文章编号:1000-5404(2010)10-1047-04

论著

卡托普利对急性肺损伤血凝素样氧化低密度血浆脂蛋白受体-1 蛋白表达的影响

韩鹏凯,张 婷,王导新 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 研究大鼠急性肺损伤模型及其卡托普利干预下肺组织血凝素样氧化低密度血浆脂蛋白受体-1(lectin-like oxidized LDL receptor-1,LOX-1)蛋白表达的变化,旨在探讨 LOX-1 在急性肺损伤中的表现及初步干预措施。**方法** 将 30 只 SD 大鼠按随机数字法分成 3 组:生理盐水对照组、脂多糖组(5 mg/kg)和卡托普利治疗组(1.25 mg/kg),每组 10 只。观察各组大鼠动脉血氧分压[$p(O_2)$]、肺湿质量/干质量值(W/D)、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)蛋白含量及肺组织病理变化,利用 Western blot 法检测各组大鼠肺组织中 LOX-1 蛋白的表达。**结果** 脂多糖处理后大鼠的肺部炎症反应显著,以中性粒细胞浸润为主,脂多糖组 $p(O_2)$[(6.86 ± 0.75)kPa]较对照组[(12.14 ± 0.60)kPa]下降($P < 0.05$),脂多糖组肺 W/D(7.47 ± 0.31)、BALF 蛋白含量(0.39 ± 0.07) g/L、LOX-1 蛋白的表达(0.91 ± 0.12)较对照组肺 W/D(3.82 ± 0.21)、BALF 蛋白含量(0.26 ± 0.05)g/L、LOX-1 蛋白表达量(0.38 ± 0.05)升高($P < 0.05$)。与脂多糖组 $p(O_2)$ 相比,卡托普利治疗组 $p(O_2)$[(9.43 ± 0.89)kPa]和肺组织病理变化明显改善,肺 W/D(5.21 ± 0.08)、BALF 蛋白含量(0.34 ± 0.05)g/L 和 LOX-1 蛋白表达(0.43 ± 0.08)降低($P < 0.05$)。**结论** LOX-1 蛋白可能参与急性肺损伤过程;卡托普利对急性肺损伤有保护作用,而此作用可能与抑制 LOX-1 的表达有关。

[关键词] 急性肺损伤;卡托普利;血凝素样氧化低密度血浆脂蛋白受体-1
[中图法分类号] R563.02; R972.4; R394.1 **[文献标志码]** A

Captopril suppresses lectin-like oxidized LDL receptor-1 protein in rats after acute lung injury

Han Pengkai, Zhang Ting, Wang Daoxin (Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) protein in acute lung injury (ALI) and the effect of captopril on this expression in order to investigate its role in the process and preliminary intervention. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups, normal control group, lipopolysaccharide (LPS) groups, and a LPS + captopril group, each group 10 rats. ALI model was induced by intratracheal injection of LPS (5 mg/kg), then those of LPS + captopril group were give an intraperitoneal injection of captopril (1.25 mg/kg). The animals of normal control group received an intratracheal injection of normal saline. In 6 h after LPS injection, the level of $p(O_2)$, wet/dry ratio (W/D), concentration of total protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue histopathological changes were examined. The expression of LOX-1 protein in the lung tissue was measured by Western blot analysis. HE staining was used to examine the pathological changes of the lung. **Results** Histological examination showed that extensive lung inflammation were seen in the LPS group, which manifested by accumulation of significant numbers of neutrophils. The level of $p(O_2)$ in LPS group [(6.86 ± 0.75) kPa] was decreased compared with that in sham group [(12.14 ± 0.60) kPa, $P < 0.05$]. The level of W/D (7.47 ± 0.31), concentration of total protein in BALF (0.39 ± 0.07) g/L and the expression of LOX-1 protein (0.91 ± 0.12) in LPS group were increased significantly compared with W/D (3.82 ± 0.21), total protein in BALF (0.26 ± 0.05) g/L and LOX-1 expression of protein in sham group (0.38 ± 0.05) ($P < 0.05$)]. Compared with LPS group, these changes were markedly attenuated in LPS + captopril group ($P < 0.05$) [W/D (5.21 ± 0.08), total protein in BALF (0.34 ± 0.05) g/L, and LOX-1 protein expression (0.43 ± 0.08), and the level of $p(O_2)$ (9.43 ± 0.89) kPa] and pathological changes of the lung were also ameliorated in this group. **Conclusion** LOX-1

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研项目(2008-2-224)
[通信作者] 张 婷, E-mail:zhangtng@tom.com

protein may be involved in the pathogenesis of ALI. Captopril exerts a protective effect on ALI, which may be through inhibiting the expression of LOX-1 protein.

[**Key words**] acute lung injury; captopril; lectin-like oxidized LDL receptor-1

Supported by the Medical Scientific Research Program of Chongqing Municipal Health Bureau(2008-2-224). Corresponding author: Zhang Ting, Email:zhangtng@tom.com

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是由多种炎症细胞介导的肺部局部炎症反应和炎症反应失控所致的肺毛细血管损伤,是临床常见的呼吸危重症。虽然这方面的研究取得了巨大的进展,但病死率仍很高[1]。更清楚地认识它的发病机制,将有助于研究新的治疗方案。血凝素样氧化低密度血浆脂蛋白受体-1(lectin-like oxidized LDL receptor-1,LOX-1)是一种在内皮细胞丰富表达的Ⅱ型单链跨膜蛋白,属C型选择素家族,是一种氧化低密度血浆脂蛋白受体。以往的研究[2]表明LOX-1是动脉粥样硬化重要的介质,而近来研究[3]发现LOX-1在内毒素炎症中具有重要的作用,但LOX-1在急性肺损伤中的表现尚少见报道。我们的实验旨在研究LOX-1在急性LPS介导性肺损伤中的表现及初步的干预措施。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性清洁级成年SD大鼠30只,体质量(230±20)g(重庆医科大学实验动物中心提供),脂多糖(LPS,0111:B4)购自Sigma公司,全蛋白提取试剂购自南京凯基生物科技发展有限公司,山羊抗鼠LOX-1多克隆抗体(SC-11653,Santa Cruz),β-肌动蛋白抗体(北京博奥森生物技术有限公司),Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所),卡托普利原料(常州制药厂有限公司馈赠)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及动物预备 30只大鼠,随机数字法分为3组:对照组、脂多糖组和卡托普利治疗组,每组10只。参照文献[4]所述方法,大鼠腹腔注射10%的水合氯醛麻醉后,气管切开,LPS(5 mg/kg)溶于0.5 ml无菌生理盐水中,脂多糖组大鼠气道内缓慢滴入脂多糖,建立肺损伤模型。对照组气道内缓慢滴入等量无菌生理盐水,参照文献[5]所述方法,卡托普利组在前法给予LPS后,立即腹腔注射卡托普利(1.25 mg/kg),卡托普利原料按照1.25 mg/ml溶于10%葡萄糖溶液中,脂多糖组腹腔注射等量10%葡萄糖溶液,各组均于气道滴入完成6 h后取样。

1.2.2 标本采集 在预定时间将大鼠麻醉后,右侧股动脉插管抽血0.3 ml,进行血气分析。经腹主动脉抽血约3 ml,同时放血处死动物。结扎右肺后,暴露气管行气管插管,用无菌生理盐水1.5 ml分3次进行支气管肺泡灌洗,支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)回收率达80%~90%,BALF于4 ℃,1 500 r/min离心10 min,取上清液-20 ℃保存,完整切除右肺备用。

1.3 指标检测

1.3.1 支气管肺泡灌洗液中蛋白含量的测定 按照Bradford蛋白浓度测定试剂盒说明书操作,测定BALF中蛋白含量。

1.3.2 W/D测定 取出右肺上叶,迅速用纱布吸取表面水分和血液,电子天平称重后用锡箔纸包裹,置于70 ℃烘箱内烘干72 h至恒重,称质量并计算W/D值。

1.3.3 肺组织病理学观察 右肺中叶10%的甲醛固定后,制备石蜡切片,HE染色观察肺组织。

1.3.4 Western blot分析肺组织LOX-1蛋白的表达 按照蛋白提取试剂说明书,提取肺组织总蛋白,取称质量后的右肺下叶按照100 mg组织加蛋白裂解液1 ml进行冰浴匀浆,充分匀浆后转移到预冷的4 ℃ EP管中。以4 ℃ 10 000 r/min进行低温离心15 min,取上清液,弃沉淀。将上清液转入新的EP管中,取10 μl肺组织匀浆,用BCA法进行蛋白定量。选择β肌动蛋白(β-actin)作内参。参照文献[6]所述Western blot检测LOX-1蛋白的方法,制备SDS-PAGE凝胶,分离胶的浓度为10%,取上清液加入1/4体积的5×SDS-PAGE样品缓冲液,煮沸10 min用微量加样器将已经稀释并煮沸的蛋白样品(100 μg)加入加样孔中,在一加样孔中加入蛋白Marker,连接电源电泳。电泳完毕后,恒流250 mA,70 min将样品转移至PVDF膜,用TBS洗膜3次,每次5 min,用含5%脱脂奶粉的TBS液封闭,室温摇床摇动1 h。弃去封闭液,加入以封闭液稀释的第一抗体(山羊抗鼠LOX-1多克隆抗体,1:500),室温下摇床摇动1 h,然后4 ℃过夜。取出膜,用TBS洗涤3次,每次5 min,加入以封闭液稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊IgG抗体,1:2 000),室温摇床孵育2 h,TBS洗涤3次,每次5 min。用滤纸将膜表面吸干,在PVDF膜蛋白面滴加ECL化学发光试剂,用凝胶成像系统检测,采用Quantity One进行图像分析后作蛋白表达量的半定量分析。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,运用SAS 9.1统计软件进行分析。多组均数比较采用单因素方差分析,均数两两比较采用SNK检验。

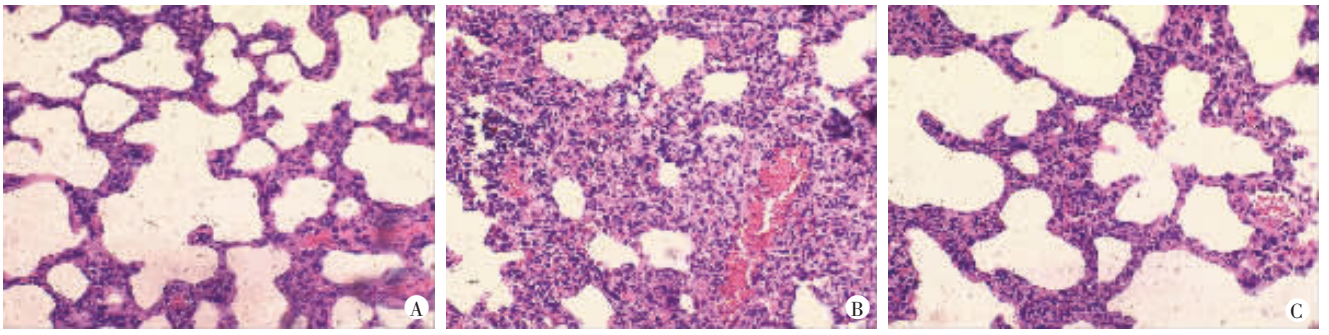
2 结果

2.1 肺W/D、BALF蛋白含量和动脉血氧分压(PaO_2)水平

脂多糖组肺W/D比值和BAFL蛋白含量均显著高于对照组,卡托普利治疗组W/D比值和BAFL蛋白含量与脂多糖组相比两者均降低,差异有统计学意义($P<0.05$);而脂多糖组较对照组动脉血氧分压明显降低,给予卡托普利干预后动脉血氧分压得到改善,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 肺组织病理学变化

光镜下见对照组肺组织结构清晰,肺泡腔及支气管腔未见炎症细胞及渗出物。脂多糖组可见点、片状出血,大量中性粒细胞浸润,显示明显的炎症和轻度肺水肿现象,肺泡间隔明显增厚,肺泡腔变窄。卡托普利组上述病理变化明显改善。见图1。



A:对照组;B:脂多糖组;C:卡托普利组

图 1　大鼠肺组织形态学改变　(HE ×400)

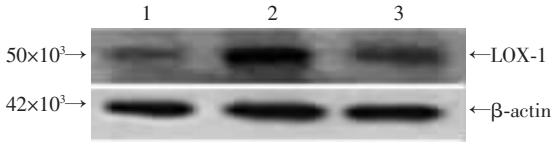
表 1　各组大鼠肺 W/D 比值、$p(O_2)$和 BALF 蛋白含量的比较
($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	W/D	$p(O_2)$(kPa)	BALF 蛋白含量(g/L)
对照组	3.82 ± 0.21	12.14 ± 0.60	0.26 ± 0.05
脂多糖组	7.47 ± 0.31[a]	6.86 ± 0.75[a]	0.39 ± 0.07[a]
卡托普利组	5.21 ± 0.08[ab]	9.43 ± 0.89[ab]	0.34 ± 0.05[ab]

a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与脂多糖组比较

2.3　Western blot 检测结果

在给予脂多糖后,免疫印迹结果显示肺组织 LOX-1 蛋白表达较对照组明显升高,而给予卡托普利的其治疗组肺组织 LOX-1 蛋白表达较脂多糖组明显下降,但仍较对照组高,统计分析显示组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。各组 LOX-1 蛋白的相对表达量分别为:对照组(0.38 ± 0.05),LPS 组(0.91 ± 0.12),卡托普利组(0.43 ± 0.08)。结果见图 2。



1: 对照组; 2: LPS 组; 3: 卡托普利组

图 2　Western blot 检测大鼠肺组织 LOX-1 蛋白的表达

3　讨论

研究表明,中性粒细胞在肺内黏附、聚集和激活是 ALI 发病的重要病理基础[7],而中性粒细胞通过"呼吸爆发"释放多种炎症介质、蛋白酶和氧自由基等对 ALI 发生起重要作用。此外,很多学者也认为,失控的全身炎症反应是导致 ALI 或急性呼吸窘迫综合征的根本原因[8,9]。

LOX-1 属于 C 型植物凝集素家族,Ⅱ型膜蛋白结构,有 1 个短的 N 末端细胞质亲水结构域和 1 个长的 C 末端胞外亲水结构域,被 26 个氨基酸组成的疏水区隔开。LOX-1 与自然杀伤细胞受体有高度的同源性,后者主要起靶细胞的识别与自然杀伤细胞激活作用。LOX-1 不仅作为氧化低密度血浆脂蛋白的受体还可以识别凋亡细胞、细菌和激活的血小板。近来有文献报道 LOX-1 作为 1 种细胞黏附分子参与炎症反应,促进白细胞捕获、游走,并且可以直接与中性粒细胞结合,作为 1 种急性炎症介质。Megumi 等的 1 项动物实验发现,LOX-1 的中和性抗体可以减少白细胞和蛋白的渗出,减少内毒素休克动物的病死率,并且体外实验发现,重组 LOX-1 蛋白可以与多形核中性细胞结合,LOX-1 的中和性抗体可以抑制它们的结合。而最近有实验发现 LOX-1 蛋白参与 LPS 介导的急性肺损伤,是急性肺损伤的一个重要因素[10],LOX-1 可以通过介导炎症反应参与急性肺损伤机制,而多种炎症介质可以促进 LOX-1 蛋白的表达[11]。本实验中利用 LOX-1 特异性抗体进行 Western blot 检测,结果显示 ALI 组 LOX-1 蛋白表达较对照组明显升高,提示肺损伤的发生及明显的炎症反应可能与 LOX-1 蛋白表达量的增加有关,LOX-1 可能参与了急性肺损伤过程。

近来 Imai 等[12]报道肾素-血管紧张素系统在急性肺损伤的发病机制中起着重要的作用,实验显示急性肺损伤时,肺组织 Ang Ⅱ水平升高[13],并进一步促进炎症反应[14]。研究表明血管紧张Ⅱ可介导白细胞与内皮细胞相互作用,具有促炎因子作用,促进白细胞粘附和游走[15],促进肺损伤,而应用 *Ang* Ⅱ受体阻滞剂氯沙坦,可以减轻急性肺损伤时肺受损程度[16]。*Ang* Ⅱ主要是由血管紧张素转化酶(ACE)催化 *Ang* Ⅰ转化而来的,阻断这一转化过程,就可使 *Ang* Ⅱ合成减少减轻炎症反应。卡托普利是 1 种血管紧张素转化酶抑制剂,它能抑制血管紧张素转化酶(ACE)的活性,使血管紧张素Ⅰ(*Ang* Ⅰ)向血管紧张素Ⅱ(*Ang* Ⅱ)转化减少。He 等[5]证实在油酸导致的肺损伤时,卡托普利可以减轻肺水肿,减少 BALF 蛋白含量及肺组织中性粒细胞浸润,减小肺损伤程度。LOX-1 能被内毒素、血管

紧张素Ⅱ等多种刺激所诱导。于是在我们的实验中试图寻找一种降低LOX-1蛋白表达的方法,ACE抑制剂可抑制*Ang* Ⅰ向*Ang* Ⅱ的转换,从而下调LOX-1蛋白的表达。Kobayashi等[17]报道ACE抑制剂可以降低心脏血管重构时LOX-1的表达,所以我们选用ACE抑制剂卡托普利观察它对急性肺损伤时肺LOX-1蛋白表达的影响,结果显示卡托普利组LOX-1蛋白表达较ALI组明显降低。提示卡托普利可能是通过降低LOX-1蛋白的表达,起到了减轻炎症反应的效果,从而对肺损伤起到保护作用。

本实验利用气道滴入LPS的方法,建立感染后ALI动物模型,旨在模拟临床上严重感染诱导的急性肺损伤。ALI可由严重感染、大面积肺栓塞、外伤等多种因素所致,而严重感染是引起急性肺损伤的主要原因之一。本实验中大鼠经气管滴注脂多糖后,$p(O_2)$下降、肺W/D增加、BALF蛋白含量增加,病理检查显示肺泡充血、水肿、肺泡间隔增宽、大量炎症细胞浸润,符合急性肺损伤改变,模型有效。在我们的实验中因条件有限,未能行动脉插管检测动脉血压的变化,评价实验剂量卡托普利对实验动物血压的影响,但文献[4]报道给予实验剂量的卡托普利,实验动物的动脉压与对照组差异无统计学意义。

综上所述,我们的实验证实,急性肺损伤时LOX-1蛋白表达增高,而给予卡托普利干预后,LOX-1蛋白表达降低,肺部炎症反应减轻。推测LOX-1蛋白可能参与了急性肺损伤的发病过程,卡托普利通过降低LOX-1蛋白的表达减轻炎症反应而对肺损伤起到保护作用。但我们的实验未能观察肺急性损伤时LOX-1的动态变化及利用阻断性抗体研究LOX-1的作用,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] MacCallum N S, Evans T W. Epidemiology of acute lung injury[J]. Curr Opin Crit Care, 2005, 11(1): 43-49.

[2] Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. Pharmacol Ther, 2002, 95(1): 89-100.

[3] Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, *et al*. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 1274-1279.

[4] Kang J L, Lee H W, Lee H S, *et al*. Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(12): 2206-2212.

[5] He X, Han B, Mura M, *et al*. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents oleic acid-induced severe acute lung injury in rats[J]. Shock, 2007, 28(1): 106-111.

[6] Hofnagel O, Luechtenborg B, Stolle K, *et al*. Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(10): 1789-1795.

[7] Tamura D Y, Moore E E, Partrick D A, *et al*. Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response[J]. Shock, 2002, 17(4): 269-273.

[8] Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome[J]. J Pathol, 2004, 202(2): 145-156.

[9] 王建春,姜鹏,黄建,等. 急性肺损伤大鼠肺组织PPAR-γ表达的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 468-471.

[10] Zhang P, Liu M C, Cheng L L, *et al*. Blockade of LOX-1 prevents endotoxin-induced acute lung inflammation and injury in mice[J]. J Innate Immun, 2009, 1(4): 358-365.

[11] Shibata Y, Kume N, Arai H, *et al*. Mulberry leaf aqueous fractions inhibit TNF-alpha-induced nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in vascular endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2007, 193(1): 20-27.

[12] Imai Y, Kuba K, Rao S, *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure[J]. Nature, 2005, 436(7047): 112-116.

[13] Zhang H, Sun G Y. LPS induces permeability injury in lung microvascular endothelium via AT1 receptor[J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 441(1): 75-83.

[14] Pueyo M E, Gonzalez W, Nicoletti A, *et al*. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 *via* nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(3): 645-651.

[15] Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, *et al*. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions *in vivo via* AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation[J]. Circulation, 2000, 102(17): 2118-2123.

[16] Liu L, Qiu H B, Yang Y, *et al*. Losartan, an antagonist of AT1 receptor for angiotensin II, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rat[J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 481(1): 131-136.

[17] Kobayashi N, Honda T, Yoshida K, *et al*. Critical role of bradykinin-eNOS and oxidative stress-LOX-1 pathway in cardiovascular remodeling under chronic angiotensin-converting enzyme inhibition[J]. Atherosclerosis, 2006, 187(1): 92-100.

(**收稿**:2009-12-08;**修回**:2010-02-26)

(编辑 邓强庭)