

# 辛伐他汀预处理对大鼠神经源性肺水肿的作用及其机制

符 晖<sup>1</sup>, 王桥生<sup>1</sup>, 方志雄<sup>2</sup>, 刘 雁<sup>3</sup>, 周 斌<sup>3</sup>, 彭忠田<sup>1</sup>, 梁咸章<sup>1</sup>

(1. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湘潭市中心医院感染科, 湖南省湘潭市 411100;

3. 南华大学医学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 辛伐他汀; 神经源性肺水肿; 肺微血管内皮细胞

[摘要] **目的** 探讨辛伐他汀预处理对大鼠神经源性肺水肿(NPE)的作用及其可能的机制。**方法** SD 大鼠分为正常对照组、NPE 组、辛伐他汀 20 mg 组、辛伐他汀 40 mg 组, 辛伐他汀组大鼠分别给予 20 mg/(kg·d) 和 40 mg/(kg·d) 辛伐他汀灌胃 4 周。干预 4 周后, 除正常对照组大鼠外, 其余各组大鼠均采用小脑延髓池穿刺注射复制 NPE 模型。Kaplan-Meier 法比较各组大鼠 24 h 生存率。造模 6 h 后采用湿干比重法评估肺水肿程度、HE 染色观察肺组织病理变化。并取各组大鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC)进行原代培养, 流式细胞术观察 PMVEC 凋亡率, Western blot 和 RT-PCR 分别检测 PMVEC 的 Bax 和 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达。**结果** 与正常对照组相比, 造模后 6 h, NPE 组大鼠肺组织湿干比值显著增加, HE 染色可见明显的肺间质及肺泡水肿, 生存曲线结果显示大鼠生存率显著下降; NPE 组大鼠 PMVEC 凋亡率显著增加, Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达下调, Bax 蛋白和 mRNA 表达上调。与 NPE 组相比, 辛伐他汀 20 mg 组大鼠肺水肿减轻, 生存率改善, PMVEC 凋亡率降低, Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达上调, 而 Bax 蛋白和 mRNA 表达下调。与辛伐他汀 20 mg 组相比, 辛伐他汀 40 mg 组上述变化更显著。**结论** 辛伐他汀预处理可能通过上调 PMVEC 的 Bcl-2、下调 Bax mRNA 和蛋白表达, 抑制 PMVEC 凋亡, 减轻大鼠 NPE。提示辛伐他汀可能对 NPE 有防治作用, 但需临床进一步证实。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect and Potential Mechanisms of Simvastatin Pretreatment on Neurogenic Pulmonary Edema in Rats

FU Hui<sup>1</sup>, WANG Qiao-Sheng<sup>1</sup>, FANG Zhi-Xiong<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>3</sup>, ZHOU Bin<sup>3</sup>, PENG Zhong-Tian<sup>1</sup>, and LIANG Xian-Zhang<sup>1</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. The Central Hospital of Xiangtan City, Xiangtan, Hunan 411100, China; 3. Medical School of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Simvastatin; Neurogenic Pulmonary Edema; Pulmonary Microvascular Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and potential mechanisms of simvastatin pretreatment on neurogenic pulmonary edema (NPE) in rats. **Methods** The SD rats were randomly divided into control group, NPE group, simvastatin 20 mg group and simvastatin 40 mg group. The rats in the simvastatin group were pretreated with simvastatin for 4 weeks according to 20 mg/(kg·d) and 40 mg/(kg·d) by intragastric administration, respectively. The NPE models of rats except the control group were induced by cerebellomedullary cistern puncture after pretreatment of 4 weeks. The 24 h survival rates of rats were evaluated by Kaplan-Meier method. At 6 h following operation, the severity of pulmonary edema, lung tissue pathological changes of rats were evaluated by Wet Dry proportion method and HE staining, respectively. The apoptosis rate, protein and mRNA expressions of Bcl-2 and Bax of primary cultured PMVEC were detected by flow cytometry, Western blot and RT-PCR, respectively. **Results** Compared with the control group, the Wet Dry proportion of lung increased significantly, and the pulmonary interstitial edema and alveolar edema of the rats were obvious by HE staining and the apopto-

[收稿日期] 2015-03-24

[修回日期] 2015-08-26

[基金项目] 湖南省医药卫生科研计划项目(B2013-040); 湖南省科技计划项目(2014SK3088)

[作者简介] 符晖, 副主任医师, 副教授, 主要从事动脉粥样硬化及脓毒症的发病机制和防治研究, E-mail 为 13973417900@163.com。王桥生, 博士研究生, 主治医师, 主要从事脑水肿机制及防治和脓毒症机制研究。方志雄, 副主任医师, 主要从事感染性疾病的治疗、重型肝炎的人工肝治疗及肝癌的微创治疗。

sis rate of PMVEC increased significantly at 6 h following operation in the NPE group. The 24 h survival rates of rats in the NPE group decreased significantly. The protein and mRNA expressions of Bcl-2 of PMVEC were downregulated, but the protein and mRNA expressions of Bax were upregulated in the NPE group. While the severity of pulmonary edema and survival rates of the 20 mg/(kg · d) simvastatin pretreatment rats decreased significantly when compared with that of rats in the NPE group. And the apoptosis rate of PMVEC decreased in the 20 mg/(kg · d) simvastatin pretreatment rats. The protein and mRNA expressions of Bcl-2 in the PMVEC were upregulated; but the protein and mRNA expressions of Bax were downregulated in the simvastatin pretreatment rats. When compared with the 20 mg/(kg · d) simvastatin pretreatment rats, these parameters changes more significantly in the 40 mg/(kg · d) simvastatin pretreatment rats. **Conclusions** The study shows that simvastatin pretreatment decreases the severity of NPE and improves survival rate of rats. One of the mechanisms may decrease the apoptosis rate of PMVEC through upregulating the expression of Bcl-2 and downregulating the expression of Bax. It is implied that simvastatin may play a role in the prevention and treatment of NPE, but it needs to be further confirmed by clinical researchs.

神经源性肺水肿(neurogenic pulmonary edema, NPE)又称中枢性肺水肿,指在无原发性心、肺和肾等疾病的情况下,由颅脑损伤或中枢神经系统其他疾病引起的突发性颅内压增高而导致的急性肺水肿。其中部分中老年患者因脑动脉粥样硬化继发脑卒中,特别是脑出血、蛛网膜下腔出血可不同程度上并发NPE,严重者危及患者生命。目前NPE发生机制尚不清楚,缺乏防治措施。最近认为肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMVEC)凋亡参与了NPE形成<sup>[1-2]</sup>。研究发现,辛伐他汀除了其调脂、稳定粥样斑块外,还具有抗炎、调节免疫、抑制脓毒症等病因所致血管内皮细胞凋亡<sup>[3]</sup>,发挥血管内皮细胞保护作用<sup>[4-5]</sup>,其作用可能与调节Bcl-2、Bax表达有关。本研究拟通过辛伐他汀预处理NPE模型大鼠,检测PMVEC凋亡及Bcl-2、Bax表达变化,探讨辛伐他汀对NPE的防治作用及其相应机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验试剂

RNA提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit)和real-time qPCR试剂盒[SYBR® Premix Dimer-Eraser™ (Perfect Real Time)](大连TaKaRa公司);Bcl-2和Bax一抗(Abcam公司);β-actin一抗、羊抗兔二抗、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)连接的羊抗兔二抗(Proteintech公司);兔抗血小板内皮细胞黏附分子CD31(武汉博士德生物工程有限公司);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);辛伐他汀(每片20 mg,杭州默沙东制药有限公司)。

### 1.2 预处理分组

清洁级雄性SD大鼠购于湖南斯莱克景达动物有限公司,3~4月龄,体重200~250 g。按照随机数字法分为四组:正常对照组、NPE组、辛伐他汀20 mg组和辛伐他汀40 mg组,每组31只。辛伐他汀20 mg组和辛伐他汀40 mg组大鼠在复制NPE模型前分别予辛伐他汀20 mg/(kg · d)和40 mg/(kg · d)灌胃4周,正常对照组与NPE组只予正常进食进水。

### 1.3 大鼠NPE模型制备

NPE组、辛伐他汀20 mg组和辛伐他汀40 mg组大鼠预处理4周后复制大鼠NPE模型。正常对照组不予造模。参考小脑延髓池穿刺法复制NPE模型<sup>[6]</sup>,实验大鼠术前12 h禁食但不禁水,10%水合氯醛300 mg/kg腹腔注射进行麻醉固定,麻醉后气管切开行气管插管,用1 mL注射器从枕骨粗隆下0.6~0.7 cm进针,进针深度1.0~1.5 cm,穿刺进入小脑延髓池;穿刺针进入小脑延髓池后即刻在大鼠脑池内注射纤维蛋白原(100 g/L)和凝血酶(200 kU/L)各0.075 mL。

### 1.4 肺水肿程度观察及大鼠生存率、肺组织湿干比值计算

造模成功后,每组15只大鼠,记录各组大鼠生存时间,绘制生存曲线,比较各组大鼠24 h生存率。造模后6 h后随机选取大鼠,每组3只,取肺组织置于10%中性甲醛固定,常规石蜡切片,HE染色,光镜下进行病理学观察肺组织病理改变。肺组织湿干比值(wet-weight/dry-weight ratio, W/D)评估肺水肿程度,先结扎气管以免液体外溢,将肺和心脏一起取出,剪除心脏和其它脂肪组织,用滤纸吸去肺表面的液体,用吸水纸吸干表面水分,称湿重后置60℃烤箱中,72 h后称干重,计算W/D。

### 1.5 大鼠 PMVEC 原代培养与鉴定

参考文献[7],将 PBS 清洗后的肺边缘组织剪成 2~3 mm<sup>3</sup> 大小组织块,使组织块贴于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,倒置培养瓶于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 2~3 h,之后正置培养瓶继续培养。培养若干天后,待组织块周围的细胞达到较高密度。将细胞制成悬液后转入培养瓶中继续培养。实验前一天将细胞以 5×10<sup>4</sup> 的数量接种于需要的 24 孔板中,加培养基进行培养。吸弃培养基,相继予 4% 多聚甲醛固定 10~20 min,1% Triton X-100 穿透 20 min,5% BSA 封闭 30 min。PBS 振洗 1 次后,加入 1:100 稀释的兔抗大鼠 CD31 一抗,4℃ 冰箱孵育过夜;PBS 振洗 3 次后,加入 1:50 稀释的 FITC 标记的二抗,孵育 1 h。置于荧光倒置显微镜下观察各组细胞染色情况。阴性对照组细胞用 5% BSA 代替 CD31 一抗孵育,二抗正常孵育。鉴定标准:①细胞为多边形,单层汇合呈典型的“铺路石样”排列,接触抑制;② FITC 标记的植物凝集素结合实验阳性。

### 1.6 流式细胞术检测 PMVEC 凋亡

细胞予 0.25% 胰蛋白酶消化后,用完全培养基中和胰酶,转入 15 mL 离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 吹打清洗一次,1000 r/min 离心 5 min 后弃上清。按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒操作步骤检测各组细胞凋亡情况。

### 1.7 Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,4℃、12000 r/min 离心 5 min,取上清液,Bradford 法测定蛋白浓度。计算含 20 μg 总蛋白的溶液体积作为上样量,进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。Bax 和 Bcl-2 一抗室温孵育 2 h 后 4℃ 过夜,HRP 标记的二抗室温孵育 1 h 后,加显色液发光,显影定影。将胶片扫描后用图像分析软件 IPP6.0 进行各条带的灰度值测定,以目的条带与内参 β-actin 的比值作为半定量依据,每组重复 3 次。

### 1.8 RT-PCR 检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达

Trizol 法提取总 RNA 并定量,具体按照试剂盒说明进行。取总 RNA 2 μg 进行逆转录反应,合成 cDNA。加入 cDNA 1 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、2×SYBR Green qPCR Mix 10 μL 及 ddH<sub>2</sub>O 7 μL,总体积 20 μL 进行扩增 Bax、Bcl-2 和 β-actin。两步法 Real-time 定量,95℃ 预变性 3 min,之后每一步变性 95℃、10 s,58℃ 退火延伸 30 s;共进行 28 个循环,每次在延伸阶段读取荧光值。引物序列及扩增片段长度分别为: Bcl-2 上游引物 5'-CCG GGA CGC GAA GTG CTA TT-3',下游引物 5'-CGA CGG

TAG CGA CGA GAG AAG T-3',扩增片段长度为 368 bp;Bax 上游引物 5'-CGG GTC CGG GGA TCA TCT C-3',下游引物 5'-AGG GCC TTG AGC ACC AGT TTG-3',扩增片段长度为 369 bp;β-actin 上游引物 5'-CCG GGA CGC GAA GTG CTA TT-3',下游引物 5'-CGA CGG TAG CGA CGA GAG AAG T-3',扩增片段长度为 558 bp。2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的相对表达量。

### 1.9 统计学方法

所有数据使用 SPSS 20.0 软件进行处理。正态分布计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示;One Way ANOVA 进行比较,组间多重比较采用 LSK 法;Kaplan-Meier 法比较各组生存率;以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠生存率比较

正常对照组大鼠 24 h 生存率为 100%,NPE 组为 30%,辛伐他汀 20 mg 组和辛伐他汀 40 mg 组大鼠生存率分别为 60% 和 80%。与 NPE 组相比,辛伐他汀 20 mg 组和辛伐他汀 40 mg 组大鼠生存率改善( $P = 0.046$  和  $P = 0.003$ );而辛伐他汀 20 mg 组和辛伐他汀 40 mg 组大鼠生存率无显著差别( $P = 0.055$ ;图 1)。

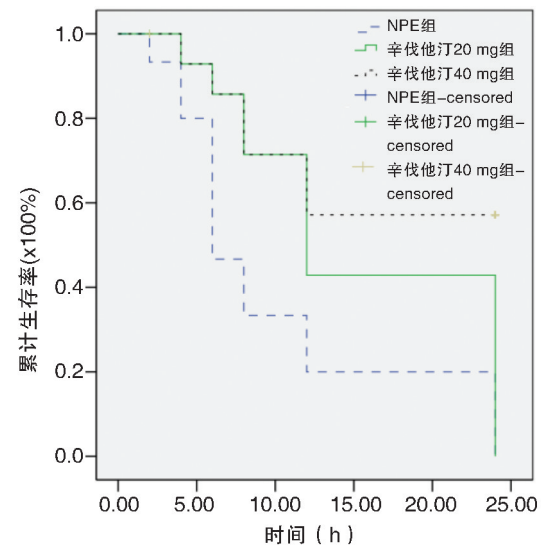


图 1. 各组大鼠生存率比较

Figure 1. The comparison of survival rates in each group

### 2.2 大鼠肺组织 W/D 比较

与正常对照组相比,NPE 组大鼠肺组织 W/D 明显增加( $P = 0.000$ );与 NPE 组相比,辛伐他汀 20



mg 组和辛伐他汀 40 mg 组大鼠肺组织 W/D 降低 ( $P=0.000$ ); 辛伐他汀 40 mg 组大鼠肺组织 W/D 比辛伐他汀 20 mg 组减低 ( $P=0.028$ ; 表 1)。

2.3 肺组织 HE 染色

正常对照组大鼠肺组织及肺泡结构正常。NPE 组大鼠肺间质增厚, 肺泡内可见大量均一的水肿液。与 NPE 组相比, 辛伐他汀 20 mg 组和辛伐他汀 40 mg 组主要以肺间质水肿为主, 肺泡水肿液减少, 辛伐他汀 40 mg 组减少更明显 (图 2)。

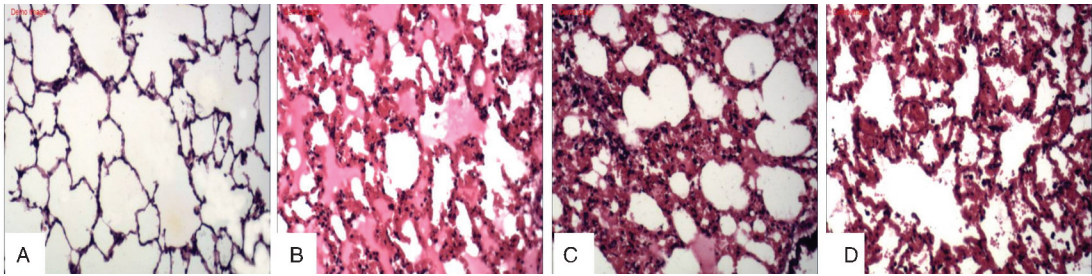


图 2. 各组大鼠肺组织 HE 染色 (×200)      A 为正常对照组, B 为 NPE 组, C 为辛伐他汀 20 mg 组, D 为辛伐他汀 40 mg 组。  
Figure 2. HE staining of rats pulmonary tissue in each group (×200)

2.4 大鼠 PMVEC 的鉴定及生长情况

荧光显微镜下可见均一染成绿色的 PMVEC, 阴性对照组未见特异性染色 (图 3)。正常对照组大鼠

表 1. 各组大鼠肺组织 W/D ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1. The lung tissue W/D of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	肺组织 W/D
正常对照组	10	3.22 ± 0.37
NPE 组	10	5.92 ± 0.35 <sup>a</sup>
辛伐他汀 20 mg 组	10	4.48 ± 0.69 <sup>b</sup>
辛伐他汀 40 mg 组	10	4.01 ± 0.59 <sup>bc</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 NPE 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与辛伐他汀 20 mg 组比较。

PMVEC 生长密集, 而 NPE 组 PMVEC 稀少, 辛伐他汀预处理后 PMVEC 较 NPE 组明显增加, 细胞生长良好 (图 3)。

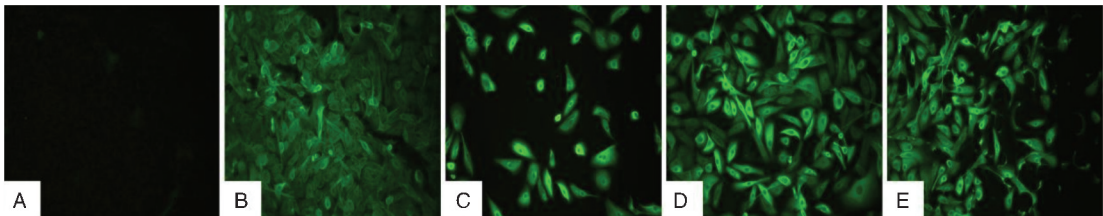


图 3. 各组 PMVEC 的鉴定及生长情况 (×400)      A 为阴性对照组, B 为正常对照组, C 为 NPE 组, D 为辛伐他汀 20 mg 组, E 为辛伐他汀 40 mg 组。  
Figure 3. The identification and growth of PMVEC in each group (×400)

2.5 PMVEC 凋亡率比较

与正常对照组相比, NPE 组 PMVEC 凋亡率显著增高 ( $P<0.05$ ); 与 NPE 组相比, 辛伐他汀 20 mg 组和辛伐他汀 40 mg 组 PMVEC 凋亡率显著降低 ( $P<0.05$ ), 其中, 辛伐他汀 40 mg 组 PMVEC 凋亡率低于辛伐他汀 20 mg 组 ( $P<0.05$ ; 表 2)。

2.6 PMVEC 的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

与正常对照组相比, NPE 组 PMVEC 的 Bcl-2 蛋白降低 ( $P<0.05$ ), Bax 蛋白表达增高 ( $P<0.05$ ); 而辛伐他汀预处理后, 两者呈反向改变; 与辛伐他汀 20 mg 组相比, 辛伐他汀 40 mg 组 PMVEC 的 Bcl-2 蛋白表达增高 ( $P<0.05$ ), 而 Bax 蛋白表达降低

( $P<0.05$ ; 图 4)。

表 2. 各组 PMVEC 凋亡率 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2. The apoptosis rate of PMVEC in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	凋亡率
正常对照组	3	2.73% ± 0.32%
NPE 组	3	22.03% ± 3.01% <sup>a</sup>
辛伐他汀 20 mg 组	3	15.70% ± 1.35% <sup>b</sup>
辛伐他汀 40 mg 组	3	12.03% ± 1.39% <sup>bc</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与正常对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 NPE 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与辛伐他汀 20 mg 组比较。

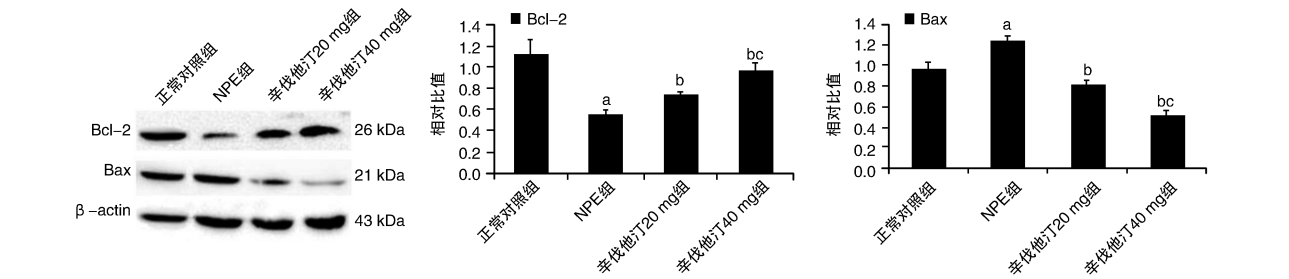


图 4. 各组 PMVEC 的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达
 a 为  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 NPE 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与辛伐他汀 20 mg 组比较。

Figure 4. The expression of Bcl-2 and Bax proteins of PMVEC in each group

2.7 PMVEC 的 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达

辛伐他汀 20 mg 组和辛伐他汀 40 mg 组 PMVEC 的 Bcl-2 mRNA 表达较 NPE 组增高 ( $P < 0.05$ ), 且辛伐他汀 40 mg 组 PMVEC 的 Bcl-2 mRNA 表达较辛伐他汀 20 mg 组亦有增高, 但无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。而与 NPE 组相比, 辛伐他汀 20 mg 组和辛伐他汀 40 mg 组 Bax mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ), 且辛伐他汀 40 mg 组 Bax mRNA 表达较辛伐他汀 20 mg 组降低 ( $P < 0.05$ ; 图 5)。

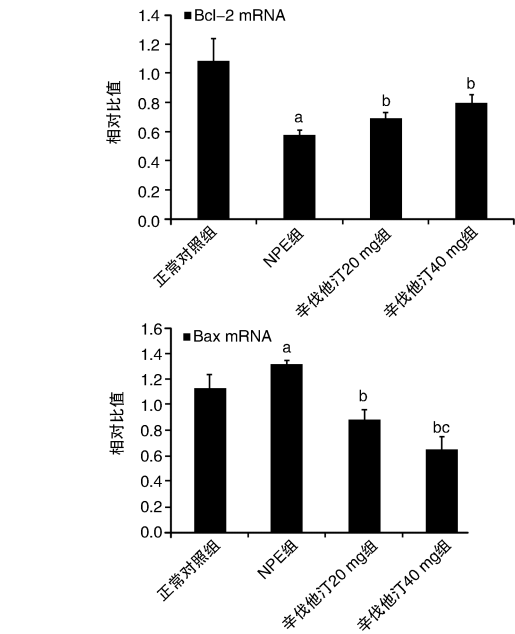


图 5. 各组 PMVEC 的 Bcl-2 和 Bax mRNA 相对表达
 a 为  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 NPE 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与辛伐他汀 20 mg 组比较。

Figure 5. The expressions of Bcl-2 and Bax mRNA of PMVEC in each group

3 讨论

NPE 是一种特殊类型的肺水肿, 发生机制较复

杂, 其机制之一是神经中枢局部和继发的全身系统炎症反应, 大量的细胞因子、趋化因子、神经肽物质 P 等释放, 导致肺血管内皮通透性增加, 诱发肺水肿<sup>[8]</sup>。研究发现, 辛伐他汀预处理可降低血浆及支气管灌洗液 P-选择素所致的白细胞黏附、渗透、浸润以及降低氧自由基<sup>[9]</sup>, 降低肺血管内皮细胞的渗透性<sup>[10]</sup>, 从而减轻内毒素所致肺损伤和肺水肿<sup>[11-12]</sup>; 可降低肺血管及肺泡通透性<sup>[13]</sup>; 可通过增加谷胱甘肽、降低髓样过氧化物酶, 进而减轻氧合应激及炎症反应<sup>[14]</sup>。张莉等<sup>[15]</sup>发现辛伐他汀不仅能保护内毒素所致急性肺损伤, 而且干预效果与剂量有关。本研究结果发现, 辛伐他汀预处理后肺组织 W/D 明显下降, 肺水肿程度明显减轻, 生存率从 30% 上升到 60% ~ 80% 以上。提示辛伐他汀预处理可减轻肺组织炎症反应, 改善大鼠生存率。同时辛伐他汀 40 mg/(kg · d) 预处理较 20 mg/(kg · d) 预处理肺组织 W/D 有显著降低, 肺水肿显著减轻, 提示其对抗肺水肿的作用效果呈一定的剂量依赖性。

研究已证实, 辛伐他汀可通过调节不同组织细胞的 Bcl-2 及 Bax 基因的表达从而抑制相应细胞凋亡。车忠应等<sup>[16]</sup>发现辛伐他汀预处理可上调心肌组织 Bcl-2、下调 Bax 表达, 抑制心肌细胞凋亡, 减少心肌梗死面积。另有研究发现辛伐他汀可上调 Bcl-2 的表达和抑制 Caspase-3 表达, 减少神经细胞凋亡, 发挥神经保护作用<sup>[17]</sup>。辛伐他汀还可以通过调节 Bcl-2/Bax 来抑制细胞凋亡, 对视网膜缺血再灌注损伤发挥保护作用<sup>[18]</sup>。我们在先前研究中发现辛伐他汀可调节人脐静脉血管内皮细胞 Bcl-2 和 Bax 基因的 mRNA 和蛋白表达, 抑制其凋亡<sup>[19]</sup>。

辛伐他汀抑制细胞凋亡机制比较复杂, 除了通过调节 Bcl-2/Bax 表达以及 Caspase-3 途径抑制细胞凋亡外, 还可以通过下调 TNF-α/NF-κB 通路表达<sup>[20]</sup>; 亦有研究发现下调 TNF-α, 增加沉默信息调节因子 1 表达, 抑制内皮祖细胞凋亡<sup>[21]</sup>; 以及抗氧

化作用等机制抑制细胞凋亡<sup>[22]</sup>。我们在另一项研究中发现辛伐他汀预处理可抑制 PPAR- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路,下调 iNOS mRNA 和蛋白的表达,保护内皮细胞,改善脓毒症大鼠血管收缩<sup>[23]</sup>。

NPE 除了肺组织的炎症反应机制外,近年来发现 PMVEC 凋亡可能参与了中枢所致肺损伤<sup>[1-2]</sup>。本次研究结果亦证实 NPE 存在明显的 PMVEC 凋亡,同时显示辛伐他汀预处理可通过调节 PMVEC Bcl-2 及 Bax 蛋白和 mRNA 的表达,显著减少 NPE 大鼠 PMVEC 凋亡,改善内皮细胞活性,证实了辛伐他汀抗凋亡作用及 NPE 的防治作用。并且,与辛伐他汀 20 mg/(kg · d) 预处理相比,辛伐他汀 40 mg/(kg · d) 预处理后 PMVEC 凋亡更少。遗憾的是随剂量增加,虽肺水肿及内皮细胞凋亡有明显改善,但大鼠生存率不再继续明显改善,提示 NPE 可能仅仅是全身性疾病的一个方面,不能单纯防治 NPE 而忽视其他器官功能的维护。

总之,本研究通过辛伐他汀干预后的大鼠行 PMVEC 原代培养观察内皮细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 的表达变化,探讨辛伐他汀对 NPE 的作用。论证了辛伐他汀预处理可通过上调大鼠 PMVEC 的 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达,下调 Bax mRNA 和蛋白表达,抑制 PMVEC 凋亡,降低大鼠 NPE 严重程度,改善大鼠生存活性。本研究提示辛伐他汀对 NPE 有防治作用,如临床研究能进一步证实,将对成人颅脑疾病及小儿重症手足口病所致 NPE 的防治具有重要的临床意义。

## [参考文献]

- [1] Suzuki H, Sozen T, Hasegawa Y, et al. Caspase-1 inhibitor prevents neurogenic pulmonary edema after subarachnoid hemorrhage in mice[J]. *Stroke*, 2009, 40 (12): 3 872-875.
- [2] Suzuki H, Sozen T, Hasegawa Y, et al. Subarachnoid hemorrhage causes pulmonary endothelial cell apoptosis and neurogenic pulmonary edema in mice [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 111: 129-132.
- [3] 徐茂凤,李永杰,王婉丽. 辛伐他汀抑制高糖诱导人脐静脉内皮细胞的凋亡[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15 (41): 7 726-729.
- [4] 李敏芝,李敏,田东莲,等. 辛伐他汀对脓毒症大鼠内皮细胞功能的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2011, 31 (4): 500-502.
- [5] La Mura V, Pasarín M, Meireles CZ, et al. Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction [J]. *Hepatology*, 2013, 57 (3): 1 172-181.
- [6] Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y, et al. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats[J]. *Crit Care Med*, 2001, 29 (6): 1 222-228.

- [7] 李颖川,江伟,周明,等. 大鼠肺微血管内皮细胞原代培养方法的改进及细胞鉴定[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2010, 30 (11): 1 440-443.
- [8] Baumann A, Audibert G, McDonnell J, et al. Neurogenic pulmonary edema[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2007, 51 (4): 447-455.
- [9] Pirat A, Zeyneloglu P, Aldemir D, et al. Pretreatment with simvastatin reduces lung injury related to intestinal ischemia-reperfusion in rats[J]. *Anesth Analg*, 2006, 102 (1): 225-232.
- [10] Müller HC, Hellwig K, Rosseau S, et al. Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice[J]. *Crit Care*, 2010, 14 (4): R143.
- [11] Grommes JI, Vijayan S, Drechsler M, et al. Simvastatin reduces endotoxin-induced acute lung injury by decreasing neutrophil recruitment and radical formation [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (6): e38917.
- [12] Shyamsundar M, McKeown ST, OKane CM, et al. Simvastatin decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in healthy volunteers[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179 (12): 1 107-114.
- [13] 霍雯,赵文静,宋海刚,等. 长期服用辛伐他汀对机械通气肺损伤大鼠肺湿/干重比与蛋白含量的影响[J]. *徐州医学院学报*, 2013, 33 (6): 375-377.
- [14] Altintas ND, Atilla P, Iskit AB, et al. Long-term simvastatin attenuates lung injury and oxidative stress in murine acute lung injury models induced by oleic acid and endotoxin[J]. *Respir Care*, 2011, 56 (8): 1 156-163.
- [15] 张莉,王文军,代丽,等. 辛伐他汀对急性肺损伤大鼠的保护作用及其机制研究[J]. *中国急救医学*, 2013, 33 (10): 948-950.
- [16] 车忠应,陈还珍. 辛伐他汀预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6 (2): 26-27.
- [17] Sun J, Xie C, Liu W, et al. The effects of simvastatin on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following kainate-induced seizures in rats[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30 (4): 739-746.
- [18] 张玉,颜华. 辛伐他汀对大鼠视网膜缺血再灌注中 Bcl-2 和 Bax 表达及细胞凋亡的影响[J]. *中华眼科杂志*, 2014, 50 (11): 826-832.
- [19] 符晖,罗琼,谭思,等. 辛伐他汀对脓毒症内皮细胞的保护作用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2013, 22 (9): 994-999.
- [20] Zhao G, Yu YM, Kaneki M, et al. Simvastatin reduces burn injury-induced splenic apoptosis via downregulation of the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Ann Surg*, 2015, 261 (5): 1 006-012.
- [21] Du G, Song Y, Zhang T, et al. Simvastatin attenuates TNF $\alpha$  induced apoptosis in endothelial progenitor cells via the upregulation of SIRT1[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34 (1): 177-182.
- [22] 赵彬,徐海龙,潘雷,等. 辛伐他汀减少三磷酸甘油醛脱氢酶的聚集及神经元凋亡[J]. *卒中与神经疾病*, 2013, 20 (1): 23-26.
- [23] 符晖,张敏,王桥生,等. 辛伐他汀改善脓毒症大鼠血管收缩功能[J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24 (9): 1 000-003.

(此文编辑 文玉珊)