文章编号:1000-5404(2011)13-1385-03

论著

瞬时感受器电位香草酸受体4型通道蛋白在气道压力诱导大鼠气道黏液高分泌中的作用

吴砚樵,周向东 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科)

【摘要】 **目的** 探讨机械通气产生的气道压力对大鼠气道黏液高分泌的影响及机制。**方法** 48只SD大鼠分为4组,实施麻醉和气管切开后接小动物呼吸机进行机械通气。①对照组(8只):大鼠气管插管后自主呼吸;②机械通气组:对大鼠采用压力控制通气模式机械通气,根据气道压力水平再分10、20、30 cmH_2O 3个亚组,每个亚组8只大鼠,机械通气6 h;③钌红干预组(8只):施加机械通气前鼠尾静脉注射瞬时感受器电位香草酸受体4型通道蛋白(transient receptor potential vanilloid 4,TRPV4)非特异性阻断剂钌红(ruthenium red,RR)进行预处理;④4α-PDD干预组(8只):机械通气前鼠尾静脉注射4-α-佛波醇-12,13-二癸酸(4-α-Phorbol-12,13-didecanoate,4α-PDD)进行预处理。实验完毕后收集大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织标本。采用ELISA法检测BALF中MUC5AC蛋白含量,RT-PCR法检测大鼠肺组织MUC5AC mRNA的表达水平。**结果** 与对照组相比,机械通气组MUC5AC在蛋白及转录水平表达均增加,呈压力依赖性。30 cmH_2O 亚组MUC5AC蛋白及mRNA转录水平分别为[(0.71±0.10)、(6.23±0.54)]明显高于对照组[(0.29±0.05)、(1.68±0.35)]($P<0.01$)。在30 cmH_2O 压力水平下MUC5AC的表达增加可被RR干预减弱[(0.41±0.06)、(4.15±0.22)]($P<0.05$),被4α-PDD干预增强[(1.12±0.09)、(8.47±0.35)]($P<0.05$)。**结论** 机械通气产生的气道压力可以通过作用于TRPV4诱导MUC5AC表达增加,这可能是压力诱导气道黏液高分泌的调节机制之一。

【关键词】 黏蛋白类;机械通气;瞬时感受器电位香草酸受体4;气道;大鼠
【中图法分类号】 R-332;R332.2;R329.25 【文献标志码】 A

Role of transient receptor potential vanilloid 4 in airway mucous hypersecretion induced by high airway pressure in rats

Wu Yanqiao, Zhou Xiangdong (Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To identify the effect of high airway pressure caused by mechanical ventilation on the airway mucous hypersecretion in rats. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups. After anesthesia and tracheotomy were performed, all rats were challenged with tracheal cannula and received ventilation with small animal ventilator. Control group kept spontaneous breath without mechanical ventilation. Mechanical ventilation group were divided to 10, 20 and 30 cmH_2O airway pressure levels ($n=8$ for each level) and respectively ventilated for 6 h. Ruthenium red (RR) pre-treatment group were injected with RR *via* tail vein, an antagonist of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) before ventilation. 4-α-Phorbol-12,13-didecanoate (4α-PDD) pre-treatment group were injected with 4α-PDD, an agonist of TRPV4 before ventilation. Rats were sacrificed after ventilation, and their bronchoalvelar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected and stored with common methods. The mucin (MUC) 5AC MUC5AC protein in the BALF was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and its mRNA level in the lung tissues was analyzed by RT-PCR. **Results** Compared with control group, the expression of MUC5AC protein and mRNA were increased in mechanical ventilation group in a pressure-dependent manner, and significantly higher in 30 cmH_2O airway pressure level than in control group (0.71±0.10 and 6.23±0.54 *vs* 0.29±0.05 and 1.68±0.35, $P<0.01$). Pretreatment of RR resulted in significantly decreased expression of MUC5AC at protein and mRNA levels in 30 cmH_2O airway pressure level (0.41±0.06 and 4.15±0.22, $P<0.05$), but these events were strongly reversed by pretreatment of 4α-PDD (1.12±0.09 and 8.47±0.35, $P<0.05$). **Conclusion** High airway pressure induced by mechanical ventilation can significantly up-regulate MUC5AC at protein and mRNA levels through TRPV4-medicated signal pathway.

【**Key words**】 mucin; mechanical ventilation; transient receptor potential vanilloid 4; airway; rats

Corresponding author: Zhou Xiangdong, E-mail: zxd999@263.net

【通信作者】 周向东,E-mail:zxd999@263.net

呼吸机在临床中应用日益广泛，正压机械通气必然会带来远高于自主呼吸的气道压力，增高的气道压力又会给肺组织带来一系列生理和病理改变。我们通过前期实验发现慢性机械压力可以诱导气道上皮细胞MUC5AC表达增加[1]，但该研究是针对细胞模型施加静态压力，而机械通气时气道压力是一个动态变化过程，能否诱导黏液高分泌尚不清楚。瞬时感受器电位香草酸受体4型通道蛋白（transient receptor potential vanilloid 4，TRPV4）是一种已知的机械敏感性离子通道，在呼吸系统中广泛表达，研究表明其在呼吸机相关性肺损伤的初始阶段发挥了重要作用[2]。因此我们推测机械通气时的高气道压力有可能通过TRPV4诱导气道黏液高分泌。本实验通过不同压力水平的机械通气，进一步探讨气道压力与黏液高分泌的关系，以及TRPV4在这一过程中的作用，以期更深入研究气道黏液高分泌的信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SD大鼠（48只，雄性，8周龄，体质量250～300 g，重庆医科大学实验动物中心），小动物呼吸机Inspira ASVP（Harvard公司）；辣根过氧化物酶-羊抗鼠IgG（中杉金桥公司），小鼠抗大鼠呼吸道黏蛋白单克隆抗体RTE11（美国SH Randell教授惠赠），MUC5AC PCR引物（上海生工生物公司合成）；ELISA试剂盒（碧云天公司），4-α-佛波醇-12，13-二癸酸（4-α-Phorbol-12，13-didecanoate，4α-PDD）、钌红（ruthenium red，RR）（Sigma公司），其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠机械通气实验模型 20%乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠后行气管切开，插入自制气管导管，除对照组外均与小动物呼吸机相连接，采用ASVP压力控制模式机械通气，根据不同实验组设定气道压力，吸入气为空气，呼吸频率40 /min，通气时间为6 h，机械通气大鼠维库溴铵肌注保持肌松。

1.2.2 分组与干预因素 将48只SD大鼠分为：①对照组（8只）：大鼠气管插管后自主呼吸；②机械通气组：根据气道压力水平再分10、20、30 cmH_2O 3个亚组，每个亚组8只大鼠，机械通气6 h；③RR干预组（8只）：施加机械通气前鼠尾静脉注射RR 20 mmol/L 1 ml进行预处理，其余条件不变；④4α-PDD干预组（8只）：施加机械通气前鼠尾静脉注射4α-PDD 300 mmol/L 1 ml进行预处理。

1.2.3 检测样本获取 通气结束后腹主动脉放血处死大鼠，气管导管内缓慢注入5 ml无菌生理盐水至各肺叶均匀膨胀，然后吸出，重复3次，收集3次灌洗液，3 000 r/min离心10 min后取上清液待测。收集各组大鼠肺组织，冷冻粉碎，分别称取100 mg待测。

1.2.4 ELISA法检测MUC5AC含量 取支气管肺泡灌洗液（BALF）上清液50 μl，与50 μl重碳酸盐一起加于96孔板中，40 ℃孵育，干燥，PBS洗板3次，室温下2%牛血清白蛋白的PBS封闭1 h；洗板3次，加入1∶500稀释的鼠气道粘蛋白单克隆抗体100 μl，37 ℃孵育1 h，加入100 μl辣根过氧化物酶-羊抗鼠IgG（1∶10 000）37 ℃孵育1 h，四甲基联苯胺过氧化物酶溶液显色，终止反应后酶标仪测各孔光密度值[D(492)]，得到MUC5AC的相对值。

1.2.5 RT-PCR法检测黏蛋白MUC5AC mRNA的表达 采用Trizol法分别提取各组样本总RNA，1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。以两步法行RT-PCR，MUC5AC引物序列：上游5′-TGTTCTATGAGGGCTGCGTCT-3′，下游5′-ATGTCGTGGGACGCACAGA-3′，扩增产物长度103 bp。GAPDH PCR引物序列：上游5′-GATCATCAGCAATGCCTCCT-3′，下游5′-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3′，扩增产物长度为240 bp。扩增条件：94 ℃预变性3 min终止；紧随35个循环，每1个循环94 ℃变性30 s，64 ℃复性30 s，72 ℃延伸90 s，后72 ℃延伸5 min补齐末端。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳分离，约103 bp处为目的基因片段，在240 bp处为GAPDH片段。电泳结果经光密度面积积分分析，与GAPDH mRNA的比值作为目的基因mRNA的相对含量。

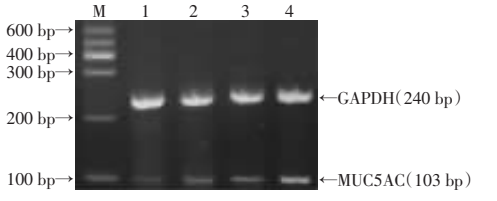
1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件，检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较行单因素方差分析，如差异有统计学意义，再进行组间的两两比较（t 检验）。

2 结果

2.1 不同压力水平机械通气对BALF中MUC5AC蛋白及mRNA表达的影响

与对照组相比，机械通气后各组MUC5AC mRNA、蛋白表达均有增加，且增加呈压力梯度依赖性[10 cmH_2O 组分别为（2.54±0.42）、（0.38±0.07），20 cmH_2O 组分别为（3.18±0.81）、（0.44±0.03）]，30 cmH_2O 组的MUC5AC mRNA（6.23±0.54）和蛋白表达（0.71±0.10）与对照组[分别为（1.68±0.35）、（0.29±0.05）]相比显著升高（$P<0.01$），与前期细胞模型实验结果相符。后续实验采用30 cmH_2O 压力水平作为RR和4α-PDD干预对象。见图1。

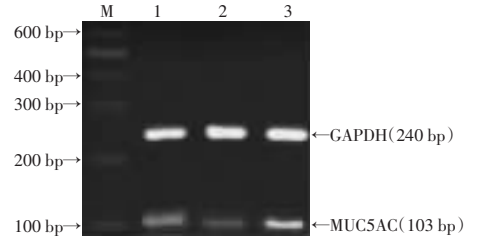


M：标准；1：对照组；2：10 cmH_2O；3：20 cmH_2O；4：30 cmH_2O

图1 RT-PCR检测不同压力机械通气对MUC5AC mRNA的影响

2.2 RR及4α-PDD干预对MUC5AC mRNA、蛋白表达的影响

给予RR预处理后，降低了30 cmH_2O 压力水平机械通气诱导的MUC5AC mRNA表达水平[处理前（6.23±0.54），处理后（4.15±0.22）]及蛋白含量[处理前（0.71±0.10），处理后（0.41±0.06），$P<0.05$]，而给予4α-PDD预处理后30 cmH_2O 压力水平MUC5AC mRNA表达水平（8.47±0.35）和蛋白含量（1.12±0.09）显著增加（$P<0.05$）。见图2。



M：标准；1：30 cmH_2O 组；2：RR干预组；3：4α-PDD干预组

图2 RT-PCR检测RR及4α-PDD干预对MUC5AC mRNA表达的影响

3 讨论

气道压力是肺重要的机械力学因素之一，哮喘、COPD 等病理状态使气道压力上升，作为治疗手段的正压机械通气使气道压力处于更高水平。高气道压力除导致直接气压伤外，还能通过诱导各种细胞因子和炎性介质的释放导致一系列细胞结构及功能改变，因此研究气道压力对黏液高分的影响具有可行性及临床意义。

TRPV4 是瞬时感受器电位离子通道家族（TRP）香草酸受体亚族成员。TRP 家族在哺乳动物体内多承担着细胞感受器的角色，将细胞外环境的变化转导为细胞膜兴奋性及第二信使信号（如 Ca^{2+} 等）的变化，以感受细胞内外的各种刺激。TRPV4 在呼吸系统表达相对较多，气道上皮细胞、气道平滑肌细胞、肺泡壁、肺动脉内皮细胞及平滑肌细胞上均有较多表达[3-5]。TRPV4 的激活可以导致钙离子的内流，钙离子是重要的细胞内信号转导分子，参与膜的兴奋性、神经递质的释放、突触传递、肌细胞的收缩等重要生理功能的调节，同时也是黏液高分泌重要的细胞内调节因素。NE、ROS 等已知的黏液高分泌强刺激因素可以通过钙离子内流引发细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加而调控粘蛋白分泌的快速启动及分泌程度[6-7]。Hamanaka 等[8]在对大鼠离体肺进行高气道峰压机械通气致急性肺损伤模型的研究中，发现 TRPV4 的激活可通过 Ca^{2+} 内流增加导致肺血管内皮通透性增加及肺泡中隔屏障的破坏。而 Zhu 等[9]研究发现以黏液高分泌为病理生理特点的 COPD 发病与 TRPV4 基因多样性有关，Karmouty-Quintana 等[10]报道通过核磁共振可以检测到 TRPV4 同亚族的 TRPV1 被辣椒素激活而引发大鼠气道黏液分泌增加。因此我们推测机械通气产生的高气道压力很有可能通过 TRPV4 途径影响黏液高分泌。国外研究还显示 TRPV4 与气道黏膜纤毛的摆动频率有关[11]，表明其还可能参与了气道黏液清除机制。

气道收缩的病理状态和机械通气时气道内压力会显著增高，文献[12]报道气道收缩产生的气道压力最高可达 30 cmH_2O 左右，而临床应用中机械通气时气道压力超过 30 cmH_2O 时，就有可能导致直接的气道压伤。本研究采用 10～30 cmH_2O 压力水平的压力控制通气作用于 SD 大鼠气道，实验模型更接近于临床实际，更进一步从动物模型验证了压力对气道黏液高分泌的影响。与对照组相比 ELISA 法和 RT-PCR 法显示机械通气组大鼠 BALF 中 MUC5AC 蛋白含量及 MUC5AC mRNA 转录水平均增加，并且与压力水平呈正相关，30 cmH_2O 亚组呈显著增加，表明机械通气导致的高气道压力确实能够在基因转录及蛋白表达水平上诱导 MUC5AC 合成。进一步实验发现对 30 cmH_2O 压力水平给予钌红预处理后，机械压力引发的 MUC5AC mRNA 和 MUC5AC 蛋白表达增加呈明显下调，而给予 4α-PDD 预处理后，MUC5AC 转录及蛋白合成均明显增加，表明 TRPV4 离子通道确实参与了机械压力诱导 MUC5AC 高分泌信号转导过程。

本研究结果表明，气道压力可以诱导 MUC5AC 的过度分泌，机械敏感性离子通道 TRPV4 参与其中，深化了我们对气道黏液高分泌调控机制的认识，为气道黏液高分泌疾的研究提供了新的方向。

参考文献：

[1] 吴砚樵，周向东. 慢性机械压力诱导气道上皮黏蛋白 5AC 的表达[J]. 第三军医大学学报，2010，32(15)：1594－1597.
[2] Hamanaka K，Jian M Y，Townsley M I，*et al*. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2010，299(3)：L353－L362.
[3] Jia Y，Wang X，Varty L，*et al*. Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2004，287(2)：L272－L278.
[4] Fernandez-Fernandez J M，Andrade Y N，Arniges M，*et al*. Functional coupling of TRPV4 cationic channel and large conductance，calcium-dependent potassium channel in human bronchial epithelial cell lines[J]. Pflugers Arch，2008，457(1)：149－159.
[5] Wang Y X，Wang J，Wang C，*et al*. Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. J Membr Biol，2008，223(3)：151－159.
[6] Jacquot J，Merten M，Millot J M，*et al*. Asynchronous dynamic changes of intracellular free Ca^{2+} and possible exocytosis in human tracheal gland cells induced by neutrophil elastase[J]. Biochem Biophys Res Commun，1995，212(2)：307－316.
[7] Maizieres M，Kaplan H，Millot J M，*et al*. Neutrophil elastase promotes rapid exocytosis in human airway gland cells by producing cytosolic Ca^{2+} oscillations[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，1998，18(1)：32－42.
[8] Hamanaka K，Jian M Y，Weber D S，*et al*，TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2007，293(4)：L923－L932.
[9] Zhu G，Gulsvik A，Bakke P，*et al*. Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Hum Mol Genet，2009，18(11)：2053－2062.
[10] Karmouty-Quintana H，Cannet C，Sugar R，*et al*，Capsaicin-induced mucus secretion in rat airways assessed *in vivo* and non-invasively by magnetic resonance imaging[J]. Br J Pharmacol，2007，150(8)：1022－1030.
[11] Lorenzo I M，Liedtke W，Sanderson M J，*et al*. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2008，105(34)：12611－12616.
[12] Gunst S J，Stropp J Q. Pressure-volume and length-stress relationships in canine bronchi in vitro[J]. J Appl Physiol，1988，64(6)：2522－2531.

（收稿 2010-12-06 修回 2010-12-14）
（编辑 王小宴）