

# 肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 9-髓样分化因子 88 信号通路在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究

戴惠军 潘灵辉 林飞 葛万运 李玮 贺盛

**【摘要】** 目的 探讨肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 9(TLR9)-髓样分化因子 88(MyD88)信号通路在呼吸机相关性肺损伤(VILI)中的作用。方法 清洁级 SD 大鼠 30 只,按随机数字表法将大鼠分为 3 组,每组 10 只。A 组保留自主呼吸作为对照;B 组给予正常潮气量( $V_T$ , 7 mL/kg)机械通气 4 h;C 组给予大  $V_T$ (40 mL/kg)机械通气 4 h。机械通气结束时,透射电镜下观察大鼠 II 型肺泡上皮细胞(AEC II)超微结构改变;测定肺组织湿/干质量(W/D)比值以及支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白、白细胞介素(IL-6、IL-1 $\beta$ )的浓度;用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的蛋白及其 mRNA 表达。结果 A、B 组大鼠 AEC II 细胞超微结构基本正常;C 组 AEC II 胞质内板层小体、细胞膜、细胞核中的染色质及微绒毛等均有不同程度的损伤性改变。C 组较 A 组、B 组肺组织 W/D 比值( $5.54 \pm 0.17$  比  $4.58 \pm 0.17$ 、 $4.69 \pm 0.16$ ), BALF 中总蛋白(g/L:  $6.33 \pm 0.61$  比  $0.45 \pm 0.05$ 、 $0.47 \pm 0.04$ )、IL-6( $\mu$ g/L:  $1.989 \pm 0.103$  比  $1.033 \pm 0.061$ 、 $1.010 \pm 0.069$ )、IL-1 $\beta$ (ng/L:  $2.79 \pm 0.25$  比  $1.05 \pm 0.15$ 、 $1.23 \pm 0.22$ ), 肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达 [TLR9 (A 值):  $0.770 \pm 0.042$  比  $0.300 \pm 0.027$ 、 $0.310 \pm 0.037$ , MyD88 (A 值):  $0.950 \pm 0.091$  比  $0.560 \pm 0.082$ 、 $0.580 \pm 0.084$ , NF- $\kappa$ B (A 值):  $1.020 \pm 0.076$  比  $0.740 \pm 0.052$ 、 $0.700 \pm 0.076$ ] 均明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。B 组肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达分别是 A 组的 ( $1.13 \pm 0.32$ ) 倍、( $1.18 \pm 0.33$ ) 倍、( $1.11 \pm 0.22$ ) 倍, 差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ); C 组肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达分别是 A 组的 ( $8.66 \pm 0.69$ ) 倍、( $6.41 \pm 0.53$ ) 倍、( $5.29 \pm 0.71$ ) 倍, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。结论 肺泡巨噬细胞 TLR9-MyD88 信号通路参与并介导了机械通气所致的肺损伤。

**【关键词】** 肺泡巨噬细胞; 机械通气; 呼吸机相关性肺损伤; Toll 样受体 9; 髓样分化因子 88

**Role and mechanism of signal pathway mediated by Toll-like receptor 9-myeloid differentiation factor 88 in alveolar macrophages in ventilator-induced lung injury in rats** Dai Huijun, Pan Linghui, Lin Fei, Ge Wanyun, Li Wei, He Sheng. Department of Anesthesiology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

Corresponding author: Pan Linghui, Email: plinghui@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of Toll-like receptor 9 (TLR9)-myeloid differentiation factor 88 (MyD88) signal pathway in alveolar macrophages in ventilator-induced lung injury (VILI). **Methods** 30 adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to three groups (with 10 rats in each group). Group A was the control group, with spontaneous respiration after tracheostomy. Rats in group B received mechanical ventilation for 4 hours with normal tidal volume ( $V_T$ ) 7 ml/kg after tracheostomy, and group C rats received mechanical ventilation with  $V_T$  40 ml/kg for 4 hours. After termination of ventilation, examination with transmission electron microscopy was performed to observe the ultrastructure changes in alveolar epithelial cell type II (AEC II) of the lung. Lung wet/dry ratios (W/D) and total protein concentration, the concentration of interleukins (IL-6 and IL-1 $\beta$ ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined. The protein and mRNA expressions of TLR9, MyD88 and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in alveolar macrophages were assayed by Western Blot and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The ultrastructure of AEC II in the group A and group B was almost normal, whereas the chromatin of the nuclei, the lamellar corpuscles in the cytoplasm, the cell membrane and the microvilli of the AEC II in the group C showed injurious changes in various degrees. When the group C was compared with the group A and the group B, it was shown that the W/D ratios ( $5.54 \pm 0.17$  vs.  $4.58 \pm 0.17$ ,  $4.69 \pm 0.16$ ) and total protein concentration (g/L:  $6.33 \pm 0.61$  vs.  $0.45 \pm 0.05$ ,  $0.47 \pm 0.04$ ), IL-6 ( $\mu$ g/L:  $1.989 \pm 0.103$  vs.  $1.033 \pm 0.061$ ,  $1.010 \pm 0.069$ ) and IL-1 $\beta$  (ng/L:  $2.79 \pm 0.25$  vs.  $1.05 \pm 0.15$ ,  $1.23 \pm 0.22$ ) in BALF, the protein expressions of TLR9, MyD88 and NF- $\kappa$ B [TLR9 (A value):  $0.770 \pm 0.042$  vs.  $0.300 \pm 0.027$ ,  $0.310 \pm 0.037$ ; MyD88 (A value):  $0.950 \pm 0.091$  vs.  $0.560 \pm 0.082$ ,  $0.580 \pm 0.084$ ; NF- $\kappa$ B (A value):  $1.020 \pm 0.076$  vs.  $0.740 \pm 0.052$ ,  $0.700 \pm 0.076$ ] in alveolar

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.05.001

基金项目:国家自然科学基金(81060008);广西研究生教育创新计划资助项目(YCSZ2012044)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学附属肿瘤医院麻醉科

通信作者:潘灵辉,Email:plinghui@hotmail.com

macrophages were all increased significantly, and all of which showed significant difference ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The mRNA levels of TLR9, MyD88 and NF- $\kappa$ B in alveolar macrophages in the group B were  $(1.13 \pm 0.32)$ ,  $(1.18 \pm 0.33)$ , and  $(1.11 \pm 0.22)$  folds of those of the group A, respectively, but there were no significant differences (all  $P > 0.05$ ). While the mRNA levels of TLR9, MyD88 and NF- $\kappa$ B of alveolar macrophages in the group C were  $(8.66 \pm 0.69)$ ,  $(6.41 \pm 0.53)$  and  $(5.29 \pm 0.71)$  folds of those of the group A, respectively, and all of them showed significant difference (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** TLR9-MyD88 signaling in alveolar macrophages plays a role in pathogenesis of VILI.

**【Key words】** Alveolar macrophage; Mechanical ventilation; Ventilator-induced lung injury; Toll-like receptor 9; Myeloid differentiation factor 88

机械通气是急性肺损伤 / 急性呼吸窘迫综合征 (ALI/ARDS) 的一种重要生命支持疗法, 但运用不当可导致肺损伤, 即呼吸机相关性肺损伤 (VILI)。Toll 样受体 (TLR) 是一种模式识别受体, 广泛表达于单核 / 巨噬细胞、树突细胞、淋巴细胞等免疫细胞, 并在非特异性免疫及特异性免疫应答中发挥着重要作用; 髓样分化因子 88 (MyD88) 则作为一种重要的接头蛋白参与了 TLR 介导的炎症信号转导<sup>[1-2]</sup>。本实验通过研究肺泡巨噬细胞 TLR9-MyD88 信号通路在 VILI 发生中的作用, 探讨该通路的作用机制, 为临床防治 VILI 提供新思路。

## 1 材料与方法

**1.1 主要实验仪器及试剂:** TOPO 型小动物呼吸机 (美国 KENT 公司), LKB-V 超薄电镜切片机 (瑞典 LKB 公司), H-500 型多功能透射电镜 (日本 Hitachi 公司), RocheLightCycler 480 II 荧光聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪 (德国 Roche 公司), Multiskan MK3 酶标仪 (德国 Thermo Scientific 公司), BCA 蛋白浓度试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 白细胞介素 (IL-6, IL-1 $\beta$ ) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司), 一步法总 RNA 提取试剂盒 TRIzol (美国生命技术有限公司), 绿色荧光染料混合物 (SYBR Green I Master Mix, 德国 Rothe 公司); TLR9、MyD88、核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 单克隆抗体 (一抗), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (美国赛信通生物技术有限公司)。

**1.2 实验动物分组及模型建立:** 健康清洁级成年雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 250 ~ 300 g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK (桂) 2013-0001。采用随机数字表法将大鼠分为自主呼吸对照组 (A 组)、机械通气正常潮气量 ( $V_T$ ) 组 ( $V_T$  7 mL/kg, B 组)、机械通气大  $V_T$  组 ( $V_T$  40 mL/kg, C 组) 3 组, 每组 10 只。腹腔注射氯胺酮 100 mg/kg、咪达唑仑 0.2 mg/kg 和阿托品 1.0 mg/kg 麻醉大鼠, 行气管切开、插管、机械通气; 股动脉插管用于监测动脉压; 股静脉插管建立静脉通道, 以  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  的速率静脉输注生理盐水, 维持肛温  $37.3 \sim 38.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。参

照文献 [3-4] 方法进行改良, 制备大鼠 VILI 模型; A 组保留自主呼吸。B 组和 C 组股静脉注射维库溴铵 0.1 mg/kg, 待自主呼吸消失后连接 TOPO 型小动物呼吸机行机械通气 4 h。机械通气参数: 吸呼比 (I : E) 为 1 : 1, 呼吸频率 (f) 80 次 / min, 吸入氧浓度 (FiO<sub>2</sub>) 0.50, 呼气末正压 (PEEP) 为 0。机械通气 4 h 后处死大鼠, 采集标本备检。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.3 肺泡巨噬细胞的提取及制备:** 参照文献 [5] 方法并改进, 分离肺泡巨噬细胞。用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 灌洗支气管肺泡, 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF)。离心取细胞沉淀, 用 PBS 洗涤, 取上清液,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  下保存备检; 细胞沉淀用含 10% 胎牛血清 (FBS)、20 kU/L 青霉素、30 kU/L 链霉素的 RPMI 1640 细胞培养液重悬, 取细胞沉淀置于细胞培养皿中, 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 3 h, 收集贴壁细胞, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 细胞培养液重悬, 将细胞密度调至  $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 。采用 Giemsa 染色法证实细胞纯度  $> 90\%$ , 采用锥虫蓝染色法鉴定细胞存活率  $\geq 95\%$ 。将肺泡巨噬细胞置于液氮中保存备检。

## 1.4 检测指标及方法

**1.4.1 透射电镜下观察 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II):** 取右肺中叶部分组织用戊二醛液固定, PBS 冲洗, 置于锇酸中固定, 应用乙醇和丙酮充分脱水后置于环氧树脂中包埋, 再用 100% 丙酮浸透, 超薄切片。切片经醋酸双氧铀 - 柠檬酸铅双重染色后, 在 H-500 型透射电镜下观察组织、细胞超微结构。

**1.4.2 肺湿 / 干质量 (W/D) 比值:** 取右肺中叶余下组织, 滤纸吸干表面水分, 称湿质量 (W), 置于  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  烘干箱 72 h 至恒重, 称干质量 (D), 计算肺 W/D 比值。

**1.4.3 BALF 中总蛋白测定:** 采用 BCA 法测定总蛋白浓度, ELISA 法测定 IL-6、IL-1 $\beta$  的浓度, 按试剂盒说明书操作。

**1.4.4 逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测细胞 TLR9、MyD88 和 NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达:** 取肺泡巨噬细胞, 按 TRIzol 说明书提取细胞总 RNA 20  $\mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 50 min,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  加热 15 min, 合成 cDNA, 然

后再进行 TLR9、MyD88 和 NF- $\kappa$ B 的 mRNA 基因扩增。TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 及内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物由上海生工合成。TLR9 上游引物:5'- CCTGGCACACAATGACATTCA-3', 下游引物:5'- TAAAGGTCCTCCTCGTCCCA-3', 扩增产物大小 117 bp; MyD88 上游引物:5'- GAGATCCGCGAG TTTGAGAC-3', 下游引物:5'- TTGTCTGTGGGACAC TGCTC-3', 扩增产物大小 228 bp; NF- $\kappa$ B 上游引物:5'-ACGATCTGTTTCCCCTCATC-3', 下游引物:5'-TG CTTCTCTCCCCAGGAATA-3', 扩增产物大小 150 bp; 内参 GAPDH 上游引物:5'-GGCACAGTCAAGGCTG AGAATG-3', 下游引物:5'-ATGGTGGTGAAGACGG CAGTA -3', 扩增产物大小 141 bp。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环。采用相对定量法  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  比较各指标表达的差异( $\Delta Ct$  值=目的基因 Ct 值 - GAPDH 的 Ct 值), 数据用仪器自带软件分析。

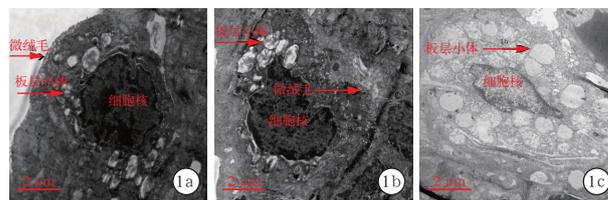
**1.4.5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞 TLR9、MyD88 和 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达:**取肺泡巨噬细胞, 按比例加入细胞蛋白裂解液和磷酸酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF), 冰上裂解后离心, 弃沉淀, 应用 BCA 法测定上清液中总蛋白浓度。取 80  $\mu$ g 总蛋白, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白转移至聚偏二氯乙烯(PVDF)膜上, 于 5% 脱脂奶中封闭 2 h, 洗涤后加 1:1 200 稀释的兔抗大鼠 TLR9 一抗, 或 1:1 200 稀释的兔抗大鼠 MyD88 一抗, 或 1:1 200 稀释的兔抗大鼠 NF- $\kappa$ B 一抗, 4 °C 孵育过夜。漂洗 PVDF 膜后加 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的小鼠抗兔 IgG 二抗, 室温下摇床杂交 1 h, 用 ECL 化学发光试剂显影底片, 用计算机软件对图像条带进行灰度扫描, 以目的蛋白/GAPDH 的吸光度(A 值)比值反映目的蛋白的相对表达水平。

**1.5 统计学处理:**应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析, 计量数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 不同处理组间比较采用方差分析或 *t* 检验, 组间多重比较采用 SNK 检验方法进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 透射电镜下观察 AEC II 超微结构改变(图 1):**A、B 两组 AEC II 细胞核及其边界清晰可见, 细胞核内染色质分布较均匀; 位于胞质内的板层小体呈椭圆形或圆形, 且板层小体的质地及密度分布较均匀; 细胞膜结构连续、完整, 微绒毛清晰可见。C 组 AEC II 细胞核固缩变小, 且明显变形, 核内的核仁已完全碎

裂成碎片, 核内染色质有不同程度的边集; 胞质内的板层小体有不同程度的空泡样改变, 其密度较 A、B 两组显著降低, 胞膜表面微绒毛结构也基本消失。



**图 1** 透射电镜下观察大鼠 II 型肺泡上皮细胞(AEC II)超微结构改变 自主呼吸对照组(a)细胞核完整, 边界清晰, 胞质内的板层小体密度均匀, 细胞膜连续、完整, 微绒毛排列规则; 机械通气正常潮气量(7 mL/kg)组(b)细胞质内的板层小体形态规则、完整, 密度均匀正常, 微绒毛清晰可见, 细胞核完整, 边界清晰, 细胞膜连续、完整; 机械通气大潮气量(40 mL/kg)组(c)细胞核变形明显、胞核固缩, 细胞质内的板层小体密度相对降低, 并且伴有不同程度的空泡样改变, 微绒毛结构基本消失 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色  $\times 1500$

**2.2 各组肺组织 W/D 比值及 BALF 中总蛋白浓度、IL-6、IL-1 $\beta$  表达比较(表 1):**与 A、B 组比较, C 组肺组织 W/D 比值及 BALF 中总蛋白、IL-6、IL-1 $\beta$  均明显升高(均  $P < 0.05$ ), 而 A、B 组间各指标比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

**表 1** 各组大鼠肺组织 W/D 比值及 BALF 中总蛋白、IL-6、IL-1 $\beta$  的比较( $\bar{x} \pm s$ )

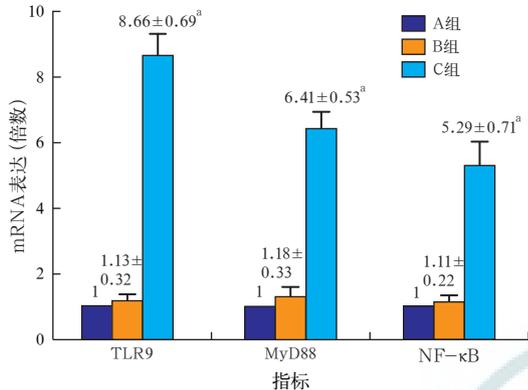
| 组别  | 动物数(只) | 肺 W/D 比值                      | 总蛋白(g/L)                      | IL-6( $\mu$ g/L)                | IL-1 $\beta$ (ng/L)           |
|-----|--------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| A 组 | 10     | 4.58 $\pm$ 0.17               | 0.45 $\pm$ 0.05               | 1.033 $\pm$ 0.061               | 1.05 $\pm$ 0.15               |
| B 组 | 10     | 4.69 $\pm$ 0.16               | 0.47 $\pm$ 0.04               | 1.010 $\pm$ 0.069               | 1.23 $\pm$ 0.22               |
| C 组 | 10     | 5.54 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup> | 6.33 $\pm$ 0.61 <sup>ab</sup> | 1.989 $\pm$ 0.103 <sup>ab</sup> | 2.79 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup> |

注: W/D 比值为湿/干质量比值, BALF 为支气管肺灌洗液, IL-6 为白细胞介素-6, IL-1 $\beta$  为白细胞介素-1 $\beta$ ; A 组为自主呼吸对照组, B 组为机械通气正常潮气量(7 mL/kg)组, C 组为机械通气大潮气量(40 mL/kg)组; 与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

**2.3 各组肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达比较(图 2):**B 组 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达量分别是 A 组的 (1.13  $\pm$  0.32) 倍、(1.18  $\pm$  0.33) 倍、(1.11  $\pm$  0.22) 倍, 但差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ ); C 组 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达量分别是 A 组的 (8.66  $\pm$  0.69) 倍、(6.41  $\pm$  0.53) 倍、(5.29  $\pm$  0.71) 倍, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。

**2.4 各组大鼠肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达比较(表 2; 图 3):**C 组 TLR9、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达量均较 A、B 组明显升高(均  $P <$

0.01); 而 A、B 两组之间 TLR9、MyD88、NF-κB 的蛋白表达比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。



注:TLR 为 Toll 样受体 9,MyD88 为髓样分化因子 88, NF-κB 为核转录因子 -κB; A 组为自主呼吸对照组, B 组为机械通气正常潮气量(7 mL/kg)组,

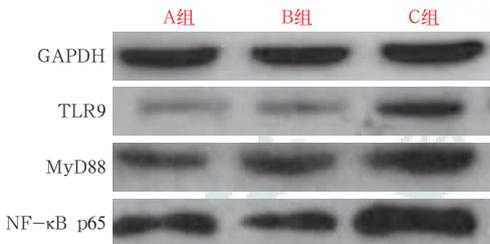
C 组为机械通气大潮气量(40 mL/kg)组;与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$

图 2 各组大鼠肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF-κB 的 mRNA 表达

表 2 各组大鼠肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF-κB 的蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 动物数(只) | TLR9(A 值)                   | MyD88(A 值)                  | NF-κB(A 值)                  |
|-----|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| A 组 | 10     | 0.300 ± 0.027               | 0.560 ± 0.082               | 0.740 ± 0.052               |
| B 组 | 10     | 0.310 ± 0.037               | 0.580 ± 0.084               | 0.700 ± 0.076               |
| C 组 | 10     | 0.770 ± 0.042 <sup>ab</sup> | 0.950 ± 0.091 <sup>ab</sup> | 1.020 ± 0.076 <sup>ab</sup> |

注:TLR 为 Toll 样受体 9,MyD88 为髓样分化因子 88,NF-κB 为核转录因子 -κB; A 组为自主呼吸对照组,B 组为机械通气正常潮气量(7 mL/kg)组,C 组为机械通气大潮气量(40 mL/kg)组;与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$



TLR9 为 Toll 样受体 9,MyD88 为髓样分化因子 88,NF-κB p65 为核转录因子 -κB p65,GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶; A 组为自主呼吸对照组,B 组为机械通气正常潮气量(7 mL/kg)组, C 组为机械通气大潮气量(40 mL/kg)组

图 3 蛋白质免疫印迹试验检测各组大鼠肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88、NF-κB 的蛋白表达

### 3 讨论

肺炎、脓毒症、创伤以及休克是 ALI 发病的主要因素;目前人们已逐渐认识到,VILI 已成为 ALI 的病因之一,其发生率在逐渐增高,据文献报道高达 15%<sup>[6]</sup>。VILI 是由于在通气过程中,对肺的异常机械张力刺激激活了细胞中炎症信号转导系统,导致大

量炎性细胞激活和炎症介质释放而引起的肺损伤。VILI 的发生发展实质是肺泡内的中性粒细胞和巨噬细胞等炎性细胞及其释放炎症递质介导的失控的“瀑布式”炎症反应,导致肺泡结构大量破坏而严重影响肺泡气体交换,从而最终参与介导并加重 VILI 的发生发展。因此,肺内炎症信号通路的激活是 ALI/ARDS 发生发展的重要环节。

在本实验中,过度机械通气 4 h 内大鼠 AEC II 细胞超微结构出现了明显的炎症破坏性改变:细胞核固缩变小,明显变形,核内的核仁已完全碎裂成碎片,核内染色质有不同程度的边集;胞质内的板层小体有不同程度的空泡样改变,密度相对降低,微绒毛结构也基本消失。肺 W/D 比值及 BALF 中总蛋白浓度是反映肺组织通透性的重要指标,说明过度的机械通气可导致肺泡内大量炎性蛋白渗出,使肺泡通透性明显增高,肺间质严重水肿,肺透明膜形成,从而严重影响了肺泡的通气 and 换气功能。以上结果证实,本实验中 VILI 大鼠模型基本制备成功。

肺泡巨噬细胞广泛分布于肺泡内以及支气管肺泡上皮表面,是气道固有免疫第一道防线的重要组成部分之一<sup>[7-9]</sup>。肺泡巨噬细胞在支气管肺泡局部的固有免疫防御及过度免疫可导致非细菌性炎症损害等作用,近年来备受关注。肺泡巨噬细胞在机械牵拉、感染等刺激作用下被激活,激活后的细胞不仅具有较强的吞噬功能,并且能合成分泌多种炎症因子如 IL-6<sup>[10]</sup>、IL-1β<sup>[11]</sup>、肿瘤坏死因子 -α(TNF-α)<sup>[12]</sup>等,诱发加重肺泡局部炎症反应<sup>[13-15]</sup>。实验研究表明,在肺泡巨噬细胞减少型 VILI 大鼠模型中,肺部炎症反应较 VILI 大鼠模型明显减轻,血清和 BALF 中炎症介质的含量亦明显减少<sup>[16-17]</sup>。提示肺泡巨噬细胞参与了 VILI 的发生发展,可能是 VILI 初始发病机制的重要因素之一。

TLR 是一类重要的模式识别受体,能特异性识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns,PAMPs),调节固有免疫和获得性免疫<sup>[18]</sup>。依据信号通路中接头分子的不同,TLR 信号通路可分为 MyD88 依赖型信号转导通路以及 MyD88 非依赖型/Toll/白细胞介素 -1 受体信号转导接头分子(TRIF)依赖型信号转导通路<sup>[19]</sup>。在 TLR 家族中,TLR1、TLR2、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 和 TLR9 介导的信号转导通路属于 MyD88 依赖型信号转导通路<sup>[20-21]</sup>。TLR9 位于细胞内膜上,其特异性配体——细菌未甲基化的胞嘧啶 - 磷酸 - 鸟嘌呤(CPG)-DNA 经内吞作用后,结合活化的 TLR9 并激活其下

游分子,介导炎症反应的发生发展<sup>[22]</sup>。近年研究发现,TLR9 通过识别自身坏死细胞的 DNA 而被激活,TLR9 被激活后又通过其 TIR 区与被招募的 MyD88 分子绑定,进而激活 MyD88 依赖型信号通路<sup>[23-26]</sup>。MyD88 被激活后可以招募丝氨酸-苏氨酸激酶白细胞介素-1 受体相关激酶 (IRAK4 及 IRAK1),并激活转化生长因子 G 激活激酶(TAK1),而 TAK1 的激活可引起 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[27-29]</sup>,进而导致 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等促炎症因子表达上调,从而介导局部炎症反应<sup>[30-31]</sup>。

综上所述,本研究结果显示,肺泡巨噬细胞 TLR9、MyD88 及 NF- $\kappa$ B 表达明显上调,且 BALF 中 IL-6、IL-1 $\beta$  含量亦明显升高。大 V<sub>T</sub> 机械通气 4 h 可导致肺脏机械性损伤,坏死细胞释放出的内源性 DNA 被肺泡巨噬细胞 TLR9 识别,激活 TLR9-MyD88 信号转导通路,使其下游分子 NF- $\kappa$ B、IL-6、IL-1 $\beta$  表达上调。提示 TLR9-MyD88 信号转导通路在机械通气诱发肺泡巨噬细胞分泌 IL-6、IL-1 $\beta$  并介导肺脏损伤性炎症反应中起重要作用。

#### 参考文献

- [1] Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(5): 1176-1180.
- [2] Li H, Su X, Yan X, et al. Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88 signaling contributes to ventilator-induced lung injury in mice [J]. *Anesthesiology*, 2010, 113(3): 619-629.
- [3] Walder B, Fontao E, Totsch M, et al. Time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2005, 22(10): 785-794.
- [4] 武庆平, 姚尚龙, 袁世炎. 呼吸机相关性肺炎动物模型的建立 [J]. *中华危重病急救医学*, 2005, 17(8): 501-502.
- [5] Seitz DH, Palmer A, Niesler U, et al. Altered expression of Fas receptor on alveolar macrophages and inflammatory effects of soluble Fas ligand following blunt chest trauma [J]. *Shock*, 2011, 35(6): 610-617.
- [6] Do-Umehara HC, Chen C, Ulrich D, et al. Suppression of inflammation and acute lung injury by Miz1 via repression of C/EBP- $\delta$  [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(5): 461-469.
- [7] 刘芬, 曾振国, 裴成, 等. 转染微小 RNA-146a 对肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(6): 335-338.
- [8] 尹华华, 夏浩, 朱京慈, 等. 创伤失血后大鼠单核/巨噬细胞分泌功能变化的异质性及其意义 [J]. *中华危重病急救医学*, 2006, 18(9): 523-526.
- [9] 刘芬, 曾振国, 丁成志, 等. 微小 RNA-146a 在脂多糖诱导肺泡巨噬细胞中的表达 [J]. *中华危重病急救医学*, 2010, 22(9): 540-542.
- [10] Hannink JD, van Hees HW, Dekhuijzen PN, et al. Non-invasive ventilation abolishes the IL-6 response to exercise in muscle-wasted COPD patients: a pilot study [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2012, 24(1): 136-143.
- [11] 白静慧, 丁环, 蒋雷, 等. 槲皮素对脓毒症急性肺损伤大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  / 白细胞介素-1 $\beta$  的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18(5): 293-295.
- [12] 曾振国, 龚洪翰, 李勇, 等. 参附注射液对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a 表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2012, 24(3): 166-169.
- [13] Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells [J]. *Science*, 2010, 327(5966): 656-661.
- [14] 汤展宏, 盘璇, 胡军涛, 等. 亚低温对急性肺损伤大鼠肺泡表面活性蛋白 A 含量的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2011, 23(4): 236-238.
- [15] Wu J, Yan Z, Schwartz DE, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury [J]. *J Immunol*, 2013, 190(7): 3590-3599.
- [16] Frank JA, Wray CM, McAuley DF, et al. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(6): L1191-1198.
- [17] Herold S, Tabar TS, Janssen H, et al. Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(10): 1380-1390.
- [18] 朱珊, 潘灵辉, 林飞, 等. Toll 样受体 3 和 4 在大鼠呼吸机相关肺损伤肺组织中的表达 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(6): 594-597.
- [19] Colegio OR, Medzhitov R. TLR Signaling and Tumour-Associated Macrophages [M]// *Tumour-Associated Macrophages*. Springer New York, 2012: 119-133.
- [20] Martinon F, Chen X, Lee AH, et al. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 411-418.
- [21] Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(2): 131-144.
- [22] Papatiantafyllou M. Innate immunity: TLR9 mutations reveal a new level of self tolerance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 12(1): 7.
- [23] Gowda NM, Wu X, Gowda DC. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria [J]. *J Immunol*, 2012, 188(10): 5073-5085.
- [24] Landrigan A, Wong MT, Utz PJ. CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides directly costimulate mouse and human CD4<sup>+</sup> T cells through a TLR9- and MyD88-independent mechanism [J]. *J Immunol*, 2011, 187(6): 3033-3043.
- [25] He W, Yu Q, Zhou Z, et al. CpG oligonucleotides induce an immune response of odontoblasts through the TLR9, MyD88 and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(2): 274-278.
- [26] Huang X, Yang Y. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(8): 787-796.
- [27] 左祥荣, 曹权, 阙军, 等. 白藜芦醇对内毒素急性肺损伤小鼠核转录因子- $\kappa$ B 及炎症反应的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20(1): 16-19.
- [28] 阮琼, 汪东颖, 杨爱东, 等. 清热燥湿方对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子- $\kappa$ B 蛋白及 mRNA 表达的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17(2): 87-89.
- [29] 卢晗, 葛赞, 洪广亮, 等. 血必净注射液对硫化氢急性中毒大鼠肺组织细胞因子及核转录因子- $\kappa$ B 的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19(6): 343-347.
- [30] Holm CK, Paludan SR, Fitzgerald KA. DNA recognition in immunity and disease [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(1): 13-18.
- [31] 林梵, 肖军, 张琛涛. 不同潮气量机械通气对大鼠肺小窝蛋白-1 及其相关信号转导酶表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(3): 154-158.

(收稿日期: 2013-09-29)

(本文编辑: 李银平)