

· 论著 ·

机械牵张对人肺上皮细胞转分化的影响

张容 毛璞 傅威 庞晓清 王银燕 杨淳 何为群 刘晓青 黎毅敏

【摘要】 目的 研究周期性机械牵张刺激对人肺上皮细胞 BEAS-2B 向间质转分化的影响。**方法** 应用 FX-5000T 细胞牵张加载系统对 BEAS-2B 细胞以 0.33 Hz 频率分别施加 10% 或 20% 牵张应力 24、48 和 72 h, 相差显微镜下观察细胞形态变化; 应用免疫荧光双标染色和实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分别检测牵张前后 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、细胞角蛋白-8 (CK-8)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和波形蛋白 (Vimentin) 的蛋白及 mRNA 表达情况。**结果** ① 20% 病理牵张 48 h 后, BEAS-2B 细胞开始由鹅卵圆形变为长梭形, 牵张 72 h 细胞间隙明显增宽, 细胞长梭形改变更明显。10% 生理牵张下细胞形态无明显改变。② 免疫荧光双标染色结果显示, 20% 牵张 72 h 时 CK-8 蛋白表达明显下调, E-cadherin 表达明显下调, α -SMA 蛋白表达明显增强。③ 与未牵张对照组 (作为 1) 相比, 20% 牵张组 E-cadherin mRNA 表达在牵张 48 h 和 72 h 分别下调至 0.388 ± 0.056 和 0.247 ± 0.064 (均 $P < 0.05$), CK-8 mRNA 表达在牵张 72 h 下调至 0.436 ± 0.060 ($P < 0.01$), α -SMA mRNA 表达在牵张 48 h 和 72 h 分别上调至 1.437 ± 0.267 和 1.261 ± 0.247 (均 $P < 0.05$), Vimentin mRNA 表达在牵张 48 h 上调至 1.679 ± 0.172 ($P < 0.05$)。10% 牵张组 E-cadherin mRNA 表达在牵张 72 h 下调至 0.387 ± 0.081 ($P < 0.05$), Vimentin mRNA 表达在牵张 48 h 上调至 1.688 ± 0.179 ($P < 0.05$); 其余各指标变化不明显, 差异无统计学意义。**结论** 持续过度牵张能诱导人肺上皮细胞 BEAS-2B 发生上皮向间质转分化。

【关键词】 机械牵张; 上皮间质转化; 急性呼吸窘迫综合征; 肺上皮细胞

Effects of cyclic stretch on the induction of the transdifferentiation in human lung epithelial cells ZHANG Rong, MAO Pu, FU Wei, PANG Xiao-qing, WANG Yin-yan, YANG Chun, HE Wei-qun, LIU Xiao-qing, LI Yi-min. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, Guangdong, China
Corresponding author: LI Yi-min, Email: dryiminli@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of mechanical stretch induced epithelial-mesenchymal transition in human lung epithelial cells BEAS-2B in vitro. **Methods** The human lung epithelial cells BEAS-2B were subjected to cyclic stretch by the FX-5000T system at 0.33 Hz of 10% or 20% elongation for 24, 48 and 72 hours respectively. The morphologic changes were observed by microscopy. The mRNA and protein expressions of E-cadherin, Cytokeratin-8 (CK-8), α -smooth muscle actin (α -SMA) and Vimentin were evaluated by immunofluorescence before and after mechanical stretch and fluorescent quantitation reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** ① When stretch by 20% elongation for 48 hours, the morphological changes in BEAS-2B cells from cobblestone-like structure to elongated shape and obviously when stretch for up to 72 hours, while 10% elongation showed no significant morphological changes comparing to control. ② Decreasing E-cadherin and CK-8 protein expression was associated with increased immunostaining for α -SMA protein at 72 hours after 20% mechanical stretch. ③ Expression of E-cadherin mRNA was decreased to 0.388 ± 0.056 and 0.247 ± 0.064 after 20% mechanical stretch for 48 hours and 72 hours compared with control without stretch (set 1, both $P < 0.05$), expression of CK-8 mRNA was decreased to 0.436 ± 0.060 at 72 hours after 20% mechanical stretch ($P < 0.01$), α -SMA mRNA was increased to 1.437 ± 0.267 (48 hours) and 1.261 ± 0.247 (72 hours) after 20% mechanical stretch (both $P < 0.05$), and Vimentin mRNA was increased to 1.679 ± 0.172 (48 hours) after 20% mechanical stretch ($P < 0.05$). Expression of E-cadherin mRNA was decreased to 0.387 ± 0.081 at 72 hours after 10% mechanical stretch ($P < 0.05$), Vimentin mRNA was increased to 1.688 ± 0.179 at 48 hours after 10% mechanical stretch while other markers showed no significant changes comparing with control. **Conclusion** Excessive mechanical stretch could induce epithelial-mesenchymal transition in lung epithelial cells BEAS-2B in vitro.

【Key words】 Mechanical Stretch; Epithelial-mesenchymal transition; Acute respiratory distress syndrome; Lung epithelial cell

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.08.002

基金项目: 国家自然科学基金 (81000005, 81270125); 广东省科技计划项目 (2010B031600148)

作者单位: 510120 广东, 广州医学院第一附属医院, 广州呼吸疾病研究所, 呼吸疾病国家重点实验室 (张容、傅威、庞晓清、王银燕、杨淳、何为群、刘晓青、黎毅敏), 医院感染管理科 (毛璞)

通信作者: 黎毅敏, Email: dryiminli@vip.163.com

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是由各种肺内外致病因素导致的急性、进行性呼吸衰竭,由于缺乏特异有效的治疗方法,其病死率仍高达 36%~44%^[1]。研究表明,肺部进行性纤维增殖是影响 ARDS 患者抢救成功率及预后的主要原因之一^[2-3]。即便是幸存者,也会由于肺纤维化的发生而遗留不同程度的肺功能损害和运动能力下降^[4-5]。因此,ARDS 的肺纤维化进程及其发生机制是 ARDS 研究的重要方向。机械通气是 ARDS 患者重要的治疗手段之一,但不适当的机械通气会引发或加重肺损伤^[6]。然而关于机械通气对 ARDS 相关纤维化发生的影响一直未被重视。过度的机械牵张会引起肺上皮损伤,持续的上皮损伤可以导致病理性修复甚至纤维化发生^[7]。同时越来越多研究表明肌成母纤维细胞作为调节肺纤维化进程的关键细胞,其主要激活方式是通过局部上皮间质转化(EMT)过程实现的^[8-9]。因此本实验以人肺上皮细胞为研究对象,通过体外实验研究机械牵张对人肺上皮细胞 EMT 的影响,探讨机械通气在 ARDS 相关肺纤维化进程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料: Flexcell® Tension Plus FX-5000T 应变加载系统(Flexcell 公司,美国),鼠抗人 E-钙黏蛋白(E-cadherin)单克隆抗体(单抗)、鼠抗人波形蛋白(Vimentin)单抗(BD 公司,加拿大),鼠抗人细胞角蛋白-8(CK-8)单抗、兔抗人 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA, Abcam 公司,美国),山羊抗兔 Cy3 二抗和山羊抗鼠异硫氰酸荧光素(FITC, EarthOx 公司,加拿大)。TRIzol RNA 提取液(Invitrogen 公司,美国),SYBR 引物探针荧光定量聚合酶链反应(PCR)、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本);DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰酶(Gibco 公司,美国)。

1.2 细胞牵张和实验分组: 人肺上皮 BEAS-2B 细胞(ATCC, Rockville 公司,美国)在 37℃、5%CO₂ 孵箱中传代培养,以 4×10^5 密度接种至 Bioflex I 型胶原包被的硅胶弹性细胞双向拉力 6 孔牵张培养板,静置培养 24 h 后换用无血清培养基继续培养 12 h。实验使用的是细胞牵张力加载装置,加载程序由 FX-5000T 计算机软件自动控制。细胞所受力值大小由培养皿底部弹性膜拉伸应变率(%)表示。实验分为静止对照组、10%牵张组、20%牵张组 3 组。牵张频率为 0.33 Hz,以正弦波进行牵张,牵张时间分别为 24、48、72 h。各组细胞均置于 37℃、5%CO₂ 孵箱进行培养。每个实验重复 3 次。

1.3 细胞形态观察: 分别于牵张 24、48、72 h,相差

显微镜下观察细胞形态变化。

1.4 细胞免疫荧光: 将牵张刺激后的细胞以 2×10^4 接种于预先放有盖玻片的 24 孔培养板,用无血清培养基静置培养 24 h 后去除培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,4%多聚甲醛溶液固定,经羊血清封闭及 0.2%曲通-X100 室温孵育 5 min 室温打孔后,兔抗人 α -SMA 单抗(1:100)、鼠抗人 E-cadherin 单抗(1:200)孵育过夜,PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,用 FITC 标记的山羊抗鼠二抗和罗丹明标记的山羊抗兔二抗避光室温孵育 60 min, PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次,加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)孵育 10 min。荧光淬灭剂 5% PBS 甘油封片后,共聚焦显微镜下观察、成像。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR): 细胞受牵张刺激后,采用 TRIzol 提取细胞 RNA。经紫外分光光度法测定纯度和浓度后,按试剂盒说明书步骤进行逆转录 cDNA。应用 Premier 5.0 软件设计 E-cadherin、CK-8、 α -SMA 及 Vimentin 引物(表 1),均由上海英骏生物技术有限公司合成。qPCR 反应体系为 20 μ l [SYBG 引物探针 10 μ l, 上游引物 0.4 μ l, 下游引物 0.4 μ l, ROX 校正染料 0.4 μ l, cDNA 2 μ l, 蒸馏水(dH₂O) 6.8 μ l], 每孔设置 3 个复孔。qPCR 反应条件: 95℃ 预变性 30 s; PCR 95℃ 反应 5 s, 60℃ 退火 30 s, 40 个循环。根据 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算 E-cadherin、CK-8、 α -SMA 以及 Vimentin 的 mRNA 表达水平。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的扩增产物为内参照。

表 1 聚合酶链反应引物设计序列

基因	引物序列
E-cadherin	上游: 5'-GCCAAAGACAGAGCGGAACAT-3' 下游: 5'-ATGTGTTTCAGCTCAGCCAGC-3'
α -SMA	上游: 5'-CCGACCGAATGCAGAAGGA-3' 下游: 5'-ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA-3'
CK-8	上游: 5'-GAGGCATCACCAGCAGTTAC-3' 下游: 5'-TTGCTTCGAGCCGCTCTTCT-3'
Vimentin	上游: 5'-TGCCGTGGAAGCTGCTAACTAC-3' 下游: 5'-TAGGTGGCAATCTCAATGTC-3'
GAPDH	上游: 5'-TCCTCCACCTTTGACGCT-3' 下游: 5'-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC-3'

注: E-cadherin: E 钙黏蛋白, α -SMA: α 平滑肌肌动蛋白, CK-8: 细胞角蛋白-8, Vimentin: 波形蛋白, GAPDH: 三磷酸甘油醛脱氢酶

1.6 统计学处理: 采用 GraphPad Prism version 5.00c 统计软件处理数据, 计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牵张刺激对肺上皮细胞形态的影响(图 1): 各组肺上皮 BEAS-2B 细胞分别在牵张 24、48 和 72 h 后用显微镜观察细胞。未牵张的 BEAS-2B 细胞呈鹅卵圆形,细胞间连接紧密。10%生理牵张下细胞形态无明显改变。20%病理牵张 48 h 后,细胞开始由鹅卵圆形变为长梭形;牵张 72 h 后细胞间隙明显增宽,细胞长梭形改变更明显。随着牵拉时应变量的增加,细胞间空隙也随之增大。

2.2 不同牵张刺激对肺上皮细胞上皮、间质标志物蛋白表达水平的影响: 分别对 20%牵张 72 h 的细胞和未牵张的对照细胞进行免疫荧光双标染色,结果显示:与未牵张细胞比较,20%牵张 72 h 时细胞上皮标志物 CK-8 表达明显下调,间质标志物 α -SMA 表达则明显增强(图 2);上皮标志物 E-cadherin 表达明显下调, α -SMA 表达显著增加(图 3)。

2.3 不同牵张刺激对肺上皮细胞上皮、间质标志物 mRNA 表达水平的影响(表 2): qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,20%牵张 48 h、72 h 时,上皮标志物 E-cadherin mRNA 表达明显下降,以 72 h 更为明显(均 $P < 0.05$);10%牵张 72 h 时, E-cadherin mRNA 表达水平才出现明显下降($P < 0.05$)。上皮标志物 CK-8 mRNA 表达只有在 20%牵张 72 h 时才较对照组出现明显下降($P < 0.01$)。间质标志物 α -SMA mRNA 表达在 20%牵张 48 h、72 h 时均较对照组明显上调(均 $P < 0.05$)。而在 10%牵张作用下均无统计学差异。间质标志物 Vimentin mRNA 表达在受到 10%牵张和 20%牵张 48 h 时均显著高于对照组(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

肺纤维增殖的程度是影响 ARDS 预后的重要因素,ARDS 的肺纤维化进程及其发生机制是其研究的重要方向^[10]。早期有效控制肺纤维化的进程有可能改善 ARDS 患者的预后。Willis 等^[8]的研究结果使人们认识到,ARDS 肺间质纤维化是一个非正常的损伤修复过程,在损伤修复过程中处

于核心地位的是上皮细胞的损伤修复。肺泡上皮是由于呼吸机参数设置不当引起呼吸机导致肺损伤的重要部位。研究显示,在重症监护病房(ICU),超过

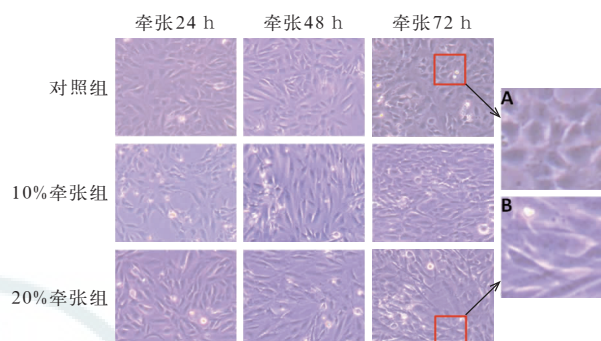


图 1 相差显微镜下观察人肺上皮 BEAS-2B 细胞受到不同牵张刺激后细胞形态改变 对照组和 10%牵张组牵张后不同时间点细胞形态无明显改变,呈鹅卵圆形,细胞间连接紧密;20%牵张组随牵张时间延长,细胞变为长梭形,细胞间隙明显增宽。A、B 分别代表对照组和 20%牵张 72 h 后细胞形态的高倍放大图

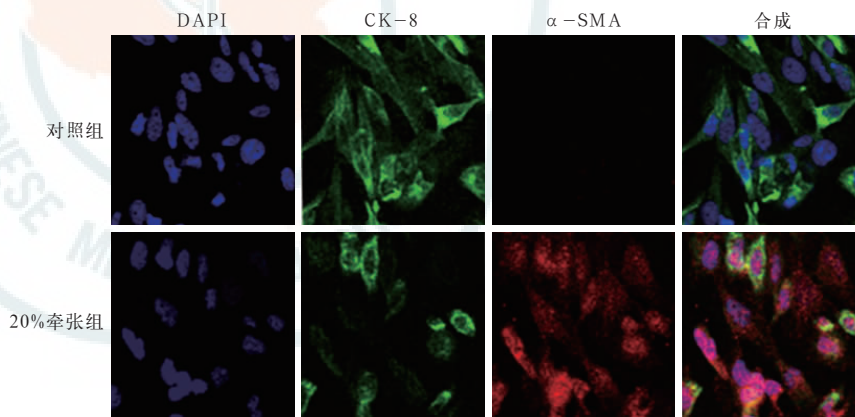


图 2 20%机械牵张人肺上皮 BEAS-2B 细胞 72 h 时细胞角蛋白-8(CK-8)的蛋白表达较对照组明显下调, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的蛋白表达较对照组明显增强 蓝色标记 DAPI,绿色标记 CK-8,红色标记 α -SMA 免疫荧光双标染色 低倍放大

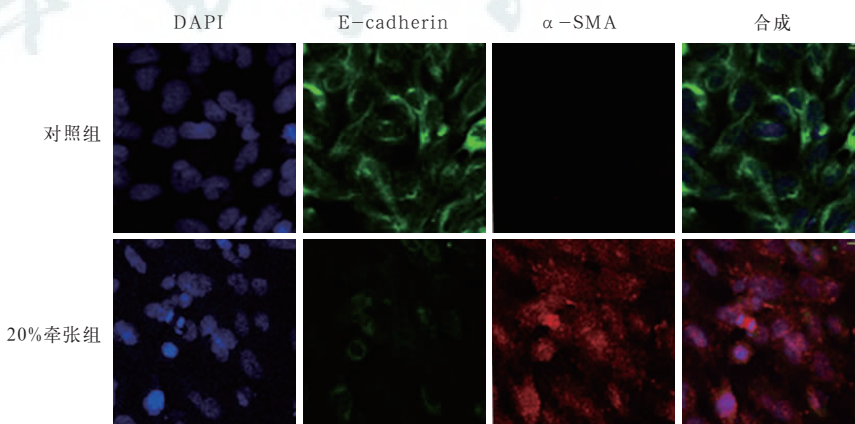


图 3 20%机械牵张人肺上皮 BEAS-2B 细胞 72 h 时 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的蛋白表达较对照组明显下调, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的蛋白表达较对照组明显增强 蓝色标记 DAPI,绿色标记 E-cadherin,红色标记 α -SMA 免疫荧光双标染色 低倍放大

表 2 不同牵张刺激对人肺上皮 BEAS-2B 细胞上皮、间质标志物 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	E-cadherin mRNA			CK-8 mRNA		
		牵张 24 h	牵张 48 h	牵张 72 h	牵张 24 h	牵张 48 h	牵张 72 h
对照组	3	1	1	1	1	1	1
10%牵张组	3	0.679 ± 0.124	0.695 ± 0.058	0.387 ± 0.081 ^a	0.879 ± 0.218	0.781 ± 0.176	1.016 ± 0.167
20%牵张组	3	0.774 ± 0.116	0.388 ± 0.056 ^a	0.247 ± 0.064 ^a	0.664 ± 0.150	0.682 ± 0.238	0.436 ± 0.060 ^b
组别	样本数	α -SMA mRNA			Vimentin mRNA		
		牵张 24 h	牵张 48 h	牵张 72 h	牵张 24 h	牵张 48 h	牵张 72 h
对照组	3	1	1	1	1	1	1
10%牵张组	3	1.570 ± 0.397	1.380 ± 0.164	0.721 ± 0.156	1.115 ± 0.075	1.688 ± 0.179 ^a	0.883 ± 0.153
20%牵张组	3	1.827 ± 0.593	1.437 ± 0.267 ^a	1.261 ± 0.247 ^a	1.266 ± 0.080	1.679 ± 0.172 ^a	0.996 ± 0.120

注: E-cadherin: E-钙黏蛋白, CK-8: 细胞角蛋白-8, α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白, Vimentin: 波形蛋白; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

80%行机械通气的 ARDS 患者出现不同程度的肺上皮损伤^[11]。如果过度牵张肺组织, 就足以引起肺上皮细胞的损伤, 持续的肺泡上皮细胞损伤导致修复过度可能是 ARDS 相关性肺纤维化发生的主要原因^[12]。

已有的临床证据表明, 机械通气患者发生肺部纤维化的概率较高。Papazian 等^[13]和 Martin 等^[14]分别对接受机械通气 5 d 和 12 d 的 ARDS 患者行开胸肺活检, 结果显示, 并发肺纤维化的发生率高达 53% 和 64%。呼吸机相关性肺损伤(VILI)动物模型研究也表明, 肺部胶原生成与不同的机械通气模式有关^[15]。肺是一个力学器官, 机械通气使肺泡反复充气, 对邻近的肺上皮细胞产生牵张作用^[6]。机械通气过程中肺上皮细胞受到机械牵张时会发生何种变化? 丁宁等^[16]的研究发现, 机械牵张可通过激活 MKK6 p38 α 信号通路, 诱导肺泡上皮细胞表达晚期糖基化终末产物受体。然而机械牵张力对肺上皮细胞转分化的影响, 目前国内尚未见相关报道。本实验通过建立体外机械牵张模型, 研究不同机械牵张应力对人肺上皮细胞转分化的影响。实验首先从细胞形态证实 20% 机械牵张诱导 BEAS-2B 细胞发生 EMT 改变, 研究结果显示, 未牵张的 BEAS-2B 细胞呈不典型的上皮细胞形态, 经过度的机械牵张刺激后, 部分细胞由鹅卵圆形转变为梭形长条样, 相邻细胞间连接变得疏松。为了进一步证实, 我们分别从基因和蛋白水平检测了 EMT 指标的变化情况, 研究结果显示, 20% 机械牵张刺激细胞后, 上皮标志物 E-cadherin 和 CK-8 表达明显减少, 间质标志物 α -SMA 和 Vimentin 表达上调, 提示 BEAS-2B 细胞受到牵张后向间质转分化。

EMT 是器官纤维化形成的重要机制之一, 其特点是一种已分化的细胞丧失其原有的表型特点而转变成其他类型的细胞^[17]。在肾纤维化和博莱霉素

诱导的肺纤维化进程中均观察到 EMT 的发生^[18-19]。EMT 的发生主要包括以下几个方面, 首先上皮细胞失去黏附特性, 标志物 E-cadherin 丢失。E-cadherin 是组成上皮细胞间紧密连接的重要成分, 在维持上皮细胞完整性和极性中具有不可或缺的作用, 继而胞质内细胞骨架重排, 出现 α -SMA 原位表达, 肌动蛋白骨架发生改变^[20]。目前公认, E-cadherin 表达丧失和 α -SMA 表达增加是上皮细胞发生 EMT 的重要标志^[20]。本研究结果发现, 肺泡上皮 BEAS-2B 细胞受到 20% 机械牵张 48 h、72 h 的刺激条件下, 细胞发生了不同程度的 EMT 改变, 尤以 72 h 为甚, 这与国外学者研究结果类似。Cabrera-Benítez 等^[21]发现 30% 机械牵张 48 h 可以诱导肺上皮细胞发生 EMT 改变; 另外, Heise 等^[22]对大鼠肺泡上皮细胞予以 15% 牵张力、0.86 Hz 频率的牵张条件刺激, 4 d 后发现细胞发生了 EMT 改变。本研究采用人肺上皮细胞、0.33 Hz 的牵张频率更能反映人生理状态的实验条件, 同时实验还观察了不同牵张强度及牵张时间对细胞的影响。而予以 10% 机械牵张的刺激下, 细胞未出现明显的 EMT 改变。Blaauboer 等^[23]的研究也表明, 模拟正常呼吸的牵张力可以减轻肺成纤维细胞的转分化作用。

Tschumperlin 等^[24]研究表明, 当肺上皮基底膜表面积增加 25% 时, 相当于 8% ~ 12% 牵张应力, 这是生理范围内的牵张; 当肺上皮基底膜表面积增加 37% ~ 50% 时, 相当于 17% ~ 22% 牵张应力, 这种病理性牵张会对细胞造成损伤。本实验应用 Flexcell 加载装置建立体外肺上皮细胞牵张模型, 采用 10% 和 20% 的牵张应力分别代表生理性牵张和病理性牵张, 研究不同牵张条件对 BEAS-2B 细胞 EMT 的影响。结果表明病理性牵张可以诱发细胞发生 EMT 改变, 提示不恰当的外力作用于肺部能导致许多病理状态发生。孙甲君等^[25]的临床研究也发现, 低牵张

通气策略较常规机械通气对救治 ARDS 具有更好的效果。因此,全面正确地理解机械牵张力作用于肺部引起的变化,有助于临床制订合理的治疗策略,以避免不恰当的机械通气引起的肺损伤。本实验初步建立了牵张诱导细胞 EMT 的体外模型,体外模型可以避免在体或离体肺组织遇到的各种复杂因素的影响,如感染、内分泌与神经递质以及肺血流剪切力等,从单纯机械力对肺上皮细胞牵张作用角度出发,更好地阐明机械牵张应力对肺上皮细胞转分化的影响。但单层培养的 BEAS-2B 细胞很难模拟人体的真实情况,期待建立更符合体内环境的培养体系,探讨人肺上皮细胞 EMT 变化在 ARDS 相关肺纤维化中的作用及其机制。

综上所述,本研究建立了机械牵张诱导细胞 EMT 变化的体外模型,结果显示,过度机械牵张可导致肺上皮细胞上皮标志物表达下降,间质标志物表达水平上调,诱导 BEAS-2B 细胞发生 EMT 变化,从细胞水平阐明过度机械牵张可通过启动肺上皮细胞向间质转化的过程参与肺纤维化的形成,提示研究机械牵张诱导肺上皮细胞的转化过程可能为进一步阐明 ARDS 肺纤维增殖的发病机制提供新的方向。

参考文献

- [1] Phua J, Badia JR, Adhikari NK, et al. Has Mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179: 220-227.
- [2] Burnham EL, Janssen WJ, Riches DW, et al. The Fibroproliferative Response in ARDS: Mechanisms and Clinical Significance [published online ahead of print March 21, 2013]. *Eur Respir J*, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23520315>. Accessed March 23, 2013.
- [3] 李晓峰, 欧阳彬, 吴健锋, 等. N-乙酰半胱氨酸对急性呼吸窘迫综合征肺纤维化的抑制作用. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 599-601.
- [4] Bienvenu OJ, Colantuoni E, Mendez-Tellez PA, et al. Depressive symptoms and impaired physical function after acute lung injury: a 2-year longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185: 517-524.
- [5] Herridge MS, Tansey CM, Matté A, et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 2011, 364: 1293-1304.
- [6] Gattinoni L, Protti A, Caironi P, et al. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. *Crit Care Med*, 2010, 38: S539-S548.
- [7] Strieter RM, Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*, 2009, 136: 1364-1370.
- [8] Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3: 377-382.
- [9] Lee K, Nelson CM. New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 294: 171-221.
- [10] Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 147-163.
- [11] Parambil JG, Myers JL, Aubry MC, et al. Causes and prognosis of diffuse alveolar damage diagnosed on surgical lung biopsy. *Chest*, 2007, 132: 50-57.
- [12] Dos Santos CC. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Med*, 2008, 34: 619-630.
- [13] Papazian L, Doddoli C, Chetaille B, et al. A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*, 2007, 35: 755-762.
- [14] Martin C, Papazian L, Payan MJ, et al. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest*, 1995, 107: 196-200.
- [15] Pelosi P, Rocco PR. Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix. *Intensive Care Med*, 2008, 34: 631-639.
- [16] 丁宁, 肖慧, 许立新, 等. MKK6 p38 α 信号通路在机械牵张诱导肺泡上皮细胞表达晚期糖基化终末产物受体中的作用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 597-600.
- [17] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139: 871-890.
- [18] Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*, 2009, 40: 1365-1376.
- [19] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 2002, 110: 341-350.
- [20] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 2009, 119: 1429-1437.
- [21] Cabrera-Benítez NE, Parotto M, Post M, et al. Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition. *Crit Care Med*, 2012, 40: 510-517.
- [22] Heise RL, Stober V, Cheluvvaraju C, et al. Mechanical stretch induces epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelia via hyaluronan activation of innate immunity. *J Biol Chem*, 2011, 286: 17435-17444.
- [23] Blaauw ME, Smit TH, Hanemaaijer R, et al. Cyclic mechanical stretch reduces myofibroblast differentiation of primary lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404: 23-27.
- [24] Tschumperlin DJ, Oswari J, Margulies AS. Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162: 357-362.
- [25] 孙甲君, 杨茂梧, 王长辉, 等. 低牵张通气策略救治急性呼吸窘迫综合征的临床研究. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 609-612.

(收稿日期: 2013-02-25)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞公司 (封二)
- ②浙江医药: 来可信 (插页)
- ③珠海健帆: 血液灌流器 (插页)
- ④德尔格: Carina 呼吸机 (插页)
- ⑤北京谊安: VT5250 呼吸机 (插页)
- ⑥天津生化制药: 琥珀氢可 (插页)
- ⑦广东天普药业: 绿色方舟计划 (插页)
- ⑧天津红日药业: 血必净注射液 (插页)
- ⑨罗氏诊断产品(上海)有限公司: 血气分析仪 (插页)
- ⑩第一制药: 克倍宁 (封三)
- ⑪江苏新晨: 艾贝宁®盐酸右美托咪定注射液 (封四)