呼吸危重症 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001146

川芎嗪对脂多糖诱导肺损伤大鼠肺组织水通道蛋白 1、5 表达影响的研究

陈 懿,毛 蕊,肖 玲,刘 畅,刘 欣,田时静,王熙宇,周 巧,胡小勇,周发春
(重庆医科大学附属第一医院急科医学科 & 重症医学科,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:初步探讨川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导肺损伤大鼠肺组织水通道蛋白(aquaporins,AQPs)1、5 表达的调节作用。**方法**:健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 32 只随机分为正常对照组(C 组)、TMP 处理组(T 组)、LPS 刺激组(L 组)、TMP 治疗组(LT 组),每组 8 只。L 组采用尾静脉注射 6 mg/kg LPS,T 组给予 TMP 100 mg/kg 腹腔注射,LT 组大鼠注射 LPS 1 h 后立即给予 TMP 100 mg/kg 腹腔注射。8 h 后麻醉处死大鼠留取肺组织标本。测定肺组织湿/干重比(wet/dry ratio,W/D),苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理形态,实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)检测肺组织匀浆 AQP1 和 AQP5 的 mRNA 水平,免疫组化染色、Western blot 检测肺组织 AQP1、AQP5 蛋白表达。**结果**:肺组织切片 HE 染色光镜下可见 C 组、T 组肺组织结构完整、清晰;L 组肺泡结构紊乱,弥漫性肺泡间隔增厚,肺泡腔内有炎性细胞浸润、出血和水肿,而 LT 组上述病理表现较 L 组减轻。L 组平均肺组织湿/干重比值(5.577 ± 0.243)明显高于其余 3 组(P<0.01);与 C、T 2 组(3.430 ± 0.251、3.251 ± 0.142)相比,LT 组湿/干重比值(4.384 ± 0.236)增加,差异存在统计学意义(P<0.01)。qRT-PCR 结果显示 T 组 AQP1、AQP5 的 RNA 水平(1.462 ± 0.080、1.267 ± 0.063)高于 C 组(1.160 ± 0.229、0.940 ± 0.087),同时,L 组两者转录水平下调(0.607 ± 0.203、0.139 ± 0.046),而 LT 组 mRNA 水平(0.848 ± 0.071、0.314 ± 0.134)高于 L 组(P<0.05),免疫组化(C 组:2.096 ± 0.114、2.285 ± 0.266;T 组:3.253 ± 0.149、3.790 ± 0.308;L 组:1.133 ± 0.202、1.068 ± 0.221;LT 组:1.562 ± 0.085、1.647 ± 0.239)、Western blot 结果(C 组:1.443 ± 0.103、1.278 ± 0.061;T 组:1.667 ± 0.087、1.644 ± 0.102;L 组:0.974 ± 0.090、0.529 ± 0.100;LT 组:1.179 ± 0.051、0.805 ± 0.082)与 qRT-PCR 一致(P<0.05)。**结论**:川芎嗪可有效减轻脂多糖诱导急性呼吸窘迫综合征的肺水肿,起到积极的保护作用,其机制可能与上调 AQP1、AQP5 的表达有关。

【关键词】川芎嗪;急性呼吸窘迫综合征;水通道蛋白
【中图分类号】R563 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-11-28

Effect of tetramethylpyrazine's on expressions of aquaporin1,5 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats

Chen Yi, Mao Rui, Xiao Ling, Liu Chang, Liu Xin, Tian Shijing,
Wang Xiyu, Zhou Qiao, Hu Xiaoyong, Zhou Fachun
(Department of Emergency and Critical Care Medicine,
The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To preliminarily investigate the effects of tetramethylpyrazine(TMP) on expressions of aquaporin1,5 in lipopolysaccharide(LPS) -induced lung injury in rats. ***Methods***: Thirty-two healthy male SPF grade SD rats were randomly divided into the normal control group(group C), the TMP intervention group(group T), the LPS stimulation group(group L) and the TMP treatment group(LT group), with eight rats in each group. Rats in the group L were given LPS(6 mg/kg) through tail vein injection, rats in group T were given TMP(100 mg/kg) through intraperitoneal injection, and rats in group LT were given LPS for 1 h followed by TMP(100 mg/kg) through intraperitoneal injection immediately. After 8 hours, all rats were anesthetized and sacrificed, with lung tissue specimens harvested. Wet/dry ratio(W/D) of the lung tissue was detected. In addition, hematoxylin-eosin(HE) staining was performed to observe the lung tissue morphology; Quantitative real-time PCR(qRT-PCR) was used to detect the AQP1 mRNA and AQP5 mRNA levels of the lung tissue homogenate. In addition, immunohistochemistry and Western blot were used to de-

作者介绍:陈 懿,Email:929246728@qq.com,
研究方向:急性呼吸窘迫综合征。
通信作者:周发春,Email:zfc88@126.com。
基金项目:重庆市卫生局重点资助项目(编号:2013-1-007)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170103.1652.044.html (2017-01-03)

tect the protein expression of AQP1 and AQP5 in the lung tissue. ***Results***: After HE staining of the lung tissue sections, the lung tissue was integral and clear in its structure in group C and T under light microscope. Alveoli were disorderly in structures, the diffuse alveolar septa were thickened, and alveolar inflammatory cell infiltration, hemorrhage and edema were observed in group L. While the LT group had milder pathological manifestations than group L. The average W/D ratio of the lung tissue in group L(5.577 ± 0.243) was higher than that of each of the other three groups significantly(P<0.01). Compared with group C and T(3.430 ± 0.251、3.251 ± 0.142), the W/D ratio in the group LT(4.384 ± 0.236) was increased, and the difference was significant(P<0.01). The results of qRT-PCR showed that the levels of AQP1 RNA and AQP5 RNA in group T(1.462 ± 0.080, 1.267 ± 0.063) were higher than those in group C (1.160 ± 0.229, 0.940 ± 0.087) and the levels in group L(0.607 ± 0.203, 0.139 ± 0.046) were down-regulated. Meanwhile, the levels in group LT(0.848 ± 0.071, 0.314 ± 0.134) were higher than those in group L(P<0.05). The results of immunohistochemistry(C group: 2.096 ± 0.114, 2.285 ± 0.266; T group: 3.253 ± 0.149, 3.790 ± 0.308; L group: 1.133 ± 0.202, 1.068 ± 0.221; LT group: 1.562 ± 0.085, 1.647 ± 0.239) and Western blot(C group: 1.443 ± 0.103, 1.278 ± 0.061; T group: 1.667 ± 0.087, 1.644 ± 0.102; L group: 0.974 ± 0.090, 0.529 ± 0.100; LT group: 1.179 ± 0.051, 0.805 ± 0.082) were consistent with those of qRT-PCR(P<0.05). ***Conclusion***: TMP can exhibit positive protective effects by mitigating LPS-induced pulmonary edema in ARDS effectively, and the mechanism may be associated with the upregulation of the expressions of AQP1 and AQP5.

【Key words】tetramethylpyrazine; acute respiratory distress syndrome; aquaporins

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是重症监护病房(intensive care unit, ICU)最常见的急危重症之一。尽管认识不断深入，诊治手段不断更新，然其发病率和病死率仍居高不下。最新研究显示病死率大约在 30%[1]，为重症医学一直以来的棘手问题。ARDS 的基本病理改变为肺泡透明膜形成，同时伴有肺泡和间质的大量液体积聚，这种非心源性肺水肿导致肺组织顺应性显著下降，严重影响患者氧合，带来不良预后。

研究表明，水通道蛋白(aquaporins, AQPs)作为一组与水通透有关的细胞膜转运蛋白在维持肺脏的液体平衡中起着重要作用[2]，其中又以 AQP1、AQP5 与液体转运关系最为密切。川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)作为一种活血化瘀药物，现已广泛用于闭塞性血管疾病、脑血栓形成、冠心病等多种疾病的治疗，而 TMP 与 ARDS 的相关研究并不多见。在本课题组前期研究中发现 TMP 可通过减轻肺过度炎症反应、改善循环等作用，减缓肺损伤的进展[3]。同时，已有研究证实 TMP 可有效改善肺水肿[4]，但其具体机制尚有待探讨，TMP 是否通过影响水通道蛋白 1、5 表达，进而对 ARDS 起到保护作用，目前国内外未见类似报道。本实验通过观察 TMP 对 LPS诱导大鼠肺损伤模型 AQP1、AQP5 表达影响，验证其保护作用，以求为 ARDS 的临床治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只，体质量(210 ± 20) g，由重庆医科大学实验动物中心提供，动物生产许可证[SCXK(渝)2012-0001]。实验大鼠适应性喂养 1 周后开始实验，每笼饲养 5 只，自由摄食饮水，自然光线照明，室内通风良好，实验中对待动物遵循重庆医科大学伦理委员会批准。动物使用许可证[SYXK(渝)2012-0001]。

1.2 主要试剂和仪器

脂多糖(Sigma)；盐酸川芎嗪注射液(利欣药业有限公司)；RNA 提取试剂盒(Takara)；逆转录试剂盒(Takara)；SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ(Takara)；AQP1、AQP5、β-actin 引物委托上海生工生物工程有限公司设计合成；AQP1 和 AQP5 一抗购自 SantaCruz 公司，β-actin 由 ABGENT 提供，二抗购自 ABGENT 公司；BCA 蛋白测试盒(碧云天)；核酸浓度测定仪 NanoDrop 2000(Thermo Scientific)，qRT-PCR 仪(BioRad)，凝胶成像系统(BioRad)，BX51 型显微镜(Olympus)。

1.3 动物分组及处理

实验大鼠随机分为正常对照组(C 组)、TMP 处理组(T 组)、LPS 刺激组(L 组)、TMP 治疗组(LT 组)，每组 8 只。尾静脉注射 LPS 6 mg/kg 复制 ARDS 模型，T 组给予 TMP 100 mg/kg 腹腔注射，LT 组大鼠注射 LPS 1 h 后立即给予 TMP 100 mg/kg 腹腔注射。8 h 后麻醉处死大鼠留取肺组织标本，取右肺中叶测量湿/干重比，右上叶用 4%多聚甲醛固定留待组织病理学和免疫组化检测，右下叶行 qRT-PCR 检测，左肺叶留待 Western blot。

1.4 肺组织病理学观察

LPS 干预 8 h 后麻醉处死大鼠，取右肺上叶 4%多聚甲醛固定。然后经常规方法酒精脱水，石蜡包埋，切片，HE 染色后观察比较各组大鼠肺组织病理学改变。

1.5 测量肺组织湿/干重比

游离右肺中叶，滤纸吸干表面水分，称重记录；然后将组织置于 70 ℃ 烘箱 48 h 至恒重后再次称量干重，计算肺湿/干重比（wet/dry ratio，W/D）值，以此评估肺组织水肿程度。

1.6 qRT-PCR 法检测 AQP1、AQP5 mRNA 表达

采用 Trizol 法提取肺组织总 RNA，用核酸浓度测定仪 NanoDrop 2000 测定其浓度后-80 ℃保存备用。将 1 μg 组织 RNA 按试剂盒说明书操作逆转录成 cDNA，然后将其浓度稀释成 100 μg/mL。应用 qRT-PCR 检测 AQP1、AQP5 翻译水平表达。AQP1 序列上游引物：5'-CCGCAACTTCTCAAAC-CACT-3'，下游引物：5'-CATCCAGGTCATACTCCTCCA-3'；AQP5 序列上游引物：5'-AACAACAACACAACGCCTGG-3'，下游引物：5'-CCGGTGAAGTAGATCCCCAC-3'；内参 β-actin 引物序列上游：5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'，下游引物：5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3'。反应体系：cDNA 模板 1 μL，2×SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ 10 μL，正向及反向引物（10 μmol/L）各 1 μL，灭菌蒸馏水 7 μL；反应条件：预变性（95 ℃，10 s）；PCR 反应（40 个循环；95 ℃，5 s；60 ℃，30 s）。并增加溶解曲线步骤：95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；95 ℃，15 s。每个样本设 3 个平行反应孔，最后结果采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 公式计算得出。

1.7 免疫组化染色检测 AQP1、AQP5 在肺组织中表达

组织切片常规脱蜡、水化，枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复 15 min，室温自然冷却后内源性过氧化物酶阻断剂（3% H_2O_2）孵育 10 min，PBS 洗 3 次，每次 5 min。山羊血清室温封闭 30 min 后滴加兔抗鼠 AQP1、AQP5 抗体（稀释浓度 1:50）孵育过夜。滴加二抗室温孵育 20 min，PBS 洗 5 min×3 次，然后再加辣根过氧化物酶室温孵育 20 min，PBS 洗 3 次，每次 5 min。DAB 显色约 30 s 后终止，镜下观察显色效果，苏木精复染胞核、脱水、透明，中性树胶封片。显微镜下观察拍照。免疫组化半定量分析，采用 IPP 16.0 软件检测阳性组织平均吸光度值。

1.8 Western blot 检测 AQP1、AQP5 蛋白表达

取各组肺组织 100 mg 加入蛋白裂解液，匀浆（冰上操作），离心后取上清。BCA 法检测蛋白浓度，每组取等量蛋白（上样量 50 μg）进行聚丙烯胺凝胶（SDS-PAGE）电泳，湿法转移凝胶至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h；一抗（抗体稀释 1:200）4 ℃孵育过夜；TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；辣根过氧化物酶标记二抗（1:3 000 稀释），37 ℃孵育 1 h，TBST 洗膜 10 min×3 次，ECL 化学发光显影，凝胶成像系统显影。采用 Quantity One 软件进行目的条带灰度值分析。

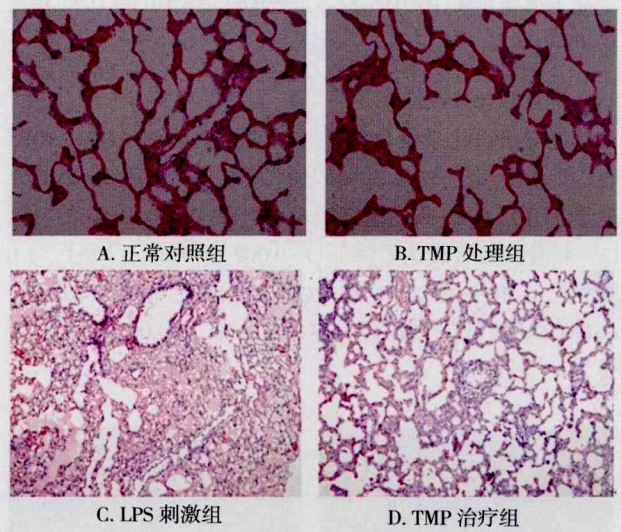
1.9 统计学处理

用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料均采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验；检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 肺组织病理学改变

肉眼观察可见正常对照组和 TMP 处理组大鼠肺组织呈粉红色，未见明显充血、出血点；LPS 刺激组肺组织则表现为暗红色，可观察到明显出血、肿胀；TMP 治疗组肿胀、充血程度弱于 LPS 刺激组。而后将各组大鼠肺组织进行 HE 染色后光镜下观察其病理变化：对照组和 TMP 处理组肺组织结构完整、清晰，肺泡间隔不增宽，肺泡腔内未见出血及炎性细胞浸润、腔内无水肿液；LPS 刺激组显示为肺泡结构紊乱，弥漫性肺泡间隔增厚、肺泡内出血以及炎性细胞浸润，腔内出现粉红色水肿液；TMP 治疗组病理改变程度较 LPS 刺激组弱，腔内水肿液减少，炎性细胞浸润和红细胞渗出减轻（图 1）。



A. 正常对照组　B. TMP 处理组

C. LPS 刺激组　D. TMP 治疗组

图 1 各组大鼠肺组织病理学改变（HE，200×）

Fig.1 Pathological changes of lung tissues of rats in various groups（HE，200×）

2.2 肺组织湿/干重比

4 组大鼠的平均肺组织 W/D 比值为如下。L 组（5.577±0.243）；C 组（3.430±0.251）；T 组（3.251±0.142）；LT 组（4.384±0.236）；4 组比较 F=165.864，P=0.000。L 组平均肺组织 W/D 值明显高于其余 3 组，两两比较 P 值皆为 0.000；与正常对照组和 TMP 处理组相比，TMP 治疗组湿/干重比增加，差异存在统计学意义（P=0.000）。同时，TMP 治疗组 W/D 值小于 LPS刺激组，差异具有统计学意义（P=0.000）。

2.3 qRT-PCR 结果

应用 qRT-PCR 检测各组肺组织 AQP1、AQP5 mRNA 水平结果显示：TMP 处理组 AQP1、AQP5 mRNA 水平（1.462±0.080、1.267±0.063）高于对照组（1.160±0.229、0.940±0.087）（P=0.024，P=0.000）；而 LPS 刺激组两者水平（0.607±0.203、

0.139 ± 0.046）降低（P=0.004，P=0.000）；同时，与 LPS 刺激组相比，TMP 治疗组 AQP1、AQP5 翻译水平（0.848 ± 0.071、0.314 ± 0.134）上升（P=0.037，P=0.025），但低于 C、T 2 组（P=0.020，P=0.000；P=0.000，P=0.000）（表 1）。

表 1　qRT-PCR 检测各组大鼠肺组织 AQP1、AQP5 mRNA 表达（n=8，$\bar{x} \pm s$）

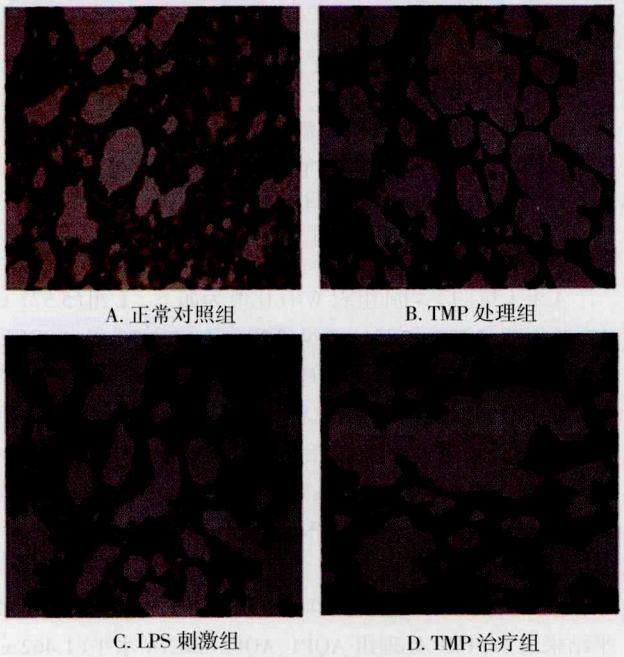
Tab.1　Expression of AQP1 and AQP5 mRNA in rats lung tissuses by RT-PCR（n=8，$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	AQP1 mRNA 相对表达量	AQP5 mRNA 相对表达量
正常对照组	8	1.160 ± 0.229	0.940 ± 0.087
TMP处理组	8	1.462 ± 0.080[a]	1.267 ± 0.063[a]
LPS刺激组	8	0.607 ± 0.203[abc]	0.139 ± 0.046[abc]
TMP治疗组	8	0.848 ± 0.071[ab]	0.314 ± 0.134[ab]
F 值		26.176	176.217
P 值		0.000	0.000

注：a，与 C 组比较，P < 0.05；b：与 T 组比较，P < 0.01；c：与 LT 组比较，P < 0.05

2.4　免疫组化检测

免疫组织化学染色结果显示正常对照组 AQP1、AQP5 表达量较多，着色较深，主要阳性表达部位在细胞膜。TMP 处理组 AQP1、AQP5 表达量高于对照组（P=0.000、P=0.003）；而 LPS 刺激组两者表达量降低（P=0.002、P=0.004）；同时，与 L 组相比，TMP 治疗组 AQP1、AQP5 蛋白表达上调（P=0.028，P=0.036），但低于正常对照组（P=0.003、P=0.037）（图 2、3，表 2）。

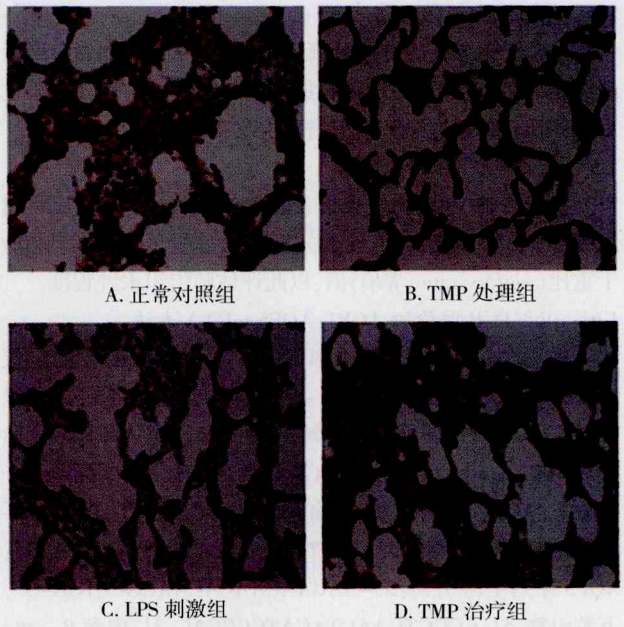


A. 正常对照组　　B. TMP 处理组

C. LPS 刺激组　　D. TMP 治疗组

图 2　AQP1 在肺组织中的表达（200 ×）

Fig.2　Expression of AQP1 in lung tissues of rats（200 ×）



A. 正常对照组　　B. TMP 处理组

C. LPS 刺激组　　D. TMP 治疗组

图 3　AQP5 在肺组织中的表达（200 ×）

Fig.3　Expression of AQP5 in lung tissues of rats（200 ×）

表 2　各组 AQP1 和 AQP5 表达比较（n=8，$\bar{x} \pm s$）

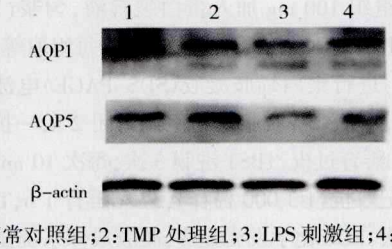
Tab.2　Comprison of AQP1 and AQP5 between four groups（n=8，$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	AQP1表达	AQP5表达
正常对照组	8	2.096 ± 0.114	2.285 ± 0.266
川芎嗪处理组	8	3.253 ± 0.149[a]	3.790 ± 0.308[a]
脂多糖刺激组	8	1.133 ± 0.202[abc]	1.068 ± 0.221[abc]
川芎嗪治疗组	8	1.562 ± 0.085[ab]	1.647 ± 0.239[ab]
F 值		121.050	60.703
P 值		0.000	0.000

注：a，与正常对照组比较，P < 0.05；b：与川芎嗪处理组比较，P < 0.01；c：与川芎嗪治疗组比较，P < 0.05

2.5　Western blot 检测

Western blot 检测肺组织 AQP1、AQP5 蛋白表达，结果显示 TMP 处理组 AQP1、AQP5 蛋白表达量高于对照组（P=0.045、P=0.006）；而 LPS 刺激组两者表达量降低（P=0.004、P=0.000）；同时，与 LPS 刺激组相比，TMP 治疗组 AQP1、AQP5 蛋白表达上调（P=0.026、P=0.020），但低于正常对照组（P=0.016、P=0.000）（图 4，表 3）。



1：正常对照组；2：TMP 处理组；3：LPS 刺激组；4：TMP 治疗组

图 4　Western blot 检测肺组织 AQP1 和 AQP5 蛋白表达

Fig.4　Expression of AQP1 and AQP5 proteins observed by Western blot

表 3 各组大鼠肺组织中 AQP1 和 AQP5 蛋白表达（n=8，$\bar{x} \pm s$）

Tab.3 Expression of AQP1 and AQP5 proteins in rats lung tissuses（n=8，$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	AQP1蛋白表达量	AQP5蛋白表达量
正常对照组	8	1.443 ± 0.103	1.278 ± 0.061
川芎嗪处理组	8	1.667 ± 0.087[a]	1.644 ± 0.102[a]
脂多糖刺激组	8	0.974 ± 0.090[abc]	0.529 ± 0.100[abc]
川芎嗪治疗组	8	1.179 ± 0.051[ab]	0.805 ± 0.082[ab]
F 值		37.947	95.637
P 值		0.000	0.000

注：a，与正常对照组比较 $P<0.05$；b：与川芎嗪处理组比较 $P<0.01$；c：与川芎嗪治疗组比较 $P<0.05$

3 讨 论

ARDS是由多种致病因素引起，导致炎性细胞浸润与大量炎症因子释放，从而造成肺内失控炎症反应的临床常见综合征。因其高发病率和高死亡率的特点[1]，现已成为 ICU 棘手的医学问题。研究[5]证实，失控的炎症反应损伤肺泡毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞，导致肺水清除能力下降，肺含水量增加，最终形成肺水肿。因此，液体在肺组织细胞内外、肺泡膜内外转运能力的强弱则成为 ARDS 病程进展的关键。已有试验证明肺水清除率高的重症患者需要呼吸机支持治疗的时间相对短，病死率较低；而肺水清除率低的患者，需要呼吸机支持治疗的时间长且病死率高[6]。由此可见，提高肺泡的液体清除率，维持肺泡腔内干燥，对肺内有效的气体交换具有重要意义，甚至在一定程度上决定了 ARDS 患者病情转归。

水转运机制主要有两种：一是通过脂质双分子层的简单扩散，二是通过细胞膜蛋白质的选择性转运。AQPs 是一组与液体平衡有关的细胞膜转运蛋白，大量证据表明 AQPs 与 ARDS 肺水的代谢和转运密切相关。迄今为止，研究发现的 AQPs 包括 AQP0~12 共 13 种亚型，证实其在结构、分布和功能等方面存在一定差异，其中分布在肺组织中的有 AQP1、AQP3、AQP4 和 AQP5 四种[7]，它们在肺内的不同分布位置与其功能相适应。AQP1 主要分布在肺泡毛细血管内皮细胞，负责清除间质水分。AQP5 主要存在于Ⅰ型肺泡上皮细胞，清除肺泡腔内水分。虽然 AQP1 和 AQP5 的分布呈现细胞特异性，但如果从完整的肺泡毛细血管屏障角度出发，不难发现 AQP1 和 AQP5 对维持肺内外液体平衡共同发挥着重要作用。因此，许多研究均围绕两者共同展开。研究表明，肺的液体清除能力与 AQPs 的表达量直接相关：敲除 AQP1 基因的小鼠肺泡毛细血管通透性较野生型发生显著改变，肺泡毛细血管膜屏障通透性下降 10 倍左右[8]。Qi 等[9]证实急性肺损伤（acute lung injury，ALI）时 AQP1 和 AQP5 表达下调。最新研究[10]同样观察到 LPS 诱导的 ARDS 模型中，两者水平降低。上述实验证实肺损伤时肺水肿的形成与 AQP1、AQP5 有关。基于这样的理论基础，许多学者开始寻找以 AQPs 为干预靶点的 ARDS 治疗措施，并且取得了一定的成果。研究发现多种药物能够调节肺损伤过程中 AQP1、AQP5 表达，增强肺水清除能力，进而减轻肺水肿[11-12]。

川芎嗪的有效成分是 TMP，研究业已证实其具有多种药理效应：免疫调节功能；抗凝、抑制血栓形成的作用；有效改善微循环；抗氧化特性。但 TMP 对肺损伤的改善作用是否与水通道蛋白密切相关，目前尚不清楚。本实验通过 LPS 诱导成功构建大鼠 ARDS 模型，观察到 LPS 刺激组平均肺组织湿/干重比值显著高于其余 3 组，同时 HE 染色结果表明 L 组肺泡腔满布粉红色水肿液，间隔弥漫性增厚，证实 ARDS 过程中肺水肿的形成。进一步研究发现：与正常对照组相比，LPS 刺激组 AQP1 和 AQP5 翻译水平和蛋白表达下调，这与 Wang 等[13]的研究结果一致，表明 AQP1、AQP5 可能参与了 ARDS 的病理生理过程。造模成功后加用 TMP 治疗，可以观察到肺水肿程度明显减轻：HE 染色显示 TMP 治疗组肺泡腔内水肿液减少，炎性细胞浸润和红细胞渗出减轻；测量肺湿/干重比可见 TMP 治疗组 W/D 值小于 LPS 干预组。这些结果证明了 TMP 对 ARDS 肺水肿的显著改善作用，因实验显示 TMP 处理组 AQP1、AQP5 的转录与翻译水平高于对照组，故推测这种改善作用或许与 TMP 上调正常肺组织两者的表达有关。通过各种检测技术观察到与 LPS 干预组相比，TMP 治疗组 AQP1、AQP5 表达水平上升，提示 TMP 治疗组肺水肿缓解也许是通过调节 AQP1、AQP5 的表达发挥作用。

综上所述，本研究初步探讨了 AQP1、AQP5 在大鼠肺损伤模型中的表达规律，验证了 TMP 在 LPS 诱导的 ARDS 大鼠通过上调 AQP1 和 AQP5 从而减轻肺水肿的调节作用，为临床治疗 ARDS 提供了新的思路。但由于 ARDS 发病过程的复杂性，肺水肿的形成往往是多环节多靶点的，关于 AQPs 在ARDS 发生发展中的具体作用及调节机制仍待继续深入探索。

呼吸危重症

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001101

IMRT联合后程立体定向放射治疗局部中晚期非小细胞肺癌的近期疗效分析

罗　茜，王　颖，吴永忠，周　伟，柳先锋

（重庆市肿瘤研究所/医院/癌症中心放疗科，重庆　400030）

【摘　要】目的：比较适形调强放射治疗（intensity modified radiotherapy，IMRT）联合后程立体定向放射治疗（stereotactic body radiotherapy，SBRT）与单纯 IMRT 治疗局部中晚期非小细胞肺癌的疗效。**方法**：将 90 例局部中晚期非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）患者随机分成试验组和对照组，各 45 例。试验组采用 IMRT 联合后程 SBRT，先行 IMRT，常规分割剂量至 50 Gy/5 周，再采用 SBRT 推量 17.5 Gy/1 周；对照组采用 IMRT，常规分割剂量至 70 Gy/7 周。在放疗结束 3~6 个月后行肺部增强 CT 检查，采用实体瘤治疗疗效评价标准（response evaluation criteria in solid tumors，RECIST）评价完全缓解率（complete remission，CR）和部分缓解率（partial remission，PR）。按照放射治疗肿瘤学组（radiation therapy oncology group，RTOG）标准评价正常组织急性反应。**结果**：试验组治疗的有效率（CR+PR）明显高于对照组，分别为 84.44%和 66.67%，2 组之间有统计学差异（P=0.05）。试验组的放射性肺炎发生率要低于对照组，分别为 4.44%和 13.33%，但 2 组之间无统计学差异（P=0.138）。2 组放射性食管炎发生率分别为 44.44%和 48.89%，2 组之间亦无统计学差异（P=0.822）。放射性脊髓炎均未发生。**结论**：IMRT 联合后程立体定向放射治疗局部中晚期非小细胞肺癌安全有效，疗效优于单纯 IMRT 放疗，且引起的急性组织反应少，故临床上值得推广应用。

作者介绍：罗　茜，Email：luoqian919@163.com，
研究方向：肿瘤放射治疗。

通信作者：王　颖，Email：wangying_cq@hotmail.com。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161215.1553.068.html
（2016-12-15）

参　考　文　献

[1] Sweeney RM，McAuley DF.Acute respiratory distress syndrome[J]. Lancet，2016[Epub ahead of peint].

[2] Zemans RL，Matthay MA. Bench-to-bedside review:the role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute lung injury[J]. Crit Care，2004，8(6)：469-477.

[3] 刘　丹，周发春. 川芎嗪对脓毒症诱导的急性肺损伤小鼠血管内皮生长因子水平变化的影响[J]. 中国生物制品学杂志，2011，24(2)：199-202.

[4] Zhao S，Zhang Y，Chen Q，et al.A modified "double-hit" induced acute lung injury model in rats and protective effects of tetramethylpyrazine on the injury via Rho/ROCK pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol，2015，8(5)：4581-4587.

[5] Huang B，Wang DX，Deng W. Protective effects of dexamethasone on early acute lung injury induced by oleic acid in rats[J]. Int J Clin Exp Med，2014，7(12)：4698-4709.

[6] Matthay MA. Alveolar fluid clearance in patients with ARDS：does it make a difference?[J]. Chest，2002，122(s6)：340-343.

[7] Verkman AS. More than just water channels：unexpected cellular roles of aquaporins[J]. J Cell Sci，2005，118(Pt 15)：3225-3232.

[8] Bai C，Fukuda N，Song Y，et al. Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice[J]. J Clin Invest，1999，103(4)：555-561.

[9] Qi QY，Chen W，Li XL，et al. H2S protecting against lung injury following limb ischemia-reperfusion by alleviating inflammation and water transport abnormality in rats[J]. Biomed Environ Sci，2014，27(6)：410-418.

[10] Hasan B，Li FS，Siyit A，et al. Expression of aquaporins in the lungs of mice with acute injury caused by LPS treatment[J]. Respir Physiol Neurobiol，2014，200：40-45.

[11] Jin LD，Wang LR，Wu LQ，et al. Effects of COX-2 inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats[J]. Int Immunopharmacol，2013，16(2)：288-295.

[12] Han G，Ma L，Guo Y，et al. Hyperbaric oxygen therapy palliates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats by upregulating AQP1 and AQP5 expression[J]. Exp Lung Res，2015，41(8)：444-449.

[13] Wang F，Huang H，Lu F，et al. Acute lung injury and change in expression of aquaporins 1 and 5 in a rat model of acute pancreatitis[J]. Hepatogastroenterology，2010，57(104)：1553-1562.

（责任编辑：冉明会）