

## • 论著 •

## 大鼠机械通气所致肺损伤时 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路的激活

冯丹 姚尚龙 尚游 武庆平 王立奎

**【摘要】** 目的 探讨大鼠机械通气所致呼吸机相关性肺损伤(VILI)时 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的激活以及致炎因子的表达。方法 30 只健康 SD 大鼠随机均分成 A、B、C 3 组, A 组:潮气量( $V_T$ ) 8 ml/kg, 呼吸频率(RR) 80 次/min; B 组:  $V_T$  20 ml/kg, RR 80 次/min; C 组:  $V_T$  40 ml/kg, RR 80 次/min。各组机械通气时间均为 2 h。实验结束处死大鼠, 收集支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织标本, 光镜下观察肺组织病理学改变。采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测各组肺组织中 p38、磷酸化 p38(p-p38)水平, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达水平, 考马斯亮蓝染色法检测肺组织中总蛋白浓度和髓过氧化物酶(MPO)活性, 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测 BALF 中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)和白细胞计数(WBC)。结果 肺组织病理观察显示, A、B、C 3 组的改变依次加重; 与 A 组相比, B、C 两组 p-p38 和 ICAM-1 的表达以及总蛋白、WBC、MIP-2、TNF- $\alpha$  及 MPO 的水平均显著增高( $P$  均  $< 0.01$ ); 与 B 组相比, C 组 p-p38 和 ICAM-1 的表达以及总蛋白、WBC、MIP-2、TNF- $\alpha$  及 MPO 的水平均显著增高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 大  $V_T$  机械通气能显著激活 p38 通路以及致炎因子的表达, 这可能是大鼠机械通气所致肺损伤的重要致病机制之一。

**【关键词】** 肺损伤; 机械通气; 丝裂原活化蛋白激酶

## Activation of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in ventilator-induced lung injury in rat

FENG Dan, YAO Shang-long, SHANG You, WU Qing-ping, WANG Li-kui. Department of Anesthesiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

**【Abstract】** **Objective** To study the activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the expression of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury (VILI) in rat. **Methods** Thirty healthy male SD rats were randomly divided into three group (A, B, C group,  $n=10$  per group). Mechanical ventilation was instituted in all the groups. A group: tidal volume ( $V_T$ ) = 8 ml/kg, respiratory rate (RR) = 80/min; B group:  $V_T$  = 20 ml/kg, RR = 80/min; C group:  $V_T$  = 40 ml/kg, RR = 80/min. The time of ventilation for all the groups was two hours. Rats were sacrificed after experiment was finished. The bronchial lavage liquid and lung tissue were collected and stored with routine methods. The pathological changes in lung tissue were examined with optical microscope. The expression of p38 and phos-p38 (p-p38) were measured by Western blotting in lung tissues. The expression of intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1) was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The contents of total protein, white blood cells (WBC), myeloperoxidase (MPO), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were also determined. **Results** Compared with A group, total protein, WBC, MPO, MIP-2, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 and p-p38 were significantly increased in B group and C group (all  $P < 0.01$ ). Compared with B group, the above indexes were also significantly increased in C group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Large  $V_T$  mechanical ventilation can significantly activate the p-p38 and inflammatory cytokines, which may play an important role in VILI.

**【Key words】** ventilator-induced lung injury; mechanical ventilation; mitogen-activated protein kinase

呼吸机相关性肺损伤(VILI)是肺功能严重受损患者行机械通气支持治疗时的常见并发症,其主要致病机制之一可能是由于过度的机械刺激(如牵

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571787);湖北省科技攻关计划(2005AA301C23)

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

作者简介:冯丹(1973-),男(汉族),湖北省人,博士研究生,主治医师,主要从事机械通气所致肺损伤的研究。

拉、切变力等)激活了肺细胞内多种与炎症反应密切相关的信号转导通路,致使各种致炎因子的表达增多,引起中性粒细胞在肺组织“募集”,从而造成肺损伤<sup>[1-4]</sup>。p38 信号转导通路在炎症反应中发挥着重要的调节作用,其激活后可上调多种致炎因子的表达,如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-8(IL-8)、巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)以及各种黏附分子等,并能激活核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)系

统<sup>[5-7]</sup>。本研究检测了不同通气方式时 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)以及多种致炎因子的表达水平,研究 p38 在机械通气所致肺损伤中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂:**RNA 提取试剂(Trizol)、逆转录试剂盒、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒、酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒均购自深圳鼎美生物工程有限公司,总蛋白和髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,兔抗 p38、磷酸化 p38(p-p38)抗体为 BioVision 公司产品。

**1.2 动物分组及模型制备:**将 30 只健康 SD 大鼠按随机数字表法均分成 A、B、C 3 组。A 组:潮气量( $V_T$ )8 ml/kg,呼吸频率(RR)80 次/min,呼气末正压(PEEP)为 0;B 组: $V_T$  20 ml/kg,RR 80 次/min,PEEP 为 0;C 组: $V_T$  40 ml/kg,RR 80 次/min,PEEP 0。3 组机械通气时间均为 2 h。用质量分数为 20%的乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠,起效后行气管切开,插入气管导管(用 16 号静脉穿刺套管针外套管自制)行机械通气,机械通气参数统一设置为: $V_T$  按以上分组要求设置,RR:80 次/min,吸:呼(I:E)为 1:1,PEEP 为 0,吸入气体为室内空气。皮下切开行股静脉穿刺置管,静脉给予阿曲库铵维持肌松,颈内动脉穿刺置管,监测血压、心率等。

**1.3 标本留置:**机械通气达到预定时间后,放血处死大鼠。分离左右两侧完整肺组织,切除部分右肺用多聚甲醛溶液固定,用于病理切片检查,其余右肺直接放入液氮中保存待检。左肺用生理盐水行肺灌洗(2 ml×3),回收全部支气管肺泡灌洗液(BALF),立即以 2 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,沉淀物用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释后行白细胞计数(WBC),上清液于-70℃冰箱中保存待检。

## 1.4 检测指标与方法

**1.4.1 肺组织病理学:**取右肺组织,用常规方法制作石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理变化。

**1.4.2 总蛋白和 MPO:**BALF 中总蛋白测定采用考马斯亮蓝染色法,用 UV-2000 型分光光度计测量吸光度(A)值。肺组织中 MPO 活性测定采用专用 MPO 试剂盒,先准确称取肺组织重量,按重量/体积比用匀浆缓冲液(试剂盒中自备)进行匀浆,其后所有步骤均严格按照试剂盒说明书要求进行,最后用 UV-2000 型分光光度计测量特定波长下 A 值。MPO 活性单位定义为:每克肺组织湿片在 37℃反应体系中过氧化氢( $H_2O_2$ )被分解 1  $\mu$ mol 为一个酶

活性单位。

**1.4.3 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 MIP-2:**BALF 中 TNF- $\alpha$  和 MIP-2 水平测定采用双抗体夹心 ELISA 法。所有操作均严格按照试剂盒说明书要求进行,先在酶标仪上测量标准品 A 值并绘制出标准曲线,然后测量样品 A 值,并根据测得的 A 值在标准曲线上读出样品的浓度。

**1.4.4 RT-PCR 检测肺组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)基因表达:**①RNA 提取。称取 100 mg 肺组织,匀浆后按 Trizol 一步法进行 RNA 抽提。②RNA 逆转录。抽取 1  $\mu$ g 总 RNA,按逆转录试剂盒提供的方法合成 cDNA。③PCR。PCR 反应体系包括:cDNA 4  $\mu$ l,Buffer 5  $\mu$ l,三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)1  $\mu$ l,引物的正义链和反义链各 1  $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l,Taq 酶 1  $\mu$ l,加水至 50  $\mu$ l。内参采用管家基因磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)。PCR 反应条件:95℃预变性 4~5 min;然后扩增 30~35 个循环,每个循环步骤包括:94℃变性 30 s;55℃退火 30 s(GAPDH),60℃退火 30 s(ICAM-1);72℃延伸 45 s;最后 72℃延伸 7 min,4℃终止反应。PCR 产物用质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统采集图像,用图像分析软件(ImageMaster)分析目的基因片段光密度值。ICAM-1 引物序列:5'-AGACACAAGCAAGAGAAGAAAAGG-3'(正义链),5'-TTGGGAACAAAGGTAGGAATGTAT-3'(反义链),目的基因片段长度为 425 bp;GAPDH 引物序列:5'-TGAAGGTCGGTGTCAA CGGATTTGGC-3'(正义链),5'-CATGTAGGC CATGAGGTCCACCAC-3'(反义链),目的基因片段长度为 983 bp。以 ICAM-1/GAPDH 的光密度比值来反映 ICAM-1 的表达水平。

**1.4.5 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 p38、p-p38 的表达:**取大鼠右肺组织,分别剪碎,各加入一定比例裂解液,冰浴条件下进行组织匀浆;4℃、10 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min,弃除沉淀,用考马斯亮蓝染色法定量。每份样本取等量总蛋白,质量分数为 10%的变性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳(SDS-PAGE)。将蛋白转移至硝酸纤维素膜后于质量分数为 5%的脱脂牛奶中封闭 3 h,加入 1:1 000 稀释的一抗(兔抗 p38、p-p38 抗体),4℃过夜。膜漂洗后加入 1:2 000 稀释的二抗,室温下摇床杂交 1 h。用增强化学发光法(ECL)检测阳性信号。采用 Bio-Rad Gel Doc 1000 成像系统采集 X 线片上的结果图像,用图像分析软

件(Imagemaster)分析图像条带,并计算其积分光密度值。以 p-p38 与总 p38 积分吸光度比值来反映 p38 的磷酸化程度,即 p-p38 的表达水平。

1.5 统计学处理:数据资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肺组织 p38 和 p-p38 的表达(图 1,图 2): 3 组肺组织 p38 表达水平差异均无显著性( $P$  均  $> 0.05$ );与 A 组比较,B 组和 C 组 p-p38 表达水平显著增高,且 C 组 p-p38 的表达水平显著高于 B 组( $P$  均  $< 0.01$ )。B 组和 C 组的  $A_{p-p38}/A_{p38}$  显著高于 A 组,且以 C 组值最高( $P$  均  $< 0.01$ )。

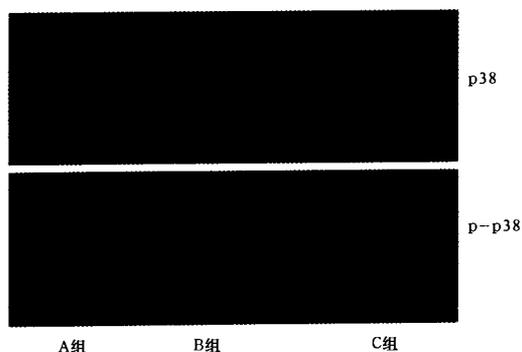
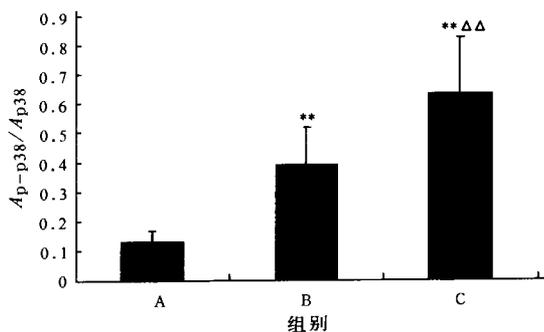


图 1 Western blotting 检测大鼠肺组织 p38、p-p38 的表达  
Figure 1 Expression of p38 and p-p38 in lung tissues of rats by Western blotting



注:与 A 组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 B 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$   
图 2 以  $A_{p-p38}/A_{p38}$  反映 p-p38 的表达水平  
Figure 2 Expression of p-p38 reflected by  $A_{p-p38}/A_{p38}$

2.2 肺组织 ICAM-1 表达水平(图 3,图 4):A 组 ICAM-1 仅有较微弱的表达,B 组和 C 组表达水平较 A 组均显著增高( $P$  均  $< 0.01$ ),C 组 ICAM-1 表达水平也显著高于 B 组( $P < 0.01$ )。

2.3 肺组织中总蛋白、MPO 及 BALF 中 WBC、TNF- $\alpha$  和 MIP-2 的变化(表 1):B 组和 C 组各项指标均显著高于 A 组,且 C 组各项指标均显著高于 B 组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

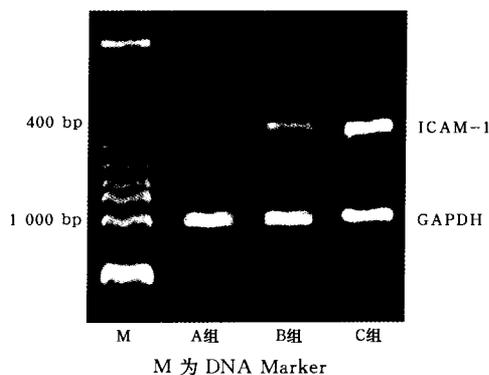
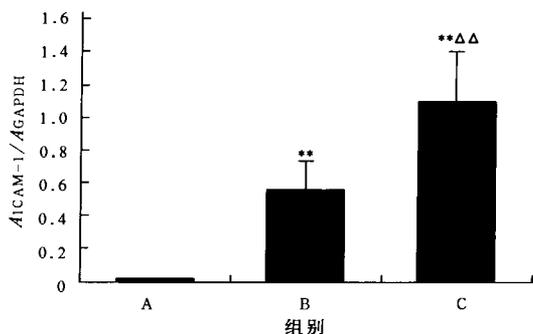


图 3 RT-PCR 检测大鼠肺组织 ICAM-1 的表达  
Figure 3 Expression of ICAM-1 in lung tissues of rats by RT-PCR



注:与 A 组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 B 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

图 4 以  $A_{ICAM-1}/A_{GAPDH}$  反映 ICAM-1 的表达水平

Figure 4 Expression of ICAM-1 reflected by  $A_{ICAM-1}/A_{GAPDH}$

表 1 各组肺组织中总蛋白、MPO 及 BALF 中 WBC、TNF- $\alpha$  和 MIP-2 的比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Comparison of total protein, MPO in lung tissues and WBC, TNF- $\alpha$  and MIP-2 in BALF in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	总蛋白(g/L)	MPO(U/g)	WBC( $\times 10^7/L$ )	TNF- $\alpha$ (ng/L)	MIP-2(ng/L)
A 组	0.16±0.04	0.32±0.08	22.0±7.1	12±3	92±11
B 组	2.10±0.80**	3.70±0.90**	110.0±59.0**	77±18**	219±79**
C 组	3.70±1.30** $\Delta$	5.30±1.60** $\Delta$	178.0±52.0** $\Delta$	111±30** $\Delta\Delta$	375±76** $\Delta\Delta$

注:与 A 组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 B 组比较: $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

2.4 肺组织病理改变(彩色插页图 5):A 组肺组织无明显的病理改变,肺泡间隔正常,偶见炎性细胞及巨噬细胞,肺泡腔无明显渗出物;B 组肺组织可见一定炎性损伤性改变,肺泡间隔增厚,肺泡腔内有一定数量炎性细胞,部分肺泡腔内有渗出液;C 组肺组织病理改变明显加重,肺泡间隔明显增厚,肺泡腔可见较多炎性细胞浸润,肺泡腔有较多的渗出物。

## 3 讨论

p38 通路激活时表现为 p38MAPK 发生磷酸化,形成 p-p38MAPK。MIP-2 是中性粒细胞重要的趋化因子,ICAM-1 调节中性粒细胞向内皮细胞

的黏附,二者在中性粒细胞向肺组织的浸润过程中均起着重要的调节作用。研究证明,p38 通路的激活在脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤的致病机制中发挥着重要作用,而 p38MAPK 的特异性阻断剂能显著抑制 MIP-2、TNF- $\alpha$  等多种致炎因子的表达以及中性粒细胞向肺组织的“募集”<sup>[6]</sup>。在本研究中,我们观察大鼠机械通气所致肺损伤时对 p38 通路激活的影响,以及 MIP-2、TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 等致炎因子的表达水平;同时检测了肺组织中总蛋白、MPO 和 BALF 中 WBC、TNF- $\alpha$  的水平,以总蛋白浓度反映肺水肿、损伤程度,以肺组织 MPO 水平反映中性粒细胞的浸润程度,以 TNF- $\alpha$  浓度反映炎症反应的程度。结果显示,小 V<sub>T</sub> 机械通气的 A 组并没有产生明显的肺损伤,肺组织病理结构无明显改变,总蛋白、WBC、MIP-2、TNF- $\alpha$  和 MPO 均处于较低水平,p-p38MAPK 和 ICAM-1 仅有较微弱的表达;大 V<sub>T</sub> 机械通气的 B 组发生了明显的 VILI,肺组织有较明显的炎性损伤改变,p-p38MAPK 的表达显著增加,总蛋白、WBC、MIP-2、TNF- $\alpha$  和 MPO 均显著增加,ICAM-1 的表达也显著增多,说明大 V<sub>T</sub> 机械通气明显激活了 p38 信号转导通路,使 MIP-2、ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  等致炎因子的表达显著增加,引起中性粒细胞向肺组织聚集,产生了明显的急性炎性损伤(即 VILI);C 组以更大的 V<sub>T</sub> 行机械通气,肺组织病理改变更加明显,中性粒细胞浸润程度明显增加,p-p38MAPK 的表达水平显著增加,MIP-2、ICAM-1、TNF- $\alpha$  等致炎因子及其他指标均显著增加。说明机械通气所致肺损伤的程度和 V<sub>T</sub> 有一定的关系,V<sub>T</sub> 越大,p38 信号转导通路的激活程度越高,MIP-2、ICAM-1、TNF- $\alpha$  等致炎因子的表达越多,中性粒细胞向肺组织的聚集越多,机械通气所致肺损伤程度越重。

p38 通路是近些年来研究炎症信号转导领域的热点之一。p38MAPK 在介导炎症、应激等多种细胞反应中起着重要的作用,是外界刺激信号传向细胞内的重要传递者。p38 通路激活后,细胞内无活性的未磷酸化 p38MAPK 蛋白分子上的苏氨酸和酪氨酸发生磷酸化,形成 p-p38MAPK。p-p38MAPK 可激活多种转录因子,如活化蛋白-1(AP-1)、活化转录因子-2(ATF-2)等,从而上调多种致炎因子的表达,如 TNF- $\alpha$ 、IL-8(MIP-2)、ICAM-1 等<sup>[5,7,8]</sup>。因此,本研究中大 V<sub>T</sub> 机械通气时 MIP-2、ICAM-1、TNF- $\alpha$  等致炎因子的表达显著增加可

能与 p38 通路的激活有关,p38MAPK 的激活可能在机械通气所致肺损伤的致病机制中起重要作用。

大鼠机械通气所致肺损伤时 p38MAPK 激活的机制还不十分清楚。大 V<sub>T</sub> 机械通气在肺细胞表面产生了过度的机械刺激(如牵拉、剪切力等),而机械刺激是机体很多细胞都能感应的重要外部刺激信号之一<sup>[9]</sup>。细胞研究证明,对人支气管上皮细胞施加一定的牵张刺激,能显著激活 p38 信号转导通路,激活转录因子 AP-1,导致 IL-8 等致炎因子的表达显著增多<sup>[10]</sup>。因此,大鼠机械通气所致肺损伤时 p38MAPK 激活可能是由于过度的机械刺激作用于肺细胞所致。大 V<sub>T</sub> 机械通气能显著激活 p38 信号转导通路,这可能是机械通气所致肺损伤的重要致病机制之一。

#### 参考文献:

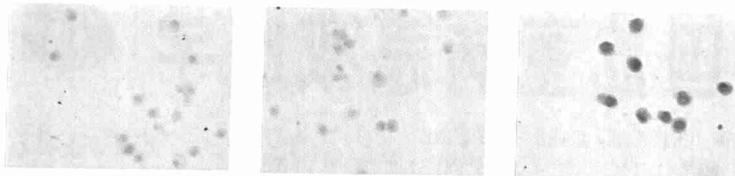
- 1 Liu M, Tanswell A K, Post M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(4Pt1): L667-683.
- 2 Li L F, Ouyang B, Choukroun G, et al. Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH2-terminal and nuclear factor-kappaB inducing kinases[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(2): L464-475.
- 3 Held H D, Boettcher S, Hamann L, et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(3Pt1): 711-716.
- 4 张新日, 杜永成, 姜宏英, 等. 中性粒细胞活化在呼吸机所致肺损伤中的作用[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(6): 367-369.
- 5 Nick J A, Avdi N J, Young S K, et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(5): 975-986.
- 6 Nick J A, Young S K, Brown K K, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation[J]. *J Immunol*, 2000, 164(4): 2151-2159.
- 7 Zu Y L, Qi J, Gilchrist A, et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF- $\alpha$  or FMLP stimulation[J]. *J Immunol*, 1998, 160(4): 1982-1989.
- 8 Detmers P A, Zhou D, Polizzi E, et al. Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in beta2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst[J]. *J Immunol*, 1998, 161(4): 1921-1929.
- 9 张敬刚, 刘又宁. 机械通气相关肺损伤与多系统脏器功能衰竭[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(12): 757-759.
- 10 Oudin S, Pugin J. Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(1): 107-114.

(收稿日期: 2006-04-24 修回日期: 2007-01-26)

(本文编辑: 李银平)

### 机械通气对大鼠肺泡巨噬细胞Toll样受体4表达的影响

(正文见73页)



R组:保持自主呼吸

M组:Vt为6 ml/kg

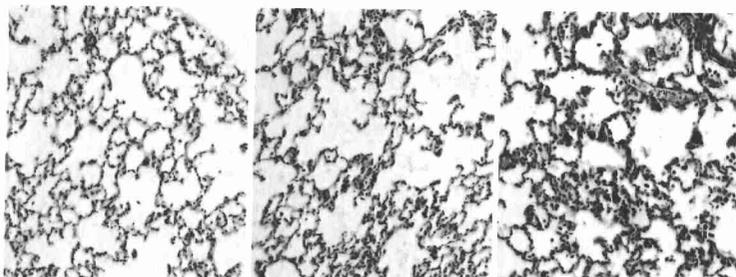
N组:Vt为40 ml/kg

图1 3组肺AM表面TLR4蛋白的表达(免疫组化,×400)

Figure 1 Expression of TLR4 protein on lung AM surface in three groups (immunohistochemistry, ×400)

### 大鼠机械通气所致肺损伤时p38丝裂原活化蛋白激酶通路的激活

(正文见77页)



A组:Vt为8 ml/kg

B组:Vt为20 ml/kg

C组:Vt为40 ml/kg

图1 3组肺组织病理改变(HE,×100)

Figure 1 Pathological change of lung tissues in three groups (HE, ×100)

### 机械通气状态下床旁气管和食管支架置入术(附5例报告)

(正文见117页)

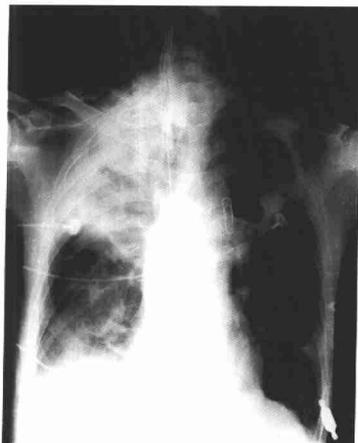


图1 食管支架置入:支架释放

Figure 1 Insertion of esophagus stent after release

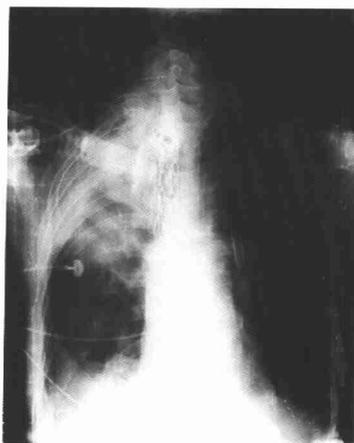


图2 食管支架置入:支架释放膨胀后

Figure 2 Insertion of esophagus stent after expansion