

亚低温对脂多糖诱导急性肺损伤大鼠肺组织 TLR2/MyD88 信号转导通路的影响

赖洁 汤展宏 胡军涛 周威 张驰 陈显峰

【摘要】 目的 研究亚低温对脂多糖(LPS)吸入导致的急性肺损伤(ALI)大鼠 Toll 样受体 2/髓样分化因子 88(TLR2/MyD88)通路中 TLR2、MyD88、核转录因子 κ Bp65(NF- κ Bp65)及相关炎性蛋白纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)表达的影响。方法 将 90 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分成对照组($n=18$)、亚低温组($n=24$)、控温组($n=24$)、非控温组($n=24$)。用气管内滴入 LPS 0.5 mL/kg 方法建立 ALI 模型,对照组滴入等量生理盐水;1 h 后取颈动脉血并予以物理降温,亚低温组、控温组分别控制肛温在 32~34 °C、36~37 °C,对照组、非控温组体温不加干预。分别于制模前、制模后 1 h 及干预后 1、6、12 h 进行血气分析;分别于干预后 1、6、12 h 处死大鼠,光镜下观察肺组织病理改变并进行半定量评分;酶联免疫吸附试验(ELISA)测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中 PAI-1 蛋白表达;反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织 TLR2 mRNA、MyD88 mRNA 表达;蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织 NF- κ Bp65 蛋白表达。结果 滴入 LPS 后,各组氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)明显降低,肺组织损伤加重,肺损伤评分、BALF 中 PAI-1、肺组织 TLR2 mRNA、MyD88 mRNA、NF- κ Bp65 蛋白表达均明显升高。给予亚低温治疗后各指标均明显改善,亚低温疗程持续 6 h 时效果最好,持续 6~12 h 可能获益。与控温组比较,亚低温组 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa)于干预后 1 h、6 h 明显升高(1 h: 402.49 ± 38.61 比 324.36 ± 28.93 , 6 h: 349.72 ± 98.20 比 284.35 ± 13.68 , 均 $P < 0.01$);肺损伤评分(分)于干预后 1、6、12 h 明显降低(1 h: 6.04 ± 0.74 比 7.96 ± 0.65 , 6 h: 9.09 ± 0.80 比 13.13 ± 1.02 , 12 h: 10.79 ± 1.42 比 13.42 ± 0.68 , 均 $P < 0.01$);BALF 中 PAI-1 蛋白表达 (ng/L)于干预后 1、6、12 h 明显下降(1 h: 121.36 ± 4.62 比 197.74 ± 9.42 , 6 h: 230.53 ± 10.76 比 294.06 ± 16.60 , 12 h: 270.48 ± 13.20 比 319.40 ± 10.24 , 均 $P < 0.01$);TLR2、MyD88 的 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)于干预后 1、6 和 12 h 均明显下降(TLR2 mRNA 表达 1 h: 2.18 ± 0.26 比 3.04 ± 0.39 , 6 h: 4.09 ± 0.29 比 4.90 ± 0.35 , 12 h: 6.02 ± 0.43 比 7.10 ± 0.54 ; MyD88 mRNA 表达 1 h: 2.25 ± 0.41 比 3.04 ± 0.30 , 6 h: 5.67 ± 0.55 比 7.01 ± 0.76 , 12 h: 7.14 ± 0.60 比 8.87 ± 0.54 , 均 $P < 0.01$);NF- κ Bp65 蛋白表达(A 值)于干预后 6 h、12 h 明显下降(6 h: 0.31 ± 0.08 比 0.53 ± 0.12 , 12 h: 1.05 ± 0.17 比 1.76 ± 0.35 , 均 $P < 0.01$)。控温组与非控温组干预后各指标比较差异均无统计学意义。结论 亚低温可通过下调 TLR2/MyD88 通路中 TLR2 mRNA、MyD88 mRNA、NF- κ Bp65 及相关炎性蛋白 PAI-1 的表达,对 LPS 吸入致 ALI 大鼠肺组织起保护性作用。

【关键词】 急性肺损伤; 亚低温; Toll 样受体 2; 髓样分化因子 88; 核转录因子 κ B; 脂多糖

Effect of hypothermia on TLR2/MyD88 signal pathway in lung tissue in rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide Lai Jie, Tang Zhanhong, Hu Juntao, Zhou Wei, Zhang Chi, Chen Xianfeng. Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China
Corresponding author: Tang Zhanhong, Email: tangzhanhong139@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hypothermia on the expression Toll-like receptor 2 (TLR2), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in the TLR2/MyD88 pathway in rats with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) inhalation. **Methods** Ninety male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group ($n = 18$), hypothermia group ($n = 24$), temperature controlled group ($n = 24$), and temperature-uncontrolled group ($n = 24$). The ALI model was reproduced by 0.5 mL/kg LPS intratracheal instillation, while only normal saline was instilled intratracheally for control group. Arterial blood was collected and physical cooling was started 1 hour after instillation. The body temperature was lowered to 32-34 °C in hypothermia group and 36-37 °C in

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.010

基金项目:广西自然科学基金(2013GXNSFAA019117);广西教委高校科研项目(201203YB046);国家临床重点专科建设项目(2011-873)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院重症医学科

通信作者:汤展宏, Email: tangzhanhong139@sina.com

temperature controlled group, and no intervention was used for temperature-uncontrolled group and control group. The arterial blood gas was determined in all the groups before and 1 hour after instillation of saline or LPS and 1, 6, 12 hours after intervention. Rats were sacrificed respectively at 1, 6 and 12 hours after temperature control therapy, the morphological changes in lung tissue were observed under light microscope. The protein expression of PAI-1 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). TLR2 mRNA and MyD88 mRNA transcriptional level were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). NF- κ Bp65 protein level was determined by Western Blot. **Results** After instillation of LPS, the oxygenation index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) of each group was decreased obviously, the damage of lung tissues was aggravating, the lung injury score was increased significantly, PAI-1 protein in BALF and the expressions of TLR2 mRNA, MyD88 mRNA, NF- κ Bp65 protein in lung tissues were increased obviously. Each index was improved by therapeutic Hypothermia, the effect of which was best in using a cooling period in the 1-6 hours, while might be benefit at 6-12 hours. Compared with temperature controlled group, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa) at 1 hour and 6 hours of hypothermia group was improved (1 hour: 402.49 ± 38.61 vs. 324.36 ± 28.93 , 6 hours: 349.72 ± 98.20 vs. 284.35 ± 13.68 , both $P < 0.01$), the lung injury score at 1, 6 and 12 hours were significantly decreased (1 hour: 6.04 ± 0.74 vs. 7.96 ± 0.65 , 6 hours: 9.09 ± 0.80 vs. 13.13 ± 1.02 , 12 hours: 10.79 ± 1.42 vs. 13.42 ± 0.68 , all $P < 0.01$), the PAI-1 protein (ng/L) in BALF at 1, 6 and 12 hours were significantly decreased (1 hour: 121.36 ± 4.62 vs. 197.74 ± 9.42 , 6 hours: 230.53 ± 10.76 vs. 294.06 ± 16.60 , 12 hours: 270.48 ± 13.20 vs. 319.40 ± 10.24 , all $P < 0.01$), TLR2 mRNA and MyD88 mRNA expressions ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in the lung tissues at 1, 6 and 12 hours were significantly decreased (TLR2 mRNA 1 hour: 2.18 ± 0.26 vs. 3.04 ± 0.39 , 6 hours: 4.09 ± 0.29 vs. 4.90 ± 0.35 , 12 hours: 6.02 ± 0.43 vs. 7.10 ± 0.54 ; MyD88 mRNA 1 hour: 2.25 ± 0.41 vs. 3.04 ± 0.30 , 6 hours: 5.67 ± 0.55 vs. 7.01 ± 0.76 , 12 hours: 7.14 ± 0.60 vs. 8.87 ± 0.54 , all $P < 0.01$), NF- κ Bp65 protein expression (A value) at 6 hours and 12 hours was significantly decreased (6 hours: 0.31 ± 0.08 vs. 0.53 ± 0.12 , 12 hours: 1.05 ± 0.17 vs. 1.76 ± 0.35 , both $P < 0.01$). There was no difference in each index between temperature controlled group and temperature-uncontrolled group. **Conclusion** Hypothermia can down-regulate the expression of TLR2 mRNA, MyD88 mRNA, NF- κ Bp65 protein and PAI-1 in the TLR2/MyD88 pathway to protect lung tissue of rats with ALI induced by LPS inhalation from injury.

【Key words】 Acute lung injury; Hypothermia; Toll-like receptor 2; Myeloid differentiation factor 88; Nuclear factor- κ Bp65; Lipopolysaccharide

急性肺损伤 (ALI) 可由多种致病因素导致, 存在发病机制不明确、病理生理变化复杂等特点。目前普遍认为 ALI 的本质是全身炎症反应在肺部的表现, 主要体现在肺泡-毛细血管基底膜受损。由于 ALI 发病机制及病理生理变化的复杂性, 临床对其尚无特殊治疗方法。本课题组前期研究结果显示, 亚低温对 ALI 的治疗起到一定的作用^[1-3]。本研究通过探讨亚低温干预下 ALI 炎症反应的 Toll 样受体 2/髓样分化因子 88 (TLR2/MyD88) 通路是否受到影响, 试图寻找亚低温起肺保护性作用的关键因素, 以期起到对 ALI 治疗的补充作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组: 清洁级雄性 SD 大鼠 90 只, 体质量 280 ~ 350 g, 购自广西医科大学动物实验中心, 动物合格证号: SCXK (桂) 2009-0002。按照随机数字表法将大鼠分为对照组 ($n=18$)、亚低温组 ($n=24$)、控温组 ($n=24$) 和非控温组 (24 只) 4 组。

1.2 ALI 动物模型的建立: 麻醉大鼠后分离左颈总动脉, 放入动脉留置针以备取血; 气管插管机械通气

(通气参数: 呼吸频率 80 次/min, 呼吸比 2:1, 潮气量 20 mL/kg) 30 min 后制模。气管内滴入 200 mg/L 脂多糖 (LPS, 0.5 mL/kg) 建立 ALI 模型^[4], 对照组气管内滴入等量生理盐水。制模后 1 h 即予以温度控制干预, 控温组、亚低温组予冰袋及动物恒温仪降温, 分别将肛温控制在 36 ~ 37 °C、32 ~ 34 °C; 对照组、非控温组不予温度控制。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法: 于制模前和制模后 1 h (控温前) 以及干预后 1、6、12 h 取左颈总动脉血; 于干预后 1、6、12 h 各处死 8 只大鼠, 留取支气管肺泡灌洗液 (BALF) 及肺组织保存待测。

1.3.1 血气分析: 每只大鼠于相应时间点取左颈总动脉血共计 3 次, 于 15 min 内进行动脉血气分析。

1.3.2 肺组织病理观察: 取左肺, 用 10% 多聚甲醛固定, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察, 按照 Mikawa 法, 以肺泡充血、出血、肺泡壁增厚和 (或) 透明膜形成、肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润或聚集等 4 项指标进行肺组织病理损伤半定量评分^[5]。

1.3.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 BALF 中纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI-1) 表达:取右肺进行肺泡灌洗,收集 BALF,离心取上清液,采用 ELISA 法检测 PAI-1 表达。

1.3.4 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肺组织 TLR2、MyD88 的 mRNA 表达:取肺组织 50 mg,提取总 RNA,反转录为 cDNA,取 2 μ L 样本于 20 μ L 体系中进行荧光定量 PCR 扩增。待反应结束后取 10 μ L 产物用含有 I 型核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。以三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 TLR2/GAPDH、MyD88/GAPDH 表达水平进行相对定量。

1.3.5 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺组织中炎性蛋白核转录因子 κ Bp65 (NF- κ Bp65) 表达:取肺组织提取总蛋白,以考马斯亮蓝法蛋白定量后,经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转移至聚偏二氟乙烯 (PDVF) 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,放入一抗孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜后加二抗室温摇床 1 h,洗膜后经底物发光检测 (ECL) 显色曝光,显影定影。内参为 GAPDH,以 NF- κ Bp65 与 GAPDH 条带的吸光度 (A) 值比值表示 NF- κ Bp65 蛋白表达量。

1.4 统计学方法:运用 SPSS 16.0 统计分析软件处理数据,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组内、组间均数比较采用完全随机设计 t 检验或单因

素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动脉血气分析 (表 1):对照组实验期间氧合指数 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) 无明显改变 (均 $P > 0.05$);亚低温组、控温组和非控温组制模后 1 h $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 均较对照组明显降低 (均 $P < 0.01$),说明 LPS 吸入致 ALI 模型建模成功。随 ALI 发展,亚低温组、控温组和非控温组 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 随时间延长呈持续下降趋势,但亚低温组下降趋势较控温组或非控温组平缓,干预后 1 h、6 h $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 明显高于控温组和非控温组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但 12 h 时无差异。

2.2 BALF 中 PAI-1 表达 (表 2):对照组干预各时间点 BALF 中 PAI-1 表达无明显变化,均处于基础水平;亚低温组、控温组、非控温组 PAI-1 表达随干预时间延长呈增加趋势,各时间点均显著高于对照组 (均 $P < 0.01$)。亚低温组干预后各时间点 PAI-1 表达均明显低于控温组和非控温组 (均 $P < 0.01$);而温控组与非温控组间无明显差异。

2.3 肺组织病理改变 (图 1; 表 2):光镜下观察对照组各时间点肺泡结构完整,无或仅见轻微病理改变。亚低温组 1 h 时肺泡壁完整,稍增厚,肺泡腔内出血及炎性细胞较少;6 h 时肺泡壁完整,较前增厚,腔内出血及炎性细胞增多;12 h 时肺泡壁尚完整,明显增厚,出血及炎性细胞较前大大增多,透明膜形成。控温组和非控温组随时间推移,肺泡壁逐渐增

表 1 急性肺损伤大鼠制模前后各时间点 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (mmHg)				
		制模前	制模后 1 h	干预后 1 h	干预后 6 h	干预后 12 h
对照组	18	466.63 \pm 22.25	455.43 \pm 33.31	465.13 \pm 13.17	451.64 \pm 17.54	457.06 \pm 25.06
亚低温组	24	469.40 \pm 25.57	331.44 \pm 55.59 ^a	402.49 \pm 38.61 ^a	349.72 \pm 98.20 ^a	241.20 \pm 15.29 ^a
控温组	24	458.04 \pm 26.83	330.15 \pm 35.82 ^a	324.36 \pm 28.93 ^{ab}	284.30 \pm 13.68 ^{bc}	233.40 \pm 28.64 ^a
非控温组	24	463.00 \pm 22.52	329.91 \pm 21.72 ^a	316.15 \pm 19.94 ^{ab}	263.22 \pm 57.10 ^{ab}	220.25 \pm 6.29 ^a
F 值		0.943	59.951	31.899	13.416	167.235
P 值		0.424	0.000	0.000	0.000	0.000

注: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 为氧合指数; 1 mmHg = 0.133 kPa; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与亚低温组比较, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$

表 2 急性肺损伤大鼠温度控制后各时间点 BALF 中 PAI-1 和肺损伤评分的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	PAI-1 (ng/L)			肺损伤评分 (分)		
		干预后 1 h	干预后 6 h	干预后 12 h	干预后 1 h	干预后 6 h	干预后 12 h
对照组	6	66.39 \pm 0.45	66.65 \pm 0.69	66.79 \pm 0.75	1.11 \pm 0.50	1.33 \pm 0.37	0.94 \pm 0.14
亚低温组	8	121.36 \pm 4.62 ^a	230.53 \pm 10.76 ^{bc}	270.48 \pm 13.20 ^{cd}	6.04 \pm 0.74 ^a	9.09 \pm 0.80 ^{bc}	10.79 \pm 1.42 ^{bc}
控温组	8	197.74 \pm 9.42 ^{ab}	294.06 \pm 16.60 ^{abc}	319.40 \pm 10.24 ^{abd}	7.96 \pm 0.65 ^{ab}	13.13 \pm 1.02 ^{abc}	13.42 \pm 0.68 ^{abc}
非控温组	8	196.64 \pm 16.03 ^{ab}	300.41 \pm 9.75 ^{abc}	328.41 \pm 15.12 ^{abd}	8.17 \pm 0.59 ^{ab}	13.00 \pm 0.98 ^{abc}	13.38 \pm 1.08 ^{abc}
F 值		283.490	590.922	707.739	173.192	274.885	229.598
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制剂 -1; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与亚低温组比较, ^b $P < 0.01$; 与本组干预后 1 h 比较, ^c $P < 0.01$; 与本组干预后 6 h 比较, ^d $P < 0.01$

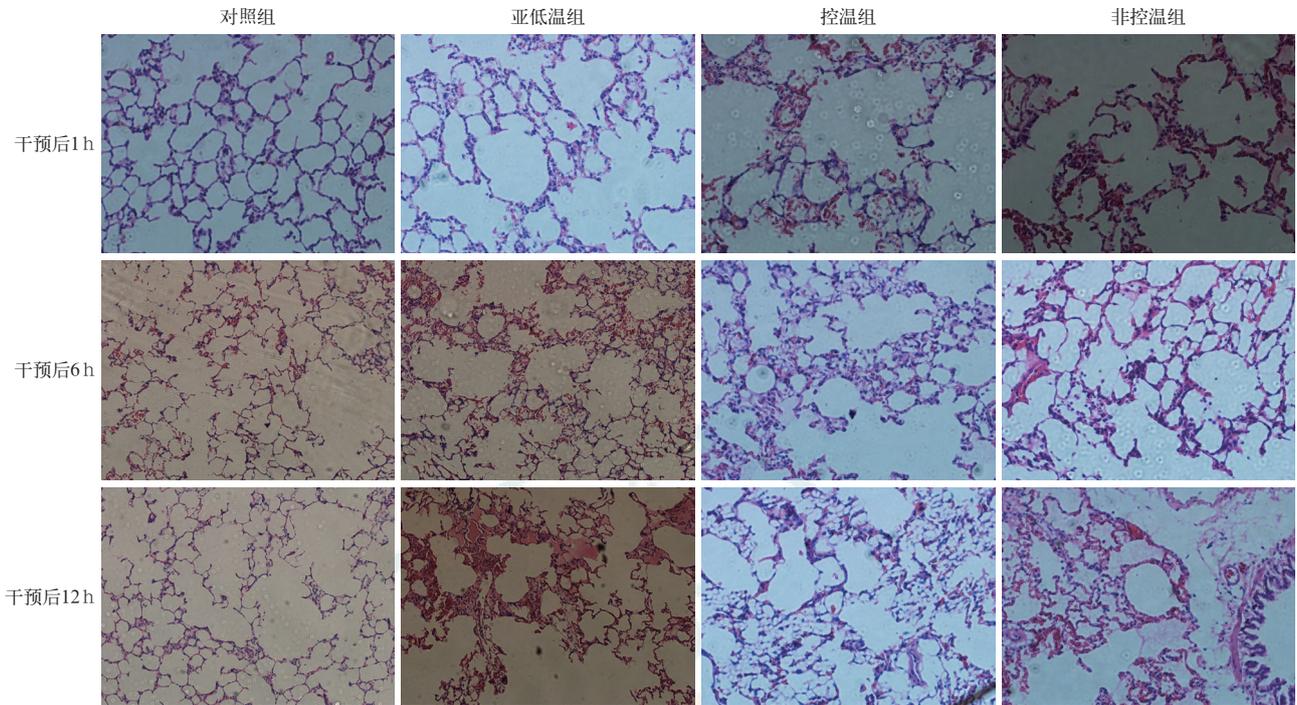


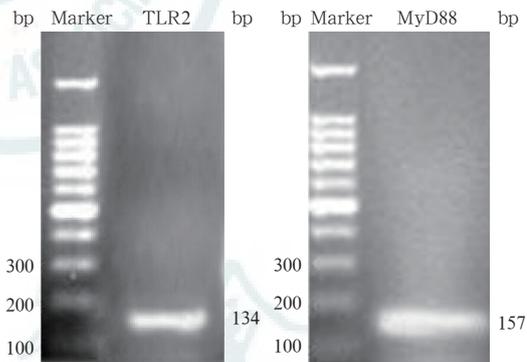
图 1 光镜下观察急性肺损伤大鼠温度控制后肺组织病理改变 对照组干预后各时间点肺泡壁完整, 未见或轻微肺泡壁增厚, 或少量炎性细胞浸润。亚低温组 1 h 时肺泡壁完整, 稍增厚, 肺泡腔内见少量出血及少量炎性细胞浸润或聚集; 6 h 时肺泡壁完整, 较前增厚, 腔内出血及炎性细胞浸润或聚集较前增多; 12 h 时肺泡壁尚完整, 严重增厚, 出血及炎性细胞较前明显增多, 有透明膜形成。控温组及非控温组 1 h 时肺泡壁完整、增厚, 肺泡腔内见较多出血及少量炎性细胞浸润或聚集; 6 h 时肺泡壁尚完整, 较前增厚, 腔内出血及炎性细胞浸润或聚集较前增多; 12 h 时肺泡壁严重增厚、破坏, 出血及炎性细胞大量增多, 有透明膜形成 HE 低倍放大

厚、破坏, 肺泡腔内出血及炎性细胞浸润逐渐增多, 透明膜形成。

肺损伤评分显示, 对照组干预后各时间点肺损伤评分无明显变化 (均 $P > 0.05$); 亚低温组、控温组和非控温组干预后各时间点肺损伤评分均较对照组明显升高 (均 $P < 0.01$), 说明病理损伤较严重。亚低温组、控温组、非控温组早期 (1 ~ 6 h) 呈进行性病理损伤加重, 后期 (6 ~ 12 h) 无明显改变, 推测 6 ~ 12 h 病理损伤已达高峰。亚低温组干预后各时间点肺损伤评分均明显低于控温组和非控温组 (均 $P < 0.01$); 而控温组与非控温组间无明显差异。

2.4 肺组织中 TLR2、MyD88 的 mRNA 表达 (图 2 ; 表 3): 对照组 TLR2、MyD88 的 mRNA 表达随干预时间延长均未出现明显变化; 而亚低温组、控温组及非控温组则随时间延长逐渐升高。亚低温组干预后各时间点 TLR2、MyD88 的 mRNA 表达水平明显低于控温组和非控温组 (均 $P < 0.01$); 而控温组与非控温组间无明显差异。

2.5 肺组织 NF- κ Bp65 蛋白表达 (图 3 ; 表 4): 对照组干预后各时间点 NF- κ Bp65 蛋白表达水平稳定, 未见明显变化; 亚低温组、控温组和非控温组



RT-PCR 为反转录 - 聚合酶链反应, TLR2 为 Toll 样受体 2, MyD88 为髓样分化因子 88

图 2 RT-PCR 检测急性肺损伤大鼠温度控制后 12 h 时肺组织 TLR2、MyD88 的 mRNA 表达

NF- κ Bp65 蛋白表达水平呈持续升高趋势, 且干预后 6 h、12 h 时均较对照组明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。亚低温组 NF- κ Bp65 蛋白表达于干预后 6 h、12 h 均较控温组和非控温组明显降低 (均 $P < 0.01$); 而控温组与非控温组间无明显差异。

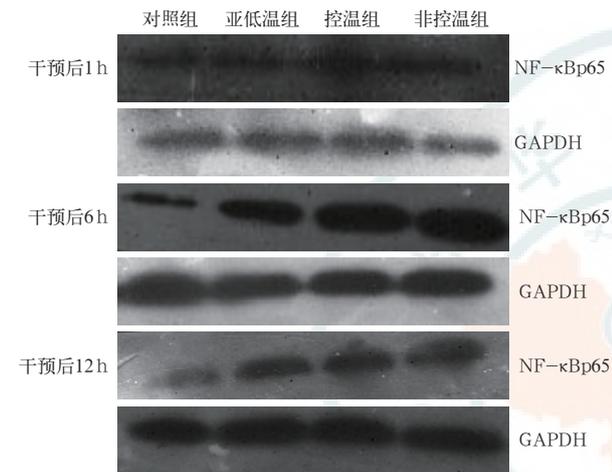
3 讨论

研究显示, LPS 通过 CD14⁺细胞产生一系列炎症反应^[6]; TLR2 大量富集于 CD14⁺细胞^[7], 可通过 CD14 表面蛋白的参与结合 LPS, 并介导激活炎

表 3 急性肺损伤大鼠温度控制后各时间点肺组织 TLR2、MyD88 的 mRNA 表达变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TLR2/GAPDH mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			MyD88/GAPDH mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
		干预后 1 h	干预后 6 h	干预后 12 h	干预后 1 h	干预后 6 h	干预后 12 h
对照组	6	1.06 ± 0.08	1.06 ± 0.10	1.04 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.10	1.04 ± 0.10
亚低温组	8	2.18 ± 0.26 ^a	4.09 ± 0.29 ^{ac}	6.02 ± 0.43 ^{ad}	2.25 ± 0.41 ^a	5.67 ± 0.55 ^{ac}	7.14 ± 0.60 ^{ad}
控温组	8	3.04 ± 0.39 ^{ab}	4.90 ± 0.35 ^{abc}	7.10 ± 0.54 ^{abd}	3.04 ± 0.30 ^{ab}	7.01 ± 0.76 ^{abc}	8.87 ± 0.54 ^{abd}
非控温组	8	3.07 ± 0.42 ^{ab}	5.06 ± 0.39 ^{abc}	7.26 ± 0.49 ^{abd}	3.14 ± 0.35 ^{ab}	7.20 ± 0.55 ^{abc}	9.17 ± 0.73 ^{abd}
F 值		55.057	229.680	285.850	26.972	301.657	336.840
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: TLR2 为 Toll 样受体 2, MyD88 为髓样分化因子 88; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与亚低温组比较, ^b $P < 0.01$; 与本组干预后 1 h 比较, ^c $P < 0.01$; 与本组干预后 6 h 比较, ^d $P < 0.01$



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, NF-κBp65 为核转录因子 -κBp65, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 Western Blot 检测急性肺损伤大鼠温度控制后 1、6、12 h 时肺组织 NF-κBp65 蛋白表达

表 4 急性肺损伤大鼠温度控制后各时间点肺组织 NF-κBp65 蛋白表达的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	NF-κBp65/GAPDH (A 值)		
		干预后 1 h	干预后 6 h	干预后 12 h
对照组	6	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.03
亚低温组	8	0.15 ± 0.02	0.31 ± 0.08 ^a	1.05 ± 0.17 ^{bc}
控温组	8	0.15 ± 0.03	0.53 ± 0.12 ^{bc}	1.76 ± 0.35 ^{bcd}
非控温组	8	0.17 ± 0.03	0.60 ± 0.12 ^{bcd}	1.73 ± 0.13 ^{bcd}
F 值		0.246	26.504	88.743
P 值		0.863	0.000	0.000

注: NF-κBp65 为核转录因子 -κBp65; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与亚低温组比较, ^c $P < 0.01$; 与本组干预后 1 h 比较, ^d $P < 0.01$; 与本组干预后 6 h 比较, ^e $P < 0.01$

症反应^[8]。有研究认为, TLR2 能通过 LPS 结合蛋白与 LPS 结合, 从而启动 TLR2/MyD88 炎性通路, 产生 NF-κB 炎症因子^[9]。本研究发现, 经 LPS 吸入诱导 ALI 大鼠肺组织中 TLR2 mRNA 表达在滴入 LPS 后 2~13 h (干预后 1~12 h) 呈逐渐升高的趋势, 并且伴有氧合指数逐渐降低及病理损害的逐步加重, 证明 LPS 致炎过程中存在炎症因子 TLR2 上调, 并与宏观表现具有一致性。尽管机制不是很明

确, 但是所有的证据都表明 TLR2 上调介导炎性通路激活是 LPS 诱导的炎症反应中一个主要组成部分^[10-13], 与本研究结果一致。推测 TLR2 可能通过以下依赖 MyD88 的信号转导通路激活炎症反应, 参与 ALI 过程: TLR2 与 MyD88 结合、上调 MyD88, MyD88 mRNA 于滴入 LPS 后 2 h 起一直保持上升趋势, 二者结合后通过一系列信号转导激活途径逐渐扩大, 形成炎症级联反应, 其中一条途径活化丝/苏氨酸蛋白激酶 (MPKKK) 家族, 促使 NF-κB 复合物的释放活化, 直接导致促炎因子肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的产生。TNF-α 除能起致炎作用外, 尚可激活另一系列信号转导通路, 产生与 ALI 直接相关炎性蛋白 PAI-1 并呈增长趋势, 当肺泡上皮细胞、巨噬细胞及血管内皮细胞暴露于 TNF-α 及 LPS 下, 会产生大量抑制纤溶的 PAI-1, 导致肺泡及肺血管内纤维蛋白的沉积^[14-15], 这种 PAI-1 大量产生的现象在 BALF 中最为突出, 与本研究结果及推论相符。

亚低温作为一种临床治疗手段早已用在淹溺、新生儿窒息、心肌梗死及颅脑损伤等方面, 其作用机制可能与受损细胞对温度敏感性高有关^[16]。ALI 的发病机制主要认为是全身炎症反应失控在肺部的突出表现, 即肺泡上皮-肺毛细血管内皮细胞受损, 同时还与炎症反应中的细胞凋亡有关。本研究发现, 经亚低温干预后, 炎症指数下降及炎症表现改善; 肺组织病理显示亚低温组可明显下调肺部炎症反应。与控温组、非控温组比较, 亚低温组 TLR2/MyD88 通路中 TLR2 mRNA、MyD88 mRNA、NF-κBp65 蛋白及 PAI-1 的表达均有不同程度下降, 且均呈下调趋势, 这可能与亚低温的特性有关: ①降低细胞受体的敏感性^[16], 使 LPS 与其受体的结合率下降; ②降低代谢, 从而减少促炎因子及致炎因子的产生和活性^[17-19], 上调抗炎因子的表达^[20], 抑制炎症反应在机体内级联放大作用, 达到肺保护效果。

从目前相关研究来看, 亚低温的实施在时间点

的选择和降温速度上都倾向于越快越好,但是治疗的持续时间一直未有定论^[21]。目前临床亚低温治疗时间一般维持在 24~48 h,甚少有超过 48 h,一旦超过 48 h 会出现亚低温的副作用,如低血压、低血钾、血小板减少等^[22-23]。本研究发现,亚低温疗程持续 6 h 效果最佳,持续 6~12 h 可能获益,但是亚低温组 12 h 时氧合指数与控温组和非控温组比较已无明显差异,仅从数值上观察有所升高,仍有少量优势。这可能与长时间亚低温治疗带来炎症减轻的同时产生了一些副作用有关,如长时间低氧代谢状态导致机体需求增大,代谢活性物质反馈性产生增强抵消了最初氧需求降低的效果,甚至推测最终会增加机体负担。亚低温早期(6 h 内)对肺具有明显的效果,但是到了较晚阶段(12 h 后),这种效果是否还能延续,有待进一步实验。考虑到肺水肿的发生较晚(3~4 d),较长的亚低温治疗时间有利于减少肺水肿,但是长时间亚低温带来的副作用能否通过其他手段来减轻,尚有待进一步实验证实。可以明确的是,亚低温治疗时间的把握是治疗的难关。

参考文献

- [1] 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]. 中国危重病急救医学,2011,23(4):236-238.
- [2] 汪首振,汤展宏,胡军涛,等. 亚低温对脂多糖诱导巨噬细胞 Toll 样受体 4 mRNA 转录及炎症平衡的影响[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(2):84-88.
- [3] Tang ZH, Hu JT, Lu ZC, et al. Effect of Mild Hypothermia on the Expression of Toll-like Receptor 2 in Lung Tissues with Experimental Acute Lung Injury [J/OL]. Heart Lung Circ,2014. [2014-07-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25224460> [published online ahead of print June 24, 2014].
- [4] Chin JY, Koh Y, Kim MJ, et al. The effects of hypothermia on endotoxin-primed lung [J]. Anesth Analg, 2007, 104(5):1171-1178.
- [5] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. Anesth Analg, 2003, 97(6):1751-1755.
- [6] Fang L, Xu Z, Wang GS, et al. Directed evolution of an LBP/CD14 inhibitory peptide and its anti-endotoxin activity [J]. PLoS One, 2014, 9(7):e101406.
- [7] Sugitharini V, Pavani K, Prema A, et al. TLR-mediated inflammatory response to neonatal pathogens and co-infection in neonatal immune cells [J]. Cytokine, 2014, 69(2):211-217.
- [8] Raby AC, Holst B, Le Bouder E, et al. Targeting the TLR co-receptor CD14 with TLR2-derived peptides modulates immune responses to pathogens [J]. Sci Transl Med, 2013, 5(185):185ra64.
- [9] Ranao DR, Kelley SL, Tapping RI. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex [J]. J Biol Chem, 2013, 288(14):9729-9741.
- [10] Matsuda N, Yamazaki H, Takano K, et al. Priming by lipopolysaccharide exaggerates acute lung injury and mortality in responses to peptidoglycan through up-regulation of Toll-like receptor-2 expression in mice [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(5):1065-1075.
- [11] Wilhelmsen K, Mesa KR, Prakash A, et al. Activation of endothelial TLR2 by bacterial lipoprotein upregulates proteins specific for the neutrophil response [J]. Innate Immun, 2012, 18(4):602-616.
- [12] Shin HS, Xu F, Bagchi A, et al. Bacterial lipoprotein TLR2 agonists broadly modulate endothelial function and coagulation pathways in vitro and in vivo [J]. J Immunol, 2011, 186(2):1119-1130.
- [13] 王娜,郑晔,苏跃. 盐酸戊乙奎醚对内毒素性急性肺损伤大鼠肺组织 Toll 样受体 4 mRNA 和 Toll 样受体 2 mRNA 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2011, 31(2):248-250.
- [14] El Solh AA, Bhora M, Pineda L, et al. Alveolar plasminogen activator inhibitor-1 predicts ARDS in aspiration pneumonia [J]. Intensive Care Med, 2006, 32(1):110-115.
- [15] Song Y, Lynch SV, Flanagan J, et al. Increased plasminogen activator inhibitor-1 concentrations in bronchoalveolar lavage fluids are associated with increased mortality in a cohort of patients with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Anesthesiology, 2007, 106(2):252-261.
- [16] Sandestig A, Romner B, Grände PO. Therapeutic Hypothermia in Children and Adults with Severe Traumatic Brain Injury [J]. Ther Hypothermia Temp Manag, 2014, 4(1):10-20.
- [17] 赵明亮,杨细平,田竺,等. 亚低温联合依达拉奉对重型颅脑创伤患者脑脊液肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-6 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(4):258-261.
- [18] 万丽春,刘德红,陈伟峰,等. 亚低温对 ARDS 大鼠肺部炎症反应影响的研究[J]. 中国急救医学, 2010, 30(5):424-427.
- [19] 刘春峰,张趣,蔡栩栩. 亚低温对脓毒症大鼠肺组织影响的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(6):580-582, 585.
- [20] 张剑锋,李超乾,郑晓文,等. 亚低温对急性肺损伤大鼠高迁移率族蛋白 1 表达的影响[J]. 中国急救医学, 2011, 31(4):327-330.
- [21] 宿志宇,李春盛. 低温疗法在心肺脑复苏中的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(2):119-122.
- [22] Finkelstein RA, Alam HB. Induced hypothermia for trauma: current research and practice [J]. J Intensive Care Med, 2010, 25(4):205-226.
- [23] Rundgren M, Engström M. A thromboelastometric evaluation of hypothermia on the coagulation system [J]. Anesth Analg, 2008, 107(5):1465-1468.

(收稿日期:2014-09-24)(本文编辑:李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊关于临床试验和伦理的一般要求

临床试验注册号应是从 WHO 认证的一级临床试验注册中心获得的全球唯一的注册号。临床试验注册号排印在摘要结束处。以“临床试验注册”(Trial registration)为标题(字体、字号与摘要的其他小标题相同),写出注册机构名称和注册号。前瞻性临床试验研究的论著摘要应含有 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trial; <http://www.consort-statement.org/home>)列出的基本要素。医学伦理问题及知情同意须遵循医学伦理基本原则。当论文的主体是以人为研究对象时,作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准。提供该委员会的批准文件(批准文号著录于论文中)及受试对象或其亲属的知情同意书。