

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.09.005

## 藻酸双酯钠对脂多糖所致小鼠肺微血管内皮细胞损伤的保护作用研究\*

黄厚刚<sup>1</sup>, 史斌<sup>2</sup>, 税春玲<sup>1△</sup>

(1. 重庆医科大学附属永川医院麻醉科, 重庆 402160; 2. 四川省革命伤残军人医院麻醉科, 成都 610501)

**[摘要]** 目的 研究藻酸双酯钠(PSS)对脂多糖(LPS)所致的小鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC)损伤的保护作用。方法 体外培养 PMVEC, 随机将细胞分为空白对照组(C组)、LPS 刺激组(L组)、PSS+LPS 组(LP组)。采用 MTT 法检测 PSS 对 LPS 刺激 PMVEC 的细胞活力的影响, 虎红染色法测定中性粒细胞(PMN)对 PMVEC 黏附数量的影响, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 3 组培养上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的浓度。结果 PSS 能抑制 LPS 所致的 PMVEC 细胞活力下降( $P=0.001$ ); 与 C 组比较, L 组的 PMVEC 与 PMN 的黏附数量明显增加( $P=0.000$ ), TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的表达显著增加( $P=0.000$ ); 与 L 组比较, PSS 预处理 1 h 能显著降低 LPS 所致的 PMVEC 与 PMN 的黏附( $P=0.000$ ), LP 组的 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 表达显著降低( $P<0.05$ )。结论 PSS 能抑制 LPS 对 PMVEC 的损伤及 PMVEC 与 PMN 的黏附, 其作用机制可能与降低 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  的表达有关。

**[关键词]** 急性肺损伤; 藻酸双酯钠; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 细胞间黏附分子-1

**[中图分类号]** R543

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)09-1167-03

## Protective effects of polysaccharide sulfate on LPS-induced mice pulmonary microvascular endothelial cell injury\*

Huang Hougang<sup>1</sup>, Shi Bing<sup>2</sup>, Shui Chunling<sup>1△</sup>

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; 2. Department of Anesthesiology, Sichuan Provincial Hospital for Disabled Revolutionary Servicemen, Chengdu, Sichuan 610501, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of polysaccharide sulfate (PSS) on lipopolysaccharide (LPS)-induced mice pulmonary microvascular endothelial cell (PMVEC) injury in vitro. **Methods** PMVEC were divided into the blank control group (C), LPS stimulation group (L) and PSS+LPS group (LP). The effect of PSS on the viability of LPS-induced PMVEC was observed by MTT assay. The influence of polymorphonuclear (PMN) on the PMVEC adhesion number was measured by the rose Bengal staining. The concentrations of TNF- $\alpha$  and ICAM-1 in culture supernatant of PMVEC were detected by ELISA assay. **Results** PSS could inhibit the decrease of PMVEC viability caused by LPS ( $P=0.001$ ), compared with the group C, the adhesion number of PMVEC and PMN in the group L was significantly increased ( $P=0.000$ ), the expression of TNF- $\alpha$  and ICAM-1 was significantly increased ( $P=0.000$ ); compared with the group L, PSS pretreatment for 1 h could significantly decrease the LPS caused adhesion of PMVEC and PMN ( $P=0.000$ ), the expression of TNF- $\alpha$  and ICAM-1 in the group LP was significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PSS can inhibit LPS-induced PMVEC injury and adhesion of PMVEC and PMN, its mechanism may be related with the decrease of ICAM-1 and TNF- $\alpha$  expression.

**[Key words]** acute lung injury; polysaccharide sulfate; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; intercellular adhesion molecular-1

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是一组因肺泡毛细血管膜弥漫性损伤导致肺水肿和肺微不张, 以呼吸窘迫和顽固性低氧血症为主要临床表现的综合征, 进一步可发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 在临床非常常见且十分凶险。由于其发病机制复杂, 治疗效果不佳, 其病死率仍然居高不下, 平均病死率高达 50% 以上<sup>[1]</sup>。近年来许多研究显示, 肺血管内皮细胞在 ALI/ARDS 病理、生理过程中既是主要的受损靶细胞, 亦是活跃的炎症和效应细胞, 在 ALI/ARDS 中发挥重要作用<sup>[2]</sup>, 其损伤及活化是 ALI/ARDS 发生、发展的重要病理基础和关键环节, 因而改善内皮细胞损伤及调控其不当活化对 ALI/ARDS 的治疗和预后具有重要意义。

国内外研究发现传统的抗凝药肝素具有抑制中性粒细胞 (PMN) 对毛细血管内皮的黏附、减少炎症介质及细胞因子的

产生、阻止内皮细胞活化及氧自由基和脂质过氧化物的生成而发挥对抗氧自由基的损伤等作用, 从而应用于 ALI 的治疗<sup>[3-5]</sup>。藻酸双酯钠 (polysaccharide sulfate, PSS) 是我国最早从海藻中提取的一种类肝素物质, 被证明具有调血脂、抗凝血、改善血流动力学及改善微循环等作用, 过去临床上主要被应用于缺血性心脑血管病的治疗<sup>[6-7]</sup>。本实验采用小鼠肺微血管内皮细胞 (pulmonary microvascular endothelial cell, PMVEC) 为研究对象, 用细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激 PMVEC 建立炎症反应模型, 以研究 PSS 对 LPS 诱导 PMVEC 损伤的保护作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 药物与试剂** PSS 纯原料粉剂由青岛正大海尔制药公司馈赠; LPS 购自美国 Sigma 公司; 内皮细胞及培养液购自武

\* 基金项目: 重庆医科大学附属永川医院青年课题 (YJQN201002)。 作者简介: 黄厚刚 (1974—), 硕士, 主治医师, 主要从事急性肺损伤研究。 △ 通讯作者, E-mail: scling@163.com。

汉原生代生物医药科技有限公司;虎红和台盼蓝购自美国 Sigma 公司;兔抗小鼠 ICAM-1 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司;TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司。

**1.1.2 仪器** 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Thermo Forma 3110 二氧化碳培养箱(美国 Thermo Scientific 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 MTT 法检测 PMVEC 的细胞活力** 将小鼠 PMVEC 接种至 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,采用专用培养液在 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h。实验分 3 组:空白对照组(C组)、LPS 组(L组)与 LPS+PSS 组(LP组)。C组和 L组分别加入 100  $\mu$ L 培养液,LP组加入含 100  $\mu$ g/mL PSS 的培养液,于培养箱中孵育 1 h 后取出培养板,L组和 LP组加入 100  $\mu$ L 含有 1  $\mu$ g/mL LPS 的 ECM,C组加入 100  $\mu$ L ECM。每组各设 10 个复孔。继续孵育 24 h 后将培养液吸出,向每孔内加入 20  $\mu$ L 0.5% MTT 溶液及 100  $\mu$ L 培养液,37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后吸掉培养液,每孔中加入 DMSO 溶液 150  $\mu$ L,振荡 10 min 以完全溶解结晶。最后使用酶标仪检测各孔的 490 nm 吸光度值。

**1.2.2 PMVEC 与 PMN 黏附实验** 各组细胞孵育 24 h 后吸除每孔培养液,立即加入 PMN 200  $\mu$ L,培养 1 h 后吸去上清液,用 PBS 清洗 2 遍,然后在每孔中加入 100  $\mu$ L 0.25% 虎红染色,室温静置 10 min 后吸除虎红液,再用 PBS 清洗 2 遍,加入 200  $\mu$ L 1:1 的 95%乙醇-PBS 以脱色,室温静置 1 h,最后用酶标仪测定各孔 550 nm 波长处的吸光度值。

**1.2.3 PMVEC 培养上清液中 TNF- $\alpha$  的测定** 采用双抗体夹心 ELISA,按试剂盒说明书操作步骤测定 PMVEC 培养上清液中 TNF- $\alpha$  的含量。

**1.2.4 免疫细胞化学染色检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1) 细胞爬片**,PBS 洗涤盖玻片 3 $\times$ 5 min,加 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 10 min,PBS 洗涤 3 $\times$ 5 min,加山羊血清封闭,室温静置 20 min,吸干后滴加一抗 50  $\mu$ L(1:200),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 充分洗涤 3 $\times$ 5 min,然后加二抗于室温静置 20 min,PBS 充分洗涤 3 次,每次各 5 min。使用 DAB 显色,苏木精复染,最后于乙醇脱水二甲苯透明,使用中性和树胶封片。采用 Image Proplus 5.1 软件拍照并进行半定量分析,用蛋白阳性表达面积(area)和积分光密度值(IOD 值)两个指标进行比较。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计

量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行多组间数据统计分析,方差齐时采用 LSD 和 S-N-K  $t$  检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 和 Dunnett's C 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PSS 对 LPS 诱导 PMVEC 增殖的影响** 与 C 组比较,L 组 PMVEC 经 LPS 刺激 24 h 后,细胞活力明显下降( $P=0.000$ )。LP 组经过 PSS 预处理,与 L 组比较 PMVEC 活力升高,差异具有统计学意义( $P=0.001$ ),见表 1。

**2.2 PSS 对 PMVEC 与 PMN 黏附作用的影响** L 组中 PMVEC 与 PMN 的黏附数量较 C 组显著增加( $P=0.000$ ),而 LP 组 PMVEC 与 PMN 的黏附数量较 L 组显著减少( $P=0.000$ ),见表 2。

**2.3 PSS 对 LPS 诱导 PMVEC 分泌 TNF- $\alpha$  的影响** ELISA 结果显示:与 C 组比较,LPS 刺激 PMVEC 24 h 后,TNF- $\alpha$  分泌水平显著提高( $P=0.000$ )。与 LPS 组比较,PSS 预处理 PMVEC TNF- $\alpha$  分泌显著降低( $P=0.000$ ),见表 3。

表 1 PSS 对 LPS 诱导 PMVEC 增殖的影响( $n=10$ )

组别	OD 值( $\bar{x}\pm s$ )	增殖率(%)
C 组	0.678 $\pm$ 0.063	—
L 组	0.396 $\pm$ 0.057 <sup>a</sup>	58.4
LP 组	0.504 $\pm$ 0.065 <sup>b</sup>	74.3
F	53.083	—
P	0.000	—

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 L 组比较;—:此项无数据。

表 2 PSS 对 LPS 诱导 PMVEC 与中性粒细胞黏附作用的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本数( $n$ )	OD 值
C 组	10	0.321 $\pm$ 0.055
L 组	10	0.550 $\pm$ 0.074 <sup>*</sup>
LP 组	10	0.414 $\pm$ 0.062 <sup>#</sup>
F	32.159	—
P	0.000	—

<sup>\*</sup>: $P<0.05$ ,与 C 组比较;<sup>#</sup>: $P<0.05$ ,与 L 组比较。

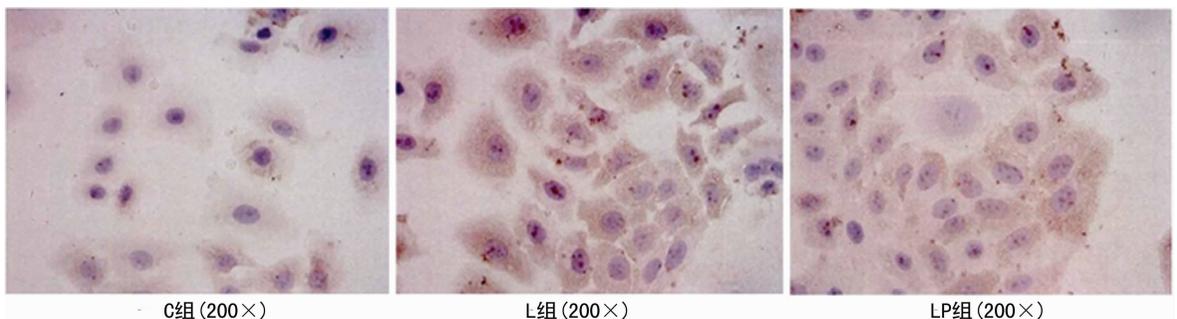


图 1 各组 PMVEC 中 ICAM-1 免疫细胞化学检测结果

**2.4 PSS 对 LPS 诱导 PMVEC 表达 ICAM-1 的影响** 光镜下观察 C 组 PMVEC 细胞质中可见少量 ICAM-1 表达(图 1)。

半定量分析结果显示,L 组 ICAM-1 阳性表达面积和 IOD 较 C 组均显著增加( $P=0.000$ )。而 PSS 预处理组的 ICAM-1 阳性

表达面积和 IOD 均显著低于 L 组 ( $P=0.05, 0.025$ ), 见表 3。

表 3 PSS 对 LPS 诱导 PMVEC 表达 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	ICAM-1	
		阳性表达面积( $\mu\text{m}^2$ )	IOD 值
C 组	195.42 $\pm$ 20.11	0.210 $\pm$ 0.031	0.088 $\pm$ 0.024
L 组	1 015.81 $\pm$ 83.67 <sup>a</sup>	0.310 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>	0.147 $\pm$ 0.037 <sup>a</sup>
LP 组	565.97 $\pm$ 45.74 <sup>b</sup>	0.251 $\pm$ 0.041 <sup>b</sup>	0.115 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>
F	356.085	14.125	9.862
P	0.000	0.000	0.001

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 C 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 L 组比较。

### 3 讨 论

近期研究发现肺血管内皮细胞在 ALI 的发病机制中担当着重要角色。肺血管内皮细胞在 LPS 等的作用下, 分泌和释放多种炎症介质及细胞因子, 打破机体促炎和抗炎过程的平衡, 引起 PMN 激活黏附聚集等过度炎性反应, 同时亦诱发凝血与抗凝系统平衡紊乱, 导致肺微循环障碍及肺动脉高压, 从而患者出现以进行性低氧血症和呼吸窘迫为主要表现的临床症状<sup>[8-9]</sup>。国内外研究报道传统的抗凝药肝素具有改善低氧血症和减轻炎性反应的效应从而可用于治疗 ALI。此外还有报道, 甘糖酯作为 PSS 的换代产品可通过增强尿激酶活性、激活纤溶系统, 而表现出良好的抗血栓作用, 且对氧化低密度脂蛋白所引发的血管内皮细胞损伤亦具有修复和保护作用<sup>[10-11]</sup>。因此, 笔者推测 PSS 具有保护血管内皮细胞、抑制 PMN 与内皮细胞黏附的功能。

本研究采用 100  $\mu\text{g/mL}$  浓度 PSS 预处理 PMVEC, 在 1  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS 刺激下, PMVEC 的活力明显的减低, 而 PSS 能部分的抑制 LPS 导致的 PMVEC 损伤, 说明 PSS 具有保护 PMVEC 的作用。有文献报道适当浓度的 PSS 能促进体外培养的人类脐静脉血管内皮细胞生长<sup>[12]</sup>, 与本研究结果类似。肺血管内皮细胞是各种肺损伤因素攻击的靶细胞, 其损伤后导致肺血管内皮细胞屏障功能下降, 毛细血管通透性增加, 从而出现肺水肿, 呼吸困难。因此, PSS 对 PMVEC 发挥出的保护作用提示其对 ALI 的治疗潜力。

正常情况下, PMN 和 PMVEC 不黏附或很少黏附<sup>[13]</sup>。当细菌进入体内释放 LPS 等内毒素性物质会激活机体炎症细胞释放 PG、LT 及 TXA<sub>2</sub> 等致炎因子, 从而促进 PMN 趋化和黏附聚集增多<sup>[14]</sup>。检测内皮细胞与中性粒细胞黏附的方法目前主要有直接计数法<sup>[15]</sup>和虎红染色法<sup>[16]</sup>。本实验采用的虎红染色法具有省时、方便、重复性好的优势。实验结果显示 LPS 刺激可显著增加 PMN 对 PMVEC 的趋化和黏附数量, 而 PSS 处理能显著抑制这一过程, 推测其可能存在以下机制: (1) PSS 具有保护内皮细胞作用, 促进其损伤修复, 从而降低 LPS 对 PMVEC 的炎症激活效应; (2) PSS 系一种酸性黏多糖类阴离子聚电解质, 其分子本身带有负电荷, 故能增加 PMVEC 表面负电荷及细胞间静电排斥力, 从而阻碍其黏附<sup>[6]</sup>; (3) PSS 可能减少炎症因子和黏附分子的表达而发挥直接抗炎作用。本研究亦进一步对此进行了验证, 发现 PSS 确可抑制 LPS 诱导的肺血管内皮细胞 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  表达。

总之, 本研究证实 PSS 能抑制 LPS 对 PMVEC 的损伤, 并能抑制 LPS 诱导的 PMVEC 与 PMN 之间的黏附, 其作用机制可能与降低 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  的表达有关, 这些发现提示

PSS 应用于治疗 ALI 的潜力。但本研究仅为体外试验, PSS 对 ALI 的确切疗效还有待在动物实验中进一步验证评价。

### 参考文献

- [1] 金发光. 急性肺损伤的诊治研究现状及进展[J/CD]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2013, 6(1): 1-3.
- [2] Cheng IW, Matthay MA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Clin, 2003, 19(4): 693-712.
- [3] 杨琼, 刘丰海, 徐仑. 急性肺损伤的发病机制及肝素的保护作用[J]. 齐鲁医学杂志, 2002, 17(3): 278-279.
- [4] Derhaschnig U, Pernerstorfer T, Knechtelsdorfer MA, et al. Evaluation of antiinflammatory and antiadhesive effects of heparins in human endotoxemia[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1108-1112.
- [5] 韩旭东, 黄晓英, 葛志华, 等. 持续小剂量肝素治疗脓毒症患者急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合症的临床研究[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(12): 1730-1732.
- [6] 于丽凤, 赵金生, 于龙, 等. 藻酸双酯钠对 2 型糖尿病心血管并发症防治作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(5): 630-635.
- [7] 史丽华, 荣阳, 荣根满. 藻酸双酯钠溶栓治疗急性脑梗死的疗效分析与临床研究[J]. 中国医药指南, 2015, 13(9): 128-129.
- [8] 李亚春, 李颖川, 周明. 肺血管内皮细胞损伤与修复在急性肺损伤中的作用[J]. 中国临床医学, 2010, 17(6): 819-821.
- [9] 杜景霞, 魏国会. 肺血管内皮细胞结构功能变化与急性肺损伤[J]. 河北医药, 2012, 34(23): 3624-3626.
- [10] 姚子昂, 马洪明, 姜招峰, 等. 甘糖酯对大鼠尿激酶型纤溶酶原激活物活性的诱导作用[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 2001, 31(2): 215-219.
- [11] 滕继军. 甘糖酯对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的作用[J]. 齐鲁医学杂志, 2003, 18(3): 224-226.
- [12] 赵仁亮, 王春霞, 赵俊武, 等. 藻酸双酯钠对血管内皮细胞的生长及其与中性粒细胞黏附功能的影响[J]. 中国海洋药物, 2007, 26(3): 41-44.
- [13] Van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Nègre-Aminou P, et al. Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function[J]. Circulation, 2000, 102(23): 2803-2809.
- [14] Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, et al. A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283(6): C1592-1603.
- [15] 曾祥元, 顾大勇, 马布仁, 等. LPS 诱导肺微血管内皮细胞与 PMN 的黏附作用及核调控机理的实验研究[J]. 中国微循环, 2002, 6(5): 310-311.
- [16] 任钧国, 邱全瑛, 郝钰, 等. 清解宁对白细胞血管内皮细胞黏附的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(9): 618.