

# 盐酸戊乙奎醚对脂多糖诱导肺微血管内皮细胞通透性的影响

## Effects of penheyclidine hydrochloride on pulmonary microvascular endothelial permeability induced by lipopolysaccharide

张凌杰<sup>1</sup>, 张俊峰<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>

(1. 湖北省中西医结合医院麻醉科, 湖北 武汉 430015; 2. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030)

**摘要:** 为探讨盐酸戊乙奎醚 (PHC) 对脂多糖 (LPS) 诱导的肺微血管内皮细胞通透性的影响, 将 Wistar 大鼠肺微血管内皮细胞随机分为对照组、LPS 组和 LPS+PHC 预处理组, 测定内皮单层滤过系数 (Kf) 和蛋白质渗透压反射系数 ( $\sigma$ ), MTT 法测定细胞存活率, 免疫印迹法测定水通道蛋白-1 (AQP-1) 表达。与对照组比较, LPS 组 Kf 增加、 $\sigma$  减少, 存活率降低; PHC 预处理可减少 LPS 组的变化, 提高存活率, 上调 AQP-1 表达。

**关键词:** 盐酸戊乙奎醚; 微血管内皮细胞; 脂多糖; 水通道蛋白

**中图分类号:** R99 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2016)03-0207-02

**DOI:** 10.13631/j.cnki.zggyyx.2016.03.016

水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 是一组水选择通道的分子家族, 可以提供液体快速转运的通路, 肺组织水转运功能对于维持正常肺组织的通气和换气功能起重要作用<sup>[1]</sup>。肺微血管内皮细胞 (lung microvessel endothelial cell, LMEC) 是构成血气屏障的重要结构, 为急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) / 急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 发病的中心环节。AQP-1 主要位于 LMEC, AQP-1 在急性肺损伤发病机制中起重要作用<sup>[2,3]</sup>。莨菪类药物可通过多种途径改善脓毒症患者的循环及脏器功能, 提高生存率; 盐酸戊乙奎醚 (penheyclidine hydrochloride, PHC) 作为一种新型抗胆碱能药对肺损伤有一定疗效<sup>[4,5]</sup>。本研究拟以离体培养的大鼠肺微血管内皮细胞为模型, 探讨 PHC 对脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导内皮细胞通透性和 AQP-1 表达的影响, 为 PHC 治疗脓毒症肺损伤奠定实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 250~290 g, 购自同济医学院实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (鄂) 2008—0005。

**1.1.2 试剂与仪器** 盐酸戊乙奎醚 (成都力思特制药股份有限公司, 浓度 1 mg/ml, 0.1%), M199 培养基、胰酶、胎牛血清 (Gibco 公司), NC 膜 (Amersham 公司), LPS、AQP-1 单克隆抗体及增强荧光显示剂 (Santa Cruz 公司)。微孔滤器和滤膜购自上海医学工业研究所。其余试剂为国产分析纯。

#### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠肺微血管内皮细胞的培养与实验分组** 参照文献 [6] 方法进行大鼠肺微血管内皮细胞的培养、分离和鉴定。大鼠放血处死, 打开胸腔, 从右心灌注无血清 M199 培养液, 至双肺发白, 取出肺脏置于 M199 培养液中, 充分冲洗肺脏, 取表面 5 mm 的外周肺组织, 切割至 1 mm<sup>3</sup> 组织块, 置于培养瓶内, 使用含 20% 胎牛血清、10<sup>5</sup> U/L 青霉素的 M199 培养基, 培养箱中孵育 72 h 后去除组织块, 每 3~4 d 更换 1 次培养液。用 0.4% 台盼蓝染色少量细胞悬液记数活细胞在 95% 以上。相差显微镜下细胞呈单层铺路石样排列。孵育 72 h 后, 根据所加试剂随机分为 4 组: (1) 对照组, 常规细胞培养, 不予任何药物处理; (2) LPS 组, 单纯给予终浓度 1  $\mu$ g/ml LPS 培养 2 h; (3) LPS+低剂量 PHC (终浓度为 0.1  $\mu$ mol/L, 于 LPS 处理前 1 h 给药) 预处理组; (4) LPS+高剂量 PHC (终浓度为 1  $\mu$ mol/L, 于 LPS 处理前 1 h 给药) 预处理组。重复 5 次给药, 在相应组中分别加入不同浓度 PHC 或培养液, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h, 再在相应组中加入 LPS, 置于培养箱继续孵育 6 h。

**1.2.2 细胞存活率** 采用台盼蓝拒染实验测定。用 0.125% 胰酶消化分离贴壁内皮细胞, 制成单细胞悬液, 取 450  $\mu$ l 各组细胞悬液移入试管中, 加 50  $\mu$ l 0.04% 台盼蓝溶液混匀, 用细胞计数板在光镜下分别计数活细胞和死细胞 (蓝染细胞)。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{未蓝染细胞}}{\text{蓝染细胞} + \text{未蓝染细胞}} \times 100\%$$

**1.2.3 内皮细胞单层通透性测定** 参照文献 [7], 滤膜内皮细胞形成单层后, 用 Hanks' 液漂洗, 装入针式滤器, 上端玻璃管内加 Hanks' 液 (含或不含 0.5% 牛血清白蛋白), 液体压力 2.45 kPa (25 cm H<sub>2</sub>O), 液柱高 25 cm。平衡 5~10 min 后, 收集下管流出液体, 称量并测定其 2 min 流出液体体积, 或测上下管白蛋白浓度, 分别计算内皮单层滤过系数 (Kf) 和蛋白质渗透压反射系数 ( $\sigma$ )。

$$Kf = J_v / \Delta P, \sigma = 1 - CF / CP$$

$J_v$ —流出液生成速度,  $\Delta P$ —灌注压, CF—下管液白蛋白浓度, CP—上管液白蛋白浓度。

**1.2.4 免疫印迹法检测水通道蛋白表达** 参照文献 [8], 常规裂解细胞提取蛋白, 取 50  $\mu$ g 总蛋白加入上样缓冲液煮沸 3 min 变性, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 再电转移至 PVDF 膜, 封闭后与 1:1 000 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜, 与 1:20 000 稀释的二抗室温孵育 1 h, 再与 ECL 温浴 1 min 后曝光、显影和定影, 进行吸光度扫描分析。

收稿日期: 2015-06-30; 修回日期: 2015-12-16

作者简介: 张凌杰 (1979—), 男, 主治医师, 从事麻醉临床及医疗管理工作。

### 1.3 统计学方法

所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS12.0 统计软件包进行单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PHC 对内皮通透性的影响

与对照组相比, LPS 使  $K_f$  升高、 $\sigma$  降低 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS 组比较, 低剂量 PHC 组与高剂量 PHC 组  $K_f$  明显降低,  $\sigma$  显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 PHC 对 LPS 诱导的内皮细胞通透性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n | Hank's-Kf                      | 牛血清蛋白 $\sigma$                 |
|-----------|---|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照组       | 5 | 0.138 $\pm$ 0.03               | 0.386 $\pm$ 0.05               |
| LPS 组     | 5 | 0.386 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>  | 0.218 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>  |
| 低剂量 PHC 组 | 5 | 0.211 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>  | 0.268 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>  |
| 高剂量 PHC 组 | 5 | 0.196 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup> | 0.336 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup> |

注: 与对照组相比, <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; 与 LPS 组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.2 PHC 对内皮细胞存活率的影响

与对照组相比, LPS 能降低细胞存活率, 低剂量 PHC 组、高剂量 PHC 组细胞存活率明显提高。见表 2。

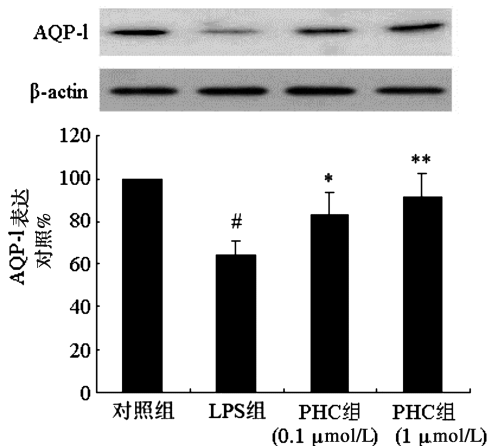
表 2 PHC 对 LPS 诱导的内皮细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n | 内皮细胞存活率 (%)                     |
|-----------|---|---------------------------------|
| 对照组       | 5 | 100                             |
| LPS 组     | 5 | 81.09 $\pm$ 9.13 <sup>#</sup>   |
| 低剂量 PHC 组 | 5 | 89.22 $\pm$ 9.63 <sup>*</sup>   |
| 高剂量 PHC 组 | 5 | 95.36 $\pm$ 10.13 <sup>**</sup> |

注: 与对照组相比, <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; 与 LPS 组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.3 PHC 对 AQP-1 表达的影响

与对照组相比, LPS 组 AQP-1 表达明显减少; 而与 LPS 组相比, 低剂量 PHC 组和高剂量 PHC 组内皮细胞 AQP-1 表达明显上调; 差异均具有统计学意义。见图 1。



注: 与对照组相比, <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; 与 LPS 组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 1 PHC 对 AQP-1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

## 3 讨论

ALI 是以通透性肺水肿为特征的一种临床综合征, 其严

重阶段即是 ARDS<sup>[9]</sup>。目前, ARDS 仍是临床的危重症, 死亡率高, 临床缺乏特异治疗。肺微血管内皮细胞是构成血气屏障的重要结构, 在各种炎症、损伤等引起的病理过程中如 ALI、ARDS 等, 其通透性增加, 是发病的中心环节。

有文献报道, 急性肺损伤时肺微血管内皮细胞 AQP-1 表达下调, 水转运功能下降导致肺水稳态失衡, 参与 ALI 时肺水肿的发生<sup>[10]</sup>。本研究也发现, 在 LPS 刺激作用下, AQP-1 蛋白合成受到影响, 其表达明显减少; 而与 LPS 组比较, 低剂量 PHC 组和高剂量 PHC 组内皮细胞 AQP-1 表达明显上调。因此, 我们认为, PHC 药物本身可能通过调节 AQP-1 的表达调控了局部细胞膜的水通透性, 导致水从间质回流入血管系统, 促进了其吸收, 从而有利于减轻 ALI/ARDS 肺水肿的形成。

$K_f$  是反映内皮细胞单层通透性的最敏感指标之一。本实验证实, LPS 作用后内皮细胞  $K_f$  减小, 低剂量和高剂量 PHC 组分别为 0.211 $\pm$ 0.03 和 0.196 $\pm$ 0.03, 提示 LPS 刺激可引起内皮细胞通透性显著增加。在 PHC 预处理组, 内皮细胞蛋白质  $\sigma$  均明显增加, 低剂量和高剂量 PHC 组分别为 0.268 $\pm$ 0.03 和 0.336 $\pm$ 0.05, 提示 PHC 可拮抗 LPS 所致内皮细胞单层通透性的增加, 进而减轻 ALI 时水从肺微血管流入肺间质, 也将有助于减轻 ALI 时肺水肿的发生。

### 参考文献:

- [1] Bienert G P, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840 (5): 1596-1604.
- [2] Xu G Y, Wang F, Jiang X, et al. Aquaporin-1, a potential therapeutic target for migraine with aura [J]. Mol Pain, 2010, 6: 68.
- [3] Papadopoulos M C, Verkman A S. Aquaporin water channels in the nervous system [J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14 (4): 265-277.
- [4] 胡宗凤, 孙海晨, 邵旦兵, 等. 盐酸戊乙奎醚对急性肺损伤血管内皮保护作用的临床研究 [J]. 创伤外科杂志, 2009, 11 (6): 524-528.
- [5] 詹佳, 肖飞, 李进杰, 等. 盐酸戊乙奎醚对脓毒症小鼠肺血管内皮细胞黏附分子-1 和髓过氧化物酶影响 [J]. 武汉大学学报 (医学版), 2013, 34 (4): 504-506.
- [6] 肖贞良, 孙耕耘, 钱桂生. 肺循环灌注对大鼠肺微血管内皮细胞分离和培养的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15 (11): 1053-1054.
- [7] 彭为平, 高巨. 丙泊酚对脂多糖诱导的内皮细胞通透性的影响 [J]. 广东医学, 2009, 30 (8): 1064-1066.
- [8] 高巨, 招伟贤, 项冬梅, 等. 丙泊酚对脂多糖诱导的大鼠肺微血管内皮细胞 AQP-1 表达的影响 [J]. 中国急救医学, 2006, 26 (9): 670-672.
- [9] Schmickl C N, Mastrobuoni S, Filippidis F T, et al. Male-predominant plasma transfusion strategy for preventing transfusion-related acute lung injury: a systematic review [J]. Crit Care Med, 2015, 43 (1): 205-225.
- [10] Chu Y H, Hsu Y J, Lee H S, et al. The osmopressor response is linked to upregulation of aquaporin-1 tyrosine phosphorylation on red blood cell membranes [J]. Hypertension, 2013, 62 (1): 197-202.