

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.04.003

❖ 基础研究 ❖

以 a7nAChR 为靶点治疗急性呼吸窘迫综合征及相关机制

李孟秦¹, 王飞², 杨秋燕¹, 黄丹¹, 曹小平¹

(1. 川北医学院附属医院急诊医学科; 2. 南充市第五人民医院骨科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨 a7 胆碱能受体 (a7nAChR) 在急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 中的作用及兴奋 a7nAChR 减轻 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的相关机制。**方法:** 将 20~75 岁的男性 ARDS 患者分为吸烟组与非吸烟组, 入院后 24 h 内检测血浆中 IL-17、IL-6、TNF- α 浓度。24 只小鼠随机分为对照组、LPS 组、LPS + a7nAChR 激动剂组、LPS + a7nAChR 抑制剂组, 每组各 6 只。造模前 1 h, LPS + a7nAChR 激动剂、LPS + a7nAChR 抑制剂组小鼠分别予以腹腔注射 choline (10 mg/kg)、 α -bungarotoxin (1 μ g/kg)。然后对照组通过气管导管滴注 PBS 溶液, 其余 3 组小鼠气管导管内滴注 LPS 溶液建立小鼠 ARDS 模型。检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-17、IL-6、TNF- α 水平。取左下肺组织行 HE 染色、肺损伤评分, 右肺测肺组织湿/干比重, 左上肺测 ROR γ T 蛋白及 mRNA 水平。**结果:** 男性 ARDS 患者中, 吸烟者外周血 IL-17、IL-6、TNF- α 水平低于非吸烟者 ($P < 0.05$)。a7nAChR 激动剂降低小鼠肺损伤评分及肺组织湿/干比重 ($P < 0.05$), 而 a7nAChR 抑制剂使其进一步升高 ($P < 0.05$)。肺损伤小鼠 BALF 中 IL-17、IL-6、TNF- α 水平较对照组升高 ($P < 0.05$), a7nAChR 兴奋剂可使其降低 ($P < 0.05$), 而 a7nAChR 抑制剂可使其进一步升高 ($P < 0.05$)。肺损伤小鼠肺组织 ROR γ T 蛋白及 mRNA 水平较对照组升高 ($P < 0.05$), a7nAChR 兴奋剂可下调其表达 ($P < 0.05$), 而 a7nAChR 抑制剂可使其表达进一步上调 ($P < 0.05$)。**结论:** 抑制 a7nAChR 可能通过在转录及翻译水平抑制 ROR γ T 表达减轻 Th17 细胞反应性反应, 从而抑制炎症反应, 减轻肺损伤。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; 急性肺损伤; a7 胆碱能受体; 白细胞介素-17; 炎症反应

【中图分类号】 R563.9 **【文献标志码】** A

Treatment of acute respiratory distress syndrome by targeting a7nAChR and its related mechanism

LI Meng-qin¹, WANG Fei², YANG Qiu-yan¹, HUANG Dan¹, CAO Xiao-ping¹

(1. Department of Emergency, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. Department of Orthopaedics, Fifth people's Hospital of Nanchong, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the role of a7nAChR in acute respiratory disease syndrome (ARDS) and the mechanism of a7nAChR agonists alleviating LPS-induced acute lung injury in mice. **Methods:** Male ARDS patients aged 20-75 years were divided into smoking group and non-smoking group. The concentrations of IL-17, IL-6 and TNF- α in plasma were measured by ELISA within 24 hours after admission. 24 mice were randomly divided into 4 groups: control group, LPS group, LPS + a7nAChR agonists group, LPS + a7nAChR inhibitor group, 6 mice in each group. 1 hour before modeling, mice in LPS + a7nAChR agonists and LPS + a7nAChR inhibitor groups were intraperitoneally injected choline (10mg/kg) and α -Bungarotoxin (1 μ g/kg), respectively. The control group was given PBS solution through tracheal tube, and the other three groups were given LPS solution to establish mouse ARDS model. The mice were sacrificed 48 h later, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to detect the levels of IL-17, IL-6 and TNF- α . The lower left lung tissue was stained with HE and scored for lung injury. The wet/dry proportion of lung tissue was measured in the right lung, and the protein and mRNA levels of ROR γ T were measured in the upper left lung. **Results:** In enrolled ARDS patients, the levels of IL-17, IL-6 and TNF- α in plasma of smokers were significantly lower than those of non-smokers ($P < 0.05$). a7nAChR agonists decreased lung injury score and wet/dry ratio of lung tissue in ARDS/ALI mice, while a7nAChR inhibitor further increased lung injury score and wet/dry proportion of lung tissue in the ARDS/ALI mice ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of IL-17, IL-6 and TNF- α in BALF of ARDS/ALI mice were significantly increased, which were decreased by a7nAChR agonists while were further increased by a7nAChR inhibitor ($P < 0.05$). The protein and mRNA of ROR γ T expression in lung tissue of ARDS/ALI mice were signifi-

基金项目: 四川省南充市市校科技战略合作专项资金 (19SXHZ0056)

作者简介: 李孟秦 (1980 -), 女, 博士, 副主任医师。E-mail: 105623226@qq.com

通讯作者: 曹小平。E-mail: cxp@126.com

cantly upregulated when compared with control group, which was downregulated by a7nAChR agonists while further upregulated by while a7nAChR inhibitor ($P < 0.05$). **Conclusion:** Inhibition of a7nAChR may alleviate lung injury by reduce Th17 reactivity via inhibiting ROR γ t expression at both the transcriptional and translational levels.

【Key words】 Acute Respiratory Disease Syndrome (ARDS); Acute Lung Injury (ALI); a7Nicotinic Acetylcholine Receptors (a7nAChR); Interleukin17 (IL-17); Inflammation

急性呼吸窘迫综合征 (acute Respiratory disease syndrome, ARDS) 是由于各种肺内外因素导致的肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤。典型病理改变为弥漫性肺间质和肺泡水肿、肺实变, 顽固性低氧血症是典型临床表现^[1]。ARDS 的发病机制复杂, 炎症介导的损伤对其发生发展有重要作用。因此, 通过调节炎症反应治疗 ARDS 一直是临床及基础研究的方向之一, 但目前尚无确切有效的药物治疗方法^[2]。Th17 细胞是继 Th1、Th2 细胞之后适应性免疫应答的又一效应细胞, 是典型的促炎因子^[3], 可诱导 IL-6 和 TNF- α 表达。越来越多的研究^[4]发现, 胆碱能抗炎途径 (CAIP) 在肺损伤的调控中发挥重要作用。CAIP 是基于迷走神经递质 ACh 与免疫细胞的烟碱乙酰胆碱受体 (a7nAChR) 结合, 从而抑制促炎细胞因子的释放^[5]。正向调控 a7nAChR 可强有力抑制炎症, 有应用于治疗炎症性疾病治疗的前景, 如炎症性肠病、关节炎、哮喘^[6]。胆碱酯酶抑制剂导致的胆碱能神经兴奋能减少链脲霉素致糖尿病小鼠脾脏炎症因子合成及 Th17 分化^[7]。拟胆碱药物 α 7nACHR 激动剂是否能抑制 Th17 反应性, 从而减轻 ARDS 目前尚未见报道。本研究通过临床研究及动物实验探讨 a7nAChR 激动剂的肺保护作用及可能的机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 临床资料 选取 2019 年 9 月至 2021 年 9 月川北医学院附属医院急诊医学科收治的 44 例 ARDS 患者为研究对象, 依据吸烟史分为吸烟组 ($n = 30$) 和非吸烟组 ($n = 14$), 两组患者年龄比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$); 依据 ARDS 基础病因为肺内-ARDS 组 ($n = 31$) 与肺外-ARDS 组 ($n = 13$), 两组患者在吸烟组与非吸烟组的比例比较, 差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。纳入标准: 依据 2012 柏林定义诊断为 ARDS 的男性患者, 年龄 20 ~ 70 岁。排除标准: (1) 合并免疫缺陷的患者; (2) 肺结核活动期、肺癌、COPD 等慢性肺部疾病导致急性呼吸衰竭的患者。

1.1.2 实验动物 清洁级 6 ~ 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠, 体重约 20 g。购自川北医学院动物实验中心。

表 1 患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	吸烟组 ($n = 30$)	非吸烟组 ($n = 14$)
年龄	59.3 \pm 16.7	58.7 \pm 18.2
病因		
肺内-ARDS ($n = 31$)	21	10
肺外-ARDS ($n = 13$)	9	4

1.1.3 药物、试剂及主要仪器 LPS (索莱宝); SYBR RT-PCR 试剂盒 (宝生物工程公司); ELISA 试剂盒 (上海碧云天生物科技有限公司); β -actin 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 中国); 兔抗 ROR γ t (Abcam 公司, 英国); GTS-21 (MCE 公司, 美国); MLA (MCE 公司, 美国); choline (Fisher Scientific, 美国); α -bungarotoxin (sigma, 美国)。YS100 光学显微镜 (日本尼康株式会社); JYSCZ2 SDS-PAGE 蛋白电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统 (BIO-RAD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 患者血浆白介素 16 及 17 (IL-6、IL-17)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度检测 患者入院后 24 h 内抽取患者外周血, 采用 ELISA 法检测, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 实验动物分组、造模及标本收集 24 只小鼠随机分对照组、LPS 组、LPS + a7nAChR 激动剂组、LPS + a7nAChR 抑制剂组, 每组各 6 只。4% 水合氯醛 (约 0.1 mL/10 g) 小鼠麻醉后建立 ARDS 小鼠模型: 建立人工气道后, 通过气管导管对照组给予等体积 PBS 溶液, 其余 3 组小鼠给予缓慢推注 50 μ L 无菌 LPS 溶液 (浓度 1 μ g/ μ L, 总量 5 mg/kg)。建立 ARDS 模型前 1 h, LPS + a7nAChR 激动剂组小鼠予以腹腔注射 choline (10 mg/kg)、LPS + a7nAChR 抑制剂组小鼠予以腹腔注射 α -bungarotoxin (1 μ g/kg), 其余两组小鼠给予腹腔注射等体积 PBS 溶液。在建立 ARDS 模型后 48h 水合氯醛麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠, 行支气管肺泡灌洗, 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF)。打开胸腔, 剪取肺组织。

1.2.3 肺组织 HE 染色 分离左上肺组织, 10% 多聚甲醛固定过夜、包埋、切片、HE 染色。随机选取 5 个视野观察, 并依据美国胸科协会提出的肺损伤评分标准进行评分。

1.2.4 肺湿/干比重检测 取右肺组织, 放置于事先称重的 EP 管中称量肺湿重, 再将样本置于 80 $^{\circ}$ C 烤箱 48 h 至恒重后称其干重。然后计算肺湿/干比重。

1.2.5 小鼠炎症因子水平检测 将 BALF 离心,收集上清液,用 ELISA 法检测 BALF 中 IL-17、IL-6、TNF- α 水平。

1.2.6 RT-PCR 检测 提取左下肺组织 RNA,反转录后根据 RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 实验。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来测定 ROR γ t 基因相对表达量,内参为 β -actin,重复 3 次,取平均值。

1.2.7 Western blot 检测 提取左下肺组织总蛋白。根据 Western blot 试剂盒说明书进行电泳、转膜、封闭,采用抗 anti-ROR γ t(1:500)。二抗孵育后成像,计算灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验、单因素方差分析(ANOVA)或 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吸烟对 ARDS 患者血浆中 IL-17 水平的影响

吸烟组 ARDS 患者血浆中 IL-17 水平低于非吸烟组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

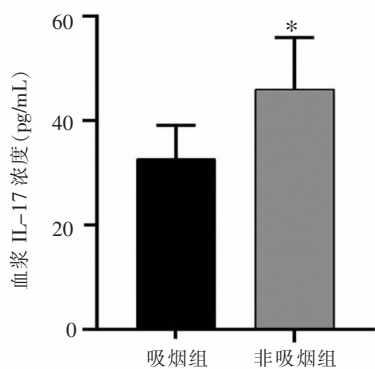


图 1 吸烟对 ARDS 患者血浆中 IL-17 水平的影响

* $P < 0.05$ 。

2.2 吸烟对 ARDS 患者血浆中 TNF- α 水平的影响

吸烟组 ARDS 患者血浆中 TNF- α 水平低于非吸烟组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

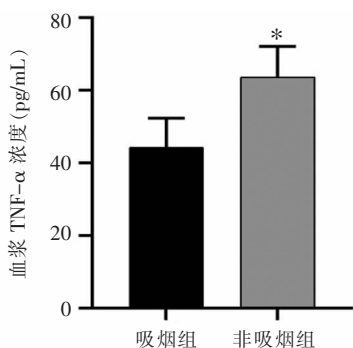


图 2 吸烟对 ARDS 患者血浆中 TNF- α 水平的影响

* $P < 0.05$ 。

2.3 吸烟对 ARDS 患者血浆中 IL-6 水平的影响

吸烟组 ARDS 患者血浆中 IL-6 水平低于非吸烟组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 a7nAChR 激动剂减轻 LPS 导致的小鼠急性肺损伤

与对照组相比,所有肺损伤小鼠均出现典型的急性肺损伤表现,包括肺泡水肿、肺泡间隔增厚及炎细胞浸润。对照组肺损伤评分低于其余 3 组($P < 0.05$),LPS + a7nAChR 激动剂组肺损伤评分低于 LPS 组($P < 0.05$),LPS + a7nAChR 阻断剂组肺损伤评分高于 LPS 组($P < 0.05$)。对照组肺组织湿/干比低于其余 3 组($P < 0.05$),LPS + a7nAChR 激动剂组肺组织湿/干比低于 LPS 组($P < 0.05$),LPS + a7nAChR 阻断剂组肺组织湿/干比高于 LPS 组($P < 0.05$)。见图 4、图 5 及图 6。

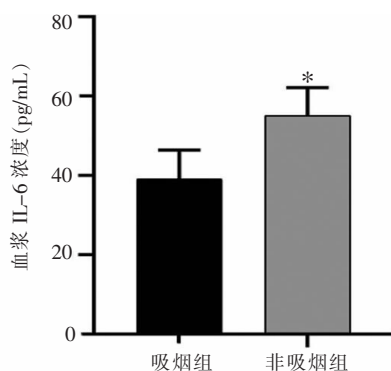
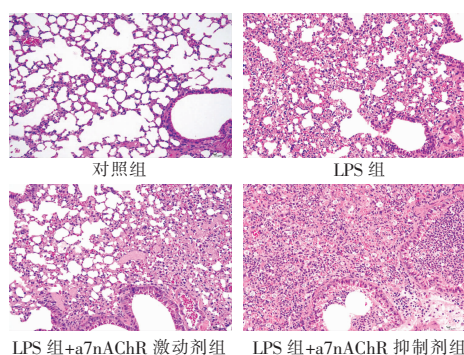


图 3 吸烟对 ARDS 患者血浆中 IL-6 水平的影响

* $P < 0.05$ 。



LPS 组+a7nAChR 激动剂组 LPS 组+a7nAChR 抑制剂组

图 4 肺组织 HE 染色 (200 \times)

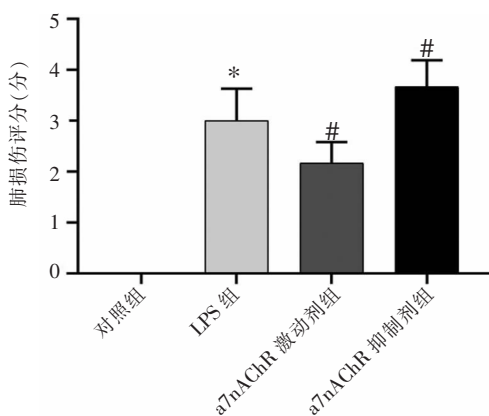


图 5 肺损伤程度评分

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与 LPS 组相比。

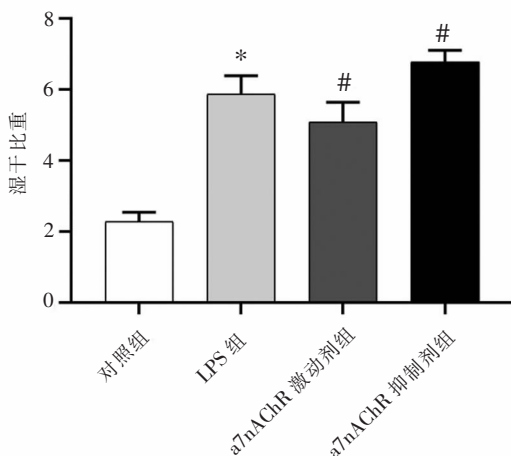


图 6 肺组织湿/干比重

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 LPS 组相比。

2.5 a7nAChR 激动剂减轻小鼠肺部炎症反应

以小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症因子

IL-17、IL-6、TNF- α 浓度评价肺部炎症反应水平, 结果显示, 对照组小鼠 BALF 中 IL-17、IL-6、TNF- α 浓度低于其余三组 ($P < 0.05$), LPS + a7nAChR 激动剂组小鼠 BALF 中 IL-17、IL-6、TNF- α 浓度低于 LPS 组 ($P < 0.05$), LPS + a7nAChR 阻断剂组小鼠 BALF 中 IL-17、IL-6、TNF- α 浓度高于 LPS 组 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.6 a7nAChR 激动剂下调小鼠肺组织 ROR γ t 蛋白及 mRNA 水平

对照组小鼠肺组织 ROR γ t 蛋白及 mRNA 水平低于其余三组 ($P < 0.05$), LPS + a7nAChR 激动剂组小鼠肺组织蛋白及 mRNA 水平低于 LPS 组 ($P < 0.05$), LPS + a7nAChR 阻断剂组小鼠肺组织 ROR γ t 蛋白及 mRNA 水平高于 LPS 组 ($P < 0.05$)。见图 8。

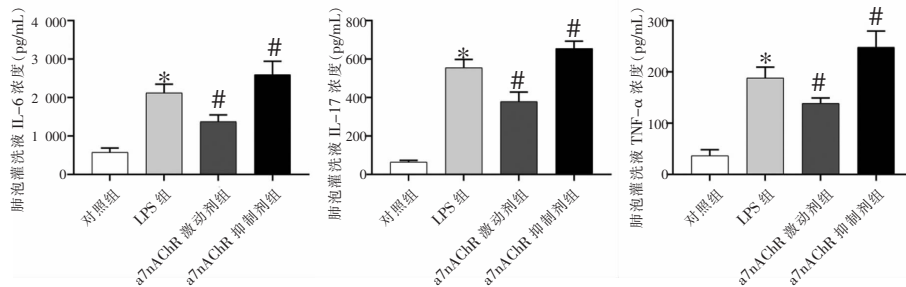


图 7 a7nAChR 激动剂减轻小鼠肺部炎症反应

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 LPS 组相比。

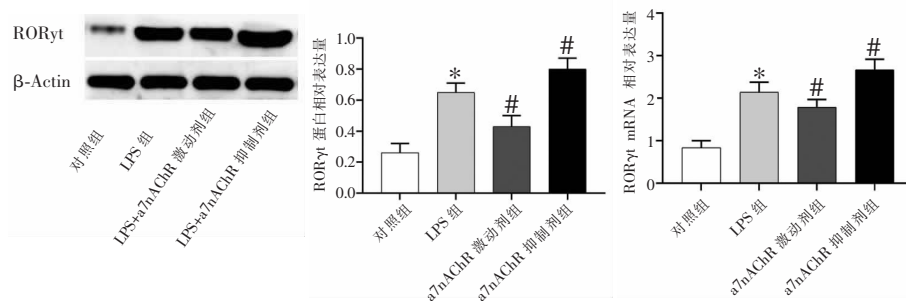


图 8 a7nAChR 激动剂下调小鼠肺组织 ROR γ t 蛋白及 mRNA 水平

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 LPS 组相比。

3 讨论

本研究发现, 在男性 ARDS 患者中, 吸烟者与非吸烟者相比, 外周血中 IL-17、IL-6、TNF- α 水平低于非吸烟者 ($P < 0.05$)。类似的研究还有炎性肠病患者结肠黏膜中吸烟者比非吸烟者细胞因子水平显著降低^[8], Guslandi M 发现尼古丁可有效治疗部分炎性肠病患者^[9], 表明 ARDS 患者外周血中 IL-17、IL-6、TNF- α 水平降低可能与烟碱受体兴奋有关。

动物实验研究^[10]发现, a7nAChR 激动剂可减轻 LPS 导致的小鼠肺损伤评分及肺组织湿/干比重

($P < 0.05$), 而抑制 a7nAChR 使小鼠肺损伤评分及组织湿/干比重增加 ($P < 0.05$), 与 Ravikumar A. Sitapara 等报道一致, 提示 a7nAChR 可能是干预 ARDS 的重要靶点。炎症反应已被证实在 ARDS 的发展中有重要作用^[11], IL-17、IL-6、TNF- α 均为重要的炎症因子。本研究发现, LPS 诱导的肺损伤小鼠 BALF 中炎症因子 IL-17、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$), a7nAChR 激动剂使其降低 ($P < 0.05$), 而 a7nAChR 抑制剂使其升高 ($P < 0.05$), 与脓毒症的相关研究^[12]一致, 说明 a7nAChR 激动剂可能通过下调炎症反应发挥肺保护作用。

Th17 细胞已被证实可促进中性粒细胞的募集,发挥强大的促炎作用^[13]。IL-17 是 Th17 细胞关键的效应分子之一,是典型的可诱导 IL-6 和 TNF- α 表达的促炎细胞因子^[14]。抑制 Th17 可减轻肺部炎症反应^[15],而 ROR γ t 是调控 Th17 细胞分化的重要转录因子^[16-18]。本研究发现,与对照组相比,肺损伤小鼠肺组织 ROR γ t 蛋白及 mRNA 水平均升高($P < 0.05$), $\alpha 7$ nAChR 激动剂可下调肺损伤小鼠肺组织 ROR γ t 蛋白及 mRNA 水($P < 0.05$),而 $\alpha 7$ nAChR 抑制剂进一步促进其表达($P < 0.05$),提示兴奋 $\alpha 7$ nAChR 可能通过在转录及翻译水平抑制 ROR γ t 表达,从而抑制 Th17 分化。

综上所述, $\alpha 7$ nAChR 可能是治疗 ARDS 的潜在靶点,兴奋 $\alpha 7$ nAChR 可能通过抑制 ROR γ t 表达,降低 Th17 细胞反应性,减轻炎症反应,从而发挥肺保护作用。

参考文献

- [1] 中华医学会重症医学分会.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南_2006[J].中国危重病急救医学,2006,18(12):706-710.
- [2] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and MortARDS/ALity for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries[J]. JAMA,2016,315(8):788-800.
- [3] Koenders MI, Joosten LA, van den Berg WB. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis[J]. Annals of the rheumatic diseases,2006,65(Suppl 3):29-33.
- [4] Wang L, Yi T, Kortylewski M, et al. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signARDS/ALIng pathway[J]. The Journal of experimental medicine,2009,206(7):1457-1464.
- [5] Enioutina EY, Myers EJ, Tvrđik P, et al. The nicotinic receptor Alpha7 impacts the mouse lung response to LPS through multiple mechanisms[J]. PloS one,2015,10(3):e0121128.
- [6] Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway[J]. The Journal of experimental medicine,2002,195(6):781-788.
- [7] 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.
- [8] Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, et al. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes[J]. Shock, 2006, 26(4):358-364.
- [9] George JA, Bashir G, Qureshi MM, et al. Cholinergic Stimulation Prevents the Development of Autoimmune Diabetes: Evidence for the Modulation of Th17 Effector Cells via an IFN γ -Dependent Mechanism[J]. Frontiers in immunology,2016,7(1):419.
- [10] Sher ME, Bank S, Greenberg R, et al. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease[J]. Inflammatory bowel diseases,1999,5(2):73-78.
- [11] Guslandi M. Nicotine treatment for ulcerative colitis[J]. British journal of clinical pharmacology,1999,48(4):481-484.
- [12] Sitapara RA, Gauthier AG, Valdés-Ferrer SI, et al. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, GTS-21, attenuates hyperoxia-induced acute inflammatory lung injury by alleviating the accumulation of HMGB1 in the airways and the circulation[J]. Molecular medicine (Cambridge, Mass),2020,26(1):63.
- [13] Meduri GU, Annane D, Chrousos GP, et al. Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy[J]. Chest,2009,136(6):1631-1643.
- [14] Kong W, Kang K, Gao Y, et al. GTS-21 Protected Against LPS-Induced Sepsis Myocardial Injury in Mice Through $\alpha 7$ nAChR[J]. Inflammation,2018,41(3):1073-1083.
- [15] Lo R S, Dumoutier L, Couillin I, et al. IL-17A-producing gamma delta T and Th17 lymphocytes mediate lung inflammation but not fibrosis in experimental silicosis[J]. Journal of immunology (Baltimore, Md ;1950),2010,184(11):6367-6377.
- [16] Hu Z, Luo D, Wang D, et al. IL-17 Activates the IL-6/STAT3 Signal Pathway in the Proliferation of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma[J]. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology,2017,43(6):2379-29230.
- [17] Zhao Y, zhang X Y, Song Z X, et al. Rapamycin attenuates acute lung injury induced by LPS through inhibition of Th17 cell proliferation in mice[J]. Scientific reports,2016,6(1):20156.
- [18] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells[J]. Cell,2006,126(6):1121-1133.

(收稿日期:2021-11-07

修回日期:2021-12-01)