

## $\beta$ -防御素-2 在呼吸机相关性肺炎中的表达

武庆平 姚尚龙 方向明

**【摘要】目的** 观察机械通气大鼠铜绿假单胞菌(PA)肺部感染前后肺组织 $\beta$ -防御素-2(BD-2)基因和蛋白质表达的变化,探讨肺组织BD-2在呼吸机相关性肺炎(VAP)发生机制中的作用。**方法** 58只健康清洁级雄性成年SD大鼠随机分为对照组和机械通气组。机械通气组大鼠采用经口气管插管机械通气24h后,经气管内注入PA复制肺部感染模型。对照组中大鼠无需机械通气,直接气管内接种PA复制肺部感染模型。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)技术测定大鼠BD-2基因和蛋白质表达的变化。**结果** 机械通气组重度肺组织病理变化大鼠占47.6%,明显高于对照组的28.5%( $P < 0.05$ )。机械通气组中BD-2基因和蛋白质表达水平的上调在3h后显著低于对照组( $P$ 均 $< 0.05$ )。机械通气组接种PA6h后血培养阳性率为40.0%,显著性高于对照组的6.7%( $P < 0.05$ )。机械通气组支气管肺泡灌洗液中PA培养阳性率持续为100.0%,而对照组从3h的100.0%降至24h的33.3%( $P < 0.05$ )。对照组存活率为80.0%,机械通气组为40.0%,两组比较,差异有显著性( $P < 0.05$ )。**结论** BD-2基因和蛋白质表达上调水平的下降可能与VAP的发生和发展有关。

**【关键词】**  $\beta$ -防御素-2; 基因; 呼吸机相关性肺炎

**Study of rat  $\beta$ -defensin - 2 gene and protein expression in ventilator - associated pneumonia** WU Qing - ping \*, YAO Shang - long, FANG Xiang - ming. \* Department of Anesthesiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

**【Abstract】Objective** To study the changes in the expression of rat  $\beta$ -defensin - 2(RBD - 2) gene in the lung tissue with *P. aeruginosa* (PA) pneumonia following tracheal mechanical ventilation(MV), and to evaluate the pathogenesis of ventilator - associated pneumonia (VAP). **Methods** A total of 58 normal healthy Sprague - Dawley rats, weighing between 280 and 320 g, were randomly divided into the control group and the conventional MV group (CMV). A tracheal catheter was inserted via mouth in every rat under urethane anesthesia. PA (1 MIC, 0.2 ml) was instilled into the tracheal in the control group. Rats of CMV group received MV ( $V_T = 12$  ml/kg) through tracheal tube for 24 hours, and then were challenged intra - tracheally with PA (1 MIC, 0.2 ml). Fluid loss was replenished through intravenous infusion. The arterial catheter was used for hemodynamics, parameters were monitored, and arterial blood gases were determined. Samples of lung were harvested at 0 hours, 1.5 hours, 3 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 3 days and 5 days, respectively, after bacterial challenge. The mRNA of RBD - 2 was detected by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR), and the protein levels were analyzed by Western blotting. **Results** Expression of RBD - 2 mRNA and protein was lower in CMV group compared with the control 3 hours before instillation of bacteria. RBD - 2 mRNA increased 3 hours after bacteria instillation, reaching the peak at 12 - 24 hours. No significant difference in RBD - 2 expression between the control group and the CMV group within 3 hours, but it was significantly higher at 3 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 3 days and 5 days in the control group than in the CMV group. The number of inflammatory cells infiltrating the bronchial submucous layer was significantly higher in the control group than in the CMV group ( $P < 0.05$ ). There was milder interstitial pulmonary edema and less red blood cells in the alveoli in the control group than in the CMV group. The mortality rate of the CMV group was 60%, which was significantly higher than that of the control group (20%,  $P < 0.05$ ). The positive rates of blood culture and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) bacterial culture were also higher in the CMV group ( $P < 0.05$ ). The survival rate in CMV group (40%) was lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The lowering of BD - 2 gene and protein expression in the CMV group 3 hours after bacteria challenge might be one of the contributory factors in causing VAP.

**【Key words】**  $\beta$ -defensin - 2; gene; ventilation - associated pneumonia

基金项目:教育部高等学校博士点专项科研基金资助(20020487063)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉科(武庆平,姚尚龙);310016 杭州,浙江大学邵逸夫医院中心实验室(方向明)

作者简介:武庆平(1968-),男(汉族),山西省平遥县人,医学博士,主治医师,主要从事呼吸机相关性肺损伤和肺炎方面的研究,获省科技进步三等奖1项,已发表论文8篇。

在ICU,呼吸机相关性肺炎(ventilator - associated pneumonia, VAP)是最重要和最常见的感染并发症。虽然近些年在VAP的诊断、治疗和预防方面已取得了许多进展,但VAP仍然是目前院内感染和死亡的主要原因之一。新近发现的 $\beta$ -防御素-2

( $\beta$ -defensin-2, BD-2) 主要分布于皮肤和呼吸道上皮细胞, 是具有广谱高效抗菌作用的小分子抗菌肽, 它对树突状细胞和记忆型 T 细胞有较强的趋化作用<sup>[1]</sup>, 在机体免疫炎症反应中发挥重要作用。本研究中观察了 VAP 模型大鼠肺组织 BD-2 基因和蛋白质表达水平, 探讨肺组织 BD-2 在 VAP 发生机制中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料与试剂:** 一步法总 RNA 提取试剂 (Trizol) 和 DNA 聚合酶 (TaqDNA) 均购自上海生物工程公司; RNA 酶抑制剂、鼠白血病病毒反转录酶 (M-MLV 逆转录酶)、脱氧核苷三磷酸 (dNTP)、聚合酶链反应产物的直接克隆载体系统 (pGEM-T easy) 购自美国 Promega 公司; BD-2 单克隆抗体 (HBD21-S) 购自美国 Alpha 公司。铜绿假单胞菌 (PA) 标准菌株 ATCC 27853 液由浙江大学邵逸夫医院检验科提供, 每 24 h 转种 1 次, 以保证 PA 活性; 使用前 1~2 h 用无菌盐水配成 1 个麦氏单位 (MIC) 浓度 ( $3 \times 10^8$  CFU/ml)。

**1.2 引物设计与合成:** 检索基因库中的磷酸甘油脱氢酶 (glyceraldehydes phosphate dehydrogenase, GAPDH) 和大鼠 BD-2 (rat  $\beta$ -defensin-2, RBD-2) cDNA 序列, 分别设计其扩增引物 (由上海生物工程技术服务有限公司合成), 引物序列分别如下。GAPDH 聚合酶链反应 (PCR) 上游引物为: 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTT-3'; 下游引物为: 5'-AGATGATGACCCTTTTGGCTC-3'; 产物片段为: 362 bp。RBD-2 PCR 上游引物为: 5'-CAGGCTTCAGTCATGAGGAT-3'; 下游引物为: 5'-TCACTCTAGGCAGTCCACAA-3'; 产物片段为: 184 bp。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 动物模型制备与分组:** 健康清洁级成年雄性 SD (Sprague Dawley) 大鼠 58 只, 体重 280~320 g, 由浙江省医学科学院动物中心提供, 随机分成对照组和机械通气组, 每组 29 只; 每组中各取 5 只大鼠观察 5 d 生存率。机械通气组大鼠腹腔注射质量分数为 20% 的乌拉坦 (1 ml/100 g) 麻醉后, 经气管插管, 连接 DH-50 型小动物呼吸机 (浙江大学生产) 控制呼吸, 行颈动脉及股静脉插管, 用 Medlab 生物信号采集处理系统 (南京美易科技有限公司制造) 监测呼吸、血压、心率和体温, 股静脉输入质量分数为 5% 的葡萄糖盐水 3~5 ml/h。呼吸机参数设置为: 潮气量 12 ml/kg, 呼吸频率 70 次/min, 吸入氧

浓度 (FiO<sub>2</sub>) 0.5。机械通气 24 h 后, 从气管导管中注入 0.2 ml 新鲜配置 1 MIC 浓度的 PA 菌液, 复制动物肺部感染模型。对照组中大鼠无需机械通气, 直接气管内接种 0.2 ml 新鲜配置 1 MIC 浓度的 PA 菌液复制肺部感染模型。大鼠机械通气 24 h 并经气管接种 PA 菌株后, 依据大鼠行为变化、肺组织病理切片小叶性肺炎的病理改变和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的 PA 细菌培养结果判定 VAP 模型制备是否成功<sup>[2]</sup>。

**1.3.2 标本采集和处理:** 分别于接种细菌后 0、1.5、3、6、12 h 及 1、3、5 d 各取 3 只大鼠, 处死后剖胸取左中、下肺组织和胸腔血, 肺组织标本用于病理学观察及供提取肺组织总 RNA 和蛋白质。右侧肺组织行支气管肺泡灌洗, 用 4 °C 生理盐水反复肺灌洗 5 次, 每次灌洗量为 5 ml, 回收量 > 90%, 收集 BALF。取血液或 BALF 接种于 Luria-Bertani (LB) 选择培养基试管, 放入 37 °C、体积分数为 4% 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24~48 h。在接种的 LB 选择培养基上生长并有明显绿脓色素者即可确定为 PA。

**1.3.3 大鼠 VAP 表现和病理学观察:** 向大鼠气管内接种细菌后观察其行为变化。剖胸处死大鼠, 肉眼观察肺组织; 取肺组织标本, 经体积分数为 10% 的甲醛固定后制成苏木素-伊红 (HE) 染色病理切片, 光镜下观察肺组织炎症反应情况, 并在高倍镜下行中性粒细胞半定量计数, 每张切片随机观察 10 个高倍视野 (HP), 取平均值。

**1.3.4 BD-2 mRNA 测定:** 从 -70 °C 冰箱中取出肺组织样本 (2.0 cm × 2.0 cm × 0.5 cm), 用 Trizol 一步法提取肺组织总 RNA, 并于 260 nm 和 280 nm 处测定其吸光度 (A) 值, 计算 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值, 观察总 RNA 的纯度。以 GAPDH 为内参, 半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 RBD-2 mRNA 表达水平。取总 RNA 3 μg, 依次加入 400 U M-MLV 逆转录酶, 0.5 μg 寡脱氧胸苷酸 [olig(dT)<sub>14</sub>], 5 × M-MLV 缓冲液 5 μl, 10 mmol dNTP, RNA 酶抑制剂 40 U, 总体积为 25 μl。42 °C 孵育 60 min, 95 °C 5 min 终止反应, 完成 cDNA 第一链的合成。取 cDNA, 加入 10 × PCR 缓冲液、Mg<sup>2+</sup>、dNTP 引物, Taq DNA 聚合酶, 总体积 20 μl 进行 PCR 扩增。上述反应完成后将目的产物 GAPDH 和 RBD-2 各 4 μl + PCR Marker 2 μl (作为分子质量标准) 在质量分数为 1.7% 的琼脂糖凝胶上电泳, Bio-Rad Gel 1000 型凝胶成像仪上检测所获条带并摄像, 再进行吸光度扫描, 测得 DNA 条带的积分吸光度 (IA) 值,

以 RBD-2/GAPDH 的 IA 值进行数据分析,反映 RBD-2 mRNA 表达程度。

**1.3.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测:**采用 Laemmli 法进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳)。转至硝酸纤维素膜上,膜于体积分数为 5%的脱脂牛奶中封闭 3 h,加入一抗(HBD21-S)40℃反应过夜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗[(aRb IgG (H+L)/HRP]室温孵育 1 h。用 Gel 2000 成像系统(Bio-Rad)采集 X 线片上的实验结果图像,并用 Quantity One 软件对图像条带进行辉度扫描,计算其 IA 值,IA 值反应信号的相对强弱。

**1.4 统计学分析:**计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SAS 8.1 医学统计分析软件,进行成组设计 t 检验和  $\chi^2$  检验。采用 Univariate 过程对数据进行正态分布检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 肺组织形态学变化:**①肉眼观察:接种 PA 6 h 后机械通气组 19 只大鼠和对照组 16 只(含生存率观察大鼠)出现不同程度的口、鼻周血迹和双中、下肺叶融合性出血性病灶。②光镜观察:大鼠肺组织呈小叶性肺炎特征。低倍镜下见小支气管和细支气管周围及肺泡内有中性粒细胞浸润,间质毛细血管充血者为轻度改变;多个细支气管及肺泡灶性中性粒细胞浸润、充血、出血者为中度改变;片状中性粒细胞浸润和坏死者为重度改变。

**2.2 两组大鼠 PA 感染率和死亡率比较(表 1):**接种 PA 后 0 h,两组均无肺感染大鼠;接种 PA 1.5 h 后机械通气组重度肺组织病理变化大鼠占 47.6%,明显高于对照组的 28.5% ( $P < 0.05$ , 表 1)。

**表 1 两组大鼠接种 PA 1.5 h 后 PA 感染率比较**

**Table 1 Comparison of PA infection rate between two groups 例/例(%)**

组别	无感染	轻度感染	中度感染	重度感染
对照组	5/21(23.8)	5/21(23.8)	5/21(23.8)	6/21(28.5)
机械通气组	2/21(9.5)*	3/21(14.2)	6/21(28.5)	10/21(47.6)*

注:与对照组比较; \*  $P < 0.05$

**2.3 细菌学检查结果(表 2):**机械通气组 6 h 后 PA 血培养阳性率为 40%,明显高于对照组的 6.7%。机械通气组 BALF 中 PA 培养阳性率持续为 100%,而对照组则从接种细菌后 3 h 的 100%降至 24 h 的 33.3% ( $P < 0.05$ )。

**2.4 5 d 生存率观察:**对照组存活 4 只,生存率为 80.0%(4/5 只);机械通气组存活 2 只,生存率为

**表 2 VAP 大鼠血和 BALF 细菌培养阳性率**

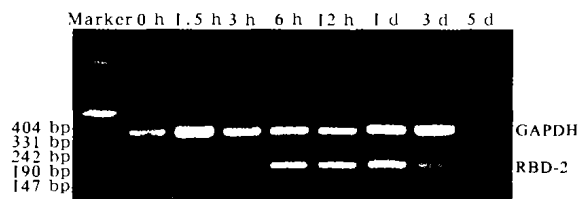
**Table 2 Positive rate of bacteria in blood and BALF in VAP rats**

组别	PA 培养阳性率[例/例(%)]		
	接种 6 h 后胸腔血	接种 3 h BALF	接种 24 h BALF
对照组	1/15(6.7)	3/3(100.0)	1/3(33.3)
机械通气组	6/15(40.0)*	3/3(100.0)	3/3(100.0)*

注:与对照组比较; \*  $P < 0.05$

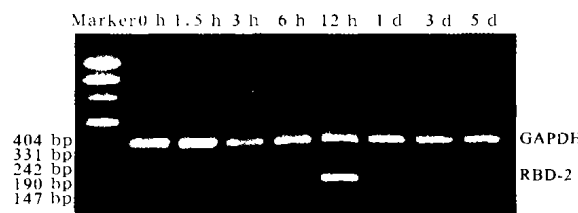
40.0%(2/5 只)。两组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。

**2.5 RBD-2 mRNA 和蛋白质表达变化:**两组大鼠肺组织总 RNA 纯度为 1.8~2.0,经 RT-PCR 扩增后,都出现 GAPDH 和 RBD-2 的 cDNA 片段(图 1,2)。对照组接种细菌 3 h 内 RBD-2 mRNA 表达与机械通气组差异无显著性,3 h 后 RBD-2 表达上调水平均显著高于机械通气组( $P$  均  $< 0.05$ ),两组均于 12~24 h 时 RBD-2 基因表达水平达峰值(图 3)。免疫蛋白印迹显示 RBD-2 多肽表达情况与 mRNA 的检测结果十分相似(图 4)。



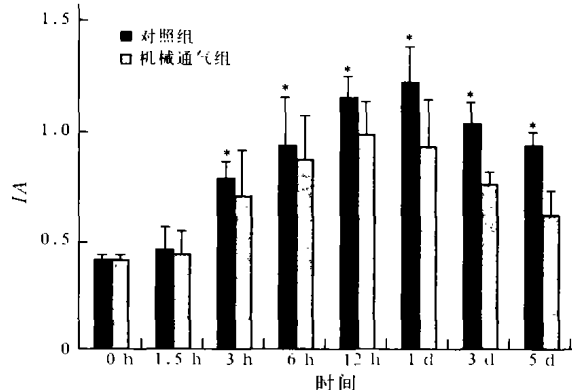
**图 1 对照组大鼠 RBD-2 mRNA 的转录水平**

**Figure 1 RBD-2 mRNA expression by RT-PCR in the control group**



**图 2 机械通气组大鼠 RBD-2 mRNA 的转录水平**

**Figure 2 RBD-2 mRNA expression by RT-PCR in CMV group**



注:与机械通气组比较; \*  $P < 0.05$

**图 3 两组 RBD-2 mRNA 表达的变化**

**Figure 3 RBD-2 mRNA expression between two groups**

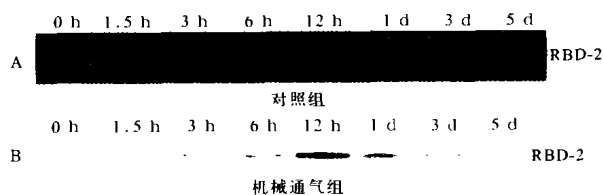


图 4 两组 RBD-2 多肽表达的变化

Figure 4 RBD-2 protein expression between two groups

### 3 讨论

VAP 指患者接受机械通气后发生的细菌性肺炎,其病死率高。国内外流行病学研究显示,PA 是 VAP 患者首要的致病菌(占 24.4%)<sup>[3,4]</sup>。VAP 的发病机制与多种因素有关,呼吸道细菌黏附和定植是 VAP 发病最危险的因素之一。BD-2 广泛存在于呼吸道黏膜上皮组织,具有广谱、高效的抗菌作用。研究证实,如果 BD-2 产生或作用被抑制,机体将发生肺部感染<sup>[1,5]</sup>。我们研究发现,机械通气组在接种 PA 3 h 后 RBD-2 表达上调水平较对照组显著降低,且机械通气组的 PA 细菌血培养阳性率、重度肺组织病理改变和死亡率明显高于对照组。提示机械通气引起 BD-2 表达下降减弱了呼吸道抗菌能力,增加了病原菌定植几率,从而导致 VAP 发生。我们推测机械通气时高肺泡压和(或)高容量引起的肺组织过度牵拉、终末小气道和肺泡周期性开放形成的剪切力,导致肺泡上皮细胞和血管内皮细胞的机械性损伤,细胞因子和炎症介质基因过度表达,造成肺部过度炎症反应致呼吸道上皮组织受损和肺泡 I、II 型细胞破裂和凋亡<sup>[6,7]</sup>。这可能就是机械通气组 BD-2 基因表达上调水平下降的主要原因。

1997 年 Harder 等<sup>[8]</sup>首次分离出的 BD-2 是一类被细菌诱导表达的小分子阳离子抗菌肽,其合成有赖于感染和炎症刺激。本实验结果显示,向气管注入 PA 3 h 内肺组织中 RBD-2 的表达处于低水平,而在气管内注入 PA 3 h 后 RBD-2 mRNA 和蛋白质的表达均显著增高。这与国外许多关于 BD-2 基因启动子区域被细菌和炎症因子活化,从而启动 BD-2 基因转录和翻译,导致 BD-2 分子成倍增加的研究结果<sup>[9]</sup>相似。

Yang 等<sup>[10]</sup>研究发现,BD-2 还可通过与细胞

膜上的 CD4<sup>+</sup>/CD45 受体 6(CCR6 受体)结合,对未成熟树突状细胞和记忆型 T 细胞产生趋化作用,活化 T、B 细胞,调节细胞免疫和体液免疫,参与机体的获得性免疫反应,在免疫应答中发挥重要作用。BD-2 是一类被诱导表达的阳离子抗菌肽,其合成有赖于感染和炎症刺激,随着机体免疫应答和抗炎因子的启动和增强,这些炎症因子如白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和黏附分子等大量生成后对 BD-2 产生反馈抑制,导致 BD-2 mRNA 的表达下降。这可能是实验中观察到 BD-2 mRNA 先被诱导表达,后逐渐减弱的原因。

综上所述,BD-2 在机体呼吸系统中发挥重要的抗感染作用。长时间正压机械通气引起 BD-2 基因和蛋白质表达上调水平的下降可能与 VAP 的发生和发展有关。

### 参考文献:

- Ganz T. Defensin and Host defense[J]. Science, 1999, 286: 420-421.
- Young P J, Redly S A. Ventilator - associated pneumonia diagnosis, pathogenesis and prevention [J]. Anaesthesia, 1999, 54: 1183-1197.
- Chastre J, Fagon J Y. Ventilator - associated pneumonia [J]. Am J Respir Crit Med, 2002, 165: 867-903.
- 康建利, 丁殿勋, 单毅, 等. 危重症患者机械通气前后不同时段内合并严重肺感染的细菌构成与转变 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 465-467.
- Schroder J M, Harder J. Human beta - defensin - 2 [J]. IJBCB, 1999, 31: 645-651.
- 黎檀实, 尹明, 冯丽洁, 等. 急性肺损伤中肺泡 II 型细胞凋亡机制的研究现状 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 185-187.
- 解立新, 刘又宁, 赵晓巍, 等. 肺保护性通气对肺内外源性急性呼吸窘迫综合征外周血和肺泡灌洗液中炎症介质影响的比较 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 262-266.
- Harder J, Bartels J, Chritophers E, et al. A peptide antibiotic from human skin [J]. Nature, 1997, 387: 861.
- Suttichai K, Janet R, Aaron W, et al. Inducible expression of human  $\beta$  - defensin - 2 by fusobacterium nucleatum in oral epithelial cells; multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier [J]. Infection and Immunity, 2000, 68: 2907-2915.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia S N, et al.  $\beta$  - defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 [J]. Science, 1999, 286: 525-528.

(收稿日期: 2004-12-14 修回日期: 2005-06-01)

(本文编辑: 郭方)

更正: 由于校对失误, 本刊 2005 年第 5 期第 264 页袁志强医生的文章《严重烧伤早期肠黏膜组织热休克蛋白 70 的表达规律》彩色插页图 4 和图 5 的位置发生颠倒, 图和图题出现错位, 特此更正, 并向作者致歉。 (本刊编辑部)