p70S6K 为磷酸化 p70 核糖体蛋白 S6 激酶, p70S6K 为 p70 核糖体蛋白 S6 激酶, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; ^a 与正常组比较, $P < 0.05$; ^b 与 COPD 模型组比较, $P < 0.05$

3 讨论

氧化应激是促进 COPD 发生发展的重要病理机制,抑制氧化应激是延缓其疾病进展的重要途径。氧化剂长期以来被认为是 COPD 发病的危险因素之一^[8],除直接损害肺部外,其还能激活多条信号通路,进一步促进氧化物、炎症因子的产生,造成持续的肺组织损伤^[18-19]。NAC 的抗氧化活性被多项研究证实,其直接抗氧化作用与巯基和氨基相连的乙酰基的存在有关,这决定了 NAC 能够与各种自由基和非自由基发生反应;NAC 的间接抗氧化作用主要是通过半胱氨酸(由 NAC 去乙酰化形成)以及合成谷胱甘肽(glutathione, GSH)所必需的谷氨酸和甘氨酸的细胞递送来补充 GSH^[11]。研究发现, NAC 能显著减轻香烟烟雾诱导的肺泡巨噬细胞吞噬功能抑制,并有效抑制糖酵解和活性氧的生成^[20]。此外, NAC 通过不依赖于核因子 E2 相关因子 2 的途径,对香烟烟雾诱导的小鼠 II 型肺泡上皮细胞损伤具有保护作用^[21]。香烟烟雾诱导的内质网-线粒体

相互作用促进的氧化应激及对支气管的损害也可被 NAC 显著减弱^[22]。

本研究结果表明, NAC 可改善香烟烟雾暴露联合细菌感染诱导的 COPD 大鼠肺组织损伤,减轻肺泡损伤程度,减少炎症细胞浸润。在 COPD 病理进程中,氧化应激标志物可在血清、支气管肺泡灌洗液及肺组织中富集。研究证实,大多数 COPD 患者的呼气液中可以准确测量 MDA,并且与气道阻塞和中性粒细胞炎症的严重程度呈正相关^[23]。通过对大鼠血清和肺组织中的氧化及抗氧化物检测发现, COPD 大鼠血清和肺组织中 MDA、LPO 水平升高, T-SOD、T-AOC 活性下降;而 NAC 可降低 MDA、LPO 水平,增强肺组织中 T-SOD 活性,说明 NAC 对 COPD 氧化应激有很好的抑制作用。与本研究结果一致的是, Chen 等^[24]研究证明 NAC 可通过补充细胞内 GSH 的方式减轻肺泡上皮细胞凋亡,纠正肺氧化-抗氧化失衡,发挥抑制氧化应激的作用。

为了探讨 NAC 抑制 COPD 氧化应激的机制,本研究进行了大鼠肺组织的转录组测序,分析差异基因及 NAC 可能的作用途径。结果显示, NAC 干预 COPD 与抗氧化应激和调控 HIF-1 α 通路有关。与本研究结果一致的是, Baz-Dávila 等^[25]发现 COPD 患者肺组织中 HIF-1 α 水平增加。另有研究证实,香烟烟雾中的有害成分可以直接增强 HIF-1 α 的蛋白合成^[26]。HIF-1 α 的增多,使机体加速了氧化应激反应,这加剧了 COPD 的病理进展^[27-28]。HIF-1 α 的激活受多种因素调控, mTOR 是其关键上游通路。McInturff 等^[29]报道, mTOR 通过诱导 HIF-1 α 蛋白表达来调节中性粒细胞胞外诱捕网的形成,并证明在免疫效应细胞中抑制 mTOR 和 HIF-1 α 信号转导会导致细菌杀伤能力下降。可见, mTOR/HIF-1 α 通路介导了 COPD 氧化应激,有效抑制该通路是恢复氧化-抗氧化失衡的重要途径。随后,本研究采用分子对接技术考察 NAC 与 mTOR/HIF-1 α 通路关键蛋白的结合情况,发现 NAC 与 p70S6K、HIF-1 α 、mTOR 具有潜在结合活性,提示 mTOR/HIF-1 α 通路可能是 NAC 的作用途径。

本研究中进一步采用 Western blotting 检测 mTOR/HIF-1 α 通路相关蛋白表达,结果显示, NAC 可降低 COPD 模型大鼠 mTOR 在 Ser2448 位点、p70S6K 在 Ser371 位点的磷酸化水平,表明 NAC 能通过抑制 mTOR/HIF-1 α 通路干预 COPD 氧化应激。尽管 NAC 是一种抑制黏液分泌的经典“老药”,但

诸多证据证明其具有较好的抗氧化应激活性^[30],可将 NAC 作为 COPD 患者标准治疗的一种辅助手段。本研究证明 NAC 可通过抑制 mTOR/HIF-1 α 通路减轻 COPD 大鼠氧化应激。

综上,本研究表明 NAC 可通过 mTOR/HIF-1 α 通路有效抑制香烟烟雾暴露联合细菌感染诱导的 COPD 大鼠血清和肺组织中的氧化应激,并改善肺组织损伤。但本研究还存在一定的局限性和不足之处,仅在动物层面验证了 NAC 的作用,没有进行体外实验验证;NAC 只设计一个剂量,该剂量是参考大量临床试验数据的有效剂量,根据人体与小鼠体表面积比进行换算确定的,也在体内确定证实了 NAC 的抗氧化应激作用,但是缺乏量-效关系研究。下一步研究计划在此基础上探讨 NAC 减轻 COPD 氧化应激的量-效关系,并深入研究 mTOR/HIF-1 α 通路与其他抗氧化通路的交互作用。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨博斐:实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析;宋雨薇、王茜茜:采集数据、分析/解释数据、统计分析;张蓝熙:对文章的知识性内容作批评性审阅,行政、技术或材料支持,指导;秦燕勤:酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、指导

参考文献

- [1] Thawanaphong S, Nair P. Contemporary concise review 2024: chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Respirology*, 2025, 30(7): 574–586. DOI: 10.1111/resp.70062.
- [2] 李慧茹,周林琼,段春磊,等.早期慢性阻塞性肺疾病危险因素及诊断和管理的国际研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35(12): 1340–1344. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221205-01056.
- [3] GBD 2019 Chronic Respiratory Diseases Collaborators. Global burden of chronic respiratory diseases and risk factors, 1990–2019: an update from the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *EClinicalMedicine*, 2023, 59: 101936. DOI: 10.1016/j.eclinm.2023.101936.
- [4] Cho MH, Hobbs BD, Silverman EK. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease: understanding the pathobiology and heterogeneity of a complex disorder[J]. *Lancet Respir Med*, 2022, 10(5): 485–496. DOI: 10.1016/S2213-2600(21)00510-5.
- [5] Xu J, Zeng QY, Li SQ, et al. Inflammation mechanism and research progress of COPD[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1404615. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1404615.
- [6] Wiegman CH, Li F, Ryffel B, et al. Oxidative stress in ozone-induced chronic lung inflammation and emphysema: a facet of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1957. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01957.
- [7] Chamitava L, Cazzoletti L, Ferrari M, et al. Biomarkers of oxidative stress and inflammation in chronic airway diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4339. DOI: 10.3390/ijms21124339.
- [8] Barnes PJ. Oxidative stress-based therapeutics in COPD[J]. *Redox Biol*, 2020, 33: 101544. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101544.
- [9] China N-acetylcysteine in Mild-to-moderate COPD Study Group. Effect of high-dose N-acetylcysteine on exacerbations and lung function in patients with mild-to-moderate COPD: a double-blind, parallel group, multicentre randomised clinical trial[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 8468. DOI: 10.1038/s41467-024-51079-1.
- [10] Santus P, Signorello JC, Danzo F, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of N-acetylcysteine: a fresh perspective[J]. *J Clin Med*, 2024, 13(14): 4127. DOI: 10.3390/jcm13144127.
- [11] Mokry D, Mokry J, Barosova R, et al. Advances in the use of N-acetylcysteine in chronic respiratory diseases[J]. *Antioxidants* (Basel), 2023, 12(9): 1713. DOI: 10.3390/antiox12091713.
- [12] Houssaini A, Breau M, Kebe K, et al. mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(3): e93203. DOI: 10.1172/jci.insight.93203.
- [13] Goyal A, Chopra V, Garg K, et al. Mechanisms coupling the mTOR pathway to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) pathogenesis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2025, 82: 55–69. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2024.12.005.
- [14] Song CL, Liu Q, Qin J, et al. UCP2 promotes NSCLC proliferation and glycolysis via the mTOR/HIF-1 α signaling[J]. *Cancer Med*, 2024, 13(3): e6938. DOI: 10.1002/cam4.6938.
- [15] Zhong WJ, Liu T, Yang HH, et al. TREM-1 governs NLRP3 inflammasome activation of macrophages by firing up glycolysis in acute lung injury[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(1): 242–257. DOI: 10.7150/ijbs.77304.
- [16] Li JS, Ma JD, Tian YG, et al. Effective-component compatibility of Bufei Yishen formula II inhibits mucus hypersecretion of chronic obstructive pulmonary disease rats by regulating EGFR/PI3K/mTOR signaling[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112796. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112796.
- [17] Li MY, Qin YQ, Tian YG, et al. Effective-component compatibility of Bufei Yishen formula III ameliorated COPD by improving airway epithelial cell senescence by promoting mitophagy via the NRF2/PINK1 pathway[J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 434. DOI: 10.1186/s12890-022-02191-9.
- [18] Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 715–748. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
- [19] Yalcinsoy M, Beykumul A, Gulbas G, et al. DO disease stages affect oxidative stress in stable COPD[J]. *Heliyon*, 2024, 10(10): e31188. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e31188.
- [20] Aridgides DS, Mellinger DL, Armstrong DA, et al. Functional and metabolic impairment in cigarette smoke-exposed macrophages is tied to oxidative stress[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9624. DOI: 10.1038/s41598-019-46045-7.
- [21] Messier EM, Day BJ, Bahmed K, et al. N-acetylcysteine protects murine alveolar type II cells from cigarette smoke injury in a nuclear erythroid 2-related factor-2-independent manner[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(5): 559–567. DOI: 10.1165/ajrmb.2012-0295OC. Erratum in: *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(1): 165.
- [22] Rodríguez-Pérez J, Andren-Martínez R, Pérez-Sánchez L, et al. CSE-induced ER-mitochondria crosstalk promotes oxidative stress and impairs bronchial contractile response[J]. *Antioxidants* (Basel), 2025, 14(6): 703. DOI: 10.3390/antiox14060703.
- [23] Li CL, Liu SF. Exploring molecular mechanisms and biomarkers in COPD: an overview of current advancements and perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13): 7347. DOI: 10.3390/ijms25137347.
- [24] Chen JM, Cheng YF, Cui HJ, et al. N-acetyl-L-cysteine protects rat lungs and RLE-6TN cells from cigarette smoke-induced oxidative stress[J]. *Mol Med Rep*, 2025, 31(4): 97. DOI: 10.3892/mmr.2025.13462.
- [25] Baz-Dávila R, Espinoza-Jiménez A, Rodríguez-Pérez Mdel C, et al. Role of HIF1A, VEGFA and VEGFR2 SNPs in the susceptibility and progression of COPD in a Spanish population[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154998. DOI: 10.1371/journal.pone.0154998.
- [26] Guan RJ, Wang J, Li ZY, et al. Sodium tanshinone II A sulfonate decreases cigarette smoke-induced inflammation and oxidative stress via blocking the activation of MAPK/HIF-1 α signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 263. DOI: 10.3389/fphar.2018.00263.
- [27] Atalay NA, Yormaz B, Şahin A, et al. Elevated HIF-1 α as a diagnostic biomarker in COPD: correlations with EPO, emphysema index, and pulmonary function[J]. *Respir Med*, 2025, 245: 108184. DOI: 10.1016/j.rmed.2025.108184.
- [28] Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 281–298. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.10.005.
- [29] McInturf AM, Cody MJ, Elliott EA, et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 α [J]. *Blood*, 2012, 120(15): 3118–3125. DOI: 10.1182/blood-2012-01-405993.
- [30] 赵巍,章守琴,张翔宇. N-乙酰半胱氨酸抗氧化作用在急性呼吸窘迫综合征治疗中的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(12): 1530–1532. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200709-00503.

(收稿日期: 2026-01-07)

(本文编辑: 保健媛 张耘菲)