

# Chromofungin 抑制 TNF- $\alpha$ 诱导血管内皮通透性增加的钙信号机制

罗丽 张丹 古妮娜 魏伏 陈晓迎 姜丽萍 蔡国强 刘景仑

**【摘要】目的** 探讨嗜铬粒蛋白 A (chromogranin A, CGA) 衍生多肽 Chromofungin (CHR) 对肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导血管内皮细胞钙内流的影响。**方法** 以人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926 细胞为研究对象, 建立 TNF- $\alpha$  刺激炎症模型, 实验分为对照组、TNF- $\alpha$  组、10 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$  组、100 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$  组和 1 000 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$  组。Transwell 小室法检测 EA.hy926 细胞通透性, 激光共聚焦法检测 EA.hy926 细胞内钙离子浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 的变化。**结果** 与对照组比较, TNF- $\alpha$  组明显增加 EA.hy926 细胞通透性 [ $(1.189 \pm 0.086)$  vs.  $(1.771 \pm 0.195)$ ,  $t = 4.343$ ,  $P = 0.01$ ]; 10 nmol/L、100 nmol/L 和 1 000 nmol/L CHR 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 EA.hy926 细胞通透性增加, 其中 10 nmol/L 和 100 nmol/L CHR 显著降低 TNF- $\alpha$  诱导的 EA.hy926 细胞高通透性 [ $(1.771 \pm 0.195)$  vs.  $(1.315 \pm 0.134)$ ,  $t = 3.403$ ,  $P = 0.042$ ;  $(1.771 \pm 0.195)$  vs.  $(1.236 \pm 0.181)$ ,  $t = 3.985$ ,  $P = 0.017$ ], 1 000 nmol/L CHR 降低 TNF- $\alpha$  诱导的 EA.hy926 细胞高通透性, 差异无统计学意义 [ $(1.771 \pm 0.195)$  vs.  $(1.411 \pm 0.255)$ ,  $t = 2.679$ ,  $P = 0.126$ ]。10 nmol/L、100 nmol/L 和 1 000 nmol/L CHR 作用于 EA.hy926 细胞时细胞内  $Ca^{2+}$  浓度无明显变化。TNF- $\alpha$  诱导 EA.hy926 细胞外  $Ca^{2+}$  快速内流, 各时间点细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度  $F_{40}$ 、 $F_{100}$  与起始荧光值  $F_{30}$  比较, 差异具有统计学意义 [荧光强度分别为:  $(41.497 \pm 3.788)$  vs.  $(56.193 \pm 3.082)$ ,  $F = 196.129$ ,  $P = 0.000$ ;  $(41.497 \pm 3.788)$  vs.  $(53.457 \pm 4.536)$ ,  $F = 101.19$ ,  $P = 0.000$ ], 10 nmol/L、100 nmol/L 和 1 000 nmol/L CHR 能够抑制 TNF- $\alpha$  引起的  $Ca^{2+}$  快速内流。**结论** CHR 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 EA.hy926 细胞通透性增加, 这一作用可能是通过阻止 TNF- $\alpha$  诱导的细胞外  $Ca^{2+}$  内流来实现的。

**【关键词】** 血管内皮细胞; EA.hy926 细胞; 钙; 嗜铬粒蛋白 A; Chromofungin; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**Chromofungin inhibits TNF- $\alpha$ -induced vascular endothelial permeability increase by calcium signal pathway mechanism** Luo Li, Zhang Dan, Gu Nina, Wei Fu, Chen Xiaoying, Jiang Liping, Cai Guoqiang, Liu Jinglun. Department of Emergency & Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Zhang Dan, Email: doctor\_zhangdan@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the influence of Chromogranin A (CGA) derived-peptide chromofungin (CHR) on calcium influx of vascular endothelial cells induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). **Methods** Human umbilical vein endothelial cell line (EA.hy926) was employed as the research object. EA.hy926 cells inflammation model was built by stimulation of TNF- $\alpha$ . The experimental was composed of control group, TNF- $\alpha$  stimulation group, 10 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$  group, 100 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$  and 1 000 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$  group. The monolayer permeability of EA.hy926 cells was measured by Transwell method. The change of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in EA.hy926 cells was assessed by laser scanning confocal microscope. **Results** Compared with the control

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.07.011

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81071531, 81372102); 2009 年重庆市自然科学基金面上项目 (CSTC 2009BB5066)

作者单位: 400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院重症医学科 (罗丽、张丹、古妮娜、魏伏、陈晓迎、姜丽萍、蔡国强、刘景仑); 垫江县中医院重症医学科 (蔡国强)

通信作者: 张丹, Email: doctor\_zhangdan@126.com

group, the permeability of EA.hy926 cells increased significantly in TNF- $\alpha$  group [ (1.189  $\pm$  0.086) vs. (1.77  $\pm$  0.195),  $t=4.343$ ,  $P=0.01$ ]. The concentrations of 10 nmol/L, 100 nmol/L and 1 000 nmol/L CHR could inhibit the hyperpermeability induced by TNF- $\alpha$  in EA.hy926 cells; in that, 10 nmol/L and 100 nmol/L CHR decreased significantly the hyperpermeability of EA.hy926 cells induced by TNF- $\alpha$  [ (1.771  $\pm$  0.195) vs. (1.315  $\pm$  0.134),  $t=3.403$ ,  $P=0.042$ ; (1.771  $\pm$  0.195) vs. (1.236  $\pm$  0.181),  $t=3.985$ ,  $P=0.017$ ]. And 1 000 nmol/L CHR decreased the hyperpermeability of EA.hy926 cells induced by TNF- $\alpha$ , but there was no statistically significant difference in comparison with 10 nmol/L and 100 nmol/L [ (1.771  $\pm$  0.195) vs. (1.411  $\pm$  0.255),  $t=2.679$ ,  $P=0.126$ ]. The different concentrations of 10 nmol/L, 100 nmol/L and 1 000 nmol/L CHR couldn't induce a significantly different intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in EA.hy926 cells. The exposure to 22 ng/mL TNF- $\alpha$  could evoke a rapid Ca<sup>2+</sup> entry in EA.hy926 cells, and the comparison of the Ca<sup>2+</sup> fluorescence intensity at different intervals showed that F<sub>40</sub> and F<sub>100</sub> were significantly different to initial fluorescence intensity F<sub>30</sub> [ (41.497  $\pm$  3.788) vs. (56.193  $\pm$  3.082),  $F=196.129$ ,  $P=0.000$ ; (41.497  $\pm$  3.788) vs. (53.457  $\pm$  4.536),  $F=101.19$ ,  $P=0.000$ ], and 10 nmol/L, 100 nmol/L and 1 000 nmol/L CHR could inhibit TNF- $\alpha$  induced rapid Ca<sup>2+</sup> influx. **Conclusions** CHR could inhibit the TNF- $\alpha$  induced hyperpermeability in EA.hy926 cells likely by blocking TNF- $\alpha$  evoking extracellular Ca<sup>2+</sup> entry into cells.

**[Key words]** Vascular endothelial cells; EAhy926 cells; Calcium; Chromogranin A; Chromofungin; Tumor necrosis factor alpha

脓毒症时机体分泌多种炎症因子,如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、缓激肽等,可引起血管内皮细胞通透性增加<sup>[1-2]</sup>。血管内皮细胞通透性增加可导致微循环障碍,组织水肿,有效循环血容量下降,最终可能导致多器官功能障碍甚至死亡<sup>[3]</sup>。到目前为止脓毒症中血管内皮细胞通透性增加的机体自身调节机制尚未完全阐明。

脓毒症时交感-肾上腺轴的激活可诱发交感神经兴奋,肾上腺髓质分泌大量嗜铬粒蛋白 A (chromogranin A, CGA), CGA 是肾上腺髓质含量丰富的激素原蛋白之一。CGA 具有多种生物学功能,如对心肌的负性调节作用,调节分泌小泡形成,参与高血压调节机制等<sup>[4-5]</sup>。CGA 的 NH<sub>2</sub>-端 CGA<sub>1-76</sub> 具有重要的心血管调节作用,同时 CGA<sub>1-76</sub> 对 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞通透性增加具有一定的调节作用<sup>[6-7]</sup>。已知 TNF- $\alpha$  引起血管内皮细胞通透性改变与诱导细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流密切相关, CGA<sub>47-66</sub> (chromofungin, CHR) 作为 CGA<sub>1-76</sub> 的重要功能基因,是否参与血管内皮细胞钙信号的调节而改变炎症状态下的血管通透性尚未有研究。本研究旨在明确 CHR 是否能够通过钙信号途径而影响 TNF- $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞通透性增加。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂和材料

人工合成多肽 CHR 由上海科肽生物科技有限

公司合成(上海,中国)。人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926 购买自上海汉恒生物有限公司(上海,中国)。胎牛血清、RPMI-1640 培养基购买自 Hyclone 公司(洛根,美国)。钙离子荧光探针 Fluo-3 AM、TMB 显色液购买自上海碧云天生物技术有限公司(上海,中国)。重组人 TNF- $\alpha$ 、辣根过氧化物酶(HRP)购买自 Sigma 公司(阿宾顿,英国)。Transwell 小室购买自 Millipore 公司(麻省,美国)。

### 1.2 细胞培养

EA.hy926 细胞由含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶消化后种植于培养瓶内,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.3 Transwell 小室法检测 CHR 对 EA.hy926 细胞通透性的影响

取 300  $\mu$ L 密度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的 EA.hy926 细胞悬液,接种于 Transwell 小室上室,培养 24 h 至细胞融合为单层。上室加入不同浓度 CHR (10 nmol/L、100 nmol/L 和 1 000 nmol/L) 预处理 30 min 后加入 22 ng/mL TNF- $\alpha$ , 培养 24 h。PBS 洗涤细胞 3 次,在上室加入含 HRP (50 mg/L) 的 PBS 300  $\mu$ L, 下室加入 PBS 300  $\mu$ L, 2 min 后收集下室液体 10  $\mu$ L/孔移至 96 孔板,加入 200  $\mu$ L TMB 显色液。15 min 后用酶标仪(波长 490 nm)测定的吸光度 A 值即表示细胞相对通透性。

## 1.4 激光扫描共聚焦显微镜检测 CHR 对 EA. hy926 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

将 EA. hy926 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 密度接种于玻底培养皿, 培养 24 h。PBS 洗涤细胞 3 次, 钙离子荧光探针 Fluo-3 AM ( $5 \mu\text{mol/L}$ )  $37^\circ\text{C}$  孵育 45 min。配制 HEPES 缓冲液 (氯化钠  $140 \text{ mmol/L}$ ; 氯化钾  $5 \text{ mmol/L}$ , 葡萄糖  $10 \text{ mmol/L}$ , EGTA  $0.1 \text{ mmol/L}$ , HEPES  $10 \text{ mmol/L}$ , pH 7.0)。HEPES 缓冲液洗涤细胞 3 次。分别观察 CHR 和 TNF- $\alpha$  在不含  $Ca^{2+}$  和含有  $2.5 \text{ mmol/L}$   $Ca^{2+}$  的 HEPES 液中对 EA. hy926 细胞内  $Ca^{2+}$  的影响。同时, 在正常 EA. hy926 细胞和 TNF- $\alpha$  ( $22 \text{ ng/mL}$ ) 作用下的 EA. hy926 细胞加入不同浓度 CHR ( $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$  和  $1000 \text{ nmol/L}$ ) 观察细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度的变化。用激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 图像分析系统分析 EA. hy926 细胞内 Fluo-3 AM 荧光强度变化, 得到反映  $[Ca^{2+}]_i$  随时间变化的荧光强度动态曲线图, 并比较各组不同时间点细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度。

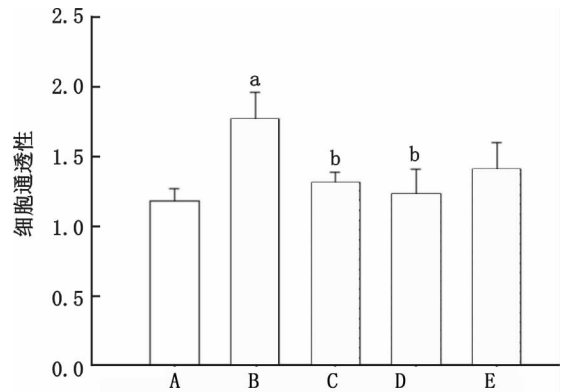
## 1.5 统计学方法

计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组均数进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和两两比较 (Tukey),  $Ca^{2+}$  荧光强度分析采用重复测量方差分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。数据用 SPSS 17.0 软件进行分析, Sigmaplot 10.0 进行作图。

## 2 结果

### 2.1 CHR 抑制 TNF- $\alpha$ 诱导 EA. hy926 细胞通透性增加

与空白组比较,  $22 \text{ ng/mL}$  TNF- $\alpha$  组 EA. hy926 细胞通透性明显增加 [ $(1.189 \pm 0.086)$  vs.  $(1.77 \pm 0.195)$ ,  $t = 4.343$ ,  $P = 0.01$ ],  $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$  和  $1000 \text{ nmol/L}$  CHR 能够抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 EA. hy926 细胞通透性增加, 其中  $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$  CHR 组的细胞通透性比 TNF- $\alpha$  组显著降低 [ $(1.771 \pm 0.195)$  vs.  $(1.315 \pm 0.134)$ ,  $t = 3.403$ ,  $P = 0.042$ ;  $(1.771 \pm 0.195)$  vs.  $(1.236 \pm 0.181)$ ,  $t = 3.985$ ,  $P = 0.017$ , 图 1]。 $1000 \text{ nmol/L}$  CHR 降低 TNF- $\alpha$  诱导的 EA. hy926 细胞通透性增加, 差异无统计学意义 [ $(1.771 \pm 0.195)$  vs.  $(1.411 \pm 0.255)$ ,  $t = 2.679$ ,  $P = 0.126$ , 图 1]。



A: 空白组; B: TNF- $\alpha$  组; C: CHR  $10 \text{ nmol/L}$  + TNF- $\alpha$  组; D: CHR  $100 \text{ nmol/L}$  + TNF- $\alpha$  组; E: CHR  $1000 \text{ nmol/L}$  + TNF- $\alpha$  组; 细胞相对通透性以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 与空白组比较, <sup>a</sup> $P = 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 1 CHR 对 TNF- $\alpha$  诱导的 EA. hy926 细胞高通透性的影响

Fig 1 The effect of CHR on TNF- $\alpha$ -induced hyperpermeability in EA. hy926 cell

### 2.2 CHR 对正常 EA. hy926 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 无影响

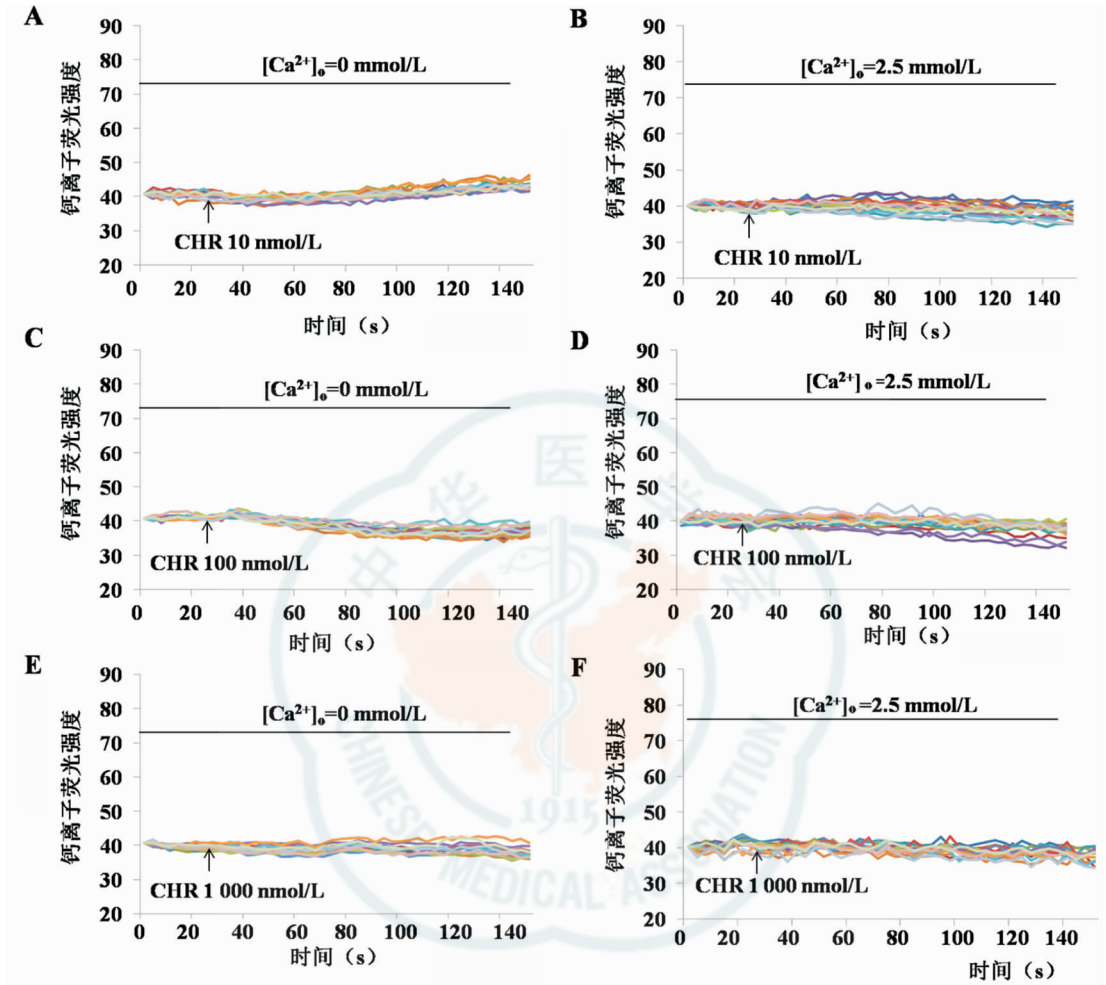
在 CLSM 下获得 EA. hy926 细胞清晰的荧光图像, 形态与白光下倒置显微镜所见一致。无论 HEPES 液中是否含  $Ca^{2+}$ ,  $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$  和  $1000 \text{ nmol/L}$  CHR 均未能引起 EA. hy926 细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  的荧光强度变化 (图 2)。 $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$  和  $1000 \text{ nmol/L}$  CHR 组各时间点细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度  $F_{t40}$ 、 $F_{t100}$  与起始荧光强度  $F_{t30}$  比较, 差异无统计学意义 (图 3)。

### 2.3 CHR 抑制 TNF- $\alpha$ 诱导 EA. hy926 细胞外 $Ca^{2+}$ 内流

在不含  $Ca^{2+}$  的 HEPES 缓冲液中,  $22 \text{ ng/mL}$  TNF- $\alpha$  不能诱导 EA. hy926 细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度变化 (图 4A); 在  $2.5 \text{ mmol/L}$   $Ca^{2+}$  的 HEPES 缓冲液中,  $22 \text{ ng/mL}$  TNF- $\alpha$  可以诱导 EA. hy926 细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度明显增加, 提示 TNF- $\alpha$  引起细胞外  $Ca^{2+}$  内流 (图 4B); 在  $2.5 \text{ mmol/L}$   $Ca^{2+}$  的 HEPES 缓冲液中, 使用  $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$  和  $1000 \text{ nmol/L}$  CHR 预处理  $30 \text{ min}$  均可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度的增加 (图 4 C, D, E);  $10 \text{ nmol/L}$  和  $1000 \text{ nmol/L}$  CHR 组在后期随着时间的延长  $Ca^{2+}$  荧光强度轻度增加 (图 4 C, E)。TNF- $\alpha$  组各时间点细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度  $F_{t40}$ 、 $F_{t100}$  与起始荧光强度  $F_{t30}$  比较, 差异具有统计学意义 [荧光强度分别为:  $(41.497 \pm 3.788)$  vs.  $(56.193 \pm 3.082)$ ,  $F = 196.129$ ,  $P = 0.000$ ;  $(41.497 \pm 3.788)$  vs.  $(53.457 \pm 4.536)$ ,  $F = 101.19$ ,  $P =$

0.000, 图 5]; 10 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$ 、100 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$  和 1 000 nmol/L CHR + TNF- $\alpha$

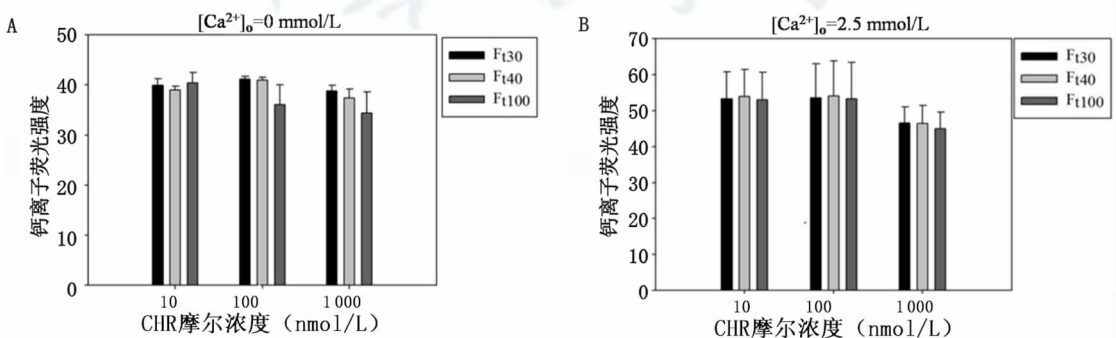
组各时间点细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度 F<sub>t40</sub>、F<sub>t100</sub> 与起始荧光强度 F<sub>t30</sub> 比较, 差异无统计学意义。



[Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> 表示细胞外液中 Ca<sup>2+</sup> 浓度, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 表示细胞内液中 Ca<sup>2+</sup> 浓度

图 2 CHR 对 EA. hy926 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响

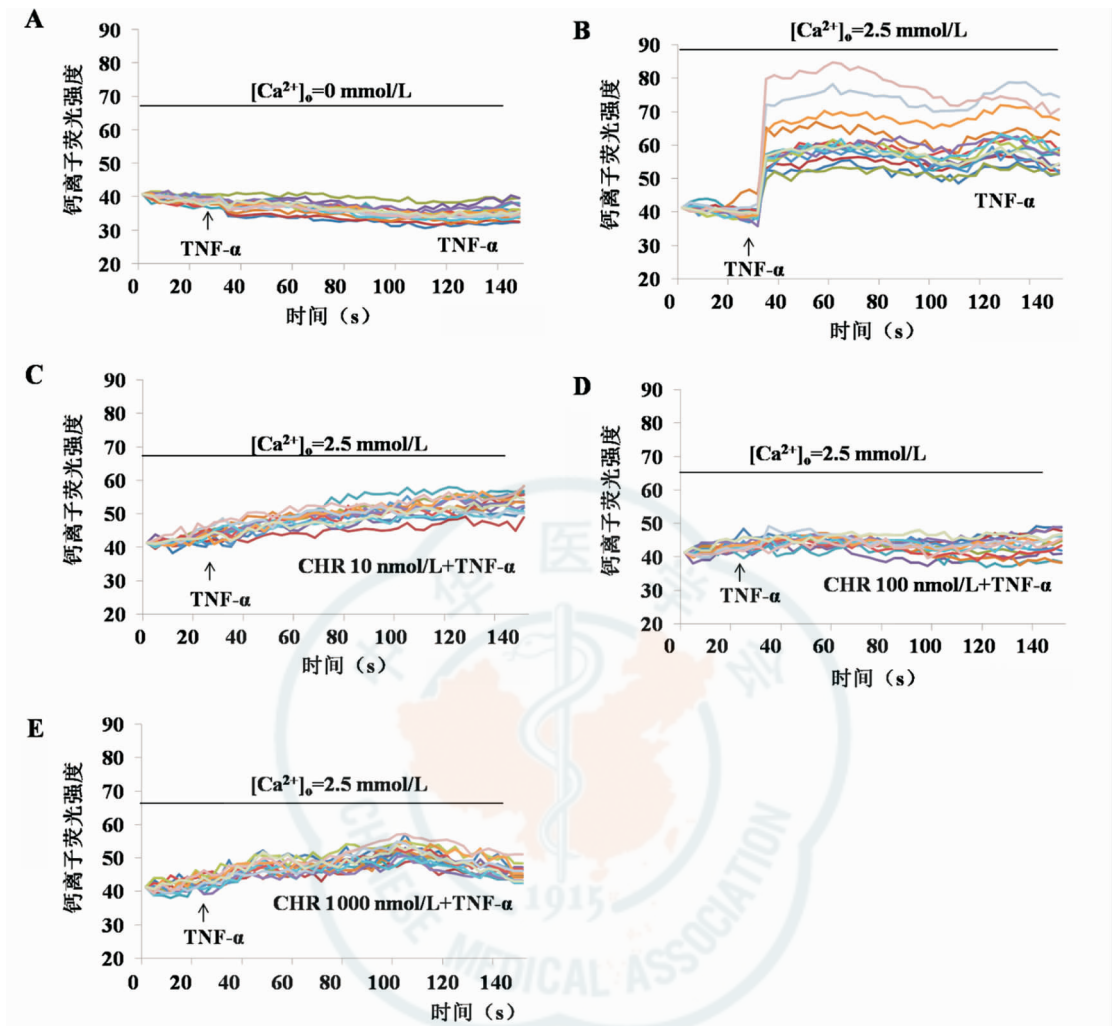
Fig 2 The effect of CHR on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in EA. hy926 cell



A: 含 Ca<sup>2+</sup> 的 HEPES 缓冲液中, 加入 CHR 后比较各时间点 EA. hy926 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度 F<sub>t30</sub>、F<sub>t40</sub> 和 F<sub>t100</sub> 变化; B: 含 2.5 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 的 HEPES 缓冲液中加入 CHR 后比较各时间点 EA. hy926 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度 F<sub>t30</sub>、F<sub>t40</sub> 和 F<sub>t100</sub> 变化。F<sub>t30</sub> 表示加入 CHR 时细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度; F<sub>t40</sub> 表示加入 CHR 10 s 时细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度; F<sub>t100</sub> 表示加入 CHR 70 s 时细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度

图 3 EA. hy926 细胞内各时间点 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度比较

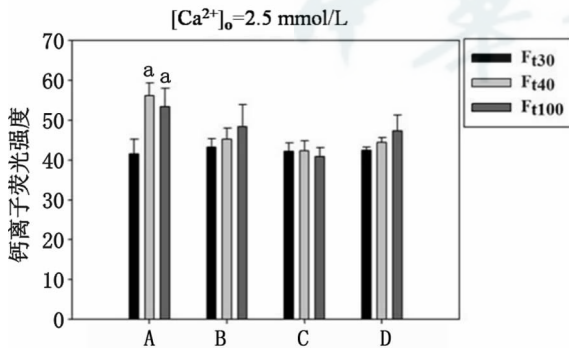
Fig 3 The comparison of Ca<sup>2+</sup> fluorescence intensity at different intervals in EA. hy926 cell



EA. hy926 细胞  $Ca^{2+}$  荧光强度的变化 (A、B) 以及不同浓度 CHR 对 TNF- $\alpha$  作用下的 EA. hy926 细胞  $Ca^{2+}$  荧光强度变化的影响 (C - E)

图 4 CHR 对 TNF- $\alpha$  诱导 EA. hy926 细胞  $Ca^{2+}$  内流的影响

Fig 4 The effect of CHR on TNF- $\alpha$ -induced  $Ca^{2+}$  entry in EA. hy926 cell



A: TNF- $\alpha$  组; B: CHR 10 mol/L + TNF- $\alpha$  组; C: CHR 100 mol/L + TNF- $\alpha$  组; D: CHR 1 000 mol/L + TNF- $\alpha$  组; 各组细胞在不同时间点  $Ca^{2+}$  荧光强度  $F_{140}$ 、 $F_{1100}$  与起始荧光强度  $F_{30}$  比较,  $^a P < 0.05$

图 5 EA. hy926 细胞内各时间点  $Ca^{2+}$  荧光强度比较

Fig5 The comparison of  $Ca^{2+}$  fluorescence intensity at different intervals in EA. hy926 cell

### 3 讨论

脓毒症和全身炎症反应时血管内皮的广泛激活和功能障碍直接破坏微血管屏障的完整性,引起组织水肿、休克甚至多器官功能衰竭<sup>[8-10]</sup>。调节血管内皮细胞通透性,避免过度炎症反应引起血管内皮细胞损伤,是脓毒症中维持循环稳态、保护脏器功能的关键。

脓毒症时机体分泌多种炎症介质,比如 TNF- $\alpha$ 、血管内皮生长因子和组胺等,都能诱导血管内皮细胞损伤<sup>[11]</sup>。TNF- $\alpha$  是脓毒症早期主要的促炎介质之一,作用于血管内皮细胞时诱导细胞外  $Ca^{2+}$  内流,细胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高,导致细胞通透性增加<sup>[1,12]</sup>。

本实验研究结果表明 10 ~ 1 000 nmol/L 浓度范围的 CHR 能够抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞通

透性增加, 笔者前期研究也支持这一结果<sup>[13]</sup>。Blois 等<sup>[7]</sup>研究证实 CGA<sub>1-76</sub>能够抑制 TNF- $\alpha$  诱导的内皮通透性增加, 但是具体机制尚未阐明。本研究结果显示 10 ~ 1 000 nmol/L 浓度范围的 CHR 对正常血管内皮细胞细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  没有影响, 但是均能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞外  $Ca^{2+}$  快速内流, 本研究结论能够进一步阐明 CGA<sub>1-76</sub>改善血管内皮细胞通透性的分子机制。

本实验研究表明 10 nmol/L、100 nmol/L 和 1 000 nmol/L CHR 组早期均有抑制 TNF- $\alpha$  诱导血管内皮细胞外  $Ca^{2+}$  内流的作用, 但是随着时间的延长, 10 nmol/L 和 1 000 nmol/L CHR 这两组后期细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度有所增加, 其原因可能分别与低浓度 CHR 不能全部抑制 TNF- $\alpha$  诱导  $Ca^{2+}$  内流作用以及高浓度 CHR 的细胞毒性作用相关<sup>[12]</sup>。已有研究表明 CGA 参与调节血管生成, 调节血管通透性<sup>[14]</sup>, 笔者前期研究结果表明 CGA 和危重患者的预后密切相关<sup>[15]</sup>, 2012 年 Finland 一项多中心随机大样本试验<sup>[16]</sup>也证明了笔者这一前期研究结果。CGA 的 NH<sub>2</sub>-端 CGA1-76 具有血管舒张效应、调节细胞黏附等多种生物学功能<sup>[17-18]</sup>。本研究结果表明 CGA 衍生多肽 CHR 通过钙信号机制参与到脓毒症时血管内皮细胞正常通透性的维持这一机体稳态调节的重要机制, 这一研究结果也是对 CGA 和 CGA 的 NH<sub>2</sub>-端衍生多肽 CGA<sub>1-76</sub>重要生物学功能的进一步诠释, 尤其阐明了其发挥这些重要作用的新的分子机制。

有意思的是笔者早期的研究发现 CHR 在 5  $\mu$ mol/L 及以上浓度时可诱导中性粒细胞外  $Ca^{2+}$  内流作用<sup>[19]</sup>, 而本实验结果显示 CHR 在远远低于前者的浓度范围 (10 nmol/L ~ 1 000 nmol/L) 可以抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞  $Ca^{2+}$  内流, 提示 CHR 和其他一些对生理功能具有双向调节作用的蛋白质 (如凝血酶等<sup>[20-21]</sup>) 一样, 随着浓度的变化而对机体生理功能可能具有双向调节作用。

本研究结果显示 CHR 能够改善 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞通透性增加, 同时 CHR 也能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞  $Ca^{2+}$  内流。这一结果提示 CHR 可能通过抑制  $Ca^{2+}$  这一与通透性相关的关键信号来改善 TNF- $\alpha$  诱导血管内皮细胞通透性增加。

本研究首次从钙信号途径角度探讨了肾上腺髓质重要的应激激素前蛋白 CGA 衍生多肽 CHR 对炎症状态下血管内皮细胞通透性的影响, 为进一步阐明脓毒症时神经内分泌免疫系统通过肾上腺髓质分

泌的激素前蛋白维持微循环稳态的机制以及寻找脓毒症的治疗方法提供了新的思路。

## 参考文献

- [1] Shao M, Yue Y, Sun GY, et al. Caveolin-1 regulates Rac1 activation and rat pulmonary microvascular endothelial hyperpermeability induced by TNF- $\alpha$  [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e55213.
- [2] Terzuoli E, Meini S, Cucchi P, et al. Antagonism of bradykinin B2 receptor prevents inflammatory responses in human endothelial cells by quenching the NF- $\kappa$ B pathway activation [J]. PLoS One, 2014, 9 (1): e84358.
- [3] 张晓娟, 马晓春. 脓毒症与内皮细胞 [J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9 (6): 11-14.
- [4] Pieroni M, Corti A, Tota B, et al. Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function [J]. Eur Heart J, 2007, 28 (9): 1117-1127.
- [5] Vaingankar SM, Li Y, Biswas N, et al. Effects of chromogranin A deficiency and excess in vivo: biphasic blood pressure and catecholamine responses [J]. J Hypertens, 2010, 28 (4): 817-825.
- [6] Yu M, Wang Z, Fang Y, et al. Overexpression of vasostatin-1 protects hypoxia/reoxygenation injuries in cardiomyocytes independent of endothelial cells [J]. Cardiovasc Ther, 2012, 30 (3): 145-151.
- [7] Blois A, Srebro B, Mandalà M, et al. The chromogranin A peptide vasostatin-I inhibits gap formation and signal transduction mediated by inflammatory agents in cultured bovine pulmonary and coronary arterial endothelial cells [J]. Regul Pept, 2006, 135 (1/2): 78-84.
- [8] Gill SE, Taneja R, Rohan M, et al. Pulmonary microvascular albumin leak is associated with endothelial cell death in murine sepsis-induced lung injury in vivo [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e88501.
- [9] Bansch P, Nelson A, Ohlsson T, et al. Effect of charge on microvascular permeability in early experimental sepsis in the rat [J]. Microvasc Res, 2011, 82 (3): 339-345.
- [10] 刘秀娟, 穆恩, 梁英健, 等. 脓毒症糖尿病大鼠肺脏血管内皮细胞损伤及 DDAH2/NOS/NO 系统变化 [J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 10 (22): 1105-1111.
- [11] 丁欢, 曹相原, 马希刚, 等. 脓毒症内皮细胞损伤与炎症、凝血相关性研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 5 (22): 482-486.
- [12] 肖贞良, 全燕, 李福祥, 等. LPS 和 TNF $\alpha$  对肺微血管内皮细胞内游离钙的影响 [J]. 西南军医, 2010, 12 (1): 1-3.
- [13] 古妮娜, 张丹, 罗丽, 等. 嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽 CGA47-66 抑制脓毒症血清所致脐静脉内皮细胞高通透性的研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (12): 715-719.
- [14] Crippa L, Bianco M, Colombo B, et al. A new chromogranin A-dependent angiogenic switch activated by thrombin [J]. Blood, 2013, 121 (2): 392-402.
- [15] Zhang D, Lavaux T, Sapin R, et al. Serum concentration of chromogranin A at admission: an early biomarker of severity in

- critically ill patients [J]. *Ann Med*, 2009, 41 (1): 38-44.
- [16] Røsjø H, Nygård S, Kaukonen KM, et al. Prognostic value of chromogranin A in severe sepsis: data from the FINNSEPSIS study [J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38 (5): 820-829.
- [17] Rumio C, Dusio GF, Colombo B, et al. The N-terminal fragment of chromogranin A, vasostatin-1 protects mice from acute or chronic colitis upon oral administration [J]. *Dig Dis Sci*, 2012; 57 (5): 1227-37.
- [18] Cerra MC, Gallo MP, Angelone T, et al. The homologous rat chromogranin A1-64 (Regal-64) modulates myocardial and coronary function in rat heart to counteract adrenergic stimulation indirectly via endothelium-derived nitric oxide [J]. *FASEB J*, 2008, 22 (11): 3992-4004.
- [19] Zhang D, Shooshtarzadeh P, Laventie BJ, et al. Two

- chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2 [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (2): e4501.
- [20] Wang Z, Ginnan R, Abdullaev IF, et al. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II delta 6 (CaMKIIdelta6) and RhoA involvement in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (28): 21303-21312.
- [21] Bae JS, Kim YU, Park MK, et al. Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219 (3): 744-751.

(收稿日期: 2015-01-14)

(本文编辑: 郑辛甜)

## · 病例报告 ·

## 院外心脏骤停复苏成功一例

唐峰 王士梅 刘向

患者,男,41岁,于2012-07-18“游泳时突发意识不清”由第一目击者将之转移至池边确认颈动脉无搏动后给予胸外按压,并呼叫120,8 min后急救车到达现场。现场查体及入院查体:现场患者面容青紫,呈叹气样呼吸,血压未测到,心电图示“室颤”,给予除颤后出现房颤,且呼吸节律逐渐规则;入院后检查患者恢复窦性心律,呼吸节律规整,血压100/70 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),仍呈昏迷状态。院内辅助检查:心电图示急性前壁心肌梗死。冠脉造影示LAD自开口闭塞,LCX开口50%狭窄,OM2开口80%,OM3近段60%;RCA动脉粥样硬化,远段向LAD提供2~3级侧支循环。治疗方法及预后:入院后给予扩冠、改善脑细胞代谢及对症支持处理,约6 h后渐苏醒,于2012-07-27日病情稳定后转院行“冠状动脉搭桥术”治疗痊愈出院,恢复正常生活。

**讨论** 本例患者因在发病后第一目击者确认心搏骤停,立即给予胸外心脏按压直至120专业人员到达,为抢救成功赢得了宝贵时间。发生猝死的患者能否得到积极、迅速、有效的心肺复苏是抢救成功的关键,我国八个大中城市院前急救流行病学调查分析结果显示,院前心脏性猝死组调度时间、到达时间分别为(2.12 ± 1.02) min, (14.10 ± 7.05) min<sup>[1]</sup>,因此没有办法让一名专业的急救应对者在患者发病的4~5 min内到达患者身边,所以旁观者有责任和义务实施即刻基础心肺复苏(BCPR)以使患者达到最佳的生存状态。在那些被证实的,由旁观者给予的即刻基础心肺复苏(BCPR)的患者以及以室颤状况等到急救人员出现

的患者,患者的存活率超过了40%。笔者发现与院外心肺复苏和存活到院的成功有关的关键性变量之一是急救人员的应对间隔时间相对较短<sup>[2]</sup>。患者预后和急救人员到达时间之间的反比关系可能是唯一影响给予室颤患者除颤时间的因素<sup>[3]</sup>。

据报道,2007年北京市每150人中仅有1人掌握急救技术,这与发达国家如美国要求的1/3以上公民学会院前急救技术的比例相差甚远。北京急救中心调查显示,大学生对于止血、包扎、晕倒处理、火灾处理的正确知晓率分别为58.66%、45.51%、54.28%、21.09%<sup>[4]</sup>,这也充分显示了我国公众的急救知识掌握情况不佳,所以对于公众的急救知识的普及急需加强。

## 参考文献

- [1] 张在其,骆福添,陈兵,等. 我国八个大中城市院前急救流行病学调查分析 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2010, 19 (11): 1130-1136.
- [2] Eisenberg M, Bergner L, Hallstrom A. Paramedic programs and out-of-hospital cardiac arrest: I factors associated with successful resuscitation [J]. *Am J Public Health*, 1979, 69 (1): 30-38.
- [3] White RD, Vukov LF, Bugliosi TF. Early defibrillation by police: Initial experience with measurement of critical time intervals and patient outcome [J]. *Ann Emerg Med*, 1995, 23 (5): 1009-1013.
- [4] 张雁,温新华,林长敏,等. 国内外公众基础生命支持技术培训现状及其差距 [J]. *中国全科医学*, 2006, 9 (20): 1668-1669.

(收稿日期: 2014-12-16)

(本文编辑: 郑辛甜)