基因激活在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究进展

孙志鹏 尚游 姚尚龙

机械通气是临床上危重患者重要的治疗措施,但其并发症之一呼吸机相关性肺损伤(VILI)是重症监护中重要的临床问题。VILI的机制包括炎症、气道屏障破坏、肺泡水肿、细胞损伤和凋亡^[1],并涉及多个交互的病理生理学机制,如在组织学水平,机械通气可引起气压伤、容量伤、萎陷伤;在细胞水平,通过应力变化对肺上皮细胞和血管内皮细胞产生生物伤^[2]。目前除应用小潮气量机械通气外,几乎没有任何有效的临床策略来阻止VILI的进展。但对VILI的分子生物学和基因学基础已经进行了深入研究^[3],发现基因激活在许多病理生理反应如早期诱导基因、毛细血管通透性改变、细胞凋亡、纤维蛋白沉积、炎性细胞因子释放、氧化应激反应、血管生成和中性粒细胞浸润中都发挥着重要作用。一些研究已经从实验室转化为临床,旨在提供更多可行的治疗手段。现将基因激活在VILI中的作用进展综述如下。

1 早期反应基因

目前研究发现,早期反应基因之一Egr1(early growth response-1)负责编码一种核转录因子,在VILI时表达明显上调且作用显著。Egr1能诱导前列腺素E₂合成酶以增加前列腺素E₂(PGE₂)的合成,从而激活肺前列腺素E受体1(EP1受体),促进肺损伤的形成。如果敲除Egr1基因或阻断EP1受体,则可减轻VILI模型小鼠肺损伤程度,明显减少细胞因子的释放和PGE₂的合成。由于早期反应中基因作用出现较早,因此对基因和相应产物的检测可以在临床可疑VILI症状出现之前进行诊断或干预^[4]。

2 毛细血管渗漏和血管内皮细胞通透性改变

在机械应力牵张时,磷脂酰肌醇3激酶 γ (PI3K γ)被激活,诱导产生一氧化氮(NO),并参与环磷酸腺苷(cAMP)水解,其中每个环节均可导致肺泡水肿。PI3K γ 基因敲除小鼠的VILI发生率降低,同时磷酸化蛋白激酶B(Akt)、血管内皮型一氧化氮合酶(eNOS)以及硝基酪氨酸生成和cAMP水解均相应减少。与此一致的是,PI3K γ 抑制剂对野生型VILI模型小鼠有部分保护作用^[5]。

此外,在VILI时瞬时感受器电位离子通道香草素受体4(TRPV4)被激活,钙内流增加,同时促进NO和氧自由基的生成,导致血管通透性增加。如果将激活的野生型VILI模型小鼠巨噬细胞引入TRPV4敲除小鼠的肺部,可造成肺损

伤加重,这也证实了巨噬细胞TRPV4的重要作用^[6]。

研究表明,在脂多糖(LPS)诱导的肺损伤和VILI模型中,增加II型脱碘酶(DIO2)的基因或蛋白表达可以减轻肺损伤,而用小干扰RNA(siRNA)抑制DIO2的表达后,模型小鼠的肺损伤加重^[7]。进一步的脓毒症相关急性肺损伤(ALI)临床对照研究表明,携带有DIO2基因上编码SNP非同义序列G(Ala)等位基因的患者,对严重脓毒症和脓毒症相关ALI具有保护作用^[7]。

血管内皮生长因子(VEGF)参与调节血管通透性和内皮细胞的存活。有研究表明,羟乙基淀粉(HES)对VILI的保护作用与其对VEGF的调节有关,因为HES可以减少小鼠VEGF生成和减轻肺水肿,在应用VEGF siRNA时可以得到类似的结果^[8]。

由肌球蛋白轻链激酶异构体(nmMLCK)介导的细胞骨架重建可以调节血管内皮屏障功能,其同样对血管生成、内皮细胞凋亡、白细胞渗出有调节作用^[9]。病例对照研究表明,在MYLK基因(编码nmMLCK)SNPs位点的基因变异可增加对ALI的易感性^[10]。而在VILI实验模型应用膜通透性的肌球蛋白轻链激酶抑制剂或nmMLCK siRNA可降低肺泡和内皮细胞的通透性,敲除nmMLCK基因可以减少肺损伤模型核转录因子等基因的表达,减轻转录因子NF-E2相关因子2(Nrf2)介导的氧化应激反应,减少血液凝固、白细胞渗出,抑制p53以及白细胞介素-6(IL-6)信号通路^[11]。

3 肺泡细胞凋亡

研究证实,PI3K γ /Akt信号通路除可调节毛细血管通透性外,还可以保护高氧诱导的损伤。在体外培养高氧暴露的上皮细胞转染的Akt编码基因可以降低天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)活性(即减少凋亡);在动物模型,气管内的Akt基因治疗能够改善新生大鼠高氧处理后的生长停滞,证实了凋亡刺激的消除是由PI3K γ /Akt信号通路转导的^[12]。

4 蛋白沉积

分泌性糖蛋白Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路可以调节生长因子,激活多种信号通路,控制细胞增殖、分化和迁移^[13]。 β -catenin可以调节50多种基因的转录,包括组织基质金属蛋白酶(MMPs)。肺巨噬细胞和II型上皮细胞可以产生MMP-7,调节肺纤维化。事实上脓毒症诱导的VILI能上调Wnt/ β -catenin的表达,促进MMP-7蛋白合成和肺泡沉积增加,表明这一途径可能介导了VILI后的肺纤维化^[14]。

5 促炎因子的产生

Toll样受体4(TLR4)诱发骨髓分化因子88(MyD88)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.10.017

基金项目:国家自然科学基金(81372036)

作者单位:430022 湖北武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉与危重病医学研究所(孙志鹏、尚游、姚尚龙),ICU(尚游),麻醉科(姚尚龙)

通讯作者:尚游, Email: you_shang@yahoo.com

依赖的下游信号通路,导致核转录因子 κ B (NF- κ B) 的激活和促炎细胞因子的生成^[15]。TLR4 或 MyD88 基因缺失可以减轻大潮气量机械通气诱发的 ALI,以及减少 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 的降解;而 I κ B α 增加可以抑制 NF- κ B 通路^[16]。这两种基因的缺失也可以减少细胞外信号调节激酶 (ERK) 的磷酸化,而 ERK 是一条主要的促炎信号通路。与 TLR4 类似,激活 TLR3 受体同样可促进 VILI 的发生^[17]。然而,尽管也依赖于 MyD88,但 TLR3 和 TLR4 似乎是相互独立的。有研究表明,TLR2 和 TLR9 在大鼠 VILI 模型中也发挥了相关作用^[18-19]。

此外,MMP-8 由中性粒细胞合成,对体内趋化因子的产生至关重要^[20]。基因消融或药物抑制可以减少 VILI 模型中性粒细胞浸润以及 γ -干扰素 (IFN- γ) 和趋化因子的生成,但也增加了抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 的产生,因此,MMP-8 也可以作为 VILI 的治疗靶点。

6 氧化应激

吸入高浓度氧会促进 VILI 模型细胞的凋亡,这涉及一种新近发现的几丁质酶样蛋白,即 YKL-40 (BRP-39)。在 BRP-39 $-/-$ 小鼠 VILI 模型中,高氧可以抑制 BRP-39,从而增强肺损伤时肺泡和上皮细胞的凋亡,这些影响在 YKL-40 过表达的呼吸道上皮细胞减弱^[21]。临床上也证实,在早产儿发生呼吸窘迫时,呼吸道 YKL-40 水平与支气管肺发育不良和死亡风险密切相关^[22]。

活性氧 (ROS) 在肺部炎症中扮演了多种角色。在人类肺动脉内皮细胞,高氧导致囊泡调节因子 (dynamin-2)、非受体酪氨酸激酶 (c-Abl) 及 NADPH 氧化酶亚基 (p47phox) 在微囊蛋白富集区 (CEM) 募集,使用 siRNA 沉默蛋白-1 (caveolin-1) 或 c-Abl 表达可阻断 CEM 和 ROS 的生成^[23]。同样, dynamin-2 siRNA 或 dynamin GTP 酶抑制剂处理人肺动脉内皮细胞,可以缓解高氧介导的 ROS 生成以及 p47phox 在 CEM 的募集。在小鼠,高氧会促进 ROS 生成增加、c-Abl 激活、p47phox 与 dynamin-2 结合和肺通透性增加,所有这些病变在 caveolin-1 敲除鼠得到改善,从而证实 CEM 在 ROS 生成的作用。这些结果表明,高氧诱导 c-Abl 介导的 dynamin-2 磷酸化需要 p47phox 在 CEM 募集于肺内皮和随后 ROS 在肺内皮细胞的生成^[24]。

在 VILI 相关氧化应激中,一氧化氮合酶 3 (NOS3) 催化产生超氧化物。敲除 NOS3 基因可以减少超氧化物生成,从而缓解 VILI。使用抗氧化剂 (如四氢生物蝶呤和抗坏血酸) 预处理也可以减轻 VILI^[25]。

Nrf2 是一种转录因子,其能够通过结合顺式抗氧化反应单元 (AREs) 诱导抗氧化剂和防御基因的表达,因而 Nrf2-AREs 通路能够保护高氧诱导的炎症^[26]。通过高氧对 Nrf2 $+/+$ 和 Nrf2 $-/-$ 小鼠影响的研究发现了一些重要的基因,其中包括 Ppar γ 基因,该基因编码过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)。激活 PPAR γ 受体 (配体 15d-PGJ2) 可减轻高氧诱导的炎症,而其在动物实验使用 siRNA 沉默后,炎症反应加重。通过比较 Nrf2 $-/-$ 与野生型小鼠的研究

表明,PPAR γ 的抗炎效应在一定程度上依赖于 Nrf2^[27]。

7 中性粒细胞浸润

最近在中枢神经系统发现了一种神经迁移蛋白,即 netrin-1,其能够调节轴突生长和生长圆锥迁移,已被证实可以通过刺激腺苷 2b 受体,负性调节中性粒细胞迁移,发挥抗炎作用^[28]。敲除 netrin-1 基因可导致 VILI 的炎症反应增强,这种作用可被静脉注射 netrin-1 拮抗^[29]。

TLR4 是 LPS 诱导炎症的关键中介,在 VILI 中也发挥着重要作用^[30]。肺 TLR4 的表达在 VILI 中明显上调,在给予 LPS 预处理后其明显增强。单纯给予 LPS 或大潮气量机械通气,可以激活循环中的多形核细胞 (PMNs) 和血管内皮细胞,两者结合会显著加强这种效应;而在 tlr4 $-/-$ 小鼠,中性粒细胞和血管内皮细胞的激活作用消失。另外在 tlr4 $+/+$ 小鼠,PMNs 能够导致肺血管通透性增加,而 tlr4 $-/-$ 小鼠却没有。此外,tlr4 $+/+$ PMN 诱导的渗出和肺血管通透性增加的作用在隔离 tlr4 $-/-$ 的肺中减弱,表明中性粒细胞和肺内 TLR4 介导了肺血管损伤^[31]。

综上所述,最近对 VILI 信号通路的研究集中于上游和下游的分子,目前面临的挑战是将现有的研究结果整理成完整的框架^[32]。一些具有潜在治疗价值的方法已经应用于临床,而更多的仍是处于实验室阶段,最近的研究进展将实验室与临床拉近了一步^[33-34]。此外,在人群中预测基因变异对 VILI 的识别还处于起步阶段,更进一步的研究数据将来可以用于发现在不同人群易感性中有价值的基因预测因子。

参考文献

- [1] Frank JA, Matthay MA. Science review: mechanisms of ventilator-induced injury [J]. Crit Care, 2003, 7 (3): 233-241.
- [2] Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside [J]. Intensive Care Med, 2006, 32 (1): 24-33.
- [3] 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.
- [4] Ngiam N, Peltekova V, Engelberts D, et al. Early growth response-1 worsens ventilator-induced lung injury by up-regulating prostanoid synthesis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181 (9): 947-956.
- [5] Fanelli V, Puntorieri V, Assenzio B, et al. Pulmonary-derived phosphoinositide 3-kinase gamma (PI3K γ) contributes to ventilator-induced lung injury and edema [J]. Intensive Care Med, 2010, 36 (11): 1935-1945.
- [6] Hamanaka K, Jian MY, Townsley MI, et al. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299 (3): L353-362.
- [7] Ma SF, Xie L, Pino-Yanes M, et al. Type 2 deiodinase and host responses of sepsis and acute lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45 (6): 1203-1211.
- [8] Li LF, Huang CC, Liu YY, et al. Hydroxyethyl starch reduces high stretch ventilation-augmented lung injury via vascular endothelial growth factor [J]. Transl Res, 2011, 157 (5): 293-305.
- [9] Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability [J]. J Appl Physiol (1985), 2001, 91 (4): 1487-1500.
- [10] Desai AA, Hysi P, Garcia JG. Integrating genomic and clinical medicine: searching for susceptibility genes in complex lung diseases [J]. Transl Res, 2008, 151 (4): 181-193.
- [11] Mirzapoiazova T, Moitra J, Moreno-Vinasco L, et al. Non-muscle

- myosin light chain kinase isoform is a viable molecular target in acute inflammatory lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44 (1): 40-52.
- [12] Alphonse RS, Vadivel A, Coltan L, et al. Activation of Akt protects alveoli from neonatal oxygen-induced lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44 (2): 146-154.
- [13] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781-810.
- [14] Villar J, Cabrera NE, Casula M, et al. WNT/ β -catenin signaling is modulated by mechanical ventilation in an experimental model of acute lung injury [J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37 (7): 1201-1209.
- [15] Imai Y, Kuba K, Neely GG, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury [J]. *Cell*, 2008, 133 (2): 235-249.
- [16] 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.
- [17] Chun CD, Liles WC, Frevert CW, et al. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor-3-induced lung inflammation via a MyD88-dependent, TLR4-independent pathway: a controlled animal study [J]. *BMC Pulm Med*, 2010, 10: 57.
- [18] 傅瑞丽, 潘灵辉, 林飞, 等. 调控 Toll 样受体 2/ 核转录因子 κ B 信号通路对呼吸机相关性肺损伤大鼠的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (12): 865-869.
- [19] 戴惠军, 潘灵辉, 林飞, 等. 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 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (5): 289-293.
- [20] Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17 (4): 217-223.
- [21] 荣令, 殷瑞和, 周新. YKL-40 在呼吸病中作用的研究进展 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2011, 5 (3): 823-825.
- [22] Sohn MH, Kang MJ, Matsuura H, et al. The chitinase-like proteins breast regression protein-39 and YKL-40 regulate hyperoxia-induced acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182 (7): 918-928.
- [23] 方以群, 张懿. 高氧诱导的急性肺损伤研究现状及治疗靶点 [J]. *转化医学杂志*, 2013, 2 (5): 260-265.
- [24] Singleton PA, Pendyala S, Gorshkova IA, et al. Dynamin 2 and c-Abl are novel regulators of hyperoxia-mediated NADPH oxidase activation and reactive oxygen species production in caveolin-enriched microdomains of the endothelium [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (50): 34964-34975.
- [25] Vaporidi K, Francis RC, Bloch KD, et al. Nitric oxide synthase 3 contributes to ventilator-induced lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299 (2): L150-159.
- [26] Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, et al. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26 (2): 175-182.
- [27] Cho HY, Gladwell W, Wang X, et al. Nrf2-regulated PPAR γ expression is critical to protection against acute lung injury in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182 (2): 170-182.
- [28] Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, et al. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (41): 14729-14734.
- [29] Mirakaj V, Thix CA, Laucher S, et al. Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181 (8): 815-824.
- [30] Held HD, Boettcher S, Hamann L, et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor- κ B and is blocked by steroids [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163 (3 Pt 1): 711-716.
- [31] Hu G, Malik AB, Minshall RD. Toll-like receptor 4 mediates neutrophil sequestration and lung injury induced by endotoxin and hyperinflation [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38 (1): 194-201.
- [32] 黄涛. 机械通气肺损伤机制及防治新进展 [J]. *医学综述*, 2014, 20 (12): 2173-2175.
- [33] 秦英智. 进一步提高机械通气的应用与管理水平 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (7): 545-547.
- [34] 刘冠锦. 低潮气量机械通气在呼吸机相关性肺损伤中的应用进展 [J]. *重庆医学*, 2011, 40 (34): 3513-3515.

(收稿日期: 2015-05-13)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

比较早期及晚期或未行气管切开术对机械通气危重患者病死率和肺炎的影响: 一项回顾性 Meta 分析

危重患者经喉插管约 2 周后再行气管切开是目前大型试验结果推荐的做法, 然而, 这些试验未能证明这种做法对患者病死率的影响, 而这对于临床来说是非常重要的。因此有学者进行了一项回顾性 Meta 分析, 旨在评估早期及晚期或未行气管切开治疗对需要机械通气危重患者病死率和肺炎发生的影响。研究者系统检索美国国立医学图书馆 PubMed、CINAHL、荷兰医学文摘 EMBASE、Web of Science、DOAJ、Cochrane 临床试验数据库的相关文献及科学会议录, 以及截至 2013 年 8 月 31 日的灰色文献, 纳入标准是比较机械通气危重患者早期气管切开 (经喉插管后 1 周内) 和晚期气管切开 (机械通气 1 周后) 或未行气管切开患者的病死率和肺炎发病情况的随机对照试验; 研究的主要终点为重症加强治疗病房 (ICU) 住院期间的全因病死率和呼吸机相关性肺炎 (VAP) 的发生率。ICU 住院期间的病死率包括明确的 ICU 病死率、推定病死率和 28 d 病死率。结果显示: 共对 13 个临床试验进行了分析 (2 434 例患者, 死亡 648 例)。与晚期气管切开组或未行气管切开组比较, 早期气管切开组 ICU 全因病死率并没有显著降低 [比值比 (OR) = 0.8, 95% 可信区间 (95%CI) = 0.59 ~ 1.09, P = 0.16]; 当只分析偏倚风险较低的试验 (8 个临床试验 1 934 例患者) 时这一结果仍成立 (死亡 511 例; OR = 0.80, 95%CI = 0.59 ~ 1.09, P = 0.16)。与晚期气管切开组或未行气管切开组比较, 早期气管切开组 VAP 发生率较低 (发生 691 例; OR = 0.60, 95%CI = 0.41 ~ 0.90, P = 0.01; 共分析 13 个临床试验的 1 599 例患者)。组间 1 年病死率比较差异无统计学意义 [788 例死亡; 风险比 (RR) = 0.93, 95%CI = 0.85 ~ 1.02, P = 0.14; 分析了 3 个临床试验的 1 529 例患者]。该 Meta 分析表明, 与晚期气管切开或未行气管切开比较, 早期气管切开并不能降低机械通气危重患者的病死率, 但尽早气管切开可降低 VAP 发生率。然而气管切开对患者长期病死率的益处并不明显, 同时还有潜在的并发症, 因此也需慎重考虑; 进一步对长期预后结果进行研究是必要的。

喻文, 罗红敏, 编译自《Lancet Respir Med》, 2015, 3 (2): 150-158

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25680911>