

· 论著 ·

钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 在机械通气膈肌损伤和萎缩中的作用研究

石磊 郭虹 黄佳茹 马少林 陈小平 朱晓萍

【摘要】 目的 探讨钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 在机械通气所致膈肌损伤和膈肌萎缩中的作用。**方法** 将 24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为麻醉对照组(CON 组)、24 h 机械通气组(CMV 组)、24 h 机械通气 + 钙蛋白酶抑制剂组(CMVC 组)3 组, 每组 8 只。CON 组仅腹腔麻醉大鼠, 无机械通气和维持麻醉; CMV 组行控制性机械通气 24 h; CMVC 组在通气前 2 h 和通气 8、15、23 h 时分别皮下注射钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 4 mg/kg。术后观察各组大鼠膈肌超微结构、组织学改变及膈肌肌球蛋白重链(MHC)分型表达。**结果** ① 电镜下观察显示, CON 组肌原纤维排列整体, 线粒体形态正常。CMV 组膈肌肌纤维排列紊乱, “Z 线”消失, 线粒体空泡变等; 膈肌纤维损伤密度($\times 10^{-2}/\mu\text{m}^2$)显著高于 CON 组(36.8 ± 13.7 比 6.4 ± 6.3 , $t=6.373$, $P=0.001$)。CMVC 组膈肌超微结构改变较 CMV 组明显改善; 膈肌纤维损伤密度较 CMV 组明显降低(17.6 ± 9.1 比 36.8 ± 13.7 , $t=3.694$, $P=0.002$)。② 光镜下观察显示, CON 组膈肌肌纤维横截面形状规则, 无病理改变。CMV 组膈肌纤维横截面不规则, 内皮细胞肿胀, 中央核出现。CMVC 组病理改变较 CMV 组明显减轻。③ CMV 组大鼠膈肌 MHC 慢肌(MHCslow)和快肌(MHCfast)蛋白条带均较 CON 组变浅, 蛋白条带灰度值分别降低了 61.1% ($t=8.138$, $P=0.001$)和 77.1% ($t=8.844$, $P=0.001$), 以 MHCfast 降低更为显著。CMVC 组 MHCslow 和 MHCfast 蛋白条带灰度值较 CMV 组分别升高了 1.51 倍($t=4.601$, $P=0.010$)和 1.33 倍($t=2.859$, $P=0.011$), 以 MHCslow 升高更为显著。**结论** 24 h 机械通气可造成膈肌肌纤维损伤和肌萎缩, 而钙蛋白酶抑制剂能明显逆转上述改变, 提示钙蛋白酶在机械通气所致膈肌功能障碍中发挥了促进作用。

【关键词】 机械通气; 膈肌; 钙蛋白酶; 肌损伤; 肌萎缩

The effect of calpeptin on injury and atrophy of diaphragm under mechanical ventilation in rats Shi Lei*, Guo Hong, Huang Jiaru, Ma Shaolin, Chen Xiaoping, Zhu Xiaoping. *Department of Respiratory Diseases, Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China
Corresponding author: Zhu Xiaoping, Email: z_xping@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of calpeptin on diaphragmatic injury and atrophy under controlled mechanical ventilation in rats. **Methods** A total of 24 SPF Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into anesthetized control group (CON group), 24-hour controlled mechanical ventilation group (CMV group), and 24-hour CMV + treatment with calpeptin group (CMVC group), with 8 rats in each group. Animals in the CON group received an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium without CMV and continuous infusion of pentobarbital sodium. A small-animal ventilator was used for 24 hours in rats of CMV group. Rats of CMVC were treated with a specific calpain inhibitor calpeptin (4 mg/kg). The drug was injected subcutaneously 2 hours before and 8, 15 and 23 hours after mechanical ventilation. Changes in diaphragm ultrastructure, light microscopic picture, and myosin heavy chain (MHC) expression were observed. **Results** ① Alignment of myofilaments and normal Z-band, and the shape of mitochondria were maintained in CON group as revealed by electron microscope. The signs of misalignment of myofibrils, disruption of Z-band and vacuolar mitochondria were found in CMV group, and they were obviously improved in CMVC group. The density of muscle injury ($\times 10^{-2}/\mu\text{m}^2$) in CMV group was significantly higher than that in control group (36.8 ± 13.7 vs. 6.4 ± 6.3 , $t=6.373$, $P=0.001$), and that in CMVC group was significantly lowered (17.6 ± 9.1 vs. 36.8 ± 13.7 , $t=3.694$, $P=0.002$). ② In CON group, the diaphragm fibers appeared regular in cross section without pathologic change under light microscopy. Fuzzy muscle striations, irregular muscle fibers, centralized nuclei and swelling of capillary endothelial cells were observed in CMV group, while pathological changes in the CMVC group were milder significantly. ③ In CMV group, the density of MHCslow and MHCfast was lower compared with that of CON group, and the gray value was lowered by 61.1% ($t=8.138$, $P=0.001$) and 77.1% ($t=8.844$, $P=0.001$), respectively, especially in MHCfast. However, the gray values of MHCslow and MHCfast were increased by 1.51 folds ($t=4.601$, $P=0.010$), and 1.33 folds ($t=2.859$, $P=0.011$), respectively, after treatment with calpeptin, and the

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.08.005

基金项目: 国家自然科学基金(81170074)

作者单位: 200120 上海, 同济大学附属东方医院呼吸科(石磊、朱晓萍), ICU(马少林); 213003 江苏, 南京医科大学附属常州市第二人民医院(石磊); 750004 银川, 宁夏医科大学研究生院(郭虹、黄佳茹); 200092 上海, 同济大学医学院免疫教研室(陈小平) 通信作者: 朱晓萍, Email: z_xping@hotmail.com

elevation was more significantly in MHCslow. **Conclusions** Diaphragmatic injury and atrophy were found after CMV for 24 hours. Calpeptin could reverse the detrimental effects of CMV, and it suggested that calpain plays an important role in modulating the ventilator-induced dysfunction of the diaphragm.

【Key words】 Mechanical ventilation; Diaphragm; Calpain; Muscle injury; Muscle atrophy

机械通气是治疗急、慢性重症呼吸衰竭患者的必要手段^[1]。但膈肌活动缺如、无负荷承受等可导致呼吸机相关的膈肌功能障碍(VIDD)^[2],如控制性机械通气 12 h 即可出现膈肌收缩力下降并随通气时间延长而加重^[3]。且 VIDD 与撤机困难密切相关,研究表明 10 例机械通气(78.4 ± 42.8) d 且难以撤机的呼吸衰竭患者,经吸气肌锻炼跨膈压提高后 9 例患者成功脱机^[4];在重症监护病房(ICU),约 30%的机械通气患者存在脱机困难^[5]。因此,探讨 VIDD 的机制对救治临床危重症机械通气患者具有重大的临床意义。

钙蛋白酶(calpain)是一族钙离子依赖性的、水解半胱氨酸的蛋白酶,在肌细胞内“Z 线”中浓度最高,其主要作用是降解细胞骨架蛋白和蛋白激酶等。钙蛋白酶可通过切割骨架蛋白协同 ATP 依赖的泛素蛋白酶体途径(UPP)降解肌纤维蛋白^[6]。但它对骨架蛋白的起始拆分也伴随着肌损伤^[7]。骨架蛋白能够维持肌纤维内相邻肌节于一体,以保证肌节三维结构的完整性。快速肌萎缩时,骨骼肌中钙蛋白酶活性是正常肌肉的数倍,呈现特征是“Z 线”降解^[6]。另外,膈肌萎缩也是导致 VIDD 的原因。在各种分解代谢状况下,80%~90%肌纤维蛋白通过 UPP 降解^[6]。但 UPP 只能降解游离的肌动蛋白和肌球蛋白,肌纤维蛋白与肌节相连的骨架结构具有抵挡 UPP 降解收缩蛋白的作用。研究提示钙蛋白酶可能作用于 UPP 上游发挥协同作用^[6]。calpeptin 是一种可穿过细胞膜的钙蛋白酶抑制剂,能有效抑制钙蛋白酶主要活性组分钙蛋白酶-1 和钙蛋白酶-2 的活性^[8]。因此,本研究假设钙蛋白酶在机械通气肌损伤和肌萎缩中发挥促进作用,观察特异性钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 对 VIDD 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组处理:24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 320~410 g,由上海中医药大学动物中心提供,许可证号:SYXK(沪)2009-0069。按计算机生成的随机数字表法将大鼠分为 3 组:麻醉对照组(CON 组)、24 h 机械通气组(CMV 组)、24 h 机械通气+钙蛋白酶抑制剂组(CMVC 组),每组 8 只。

1.1.1 CON 组:腹腔注射戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉大鼠,胸腹联合切开取膈肌。无机械通气和长时间的

维持剂量麻醉。

1.1.2 CMV 组:气管插管,接小动物呼吸机行控制性机械通气,呼吸频率 80 次/min,潮气量 10 mL/kg,吸气峰压 12 cmH₂O (1 cmH₂O=0.098 kPa),呼气末正压(PEEP)1 cmH₂O。股静脉置管泵入 2 mL·kg⁻¹·h⁻¹生理盐水和 10 mg·kg⁻¹·h⁻¹戊巴比妥钠。尾端无创血压计监测鼠尾血压,24 h 时取腹主动脉血约 100 μL 进行血气分析。间隔 2 h 肌肉注射 0.04 mg/kg 格隆溴铵 1 次,以减少呼吸道分泌物。胃肠营养给予营养液 69 mL/d(糖:脂肪:蛋白质为 50:35:15)。整个通气过程中给予毛毯保暖、排空膀胱、活动肢体及吸出气道分泌物等重症护理。

1.1.3 CMVC 组:通气前 2 h 和通气中 8、15、23 h 分别皮下注射 calpeptin 4 mg/kg(Sigma 公司,美国)。其余实验步骤同 CMV 组。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法:术后胸腹联合切开,取 1 cm×1 cm×1 cm 的膈肌标本 4 块,置于 4%戊二醛中 4℃保存,用于电镜观察。取左侧膈肌 1 cm×1 cm 的标本 1 块,置于 10%甲醛溶液中 4℃保存,用于苏木素-伊红(HE)染色。取右侧膈肌迅速切割成 2 块,冻存管-80℃保存,用于蛋白提取。

1.2.1 超微结构观察:取 4%戊二醛固定的膈肌组织,进行切片制作及图像采集。随机选取 30 个视野的膈肌肌纤维图像定量评价肌损伤。肌损伤计数标准参照文献[9]方法,随后计算损伤密度[损伤密度($\times 10^{-2}/\mu\text{m}^2$)=损伤数量/图像面积]。

1.2.2 病理学观察:甲醛固定膈肌标本 24 h 后石蜡包埋,进行 HE 染色,并结合 ImagePro Plus 6.0 病理图像分析软件,随机选取 24 个视野,观察膈肌肌纤维横截面形状、细胞核分布、毛细血管内皮细胞完整、胞质染色等情况。

1.2.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测膈肌组织肌球蛋白重链(MHC)的表达:剪碎组织块,加入裂解液冰上裂解 30 min。13 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 10 min 去除细胞碎片后,测定蛋白含量。取 40 μg 样品与上样缓冲液混合,煮沸 5 min,进行 8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转硝酸纤维素膜后,置于含 5%胎牛血清(BSA)蛋白溶液中室温下封闭 1 h,分别加入

MHC 慢肌(MHCslow)一抗(ab11083)和 MHC 快肌(MHCfast)一抗(F18)4℃过夜,然后加山羊抗小鼠二抗,电化学发光(ECL)试剂检测,将胶片进行拍照,用凝胶图像处理系统分析目标条带的灰度值,并用三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)内参蛋白灰度值校正结果。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组间两两比较用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物生理指标改变(表 1):实验过程中,CMV 组和 CMVC 组大鼠的 pH 值、动脉血氧分压(PaO₂)和动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)均维持在生理范围内。3 组大鼠体重、心率、收缩压比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.2 膈肌超微结构改变(图 1):CON 组肌原纤维排列整齐,明暗带界线清晰,“Z 线”及相邻两条“Z 线”之间的肌节均清晰可见,线粒体形态正常。CMV 组肌纤维排列紊乱,大小不一,肌纤维间隙增宽,明暗带局部界线不清晰,“Z 线”部分消失,可见线粒体呈空泡变,并在肌丝间可见散在少量脂质空泡。CMVC 组肌原纤维排列整齐,明暗带界线清晰,均可见到“Z 线”及相邻两条“Z 线”之间的肌节,偶见线粒体肿胀和嵴减少等变性。随机选取 30 个视野的肌纤维图像定量评价肌损伤,发现 CMV 组膈肌纤维损伤密度($\times 10^{-2}/\mu\text{m}^2$)明显高于 CON 组(36.8 ± 13.7 比 6.4 ± 6.3 , $t=6.373$, $P=0.001$);CMVC 组膈肌纤维损伤密度明显低于 CMV 组(17.6 ± 9.1 比 36.8 ± 13.7 , $t=3.694$, $P=0.002$)。

2.3 膈肌组织学改变(图 2):CON 组膈肌肌纤维横截面形状规则,细胞核分布正常,毛细血管内皮细胞完整,肌细胞胞质染色均匀。CMV 组肌纤维横截面呈不规则凹陷、分叶状及锐角形,出现细胞内核,肌纤维间距增宽,间质细胞增多,局部见肌横纹模糊,

毛细血管丰富,内皮细胞明显肿胀,可见坏死纤维和炎性细胞浸润。CMVC 组膈肌肌纤维横截面形状规则,细胞核分布于边缘,肌纤维间距较 CON 组略增宽,但毛细血管形态正常。

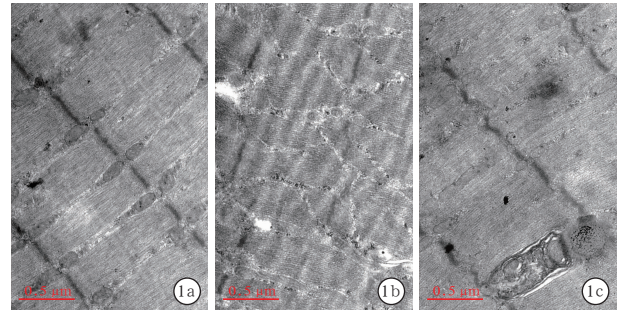


图 1 电镜下观察各组大鼠膈肌超微结构改变 麻醉对照组(a)肌原纤维排列整齐,“Z 线”清晰,线粒体形态正常;24 h 机械通气组(b)肌纤维排列紊乱,“Z 线”部分消失,部分线粒体萎缩;24 h 机械通气+钙蛋白酶抑制剂组(c)肌原纤维排列整齐,“Z 线”清晰,偶见线粒体肿胀 钡-铅双染 $\times 30\,000$

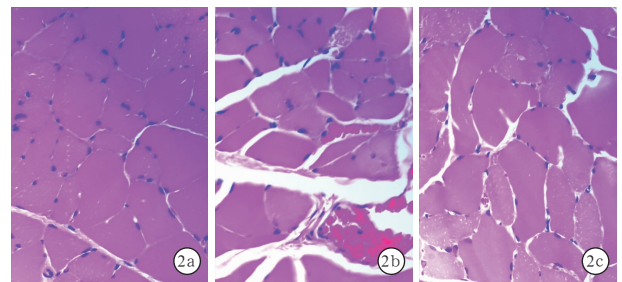


图 2 光镜下观察各组大鼠膈肌组织学改变 麻醉对照组(a)肌纤维横截面形状规则,细胞核分布于肌细胞边缘,毛细血管内皮细胞完整;24 h 机械通气组(b)肌纤维横截面局部萎缩,出现细胞中央核,毛细血管丰富,内皮细胞肿胀;24 h 机械通气+钙蛋白酶抑制剂组(c)肌纤维横截面形状规则,毛细血管内皮略有肿胀 HE 高倍放大

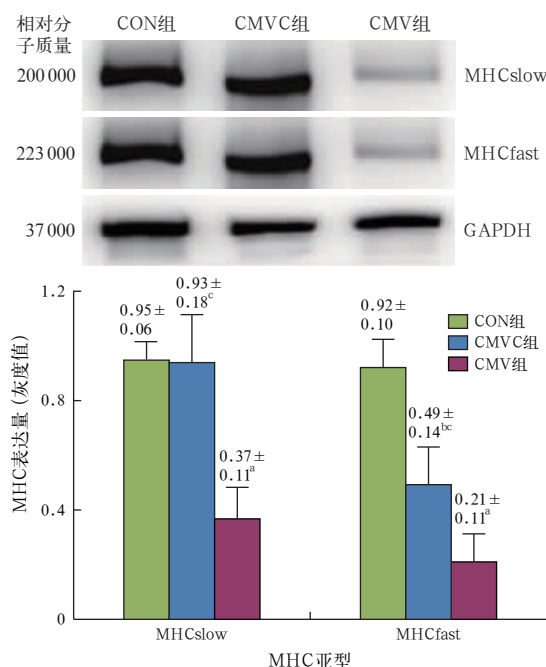
2.4 膈肌组织 MHC 表达(图 3):CMV 组大鼠膈肌 MHCslow、MHCfast 蛋白条带较 CON 组明显变浅, MHCfast 蛋白条带几近消失;CMV 组 MHCslow 和 MHCfast 蛋白条带灰度值分别较 CON 组降低了 61.1%和 77.1%($t_1=8.138$, $t_2=8.844$, 均 $P=0.001$),以 MHCfast 降低更为显著。而 CMVC 组 MHCslow 和 MHCfast 蛋白条带灰度值分别较 CMV 组升高了

表 1 各组大鼠实验过程中体质量、血气和血压的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	体质量(g)	pH 值	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	心率(次/min)	收缩压(mmHg)
CON 组	8	363 ± 21				343 ± 27	123 ± 12
CMV 组	8	353 ± 22	7.41 ± 0.03	95.48 ± 8.18	41.55 ± 2.90	346 ± 26	123 ± 12
CMVC 组	8	368 ± 27	7.40 ± 0.02	93.43 ± 8.13	39.41 ± 3.16	350 ± 22	121 ± 11
检验值		$F=0.784$	$t=0.622$	$t=0.503$	$t=1.410$	$t=0.969$	$t=0.279$
P 值		0.470	0.544	0.623	0.180	0.381	0.757

注:CON 组为麻醉对照组,CMV 组为 24 h 机械通气组,CMVC 组为 24 h 机械通气+钙蛋白酶抑制剂;PaO₂ 为动脉血氧分压,PaCO₂ 为动脉血二氧化碳分压;1 mmHg=0.133 kPa;空白代表未测

1.51 倍和 1.33 倍 ($t_1=4.601$ 、 $P=0.010$, $t_2=2.859$ 、 $P=0.046$), 且以 MHCslow 升高幅度更显著。CMVC 组 MHCslow 蛋白条带灰度值与 CON 组无差异, 蛋白条带灰度值仅降低了 2.1% ($t=0.191$, $P=0.858$); MHCfast 蛋白条带仍浅, 蛋白条带灰度值较 CON 组降低了 46.7% ($t=4.448$, $P=0.011$)。



注: Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, MHC 为肌球蛋白重链, MHCslow、MHCfast 为 MHC 慢肌、快肌, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶; CON 为麻醉对照组, CMVC 为 24 h 机械通气 + 钙蛋白酶抑制剂组, CMV 为 24 h 机械通气组; 与 CON 组比较, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.05$; 与 CMV 组比较, ^c $P<0.05$

图3 Western Blot 检测各组大鼠膈肌组织 MHC 的表达

3 讨论

本研究发现, 24 h 机械通气可造成大鼠膈肌明显的肌损伤及快肌和慢肌萎缩, 钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 能够明显逆转膈肌损伤和肌萎缩, 提示钙蛋白酶在机械通气所致膈肌损伤和肌萎缩中发挥了促进作用。

研究证实, 早期的膈肌损伤可能早于肌萎缩的出现^[7]。因此, 本研究着重研究了钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 对膈肌形态学结构的影响, 并定量评价了超微结构下膈肌的损伤程度。结果发现, calpeptin 可有效减轻控制性通气所致的肌纤维排列紊乱、断裂和肌横纹模糊等肌损伤, 这可能与钙蛋白酶在肌细胞内的分布位置及其作用有关。钙蛋白酶在“Z 线”中浓度最高, 其主要作用是降解细胞骨架蛋白, 它通过切割肌联蛋白和中间肌丝结蛋白等骨架蛋白协同

UPP 蛋白降解作用^[7,10]。但肌动蛋白复合物的起始拆分也伴随着肌损伤, 如中间丝蛋白结蛋白可维持肌纤维内相邻的肌节于一体, 以保证肌节三维结构的完整性^[11]。另外, Udaka 等^[12]报道下肢制动和肌肉废用后出现粗肌丝长度下降与粗肌丝长度的均一性下降, 而抑制钙蛋白酶活性后, 粗肌丝长度增加, 被动张力好转, 提示肌联蛋白通过调节粗肌丝长度维持肌节装配完整。钙蛋白酶切割骨架蛋白的片段会渗出肌纤维, 使结构紊乱, 肌纤维功能异常。另外, 本研究还发现, 钙蛋白酶抑制剂能减少控制性通气导致的脂质空泡增加。在某些萎缩性肌病中, 胞质空泡代表了继发于溶酶体参与的肌纤维自噬过程导致的肌损伤。有研究提示钙蛋白酶的激活与自噬有直接关系。在对缺血/再灌注损伤小鼠的肝脏研究中发现, 使用钙蛋白酶抑制剂能阻止钙超载和钙蛋白酶的激活, 使自噬相关蛋白消耗和自噬相关基因 Beclin-1 的表达降低^[13]。作为肌力产生的基本单位——肌小节损伤及破坏, 胶原纤维增多及肌纤维形状异常, 核形态及线粒体形态异常等均会导致膈肌收缩强度和耐力下降, 造成脱机困难。此外, 本研究光镜下观察到机械通气导致了肌纤维细胞核中央化。有研究发现, 慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者膈肌约 15% 的肌纤维横截面可以看见中央核^[14], 中央核产生可能代表了肌肉再生的适应性改变。

本研究证实, 24 h 机械通气造成大鼠膈肌快肌和慢肌普遍萎缩, 以快肌萎缩更明显, 这与既往的研究结果一致且有可比性。van Hees 等^[9]发现, 机械通气 18 h 后, 大鼠膈肌 MHC 总含量降低了约 25%; 机械通气 12 h 后, 大鼠膈肌 MHCslow 和 MHC2A 横截面积分别减少了约 17% 和 23%, 以 MHC2A 横截面积减少更明显^[3]。研究表明, 在多种病理状态下, 肌肉蛋白分解加剧在骨骼肌萎缩中占主导地位^[6]。在机械通气过程中, UPP 系统、钙蛋白酶系统及溶酶体自噬系统 3 个蛋白水解途径均被激活, 其中 UPP 系统占主导地位。一项对脑死亡机械通气患者的研究发现: 机械通气 18 ~ 69 h 可以造成膈肌纤维明显肌萎缩, 膈肌中泛素连接酶肌肉萎缩 F-box (MAFbx) 和肌肉环脂蛋白 (MuRF1) mRNA 表达明显增高^[15]。虽然 80% ~ 90% 的蛋白通过 UPP 降解, 然而 UPP 不能直接降解完整的肌动球蛋白。本研究结果显示, 钙蛋白酶抑制剂可使机械通气条件下膈肌 MHCslow 和 MHCfast 蛋白表达明显升高, 逆转了大部分控制性通气所致的膈肌萎缩。钙蛋白酶很可能是 UPP 降解蛋白必需的上游激活系统, 协同降解蛋白。Smith

和 Dodd^[16]将大鼠膈肌置于含 3.5 mmol/L Ca^{2+} 的克-林重碳酸盐缓冲液(KRB)中,总蛋白含量减少 65%;而加入钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 后,总蛋白量明显上升。

本研究结果显示,24 h 机械通气造成大鼠膈肌快肌减少更明显,这可能提示肌肉损伤与适应性改变相关。膈肌可通过两种方式改变慢肌和快肌的比例,一种是萎缩或肥大某类肌纤维,另一种是从某类肌纤维类型向另一种转变。这种短期(<48 h)机械通气引起的膈肌由快肌向慢肌的转变有利于减少最大收缩力,通过有氧代谢获能更能耐受疲劳,calpeptin 可能通过抑制钙蛋白酶活性减缓快肌向慢肌转变的速度,减少膈肌收缩功能障碍的发生。

4 结 论

本研究发现,短期的机械通气可导致膈肌肌纤维结构损伤和肌萎缩,而钙蛋白酶抑制剂则能明显逆转此情况,提示钙蛋白酶在机械通气条件下膈肌损伤和肌萎缩中发挥了重要的调节作用。进一步的研究将在肌细胞水平阐明钙蛋白酶对肌萎缩是否有直接的调节作用,以及明确机械通气条件下钙蛋白酶是否作用于 UPP 系统上游协同降解肌纤维蛋白导致肌萎缩,为对抗机械通气时肌萎缩和损伤的治疗药物寻找理论依据。

参考文献

- [1] 秦英智. 关注长期机械通气患者的程序化管理[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(3): 130-131.
- [2] Sieck GC, Mantilla CB. Effect of mechanical ventilation on the diaphragm[J]. N Engl J Med, 2008, 358(13): 1392-1394.
- [3] Zhu E, Sassoon CS, Nelson R, et al. Early effects of mechanical ventilation on isotonic contractile properties and MAF-box gene expression in the diaphragm [J]. J Appl Physiol (1985), 2005, 99(2): 747-756.
- [4] Martin AD, Davenport PD, Franceschi AC, et al. Use of inspiratory muscle strength training to facilitate ventilator weaning: a series of 10 consecutive patients [J]. Chest, 2002, 122(1): 192-196.
- [5] 秦英智. 关注困难脱机的研究现状 [J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(2): 65-67.
- [6] Russell AP. Molecular regulation of skeletal muscle mass [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(3): 378-384.
- [7] Salazar JJ, Michele DE, Brooks SV. Inhibition of calpain prevents muscle weakness and disruption of sarcomere structure during hindlimb suspension [J]. J Appl Physiol (1985), 2010, 108(1): 120-127.
- [8] Nozaki K, Das A, Ray SK, et al. Calpainin hibiition attenuates intracellular changes in muscle cells in response to extracellular inflammatory stimulation[J]. Exp Neurol, 2010, 225(2): 430-435.
- [9] van Hees HW, Schellekens WJ, Andrade Acuña GL, et al. Titin and diaphragm dysfunction in mechanically ventilated rats [J]. Intensive Care Med, 2012, 38(4): 702-709.
- [10] Smith IJ, Lecker SH, Hasselgren PO. Calpain activity and muscle wasting in sepsis [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 295(4): E762-771.
- [11] Goll DE, Netti G, Mares SW, et al. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains [J]. J Anim Sci, 2008, 86(14 Suppl): E19-35.
- [12] Udaoka J, Ohmori S, Terui T, et al. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization [J]. J Gen Physiol, 2008, 131(1): 33-41.
- [13] Kim JS, Wang JH, Biel TG, et al. Carbamazepine suppresses calpain-mediated autophagy impairment after ischemia/reperfusion in mouse livers [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 273(3): 600-610.
- [14] Macgowan NA, Evans KG, Road JD, et al. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1654-1659.
- [15] Levine S, Nguyen T, Taylor N, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans [J]. N Engl J Med, 2008, 358(13): 1327-1335.
- [16] Smith IJ, Dodd SL. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle [J]. Exp Physiol, 2007, 92(3): 561-573.

(收稿日期: 2014-02-20)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

气管内吸出物细菌培养对呼吸机相关性肺炎的诊断意义不大

呼吸机相关性肺炎(VAP)是小儿重症监护病房(PICU)中最常见的院内感染性疾病之一。疾病控制中心对 VAP 的诊断标准包括临床表现以及气管内吸出物细菌阳性(细菌定量 > 10 CFU/mL 或革兰染色每低倍镜视野下中性粒细胞数量 > 25 个)。但最近美国学者认为气管内吸出物细菌阳性与患者临床表现并无明显的相关性,同时它未必能区分出细菌定植与细菌感染。为此,研究人员进行了一项观察性研究,研究对象为美国一家研究型三级医院 PICU 中需要机械通气(48 h 内)的患儿;观察指标包括气管内吸出物细菌培养阳性率,革兰染色每低倍镜视野下中性粒细胞数量以及 VAP 的临床表现。结果显示:气管插管后气管内吸出物细菌培养阳性率较前明显增加($P < 0.001$),但 VAP 的临床表现并未明显加重。与使用封闭式吸痰管相比,使用新的无菌导管采集的气管内吸出物细菌培养阳性率明显下降($P < 0.001$)。大部分标本革兰染色每低倍镜视野下中性粒细胞数量 > 25 个,且数量与细菌培养结果呈正相关($P = 0.04$)。培养分离出的细菌中有 77% 为致病菌。此外,除头孢吡肟外,细菌培养前使用抗菌药物并不会降低细菌培养阳性率。研究人员据此得出结论:气管插管后气道内吸出物细菌培养阳性率明显增加,但细菌培养和革兰染色并不能区分出细菌定植与细菌感染;此外,头孢吡肟可降低细菌培养的阳性率。

罗红敏, 编译自《Pediatr Crit Care Med》, 2014, 15(4): 299-305