

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.03.016

泮托拉唑对急性肺损伤模型大鼠和人肺微血管内皮细胞损伤的作用及作用机制*

陈庆贤, 刘立伟[△], 吴茂森

(海南西部中心医院药剂科, 海南 儋州 571799)

摘要:目的 探讨泮托拉唑对急性肺损伤(ALI)模型大鼠和人肺微血管内皮细胞(HPMECs)损伤的作用及作用机制。方法 将48只SD大鼠随机分为正常对照组、脂多糖组、阳性对照组、泮托拉唑低、高剂量组和泮托拉唑高剂量+氯喹组,各8只。除正常对照组外,其余各组大鼠均腹腔注射5 mg/kg脂多糖复制ALI模型;阳性对照组大鼠腹腔注射2 mg/kg地塞米松,泮托拉唑低、高剂量组分别腹腔注射泮托拉唑26,104 mg/kg,泮托拉唑高剂量+氯喹组注射104 mg/kg泮托拉唑和10 mg/kg氯喹,正常对照组和脂多糖组大鼠均腹腔注射等体积生理盐水。取对数生长期的HPMECs,随机分为正常对照组、脂多糖组、阳性对照组、泮托拉唑低、高剂量组和泮托拉唑高剂量+氯喹组。除正常对照组(给予等体积生理盐水)外,其余各组细胞添加100 μg/mL脂多糖,以构建HPMECs损伤模型,阳性对照组添加100 nmol/L地塞米松,泮托拉唑低、高剂量组细胞分别添加泮托拉唑40,80 μg/mL,泮托拉唑高剂量+氯喹组添加80 μg/mL泮托拉唑和5 μmol/L氯喹。采用苏木精-伊红染色法检测大鼠肺组织的病理学变化,测定肺组织湿/干重比值(W/D);采用TUNEL染色法检测大鼠肺组织细胞凋亡情况;采用酶联免疫吸附法检测肺组织和HPMECs细胞中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1β(IL-1β)水平;采用CCK-8法检测细胞活性;采用蛋白免疫印迹法检测肺组织和HPMECs细胞中LC3、Beclin1、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化mTOR(p-mTOR)的表达水平。结果 与脂多糖组比较,阳性对照组,泮托拉唑低、高剂量组大鼠肺组织病理学评分、W/D值均显著降低($P < 0.05$),大鼠血清和HPMECs细胞中TNF-α,IL-6,IL-1β水平均显著降低($P < 0.05$),TUNEL阳性细胞数均显著减少($P < 0.05$),细胞凋亡率和p-mTOR/mTOR表达水平均显著降低($P < 0.05$),LC3 II/LC3 I和Beclin1表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 泮托拉唑可通过mTOR信号通路调控自噬,在ALI模型大鼠和HPMECs损伤中发挥保护作用。

关键词:泮托拉唑;急性肺损伤;人肺微血管内皮细胞;雷帕霉素靶蛋白信号通路;自噬;作用机制

中图分类号:R965;R974

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)03-0065-07

Effect of Pantoprazole on Acute Lung Injury Rats and Injury of Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells Injury and Its Mechanism

CHEN Qingxian, LIU Liwei, WU Maosen

(Department of Pharmacy, Hainan Western Central Hospital, Danzhou, Hainan, China 571799)

Abstract: Objective To investigate the effect of pantoprazole on acute lung injury (ALI) rats and human pulmonary microvascular endothelial cell (HPMECs) injury and its mechanism. **Methods** A total of 48 SD rats were randomly divided into the normal control group, lipopolysaccharide (LPS) group, positive control group, pantoprazole low- and high-dose groups and pantoprazole high-dose + chloroquine group, with eight rats in each group. ALI model was established by intraperitoneal injection of 5 mg/kg of LPS except the normal control group (equal volume of normal saline). The rats in the positive control group were intraperitoneally injected with 2 mg/kg of dexamethasone, the rats in the pantoprazole low- and high-dose groups were intraperitoneally injected with 26, 104 mg/kg of pantoprazole, the rats in the pantoprazole high-dose + chloroquine group was injected with 104 mg/kg of pantoprazole and 10 mg/kg of chloroquine, and the rats in the normal control group and LPS group were intraperitoneally injected with equal volume of normal saline. HPMECs during the logarithmic growth period were randomly divided into the normal control group, LPS group, positive control group, pantoprazole low- and high-dose groups and pantoprazole high-dose + chloroquine group. HPMECs injury model was established by adding 100 μg/mL of LPS to cells in other groups except the normal control group (equal volume of normal saline). 100 nmol/L of dexamethasone was added to cells in the positive control group, and 40 μg/mL and 80 μg/mL of pantoprazole were added to cells in pantoprazole low- and high-dose groups respectively. 80 μg/mL of pantoprazole and 5 μmol/L of chloroquine were added to cells in pantoprazole high-dose + chloroquine group. The pathological changes of lung tissue of rats were detected by the hematoxylin-eosin staining, and the wet/dry weight ratio (W/D) of lung tissue was measured. The apoptosis of rat lung tissue was detected by the TUNEL staining. The levels of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin 1β (IL-1β) in lung tissue and HPMECs were detected by the enzyme-

*基金项目:海南省卫生计生行业科研项目[20A200008]。

第一作者:陈庆贤,男,副主任药师,研究方向为医院药学及临床药学,(电子信箱)aabu123@163.com。

[△]通信作者:刘立伟,男,硕士,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)liuliwei_2013@126.com。

linked immunosorbent assay(ELISA). The cell activity was detected by the CCK-8 method. The expression levels of LC3, Beclin1, mammalian target of rapamycin (mTOR) and phosphorylated mTOR (p-mTOR) in lung tissue and HPMECs cells were detected by the Western blot. **Results** Compared with those in the LPS group, the lung histopathological score and *W/D* ratio of rats were significantly lower ($P < 0.05$), the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in serum of rats and HPMECs were significantly lower ($P < 0.05$), the number of TUNEL positive cells was significantly fewer ($P < 0.05$), the apoptosis rate and p-mTOR/mTOR expression level were significantly lower ($P < 0.05$), while the expression levels of LC3 II/LC3 I and Beclin1 were significantly higher in the positive control group and pantoprazole low- and high-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Pantoprazole can regulate autophagy through the mTOR signaling pathway and play a protective role in ALI model rats and HPMECs injury.

Key words: pantoprazole; acute lung injury; human pulmonary microvascular endothelial cells; mTOR signaling pathway; autophagy; mechanism

急性肺损伤(ALI)及急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是由各种非心源性原因引起的肺毛细血管内皮和肺泡上皮损伤,血管通透性增高的临床综合征^[1]。ALI的临床死亡率高达45%^[2],故进一步探索有效治疗ALI的药物具有重要意义。泮托拉唑是一种质子泵抑制剂,是治疗消化不良、胃食管反流病、消化性溃疡等多种胃食管疾病的有效胃酸分泌拮抗剂^[3],通过抑制内皮细胞和胃壁细胞核因子- κ B(NF- κ B)的激活,调节多形核中性粒细胞中的钙离子浓度,抑制中性粒细胞的迁移等不同作用机制,以减轻炎症损伤^[4]。雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路在代谢、增殖和自噬诱导过程中起着关键作用,自噬是细胞维持稳态的一种重要机制,脂多糖可诱导小鼠肺上皮和人支气管上皮细胞mTOR磷酸化,并抑制自噬^[5]。本研究探讨了泮托拉唑通过mTOR信号通路调控自噬对大鼠ALI和内皮细胞损伤的影响,为开发新的ALI治疗药物提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、动物与细胞

仪器:Multiskan FC型酶标仪(赛默飞世尔科技<中国>有限公司);CytoFLEX V2-B4-R2型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司);E200型光学显微镜(日本尼康公司);BIO-RADXR型凝胶成像分析系统(美国伯乐公司)。

试剂:泮托拉唑(批号为CC2261),地塞米松(批号为D4902),氯喹(批号为C6628),脂多糖(批号为916374),均购自美国Sigma Aldrich公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒,均购自上海江莱生物科技有限公司;TUNEL凋亡检测试剂盒(德国Roche公司);Annexin V FITC/PI凋亡检测试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司);LC3, Beclin1, mTOR, p-mTOR, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,均购自英国Abcam公司;BeyoECLStar特超敏电化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

动物与细胞:SPF级成年雄性SD大鼠48只,体质量

220~250 g,购自海南省实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(琼)2020-0007,饲养于(20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C条件下,提供充足饮水及饲料,适应性饲养1周。

细胞:人肺微血管内皮细胞(HPMECs,上海中乔新舟生物科技有限公司,货号为3000)。

1.2 方法

脂多糖诱导ALI大鼠模型分组及给药:将48只SD大鼠随机分为正常对照组,脂多糖组,阳性对照组,泮托拉唑低、高剂量组,泮托拉唑高剂量+氯喹组(氯喹为自噬抑制剂),各8只。除正常对照组外,其余各组大鼠均腹腔注射5 mg/kg脂多糖,以建立ALI大鼠模型。苏木精-伊红(HE)染色见肺微血管内充血及出血,肺泡腔及肺泡隔内有大量中性粒细胞聚集;肺组织湿/干重比值明显升高,血清炎症因子水平明显上升,代表成功构建ALI模型^[6]。注射30 min后,阳性对照组大鼠腹腔注射地塞米松2 mg/kg^[7],泮托拉唑低、高剂量组大鼠分别腹腔注射26,104 mg/kg泮托拉唑^[8],泮托拉唑高剂量+氯喹组大鼠腹腔注射104 mg/kg泮托拉唑和10 mg/kg氯喹^[9],正常对照组和脂多糖组注射等体积生理盐水。24 h后进行后续实验。

细胞培养与泮托拉唑给药浓度确定:取HPMECs细胞,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。待细胞密度为80%~90%时,0.25%胰酶液消化细胞,取100 μ L HPMECs细胞(5×10^3 个/孔)加入96孔板,12 h后分别向细胞中加入不同质量浓度泮托拉唑,即10 μ g/mL组、20 μ g/mL组、40 μ g/mL组、80 μ g/mL组、160 μ g/mL组,空白组加入等体积生理盐水。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养24 h后,向细胞中加入CCK-8(10 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C条件下孵育3 h。利用Multiskan FC型酶标仪于450 nm波长处测定各孔吸光度值。

HPMECs细胞分组、细胞损伤模型构建与给药:将对数生长期的HPMECs细胞接种于6孔板(5×10^4 个/孔),继续培养24 h,将细胞随机分为正常对照组,脂多糖组,阳性对照组,泮托拉唑低、高剂量组,泮托拉唑高剂量+

氯喹组,各3孔。正常对照组和脂多糖组细胞给予等体积生理盐水,其余各组细胞添加100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖^[10],刺激1 h,收集细胞。检测到炎症因子水平较对照组明显升高,表示成功构建 HPMECs 细胞损伤模型。脂多糖处理1 h后,阳性对照组添加100 nmol/L 地塞米松^[7],泮托拉唑低、高剂量组分别添加泮托拉唑40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,泮托拉唑高剂量+氯喹组添加泮托拉唑80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和氯喹5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ^[11]。继续培养24 h后进行后续实验。

HE染色:给药24 h后,取大鼠肺组织,4%多聚甲醛固定72 h,用乙醇梯度脱水,用二甲苯使之透明。石蜡包埋,切片,脱蜡至水,苏木精染色10 min,0.7%盐酸乙醇分化数秒,流水洗涤,伊红液浸染3 min。用乙醇梯度脱水,用二甲苯使之透明,中性树胶封片。参考文献[12],对肺组织病理学变化进行评分。

肺组织湿/干重比值测定:给药24 h后,麻醉大鼠,取右上肺,去除肺表面水分和血迹,称定质量,即为湿重(W)。65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱干燥肺组织,48 h后称定质量,即为干重(D)。计算各组大鼠W/D值。

TUNEL染色检测肺组织凋亡:按HE染色项下方法进行肺组织石蜡切片,常规脱蜡至水,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,3% H_2O_2 浸洗10 min,加入蛋白酶K工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应20 min,PBS漂洗,滴加TUNEL反应混合液,湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h;PBS漂洗,加入转化剂,湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min;PBS漂洗,DAB显色;中性树胶封片,于光学显微镜下观察。

肺组织和HPMECs细胞中TNF- α ,IL-6,IL-1 β 水平测定:采集大鼠颈动脉血液标本,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以1 000 r/min的转速离心10 min,取血清。收集HPMECs细胞培养上清液,以10 000 r/min的转速离心10 min,去除死细胞及细胞碎片等,吸取上清液,置新的无菌离心管中,分装后冻存,后续实验用。根据ELISA试剂盒说明书检测血清和上清液中TNF- α ,IL-6,IL-1 β 的水平。

流式细胞仪测定HPMECs细胞凋亡率:收集给药处理后的HPMECs细胞,PBS清洗后,Binding Buffer重悬细胞,随后加入Annexin V-FITC室温避光孵育15 min,加

入PI室温避光孵育5 min,1 h内利用流式细胞仪检测。

蛋白免疫印迹(Western blot)法测定蛋白表达:将大鼠肺组织剪碎,收集给药继续培养24 h后的HPMECs细胞,RIPA裂解液裂解组织和细胞,以10 000 r/min的转速离心10 min,取上清液,采用蛋白质定量(BCA)法测定蛋白浓度。取30 μg 蛋白经SDS-PAGE分离,并转至PVDF膜上。10%脱脂奶粉封闭,随后加入LC3(1:1 000)、Beclin1(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、p-mTOR(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜孵育。加入二抗(1:5 000),室温孵育1 h后,滴加BeyoECL Star工作液至膜上,用化学发光成像仪检测。

CCK-8检测细胞活性:取对数生长期的HPMECs细胞,按HPMECs细胞损伤模型分组,加入脂多糖诱导并给药处理,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h后,每孔加入20 μL CCK-8溶液,2 h后利用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度值。细胞活力(%) = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0\text{加药}) - A(\text{空白})] \times 100\%$ 。其中,A(加药),具有细胞、CCK-8溶液和药物溶液孔的吸光度,A(0加药)为具有细胞、CCK-8溶液而无药物溶液孔的吸光度值,A(空白)为没有细胞孔的吸光度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

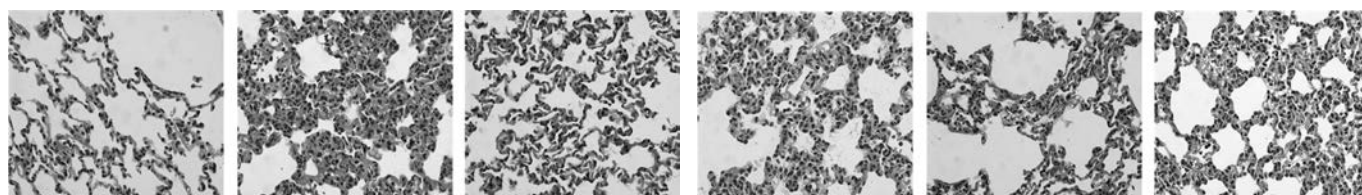
2 结果

2.1 大鼠肺组织病理学变化、W/D值、炎症因子水平

结果见图1和表1。与正常对照组比较,脂多糖组大鼠肺组织病理学评分、W/D值及TNF- α ,IL-6,IL-1 β 水平均显著升高($P < 0.05$);与脂多糖组比较,阳性对照组,泮托拉唑低、高剂量组大鼠肺组织上述指标均显著降低($P < 0.05$);与泮托拉唑高剂量组比较,泮托拉唑高剂量+氯喹组大鼠肺组织上述指标均显著升高($P < 0.05$)。

2.2 大鼠细胞凋亡情况

结果见图2和表1。与正常对照组比较,脂多糖组大



A. 正常对照组 B. 脂多糖组 C. 阳性对照组 D. 泮托拉唑低剂量组 E. 泮托拉唑高剂量组 F. 泮托拉唑高剂量+氯喹组

图1 大鼠肺组织病理学变化($\times 400$)

A. Normal control group B. LPS group C. Positive control group D. Pantoprazole low-dose group E. Pantoprazole high-dose group
F. Pantoprazole high-dose + chloroquine group

Fig. 1 Pathological changes of lung tissue of rats($\times 400$)

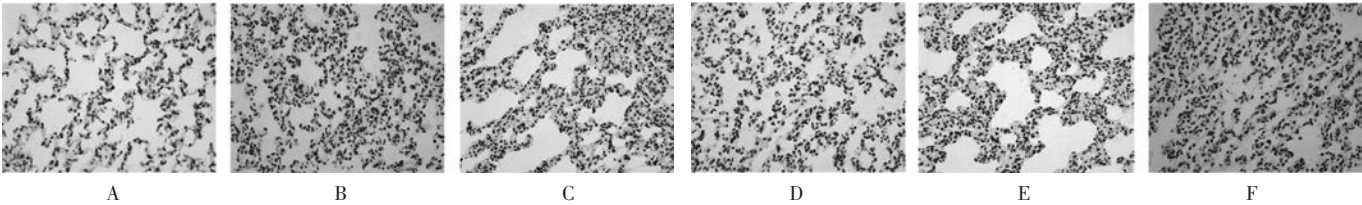
表 1 大鼠肺组织病理学评分、W/D 值、血清炎症因子水平和细胞凋亡情况比较($\bar{X} \pm s, n = 8$)

Tab. 1 Comparison of lung histopathological score, W/D ratio, serum inflammatory factor levels and apoptosis of rats($\bar{X} \pm s, n = 8$)

组别	给药剂量	肺组织病理学 评分(分)	W/D 值	血清炎症因子			TUNEL 阳性细胞数 (个/每个视野)
				TNF- α	IL-6	IL-1 β	
正常对照组		0.25 $\pm$ 0.02	3.22 $\pm$ 0.34	32.16 $\pm$ 5.04	43.44 $\pm$ 4.91	100.34 $\pm$ 9.96	52.33 $\pm$ 5.51
脂多糖组		8.13 $\pm$ 0.84 [*]	5.63 $\pm$ 0.40 [*]	312.93 $\pm$ 24.41 [*]	227.18 $\pm$ 19.20 [*]	290.73 $\pm$ 23.19 [*]	613.67 $\pm$ 56.52 [*]
阳性对照组	2 mg/kg	2.84 $\pm$ 0.51 [#]	3.13 $\pm$ 0.28 [#]	105.38 $\pm$ 12.35 [#]	98.87 $\pm$ 10.18 [#]	127.28 $\pm$ 13.67 [#]	238.63 $\pm$ 28.18 [#]
泮托拉唑低剂量组	26 mg/kg	5.07 $\pm$ 0.65 ^{#*}	4.34 $\pm$ 0.31 [#]	191.81 $\pm$ 28.67 [#]	163.41 $\pm$ 14.61 [#]	198.81 $\pm$ 20.26 [#]	483.67 $\pm$ 36.53 [#]
泮托拉唑高剂量组	104 mg/kg	3.52 $\pm$ 0.44 [#]	3.95 $\pm$ 0.24 [#]	127.84 $\pm$ 15.06 [#]	114.45 $\pm$ 11.01 [#]	142.47 $\pm$ 13.84 [#]	274.33 $\pm$ 25.54 [#]
泮托拉唑高剂量 + 氯喹组	104 mg/kg + 10 mg/kg	5.48 $\pm$ 0.61 ^Δ	5.13 $\pm$ 0.30 ^Δ	243.11 $\pm$ 24.07 ^Δ	186.89 $\pm$ 13.18 ^Δ	241.51 $\pm$ 19.07 ^Δ	552.67 $\pm$ 35.02 ^Δ
F 值		145.346	64.284	134.475	115.836	97.743	178.745
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与脂多糖组比较,[#] $P < 0.05$;与泮托拉唑高剂量组比较,^Δ $P < 0.05$ 。表 3 至表 4 同。

Note: Compared with those in the normal control group, ^{*} $P < 0.05$ (for Tab. 1 and Tab. 3-4); Compared with those in the LPS group, [#] $P < 0.05$ (for Tab. 1 and Tab. 3-4); Compared with those in the pantoprazole high-dose group, ^Δ $P < 0.05$ (for Tab. 1 and Tab. 3-4).



A. 正常对照组 B. 脂多糖组 C. 阳性对照组 D. 泮托拉唑低剂量组 E. 泮托拉唑高剂量组 F. 泮托拉唑高剂量 + 氯喹组

图 2 大鼠肺组织细胞凋亡 TUNEL 染色检测结果($\times 400$)

A. Normal control group B. LPS group C. Positive control group D. Pantoprazole low-dose group E. Pantoprazole high-dose group
F. Pantoprazole high-dose + chloroquine group

Fig. 2 TUNEL staining results of apoptosis in lung tissue of rats($\times 400$)

鼠 TUNEL 阳性细胞数显著增多($P < 0.05$);与脂多糖组比较,阳性对照组,泮托拉唑低、高剂量组大鼠 TUNEL 阳性细胞数均显著减少($P < 0.05$);与泮托拉唑高剂量组比较,泮托拉唑低高剂量 + 氯喹组大鼠 TUNEL 阳性细胞数显著增多($P < 0.05$)。

2.3 HPMECs 细胞炎症因子水平和细胞凋亡情况

结果见表 2、表 3 和图 3。与空白组比较,160 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞活力显著降低($P < 0.05$),其余组无明显变化。故选取 40 $\mu\text{g/mL}$ 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 作为使用浓度。与正常对照组比较,脂多糖组细胞 TNF- α , IL-6, IL-1 β 水平及细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$);与脂多糖组比较,

表 2 不同剂量泮托拉唑对 HPMECs 细胞活力的影响
($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

Tab. 2 Effects of different doses of pantoprazole on cell viability of HPMECs($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

组别	细胞活力	组别	细胞活力
空白组	100.00 $\pm$ 5.32	80 $\mu\text{g/mL}$ 组	91.29 $\pm$ 5.27
10 $\mu\text{g/mL}$ 组	98.37 $\pm$ 6.21	160 $\mu\text{g/mL}$ 组	80.86 $\pm$ 5.92 [*]
20 $\mu\text{g/mL}$ 组	97.82 $\pm$ 6.98	F 值	37.297
40 $\mu\text{g/mL}$ 组	95.14 $\pm$ 5.88	P 值	<0.001

注:与空白组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in the blank group, ^{*} $P < 0.05$.

表 3 HPMECs 细胞 TNF- α , IL-6, IL-1 β 水平及细胞
凋亡率比较($\bar{X} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels and apoptosis of HPMECs($\bar{X} \pm s$)

组别	给药剂量	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	细胞凋亡率 (%)
正常对照组		19.36 $\pm$ 2.02	11.29 $\pm$ 0.96	32.13 $\pm$ 2.47	4.58 $\pm$ 0.38
脂多糖组		42.85 $\pm$ 3.28 [*]	27.37 $\pm$ 2.12 [*]	74.75 $\pm$ 6.82 [*]	16.24 $\pm$ 1.03 [*]
阳性对照组	10 nmol/L	21.05 $\pm$ 1.87 [#]	13.28 $\pm$ 1.24 [#]	35.45 $\pm$ 3.23 [#]	6.86 $\pm$ 0.57 [#]
泮托拉唑低剂量组	40 $\mu\text{g/mL}$	33.26 $\pm$ 2.19 [#]	21.84 $\pm$ 1.95 [#]	51.57 $\pm$ 5.48 [#]	11.12 $\pm$ 1.07 [#]
泮托拉唑高剂量组	80 $\mu\text{g/mL}$	25.18 $\pm$ 1.93 [#]	15.72 $\pm$ 1.01 [#]	38.23 $\pm$ 3.11 [#]	7.66 $\pm$ 0.63 [#]
泮托拉唑高剂量 + 氯喹组	80 $\mu\text{g/mL}$ + 5 $\mu\text{mol/L}$	38.19 $\pm$ 2.57 ^Δ	24.83 $\pm$ 2.31 ^Δ	62.39 $\pm$ 5.84 ^Δ	13.13 $\pm$ 0.83 ^Δ
F 值		76.452	87.357	63.395	137.182
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

阳性对照组,泮托拉唑低、高剂量组细胞上述指标水平均显著降低($P < 0.05$);与泮托拉唑高剂量组比较,泮托拉唑高剂量 + 氯喹组细胞上述指标水平均显著升高($P < 0.05$)。

2.4 泮托拉唑激活 ALI 模型大鼠细胞自噬

结果见图 4、图 5 和表 4。与正常对照组比较,脂多糖组大鼠肺组织和 HPMECs 细胞中 LC3 II / LC3 I 和 Beclin1 的表达水平均显著降低($P < 0.05$);与脂多糖组比较,阳性对照组,泮托拉唑低、高剂量组大鼠肺组织

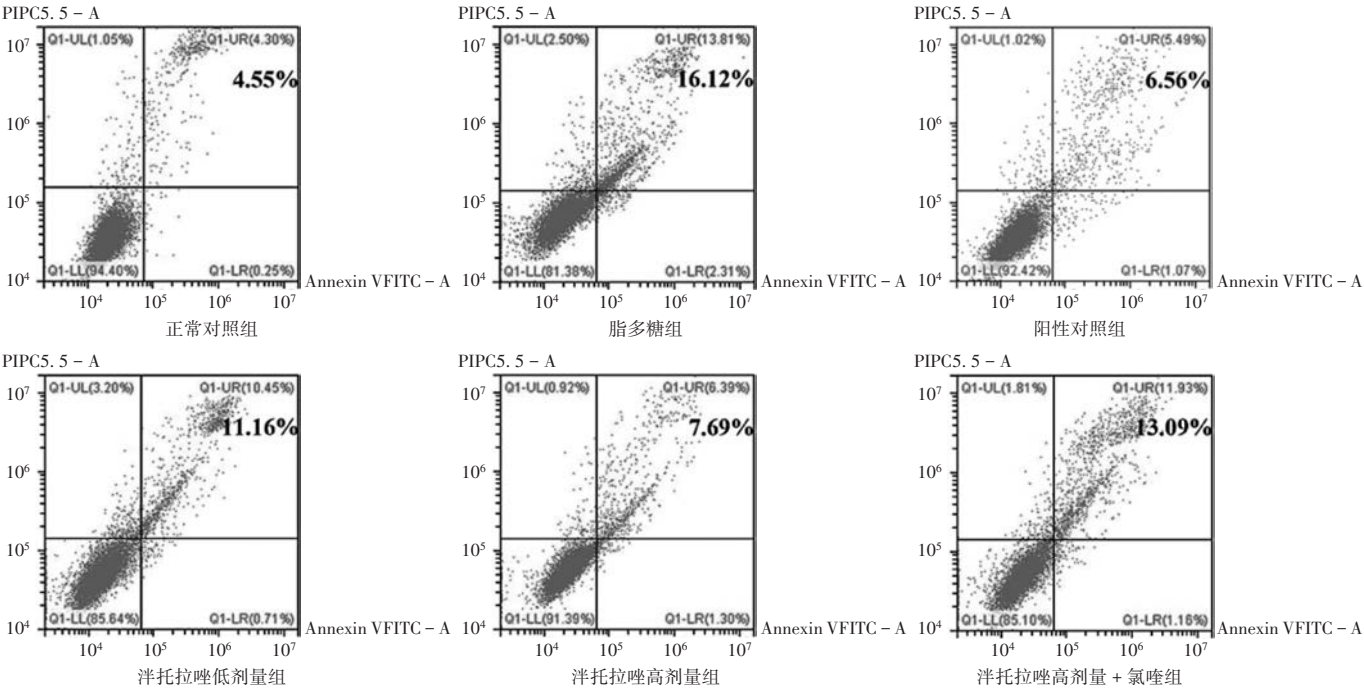


图3 流式细胞仪检测 HPMECs 细胞凋亡情况

Fig. 3 Apoptosis of HPMECs detected by the flow cytometry

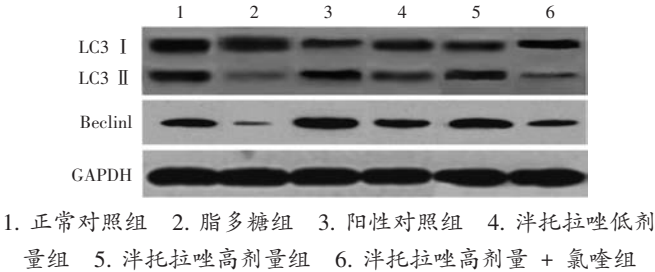


图4 大鼠肺组织 LC3 和 Beclin1 表达

1. Normal control group 2. LPS group 3. Positive control group
4. Pantoprazole low - dose group 5. Pantoprazole high - dose group
6. Pantoprazole high - dose + chloroquine group

Fig. 4 Expression of LC3 and Beclin1 in lung tissue of rats

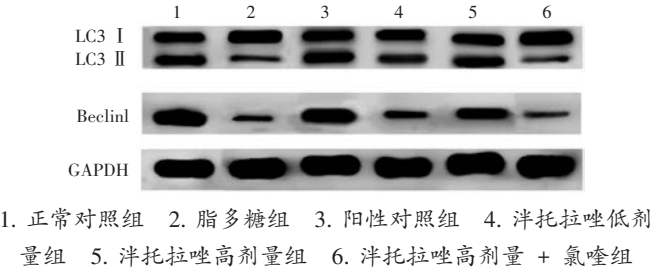


图5 HPMECs 细胞 LC3 和 Beclin1 表达

1. Normal control group 2. LPS group 3. Positive control group
4. Pantoprazole low - dose group 5. Pantoprazole high - dose group
6. Pantoprazole high - dose + chloroquine group

Fig. 5 Expression of LC3 and Beclin1 in HPMECs

表4 大鼠肺组织和 HPMECs 细胞中 LC3, Beclin1, p - mTOR / mTOR 表达水平比较 ($\bar{X} \pm s$)

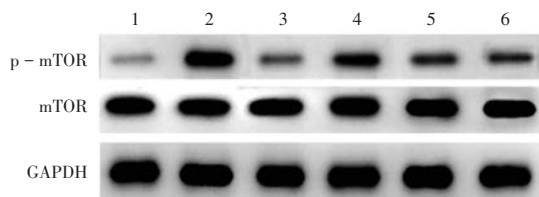
Tab. 4 Comparison of LC3, Beclin1 and p - mTOR / mTOR expression levels in lung tissue of rats and HPMECs ($\bar{X} \pm s$)

组别	LC3 II / LC3 I		Beclin1		p - mTOR / mTOR	
	肺组织 (n = 8)	HPMECs 细胞 (n = 3)	肺组织 (n = 8)	HPMECs 细胞 (n = 3)	肺组织 (n = 8)	HPMECs 细胞 (n = 3)
正常对照组	0.64 ± 0.05	0.94 ± 0.09	0.22 ± 0.03	0.87 ± 0.09	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
脂多糖组	0.12 ± 0.01 [*]	0.21 ± 0.02 [*]	0.09 ± 0.00 [*]	0.11 ± 0.01 [*]	0.98 ± 0.11 [*]	1.15 ± 0.12 [*]
阳性对照组	1.38 ± 0.13 ^{##}	0.96 ± 0.11 ^{##}	0.64 ± 0.05 ^{##}	0.84 ± 0.08 ^{##}	0.20 ± 0.02 ^{##}	0.25 ± 0.03 ^{##}
泮托拉唑低剂量组	0.41 ± 0.03 ^{##}	0.62 ± 0.07 ^{##}	0.26 ± 0.03 ^{##}	0.20 ± 0.02 ^{##}	0.64 ± 0.06 ^{##}	0.44 ± 0.03 ^{##}
泮托拉唑高剂量组	1.36 ± 0.14 ^{##}	0.87 ± 0.09 ^{##}	0.53 ± 0.04 ^{##}	0.65 ± 0.06 ^{##}	0.45 ± 0.03 ^{##}	0.32 ± 0.03 ^{##}
泮托拉唑高剂量 + 氯喹组	0.11 ± 0.01 ^Δ	0.17 ± 0.02 ^Δ	0.35 ± 0.04 ^Δ	0.13 ± 0.01 ^Δ	0.42 ± 0.04 ^Δ	0.30 ± 0.03 ^Δ
F 值	142.289	134.758	115.046	117.043	132.246	121.035
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

和 HPMECs 细胞中的表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与泮托拉唑高剂量组比较, 泮托拉唑高剂量 + 氯喹组大鼠肺组织和 HPMECs 细胞中上述指标的表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。

2.5 泮托拉唑抑制 mTOR 信号通路激活

结果见图6、图7和表4。与正常对照组比较, 脂多糖组大鼠肺组织和 HPMECs 细胞中 p - mTOR / mTOR 的表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与脂多糖组比较, 阳性对

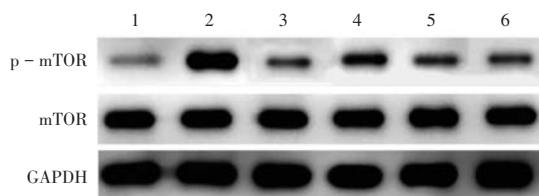


1. 正常对照组 2. 脂多糖组 3. 阳性对照组 4. 泮托拉唑低剂量组 5. 泮托拉唑高剂量组 6. 泮托拉唑高剂量 + 氯喹组

图6 大鼠肺组织p-mTOR和mTOR表达

1. Normal control group 2. LPS group 3. Positive control group
4. Pantoprazole low-dose group 5. Pantoprazole high-dose group
6. Pantoprazole high-dose + chloroquine group

Fig. 6 Expression of p-mTOR and mTOR in lung tissue of rats



1. 正常对照组 2. 脂多糖组 3. 阳性对照组 4. 泮托拉唑低剂量组 5. 泮托拉唑高剂量组 6. 泮托拉唑高剂量 + 氯喹组

图7 HPMECs细胞p-mTOR和mTOR表达

1. Normal control group 2. LPS group 3. Positive control group
4. Pantoprazole low-dose group 5. Pantoprazole high-dose group
6. Pantoprazole high-dose + chloroquine group

Fig. 7 Expression of p-mTOR and mTOR in HPMECs

照组,泮托拉唑低、高剂量组大鼠肺组织和HPMECs细胞中p-mTOR/mTOR的表达水平均显著降低($P < 0.05$);与泮托拉唑高剂量组比较,泮托拉唑高剂量 + 氯喹组大鼠肺组织和HPMECs细胞中p-mTOR/mTOR的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。

3 讨论

ALI发病机制复杂,目前的治疗方法存在明显局限^[13]。泮托拉唑可提高癌细胞对长春新碱的敏感性,诱导癌细胞周期阻滞,抑制迁移和侵袭^[14];可有效减轻脓毒症急性肺、肾损伤,抑制肾小管上皮细胞凋亡^[8]。本研究结果显示,泮托拉唑干预可减轻ALI模型大鼠和HPMECs模型大鼠肺组织损伤,抑制炎症因子产生及细胞凋亡,发挥保护作用。

细胞自噬是生物体广泛存在的细胞内自主降解过程,自噬不足或过度自噬均可导致ALI,将自噬水平调节至正常范围可减轻ALI^[15]。可见,自噬对ALI的发展具有双重作用。研究表明,脂多糖诱导的ALI模型可明显活化mTOR通路,抑制细胞自噬^[16],上调自噬水平可改善ALI^[17]。本研究结果显示,脂多糖诱导的ALI和HPMECs可明显抑制细胞自噬,泮托拉唑干预可上调自噬水平,自噬抑制剂氯喹可逆转泮托拉唑对ALI和HPMECs的保护作用。

mTOR作为一种保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是

调节细胞生长、增殖、运动、存活、自噬等上游通路的汇合点,抑制mTOR活化可促进细胞自噬^[18]。在PM2.5诱导的ALI模型大鼠^[19]中,mTOR被激活,导致下游细胞自噬水平受到抑制,黄芩甲苷通过抑制mTOR活化促进自噬,保护PM2.5诱导的ALI。本研究结果显示,脂多糖诱导的ALI和HPMECs均可导致mTOR活化,泮托拉唑干预可抑制其活化,且自噬抑制剂氯喹对其活化无明显影响。

综上所述,泮托拉唑通过mTOR通路调节自噬,在ALI模型大鼠和HPMECs损伤中发挥保护作用。

参考文献

- [1] VILLAR J, SLUTSKY AS. Golden anniversary of the acute respiratory distress syndrome: still much work to do! [J]. Curr Opin Crit Care, 2017, 23(1): 4-9.
- [2] SWEENEY RM, MCAULEY DF. Acute respiratory distress syndrome [J]. Lancet, 2016, 388: 2416-2430.
- [3] ZHANG JX, GE L, HILL M, et al. Standard-Dose Proton Pump Inhibitors in the Initial Non-Eradication Treatment of Duodenal Ulcer: Systematic Review, Network Meta-Analysis, and Cost-Effectiveness Analysis [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1512.
- [4] ZENG XY, LIU L, ZHENG MZ, et al. Pantoprazole, an FDA-approved proton-pump inhibitor, suppresses colorectal cancer growth by targeting T-cell-originated protein kinase [J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 22460-22473.
- [5] HU Y, LOU J, MAO YY, et al. Activation of mTOR in pulmonary epithelium promotes LPS-induced acute lung injury [J]. Autophagy, 2016, 12(12): 2286-2299.
- [6] 王 兰, 王 磊, 宗宇红, 等. miR-146a在骨髓间充质干细胞减轻大鼠急性肺损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(4): 475-478.
- [7] GENG P, MA T, XING J, et al. Dexamethasone ameliorates H₂S-induced acute lung injury by increasing claudin-5 expression via the PI3K pathway [J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(6): 626-635.
- [8] YAN XX, ZHENG AD, ZHANG ZE, et al. Protective effect of pantoprazole against sepsis-induced acute lung and kidney injury in rats [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(8): 5197-5211.
- [9] 杨红星. 通心络干预大鼠心肌缺血再灌注损伤的自噬机制及其相关microRNA途径 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [10] 魏桂红. GLP-1受体在急性肺损伤中对肺血管内皮细胞的保护作用及机制探讨 [D]. 南京: 南京医科大学, 2019.
- [11] 毛佳璇, 左 丽, 孔维莹, 等. DENV-2诱导HUVECs自噬和影响细胞活力的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(8): 1131-1136.
- [12] MENG XZ, XU H, DANG YJ, et al. Hyperoxygenated Hydrogen-Rich Solution Suppresses Lung Injury Induced by Hemorrhagic Shock in Rats [J]. J Surg Res, 2019, 239: 103-114.
- [13] PAVKOV ME, HARDING JL, BURROWS NR. Trends in Hospitalizations for Acute Kidney Injury - United States, 2000-2014 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2018, 67(10): 289-293.