机械通气致大鼠肺损伤时肺组织 PPARγ 表达的变化

王秀芹,王凯国,罗红敏,李 浩,王宝胜,王培民 (山东省肿瘤医院麻醉科,山东 济南 250117)

[摘 要] **目的** 观察 PPARγ 在通气相关性肺损伤大鼠肺组织中的表达,探讨 PPARγ 在通气相关性肺损伤中的作用。**方法** 清洁雄性SD 大鼠,随机分为大潮气量(Tidal volume,VT)组,Vt = 12 mL;小潮气量组,Vt = 6 mL;自主呼吸组。每组又分为 3 个亚组:即通气 1 h、4 h、8 h 组。于各时间段末放血处死动物,收集肺组织和肺灌洗液标本,测定肺灌洗液中蛋白总量、白细胞计数;测定肺组织湿/干重比(W/D);逆转录聚合酶链反应检测 PPARγmRNA 的表达;western blot 检测 PPARγ 蛋白的变化。**结果** 大潮气量组机械通气 4 h、8 h 后,与小潮气量组及自主呼吸组相比,肺灌洗液中白细胞计数、蛋白总量明显增加($P < 0.01$),肺 W/D 增加($P < 0.01$);肺组织出现明显病理组织学损伤;PPARγmRNA 和 PPARγ 蛋白表达减少($P < 0.01$)。通气 1 h 时,各组之间比较无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 通气相关性肺损伤大鼠肺组织中 PPARγ 基因和蛋白表达下降,这可能与炎症损伤和持续有关。

[关键词] 肺损伤;机械通气;过氧化体增殖物激活受体 γ

[中图分类号] R563 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)06-0583-04

PPARγ expression in rat lung tissue after ventilator-induced lung injury

WANG Xiu-qin, WANG Kai-guo, LUO Hong-min, LI Hao, WANG Bao-sheng, WANG Pei-min (Department of Anaesthesiology, Shandong Tumor Hospital, Jinan Shandong 250117, China)

Abstract: Objective To observe the changes of PPARγ expression in ventilator-induced lung injury rats and explore the role of PPARγ in the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n = 21$ each): group N received large tidal volume with mechanical ventilation (Vt = 12 mL/kg); group C received lower tidal volume with mechanical ventilation (Vt = 6 mL/kg); group R received room air without mechanical ventilation. Rats in every group were randomly divided into 3 subgroups respectively by 1, 4 and 8 h. The samples of lung were collected at 1, 4 and 8 h after ventilation. Lung pathological examination, total protein and white blood cells in bronchoalveolar fluid and wet-to-dry weight were detected. The exoressions of PPARγ mRNA were detected by RTPCR; PPARγ protein in lung tissues was detected by western bolt. **Result** After 4 and 8 h ventilation in group N, total protein and WBC in bronchoalvelor fluid, W/D were markedly higher than those of group C and R ($P < 0.01$). While PPARγ mRNA and PPARγ protein were decreased than those of group C and R ($P < 0.01$). There were no difference after 1 h ventilation in three group ($P > 0.05$). **Conclusion** PPARγ mRNA and protein expressions in the rats lung tissue of ventilator-induced lung injury were decreased and associated with inflammation and damage of lung tissue.

Keywords: lung injury; mechanical ventilation; peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPARγ)

机械通气引起的肺损伤(ventilator-induced lung injury,VILI)是指应用呼吸机过程中由于机械通气诸多因素和肺部原发病共同作用导致的肺组织损伤,发生率占机械通气的 0.5% ~39%。研究表明,机械通气导致炎性细胞活化并促进细胞因子释放,由此激发肺内或肺外组织的炎症反应,从而导致或加重急性呼吸窘迫综合征或多系统器官衰竭[1-2]。过氧化体增殖物激活受体 γ(peroxisome proliferator activated receptor-γ,PPAR-γ)属于核内受体,共有 α、β 和 γ 3 个亚型。已发现 PPARγ 广泛表达于肺泡巨噬细胞和中性粒细胞中,它可以调节胰岛素敏感性,参与体内的新陈代谢,并在炎症过程起主要作用;还参与调节细胞增长、分化、凋亡。PPARγ 能够通过干扰趋化因子的表达,调节肺泡巨噬细胞抗炎活性,限制过多伤害性的肺内炎症。近年的研究显示,在内毒素导致的肺损伤中,PPARγ 的表达下调且 NF-κB p65 水平升高[3-4]。PPARγ 在通气相关性肺损伤方面的研究尚未见报道。本研究拟从此入手,通过观察 PPARγ 在通气相关性肺损伤大鼠肺组织中的表达,以期进一步揭示通气相关性肺损伤机制,为临床预防及治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁雄性 SD 大鼠 63 只,体质量 370 ~390 g(由山东大学医学院动物实验中心提供),随机分为 3 组($n = 21$):大潮气量(Tidal volume,VT)组,Vt = 12 mL;小潮气量组,Vt = 6 mL;自主呼吸组。每组再根据通气时间分为 3 个亚组($n = 7$):通气 1 h

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201406004

[基金项目] 山东省科技发展计划政策引导类(2012YD18091)

[收稿日期] 2014-03-10 [修回日期] 2014-03-28

组、4 h 组和 8 h 组。

1.2 方法

各组动物均在适应实验室环境 72 h 后麻醉,术前夜禁食,自由饮水。20% 乌拉坦 0.8 mL/100 g 腹腔注射麻醉,右颈总动脉穿刺置管,测动脉压;左股静脉插管用于输液和给药,用微量输液泵以 10 mL · kg^{-1} · h^{-1} 速度输注输林格氏液,大潮气量组、小潮气量组给予肌肉松弛剂阿曲库胺,用生理盐水配制成 2 mg/mL,先给负荷量 1 ~ 2 mg/kg,继而以 4 ~ 5 mg · kg^{-1} · h^{-1} 输注速度维持。用 14 号 BD 留置针行气管插管,口腔内填塞无菌纱布以防止漏气。各项操作完毕后稳定 20 min,开始实验。机械通气:接小动物呼吸机(浙江大学医学仪器厂,DH150 型),呼吸参数设定:Vt 按照实验各组要求设置,吸/呼(I∶E)比为 1∶1,呼吸频率 60 ~ 70 次/分,呼气末 CO_2 分压维持在 35 ~ 45 mmHg,呼气末正压(PEEP)为 0,吸入室内空气(氧浓度为 21%)。各组分别于通气 1 h、4 h 和 8 h 末颈总动脉放血处死动物。

测定肺灌洗液中蛋白总量、白细胞计数,测定肺组织湿/干重比(W/D),取颈动脉血 4 mL 后处死大鼠。立即开胸取出肺,左肺用 4 ℃生理盐水行支气管肺泡灌洗。收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF),低温离心(1 200 rpm,4 ℃,10 min),待上清液等分后置于 -70 ℃保存,用于测定总蛋白(TP)含量,沉淀物用磷酸缓冲液稀释后光镜下行白细胞(WBC)计数;右上叶肺组织用于病理学检查,右中叶肺组织称湿重后置于烤箱中,70 ℃烘烤至恒重后称干重。计算肺 W/D。剩余右肺迅速放液氮中冻实,留做 RNA 提取备用。Tripure 法提取肺组织总 RNA,紫外分光光度计测定 D(260),计算 RNA 浓度。RTPCR:按试剂盒说明配置反应体系,在 PCR 仪中进行反应。先逆转录合成第 1 条 cDNA,以此为模板进行扩增:94 ℃变性 45 s;58 ℃退火 45 s;72 ℃延伸 45 s;共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。PCR 反应体系(cDNA 2 μl,10 × PCR buffer 5 μl,$MgCl_2$ 4 μl,dNTP 0.5 μl)。所用引物均源自 GenBank 中大鼠 PPARγ 和 GAPDH 全长 cDNA 序列,经 Primer 5.0 软件设计,由日本 TaKaRa Biotech 公司合成。扩增产物置于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,经凝胶成像系统分析成像,western blot 检测 PPARγ 蛋白的变化,引物序列及反应条件见表 1。

表 1 PPARγ 扩增反应条件

扩增基因	反应体系	引物序列	退火温度(℃)	循环次数(次)	产物大小(bp)
PPARγ	25 μl	上游:5′-ATGACAGCGACTTGGCAATA-3′ 下游:5′-GCAACTGGAAGAAGGGAAAT-3′	50	40	341
GAPDH	25 μl	上游:5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′ 下游:5′-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3′	55	25	500

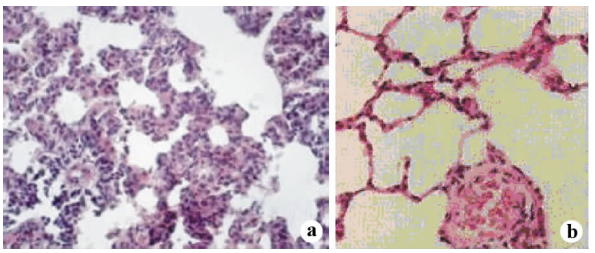
1.3 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件作单因素方差分析,组间比较采用 q 检验,$P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 肺组织病理改变

大潮气量组通气 4 h、8 h 后肺组织病理改变明显,肺泡间隔明显增厚,肺泡腔内可见较多的炎性细胞,部分肺泡腔内有渗出液;小潮气量组肺组织病理改变不明显,仅在 8 h 后有少量白细胞浸润;而自主呼吸组自主呼吸,肺组织无显著病理改变,见图 1。



a:大潮起量组;b:小潮起量组

图 1 大鼠肺组织病理改变(HE, ×20)

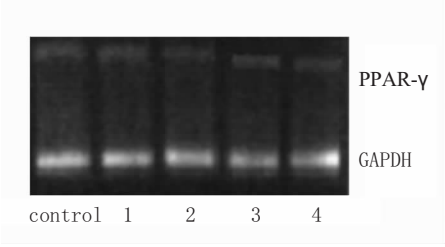
2.2 各组大鼠肺 W/D 和 BALF 中 WBC、总蛋白的比较

大潮气量组通气 4 h、8 h 后肺 W/D 和 BALF 中 WBC、总蛋白量明显增多,与其他组比较差异显著($P < 0.01$),而通气 1 h 后各组比较无显著差异($P > 0.05$),见表 2。

2.3 PPARγ mRNA 和 PPARγ 蛋白表达的比较

N 组通气 4 h、8 h 后肺组织 PPARγ mRNA 和 PPARγ 蛋白表达下降,与其他组比较差异显著($P < 0.01$),而通气 1 h 后各组比较无显著差异($P > 0.05$),见表 3、图 2。

大潮气量机械通气 4 h、8 h 后,RT-PCR 电泳结果显示 PPARγ mRNA 表达下调,与对照组相比,显著下降($P < 0.01$),见图 2。



1:小潮气量通气 8 h;2:大潮气量通气 1 h;3:大潮气量通气 4 h;4:大潮气量通气 8 h

图 2 PPARγ mRNA 表达变化

3 讨论

机械通气是临床救治呼吸衰竭患者的重要方法,也是全身麻醉患者必用的方法。但是,其引起的并发症尤其在 ICU 中,越来越受到重视。由此引起的肺损伤称为通气相关性肺损伤,发生机制主要在:容积伤(或称容量伤)、剪切力伤和生物性损伤。肺保护性的

表 2 大鼠肺 W/D 和 BALF 中 WBC、TP 的比较($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

指标	大潮气量组			小潮气量组			自主呼吸组		
	0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h
W/D	4.28 ± 0.04	5.03 ± 0.07	5.65 ± 0.08	4.41 ± 0.06	4.45 ± 0.07 *	4.46 ± 0.05 *	4.42 ± 0.02	4.37 ± 0.06 *	4.44 ± 0.11 *
WBC(10^4/mL)	0.20 ± 0.06	0.70 ± 0.05	1.20 ± 0.16	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02 *	0.18 ± 0.18 *	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.01 *	0.17 ± 0.09 *
TP(g/L)	1.30 ± 0.40	6.10 ± 0.70	7.90 ± 0.90	1.10 ± 0.30	1.20 ± 0.30 *	1.30 ± 0.30 *	1.10 ± 0.30	1.20 ± 0.20 *	1.20 ± 0.20 *

*：与大潮气量组相应时间比较，$P<0.01$

表 3 PPARγmRNA 和 PPARγ 蛋白表达的比较($n=7$, $\bar{x} \pm s$)

指标	大潮气量组			小潮气量组			自主呼吸组		
	0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h
PPARγmRNA	0.36 ± 0.08	0.30 ± 0.05	0.29 ± 0.03	0.37 ± 0.06	0.36 ± 0.05 *	0.37 ± 0.02 *	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.04 *	0.37 ± 0.03 *
PPARγ 蛋白	0.54 ± 0.05	0.50 ± 0. 04	0.50 ± 0.06	0.58 ± 0.09	0.57 ± 0.11 *	0.59 ± 0.04 *	0.55 ± 0.07	0.56 ± 0.05 *	0.55 ± 0.09 *

*：与大潮气量组相应时间比较，$P<0.01$

通气策略既是针对此而提出的，以小潮气量、容许性高 CO_2 血症和适度 PEEP 为主[5]。研究发现，机械通气导致或加重肺血管通透性增加、炎性细胞积聚和细胞因子释放[6]。Tremblay 等[7]研究发现，机械通气在肺内炎症因子（包括 TNFα、IL，MIP 等）的产生和释放以及导致肺损伤加重的过程中起着重要的作用，其机制目前并不十分清楚容积伤或称生物性损伤被认为在 VILI 中起主要作用[8-9]，过大的潮气量导致肺泡反复张开与关闭，产生剪切力伤，并最终导致 VILI。PPARγ 属于核激素受体超家族，在调控脂肪细胞分化、脂质和糖类代谢以及炎症控制等方面具有重要作用，已有多个研究认为 PPARγ 参与肺损伤过程[10-11]。通常情况下，PPARγ 与视黄醛 X 受体形成异源二聚体，并与辅抑制因子结合成复合物，处于失活状态。当 PPARγ 与特异性配体结合后，导致 PPARγ 与视黄醛 X 受体形成的异源二聚体的空间构象发生改变，与辅抑制因子脱离，再通过与相应靶基因启动子上的过氧化物酶体增殖物反应元件结合，激活靶基因转录[12-13]。已有研究表明内皮细胞 PPARγ 能够抵抗内毒素导致的肺损伤[14]，而 CO_2 在治疗急性肺损伤时 PPARγ 蛋白表达上升[15]。这些都说明 PPARγ 在肺损伤机制中起着重要作用。

本研究中用自主呼吸作为对照，不同潮气量进行比较。肺组织 W/D 和 BALF 中 TP 的变化可较好地反映肺间质及肺泡血管通透性改变，以及肺受损的程度；WBC 计数可反映白细胞的浸润及炎症反应的水平。潮气量是机械通气最基本的参数，过大易引起通气过度、气压伤、循环功能紊乱等并发症，Vt 过小易引起通气不足、肺泡萎陷、肺内分流增加等并发症。本试验选用常规大 Vt（10 ~ 12 mL/kg）和低 Vt（6 ~ 8 mL/kg），并以正常自主呼吸作为对照，实验结果显示：大潮气量组（即 N 组）在通气 4 h 后即出现肺组织损伤，表现为 W/D增加，BALF 中 TP 和 WBC 含量升高；肺组织病理改变明显，肺泡间隔明显增厚，肺泡腔内可见较多的炎性细胞，部分肺泡腔内有渗出液。通气 8 h 后，损伤继续；与小潮气量组即 C 组和自主呼吸 R 组比较，差异显著。N 组 4 h 和 8 h 相比，无显著差异，说明大潮气量长时间机械通气导致 VILI，而 C 组在长时间通气 4 ~ 8 h后，较 1 h 相比，肺间质有水肿，BALF 中 TP 和 WBC 含量也增高，但差异无显著意义。可能是非生理性的机械通气使肺泡反复萎陷产生剪切力，引起上皮细胞和肺泡细胞的牵拉和肺泡巨噬细胞活化，激活肺部炎症级联反应和化学介质的产生等机制，进一步导致 VILI。不同的研究显示潮气量在 20 mL/kg 和 15 mL/kg通气 2 h 就能导致大鼠肺损伤。本实验中，潮气量设为 12 mL/kg，但通气时间延长，也导致大鼠的肺损伤。本实验结果显示，N 组通气 4 ~ 8 h 后，PPARγmRNA 和 PPARγ 蛋白减少，而通气 1 h 无显著变化。小潮起量组及自主呼吸组无肺损伤，PPARγmRNA 和 PPARγ 蛋白未见明显下降。可能是长时间大潮气量机械通气后，机体抗炎物质减少，而损伤持续，导致 VILI。

本研究结果表明，大潮气量（12 mL/kg）持续 4 h 以上机械通气对大鼠造成肺损伤，同时伴有 PPARγmRNA 和 PPARγ 蛋白的减低，说明 PPARγ 在通气相关性肺损伤的发生机制中起了重要作用。应用 PPARγ 的激活剂或抑制剂能否抑制或促进通气相关性肺损伤，以及 PPARγ 通过何种途径参与肺损伤值得继续研究。

[参考文献]

[1] Halbertsma FJ, Vaneker M, Scheffer GJ, et al. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature[J].

乳腺浸润性导管癌连接蛋白 43 和上皮性钙黏蛋白相关性研究

涂永久,高一菁,陈 战,李 锐 (解放军第 174 医院普通外科,福建 厦门 361003)

[摘 要] **目的** 探讨乳腺浸润性导管癌组织中间隙连接蛋白 43(Cx43)及上皮性钙黏蛋白(E-cad)表达中的相关性。**方法** 采用 Elivision免疫组织化学法对 89 例乳腺侵润性导管癌组织及 48 例分区组织的 Cx43 与 E-cad 检测。**结果** 乳腺浸润性导管癌的肿瘤区、交界区和远癌区的 Cx43 和 E-cad 蛋白表达具有较好的一致性($\gamma = 0.460$, $P < 0.01$);在肿瘤区两者同时为阴性表达时,淋巴结转移率最高。**结论** Cx43 和 E-cad 在乳腺浸润性导管癌发生和发展过程中具有一定的协同作用,与其发生浸润转移有关。

[关键词] 乳腺癌;间隙连接蛋白 43;上皮性钙黏蛋白;相关性

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)06-0586-03

Expressions of Connexin43 and E-cadherin and their significance in invasive ductal carcinoma

TU Yong-jiu, GAO Yi-jing, CHEN Zhan, LI Rui (Department of General Surgery, 174th Hospital of PLA, Xiamen 361003, Fujian, China)

Abstract: Objective To explore the correlation of Connexion43(Cx43), E-cadherin(E-cad) in breast infiltrating ductal carcinoma tissue. **Methods** The expressions of Cx43 and E-cad proteins were detected in 89 cases breast infiltrating ductal carcinoma tissue, 48 cases partition groups. by immunohistochemistry Elivision method. **Results** The expressions of Cx43 and E-cad has a better consistency in the tumor area, the border area and far cancer area of breast infiltrating ductal carcinoma. For both the negative expression in tumor area same time, the rate of lymph node metastasis was highest. **Conclusion** Cx43 and E-cad in breast invasive ductal carcinoma has a certain synergy in the process of the occurrence and development, which related to its metastasis occurred.

Keywords: breast cancer; Connexin43; E-cadherin; correlation

连接蛋白 43(Connexin43, Cx43)和上皮性钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)的表达情况及功能状态已被证

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201406005

[收稿日期] 2014-08-15 [修回日期] 2014-10-10

Neth J Med, 2005, 63(10): 382 – 392.

[2] Wolthuis EK, Choi G, Dessing MC, et al. Mechanical ventilation with lower tidal volumes and positive end-expiratory pressure prevents pulmonary inflammation in patients without preexisting lung injury[J]. Anesthesiology, 2008, 108(1): 46 – 54.

[3] Raju C. Reddy. Immunomodulatory role of PPARγ in alveolar macrophages[J]. Journal of Invertigative Medicine, 2008, 56(2): 522 – 527.

[4] Virender K, Rehan Reiko S, Julia C, et al. Antenatally administered PPARγ agonist rosiglitazone prevents hyperoxia-induced neonatal rat lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299(6): 672 – 680.

[5] Michelet P, D'Journo XB, Roch A, et al. Protective ventilation influences systemic inflammation after esophagectomy: a randomized controlled study. Anesthesiology, 2007, 107(1): 176 – 177.

[6] Bhatta Charya S, Sen N, Yiming MT, et al. High tidal volume ventilation induces proinflammatory signaling in rat lung endothelium[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28(2): 218 – 224.

[7] Tremblay L, Valenza F, Ribeiro S, et al. Injurious ventilatory stratrgies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model[J]. J Clin Invest, 1997, 99(5): 944 – 952.

[8] Gattinoni L, Carlesso E, Langer T. Towards ultraprotective mechanical ventilation[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2012, 25(1): 141 – 147.

[9] Ngiam N, Kavanagh BP. Ventilator-induced lung injury: the role of gene activation[J]. Curr Opin Crit Care, 2012, 18(1): 16 – 22.

[10] Basilia Z, Paul W H, Michael O'C, et al. Lung injury after hemorrhage is age dependent: role of peroxisome proliferator-activated receptor [J]. Crit Care Med, 2009, 37(6): 1978 – 1987.

[11] Theodore JS, Venkateshwar GK, Raju CR. Peroxisome proliferator-activated receptor-γas a regulator of lung inflammation and repair [J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, (2): 226 – 231.

[12] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation[J]. Inflamm Res, 2000, 49(10): 497 – 505.

[13] Bull AW. The role of peroxisome proliferator activated receptorγ in colon cancer and inflammatory bowel disease[J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(9): 1121 – 1123.

[14] Reddy AT, Lakshmi SP, Kleinhenz JM, et al. Endothelial cell peroxisome proliferator-activated receptor γ reduces endotoxemic pulmonary inflammation and injury[J]. J Immunol, 2012, 189(11): 5411 – 5420.

[15] Kawanishi S, Takahashi T, Morimatsu H, et al. Inhalation of carbon monoxide following resuscitation ameliorates hemorrhagic shock-induced lung injury[J]. Mol Med Rep, 2013, 79(1): 3 – 10.

(编辑:周小林)