

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.13.007

盐酸戊乙奎醚上调 β 抑制蛋白-1 与 M3 受体的关系研究*程斌,王轶芄,詹佳[△]

(武汉大学中南医院麻醉科 430071)

[摘要] **目的** 探讨在脂多糖(LPS)致肺微血管内皮损伤中盐酸戊乙奎醚(PHC)上调 β 抑制蛋白-1(β -arrestin-1)的作用与 M3 受体的关系。**方法** M3 shRNA 转染肺微血管内皮细胞和正常肺微血管内皮细胞,分为 LPS 组(A)、盐酸戊乙奎醚+LPS 组(B)、LPS+M3 shRNA 转染组(C)和盐酸戊乙奎醚+LPS+M3 shRNA 转染组(D),激光共聚焦观察细胞骨架变化,检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)水平,免疫荧光化学法检测血管内皮细胞黏附分子-1(VCAM-1)蛋白表达,Western blot 法和实时定量 PCR 法检测 β -arrestin-1 表达。**结果** 与 A 组、C 组比较,B 组、D 组肌动蛋白骨架排列整齐,LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达降低, β -arrestin-1 表达升高;与 A 组、B 组相比较,C 组、D 组肌动蛋白骨架排列整齐,LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达降低, β -arrestin-1 表达无明显改变。**结论** 沉默 M3 受体有助于降低脂多糖诱导的肺微血管内皮细胞损伤。但盐酸戊乙奎醚上调 β -arrestin-1 的作用与 M3 受体是否存在无必然联系。

[关键词] M3 受体;盐酸戊乙奎醚; β 抑制蛋白-1;RNA 干扰

[中图分类号] R979.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)13-1750-03

Role of M3 receptor in the effect of penehyclidine hydrochloride up-regulating β -arrestin-1 expression*Cheng Bin, Wang Yipeng, Zhan Jia[△]

(Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of M3 receptor in the effect of penehyclidine hydrochloride(PHC) upregulating β -arrestin-1 expression in lipopolysaccharide(LPS)-induced human pulmonary microvascular endothelial cell(HPMVEC) injury. **Methods** M3 shRNA transfected HPMVEC and normal HPMVEC cells were randomly divided into LPS group(A), LPS+PHC group(B), LPS+M3 shRNA transfection group(C) and PHC+LPS+M3 shRNA transfection group(D). The cytoskeleton change was observed by laser scanning confocal. The LDH level in cellular supernate was detected. The VCAM-1 protein expression was examined by immunofluorescence chemistry. β -arrestin-1 protein expression was determined by Western blot and β -arrestin-1 mRNA expression was measured by real-time PCR. **Results** Compared with the group A or C, F-actin cytoskeleton arrangement in the group B or D was neat, the LDH level and VCAM-1 protein expression were decreased, and β -arrestin-1 expression was increased; compared with group A or B, F-actin cytoskeleton arrangement in the group C or D was neat, the LDH level and VCAM-1 protein expression were decreased, while the β -arrestin-1 expression had no obvious change. **Conclusion** Silence M3 receptor is conducive to reduce LPS-induced HPMVEC injury. But the role of PHC up-regulating β -arrestin-1 expression has no necessary connection with M3 receptor.

[Key words] M3 receptor; penehyclidine hydrochloride; β -arrestin-1; shRNA

脓毒症是当前急危重症患者的主要死亡原因之一^[1]。肺是此过程中最容易受到损伤的靶器官之一,主要表现为急性肺损伤(acute lung injury, ALI)^[2]。内毒素的重要化学成分之一是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),该成分也是脓毒症、ALI 的主要致病因子之一。血管内皮细胞的损伤是脓毒症急性肺损伤中的一个重要环节,脂多糖与受体结合后,可通过激活炎性细胞因子直接及间接损伤肺微血管内皮细胞,增高肺微血管通透性,最终引起急性肺损伤^[3]。盐酸戊乙奎醚注射液(Penehyclidine Hydrochloride, PHC),商品名长托宁,由军事医学科学院设计合成。 β 抑制蛋白(β -arrestins)是当今生物学中信号传导研究领域的热点之一,是 G 蛋白耦联受体通路的负调控蛋白,本课题组前期研究发现,盐酸戊乙奎醚可上调 β -arrestin-1 表达,减轻脓毒症肺损伤^[4]。而盐酸戊乙奎醚是一种 M1、M3 选择性胆碱能受体阻滞剂。本研究拟通过 M3 受体 shRNA 干扰转染人肺微血管内皮细胞,利用 LPS 与细胞共同孵

育,模拟体外脓毒症状态,通过观察盐酸戊乙奎醚对细胞骨架变化,内皮细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平,血管内皮细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)蛋白表达以及 β -arrestin-1 表达的影响,观察 M3 在 LPS 诱导的肺微血管内皮细胞损伤中的作用,并探讨盐酸戊乙奎醚上调 β -arrestin-1 的作用是否与 M3 受体的存在有关。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺微血管内皮细胞(美国 Scien Cell 公司), RPMI 1640 培养基(Sigma 公司,美国),盐酸戊乙奎醚(批号:050302-1,成都力思特制药厂),无血清培养基中(Invitrogen Life Technologies 公司,美国),脂质体 2000 试剂(Invitrogen Life Technologies 公司,美国),LDH 试剂盒(南京建成生物工程研究所),兔单克隆抗体 IgG(Abcam 公司,英国),FITC 标记山羊抗兔 IgG(KPL 公司,美国),DAPI 染液(碧云天公司),抗荧光淬灭封片剂(碧云天公司), β -arrestin-1 一抗(Abcam 公

司,英国)和 β -actin 一抗(Santa Cruz 公司,美国),二抗 HRP-羊抗兔 IgG(KPL 公司,美国)。

1.2 人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cell, HPMVEC)体外培养 HPMVEC 用加入双抗的 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养基,置于 37 °C 5%CO₂ 培养箱中培养,隔天换液,相差显微镜下观察,培养瓶中单个细胞呈梭形或多边形,细胞株不断生长、分化后,融合呈典型铺路石样排列。待细胞培养至 80%左右融合时,吸弃培养液,用 PBS 冲洗 2 次。用 37 °C 预温的 0.25%胰蛋白酶消化 2~3 min,加 3 mL 培养基终止消化,吹打混匀成悬液,计数后按 1:2 比例传代,实验取 4~6 代细胞。

1.3 分组及处理 将已长成致密单层的内皮细胞用培养基稀释成细胞悬液,以 1×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板(每孔 2 mL)或培养瓶(每瓶 4 mL)中,采用随机数字表法将其分为 4 组: LPS 组(A)、盐酸戊乙奎醚+LPS 组(B)、LPS+M3 shRNA 转染组(C)和盐酸戊乙奎醚+LPS+M3 shRNA 转染组(D)。含 M3 受体 shRNA 质粒的构建及转染委托武汉谷歌生物公司完成。在 50 μ L 的 Opti-MEM 无血清培养基中加入含 M3 受体 shRNA 的质粒,另取 50 μ L Opti-MEM 无血清培养基,加入 4.5 μ L 脂质体 2000 试剂,混匀后室温静置 20 min,进行转染。以含 M3 受体 shRNA 转染细胞后,孵育 24 h。A 组:正常细胞加入终浓度为 0.1 μ g/mL 的 LPS 孵育 1 h;B 组:正常细胞先加入终浓度为 2.0 μ g/mL 的盐酸戊乙奎醚,孵育 1 h 时加入终浓度为 0.1 μ g/mL 的 LPS 继续孵育 1 h;C 组:以含 M3 受体 shRNA 的质粒转染细胞 24 h 时加入终浓度为 0.1 μ g/mL 的 LPS 孵育 1 h;D 组:以含 M3 受体 shRNA 的质粒转染细胞 24 h 时加入终浓度为 2.0 μ g/mL 的盐酸戊乙奎醚孵育 1 h 后,加入终浓度为 0.1 μ g/mL 的 LPS 继续孵育 1 h。

1.4 免疫双荧光标记-激光共聚焦显微镜观察肌动蛋白骨架变化 将内皮细胞用胰蛋白酶消化并制成细胞悬液,吹打均匀后滴于盖玻片上,取出盖玻片按以下流程处理:PBS 漂洗,4%多聚甲醛室温固定 5 min,细胞生长至融合后加入罗丹明标记的鬼笔环肽并在室温下孵育 40 min。PBS 漂洗,滴加 DAPI 染液,在黑暗中室温孵育 10 min。采用 Carl Zeiss 7 激光扫描共聚焦显微镜(Carl Zeiss AG,德国)观察细胞骨架的变化。

1.5 LDH 水平测定 取出加入处理因素后的 6 孔板,每组取两板,任选 10 个培养孔,于 60 min 时间点,按照 LDH 试剂盒说明书进行操作,用 2,4-二硝基苯肼显色法检测 LDH 水平。

1.6 免疫细胞荧光染色法检测 VCAM-1 蛋白表达 取出加入各种处理因素后的 6 孔板,放置灭菌盖玻片,用 4%多聚甲醛固定,PBS 冲洗后稍甩干,用组化笔在盖玻片中间细胞分布均匀的位置画圈,加 100 μ L 浓度为 0.1%的破膜工作液,室温孵育 10 min 后 PBS 冲洗,一抗覆盖组织,爬片置于冰箱内 4 °C 孵育过夜。次日取出爬片后 PBS 冲洗 3 次,去除 PBS 后滴加与一抗相应种属的二抗,避光室温孵育 50 min 后, PBS 冲洗。滴加 DAPI 染液,室温下避光孵育 10 min, PBS 冲洗后稍甩干,将有细胞的一面朝下用抗荧光淬灭封片剂将玻片封固在载玻片上封片。采用全自动图像分析系统 NIS-elements F3.2 对阳

性染色进行分析,测定 VCAM-1 阳性表达的平均吸光度值(OD),随机选取 5 个高倍视野,测定阳性表达的吸光度值,取平均值反映 VCAM-1 的表达。

1.7 Western blot 法 每组取 5 个培养瓶,收集细胞,检测 β -arrestin-1 表达。采用蛋白抽提试剂提取蛋白。取 40 μ g 蛋白,上样进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,分离的蛋白随后转印至 PVDF 膜,膜在封闭液中(5%脱脂奶粉溶于 PBS 缓冲液-0.05%Tween 20)室温作用 1 h 封闭非特异性结合。再分别加入 β -arrestin-1 一抗和 β -actin 一抗,4 °C 孵育过夜,用 TBST 漂洗滤膜 3 次,每次 5 min 后,加入二抗 HRP-羊抗兔 IgG,于室温平缓摇动孵育 30min,用 TBST 漂洗滤膜 3 次,每次 5 min,进行增强化学发光反应。采用 Alpha Ease FC 分析软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 β -arrestin-1 mRNA 表达 主要步骤包括采用 Trizol 提取总 RNA、逆转录合成 cDNA 及实时荧光定量 PCR。 β -arrestin-1 上游引物:CCAACAACACCAACAAGACGG,下游引物:CGCTTCTCTCGGTTATTGGC,扩增片段长度 193 bp。内参 β -actin 上游引物:GTCCACCGCAAATGCTTCTA,下游引物:TGCTGTCACCTTCACCGTTC,扩增片段长度 190 bp。PCR 反应体系:2× qPCR Mix:12.5 μ L,2.5 μ mol/L 内标引物:2.0 μ L,反转录产物:2.0 μ L,ddH₂O:8.5 μ L。反应条件:95 °C 预变性 1 min,95 °C 预变性 15 s,58 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,共进行 40 个循环,然后 72 °C 延伸 5 min。PCR 完成后,在 ABI Prism SDS 2.0 软件上行自动分析,导出相应的循环阈值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值作为 β -arrestin-1 mRNA 的相对表达量。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞肌动蛋白骨架变化的比较 免疫荧光共聚焦的图片显示,A 组可见排列紊乱的肌动蛋白有断裂和不连续显示,且无围绕蓝色细胞核的丝状足。而给予盐酸戊乙奎醚预处理的 B 组情况有所改善。与 C 组比较,给予盐酸戊乙奎醚预处理的 D 组肌动蛋白的连续性和断裂情况相对较轻。与 A 组比较,C 组肌动蛋白的连续性和断裂情况减轻;与 B 组比较,D 组肌动蛋白的连续性和断裂情况减轻(图 1)。

2.2 各组细胞 LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达的比较 与 A 组比较,B 组 LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达降低;与 C 组比较,D 组 LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达降低;与 A 组比较,C 组 LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达降低;与 B 组比较,D 组 LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达降低(表 1)。

2.3 各组细胞 β -arrestin-1 蛋白和 mRNA 表达的比较 与 A 组比较,B 组 β -arrestin-1 蛋白和 mRNA 表达升高;与 C 组比较,D 组 β -arrestin-1 蛋白和 mRNA 表达升高;与 A 组比较,C 组 β -arrestin-1 蛋白和 mRNA 表达无明显改变;与 B 组比较,D 组 β -arrestin-1 蛋白和 mRNA 表达无明显改变(图 2、表 1)。

表 1 各组细胞 LDH 水平、VCAM-1 和 β -arrestin-1 表达的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	LDH(U/L)	VCAM-1	β -arrestin-1	β -arrestin-1 mRNA
A 组	60.39±8.80	1.01±0.16	0.35±0.09	0.93±0.11
B 组	45.55±5.87 ^b	0.60±0.12 ^b	0.79±0.08 ^b	1.20±0.10 ^b

续表 1 各组细胞 LDH 水平、VCAM-1 和 β -arrestin-1 表达的比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	LDH(U/L)	VCAM-1	β -arrestin-1	β -arrestin-1 mRNA
C 组	36.67 \pm 4.13 ^b	0.45 \pm 0.04 ^b	0.44 \pm 0.07 ^d	1.05 \pm 0.13 ^c
D 组	25.13 \pm 3.55 ^{bde}	0.23 \pm 0.05 ^{bde}	0.92 \pm 0.14 ^{be}	1.25 \pm 0.06 ^{be}

^b: $P < 0.01$, 与 A 组比较; ^c: $P < 0.05$; ^d: $P < 0.01$, 与 B 组比较; ^e: $P < 0.01$, 与 C 组比较。

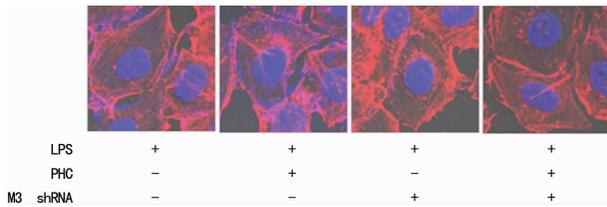
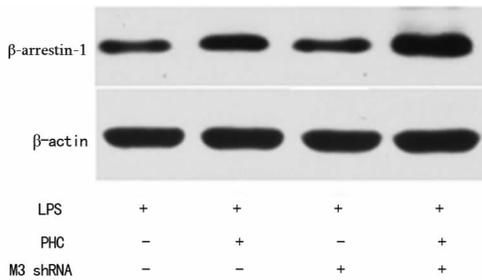


图 1 各组细胞肌动蛋白骨架变化的比较

图 2 各组细胞 β -arrestin-1 蛋白表达的比较

3 讨论

LDH 正常情况下存在于细胞内,但在细胞膜受损伤而通透性增加时,可通过受损的细胞膜释放出来,通过检测其水平高低能够较好的反映细胞受损程度^[5]。VCAM-1 为细胞黏附分子中的免疫球蛋白超家族成员,介导了中性粒细胞与内皮细胞的黏附激活并诱导炎症介质的产生,是肺微血管内皮细胞损伤发生发展的分子标志^[6]。盐酸戊乙奎醚是新型的选择性抗 M1、M3 受体型抗胆碱药,对中枢和外周均有很强的抗胆碱作用,可作用于细胞生物膜胆碱受体,通过 G 蛋白耦联环节,改变细胞内第二信使的浓度,减轻炎症因子、黏附分子及趋化分子的合成、释放,抑制有害介质对组织及细胞的损伤^[7]。本研究利用 LPS 与肺微血管内皮细胞共同孵育,结果表明,与 A 组比较,B 组 LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达降低,提示盐酸戊乙奎醚可以减轻 LPS 引起的肺微血管内皮细胞损伤。

β -arrestins 主要包括 β -arrestin-1 和 β -arrestin-2,是 GPCR 信号通路重要的接头和支架蛋白^[8]。在本研究中,预先给予盐酸戊乙奎醚 2 μ g/mL 后 LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达明显降低,而 β -arrestin-1 表达升高,提示盐酸戊乙奎醚可通过上调 β -arrestin-1 表达从而降低 LPS 导致的肺微血管内皮细胞损伤。

毒蕈碱样胆碱能受体(M 受体)是膜受体家族的成员,通过与异三聚体鸟苷酸结合蛋白(G 蛋白)耦联介导信号转导过程,因此又称 G 蛋白耦联受体(GPCRs)^[9]。而 β -arrestins 可以识别并结合磷酸化的毒蕈碱受体,阻断毒蕈碱受体与 G 蛋白之间的相互作用,从而阻断毒蕈碱受体介导的信号转导通路^[10]。本实验中,相对于其他 3 组细胞,D 组肌动蛋白骨架排列改善最明显,LDH 水平和 VCAM-1 蛋白表达水平最低,可

能是由于毒蕈碱 M3 受体表达被抑制,从而使 LPS 引起这些指标变化的程度减轻,而又累加上盐酸戊乙奎醚对这些指标的改善作用,因此 D 组表现的减轻内皮细胞损伤的作用最为明显。而与 B 组相比较,D 组 β -arrestin-1 表达无明显改变,证明盐酸戊乙奎醚调节 β -arrestin-1 的机制与 M3 受体并无直接联系。

综上所述,M3 受体在盐酸戊乙奎醚减轻 LPS 导致的肺微血管内皮细胞损伤中发挥着重要作用,沉默 M3 受体有助于降低 LPS 诱导的肺微血管内皮细胞损伤。但盐酸戊乙奎醚上调 β -arrestin-1 的作用与毒蕈碱受体 M3 的存在无必然联系。这种作用是否与毒蕈碱受体其他亚型相关,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Machado FR, Mazza BF. Improving mortality in sepsis: a analysis of clinical trials [J]. Shock, 2010, 34(1): 54-58.
- [2] Cribbs SK, Matthay MA, Martin GS. Stem cells in sepsis and acute lung injury [J]. Crit Care Med, 2010, 38(12): 2379-2385.
- [3] Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. Exp Rev Res Med, 2010, 4(6): 773-783.
- [4] 詹佳,李进杰,肖飞,等. 盐酸戊乙奎醚预先给药对脓毒症小鼠急性肺损伤时 β -抑制蛋白-1 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(4): 499-501.
- [5] Li Y, Xiang M, Yuan Y, et al. Hemorrhagic shock augments lung endothelial cell activation: role of temporal alterations of TLR4 and TLR2 [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297(6): 1670-1680.
- [6] Distasi MR, Ley K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability [J]. Trends Immunol, 2009, 30(11): 547-556.
- [7] Li BQ, Sun HC, Nie SN, et al. Effect of penehyclidine hydrochloride on patients with acute lung injury and its mechanisms [J]. Chin J Traumatol, 2010, 13(6): 329-335.
- [8] 刘毅,向旭东. β -抑制蛋白及其研究进展 [J/CD]. 中华哮喘杂志(电子版), 2011, 5(3): 208-212.
- [9] Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(28): 3573-3581.
- [10] Van Koppen CJ, Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling [J]. Pharmacol Ther, 2003, 98(2): 197-220.

(收稿日期:2016-11-23 修回日期:2017-01-11)