

内皮 Adora2b 活化可减轻脂多糖诱导的肺微血管内皮炎症

郭晓夏 安友仲

北京大学人民医院重症医学科 100044

通信作者:安友仲, Email: ayzbjicu@163.com

【摘要】 目的 探讨内皮低亲和力 A2b 腺苷受体 (Adora2b) 对脂多糖 (LPS) 诱导肺微血管内皮炎症的调控作用及机制。**方法** 原代培养大鼠肺微血管内皮细胞 (PMVEC), 血清饥饿 24 h 后, 采用 Adora2b 特异性激动剂 BAY60-6583 (0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$) 或抑制剂 PSB1115 (1 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h, 然后再加入 LPS (100 $\mu\text{g/L}$); 同时设立空白对照组、LPS 组、BAY60-6583 单独处理组和 PSB1115 单独处理组。各组细胞培养 24 h 后, 采用膜联蛋白 V/碘化丙啶 (Annexin V/PI) 双染色法检测早期细胞凋亡率, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定细胞上清液中炎症因子含量, 用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 测定趋化因子和黏附分子的 mRNA 表达; 分离提取大鼠静脉血中性粒细胞 (PMN), 观察体外 PMN 黏附迁移情况, 用异硫氰酸荧光素-白蛋白 (FITC-albumin) 法检测 PMN 黏附迁移后 PMVEC 单层通透性, 用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内氧化应激水平。**结果** 与空白对照组相比, LPS 组早期细胞凋亡率明显升高, 上清液中早期炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量明显增加, 趋化因子如 CXC 基序趋化因子配体 1 (CXCL-1)、CXC 基序趋化因子配体 3 (CXCL-3)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 以及黏附分子如 E-选择素、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 的 mRNA 表达均明显升高, 黏附迁移的 PMN 增多, PMVEC 单层通透性升高, 细胞内活性氧水平升高。与 LPS 组比较, BAY60-6583 预处理能剂量依赖性地降低早期细胞凋亡率, 减少 PMN 迁移, 降低 PMVEC 单层通透性, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时差异即有统计学意义 [凋亡率: (21.12 \pm 2.12)% 比 (27.66 \pm 3.57)%, PMN 迁移细胞数 (个/HP): 260.60 \pm 18.24 比 290.20 \pm 16.48, 通透系数 (Pd, $\times 10^{-6}$ cm/s): 28.28 \pm 2.04 比 32.55 \pm 2.13, 均 $P < 0.05$], 并能剂量依赖性减少早期促炎因子分泌, 降低趋化因子和黏附分子的 mRNA 表达, 1 $\mu\text{mol/L}$ 时差异均有统计学意义 [IL-1 β (ng/L): 475.75 \pm 63.15 比 755.25 \pm 67.42, TNF- α (ng/L): 560.25 \pm 69.96 比 818.75 \pm 60.92, CXCL-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.57 \pm 0.28 比 5.27 \pm 0.69, CXCL-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.56 \pm 0.48 比 7.32 \pm 0.54, MCP-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.21 \pm 0.31 比 3.35 \pm 0.21, E-选择素 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.64 \pm 0.09 比 7.28 \pm 0.73, ICAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.14 \pm 0.30 比 5.89 \pm 0.25, VCAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.23 \pm 0.19 比 2.92 \pm 0.33, 均 $P < 0.05$], 10 $\mu\text{mol/L}$ BAY60-6583 预处理还能降低细胞内氧化应激水平 [活性氧 (荧光强度): 629.05 \pm 33.10 比 781.45 \pm 64.59, $P < 0.05$]; 而 PSB1115 预处理能进一步增加 LPS 诱导的细胞凋亡 [凋亡率: (34.36 \pm 4.57)% 比 (27.66 \pm 3.57)%, 上调炎症因子和趋化因子、黏附分子的表达 [IL-1 β (ng/L): 889.00 \pm 63.11 比 755.25 \pm 67.42, TNF- α (ng/L): 939.00 \pm 43.44 比 818.75 \pm 60.92, CXCL-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 6.66 \pm 0.65 比 5.27 \pm 0.69, CXCL-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 10.42 \pm 0.51 比 7.32 \pm 0.54, MCP-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.85 \pm 0.34 比 3.35 \pm 0.21, E-选择素 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 8.42 \pm 0.47 比 7.28 \pm 0.73, ICAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 7.46 \pm 0.72 比 5.89 \pm 0.25, VCAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.35 \pm 0.26 比 2.92 \pm 0.33], 并能增加 PMN 黏附迁移 (个/HP): 348.40 \pm 22.68 比 290.20 \pm 16.48 及 PMVEC 单层通透性 [Pd ($\times 10^{-6}$ cm/s): 39.65 \pm 2.69 比 32.55 \pm 2.13], 加重氧化应激损伤 [活性氧 (荧光强度): 847.04 \pm 29.26 比 781.45 \pm 64.59], 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 内皮 Adora2b 活化可通过减少早期炎症因子释放、下调细胞趋化和黏附分子表达、减少 PMN 黏附迁移、降低氧化应激等机制减轻 LPS 诱导的肺微血管内皮炎症。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; A2b 腺苷受体; 肺微血管内皮; 炎症

基金项目: 北京市自然科学基金 (7194328)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.12.010

Role of adenosine A2b receptors in pulmonary microvascular endothelial inflammation induced by lipopolysaccharide

Guo Xiaoxia, An Youzhong

Department of Intensive Care Unit, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China

Corresponding author: An Youzhong, Email: ayzbjicu@163.com

【Abstract】 Objective To explore the role of the low-affinity A2b adenosine receptors (Adora2b) in pulmonary microvascular endothelial inflammation induced by lipopolysaccharide and its mechanism. **Methods** Rat pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) were isolated and cultured *in vitro*. After serum deprivation for 24 hours, cells were pretreated with Adora2b specific agonist BAY60-6583 (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$) or Adora2b specific antagonist PSB1115 (1 $\mu\text{mol/L}$) for 1 hour, respectively, and then challenged with LPS (100 $\mu\text{g/L}$). Cells without treatment were

served as the control group, and those treated with LPS, BAY60-6583 or PSB1115 alone were served as single challenge groups. After incubation with specific drugs for 24 hours, the apoptosis of PMVECs was analyzed by flow cytometry using Annexin V/propidium iodide (PI) technique. The levels of early inflammatory factors in cultured medium were measured using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of chemotactic factors and adhesion molecules were determined by real-time quantitative-polymerase chain reaction (RT-qPCR). Polymorph nuclear neutrophils (PMNs) from venous blood of healthy rats were isolated, and PMN migration through PMVECs monolayer under stimulation of drugs was observed in transwell inserts. The monolayer permeability of PMVECs after adhesion of PMNs was determined by fluorescein isothiocyanate (FITC)-albumin assay. Oxidative stress was detected by DCFH-DA assay. **Results** Compared with the control group, more cells entered into the apoptosis stage after LPS challenge. Meanwhile, the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cultured medium were significantly increased, as well as the mRNA expressions of chemotactic factors [C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL-1), CXCL-3 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)] and adhesion molecules [E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)]. More PMNs migrated through PMVECs following adhesion and the monolayer permeability of PMVECs was rapidly enhanced. The oxidative stress was upregulated. Compared with LPS group, BAY60-6583 pretreatment could dose-dependently decrease the rate of apoptosis, attenuate trans-endothelial migration of PMNs and decrease the endothelial cell barrier leakage. There were significant differences even after incubation of 0.1 $\mu\text{mol/L}$ BAY60-6583 [apoptosis rate: (21.12 \pm 2.12)% vs. (27.66 \pm 3.57)%, number of migrated PMNs/HP: 260.60 \pm 18.24 vs. 290.20 \pm 16.48, permeability coefficient (Pd, $\times 10^{-6}$ cm/s): 28.28 \pm 2.04 vs. 32.55 \pm 2.13, all $P < 0.05$]. Meanwhile, BAY60-6583 pretreatment also downregulated the levels of early proinflammatory factors in a dose-dependent manner as well as the mRNA expressions of chemotactic factors and adhesion molecules. The statistic difference was significant while treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ BAY60-6583 [IL-1 β (ng/L): 475.75 \pm 63.15 vs. 755.25 \pm 67.42, TNF- α (ng/L): 560.25 \pm 69.96 vs. 818.75 \pm 60.92, CXCL-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.57 \pm 0.28 vs. 5.27 \pm 0.69, CXCL-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.56 \pm 0.48 vs. 7.32 \pm 0.54, MCP-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.21 \pm 0.31 vs. 3.35 \pm 0.21, E-selectin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.64 \pm 0.09 vs. 7.28 \pm 0.73, ICAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.14 \pm 0.30 vs. 5.89 \pm 0.25, VCAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.23 \pm 0.19 vs. 2.92 \pm 0.33, all $P < 0.05$]. Furthermore, pretreatment of 10 $\mu\text{mol/L}$ BAY60-6583 could decrease the oxidative stress [reactive oxygen species (RFU): 629.05 \pm 33.10 vs. 781.45 \pm 64.59, $P < 0.05$]. Contrast, PSB1115 pretreatment aggravated apoptosis of PMVECs after LPS incubation [(34.36 \pm 4.57)% vs. (27.66 \pm 3.57)%], upregulated expressions of proinflammatory and chemotactic factors as well as adhesion molecules [IL-1 β (ng/L): 889.00 \pm 63.11 vs. 755.25 \pm 67.42, TNF- α (ng/L): 939.00 \pm 43.44 vs. 818.75 \pm 60.92, CXCL-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 6.66 \pm 0.65 vs. 5.27 \pm 0.69, CXCL-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 10.42 \pm 0.51 vs. 7.32 \pm 0.54, MCP-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.85 \pm 0.34 vs. 3.35 \pm 0.21, E-selectin mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 8.42 \pm 0.47 vs. 7.28 \pm 0.73, ICAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 7.46 \pm 0.72 vs. 5.89 \pm 0.25, VCAM-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.35 \pm 0.26 vs. 2.92 \pm 0.33], aggravated trans-endothelial migration of PMNs (cells/HP: 348.40 \pm 22.68 vs. 290.20 \pm 16.48), enhanced the leakage of PMVECs monolayer [Pd ($\times 10^{-6}$ cm/s): 39.65 \pm 2.69 vs. 32.55 \pm 2.13] and increased oxidative stress in PMVECs [reactive oxygen species (RFU): 847.04 \pm 29.26 vs. 781.45 \pm 64.59], with statistically significant difference (all $P < 0.05$). **Conclusion** Activation of endothelial Adora2b attenuates LPS-induced pulmonary microvascular inflammation by decreasing the release of early inflammatory factors, downregulating expressions of chemotactic factors and adhesion molecules, attenuating trans-endothelial migration of PMNs and oxidative stress in PMVECs, which suggest endothelial Adora2b is apotential anti-inflammatory target in the treatment of LPS-induced acute lung injury.

【Key words】 Acute respiratory distress syndrome; A2b adenosine receptor; Pulmonary microvascular endothelium; Inflammation

Fund program: Beijing Municipal Natural Science Foundation of China (7194328)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.12.010

急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 以进行性呼吸窘迫、顽固性低氧血症和非心源性肺水肿为特征, 是危重症患者最常见的急性呼吸衰竭, 发病率高, 病情进展迅速^[1]。ARDS 的特征性病理生理改变是肺内外因素导致的肺部严重炎症反应。在 ARDS 早期, 炎性细胞被活化, 向肺间质和肺泡内移行, 并释放炎性因子, 导致肺气血屏障损伤。本课题组前期研究发现, 腺苷的低亲和力 A2b 腺苷受体 (Adora2b) 能够通过调节肺微血管内皮细胞 (PMVEC) 间连接、减少细胞旁扩散、促进新生血管形成等机制降低肺微血管内皮屏障通透性^[2]。然而, Adora2b 活化对于肺微血管内皮凋亡和炎症反应的影响仍有待进一

步研究。本实验中通过观察脂多糖 (LPS) 刺激下, Adora2b 活化或抑制对大鼠 PMVEC 凋亡的影响, 并从炎性因子释放、趋化和黏附分子合成、中性粒细胞 (PMN) 黏附迁移及活性氧家族活化等方面, 探讨内皮 Adora2b 对内皮炎症反应的调控作用。本研究将完善 ARDS 时 Adora2b 对肺微血管内皮屏障保护的机制, 为进一步探索细胞内作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 大鼠 PMVEC 原代培养: 取 5~6 日龄健康 SD 大鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司), 腹腔注射麻醉后消毒、固定于超净台上。暴露心、肺, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 灌洗肺叶至发白。剪下

发白的肺叶置于冷 PBS 内,漂洗后小心去除脏层胸膜。剪取外周肺组织(距边缘厚度不超过 1.5 cm),用组织植块法均匀接种到细胞培养瓶中获得原代 PMVEC;然后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中传代培养,取第 3~5 代用于实验。药物干预前,弃培养液,加入含 0.1% 胎牛血清的内皮细胞培养基血清饥饿 24 h,使绝大部分细胞阻滞于 G0~G1 期。

1.2 细胞分组及药物处理:将血清饥饿后的细胞分为空白对照组(不加药物)、LPS 组(100 μg/L)、BAY+LPS 组(0.1、1、10 μmol/L 的 Adora2b 激动剂 BAY60-6583 预处理 1 h 后加 100 μg/L 的 LPS)、PSB+LPS 组(1 μmol/L 的 Adora2b 抑制剂 PSB1115 预处理 1 h 后加 100 μg/L 的 LPS)、BAY 组(BAY60-6583 10 μmol/L)、PSB 组(PSB1115 1 μmol/L) 8 组。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经北京人民医院医学伦理委员会审批(审批号:2019PHC014)。

1.3 检测指标及方法:各组细胞培养 24 h 后备检。

1.3.1 细胞凋亡率检测:收集细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^9/L$,结合缓冲液洗涤、离心。用 100 μL 的异硫氰酸荧光素-膜联蛋白 V (FITC-Annexin V) 标记溶液重悬细胞,室温下避光孵育 15 min 后,离心沉淀细胞,孵育缓冲液洗 1 次。上机前 5 min 加入碘化丙啶 (PI) 进行染色。用流式细胞仪检测细胞凋亡率,右下象限 FITC⁺/PI⁻ 为早期凋亡细胞。

1.3.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定细胞上清液中炎症因子水平:取 50 μL 细胞上清液,稀释至 500 μL 后,按 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)说明书步骤测定白细胞介素-1β (IL-1β) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 含量,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值 (A_{450}),根据标准曲线计算炎症因子含量。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 测定细胞趋化和黏附分子表达:TRIzol 法提取细胞总 RNA 后,计算 RNA 总浓度。反转录合成 cDNA,在 ABI 7700 型定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。引物序列由北京奥科公司合成。测定样品趋化因子如 CXC 基序趋化因子配体 1 (CXCL-1)、CXC 基序趋化因子配体 3 (CXCL-3)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 以及黏附分子如 E-选择素、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 的 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各样品的基因表达。

1.3.4 PMN 分离提取与体外 PMN 黏附迁移试验:将健康成年 SD 大鼠麻醉后采集静脉血肝素抗凝,

用 Ficoll 密度梯度离心、葡聚糖沉降、红细胞裂解法分离 PMN。用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞,调整细胞密度至 $2 \times 10^9/L$ 备用。

PMVEC 以 $2 \times 10^8/L$ 密度接种于 Transwell (孔径 3.0 μm,直径 24 mm,美国 Corning 公司) 上室,相差显微镜下观察细胞形态及融合程度。待细胞完全融合 48 h 后进行黏附迁移试验。各组在上室加入相应药物作用 24 h 后,在上室加入 $2 \times 10^9/L$ 正常 PMN 1.8 mL,90 min 后收集下室的 PMN,倒置显微镜下进行 PMN 计数。

1.3.5 FITC-白蛋白 (albumin) 法检测 PMN 黏附迁移后 PMVEC 通透性:收集 Transwell 下室 PMN 后,更换为含血清内皮细胞培养液。在上室加入 FITC-albumin,下室加入等摩尔、无 FITC 标记的 albumin。37 °C、5% CO₂ 孵箱避光孵育 1 h 后,分别从上、下室提取 0.3 mL 和 1.2 mL 样品。荧光分光光度计检测样品荧光能量值(吸收波长 493 nm,发射波长 528 nm)。制作 FITC-albumin 标准曲线,得到上、下室 FITC-albumin 浓度,并计算 PMVEC 通透系数 (Pd)。

1.3.6 荧光探针 DCFH-DA 检测氧化应激水平:各组药物刺激 8 h 后装载探针。去除细胞培养液,加入 DCFH-DA 10 μmol/L,37 °C 孵育 20 min。充分洗涤以去除未进入细胞内的 DCFH-DA。收集细胞后,荧光分光光度计检测各组荧光强度(激发波长 502 nm,发射波长 530 nm)以代表氧化应激水平。

1.4 统计学处理:使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。所有细胞实验至少取 4 次独立实验的结果,先对数据进行正态及方差齐性检验,因所有检测指标均符合正态分布及方差齐,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 Student *t* 检验或 ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMVEC 早期凋亡率(表 1;图 1):与空白对照组相比,LPS 组 PMVEC 早期凋亡率明显升高 ($P < 0.01$)。与 LPS 组比较,Adora2b 活化能明显减少 PMVEC 早期凋亡,并呈剂量依赖效应(均 $P < 0.05$);而 PSB1115 预处理能明显加重 LPS 诱导的细胞凋亡 ($P < 0.05$)。BAY60-6583 和 PSB1115 本身对 PMVEC 早期凋亡无显著影响(均 $P > 0.05$)。

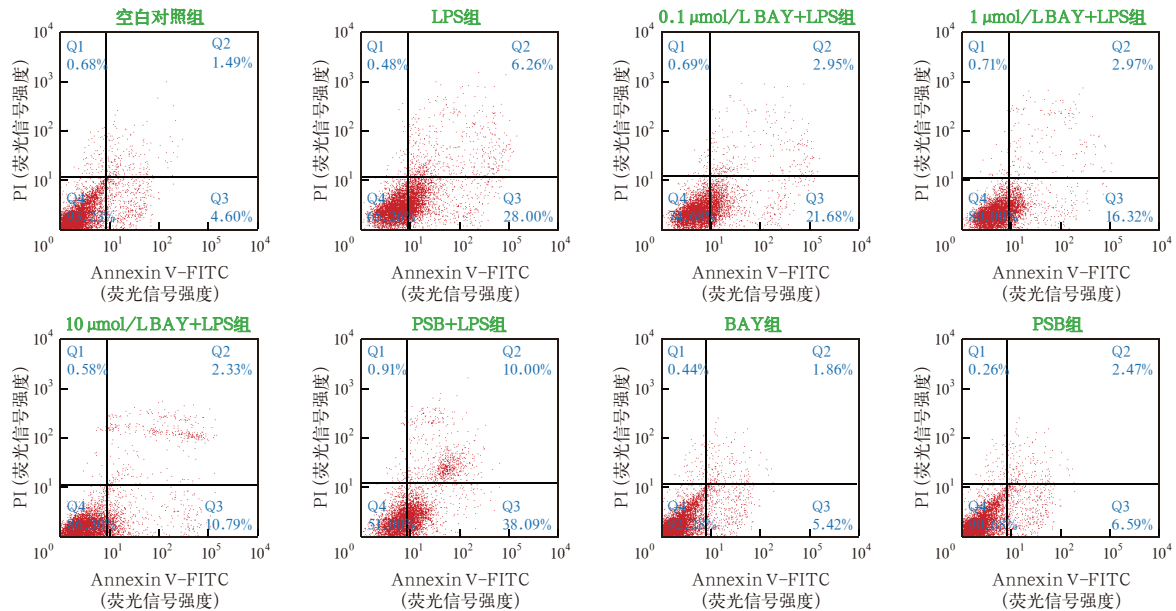
2.2 PMVEC 早期促炎因子分泌(表 1):与空白对照组相比,LPS 组细胞上清液中 IL-1β、TNF-α 含量增加(均 $P < 0.01$)。BAY60-6583 预处理可显著逆转上述效应,最大效应浓度是 10 μmol/L;PSB1115 预

处理可加重 LPS 诱导的早期促炎因子分泌 (均 $P < 0.05$)。BAY60-6583 和 PSB1115 本身对 PMVEC 早期炎症因子水平无显著影响 (均 $P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠肺微血管内皮细胞 (PMVEC) 早期凋亡率及上清液中炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (个)	凋亡率 (%)	IL-1 β (ng/L)	TNF- α (ng/L)
空白对照组	4	4.90 \pm 0.52	36.50 \pm 13.23	93.25 \pm 7.63
LPS 组	4	27.66 \pm 3.57 ^a	755.25 \pm 67.42 ^a	818.75 \pm 60.92 ^a
0.1 μ mol/L BAY+LPS 组	4	21.12 \pm 2.12 ^b	594.25 \pm 55.17	735.25 \pm 47.47
1 μ mol/L BAY+LPS 组	4	16.04 \pm 2.61 ^b	475.75 \pm 63.15 ^c	560.25 \pm 69.96 ^c
10 μ mol/L BAY+LPS 组	4	11.65 \pm 2.51 ^c	371.25 \pm 59.31 ^c	425.50 \pm 40.88 ^c
PSB+LPS 组	4	34.36 \pm 4.57 ^b	889.00 \pm 63.11 ^b	939.00 \pm 43.44 ^b
BAY 组	4	5.11 \pm 1.36	47.00 \pm 10.42	81.50 \pm 14.25
PSB 组	4	5.98 \pm 1.27	46.00 \pm 14.12	90.00 \pm 9.90

注: LPS 为脂多糖, BAY 为 A2b 腺苷受体 (Adora2b) 特异性激动剂 BAY60-6583, PSB 为 Adora2b 特异性抑制剂 PSB1115, IL-1 β 为白细胞介素-1 β , TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$



注: LPS 为脂多糖, BAY 为 A2b 腺苷受体 (Adora2b) 特异性激动剂 BAY60-6583, PSB 为 Adora2b 特异性抑制剂 PSB1115, Annexin V-FITC 为膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶; 右下象限 FITC⁺/PI⁺ 为早期凋亡细胞

图 1 流式细胞仪检测各组大鼠肺微血管内皮细胞 (PMVEC) 早期凋亡率

表 2 各组大鼠肺微血管内皮细胞 (PMVEC) 早期趋化因子和黏附分子表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (个)	mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)					
		CXCL-1	CXCL-3	MCP-1	E-选择素	ICAM-1	VCAM-1
空白对照组	4	1	1	1	1	1	1
LPS 组	4	5.27 \pm 0.69 ^a	7.32 \pm 0.54 ^a	3.35 \pm 0.21 ^a	7.28 \pm 0.73 ^a	5.89 \pm 0.25 ^a	2.92 \pm 0.33 ^a
0.1 μ mol/L BAY+LPS 组	4	4.31 \pm 0.22	5.25 \pm 0.57 ^c	2.73 \pm 0.20 ^c	6.00 \pm 0.37	5.25 \pm 0.75	2.80 \pm 0.14
1 μ mol/L BAY+LPS 组	4	3.57 \pm 0.28 ^b	4.56 \pm 0.48 ^c	2.21 \pm 0.31 ^b	4.64 \pm 0.09 ^b	4.14 \pm 0.30 ^b	2.23 \pm 0.19 ^b
10 μ mol/L BAY+LPS 组	4	1.33 \pm 0.19 ^b	2.51 \pm 0.28 ^c	1.25 \pm 0.13 ^c	3.56 \pm 0.29 ^b	3.18 \pm 0.64 ^b	1.27 \pm 0.17 ^b
PSB+LPS 组	4	6.66 \pm 0.65 ^c	10.42 \pm 0.51 ^b	4.85 \pm 0.34 ^b	8.42 \pm 0.47 ^b	7.46 \pm 0.72 ^b	4.35 \pm 0.26 ^b
BAY 组	4	1.02 \pm 0.11	1.03 \pm 0.18	1.06 \pm 0.12	0.99 \pm 0.11	1.03 \pm 0.18	0.95 \pm 0.08
PSB 组	4	0.95 \pm 0.23	1.01 \pm 0.31	1.14 \pm 0.21	1.03 \pm 0.08	1.11 \pm 0.15	1.05 \pm 0.19

注: LPS 为脂多糖, BAY 为 A2b 腺苷受体 (Adora2b) 特异性激动剂 BAY60-6583, PSB 为 Adora2b 特异性抑制剂 PSB1115, CXCL-1 为 CXCL 基序趋化因子配体 1, CXCL-3 为 CXCL 基序趋化因子配体 3, MCP-1 为单核细胞趋化蛋白 1, ICAM-1 为细胞间黏附分子-1, VCAM-1 为血管细胞黏附分子-1; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

2.3 PMVEC 趋化因子及黏附分子表达 (表 2): 与空白对照组比较, LPS 组 CXCL-1、CXCL-3、MCP-1、E-选择素、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 表达明显升高 (均 $P < 0.01$)。Adora2b 活化能呈剂量依赖性地降低上述趋化因子和黏附分子的 mRNA 表达, 以 10 μ mol/L 作用最明显; 相反, Adora2b 受抑后上述趋化因子和黏附分子表达明显增加。BAY60-6583 和 PSB1115 本身对 PMVEC 趋化因子和黏附分子表达无显著影响 (均 $P > 0.05$)。

2.4 PMN 体外迁移情况 (表 3): LPS 组 PMN 迁移细胞较空白对照组明显增多 ($P < 0.01$)。BAY60-6583 预处理可呈剂量依赖性地显著逆转 LPS 诱导的上述效应 (均 $P > 0.05$); 相反, PSB1115 预处理后 PMN 迁移增多 ($P < 0.05$)。BAY60-6583 和 PSB1115 本身对 PMN 迁移无显著影响 (均 $P > 0.05$)。

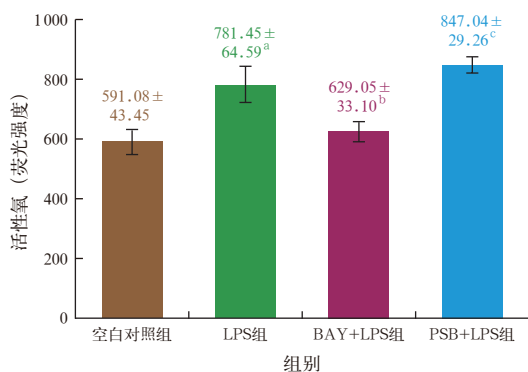
表3 各组大鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC)表面PMN迁移情况及PMVEC通透性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	PMN迁移细胞数(个/HP)	Pd($\times 10^{-6}$ cm/s)
空白对照组	4	78.50 ± 8.56	16.04 ± 0.94
LPS组	4	290.20 ± 16.48 ^a	32.55 ± 2.13 ^a
BAY 0.1 μmol/L+LPS组	4	260.60 ± 18.24 ^b	28.28 ± 2.04 ^b
BAY 1 μmol/L+LPS组	4	200.20 ± 17.31 ^c	23.68 ± 1.58 ^c
BAY 10 μmol/L+LPS组	4	176.10 ± 12.03 ^c	19.53 ± 1.06 ^c
PSB+LPS组	4	348.40 ± 22.68 ^b	39.65 ± 2.69 ^c
BAY组	4	65.70 ± 7.25	15.77 ± 1.24
PSB组	4	82.40 ± 10.91	17.10 ± 1.33

注: LPS为脂多糖, BAY为A2b腺苷受体(Adora2b)特异性激动剂BAY60-6583, PSB为Adora2b特异性抑制剂PSB1115, PMN为中性粒细胞, Pd为通透系数;与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与LPS组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

2.5 PMN黏附迁移后PMVEC通透性(表3):与空白对照组比较,LPS组PMVEC单层通透性显著增加($P < 0.01$)。与LPS组相比,BAY60-6583预处理能显著降低内皮单层通透性,并呈剂量依赖性,最大效应浓度为10 μmol/L;相反,PSB1115预处理后可显著增加内皮单层通透性($P < 0.01$)。BAY60-6583和PSB1115本身对PMVEC通透性无显著影响。

2.6 细胞内氧化应激水平(图2):与空白对照组相比,LPS组细胞内活性氧水平明显升高($P < 0.01$)。与LPS组比较,BAY60-6583预处理可明显降低细胞内氧化应激水平($P < 0.01$);相反,PSB1115预处理后LPS诱导的氧化应激损伤加重($P < 0.05$)。



注: LPS为脂多糖, BAY为A2b腺苷受体(Adora2b)特异性激动剂BAY60-6583, PSB为Adora2b特异性抑制剂PSB1115;与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与LPS组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

图2 各组大鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC)氧化应激水平比较

3 讨论

本课题组前期研究显示,腺苷的低亲和力受体Adora2b能够通过增强PMVEC间连接、减少细胞旁扩散、促进新生血管形成等机制降低肺微血管内皮屏障通透性^[2]。但Adora2b活化对肺微血管内皮凋亡和炎症的影响仍有待明确。本研究中通过原代培

养大鼠PMVEC,观察了LPS刺激下Adora2b活化或抑制对PMVEC凋亡和炎症反应的调控作用,结果显示,Adora2b活化可呈剂量依赖性降低PMVEC早期凋亡率,减轻肺微血管内皮炎症反应,从而发挥肺微血管内皮屏障保护作用。

腺苷受体属于G蛋白耦联受体超家族。根据其药理学特性,腺苷受体分为腺苷酸环化酶(AC)抑制型和刺激型受体,其中AC刺激型受体又分为高亲和力的Adora2a和低亲和力的Adora2b^[3]。正常情况下,腺苷活化Adora2a的半数有效浓度(EC₅₀)是0.2~0.7 μmol/L,而Adora2b仅在腺苷EC₅₀达24 μmol/L以上时才能被激活^[4]。尽管Adora2b在脉管系统、肺脏、胃肠道等多种组织中广泛表达,但其诱导表达和所介导的功能,随着疾病反应模型及组织来源的不同,存在很大差异。

Adora2b在肺内表达最高^[5],包括肺泡上皮、血管内皮和炎性细胞。现阶段关于Adora2b的研究主要集中在慢性阻塞性肺疾病、缺血/再灌注损伤等慢性炎症和免疫反应领域。国内外越来越重视Adora2b与急性炎症损伤如ARDS之间的相关性。本课题组前期研究显示,在LPS诱导的PMVEC损伤模型,Adora2b活化能够降低肺微血管内皮屏障通透性,分子机制包括调节细胞间连接、减少细胞旁扩散、促进新生血管形成等^[2]。本研究显示,Adora2b活化还能够抑制LPS诱导的PMVEC早期凋亡,并呈剂量依赖效应,从而减小内皮细胞间间隙。该结果完善了Adora2b肺微血管内皮屏障保护机制。

肺内外因素作用于肺微血管内皮、导致过度的炎症反应,是ARDS发病的始动环节。本研究显示,Adora2b活化能减少LPS诱导的PMVEC早期炎症因子IL-1β和TNF-α的分泌,减少PMN黏附,下调细胞趋化因子和黏附因子的mRNA表达。IL-1β和TNF-α是ARDS早期发展中重要的促炎细胞因子。LPS损伤刺激下,内皮细胞可分泌IL-1β和TNF-α等早期炎症因子及趋化因子,直接或通过激活其他通路诱导大量PMN和巨噬细胞聚集,促进PMN脱颗粒和释放溶酶体,导致肺组织的氧化损伤与微血栓形成,加速ARDS病情进展^[6]。临床研究也显示,ARDS患者肺内TNF-α和IL-1β含量均较高,并与肺组织局部损伤程度明显相关,可用于评估ARDS患者的预后^[7-8]。事实上,Adora2b活化抑制炎症和趋化因子释放的作用,与另一AC刺激型受体Adora2a类似^[9],其细胞内信号机制仍有待进一

步研究。Adora2b可能通过激活AC,提高细胞环磷酸腺苷(cAMP)水平,进而通过蛋白激酶A(PKA)途径,使cAMP反应元件结合蛋白(CREB)发生磷酸化,抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)转录,从而调控炎症因子表达。有趣的是,早期释放的TNF- α 能上调Adora2b转录,并调节Adora2b转录后的稳定性^[10],从而形成负反馈机制,抑制炎症反应进一步扩大。

PMN与血管内皮细胞的相互作用是ARDS炎症级联反应的关键步骤^[11]。研究显示,调控PMN转运可改善ARDS动物预后,血和肺泡灌洗液中持续的PMN增多与不良预后相关^[12]。肺内外因素急性刺激下,内皮细胞分泌黏附分子E-选择素,介导PMN在内皮细胞上的滚动;而ICAM-1与PMN表面的整合素相互作用,介导PMN黏附于血管内皮细胞^[13]。本研究显示,LPS刺激下,PMVEC表达E-选择素、ICAM-1和VCAM-1等黏附分子增加,而Adora2b激动剂能下调上述黏附分子表达。体外黏附迁移实验也显示,Adora2b活化后PMN迁移细胞明显减少,提示内皮Adora2b还可通过抑制炎症细胞黏附发挥抗炎特性。本研究中进一步测定了PMN黏附迁移后PMVEC的通透性,结果与预想一致,Adora2b活化能够降低PMN黏附迁移后PMVEC单层通透性,保护肺微血管内皮屏障。

血管内皮细胞炎症损伤与氧化应激密切相关。炎症反应时,黄嘌呤氧化酶等多种氧化酶可产生活性氧簇(ROS),直接或通过激活多种氧敏感性激酶导致细胞损伤^[14]。本研究显示,Adora2b活化能明显降低细胞氧化应激水平,从而减轻PMVEC炎症损伤。

在急性炎症状态下,血浆腺苷浓度迅速升高4~10倍^[15]。另外,缺氧可诱导上皮细胞产生更多的腺苷,并抑制细胞外腺苷被摄取和转化,进一步提高细胞外腺苷水平^[16-18]。因此,作为腺苷的低亲和力受体,Adora2b在ARDS时极易被活化。此外,Adora2b启动子上含有缺氧诱导因子-1(HIF-1)的结合位点,缺氧状态下可诱导Adora2b转录、表达上调^[19]。

综上,本研究显示,LPS刺激下内皮Adora2b活化具有抗凋亡效应,有利于维持正常的肺微血管内皮屏障;Adora2b活化还可通过减少急性炎症因子分泌、下调炎症细胞趋化因子和黏附分子的表达、抑制PMN黏附迁移、减少氧化应激等方面减轻肺微血管内皮炎症,有望成为ARDS急性渗出期治疗的新靶点。Adora2b抗凋亡的细胞内机制以及ARDS时Adora2b对于免疫炎症细胞的影响,尤其是对PMN趋化、激活调控的分子机制,仍有待深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 788-800. DOI: 10.1001/jama.2016.0291.
- [2] 郭晓夏,安友仲. A2b腺苷受体活化降低脂多糖诱导的肺微血管内皮通透性[J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (6): 588-593. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.06.017.
- [3] Guo XX, An YZ. Activation of A2b adenosine receptor decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary microvascular permeability [J]. *Chin Crit Care Med*, 2018, 30 (6): 588-593. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.06.017.
- [4] 李娜,王庚,金连弘. 腺苷受体信号通路和免疫细胞上腺苷受体的调节[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31 (8): 1133-1136.
- [5] Li N, Wang G, Jin LH. Adenosine receptor signaling pathway and regulation of adenosine receptors in immune cells [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2015, 31 (8): 1133-1136.
- [6] Eckle T, Füllbier L, Wehrmann M, et al. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (12): 8127-8137. DOI: 10.4049/jimmunol.178.12.8127.
- [7] Cagnina RE, Ramos SI, Marshall MA, et al. Adenosine A2B receptors are highly expressed on murine type II alveolar epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297 (3): L467-474. DOI: 10.1152/ajplung.90553.2008.
- [8] Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2005, 33 (1): 1-6. DOI: 10.1097/01.ccm.0000149854.61192.dc.
- [9] Kurdowska A, Noble JM, Grant IS, et al. Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30 (10): 2335-2337. DOI: 10.1097/00003246-200210000-00024.
- [10] Liu Y, Song M, Zhu G, et al. Corynoline attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by activating Nrf2 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 48: 96-101. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.04.029.
- [11] Hassanian SM, Dinarvand P, Rezaie AR. Adenosine regulates the proinflammatory signaling function of thrombin in endothelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229 (9): 1292-1300. DOI: 10.1002/jcp.24568.
- [12] Schingnitz U, Hartmann K, Macmanus CF, et al. Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2010, 184 (9): 5271-5279. DOI: 10.4049/jimmunol.0903035.
- [13] Abraham E. Neutrophils and acute lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (4 Suppl): S195-199. DOI: 10.1097/01.CCM.0000057843.47705.E8.
- [14] Reutershan J, Basit A, Galkina EV, et al. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289 (5): L807-815. DOI: 10.1152/ajplung.00477.2004.
- [15] Anbarasan C, Bavanilatha M, Latchumanadhas K, et al. ICAM-1 molecular mechanism and genome wide SNP's association studies [J]. *Indian Heart J*, 2015, 67 (3): 282-287. DOI: 10.1016/j.ihj.2015.03.005.
- [16] Mo Y, Wan R, Chien S, et al. Activation of endothelial cells after exposure to ambient ultrafine particles: the role of NADPH oxidase [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 236 (2): 183-193. DOI: 10.1016/j.taap.2009.01.017.
- [17] Martin C, Leone M, Viviani X, et al. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28 (9): 3198-3202. DOI: 10.1097/00003246-200009000-00014.
- [18] Eltzschig HK. Adenosine: an old drug newly discovered [J]. *Anesthesiology*, 2009, 111 (4): 904-915. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181b060f2.
- [19] Morote-García JC, Rosenberger P, Kuhlicke J, et al. HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak [J]. *Blood*, 2008, 111 (12): 5571-5580. DOI: 10.1182/blood-2007-11-126763.
- [20] Morote-García JC, Rosenberger P, Nivillac NM, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136 (2): 607-618. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.037.
- [21] Eckle T, Kewley EM, Brodsky KS, et al. Identification of hypoxia-inducible factor HIF-1A as transcriptional regulator of the A2B adenosine receptor during acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (3): 1249-1256. DOI: 10.4049/jimmunol.1100593.

(收稿日期: 2019-08-13)