・论著・

基于 GEO 数据库呼吸机相关性肺损伤小鼠基因芯片数据的生物信息学分析及关键基因验证

陈盛松^{1,2} 张祎¹ 詹庆元^{1,2}

¹中日友好医院呼吸中心呼吸与危重症科,国家呼吸医学中心,国家呼吸疾病临床医学研究中心, 中国医学科学院呼吸病学研究院,世界卫生组织戒烟与呼吸疾病预防合作中心,北京 100029; ²北京协和医学院研究生院,北京 100730 通信作者: 詹庆元, Email: drzhanqy@163.com

【摘要】 目的 利用生物信息学方法挖掘呼吸机相关性肺损伤(VILI)小鼠的差异表达基因(DEG),并通 过构建 VILI 小鼠模型对关键基因进行验证。方法 ① 实验 1(生物信息学分析):从基因表达数据库(GEO)下 载 VILI 与自主呼吸对照组小鼠的肺组织基因芯片数据 GSE9368 和 GSE11662,通过统计分析获得 DEG,运用韦 恩图获得两个数据的共同 DEG,然后使用 DAVID 在线数据库对共同 DEG 进行基因本体(GO)功能注释和京都 基因与基因组百科(KEGG)通路富集分析,最后利用基因与蛋白质相互作用检索在线数据库(STRING)对共同 DEG 进行基因编码蛋白相互作用(PPI)分析,并运用 CvtoScape 软件、分子复合物检测分析插件(MCODE),以及 CytoHubba插件中最大团中心性(MCC)、最大邻居连通度(MNC)与度(degree)算法进行拓扑分析,筛选出关键 基因。②实验2(相关基因编码蛋白验证):构建C57BL/6小鼠大潮气量(20mL/kg)VILI模型,并设自主呼吸对 照组。取小鼠肺组织进行苏木素-伊红(HE)染色,观察肺组织病理学改变;并对实验1中筛选出的关键基因编 码蛋白进行免疫组化验证。结果 ① 实验1结果: GSE9368 数据中筛选出114个 DEG,其中上调99个,下调 15个; CSE11662数据中筛选出 258个 DEG, 其中上调 188个, 下调 70个; 获得共同 DEG 66个, 其中上调 61个, 下调 5 个。GO 功能注释结果表明,共同 DEG 参与炎症反应、免疫应答、白细胞及中性粒细胞趋化浸润等过程; KEGG 通路富集分析提示共同 DEG 主要富集于细胞黏附、细胞因子-细胞因子受体相互作用及肿瘤坏死因子 (TNF)信号通路等。通过 STRING 及 CytoScape 构建差异基因 PPI 网络图和重要子模块,并获得拓扑分析 MCC、 MNC及degree 算法得出的交集基因,分别为细胞因子信号转导抑制因子3(SOCS3)、白细胞介素-1β(IL-1β)、基 质金属蛋白酶-9(MMP-9)、整合素 ltgam、CXC 型趋化因子配体 2(CXCL2)、CXC 型趋化因子受体 2(CXCR2)、 L-选择素 Sell及 CC 型趋化因子受体 1(CCR1)。②实验2结果:构建大潮气量 VILI小鼠模型结果显示,与自主呼 吸对照组相比,机械通气结束后0h小鼠肺组织有所损伤;通气结束后6h肺组织结构受损明显,肺泡腔可见不 同程度出血和塌陷,肺泡壁明显增厚,肺泡腔及间质还可见炎症细胞浸润。对拓扑分析交集前3位基因 Π-1β、 SOCS3、MMP-9的编码蛋白进行免疫组化染色,结果显示,随通气时间延长,小鼠肺组织中 IL-1β、SOCS3、 MMP-9蛋白表达逐渐上调, 6 h 时与自主呼吸对照组比较差异均有统计学意义〔IL-1β(积分 A 值): 8.40±2.67 比 5.10±0.94, SOCS3(积分 A 值):9.74±1.80 比 5.95±1.31, MMP-9(积分 A 值):11.45±6.20 比 5.36±1.28, 均 P<0.05 〕。结论 基于 GSE9368 和 GSE11662 数据的生物信息学分析发现, VILI 与炎症损伤、细胞因子及 免疫细胞浸润相关;IL-1β、SOCS3、MMP-9蛋白可能为VILI生物标志物。

【关键词】 呼吸机相关性肺损伤; 生物信息学; 炎症损伤 基金项目:国家自然科学基金(81870072) DOI:10.3760/cma.j.cn121430-20210823-01260

Bioinformatics analysis of ventilator-induced lung injury genome microarray based on gene expression omnibus database and key gene verification

Chen Shengsong^{1, 2}, Zhang Yi¹, Zhan Qingyuan^{1, 2}

¹Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Center of Respiratory Medicine, National Center for Respiratory Medicine, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, Institute of Respiratory Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, WHO Collaborating Centre for Tobacco Cessation and Respiratory Diseases Prevention, Beijing 100029, China; ²Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: Zhan Qingyuan, Email: drzhanqy@163.com

[Abstract] Objective To investigate differential expression gene (DEG) in mice with ventilator-induced lung injury (VILI) by bioinformatics analysis, and to verify the key genes by reproducing the VILI mouse model. **Methods** ① Experiment 1 (bioinformatics analysis): the microarray dataset of GSE9368 and GSE11662 regarding VILI mice and those in the spontaneous breathing control group were downloaded from the gene expression omnibus (GEO) database. DEG obtained by R and Venn map was further used to obtain common DEG. DAVID online database was

used to obtain gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. Finally, the protein-protein interaction (PPI) analysis of common DEG was carried out by using Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Database (STRING) and the key genes were screened out by using CytoScape software, molecular complex detection (MCODE) analysis plug-in and CytoHubba plug-in with maximum cluster centrality (MCC), maximum neighbor connectivity (MNC) and degree. 2) Experiment 2 (related protein verification): VILI mouse model was reproduced by high tidal volume (20 mL/kg) ventilator. Spontaneous breathing control group was set up. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to assess lung injury and the key genes screened in experiment 1 were verified by immunohistochemical staining. **Results** ① Experiment 1 results: a total of 114 DEG were screened from GSE9368 dataset, including 99 up-regulated genes and 15 down-regulated genes. A total of 258 DEG were screened from GSE11662 dataset, including 188 up-regulated genes and 70 down-regulated genes. Furthermore, 66 common DEG were obtained, including 61 up-regulated genes and 5 down-regulated genes. GO analysis showed that the common DEG were mainly involved in inflammatory response, immune response, leukocyte and neutrophil chemotaxis. KEGG analysis showed that the common DEG were involved cell adhesion, cytokine receptor interaction and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway. STRING and CytoScape analysis were used to construct gene PPI network diagram and important sub modules. And the CytoHubba plug-in with MCC, MNC and degree algorithms was used to perform topology analysis and then taken an intersection to obtain eight genes including suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), interleukin-1β (IL-1β), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), integrin Itgam, CXC chemokine ligand 2 (CXCL2), CXC chemokine receptor 2 (CXCR2), Sell and CC chemokine receptor 1 (CCR1). (2) Experiment 2 results: a mouse model of high tidal volume VILI was reproduced. Compared with the spontaneous breathing control group, the lung tissue was injured slightly at 0 hour after the end of ventilation, and the lung tissue structure was significantly damaged at 6 hours after the end of ventilation, showing bleeding in alveolar cavity, significant increase and collapse of alveolar wall thickness, and infiltration of inflammatory cells. The top three genes from intersection and topological analysis including IL-1B, SOCS3 and MMP-9 were verified by immunohistochemical staining. The results showed that the expressions of IL-1β, SOCS3 and MMP-9 were gradually increased with time of ventilation, the differences were found at 6 hours as compared with those in the spontaneous breathing control group [IL-1 β (integral A value): 8.40 ± 2.67 vs. 5.10 ± 0.94, SOCS3 (integral A value): 9.74 ± 1.80 vs. 5.95 ± 1.31 , MMP-9 (integral A value): 11.45 ± 6.20 vs. 5.36 ± 1.28 , all P < 0.05]. Conclusion Bioin formatics analysis based on GSE9368 and GSE11662 data sets found that VILI is mainly related to inflammatory injury, cytokines and immune cell infiltration; IL-1β, SOCS3 and MMP-9 might be biomarkers of VILI.

[Key words] Ventilator-induced lung injury; Bioinformatics analysis; Inflammatory injury **Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81870072)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210823-01260

机械通气(mechanical ventilation,MV)是高级生 命支持必不可少的手段,但因局部肺泡反复过度拉 伸和(或)肺泡塌陷,MV也可导致呼吸机相关性肺 损伤(ventilator-induced lung injury,VILI)^[1]。VILI的 病理生理机制复杂,容积伤、气压伤、肺不张、生物 伤、强烈的自主呼吸及心肺交互作用等均是VILI的 主要致病原因^[1-2]。目前研究较多的为生物伤,即 肺源性炎症介质的局部与全身血液循环释放^[1-2]。

VILI 生物伤的具体机制仍不清楚,包括白细胞 募集浸润、促炎因子释放、活性氧生成及补体激活 等,多种相关基因在 VILI 发生发展中扮演着重要角 色^[3-4]。本研究通过检索美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 基因表达数据库(Gege Expression Omnibus, GEO)中 VILI 相关的基因芯片数据集,筛选出差异表达基因 (differential expressed gene, DEG),利用在线数据库 分析 DEG 网络调控及其编码蛋白相互作用(proteinprotein interaction, PPI)网络图,同时通过构建 VILI 小鼠模型,对肺组织进行苏木素-伊红(hematoxylineosin, HE)染色与免疫组化染色验证,为阐明 VILI 发病的生物学机制、寻找早期诊断和治疗的新靶点提供理论基础与证据。

1 资料与方法

1.1 研究方法:本实验为国家自然科学基金项目 (81870072)内容,该项目经中日友好医院伦理委员 会审批(审批号:zryhyy21-20-01-4)。首先利用生物 信息学方法挖掘 VILI 小鼠 DEG,然后通过构建 VILI 小鼠模型对关键基因进行验证。所有操作均遵照实 验动物保护条例及实验动物伦理实施。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 数据的获取及方法:利用 GEO 数据库,通过 关键词"ventilator induced lung injury""VILI"检索并 整理出有关 VILI 小鼠的基因芯片数据 GSE9368 和 GSE11662,均为 8~12 周龄 C57BL/6 小鼠, VILI 组呼 吸机参数:潮气量 30 mL/kg,通气频率 65 次 /min,呼 气末正压(positive end-expiratory pressure, PEEP)为0, 吸入氧浓度(fraction of inspired oxygen, FiO₂)0.21,持 续 4 h; 对照组小鼠均自主呼吸 4 h。两个芯片数据 中分别包含 VILI 组 3 个样本、对照组 3 个样本,都为 基于 GPL1261 平台获得的小鼠全基因转录生物信息。 **1.2.2** DEG 表达分析:基因芯片数据设置筛选条件为 llog₂ 差异倍数(fold change,FC) l≥1、P<0.05,利用 R 4.0.4 软件的 limma 包分别对两个芯片数据进行 归一化处理,采用 Bayes 方法进行多重检验校正,筛 选出符合条件的 DEG。利用 R 4.0.4 软件 pheatmap 包绘制前 50 个 DEG 表达热图,利用 R 4.0.4 软件的 ggplot2 包绘制火山图,利用 DeepVenn 在线韦恩图 软件对从两个芯片数据中筛选得到的 DEG 通过取 交集获得共同 DEG。

1.2.3 基因本体(gene ontology,GO)功能注释和京都 基因与基因组百科(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析:将获得的共同 DEG 运用 DAVID 在线软件进行 GO 功能注释与 KEGG 通 路富集分析,GO 功能注释从细胞组分、分子功能及 生物过程 3 个层面分析。

1.2.4 DEG 编码蛋白 PPI分析:利用基因与蛋白质相 互作用检索在线数据库(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Database, STRING)对共同 DEG 编码蛋白进行 PPI分析,将结果导入 CytoScape 软件 及 CytoHubba 插件〔包括最大团中心性(maximum cluster centrality, MCC)、最大邻居连通度(maximum neighbor connectivity, MNC)与度(degree)算法〕进行 关联性和可视化分析,用分子复合物检测(molecular complex detection, MCODE)分析插件筛选关键蛋白。 **1.3** 相关基因编码蛋白验证

1.3.1 VILI小鼠模型构建:8~10周龄C57BL/6雄 性小鼠购自北京斯贝福生物技术公司,动物许可证 号:SCXK(京)2019-0010,饲养于中日友好医院SPF 级动物实验室。以氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉小鼠,切 开颈前皮肤暴露气管,将22G静脉套管插入气管, 用丝线固定后连接小动物呼吸机,采用容量控制通 气模式,潮气量20mL/kg,通气频率80次/min,PEEP 为0,FiO₂为0.21,持续通气4h;对照组仅气管插 管但不通气,自主呼吸4h。

1.3.2 HE染色与免疫组化:注射过量戊巴比妥处死 小鼠后取肺组织,用多聚甲醛固定后,石蜡包埋、切 片,HE染色,脱水透明,中性树胶封片,光镜下观察 并分析;常规脱蜡,柠檬酸修复抗原,过氧化物酶阻 断,血清封闭,一抗4℃过夜,辣根过氧化物酶标记, 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显 色,苏木素复染,盐酸乙醇分化,冰醋酸溶液等冲洗, 置入梯度乙醇脱水与二甲苯透明,中性树胶封片,光 镜下随机选取10个视野拍照,黄色或棕黄色颗粒即 为阳性表达。应用 Image Pro Plus 6.0 软件分析积分 吸光度(absorbance, A)值,代表蛋白表达量。

1.4 统计学方法:用SPSS 19.0及GraphPad Prism 5.0 软件统计分析所有数据。计量资料符合正态分布, 以均数 ± 标准差(\bar{x} ±s)表示,各组间比较方差齐则 使用独立样本 t 检验或单因素方差分析,否则采用 非参数秩和检验。P < 0.05表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物信息学分析结果

2.1.1 DEG 表达分析:分析得到两个基因芯片数据中两组样本 DEG 后,分别以 log₂FC 为横坐标、-log₁₀P 为 纵坐标绘制火山图,结果显示(图 1), GSE9368 数据 中共筛选出 114个 DEG,其中上调 99 个,下调 15 个; GSE11662 数据中共筛选出 258 个 DEG,其中上调 188 个,下调 70 个;分别取前 50 个 DEG 进行聚类 分析,并绘制热图(图 2)。



2.1.2 DEG 富集分析:通过聚类共获得 306个 DEG, GSE9368 数据 258 个,GSE11662 数据 114 个,两个 数据的共同 DEG 有 66个,其中上调 61 个,下调 5个。 对 66个共同 DEG 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富 集分析。GO 功能注释显示,细胞组分主要富集于细 胞膜、细胞外间隙、细胞表面及细胞外基质等,分子 功能包括蛋白结合、锌离子结合、转录调控区 DNA 结合、细胞因子活性、金属肽酶活性、金属内肽酶活 性、纤维连接蛋白结合、花生四烯酸结合、晚期糖 基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end product,RAGE)结合、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4) 结合等,生物过程包括炎症反应、免疫应答、 白细胞和中性粒细胞趋化聚集、血管生成、凝血调 节、Fc-γ 受体信号通路及伤口愈合等(图 3)。



差异表达基因;图中英文缩写为不同基因芯片数据中两组小鼠的前50个DEG,不同颜色代表基因表达量,红色为上调,蓝色为下调





注:GSE9368和GSE11662为从基因表达数据库(GEO)中筛选出的 有关呼吸机相关性肺损伤(VILI)小鼠的基因芯片数据;DEG为 差异表达基因,GO为基因本体,RAGE为晚期糖基化终产物受体

图 3 GSE9368 和 GSE11662 两个基因芯片数据中 VILI 组 与自主呼吸对照组小鼠共同 DEG 的 GO 功能注释 KEGG 通路富集分析显示,66 个 DEG 主要富集 于细胞黏附、细胞因子-细胞因子受体相互作用、肿 瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路等 (图 4)。

2.1.3 PPI分析:运用 STRING 在线数据库对富集分析中获得的 66 个共同 DEG 进行 PPI分析,同时构 建多中心预测的 PPI 网络图,应用 MCODE 插件进行 关键模块筛选,最终筛选出 1 个重要子模块(亮黄色 部分;图 5A)。

应用 CytoHubba 插件中的 MCC、MNC 及 degree 算法进行拓扑分析,共得到了 8 个交集基因,分别为 细胞因子信号转导抑制因子 3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)、白细胞介素 -1β(interleukin-1β, IL-1β)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、整合素 Itgam、CXC型趋化因子配体2(CXC chemokine ligand 2, CXCL2)、CXC 型趋化因子受体 2 (CXC chemokine receptor 2, CXCR2)、L-选择素 Sell 及 CC 型趋化因子受体 1(CC chemokine receptor 1, CCR1; 图 5B)。







注:GSE9368和GSE11662为从基因表达数据库(GEO)中筛选出的 有关呼吸机相关性肺损伤(VILI)小鼠的基因芯片数据;DEG为差异 表达基因,PPI为基因编码蛋白相互作用;图A英文缩写为两个 基因芯片数据中两组小鼠的共同DEG,图B算法包括最大团中心性 (MCC)、最大邻居连通度(MNC)与度(degree),数字代表基因数

图 5 GSE9368和 GSE11662两个基因芯片数据中 VILI 组与自主 呼吸对照组小鼠共同 DEG 的 PPI 网络图(A)及算法交集基因(B)

2.2 相关基因编码蛋白验证

2.2.1 VILI小鼠肺组织病理学改变(图 6):自主呼吸对照组小鼠肺组织结构完整,无明显病理学改变。通过制备大潮气量 VILI小鼠模型发现,与对照组相比, VILI 组小鼠通气结束后 0 h 肺组织结构有所损伤,肺泡壁厚度有所增加;而通气结束后 6 h 肺组织

结构受损明显,肺泡腔可见出血与塌陷,肺泡壁不同 程度增厚,还可见巨噬细胞等炎症细胞浸润。



图 6 光镜下观察两组小鼠肺组织病理学改变 自主呼吸对照 组(A)肺组织结构完整;呼吸机相关性肺损伤(VILI)组大潮气 量通气后 0 h(B)肺组织结构有所损伤,而通气后 6 h(C)肺组织 结构受损明显,肺泡腔可见少量出血,肺泡壁厚度增加,肺泡腔塌 陷,还可见炎症细胞浸润 HE 染色 高倍放大

2.2.2 VILI小鼠肺组织免疫组化分析:对拓扑分析 获得的前3位交集基因IL-1β、SOCS3、MMP-9的编 码蛋白进行免疫组化染色显示(图7),自主呼吸对照 组小鼠肺组织中仅有少量IL-1β、SOCS3、MMP-9蛋 白表达;大潮气量机械通气后小鼠肺组织中IL-1β、 SOCS3、MMP-9蛋白表达均随通气时间延长逐渐增 加;定量分析也显示(图8),VILI组6h上述蛋白表 达均较对照组明显上调(均 P<0.05)。



图7 光镜下观察各组小鼠肺组织白细胞介素-1β(IL-1β)、细胞 因子信号转导抑制因子3(SOCS3)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9) 蛋白表达 黄色或棕黄色颗粒即为阳性表达。自主呼吸对照组 仅有少量 IL-1β、SOCS3、MMP-9 蛋白表达。呼吸机相关性肺损 伤(VILI)组大潮气量通气后0h肺组织中IL-1β、SOCS3、MMP-9 蛋白表达与自主呼吸对照组无明显差异;而通气后6hIL-1β、 SOCS3、MMP-9蛋白表达均较自主呼吸对照组明显增加 免疫 组化染色 高倍放大



与自主呼吸对照组比较, ^aP<0.05; 与本组0h比较, ^bP<0.01

8 两组小鼠肺组织中 IL-1β、SOCS3、MMP-9 蛋白表达比较

3 讨 论

既往研究表明, VILI 的发病机制可以分为气压 伤、容积伤和肺不张^[1]。近年来有研究表明,机械 通气在维持气体交换的同时,可触发激活肺部促炎 因子与炎症细胞级联放大反应而导致的损伤,被称 为"生物伤"^[1-2]。过度表达炎症反应可损伤肺组织, 并引起继发损伤,故即使在没有受到明显机械损伤 的肺部区域及肺外器官也能导致损伤,甚至导致多 器官功能衰竭^[1-2]。

本研究中利用 GEO 数据中 VILI 相关 DEG 分 析证实, VILI 的生物过程包括炎症反应、免疫应答、 白细胞及中性粒细胞趋化聚集等, 细胞组分主要聚 集于细胞膜、细胞外间隙、细胞表面及细胞外基质 等, 分子功能富集于蛋白结合、锌离子结合、转录调 控区 DNA 结合、细胞因子活性、金属肽酶活性、金 属内肽酶活性、纤维连接蛋白结合、花生四烯酸结 合、RAGE 受体及 TLR 受体结合等, KEGG 通路富 集分析提示主要富集于细胞黏附、细胞因子-细胞 因子受体相互作用及 TNF 信号通路等。靶向调控 炎症反应及其信号通路可为防治 VILI 提供研究基 础与策略, 如何精准调控炎症及信号通路成为目前 的研究热点。

本研究中利用生物信息学分析筛选出相关度 最高的 8 个基因,即 SOCS3、IL-1β、MMP-9、整合素 Itgam、CXCL2、CXCR2、Sell及CCR1,可能在 VILI发 生发展中扮演重要角色。

机械通气时的机械牵拉可以直接损伤肺上皮和(或)通过机械-生物转导激活炎症,进而损伤肺上皮,II型肺泡上皮细胞和巨噬细胞TLR激活并分泌炎症细胞趋化因子如CXCL2,从而招募更多

的外周血中性粒细胞迁移至血管内皮,释放炎症因 子和蛋白酶,并诱导活性氧和中性粒细胞胞外诱捕 网产生,进而导致肺血管内皮与肺上皮细胞损伤; 同样,单核/巨噬细胞也会迁移至肺部,通过β-干 扰素(interferon- β , IFN- β)依赖释放 TNF 相关的凋 亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), TRAIL 激活死亡受体,进而引起肺部损伤 而凋亡。上述机制共同导致肺内皮和上皮细胞通透 性增加,促进白细胞迁移,并导致肺水肿及肺泡出 血,引起低氧血症及呼吸衰竭等发生^[5]。中性粒细 胞趋化因子 CXCL2 和 CXCR2、黏附分子 CD11b 和 L-选择素 Sell 在大潮气量机械通气导致损伤的肺 组织中高表达,同时与调控外周血白细胞特别是中 性粒细胞募集进入肺部诱导 VILI 密切相关^[6-7]。特 异性抑制CCR1〔巨噬细胞炎症蛋白-1α(macrophage inflammatory protein-1α, MIP-1α)的主要受体〕可减 少机械通气引起的肺损伤和中性粒细胞浸润,抑制 炎症介质,有助于改善VILI,而靶向调控细胞因子 及信号转导靶点有待进一步阐明[8]。

IL-1β 是一种重要的促炎细胞因子,主要由活 化的巨噬细胞表达^[9-10]。有研究表明,机械拉伸可通 过激活巨噬细胞 TLR 及其下游信号诱导 IL-1β 蛋白 前体表达,并由天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1)剪切形成成熟的 IL-1β 蛋白释放至细胞 外,导致周边组织细胞炎症损伤,包括支气管肺泡灌 洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 IL-1β、 TNF-α和 MIP-2 明显升高^[11-13]。香草乙酮^[12]、布地 奈德^[14]、橙皮素^[15]及帕瑞昔布^[16]等可以通过抑制 IL-1β 等细胞因子表达而减轻 VILI。因此,IL-1β 可 能是 VILI 生物学标志物及潜在治疗靶点。

SOCS3 为一种细胞因子信号转导抑制调控因 子,可反馈性调控 Janus 激酶-信号转导和转录激活 因子(Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT) 信号通路, 参与多种细胞调节过 程^[17]。Fang 等^[17]研究发现,生理性循环拉伸预处 理可以通过 IL-6/STAT3 通路降低机械牵张诱导的 高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1, HMGB1)表达,同时上调 SOCS3 蛋白的表达。Hoegl 等^[18]研究结果显示,在肺上皮细胞 A549 牵拉模型 中,IL-22 能够诱导 STAT3 磷酸化激活, SOCS3 蛋白 表达升高;在 VILI 大鼠模型中,在诱导 VILI 前预防 性吸入 IL-22 可以降低 VILI 相关生物损伤,并介导 肺组织 STAT3/SOCS3 基因的活化,因此, IL-22 可能 通过激活 STAT3 和下游基因 SOCS3 保护肺泡上皮. 减轻炎症损伤, SOCS3 蛋白可以作为 VILI 防治靶点 深入研究。

MMP-9 主要参与中性粒细胞的迁移,与急性炎 症密切相关,主要由中性粒细胞等炎症细胞分泌表 达^[19]。有研究表明,VILI时肺组织中性粒细胞浸润, 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性增强,肺 组织和 BALF 中 MMP-9 蛋白活性增强,而 MMP-9 蛋白可以通过抑制肺泡中性粒细胞浸润,从而减轻 VILI^[20-21]。然而,Albaiceta等^[22]通过构建 VILI模 型发现,与野生小鼠相比,MMP-8 基因敲低小鼠中 性粒细胞浸润减少,且 IFN-γ、CXC 型趋化因子和 MIP-2 表达降低,肺组织和 BALF 中的抗炎细胞因子 IL-4 与 IL-10 显著升高,肺水肿和肺损伤减轻,提示 MMP-8 可能成为防治 VILI 的靶点。

综上所述,本研究利用数据库分析出 VILI 相关 DEG 主要富集于炎症反应、免疫应答、白细胞及中 性粒细胞趋化浸润等,IL-1β、SOCS3、MMP-9 蛋白 可能为 VILI 的候选标志物,可进一步为特异性药物 研发及防治 VILI 提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Curley GF, Laffey JG, Zhang HB, et al. Biotrauma and ventilatorinduced lung injury: clinical implications [J]. Chest, 2016, 150 (5): 1109–1117. DOI: 10.1016/j.chest.2016.07.019.
- [2] 蒋璐璐,高巨.呼吸机相关性肺损伤分子机制研究新进展[J]. 中华危重病急救医学,2020,32(7):890-893.DOI:10.3760/cma. j.cn121430-20200324-00099.
- [3] Chen L, Xia HF, Shang Y, et al. Molecular mechanisms of ventilatorinduced lung injury [J]. Chin Med J (Engl), 2018, 131 (10): 1225– 1231. DOI: 10.4103/0366-6999.226840.
- [4] 杨依依,姚尚龙,尚游.呼吸机相关性肺损伤发病机制研究 新进展[J].中华危重病急救医学,2016,28 (9):861-864.DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2016.09.020.

- [5] Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5 (1): 18. DOI: 10.1038/s41572-019-0069-0.
- [6] Francis RC, Vaporidi K, Bloch KD, et al. Protective and detrimental effects of sodium sulfide and hydrogen sulfide in murine ventilatorinduced lung injury [J]. Anesthesiology, 2011, 115 (5): 1012–1021. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31823306cf.
- [7] Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury [J]. J Clin Invest, 2002, 110 (11): 1703–1716. DOI: 10.1172/JCI15849.
- [8] Blázquez-Prieto J, López-Alonso I, Amado-Rodríguez L, et al. Exposure to mechanical ventilation promotes tolerance to ventilatorinduced lung injury by Ccl3 downregulation [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 309 (8): L847-856. DOI: 10.1152/ ajplung.00193.2015.
- [9] Maruyama K, Nemoto E, Yamada S. Mechanical regulation of macrophage function: cyclic tensile force inhibits NLRP3 inflammasomedependent IL-1 β secretion in murine macrophages [J]. Inflamm Regen, 2019, 39: 3. DOI: 10.1186/s41232-019-0092-2.
- [10] 邵容格,杜学柯.细胞死亡在急性呼吸窘迫综合征中的相关研究[J].中国中西医结合急救杂志,2021,28 (2):239-243. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.02.028.
- [11] Wu JB, Yan ZB, 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. DOI: 10.4049/jimmunol.1200860.
- [12] Chiang CH, Chuang CH, Liu SL, et al. Apocynin attenuates ventilator-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model [J]. Intensive Care Med, 2011, 37 (8): 1360–1367. DOI: 10.1007/s00134–011–2251–z.
- [13] 张维康,潘灵辉. NOD样受体蛋白3炎症小体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, 2015, 27 (10): 821-825. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.10.008.
- [14] Gao W, Ju YN. Budesonide attenuates ventilator-induced lung injury in a rat model of inflammatory acute respiratory distress syndrome [J]. Arch Med Res, 2016, 47 (4): 275–284. DOI: 10.1016/ j.arcmed.2016.07.012.
- [15] Ma HZ, Feng XL, Ding SC. Hesperetin attenuates ventilator-induced acute lung injury through inhibition of NF-κB-mediated inflammation [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 769: 333-341. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.11.038.
- [16] Meng FY, Gao W, Ju YN. Parecoxib reduced ventilation induced lung injury in acute respiratory distress syndrome [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2017, 18 (1): 25. DOI: 10.1186/s40360-017-0131-z.
- [17] Fang XZ, Huang TF, Wang CJ, et al. Preconditioning of physiological cyclic stretch attenuated HMGB1 expression in pathologically mechanical stretch-activated A549 cells and ventilator-induced lung injury rats through inhibition of IL-6/STAT3/SOCS3 [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 31: 66–73. DOI: 10.1016/j.intimp.2015. 12.017.
- [18] Hoegl S, Bachmann M, Scheiermann P, et al. Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44 (3): 369-376. DOI: 10.1165/ rcmb.2009-04400C.
- [19] 童尧,李泉. MMP-9、HIF-1和SIRT1在急性肺损伤中的研究进展[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25 (3): 384-388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.03.029.
- [20] Albaiceta GM, Gutiérrez-Fernández A, Parra D, et al. Lack of matrix metalloproteinase-9 worsens ventilator-induced lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294 (3): L535-543. DOI: 10.1152/ajplung.00334.2007.
- [21] Kim JH, Suk MH, Yoon DW, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 prevents neutrophilic inflammation in ventilator-induced lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291 (4): L580-587. DOI: 10.1152/ajplung.00270. 2005.
- [22] Albaiceta GM, Gutierrez-Fernández A, García-Prieto E, et al. Absence or inhibition of matrix metalloproteinase-8 decreases ventilator-induced lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43 (5): 555-563. DOI: 10.1165/rcmb.2009-00340C. (收稿日期: 2021-08-23)