

$\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂通过抑制核转录因子 κB 活化可减轻脂多糖诱导的巨噬细胞炎症反应

石星星 姚建华 王成 张西京

710032 陕西西安,第四军医大学附属西京医院麻醉科(石星星、王成、张西京);710032 陕西西安,西安市第四医院麻醉科(姚建华)

通讯作者:张西京,Email:zhangxj918@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.04.003

【摘要】 目的 研究 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体 ($\alpha 7nAChR$) 激动剂对脂多糖 (LPS) 诱导巨噬细胞炎症反应的调控作用及其分子机制。**方法** 体外培养 RAW264.7 巨噬细胞,用 LPS 诱导炎症细胞模型进行实验。用 1、10、100 和 500 $\mu g/L$ LPS 刺激细胞 5 h 或用 100 $\mu g/L$ LPS 刺激细胞 0、2、4、8、12、24、48、72 h;酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达,免疫荧光法检测 $\alpha 7nAChR$ 在巨噬细胞的定位,细胞增殖与毒性试剂盒 (CCK8) 检测 1、10、100、1 000 $\mu mol/L$ $\alpha 7nAChR$ 激动剂 (GTS-21) 对 LPS 刺激后细胞活性的影响;ELISA 检测不同浓度 GTS-21 对 LPS 刺激后促炎因子 TNF- α 、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的表达。用 100 $\mu g/L$ LPS 和 100 $\mu mol/L$ GTS-21 刺激巨噬细胞,蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测高迁移率蛋白 B1 (HMGB1) 表达,免疫荧光法检测 HMGB1、NF- κB p65 在细胞内的位置变化。**结果** 100 $\mu g/L$ LPS 刺激巨噬细胞 24 h 时 TNF- α 表达达高峰。免疫荧光法检测显示,巨噬细胞膜上有 $\alpha 7nAChR$ 存在。 $\alpha 7nAChR$ 激动剂 GTS-21 无细胞毒性作用,且可呈剂量依赖性地反转 LPS 诱导细胞活性下降 [(96.2 $\pm$ 1.0)%、(92.0 $\pm$ 1.1)% 比 (86.5 $\pm$ 2.2)%,均 $P<0.05$]。与对照组比较,LPS 组细胞上清液中 TNF- α (ng/L:453.0 $\pm$ 60.6 比 100.8 $\pm$ 3.2) 和 IL-1 β ($\mu g/L$:8.21 $\pm$ 0.31 比 0.87 $\pm$ 0.16) 水平均明显升高 (均 $P<0.05$);用 10 $\mu mol/L$ 和 100 $\mu mol/L$ GTS-21 干预后可剂量依赖性地减少上清液中 TNF- α (ng/L:227.5 $\pm$ 17.5、81.0 $\pm$ 8.8 比 453.0 $\pm$ 60.6) 和 IL-1 β ($\mu g/L$:4.86 $\pm$ 0.72、2.32 $\pm$ 0.45 比 8.21 $\pm$ 0.31) 表达水平 (均 $P<0.05$)。GTS-21 可明显降低 LPS 诱导的 HMGB1 表达水平 (灰度值:0.788 $\pm$ 0.130 比 2.061 $\pm$ 0.330, $P<0.05$),并反转了 LPS 诱导的 HMGB1 胞质转移;同时 GTS-21 还可逆转 LPS 诱导的 NF- κB p65 核转位。**结论** $\alpha 7nAChR$ 激动剂 GTS-21 通过抑制 NF- κB 活化途径而减轻 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应。

【关键词】 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂; 胆碱能抗炎通路; 炎性因子; 核转录因子 κB ; 巨噬细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (81272135)

$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuated the lipopolysaccharide-induced inflammatory response via inhibiting the activation of nuclear factor- κB Shi Xingxing, Yao Jianhua, Wang Cheng, Zhang Xijing

Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China (Shi XX, Wang C, Zhang XJ); Department of Anesthesiology, Xi'an NO.4 Hospital, Xi'an 710032, Shaanxi, China (Yao JH)

Corresponding author: Zhang Xijing, Email: zhangxj918@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) on the inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 macrophages and its molecular mechanisms. **Methods** RAW264.7 macrophages were cultured *in vitro*. Inflammatory cell model was constructed by LPS stimulation. Cells were challenged by LPS (1, 10, 100 and 500 $\mu g/L$) for 5 hours or 100 $\mu g/L$ LPS for 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours, and the release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The location of $\alpha 7nAChR$ was examined in RAW264.7 macrophages by immunofluorescence. Then the cell proliferation and toxicity kit (CCK-8) was used to detect 1, 10, 100, 1 000 $\mu mol/L$ GTS-21, a $\alpha 7nAChR$ agonist, on the cell viability after LPS stimulation. ELISA was used to detect 1, 10, 100, 1 000 $\mu mol/L$ GTS-21 on the levels of TNF- α , interleukin 1 β (IL-1 β) after LPS stimulation. Cells were challenged with 100 $\mu g/L$ LPS and 100 $\mu mol/L$ GTS-21, then, the level of high mobility group box 1 (HMGB1) was detected by Western Blot and the intracellular location of HMGB1 and nuclear factor- κB p65 (NF- κB p65) was tested by immunofluorescence. **Results** LPS increased the level of TNF- α to a peak at the concentration of 100 $\mu g/L$ and at 24 hours after stimulation. The $\alpha 7nAChR$ expressed on the macrophages. The cell viability was decreased in a dose-dependent manner [(96.2 $\pm$ 1.0)%, (92.0 $\pm$ 1.1)% vs. (86.5 $\pm$ 2.2)%, both $P<0.05$]. Compared with the control group, the levels of TNF- α and IL-1 β in the supernatant of LPS group were significantly increased [TNF- α (ng/L): 453.0 $\pm$ 60.6 vs. 100.8 $\pm$ 3.2, IL-1 β

($\mu\text{g/L}$): 8.21 ± 0.31 vs. 0.87 ± 0.16 , both $P < 0.05$]. $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ were significantly decreased by $10 \mu\text{mol/L}$ and $100 \mu\text{mol/L}$ GTS-21 in a dose-dependent manner [$\text{TNF-}\alpha$ (ng/L): 227.5 ± 17.5 , 81.0 ± 8.8 vs. 453.0 ± 60.6 ; $\text{IL-1}\beta$ ($\mu\text{g/L}$): 4.86 ± 0.72 , 2.32 ± 0.45 vs. 8.21 ± 0.31 , all $P < 0.05$]. GTS-21 significantly reduced the expression of HMGB1 which was induced by LPS management (gray value: 0.788 ± 0.130 vs. 2.061 ± 0.330 , $P < 0.05$) and reversed LPS-induced HMGB1 cytoplasmic transfer. GTS-21 also reversed LPS-induced nuclear translocation of NF- κB p65.

Conclusion GTS-21 reduces the inflammatory response via inhibiting the activation of NF- κB .

【Key words】 $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor; Cholinergic anti-inflammatory pathway; Inflammatory factor; Nuclear factor- κB ; Macrophages

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81272135)

研究表明,迷走神经在调控炎症反应方面有一定作用^[1-2],迷走神经传出纤维可以抑制炎症反应,减缓内毒素血症引起的休克发展进程,这种抗炎机制被称为胆碱能抗炎通路^[3-4]。迷走神经末梢释放的递质为乙酰胆碱(ACh), $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7\text{nAChR}$)是其受体之一,存在于大多数炎性细胞的表面,包括单核细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、树突细胞和成纤维样滑膜细胞等^[5-8],这些研究均表明, $\alpha 7\text{nAChR}$ 激动剂可能发挥抗炎作用。

研究表明, $\alpha 7\text{nAChR}$ 激动剂 GTS-21 能减少促炎因子产生^[9],提高脓毒症^[10]、胰腺炎^[11]、缺血/再灌注损伤^[12]动物的存活率,并可抑制内毒素诱导的肺组织中肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF-}\alpha$)的产生^[13];此外,GTS-21 可通过调节酪氨酸蛋白激酶/信号转导和转录激活因子 3 (JAK2/STAT3) 信号通路抑制内皮细胞和单核/巨噬细胞激活,同时减少外周血中促炎细胞因子的分泌^[14-16]。因此认为 $\alpha 7\text{nAChR}$ 激动剂是炎症紊乱疾病的有效潜在治疗药物,但其抗炎效应的具体分子机制尚不明确。 $\alpha 7\text{nAChR}$ 激动剂对其他促炎细胞因子生成的影响,特别是对与炎性细胞因子生成的细胞内分子核转录因子- κB (NF- κB)的作用少有报道。因此,本研究选择小鼠单核/巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 为研究对象,探讨 $\alpha 7\text{nAChR}$ 介导的胆碱能抗炎通路对脂多糖(LPS)诱导细胞炎症反应中 $\text{TNF-}\alpha$ 、白细胞介素- 1β ($\text{IL-1}\beta$)、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 以及 NF- κB 核转位的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: RAW 264.7 巨噬细胞购于上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所。高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),胰酶、青霉素/链霉素(中国 Beyotime 公司),LPS、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,美国 Sigma 公司),GTS-21、兔源 HMGB1 和 NF- κB p65 抗体(英国 Abcam 公司),兔源 β -肌动蛋白(β -actin)

抗体(华安生物公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(美国 Thermo Fisher 公司),Alexa Fluor[®] 488 荧光染料标记驴抗兔 IgG(H+L)抗体(美国 Jackson Immuno Research 公司),细胞增殖与毒性检测试剂盒(CCK-8,上海七海复泰生物科技有限公司),酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 eBioscience 公司)。

1.2 细胞培养: 将 RAW 264.7 巨噬细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养基,于 37°C 、95% 空气和 5% CO_2 的温箱中培养,2~3 d 换液 1 次,3~4 d 传代 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 ELISA 检测炎性因子表达: 用不同剂量 LPS 刺激细胞不同时间点以确定 LPS 最佳刺激剂量和时间。将细胞分为对照组、LPS 组、不同浓度 GTS-21 干预组($10 \mu\text{mol/L}$ 、 $100 \mu\text{mol/L}$),收集各组细胞培养上清液,BCA 法进行蛋白定量,按 ELISA 试剂盒说明书步骤检测上清液 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 水平。

1.3.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 HMGB1 表达: 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次细胞样品,加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。将蛋白样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离(凝胶浓度为 10%),电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h,用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗膜后加入兔源 HMGB1 抗体(1:1000)和 β -actin 抗体(1:2000),室温下孵育 1 h, 4°C 孵育过夜。TBST 漂洗,加入 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:3000)室温孵育 2 h;漂洗后加入显色底物硝基蓝四唑(NBT/BCIP),使用显影扫描仪进行灰度分析。

1.3.3 免疫荧光检测细胞中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、HMGB1、NF- κB p65 的表达: 用细胞爬片,将 24 孔板中的细胞样品用 PBS 洗涤后加入 4% 多聚甲醛溶液固

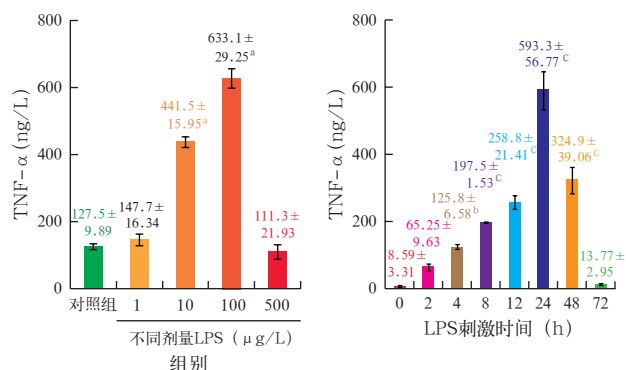
定 30 min; 用 PBS 洗涤后加入兔源 α 7nAChR 抗体 (1:100)、HMGB1 抗体 (1:500) 和 NF- κ B p65 抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日用 PBS 洗涤后加 Alexa Fluor[®] 488 标记的驴抗兔 IgG (H+L) 荧光二抗 (1:1000), 操作全程避光, 室温下孵育 2 h 后每个玻片加入 DAPI (1:1000) 20 μ L 孵育 5 min, 用 PBS 洗涤后加入 20 μ L 抗荧光衰减剂封片, 荧光显微镜下拍照并分析。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性: 以 5×10^4 /mL 目的细胞接种 96 孔板, 每孔 100 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 待生长稳定后分别进行 GTS-21 (1、10、100、1000 μ mol/L)、LPS (100 μ g/L)、或 LPS+GTS-21 (1、10、100 μ mol/L) 处理, 24 h 后加入 10 μ L CCK-8 (5 g/L) 继续培养 4 h, 于波长 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算各组细胞活性。细胞活性 (%) = (实验组 - 空白组) / (对照组 - 空白组) $\times$ 100%。

1.4 统计学处理: 使用 GraphPad software 5.0 软件进行统计分析, 所有数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 TNF- α 表达 (图 1): ELISA 检测结果显示, 用 1、10、100 和 500 μ g/L LPS 刺激 5 h, 细胞培养上清液中 TNF- α 表达较对照组升高, 其中 100 μ g/L LPS 刺激后 TNF- α 表达水平最高 ($P < 0.01$)。用 100 μ g/L LPS 刺激 2、4、8、12、24、48、72 h, 细胞培养上清液中 TNF- α 表达较 LPS 刺激前 (0 h) 升高, 其中 LPS 刺激后 24 h TNF- α 表达水平最高 ($P < 0.01$)。



注: LPS 为脂多糖, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 0 h 比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

图 1 用不同剂量 LPS 刺激 5 h (左) 及 100 μ g/L LPS 刺激不同时间 (右) 对巨噬细胞上清液中 TNF- α 表达的影响

2.2 α 7nAChR 表达 (图 2): 免疫荧光法检测显示, 绿色荧光标记的 α 7nAChR 存在于巨噬细胞膜上。

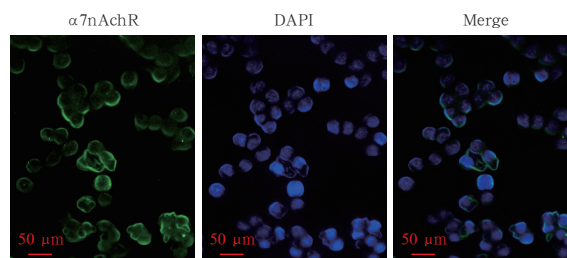
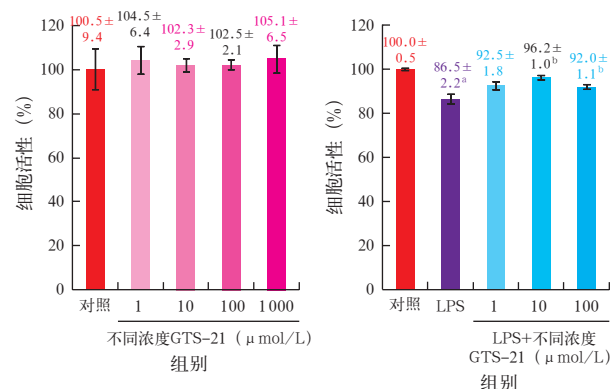


图 2 荧光显微镜下观察显示 α 7 烟碱型乙酰胆碱受体 (α 7nAChR) 表达于 RAW264.7 巨噬细胞膜上 免疫荧光染色 40 倍放大

2.3 细胞活性 (图 3): CCK-8 法检测显示, 用不同浓度 GTS-21 刺激巨噬细胞后的细胞活性与对照组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 提示 GTS-21 没有细胞毒性损伤作用。LPS 刺激后细胞活性较对照组显著降低 ($P < 0.05$); LPS 刺激后给予不同浓度 GTS-21 处理可恢复部分细胞活性, 10 μ mol/L 和 100 μ mol/L 的 GTS-21 干预作用较为显著 (均 $P < 0.05$)。



注: GTS-21 为 α 7 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂, LPS 为脂多糖; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

图 3 不同浓度 GTS-21 对巨噬细胞活性 (左) 及对 LPS 刺激后巨噬细胞活性 (右) 的影响

2.4 促炎因子表达 (表 1): ELISA 检测结果显示, 与对照组比较, LPS 刺激巨噬细胞后可明显升高上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平 (均 $P < 0.01$); GTS-21 可剂量依赖性地降低细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平 (均 $P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 GTS-21 对 LPS 诱导的促炎因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	样本量	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (μ g/L)	
对照组	3	100.8 $\pm$ 3.2	0.87 $\pm$ 0.16	
LPS 组	3	453.0 $\pm$ 60.6 ^a	8.21 $\pm$ 0.31 ^a	
LPS+10 μ mol/L GTS-21 组	3	227.5 $\pm$ 17.5 ^b	4.86 $\pm$ 0.72 ^b	
LPS+100 μ mol/L GTS-21 组	3	81.0 $\pm$ 8.8 ^b	2.32 $\pm$ 0.45 ^b	

注: GTS-21 为 α 7 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂, LPS 为脂多糖, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-1 β 为白细胞介素-1 β ; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

2.5 HMGB1 表达: 用 100 $\mu\text{g/L}$ LPS 和 100 $\mu\text{mol/L}$ GTS-21 刺激巨噬细胞 24 h, 免疫荧光结果显示, LPS 组 HMGB1 从细胞核向细胞质转移, 而 GTS-21 组可减少 HMGB1 从细胞核向细胞质转移 (图 4A); Western Blot 结果显示, GTS-21 组 HMGB1 表达水平较 LPS 组明显降低 ($P < 0.05$; 图 4B)。

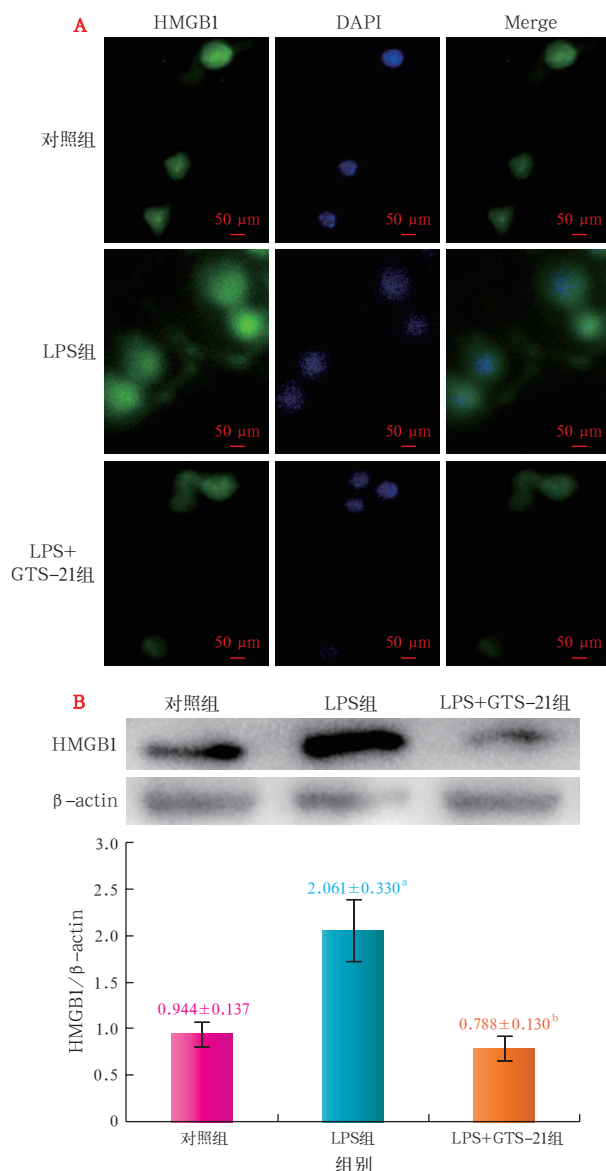


图 4 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂 (GTS-21) 对脂多糖 (LPS) 刺激巨噬细胞高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 表达的影响 A 为荧光显微镜下观察 (免疫荧光染色 40 倍放大), 对照组 HMGB1 大部分位于细胞核内; LPS 组 HMGB1 从细胞核向细胞质转移, GTS-21 能反转这一现象; B 为蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.01$

2.6 NF- κ B p65 核转位 (图 5): 用 100 $\mu\text{g/L}$ LPS 和 100 $\mu\text{mol/L}$ GTS-21 刺激巨噬细胞 24 h, 免疫荧光结果显示, LPS 组 NF- κ B p65 从细胞质向细胞核转移, 而 GTS-21 组反转了这一现象。

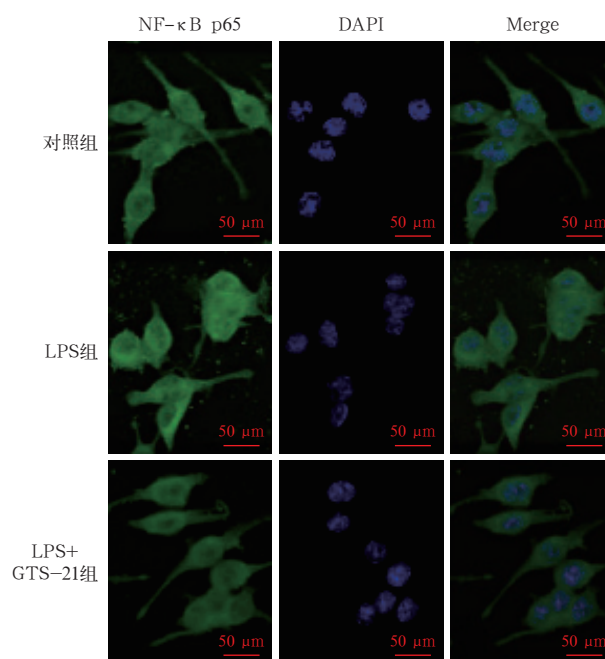


图 5 荧光显微镜下观察各组巨噬细胞内核转录因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 核转位 对照组 NF- κ B p65 主要位于细胞质; 脂多糖 (LPS) 刺激 24 h NF- κ B p65 从细胞质向细胞核转移; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂 (GTS-21) 组干预 24 h NF- κ B p65 从细胞质向细胞核转移减少 免疫荧光染色 40 倍放大

3 讨论

以往认为体液机制是唯一调节炎症反应的因素, 但美国科学家 Tracey^[17] 发现了一种新的炎症反应调节机制, 即神经抗炎机制——胆碱能抗炎通路。结合近年来的研究结果, 可以认为迷走神经的主要递质 ACh 及其受体是胆碱能抗炎通路的重要组成部分, ACh 与巨噬细胞表面的 $\alpha 7$ nAChR 结合, 激活细胞膜 $\alpha 7$ nAChR, 抑制促炎细胞因子的合成与释放, 从而发挥减轻组织和 (或) 器官炎症损伤的作用^[3, 8, 18]。

随后 Wang 等^[8] 研究发现, 巨噬细胞等诸多免疫细胞上均表达 $\alpha 7$ nAChR, 并通过基因敲除小鼠实验证实了 $\alpha 7$ nAChR 在胆碱能抗炎通路中处于核心地位。研究者进一步用银环蛇毒素阻断 $\alpha 7$ nAChR 或将小鼠 $\alpha 7$ 亚基基因敲除发现, 小鼠均表现出对炎症极度敏感, 且促炎因子水平升高, 从而证实 $\alpha 7$ nAChR 是介导该神经性抗炎通路的核心分子。 $\alpha 7$ nAChR 被激活后可明显抑制免疫细胞产生 TNF- α 、IL-1、HMGB1 等促炎因子, 这也是 $\alpha 7$ nAChR 介导抗炎作用的主要机制; 与此同时, 它还可以促进转化生长因子 -13 (TGF-13)、IL-10 等抗炎因子的产生, 两种机制同时激活起到协同抗炎的作用^[19], 但具体机制尚不清楚。

GTS-21 是一种人工合成的 $\alpha 7$ nAChR 选择性激动剂。在胰腺炎动物模型中,切断迷走神经或使用美卡拉明预处理后,可使小鼠胰腺炎严重程度明显加重,大量中性粒细胞聚集在胰腺;相反,用 GTS-21 预处理可显著减轻胰腺炎的严重程度^[11]。另外, Pavlov 等^[10]也发现,在内毒素血症和脓毒症动物模型中,给予 GTS-21 干预后可明显提高小鼠的存活率。

本研究结果表明,通过 GTS-21 干预可以显著抑制 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 释放以及细胞内 HMGB1 表达。在众多细胞因子中, HMGB1 作为晚期炎性介质参与了脓毒症的发病过程,较其他细胞因子具有出现晚、维持时间长的特点。HMGB1 作为重要的晚期炎性介质,可通过促进细胞增殖及迁移,从而介导炎症免疫反应^[20]。HMGB1 是一种存在于真核细胞核内的非组蛋白染色体结合蛋,通过与细胞表面受体如 Toll 样受体 4 (TLR4) 介导和参与炎症反应的发生^[21]。NF- κ B 是一种存在于真核细胞内的转录因子,具有高度保守、多项调节的特点^[22],是一种具有多向性调节作用的蛋白质分子,可参与调控多种因子的基因表达,在免疫调控、炎症、应激反应及细胞凋亡中起重要作用^[23]。NF- κ B 是炎症反应的中枢,也是细胞内信号转导途径的中间枢纽,其活化后与 DNA 特定序列结合,诱导相关基因转录和表达,从而激活炎性因子及细胞因子,导致缺血后炎症反应的发生^[24]。促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和抗炎因子 IL-10 的转录生成均受 NF- κ B 调控^[25]。本研究结果还表明, LPS 能够引起 NF- κ B 核转位,启动炎症反应;而 GTS-21 可以恢复 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞内 NF- κ B 核转位。激活 $\alpha 7$ nAChR 能够降低 NF- κ B p65 的活性,抑制 LPS 诱导的 NF- κ B 活化,发挥抗炎作用。

关于胆碱能通路,在体实验表明,电针足三里穴能够抑制内毒素血症大鼠促炎细胞因子释放,改善器官功能,其机制可能与兴奋胆碱能抗炎通路有关^[26]。此外,李建国等^[27]研究表明,电针刺激足三里穴对失血性休克具有保护作用,这种保护作用是由于激活了胆碱能抗炎通路。这些激活胆碱能抗炎通路的方式为临床脓毒症患者的预防和治疗提供了部分理论指导。

综上所述, $\alpha 7$ nAChR 激动剂通过抑制 NF- κ B 活化,从而减轻 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应,该作用是通过激活胆碱能抗炎通路实现的。

参考文献

- [1] Fleshner M, Goehler LE, Schwartz BA, et al. Thermogenic and corticosterone responses to intravenous cytokines (IL-1 β and TNF- α) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy [J]. J Neuroimmunol, 1998, 86 (2): 134-141. DOI: 10.1016/S0165-5728(98)00026-5.
- [2] Goehler LE, Busch CR, Tartaglia N, et al. Blockade of cytokine induced conditioned taste aversion by subdiaphragmatic vagotomy: further evidence for vagal mediation of immune-brain communication [J]. Neurosci Lett, 1995, 185 (3): 163-166. DOI: 10.1016/0304-3940(95)11251-Q.
- [3] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. Nature, 2000, 405 (6785): 458-462. DOI: 10.1038/35013070.
- [4] Wang H, Liao H, Ochani M, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis [J]. Nat Med, 2004, 10 (11): 1216-1221. DOI: 10.1038/nm1124.
- [5] van Maanen MA, Stoof SP, van der Zanden EP, et al. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on fibroblast-like synoviocytes and in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients: a possible role for a key neurotransmitter in synovial inflammation [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60 (5): 1272-1281. DOI: 10.1002/art.24470.
- [6] Waldburger JM, Boyle DL, Pavlov VA, et al. Acetylcholine regulation of synovial cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58 (11): 3439-3449. DOI: 10.1002/art.23987.
- [7] Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, et al. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines [J]. Neurosci Lett, 1999, 266 (1): 17-20. DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00026-5.
- [8] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation [J]. Nature, 2003, 421 (6921): 384-388. DOI: 10.1038/nature01339.
- [9] Giebelen IA, van Westerloo DJ, LaRosa GJ, et al. Stimulation of alpha 7 cholinergic receptors inhibits lipopolysaccharide-induced neutrophil recruitment by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism [J]. Shock, 2007, 27 (4): 443-447. DOI: 10.1097/01.shk.0000245016.78493.bb.
- [10] Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, et al. Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis [J]. Crit Care Med, 2007, 35 (4): 1139-1144. DOI: 10.1097/01.CCM.0000259381.56526.96.
- [11] van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice [J]. Gastroenterology, 2006, 130 (6): 1822-1830. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.02.022.
- [12] Yeboah MM, Xue X, Duan B, et al. Cholinergic agonists attenuate renal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Kidney Int, 2008, 74 (1): 62-69. DOI: 10.1038/ki.2008.94.
- [13] Giebelen IA, van Westerloo DJ, LaRosa GJ, et al. Local stimulation of alpha7 cholinergic receptors inhibits LPS-induced TNF- α release in the mouse lung [J]. Shock, 2007, 28 (6): 700-703. DOI: 10.1097/shk.0b013e318054dd89.
- [14] Chatterjee PK, Al-Abed Y, Sherry B, et al. Cholinergic agonists regulate JAK2/STAT3 signaling to suppress endothelial cell activation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 297 (5): C1294-1306. DOI: 10.1152/ajpcell.00160.2009.
- [15] Rosas-Ballina M, Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, et al. The selective alpha7 agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE [J]. Mol Med, 2009, 15 (7-8): 195-202. DOI: 10.2119/molmed.2009.00039.
- [16] Kox M, van Velzen JF, Pompe JC, et al. GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78 (7): 863-872. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.06.096.
- [17] Tracey KJ. The inflammatory reflex [J]. Nature, 2002, 420 (6917): 853-859. DOI: 10.1038/nature01321.
- [18] Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4 (8): 673-684. DOI: 10.1038/nrd1797.
- [19] Rehani K, Scott DA, Renaud D, et al. Cotinine-induced convergence of the cholinergic and PI3 kinase-dependent anti-

- inflammatory pathways in innate immune cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783 (3): 375-382. DOI: 10.1016/j.bbamer.2007.12.003.
- [20] 张晓娟, 栾正刚, 马晓春. 高迁移率族蛋白 B1 对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移能力的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (12): 711-714. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.12.004.
- Zhang XJ, Luan ZG, Ma XC. Effect of down-regulation of high mobility group box-1 expression on proliferation and migration abilities of human umbilical vein endothelial cells [J]. Chin Crit Care Med, 2013, 25 (12): 711-714. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.12.004.
- [21] 徐佳, 刘志锋, 王娟, 等. 人高迁移率族蛋白 B1 细胞内定位及移位研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18 (6): 338-341. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2006.06.006.
- Xu J, Liu ZF, Wang J, et al. Study of localization and translocation of human high mobility group protein B1 in eukaryotic cells [J]. Chin Crit Care Med, 2006, 18 (6): 338-341. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2006.06.006.
- [22] 严静霞, 郭勇, 张瑞, 等. 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞增殖及 NF- κ B 表达的影响 [J]. 河北医科大学学报, 2016, 37 (9): 1064-1068. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2016.09.018.
- Yan JX, Guo Y, Zhang R, et al. Effect of resveratrol on proliferation of lung cancer A549 cells and the expression of NF- κ B [J]. J Hebei Med Univ, 2016, 37 (9): 1064-1068. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2016.09.018.
- [23] 曾柳庭, 刘慧萍, 肖艺, 等. 核转录因子- κ B 在子宫肌瘤疾病中的作用及研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34 (10): 2393-2396.
- Zeng LT, Liu HP, Xiao Y, et al. Role of nuclear factor- κ B in uterine leiomyoma and its research progress [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34 (10): 2393-2396. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.10.004.
- [24] Huang B, Yang XD, Lamb A, et al. Posttranslational modifications of NF- κ B: another layer of regulation for NF- κ B signaling pathway [J]. Cell Signal, 2010, 22 (9): 1282-1290. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.03.017.
- [25] 洪辉华, 杨珺超, 蔡宛如. 芪冬活血饮对急性肺损伤大鼠 Cav-1/NF- κ B 炎症反应信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (1): 239-243.
- Hong HH, Yang JC, Cai WR. Effects of Qidong Huoxue Decoction on Caveolin-1/NF- κ B inflammation signal pathway in acute lung injury rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31 (1): 239-243.
- [26] 胡森, 宋琪, 王磊, 等. 电针兴奋胆碱能抗炎通路对内毒素引起的细胞因子释放和脏器功能损害作用研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (4): 205-208. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2008.04.004.
- Hu S, Song Q, Wang L, et al. Effect of activating cholinergic anti-inflammatory pathway by electroacupuncture on proinflammatory cytokine release and organ dysfunction in rat with endotoxin challenge [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2008, 15 (4): 205-208. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2008.04.004.
- [27] 李建国, 彭周全, 杜朝晖, 等. 电针足三里激活胆碱能抗炎通路抗大鼠失血性休克的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (1): 27-31. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2006.01.009.
- Li JG, Peng ZQ, Du ZH, et al. Study on electroacupuncture at Zusanli points against hemorrhagic shock of rats through activating cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2006, 13 (1): 27-31. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2006.01.009.

(收稿日期: 2016-11-01)

• 学术活动预告 •

中华医学会第 11 次重症医学大会会议通知

为促进我国重症医学学科繁荣发展,搭建不同学术思想融合,产学研结合转化,为医学发展服务,为医、患服务的综合交流平台,不断推动重症医学进步与创新,提高重症医学工作者诊治水平,最终保障人民健康和生命安全,中华医学会重症医学分会经讨论,定于 2017 年 5 月 25 日至 28 日在西安曲江国际会议会展中心召开“中华医学会第 11 次重症医学大会”,此次会议是重症医学分会 2017 年年会,大会主题:质量与学科。

会议将介绍重症医学最新进展,讨论学科前沿问题,重点交流近年来重症医学领域在临床和科研等方面取得的成果。大会届时将邀请国内外著名重症医学专家作近 400 个专题报告,会议还将设主题为正反方陈述(Pro & Con),病例讨论,专家查房,主题辩论,中美、中欧论坛,青年论坛,WORKSHOP,优秀论文宣读与壁报展示等多种学术交流方式。参会者将获得国家级 I 类继续教育学分。

- 大会主要内容:** ① 对重症医学临床与科学研究等方面进行深入讨论; ② 对重症医学亚专科建设进行重点讨论,以利 ICU 在国内健康有序的发展; ③ 从学术内涵角度探讨学科规范化和系统化; ④ 专业技术培训及考核的探讨; ⑤ 基本技能培训,现场演示,以提高动手能力; ⑥ 疑难病例讨论,以提高诊治水平; ⑦ 设立护理专场,对护理问题全方位进行研讨。
- 会议时间及地点:** ① 会议时间: 2017 年 5 月 25 日至 28 日。25 日全天报到,报到时间: 08:30~21:00; 26 日至 27 日全天会议; 28 日下午撤离。② 会议地点: 西安曲江国际会议会展中心,地址: 陕西省西安市雁塔区汇新路 15 号(电话: 029-87655888)。
- 会议注册须知:** ① 会议注册费: 800 元/人,陕西省代表 600 元/人(请出具单位证明或其他有效身份证明方可优惠注册费)。② 注册流程: 本次会议开通网上会议注册系统,请参会代表登录大会会议网站,点击“网上注册”按钮,在线填写注册信息进行网上交费,系统将通过邮件在会前 7 个工作日内向您寄发“注册确认函”,请对注册信息进行确认。参会报到时,请您持“注册确认函”到会议注册处签到并领取资料,办理入住手续;如已交费,但没有收到“注册确认函”,请携带个人身份证件到注册处签到,领取资料和办理入住。③ 注册联系人: 郭儒林,电话: 010-89292552-808, Email: cscem1915@126.com。
- 食宿安排:** 住宿由大会统一安排,费用自理,按规定回单位报销;会议统一安排午餐,晚餐自理,按规定回单位报销。需要预订住宿的代表务必于 5 月 6 日前在网上填写注册表时选择所需入住的酒店;如需要取消预订,务必在 2017 年 5 月 15 日前以书面形式传真或 Email 通知大会订房管理中心。大会订房管理中心: 厦门博钜国际旅行社有限公司,联系人: 邓智修、陈寿山,电话: 0592-5165512、5165565, Email: xiu@fjxmly.com, shan@fjxmly.com。