过氧化物酶增殖体激活受体-β在大鼠急性肺损伤中的作用

黄 建[1],王建春[2],钱桂生[2] (1.武警重庆市总队医院呼吸内科,重庆 400061;2.第三军医大学新桥医院全军呼吸病研究所,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探讨过氧化物酶增殖体激活受体-β(PPAR-β)在急性肺损伤(ALI)发生发展中可能的作用,以期从新的视角揭示ALI/ARDS的发病机理,并为ALI/ARDS的防治提供理论基础。**方法** 采用颈静脉注射脂多糖(LPS)的方法复制大鼠ALI模型,随机分为对照组和LPS组。半定量RT-PCR方法测定肺组织中PPAR-β mRNA的表达水平;免疫组织化学染色法测定肺组织PPAR-β蛋白表达水平;同时测定动脉血气分析、肺组织湿/干(W/D)比值、肺组织MPO活性、光镜观察肺组织病理变化。**结果** LPS组大鼠PaO_2显著降低($P<0.01$),肺组织W/D比值、肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性以及肺组织的病理积分均显著升高($P<0.05$)。免疫组化显示对照组大鼠肺组织可表达PPAR-β蛋白,主要位于肺泡上皮细胞及肺间质细胞;与对照组相比,LPS组大鼠肺组织PPAR-β蛋白的表达均显著升高($P<0.05$),分布在肺泡上皮细胞及炎性细胞。RT-PCR结果显示对照组肺组织表达一定量的PPAR-β mRNA,与对照组比较,LPS组大鼠肺组织PPAR-β mRNA的表达量显著升高($P<0.05$)。**结论** 正常大鼠肺泡上皮细胞及间质细胞存在PPAR-β,在ALI形成过程中PPAR-β蛋白和mRNA表达均显著增加,提示PPAR-β可能与ALI的炎症反应相关。

[关键词] 急性肺损伤;过氧化物酶增殖体激活受体;炎症

[中图分类号] R826.6;R563.8 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)03-0178-04

Effect of peroxisome proliferation activated receptor-β on acute lung injury in rats

HUANG Jian, WANG Jian-chun, QIAN Gui-sheng (Department of Respiration, Armed Police Hospital, Chongqing 400061, China)

Abstract: Objective To explore the effects of peroxisome proliferators-activated receptor-β (PPAR-β) in the pathogensis of acute lung injury (ALI) and provide the rationale for prevention and treatment of ALI/ARDS (acute respiratory distress syndrome). **Methods** The model of ALI rats was established with lipopolysaccharide (LPS, 5 mg/kg). The rats were randomly divided into control group and LPS group. The semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) technique was used to detect the expression of PPAR-β mRNA in the lung homogenate of rats. The immunohistochemistry (IHC) method was used for determining the protein expression of PPAR-β in the lung tissues of rats. The ratio of lung wet-dry weight (W/D), arterial blood gas analysis, the activity of myeloperoxidase (MPO) in lung homogenate and pathological change were observed respectively. **Results** The PaO_2 of arterial blood gas analysis at all time in ALI group were significantly lower than those in control group ($P<0.01$). The ratio of lung W/D and the level of pulmonary pathology accumulated points and MPO activation at 1h, 2h, 4h and 8h in ALI group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The results of immunohistochemistry (IHC) showed that the slight protein of PPAR-β was expressed in alveolar epithelial cells and lung interstitial substance cells in the control groups. relatively, the protein expression levels of PPAR-β increased significantly in the lung tissues of ALI rats($P<0.05$) and it was mostly expressed in alveolar epithelial cells and lung interstitial substance inflammatory cells. The results of RT-PCR showed the slight PPAR-β mRNA was expressed in the lung tissues of normal rats, relatively, the expression levels of PPAR-β mRNA increased significantly in the lung tissues of ALI rats ($P<0.05$). **Conclusions** PPAR-β was expressed in alveolar epithelial cells and lung interstitial substance cells in the lung tissues of normal rats, the expression levels of PPAR-β mRNA and protein were increased remarkably in ALI group after LPS disposal, above results suggested PPAR-β alternation may be concerned with inflammation in ALI.

Keywords: acute lung injury; peroxisome proliferators-activated receptor; inflammation

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是一种炎症和肺毛细血管通透性增加为主要病理特征的综合征,急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)是ALI的严重阶段。目前对ALI/ARDS的发病机理尚未完全阐明,其死亡率居高不下[1]。过氧化物酶增殖体激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors,PPARs)是核受体超家族成员之一,可能具有重要的抗炎作用[2]。然而在ALI/ARDS发病中,PPARs在基因、蛋白水平表达变化及其作用机理目前尚缺乏研究。为此,本实验探讨ALI肺组织PPAR-β表达的变化以及在ALI发生发展中可能的作用,以期从新的视角揭示ALI/ARDS的发病机理,并为ALI/

[作者简介] 黄 建(1970-),男,重庆市巫山县人,主治医师,硕士,主要从事急性肺损伤的机制及治疗方面的研究。电话:(023)62529073

[收稿日期] 2010-01-25 [修回日期] 2010-02-21

ARDS的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

72只健康雄性Wistar大鼠,体重(170±24)g(由第三军医大学实验动物中心提供),按完全随机化的原则分为LPS组(n=32)和对照组(n=40)。大鼠处理前禁食12 h,自由饮水,用10%盐酸氯胺酮溶液(50 mg/kg)腹腔注射麻醉。LPS组采用微量注射器以5 mg/kg剂量颈静脉注射LPS;对照组分别注入等体积的生理盐水。致伤后将LPS组及对照组分开放回笼中让其自由饮食。对照组在注射前0 h及完毕后1 h、2 h、4 h、8 h时相点采样,LPS组注射完毕后开始计时,分别在致伤后1 h、2 h、4 h、8 h时相点采样。实验中所用的制剂均采用无菌配制,器械均预先经消毒处理,用于颈动脉插管的管道和用于动脉血气分析的采血注射器均预先采用肝素处理。

1.2 标本采集

采集标本前,将大鼠做颈部正中切口,分离右侧颈动脉并插管备用。在预定时相点迅速采集血样:采集颈动脉血0.6 mL用于动脉血气分析;采集颈动脉血3 mL注入灭菌试管中离心(4 ℃,4 500 r/min,5 min),留取血清用于检测各种生化指标和炎症因子。然后大鼠经放血处死,剖开胸腔,暴露肺脏,观察其外观,剪取右肺下叶,用10%甲醛溶液固定,24 h内送病理检查。每只大鼠各取肺组织0.4 g,加入9倍生理盐水用电动匀浆器制成10%匀浆液,4 ℃,1 800 r/min,离心8 min,留取上清,-20 ℃保存备用。另各取左肺下叶肺组织经锡纸包装标记后,迅速置液氮中冻存备用。左肺其余肺叶做湿/干(W/D)比值测定。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 一般情况 呼吸频率、精神状况、刺激反应、活动情况等。

1.3.2 血气分析 肝素抗凝动脉血,用IL-1620型血气分析仪测定动脉血氧分压(PaO_2)等指标。

1.3.3 W/D比值测定 采用真空干燥法。肺组织称湿重后,置真空干燥箱内,70 ℃,真空4 mmHg条件下烘烤24 h后称干重,计算W/D比值。

1.3.4 肺组织髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)活性的测定 参照文献[3]的方法,留取待测肺组织,用分析天平精确称重,入匀浆器中,加入匀浆液(溴化十六烷基三甲胺、磷酸钾缓冲液pH6.0)5 mL,冰浴中匀浆30 min,反复冻融3次,5 000 ×g离心15 min,取上清液0.1 mL,加入反应液(磷酸缓冲液pH6.0、二盐酸邻联茴香胺、过氧化氢)2.9 mL,混匀,用分光光度计测量波长在460 nm处的光吸收率。一个MPO活性单位定义为1 min光吸收率的变化。肺组织中MPO以每克组织中MPO活性单位表示,每个标本设复孔,结果取其平均值。

1.3.5 病理形态学检查 大体观察:器官色泽、体积、病灶及切面等脏器改变。光镜观察:10%甲醛溶液固定右肺下叶,石蜡包埋、切片(5 μm),HE染色,光学显微镜下观察。病理形态指标:①肺间质水肿;②肺泡水肿;③炎症细胞浸润;④肺泡出血;⑤透明膜形成;⑥肺不张。参照文献[4]方法以及病变程度的无、轻、中、重分别以0、1、2、3记分,对大鼠肺组织损伤的病理形态学行半定量分析。

1.4 RT-PCR

肺组织总RNA采用Tripure(Roche,美国)提取,具体操作按照试剂说明书进行。提取的总RNA逆转录成cDNA;用primer premier5软件设计引物(PPAR-β:P1:5'-CATCCACGACATTGAGACG-3',P2:5'-GACTGGCAGCGGTAGAAC-3';GAPDH作为阳性对照引物:P1:5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3',P2:5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3')。采用RT-PCR试剂盒(RNA PCR kit Ver.3.0,TaKaRa,大连)将总RNA逆转录成cDNA,然后加入特异性引物,进行PCR反应,条件如下:94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,共35个循环。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶分析系统测定各条带积分光密度值(integral optical density,IOD)。以同一管中样品目的基因(PPAR-β)与内参照的积分光密度比值(IOD),即标准化积分密度值(normalized integrated intensity,NII),表示mRNA相对表达量,做数据分析。

1.5 免疫组织化学染色

采用SP免疫组化染色试剂盒(SP-9003,中杉生物技术有限公司,北京)进行免疫组织化学染色。具体操作参照试剂盒说明书进行。每组各时相点取8张石蜡切片,经脱腊、抗原修复及封闭后加入山羊抗PPAR-β单克隆抗体IgG(Santa cruz,美国),4 ℃孵育过夜。之后分别滴加生物素化兔抗山羊IgG,室温20 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液,37 ℃孵育20 min。DAB染色,最后进行图像分析,放大倍数(×400),每张切片随机取5个视野,应用TIGER920图像分析系统测出每个视野的光密度值和面积,得出其单位面积的平均光密度(IOD),取平均值代表该标本的染色强度,PPAR-β蛋白表达的相对强度以IOD值表示。

1.6 统计分析

所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS 10.0统计软件进行t检验或单因素方差分析,结果以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALI模型的建立

对照组各时相大鼠的一般情况良好,呼吸平稳,活动自如,饮食如常,肌张力和对刺激的反应均无异常表现。LPS组大鼠在静脉注射LPS约15 min后即出现呼吸急促,唇鼻可有紫绀,致伤约50 min后,呼吸频率显著升高。随后呼吸窘迫进一步加重,于2 h程度最重,呼吸频率由伤前的每分钟(62.33±8.12)次增至每分钟(164.76±20.31)次,与伤前比较$P<0.01$;同时大鼠还出现懒动,肌张力下降,对外界刺激反应减弱、食欲下降等现象。致伤4 h时大鼠呼吸窘迫症状仍持续存在,上述懒动等症状有所减轻。部分大鼠症状无明显减轻或进一步加重,小便呈深褐色,出现稀便等现象。濒死的大鼠呼吸浅慢,心率缓慢,肌张力下降,对刺激反应减弱或消失。血气分析结果表明

注射 LPS 后 1 h、2 h、4 h、8 h，PaO_2 较对照组均显著下降（$P<0.05$）。LPS 致伤后 2 h、4 h 及 8 h 组肺 W/D 比值均显著高于对照组（$P<0.01$）。肺组织石蜡切片，HE 染色显示，对照组肺组织结构清晰，间质血管无充血，肺泡腔内未见中性粒细胞浸润；LPS 组 2 h、4 h 和 8 h 肺组织有明显渗出、水肿及出血，肺泡结构破坏，伴局灶性肺不张和肺气肿，肺泡腔内大量炎性细胞浸润，大量均质红染样渗出物和微血栓及透明膜形成等病变。病理形态学积分 LPS 组 2 h、4 h 和 8 h 明显高于对照组。

2.2 RT-PCR 法测定肺组织 PPAR-β mRNA 的表达

在 LPS 组各时相点，可见 PPAR-β mRNA 表达较对照组显著升高（$P<0.05$），以 4 h 时 PPAR-β mRNA 表达升高最明显，对照组各时相点变化无统计学差异（图 1）。

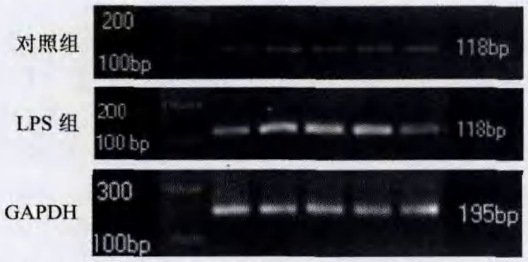


图 1 PPAR-β mRNA 在对照组和 LPS 组的表达

2.3 免疫组化染色法测定肺组织 PPAR-β 的表达

对照组肺组织表达较低水平 PPAR-β 蛋白，以核着色为主，为棕色且色深，胞浆未见表达或偶表达，主要分布在肺泡上皮细胞及间质细胞（图 2a）。在 LPS 组可见 PPAR-β 蛋白表达较对照组显著升高（$P<0.01$），见表 1，主要分布在肺间质的炎细胞和肺泡上皮细胞（图 2b）。

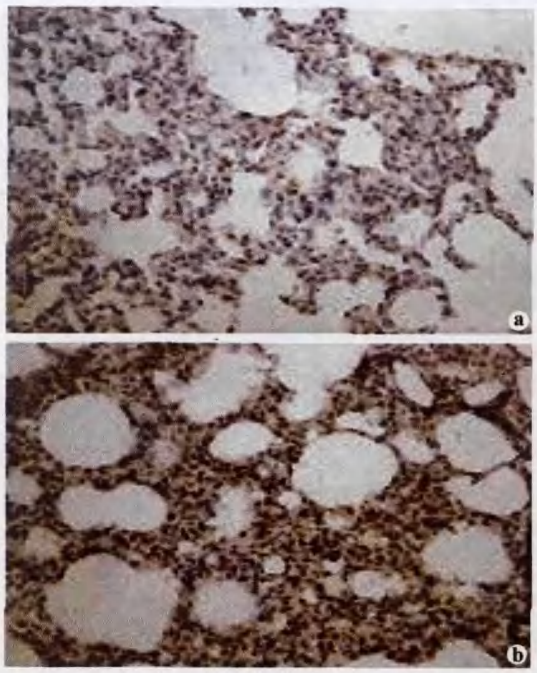
表 1 PPAR-β 蛋白在对照组和 LPS 组的表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h
对照组	0.61 ±0.05	0.60 ±0.02	0.62 ±0.08	0.60 ±0.09	0.61 ±0.08
LPS 组		0.69 ±0.12	0.78 ±0.17	*0.90 ±0.14#	0.81 ±0.12#

*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与对照组比较，$P<0.01$

3 讨论

引起 ALI/ARDS 的病因很多，感染是最多见的原因之一，而感染的细菌又以革兰氏阴性细菌多见。革兰氏阴性细菌的主要毒性物质是细菌细胞壁的内毒素外层结构，LPS 则是内毒素的主要成分。革兰氏阴性菌感染所致的内毒素血症在临床极为常见，70% 的 ARDS 与脓毒症（40%）和吸入胃内容物（30%）有关，而后者可能也反映的是感染[5]。因考虑到 LPS 感染后的脓毒症是导致 ALI/ARDS 的一个主要因素，故本实验选择 LPS 复制模型更接近临床情况。实验中观察到静脉注射 LPS（5 mg/kg）后，大鼠出现呼吸急促，



a：对照组；b：LPS 组

图 2 免疫组化检测 PPAR-β 蛋白在对照组和 LPS 组的表达（×200）

PaO_2 进行性下降，肺 W/D 比值增加，肺组织 MPO 活性显著增强，肺组织内可见肺泡结构破坏，肺间质及肺泡腔内炎细胞大量浸润（以中性粒细胞为主）伴出血、水肿，符合 ALI 的临床表现，成功地复制了 ALI 的大鼠模型。

PPARs 是 1990 年首先由 Issemann 和 Green 发现的一类核激素受体超家族成员，它通过与靶基因结合，在转录水平上对脂肪的代谢、葡萄糖的平衡、细胞增殖分化、炎症反应等生理和病理过程进行调节。PPARs 分为 PPAR-α、δ（或 β）和 γ 三种亚型。PPAR-α、PPAR-β 和 PPAR-γ 在组织中的分布和表达不尽相同，且有不同的配体结合区域。在大多数组织细胞中 PPAR-α、-β 和-γ 是共表达的[6]。PPAR-β 为 PPAR 家族中表达比较广泛的一个亚型，在脂肪组织、骨骼肌、心脏、神经胶质细胞、巨噬细胞、胚胎组织、肿瘤组织、皮肤等均有表达[7]。PPAR-β 在肺组织中主要分布在气道、肺泡上皮细胞和肺血管平滑肌细胞、肺血管内皮细胞以及肺间质细胞中[8]。本实验结果显示，正常大鼠肺组织即有表达一定水平的 PPAR-β mRNA；免疫组化结果显示，正常大鼠肺组织表达 PPAR-β，主要分布在肺泡上皮细胞及肺间质细胞，且以核着色为主，胞浆未见表达或偶表达。肺组织中 PPAR-β *m*RNA 在 LPS 致伤后 1 h 即有所上升，4 h 升至高峰，8 h 有所回

落,但仍高于对照组。免疫组化结果提示LPS组PPAR-β蛋白的表达则较对照组显著升高,4 h升至最高,主要分布在肺间质的炎性细胞和肺泡上皮细胞。上述结果提示:LPS可上调大鼠肺组织中PPAR-β mRNA和蛋白的表达。肺组织中PPAR-β在其核酸水平和蛋白水平的表达均与LPS所致ALI相关。

总之,本实验用LPS复制了ALI大鼠模型,ALI大鼠肺组织中PPAR-β无论在其基因转录水平还是蛋白水平均较正常肺组织表达升高。PPAR-β的活化及上调是由于过度的炎症反应所致,至于PPAR-β活化后仍有大量炎性物质的释放,可能与抗炎物质的减少以及其他促炎性因子的增加有关。机体能否维持致炎与抗炎的平衡与多种因素有关,PPAR-β仅仅是调节炎症反应的一个方面[9-10]。至于PPAR-β对炎性物质的抑制作用和所能达到的程度还需要用激动剂和抑制剂做进一步的研究。

[参考文献]

[1] 白春学,杨 冬.肺损伤可逆诱发因素和治疗方法新进展[J].中华急诊医学杂志,2009,18(5):453-456.

[2] Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs:the vasculature, inflammation and hypertension[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009,18(2):128-133.

[3] Fan J, Marshall JC, Jimenez M, et al. Hemorrhagic shock primes for increased expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the lung: role in pulmonary inflammation following lipopolysaccharide [J]. J mmunol,1998,161(1):440-447.

[4] Christian MD, Danielle JD. Embolic pneumopathy induced by oleic acid[J]. Am J Pathol,1997,87(12):143-158.

[5] 钱桂生.急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征研究现状与展望[J].解放军医学杂志,2003,28(2):97-101.

[6] Inoue K, Kawahito Y, Tsubouchi Y, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma in human lung cancer [J]. Anticancer Res, 2001,21(4A):2471-2476.

[7] 胡 承,贾伟平.PPAR-β与脂代谢及胰岛素抵抗[J].国际内分泌杂志,2006,26(6):385.

[8] Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs[J]. Pharmacol Res, 2005,51(2):85-94.

[9] 何家庆,蹇华胜,蒋耀光,等.单侧胸部撞击致对侧肺损伤动物模型的建立[J].局解手术学杂志,2006,15(5):301-303.

[10] Braissant O, Foufelle F, Scotto C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors: tissue distribution of PPAR-α,-β and -γ in the adult rat[J]. Endocrinology, 1996,137(1):354-366.

(编辑:左艳芳)

(上接第177页)

基于上述调查结果及危险因素分析,本文提出以下预防ICU医院感染的管理措施:①严格规章制度,增强医务人员抗感染意识。严格执行卫生部颁布的《医院感染管理规范》,以此为标准,严格要求,加强感染监控工作。委派主管科室专人负责,结合科室实际制定各项规章制度和监测项目。加强对科室人员的业务培训,提高对医院感染工作的认识。工作中一旦发现有感染迹象,立即采取有效的应对措施,防止感染的蔓延。使院内感染控制工作制度化、规范化。②严格无菌观念。熟练掌握并严格执行各种常用无菌操作规范。严把洗手关,医务人员在处理紧急状况时,不能忽略手的清洁和消毒。这要求医务人员平时做好充足的准备,如平时着装规范适宜,养成科学规范洗手习惯等。③加强工作人员的培训。所有ICU工作人员均能做到忙而不乱,能严格执行消毒隔离制度,掌握抗生素的使用原则,熟练掌握各项无菌技术操作。定期培训、考核,及时发现问题,将感染控制在萌芽状态。④加强ICU病房的消毒管理。ICU病房内设一名专职消毒员,每日负责室内的消毒工作。保持病房清洁,各种急救设备摆放合理有序。当受到病原菌污染时,采用消毒液彻底擦拭。对极易污染的门把手、水龙头等每日用消毒液进行擦拭。生活垃圾和医用垃圾分开放置,并有醒目标志,及时处理。

[参考文献]

[1] 顾克菊,王津存,贾淑梅,等.重症监护病房医院感染流行病学调查[J].中国感染控制杂志,2003,2(1):14-16.

[2] Kollef MH. The intensive care unit as a research laboratory: developing strategies to prevent antimicrobial resistance[J]. Surg Infect (Larchmt),2006,7(2):85-99.

[3] 罗伟文,罗伟强,罗伟雄.中心ICU医院感染监测结果分析[J].实用医学杂志,2009,25(19):3265-3266.

[4] 代永静,王建荣.重症监护病房医院感染危险因素及护理预防措施[J].中华医院感染学杂志,2007,17(2):239-240.

[5] 李小珍,胡正路,苏 健,等.重症监护病房呼吸机相关性肺炎危险因素分析[J].实用全科医学,2007,5(6):503-504.

[6] 顾克菊,王雪文,钟秀君,等.ICU病人留置尿管相关尿路感染病原菌分布及预防[J].护理研究,2009,23(11):2870-2871.

[7] 郑善军.ICU病房患者医院感染的调查及危险因素分析[J].现代预防医学,2004,31(3):654-656.

[8] 石兆玲,马应君.ICU医院感染临床分析与控制对策[J].现代实用医学,2009,21(5):531-532.

(编辑:左艳芳)