

# 小窝蛋白-1/ 血红素加氧酶-1 信号链轴对机械通气所致肺损伤调控效应的研究

钟荣 肖军 于志辉 周吉 戴春光

**【摘要】目的** 探讨在活体动物用酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) 阻断小窝蛋白酪氨酸残基 14 (Cav-1-Y14) 磷酸化, 是否会上调血红素加氧酶-1 (HO-1) 活性, 以对抗机械通气所致的肺损伤。**方法** 54 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为 9 组, 每组 6 只。A 组为正常对照组, 只行气管切开; B1、B2 组为保护性通气 1 h、2 h 组; C1、C2 组为大潮气量 (40 mL/kg) 通气 1 h、2 h 组; D1、D2 组为 PP2 预处理 + 大潮气量通气 1 h、2 h 组; E1、E2 组为 PP2、HO-1 抑制剂锌原卟啉 IX (ZnPP IX) 预处理 + 大潮气量通气 1 h、2 h 组。各组动物在预定实验时间结束后立即放血处死并采集肺组织标本及支气管肺泡灌洗液 (BALF), 观察肺组织病理学改变, 并计算弥漫性肺损伤系统评分 (DAD 评分), 测定髓过氧化物酶 (MPO) 活性, 计算肺湿/干质量 (W/D) 比值; 蛋白质免疫印迹试验检测磷酸化小窝蛋白-1 (P-Cav-1-Y14)、小窝蛋白-1 (Cav-1)、HO-1 的表达; 免疫组化法检测肺组织中高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 和晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 的表达, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 BALF 中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平。**结果** 与 A 组比较, B 组各指标均无明显改变。与 B1 组比较, C1 组肺组织 DAD 评分、W/D 比值、MPO 活性及 BALF 中 TNF- $\alpha$  浓度均显著升高 [DAD 评分 (分):  $7.97 \pm 0.59$  比  $0.55 \pm 0.13$ , W/D 比值:  $5.70 \pm 1.61$  比  $5.04 \pm 0.63$ , MPO (U/g):  $1.82 \pm 0.14$  比  $0.77 \pm 0.26$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $370.10 \pm 29.61$  比  $54.38 \pm 8.18$ , 均  $P < 0.05$ ], 且通气 2 h 组较 1 h 组损伤更为严重。D 组各指标较 C 组明显下降; E 组各指标明显高于 A、B、D 组, 与 C 组比较则差异无统计学意义。C 组肺组织 Cav-1、P-Cav-1-Y14 蛋白表达 (灰度值) 均显著高于 B 组 (1 h:  $1.49 \pm 0.02$  比  $1.26 \pm 0.13$ ,  $1.34 \pm 0.02$  比  $0.87 \pm 0.04$ ; 2 h:  $1.58 \pm 0.02$  比  $1.27 \pm 0.27$ ,  $1.31 \pm 0.01$  比  $0.95 \pm 0.02$ , 均  $P < 0.05$ ), HO-1 蛋白表达 (灰度值) 显著低于 B 组 (1 h:  $0.59 \pm 0.02$  比  $1.10 \pm 0.01$ ; 2 h:  $0.49 \pm 0.01$  比  $1.20 \pm 0.02$ , 均  $P < 0.05$ ); D 组、E 组 Cav-1 蛋白表达与 C 组无差异, P-Cav-1-Y14 蛋白表达明显低于 C 组; D 组 HO-1 蛋白表达明显高于 C 组, 而 E 组 HO-1 蛋白表达与 C 组无差异。与 A 组比较, C 组及 E 组肺组织 HMGB1 和 RAGE 阳性表达明显增多, 但 B 组、D 组与 A 组比较无差异。**结论** Cav-1-Y14 磷酸化是肺通气损伤的关键因素, 其不仅可导致血管屏障功能的完整性降低, 亦可抑制 HO-1 活性, 从而进一步加重机械通气所致肺组织炎症损伤。

**【关键词】** 小窝蛋白-1, 磷酸化; 血红素加氧酶-1; 机械通气相关性肺损伤

**Research on the effect of protection against ventilator-induced lung injury via regulation of caveolin-1/heme oxygenase-1 signaling** Zhong Rong, Xiao Jun, Yu Zhihui, Zhou Ji, Dai Chunguang. Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi, China  
Corresponding author: Zhong Rong, Email: zhongrong870@126.com

**【Abstract】Objective** To determine whether the inhibition of caveolin-1 tyrosine residues 14 (Cav-1-Y14) phosphorylation with protein tyrosine kinase inhibitors (PP2) will upregulate heme oxygenase-1 (HO-1) activity to protect against ventilation induced lung injury in vivo of an animal model. **Methods** Fifty-four male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into nine groups (each  $n = 6$ ). Group A served as normal control group, in which rats did not receive ventilation but tracheotomy. Groups B1 and B2 received lung protective ventilation respectively for 1 hour or 2 hours. Groups C1 and C2 received high tidal volume (40 mL/kg) ventilation for 1 hour or 2 hours, respectively. The group D1 or D2 also received high tidal volume ventilation for 1 hour or 2 hour respectively, but they were given PP2 1 hour before high tidal volume ventilation. The groups E1 and E2 also received high tidal volume ventilation respectively for 1 hour or 2 hours, but tyrosine kinase inhibitor PP2 and HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) were given to animals 18 hours before high tidal volume ventilation. All the animals were sacrificed

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.006

基金项目: 广西壮族自治区医药卫生科研课题 (Z2014323); 广西壮族自治区临床重点专科建设项目 (2014-13)

作者单位: 541001 广西桂林, 桂林医学院附属医院重症医学科

通讯作者: 钟荣, Email: zhongrong870@126.com

after ventilation, and the specimens of lung tissues and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were harvested. Then the changes in pathology of lung tissue was observed, and diffuse alveolar damage scores (DAD) were calculated, myeloperoxidase (MPO) activity was measured by colorimetric analysis, lung wet/dry ratio (W/D) was estimated. The expressions of phosphorylated caveolin-1 (P-Cav-1-Y14), caveolin-1 (Cav-1) and HO-1 were determined by Western Blot. The expressions of high mobility group B1 (HMGB1) and advanced glycation end product receptor (RAGE) in lung tissues were assayed with immunohistochemistry staining. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in BALF were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** There was no significant difference in all the parameters between group A and groups B. Compared with group B1, DAD score, W/D ratio, the activity of MPO and the concentration of TNF- $\alpha$  in BALF in group C1 were significantly increased [DAD score:  $7.97 \pm 0.59$  vs.  $0.55 \pm 0.13$ , W/D ratio:  $5.70 \pm 1.61$  vs.  $5.04 \pm 0.63$ , MPO (U/g):  $1.82 \pm 0.14$  vs.  $0.77 \pm 0.26$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $370.10 \pm 29.61$  vs.  $54.38 \pm 8.18$ , all  $P < 0.05$ ], and the injury in ventilation 2 hours group was more serious than that in ventilation 1 hour group. Compared with groups C, all the parameters in groups D were significantly decreased. The parameters in groups E were significantly higher than those in groups A, B, and D, but no significant difference was found as compared with groups C. Compared with groups B, the protein expressions of Cav-1 and P-Cav-1-Y14 (gray value) in groups C were significantly increased (1 hour:  $1.49 \pm 0.02$  vs.  $1.26 \pm 0.13$ ,  $1.34 \pm 0.02$  vs.  $0.87 \pm 0.04$ ; 2 hours:  $1.58 \pm 0.02$  vs.  $1.27 \pm 0.27$ ,  $1.31 \pm 0.01$  vs.  $0.95 \pm 0.02$ , all  $P < 0.05$ ), and the expression of HO-1 protein (gray value) was significantly decreased (1 hour:  $0.59 \pm 0.02$  vs.  $1.10 \pm 0.01$ , 2 hours:  $0.49 \pm 0.01$  vs.  $1.20 \pm 0.02$ , both  $P < 0.05$ ). No significant difference in Cav-1 protein expression between groups D as well as groups E and groups C. The protein expression of P-Cav-1-Y14 in groups D and E was significantly lower than that in groups C. The protein expression of HO-1 in groups D was significantly higher than that in groups C, but the phenomenon was not found in groups E as compared with groups C. Compared with group A, the positive expression of HMGB1 and RAGE in lung tissue in groups C and E was significantly increased, but no significant difference was found between groups B as well as groups D and group A. **Conclusion** Cav-1-Y14 phosphorylation is the key factor for ventilator induced lung injury, which can not only lead to a decrease in vascular barrier function, but also inhibit the activity of HO-1 enzyme, thus further aggravates inflammatory injury of the lung as induced by mechanical ventilation.

**【Key words】** Phosphorylation of caveolin-1; Heme oxygenase-1; Ventilation-induced lung injury

小窝蛋白-1 (Cav-1) 是诸多信号链的重要调节器,对免疫功能、血管屏障功能、氧化应激及牵拉应力损伤均有重要的调节作用<sup>[1-5]</sup>。前期相关实验证实,大潮气量 ( $V_T$ ) 通气所致牵拉应力升高,且随通气时间延长可使 Cav-1 mRNA 及蛋白表达明显增强<sup>[6-7]</sup>。但 Maniatis 等<sup>[8]</sup>在实验中发现,大  $V_T$  通气一旦开始,酪氨酸激酶可在 30 min 内磷酸化,同时伴有 Cav-1 在酪氨酸残基 Y14 (Cav-1-Y14) 的磷酸化。而 Cav-1 表达与血红素加氧酶-1 (HO-1) 活性密切相关。Jin 等<sup>[9]</sup>发现,早期 Cav-1 基因缺失小鼠,细胞或组织中 HO-1 表达明显上调;后期研究证实,通过抗增殖、抗氧化、舒张血管、抗炎及膜稳定作用,HO-1 及其催化衍生物一氧化碳 (CO) 可保护肺组织<sup>[10-13]</sup>。Sun 等<sup>[14]</sup>证实,内皮细胞中 Cav-1 磷酸化在氧化剂引发的肺血管高渗透性机制中起关键作用,由小窝蛋白介导的白蛋白转运增加及内皮屏障功能的完整性降低均取决于 Cav-1 酪氨酸磷酸化。这些研究均提示,在机械通气中, Cav-1 的表达增加或磷酸化增强可能下调 HO-1 活性并加重肺组织损伤。但也有研究证实在 Cav-1/HO-1 信号链调控方面, Cav-1 表达增强是有益的。Zhang 等<sup>[15]</sup>发现,

HO-1 及支架蛋白 Cav-1 可负性调节 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号链; HO-1/Cav-1 与 TLR4 的复合物促进了髓样分化因子 88 (MyD88) 衔接子从 TLR4 分离,于是终止了 TLR4 信号链的传递,故当 Cav-1 表达降低时炎症反应增强。这些不同的实验结果使我们觉得有必要更进一步探讨在活体通气损伤动物模型中 Cav-1 是如何调控及影响 HO-1 信号链通路的。本研究的设计思路是用特异性的阻断剂阻断大  $V_T$  通气引发的酪氨酸激酶活性增高及 Cav-1-Y14 磷酸化,观察 HO-1 信号链活性改变对血管屏障功能、肺组织炎症损伤及下游信号链的影响,从而为机械通气损伤的防治提供新的理论机制和治疗策略。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物和试剂:**健康雄性 SD 大鼠 54 只,体质量 220~250 g,由桂林医学院实验动物中心提供,动物合格证号: SCXK (桂) 2014-0001。锌原卟啉 IX (ZnPP IX) 和酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) 购自美国 MedChem Express 公司;磷酸化小窝蛋白-1 (P-Cav-1-Y14)、Cav-1、HO-1、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 抗体购自美国 Bioworld 公司。髓过氧化物酶 (MPO) 测

定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定试剂盒购自北京达科为生物科技公司。

**1.2 动物分组及模型制备:**按随机数字表法将大鼠分成9个实验组,每组6只。腹腔注射10%水合氯醛3 mL/kg麻醉大鼠,行气管插管。

**1.2.1 A组:**正常对照组,只行气管切开。

**1.2.2 B1、B2组:**保护性通气1 h、2 h组。 $V_T$  6 mL/kg,呼吸频率(RR) 60次/min,吸呼比1:2,呼气末正压(PEEP) 5 cmH<sub>2</sub>O (1 cmH<sub>2</sub>O=0.098 kPa)。

**1.2.3 C1、C2组:**大 $V_T$ 通气1 h、2 h组。 $V_T$  40 mL/kg, RR 40次/min,吸呼比1:2, PEEP 0。

**1.2.4 D1、D2组:**PP2+大 $V_T$ 通气1 h、2 h组。 $V_T$  40 mL/kg, RR 40次/min,吸呼比1:2, PEEP 0。通气前1 h腹腔注射PP2 5 mg/kg。

**1.2.5 E1、E2组:**PP2+ ZnPP IX +大 $V_T$ 通气1 h、2 h组。 $V_T$  40 mL/kg, RR 40次/min,吸呼比1:2, PEEP 0。通气前18 h腹腔注射ZnPP IX 2.5 mg/kg, PP2溶解于0.3 mL二甲亚砜中。

**1.3 标本采集:**机械通气直至预定时间点后经颈动脉放血处死大鼠。开胸结扎右侧肺门,4℃冰生理盐水2 mL反复灌洗左肺2次,回收支气管肺泡灌洗液(BALF)后离心10 min,取上清于-80℃保存备用。取左、右肺上叶组织备用。

#### 1.4 检测指标及方法

**1.4.1 肺湿/干质量(W/D)比值测定:**取右肺中叶称湿质量(W),60℃恒温箱烤72 h至恒重,称干质量(D),计算W/D比值。

**1.4.2 肺组织病理学观察及弥漫性肺泡损伤系统评分(DAD评分):**取右肺上叶用10%多聚甲醛溶液固定,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。由病理科医师按双盲法根据肺间质中性粒细胞浸润、肺泡内出血、肺泡内纤维素渗出、肺间质水肿、肺泡内中性粒细胞浸润等5个方面按照正常、轻、中、重分别评为0、1、2、3分,DAD评分为各项指标之和。

**1.4.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织中P-Cav-1-Y14、Cav-1、HO-1的蛋白表达:**每组取100 mg肺组织,提取蛋白后用BCA法定量蛋白。取50  $\mu$ g蛋白样本按比例加入上样缓冲液后开水煮沸8 min,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),半干法转膜(恒流100 mA, 60 min),牛血清蛋白(BSA)中常温封闭1 h,一抗4℃孵育过夜,含Tris-HCl的缓冲盐溶液(TBST)洗膜,

室温孵育二抗1 h, TBST洗膜,发光、显影后荧光扫描、拍照并分析图像,测定蛋白及内参 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的灰度值比值作为相对表达量。

**1.4.4 肺组织MPO活性测定:**取液氮冻存的肺组织,用冰生理盐水制成10%的肺组织匀浆,按照试剂盒说明测定肺组织中MPO活性。

**1.4.5 TNF- $\alpha$ 检测:**ELISA法检测各组大鼠BALF中TNF- $\alpha$ 水平,实验步骤严格按说明书进行。

**1.4.6 免疫组化法观察肺组织HMGB1和RAGE表达:**镜下每个标本随机取5个不重叠视野,观察到棕黄色颗粒为阳性产物,由病理图像分析系统进行处理,计算5个不重叠视野阳性颗粒的平均吸光度(A)值作为半定量分析HMGB1和RAGE的蛋白表达。

**1.5 统计学分析:**采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析,计量资料的实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,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 各组大鼠肺组织病理学观察及DAD评分(表1):**A组肺组织正常。B1、B2组肺泡结构比较完整,有少量炎细胞浸润,肺泡间隔无水肿,肺泡腔无明显渗出物。C1组肺泡间隔增厚,肺泡腔内可见较多的炎性细胞,部分肺泡腔内有血性渗出液;C2组肺泡腔内弥漫浸润的炎性细胞,有大量渗出物,部分肺泡萎陷或破裂;C组DAD评分明显高于A组和B组(均 $P<0.05$ )。D1组、D2组较C1、C2组肺损伤明显减轻,肺泡结构完整,有少量炎细胞浸润,肺泡腔有少量渗出物;DAD评分较C组、E组明显降低(均 $P<0.05$ )。E1组、E2组肺损伤程度与C1、C2组相似,DAD评分差异无统计学意义。

**2.2 各组大鼠肺组织W/D比值、MPO活性及BALF中TNF- $\alpha$ 浓度比较(表1):**与A组及B组比较,C组W/D比值、MPO活性及BALF中TNF- $\alpha$ 浓度显著升高,D组各指标较C组显著下降(均 $P<0.05$ ),E组各指标与C组比较差异无统计学意义。

#### 2.3 Western Blot结果

**2.3.1 Cav-1蛋白表达(表2;图1):**C组、D组及E组Cav-1表达均较A组及B组明显增高(均 $P<0.05$ ),B组较A组有轻度增高。

**2.3.2 P-Cav-1-Y14蛋白表达(表2;图1):**C组P-Cav-1-Y14表达较A组及B组明显增高,D组及E组P-Cav-1-Y14表达较C组明显降低(均 $P<0.05$ ),并与A组及B组相似。

**表1** 各组大鼠肺 DAD 评分、W/D 比值、MPO 活性及 BALF 中 TNF- $\alpha$  浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	DAD 评分 (分)	W/D 比值	MPO (U/g)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
A 组	6	0.60 $\pm$ 0.20	4.66 $\pm$ 0.48	0.61 $\pm$ 0.14	49.28 $\pm$ 10.37
B1 组	6	0.55 $\pm$ 0.13	5.04 $\pm$ 0.63	0.77 $\pm$ 0.26	54.38 $\pm$ 8.18
B2 组	6	0.65 $\pm$ 0.17	5.15 $\pm$ 0.50	1.03 $\pm$ 0.24	54.11 $\pm$ 8.23
C1 组	6	7.97 $\pm$ 0.59 <sup>ab</sup>	5.70 $\pm$ 1.61 <sup>ab</sup>	1.82 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	370.10 $\pm$ 29.61 <sup>ab</sup>
C2 组	6	11.00 $\pm$ 1.18 <sup>ab</sup>	5.98 $\pm$ 1.05 <sup>ab</sup>	2.46 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	463.55 $\pm$ 5.33 <sup>ab</sup>
D1 组	6	5.06 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>	4.78 $\pm$ 1.03 <sup>c</sup>	1.18 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	122.10 $\pm$ 12.38 <sup>c</sup>
D2 组	6	7.37 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>	5.19 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>	1.38 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	156.63 $\pm$ 12.11 <sup>c</sup>
E1 组	6	7.28 $\pm$ 0.92 <sup>abd</sup>	5.15 $\pm$ 1.32 <sup>abd</sup>	1.65 $\pm$ 0.19 <sup>abd</sup>	351.60 $\pm$ 28.86 <sup>abd</sup>
E2 组	6	10.02 $\pm$ 0.77 <sup>abd</sup>	6.33 $\pm$ 1.07 <sup>abd</sup>	2.25 $\pm$ 0.33 <sup>abd</sup>	453.52 $\pm$ 18.68 <sup>abd</sup>

注: A 组为正常对照组, B1、B2 组分别为保护性通气 1 h、2 h 组, C1、C2 组分别为大潮气量通气 1 h、2 h 组, D1、D2 组分别为酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) + 大潮气量通气 1 h、2 h 组, E1、E2 组分别为 PP2+ 血红素加氧酶 -1 抑制剂锌原卟啉 IX (ZnPP IX) + 大潮气量通气 1 h、2 h 组; DAD 评分为弥漫性肺泡损伤系统评分, W/D 为肺湿/干质量比值, MPO 为髓过氧化物酶, BALF 为支气管肺泡灌洗液, TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子 - $\alpha$ ; 与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 C 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 D 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$

**表2** 各组大鼠肺组织 Cav-1、P-Cav-1-Y14、HO-1 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	Cav-1 (灰度值)	P-Cav-1-Y14 (灰度值)	HO-1 (灰度值)
A 组	6	1.13 $\pm$ 0.16	0.82 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.02
B1 组	6	1.26 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.01
B2 组	6	1.27 $\pm$ 0.27	0.95 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 0.02
C1 组	6	1.49 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.34 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.59 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
C2 组	6	1.58 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.31 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>
D1 组	6	1.51 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.84 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.98 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
D2 组	6	1.54 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.89 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.10 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
E1 组	6	1.52 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.85 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
E2 组	6	1.53 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.90 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.50 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>

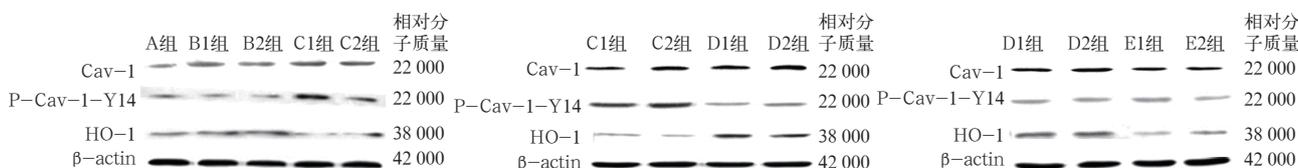
注: A 组为正常对照组, B1、B2 组分别为保护性通气 1 h 和 2 h 组, C1、C2 组分别为大潮气量通气 1 h 和 2 h 组, D1、D2 组分别为酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) + 大潮气量通气 1 h 和 2 h 组, E1、E2 组分别为 PP2 + 血红素加氧酶 -1 (HO-1) 抑制剂锌原卟啉 IX (ZnPP IX) + 大潮气量通气 1 h 和 2 h 组; Cav-1 为小窝蛋白 -1, P-Cav-1-Y14 为在酪氨酸残基 Y14 上磷酸化的小窝蛋白 -1; 与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 C 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

**2.3.3** HO-1 蛋白表达 (表 2; 图 1): C 组 HO-1 表达较 A 组及 B 组明显降低 (均  $P < 0.05$ ); D 组 HO-1 表达较 C 组明显升高 (均  $P < 0.05$ ); E 组 HO-1 表达与 C 组差异无统计学意义。

**2.4** 各组大鼠 HMGB1 和 RAGE 的表达 (图 2~3): HMGB1 和 RAGE 蛋白阳性产物为细胞核着色为主的棕黄色颗粒, 主要表达于支气管上皮细胞、炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞等。与 A 组比较, C 组及 E 组的 HMGB1 和 RAGE 表达明显增高; A 组、B 组、D 组之间表达无差异。

### 3 讨论

国内外对急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征 (ALI/ARDS) 的发病机制进行了广泛的研究<sup>[16-21]</sup>。而信号链激活以应对应力损伤是肺的基本调节机制之一。众多的信号链构成成分如 Ras、Rac、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 及 HO-1 等被发现密集分布在小窝上, 并可与小窝中的 Cav-1 交互反应<sup>[1-5]</sup>。前期的实验已证实, Cav-1 是肺血管内皮屏障功能关键的调节因子, 在机械通气所致的肺损伤中都有 Cav-1 高表达<sup>[6-8]</sup>。本实验再次证实, 与保护性通气组对比, 大  $V_T$  通气可引起 Cav-1 表达增加及 Cav-1-Y14 快速磷酸化。Sun 等<sup>[14]</sup>研究已证实, Cav-1 磷酸化是氧化剂引发内皮细胞功能紊乱的关键步骤。Cav-1 磷酸化不仅可以调节小窝蛋白介导的白蛋白转运增加 (即跨细胞浸透性), 同样也可引发旁细胞高渗透性 (即使内皮屏障功能的完整性降低), 而这种降低主要由 Cav-1-Y14 磷酸化引起, 从而导致内皮细胞连接处 Cav-1 与  $\beta$ -连环蛋白及钙黏着蛋白的显著解离。本实验虽未直接用免疫组化技术检测内皮细胞连接处 Cav-1 与  $\beta$ -连环蛋白及钙黏着蛋白的变化, 但却发现大  $V_T$  通气组肺泡渗出液较保护性通气组明显增多, 但如用 PP2 阻断 Cav-1 磷酸化, 大  $V_T$  通气组肺渗出明显减少。显然对牵拉应力损伤模型,



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, Cav-1 为小窝蛋白 -1, P-Cav-1-Y14 为在酪氨酸残基 Y14 上磷酸化的小窝蛋白 -1, HO-1 为血红素加氧酶 -1,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白; A 组为正常对照组, B1、B2 组分别为保护性通气 1 h、2 h 组, C1、C2 组分别为大潮气量通气 1 h、2 h 组, D1、D2 组分别为酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) + 大潮气量通气 1 h、2 h 组, E1、E2 组分别为 PP2 + HO-1 抑制剂锌原卟啉 IX (ZnPP IX) + 大潮气量通气 1 h、2 h 组

**图1** Western Blot 检测各组大鼠肺组织 Cav-1、P-Cav-1-Y14、HO-1 的蛋白表达

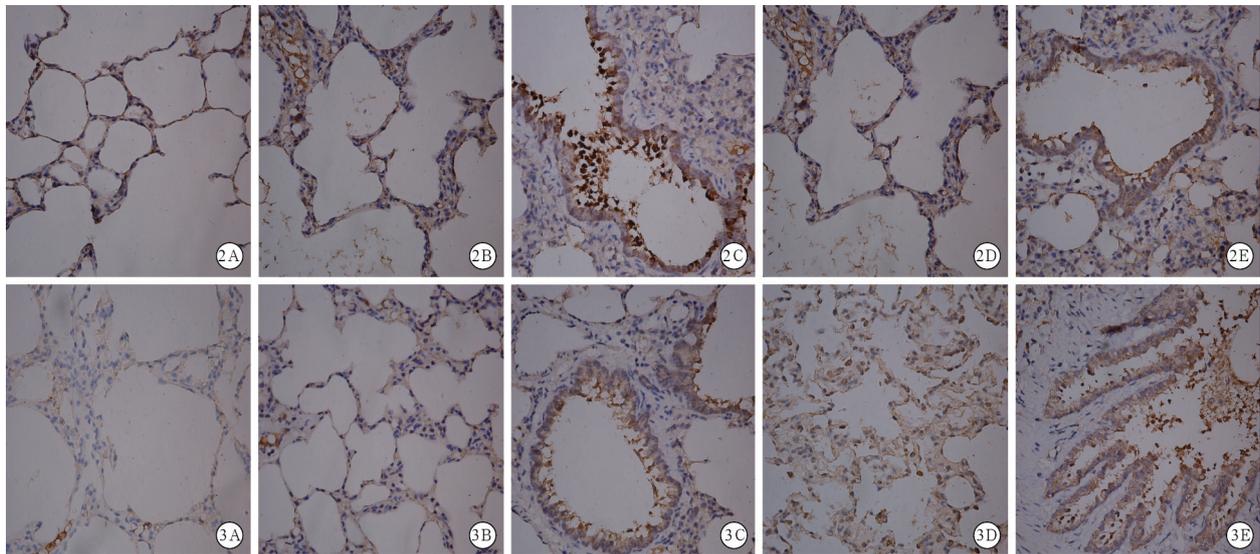


图 2 光镜下观察各组大鼠肺组织高迁移率族蛋白 B1 (HMBG1) 的表达 HMBG1 阳性产物为细胞核着色棕黄色颗粒,正常对照组 (A) 肺组织未见棕黄色颗粒;保护性通气 1 h 组 (B) 肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞棕黄色颗粒较正常对照组有所增多;大潮气量通气 1 h 组 (C) 肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞密集存在棕黄色颗粒;酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) + 大潮气量机械通气 1 h 组 (D) 与大潮气量 1 h 组 (C) 相比肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞棕黄色颗粒明显减少;PP2 + 血红素加氧酶 -1 (HO-1) 抑制剂锌原卟啉 IX (ZnPP IX) + 大潮气量通气 1 h 组 (E) 与大潮气量通气 1 h 组 (C) 相比肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞棕黄色颗粒亦明显减少 免疫组化 低倍放大 图 3 光镜下观察各组大鼠肺组织中晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 的表达 RAGE 阳性产物为细胞核着色棕黄色颗粒,正常对照组 (A) 肺组织未见棕黄色颗粒;保护性通气 1 h 组 (B) 肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞棕黄色颗粒较正常对照组有所增多;大潮气量通气 1 h 组 (C) 肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞密集存在棕黄色颗粒;酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) + 大潮气量机械通气 1 h 组 (D) 与大潮气量通气 1 h 组 (C) 相比肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞棕黄色颗粒明显减少;PP2 + HO-1 抑制剂锌原卟啉 IX (ZnPP IX) + 大潮气量通气 1 h 组 (E) 与大潮气量通气 1 h 组 (C) 相比肺炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞棕黄色颗粒亦明显减少 免疫组化 低倍放大

Cav-1 磷酸化仍是调控血管屏障功能的重要因素。

Jin 等<sup>[9]</sup>前期研究证实, Cav-1 基因敲除小鼠的 HO-1 活性明显升高,而高氧却可使 HO-1 活性降低;使用 ZnPP IX 抑制 HO-1 活性可废除 Cav-1 基因敲除带来的生存益处。这提示, Cav-1 基因敲除保护高氧所致的肺损伤涉及到 HO-1 及 Cav-1 交互反应的调节,在血管内皮细胞, Cav-1 可作为负性调节因子去调节 HO-1 的活性。Kunzmann 等<sup>[22]</sup>在另一项研究中发现,羊水内毒素降低了胎儿肺 Cav-1 mRNA 及蛋白表达,激活了 Stat、Smad 等转录因子,同时胎儿肺 HO-1 表达也上调。这些研究均证实了 Cav-1 表达与 HO-1 活性密切相关。而本研究亦在活体机械通气损伤模型中证实, Cav-1-Y14 磷酸化与 HO-1 活性密切相关,大 V<sub>T</sub> 通气可使 Cav-1-Y14 磷酸化增加,同时可使 HO-1 表达降低;但如用 PP2 抑制酪氨酸激酶活性并阻止 Cav-1-Y14 磷酸化后,大 V<sub>T</sub> 通气 HO-1 表达仍明显升高。已知在许多细胞及组织损伤模型中, HO-1 通过抗炎、抗凋亡及抗氧化效应对细胞可起到一种保护作用<sup>[10-13]</sup>。本研究亦发现,与大 V<sub>T</sub> 通气组比较, PP2 预处理的大 V<sub>T</sub> 通气组 HO-1 活性增加,肺损伤减轻,肺 W/D

比值、BALF 中 TNF- $\alpha$  浓度及肺组织 MPO 活性均减少;但用酪氨酸激酶抑制剂 PP2 和 HO-1 抑制剂 ZnPP IX 预处理后,因 ZnPP IX 抑制了 PP2 带来的 HO-1 活性增加,则可导致肺损伤再次加重。

但也有 Cav-1 表达增强可减轻机械通气损伤的研究报告<sup>[6]</sup>。此外, Zhang 等<sup>[15]</sup>的研究亦发现, HO-1 活性可负性调节 TLR4 信号链,但 HO-1/CO 对 TLR4 信号链的负性调节需要支架蛋白 Cav-1 的表达,即 Cav-1 可与 HO-1 及 TLR4 TIR 区域的基团结合;HO-1/Cav-1 与 TLR4 复合物结合促进了 MyD88 衔接子从 TLR4 分离,TLR4 信号链的传递终止;另外, Cav-1 表达降低亦可影响 HO-1 在细胞膜上的分区,使 TLR4 信号链下调功能受损,从而增加炎症介质的产生。该作者认为 Cav-1 表达增加可对抗炎症反应,这与本研究结果不符。但本次实验并未对这一方面深入研究,说明 Cav-1/HO-1 信号链轴调控的复杂性,值得进一步深入研究。

RAGE 是一种可对感染、损伤及炎症作出反应的模式识别受体 (PRR),主要表达于 I 型肺泡上皮细胞,且 RAGE 及其配体相互作用可使细胞内信号链激活并激活核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B),故有研究

证实 RAGE 在 ALI/ARDS 发病机制中起着十分重要的作用<sup>[23-24]</sup>。HMGB1 是 RAGE 的多种配体之一, 作为迟发的炎性介质, 在内毒素诱发的 ALI 形成和发展中也有重要作用<sup>[25-26]</sup>。本研究发现, 在通气损伤较重的大  $V_T$  通气组及 PP2、ZnPP IX 预处理的大  $V_T$  通气组, 肺组织中 HMGB1 及 RAGE 都有明显表达。近期有研究报告证实, 酪氨酸激酶及 Cav-1 磷酸化在 RAGE 介导的炎症基因表达及 RAGE 配体所引发的下游信号链的传输上起着十分重要的作用<sup>[27]</sup>。另外, 酪氨酸激酶活化及 Cav-1 磷酸化亦需 RAGE 及其配体参与, 故酪氨酸激酶活化及 Cav-1 磷酸化是大  $V_T$  引起损伤的机制之一; 而将酪氨酸激酶及 Cav-1 磷酸化阻断是损伤减轻的原因之一。相关研究已证实, HO-1 基因缺失小鼠肺的 HMGB1 表达水平较高<sup>[28]</sup>, 如增加 HO-1 活性则可明显地抑制 HMGB1 的表达, 而 HMGB1 表达水平与肺组织损伤的程度一致, 这与本研究结果是符合的。

综上, 本研究证实了 Cav-1 表达及 Cav-1-Y14 磷酸化是肺通气损伤的关键因素, Cav-1-Y14 磷酸化不仅可导致血管屏障功能的完整性降低, 亦可抑制 HO-1 活性, 从而进一步加重肺组织炎症损伤。此外, Cav-1-Y14 磷酸化亦与 HMGB1 及 RAGE 表达增强及肺组织损伤加重有关。

#### 参考文献

- [1] Jin Y, Lee SJ, Minshall RD, et al. Caveolin-1: a critical regulator of lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300 (2): L151-160.
- [2] Chen Z, Bakhshi FR, Shajahan AN, et al. Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23 (7): 1388-1398.
- [3] Siddiqui MR, Komarova YA, Vogel SM, et al. Caveolin-1-eNOS signaling promotes p190RhoGAP-A nitration and endothelial permeability [J]. *J Cell Biol*, 2011, 193 (5): 841-850.
- [4] Shao M, Yue Y, Sun GY, et al. Caveolin-1 regulates Rac1 activation and rat pulmonary microvascular endothelial hyperpermeability induced by TNF- $\alpha$  [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e55213.
- [5] 陈思伟, 肖军, 钟荣, 等. 小窝蛋白-1 通过 p38 MAPK 信号链通路对大鼠机械通气所致肺损伤的保护机制研究[J]. *中国急救医学*, 2014, 34 (12): 1133-1137.
- [6] Hoetzel A, Schmidt R, Vallbracht S, et al. Carbon monoxide prevents ventilator-induced lung injury via caveolin-1 [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37 (5): 1708-1715.
- [7] 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 及其相关信号链酶表达的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (3): 154-158.
- [8] Maniatis NA, Kardara M, Hecimovich D, et al. Role of caveolin-1 expression in the pathogenesis of pulmonary edema in ventilator-induced lung injury [J]. *Pulm Circ*, 2012, 2 (4): 452-460.
- [9] Jin Y, Kim HP, Chi M, et al. Deletion of caveolin-1 protects against oxidative lung injury via up-regulation of heme oxygenase-1 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39 (2): 171-179.
- [10] An L, Liu CT, Yu MJ, et al. Heme oxygenase-1 system, inflammation and ventilator-induced lung injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 677 (1-3): 1-4.
- [11] 刘海霞, 陈森, 杨秀娟, 等. 血红素加氧酶-1 对过氧化氢损伤的 II 型肺泡上皮细胞凋亡的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (2): 110-114.
- [12] 王宇辉, 陈森, 吴艳, 等. 血红素加氧酶-1 对大鼠 II 型肺泡上皮细胞凋亡及水通道蛋白-1 表达的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (6): 351-355.
- [13] Luo YP, Jiang L, Kang K, et al. Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20 (1): 24-32.
- [14] Sun Y, Hu G, Zhang X, et al. Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways [J]. *Circ Res*, 2009, 105 (7): 676-685.
- [15] Zhang PX, Murray TS, Vilella VR, et al. Reduced caveolin-1 promotes hyperinflammation due to abnormal heme oxygenase-1 localization in lipopolysaccharide-challenged macrophages with dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator [J]. *J Immunol*, 2013, 190 (10): 5196-5206.
- [16] 宋晓聪, 胡丹, 郇姗姗, 等. 外源性白蛋白输注对早期急性呼吸窘迫综合征肺毛细血管蛋白渗漏的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19 (2): 68-70.
- [17] 高婧, 杨艳荣, 梁昱泉. 人肺泡 II 型上皮细胞表面抗原在急性呼吸窘迫综合征患者中的变化及地塞米松的保护作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19 (2): 83-85.
- [18] 陈林, 尚游, 姚尚龙. 机械通气所致肺损伤的分子生物学机制研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (2): 126-128.
- [19] 傅威, 毛璞, 张容, 等. 机械牵张对人肺动脉内皮细胞中细胞因子及细胞间黏附分子-1 表达的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (8): 484-488.
- [20] Hashemian SM, Mohajerani SA, Jamaati HR. Ventilator-induced lung injury [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370 (10): 979-980.
- [21] Chiumello D, Carlesso E, Cadringer P, et al. Lung stress and strain during mechanical ventilation for acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178 (4): 346-355.
- [22] Kunzmann S, Collins JJ, Yang Y, et al. Antenatal inflammation reduces expression of caveolin-1 and influences multiple signaling pathways in preterm fetal lungs [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45 (5): 969-976.
- [23] Guo WA, Knight PR, Raghavendran K. The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38 (10): 1588-1598.
- [24] Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294 (4): H1823-1832.
- [25] Fink MP. Bench-to-bedside review: High-mobility group box 1 and critical illness [J]. *Crit Care*, 2007, 11 (5): 229.
- [26] Achouiti A, van der Meer AJ, Florquin S, et al. High-mobility group box 1 and the receptor for advanced glycation end products contribute to lung injury during *Staphylococcus aureus* pneumonia [J]. *Crit Care*, 2013, 17 (6): R296.
- [27] Reddy MA, Li SL, Sahar S, et al. Key role of Src kinase in S100B-induced activation of the receptor for advanced glycation end products in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (19): 13685-13693.
- [28] Takamiya R, Hung CC, Hall SR, et al. High-mobility group box 1 contributes to lethality of endotoxemia in heme oxygenase-1-deficient mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41 (2): 129-135.

(收稿日期: 2015-02-12)

(本文编辑: 李银平)