

• 论著 •

小窝蛋白-1对p38MAPK的调控在大潮气量机械通气致大鼠肺损伤中的作用研究

侯明霞, 张新日 (通讯作者*)

(山西医科大学第一医院, 山西 太原)

摘要: 目的 探讨小窝蛋白-1(cav-1)对P38丝裂原活化蛋白激酶(P38MAPK)活性的调控在机械通气所致肺损伤(VILI)中的作用。方法 雄性Wistar大鼠24只,随机均分为:对照组、大潮气量通气半小时组(H-VT0.5h组)、大潮气量通气2小时组(H-VT2h组)。在光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变,测定BALF总蛋白(TP)含量,计算肺湿/干重比值(W/D),测定各组大鼠肺组织中cav-1及磷酸化P38MAPK(p-P38MAPK)的表达水平。结果 与对照组比较,H-VT0.5h组大鼠肺组织中cav-1表达明显增高($P<0.05$),而BALF TP含量、W/D比值及p-P38MAPK表达差异无明显统计学意义(均 $P>0.05$);与H-VT0.5h组比较,H-VT2h组大鼠肺组织病理学改变明显,BALF TP含量、W/D比值、cav-1及p-P38MAPK表达均明显增高(均 $P<0.01$);大鼠肺组织中cav-1含量与p-P38MAPK的表达呈正相关($r=0.769$,均 $P<0.01$)。说明,大潮气量机械通气可能通过刺激肺组织细胞表面cav-1表达,从而诱导P38MAPK活化,导致肺组织损伤。结论 cav-1参与了VILI的发生,且cav-1调控P38MAPK活化有可能是导致VILI发生的重要途径之一。

关键词: 机械通气所致肺损伤(VILI);小窝蛋白-1;P38丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R333.6

文献标识码: A

DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.16.005

本文引用格式: 侯明霞,张新日.小窝蛋白-1对p38MAPK的调控在大潮气量机械通气致大鼠肺损伤中的作用研究[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(16):8-10.

The Effects of Caveolin-1 on the Expression of P38MAPK Induced by High Tidal Volume Ventilation in Lung Tissue of Rats

HOU Ming-xia, ZHANG Xin-ri*

(The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan Shanxi)

ABSTRACT: Objective To discuss the role of the cav-1 on the activation of the P38MAPK in ventilator induced lung injury(VILI).

Methods I divided twenty-four healthy male Wistar rats into three groups randomly: control group, high tidal volume half an hour group(group H-VT0.5h),high tidal volume 2 hour group(group H-VT2h). I observed the pathological changes of the lungs under light microscope. The levels of total protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was measured by Bicinchoninic acid method. At the same time, the lung wet/dry weight ratio(W/D) was calculated. The expression of the caveolin-1 and the P-P38 MAPK in lung tissues of rats was detected by immunohistochemistry(SABC), and their relation was analyzed. **Results** All of the levels of total protein in BALF, W/D, the cav-1, the P-P38 MAPK in lung tissues of H-VT2h group were higher than H-VT0.5h group and control group(all $P<0.01$), and the histopathological changes under light microscope were apparently more serious. The expression levels of cav-1 in lung tissues of H-VT0.5h group was higher than control group($P<0.01$). The levels of the above indicators except the cav-1 in lung tissues of H-VT0.5h group were no statistical significance compared with control group (all $P>0.05$). The correlation analysis between the P-P38MAPK and the cav-1 was positively correlated ($r=0.769$, all $P<0.01$). On the whole, in the acute lung injury caused by high tidal volume ventilation, the expression of the cav-1 may activated the P-P38 MAPK. **Conclusions** In VILI, cav-1 control P38MAPK activation may be one of the important ways.

KEY WORDS: Mechanical ventilation; Ventilator induced lung injury(VILI); Caveolin-1; P38 MAPK

0 引言

机械通气所致肺损伤(ventilator induced lung injury,VILI)是机械通气最严重的并发症之一,研究其发病机制和防治措施,对指导呼吸机的临床使用有重要价值。近年的研究发现,小窝蛋白-1(cav-1)在急性肺损伤中发挥着重要作用^[1,2,3,5],它可通过调控多种信号转导途径影响肺损伤的发生发展,其中P38丝裂原活化蛋白激酶(P38mitogen-activated protein kinase, P38MAPK)是受其调控的重要信号转导途径之一。本实验通过测定大潮气量机械通气大鼠肺组织中cav-1、p-P38MAPK含量,探讨cav-1对P38MAPK活性的调控在VILI发生中的作用,从而为VILI的防治提供新的思路及途径。

1 材料和方法

1.1 动物分组与模型制备

健康成年雄性Wistar大鼠24只(清洁级,山西医科大学动物中心提供),体重280~320g,随机分为3组:(1)对照组:未行机械通气;(2)大潮气量通气半小时组(H-VT_{0.5h}组);(3)大潮气量通气2小时组(H-VT_{2h}组)。

大鼠经腹腔注射25%乌拉坦(4mL/kg)麻醉后行气管切开。除对照组外,其余各组均通过玻璃三通管与小动物呼吸机(DH-150型,浙江大学医学仪器厂制造)相连接行机械通气。各组通气参数除时间外,其余均相同:VT=40mL/kg, I/E:1:3, FiO₂:21%, F:60次/min, PEEP:0cmH₂O。

1.2 标本收集与制备

通气结束后腹主动脉放血处死大鼠,切取肺组织。取左肺行

支气管肺泡灌洗术(4mL×4次),回收量不少于80%,支气管肺泡灌洗液(BALF)经3000r/min离心15min,取上清液-70℃冻存,测其总蛋白含量。取右肺下叶行肺湿/干重(W/D)比值测定。取右肺中叶用中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,行HE染色病理学检测及免疫组织化学检测。

1.3 BALF总蛋白含量测定

采用Bicinchoninic acid(BCA)法(武汉博士德生物工程有限公司提供)测定BALF总蛋白含量,操作步骤严格按照试剂说明书进行。

1.4 肺组织W/D测定

取右肺下叶用生理盐水冲洗干净表面血迹,再用无菌纱布吸干表面液体后称重(湿重W),再置于60℃烤箱中过夜,然后称重(干重D),计算肺组织W/D。

1.5 肺组织小窝蛋白-1、p-P38MAPK免疫组织化学染色

采用亲和链霉素-生物素-过氧化物复合物法(SABC)对肺组织进行cav-1、p-P38MAPK免疫组织化学染色,试剂由武汉博士德生物工程有限公司提供,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。cav-1兔抗大鼠抗体(一抗)稀释为1:200浓度,p-P38MAPK兔抗大鼠抗体(一抗)稀释为1:500浓度,均以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。结果判断:cav-1阳性染色为细胞浆内出现棕黄色颗粒,p-P38MAPK阳性染色为细胞核内出现棕黄色颗粒。每张肺组织切片随机选取5个高倍视野在400倍光镜下进行观察。采用BI-2000医学图像分析系统分别检测每个视野cav-1、p-P38MAPK染色阳性细胞的平均光密度值(A值),以上述5个视野的平均值作为该大鼠细支气管上皮细胞蛋白表达的相对含量。

1.6 统计学方法

全部数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 13.0软件包

基金项目:山西医科大学青年基金,项目编号:02201515;山西医科大学第一医院规培基金,项目编号:YP1401。

进行统计学分析,采用 One-way ANOVA 方法进行不同参数的统计学分析,若差异有统计学意义,各组均数用 LSD-t 检验进行组间两两比较,相关性分析采用 Pearson 相关分析法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织病理学改变

光镜下观察 HE 染色切片,对照组大鼠肺泡结构及各级支气管上皮完整,肺间质无明显炎性细胞浸润。H-V_{T0.5h} 组大鼠肺组织结构与对照组相比无明显变化。H-V_{T2h} 组大鼠肺组织可见肺泡间隔增宽,肺间质弥漫性水肿,伴炎性细胞浸润,部分肺泡破裂、融合,小血管断裂,肺泡腔内有大量血性液体渗出。见附图 1~3。

2.2 各组肺组织 W/D 比值、BALF 总蛋白含量测定结果

各组大鼠肺组织 W/D 比值、BALF 总蛋白含量测定结果见表 1。结果显示:H-V_{T2h} 组各项指标均较对照组和 H-V_{T0.5h} 组明显增高(均 $P < 0.01$);对照组和 H-V_{T0.5h} 组各项指标比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠肺组织 W/D 比值、BALF TP 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	W/D 比值	BALF TP 含量 (g/l)
对照组	8	4.200 ± 0.320	0.220 ± 0.063
H-V _{T0.5h} 组	8	4.440 ± 0.510	0.300 ± 0.140
H-V _{T2h} 组	8	5.640 ± 0.540 ^{ab}	0.490 ± 0.099 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 H-V_{T0.5h} 组比较,^b $P < 0.01$

2.3 各组肺组织 cav-1、p-P38MAPK 免疫组织化学染色结果

各组大鼠肺组织 cav-1、p-P38MAPK 表达水平测定结果见表 2 和图 1 及附图 4~9。表 2 结果显示:H-V_{T0.5h} 组 cav-1 表达较对照组明显增高($P < 0.01$),而 p-P38MAPK 表达与对照组比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),H-V_{T2h} 组大鼠肺组织 cav-1 和 p-P38MAPK 表达均较对照组和 H-V_{T0.5h} 组明显增高(均 $P < 0.01$);其变化规律如图 1 显示:大潮气量机械通气后,随着通气时间的延长各组大鼠肺组织中 cav-1 和 p-P38MAPK 表达逐渐增强,且 cav-1 与 p-P38MAPK 表达呈正相关($r = 0.769$, 均 $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠肺组织 cav-1、p-P38MAPK 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cav-1(A 值)	p-P38MAPK(A 值)
对照组	8	0.118 ± 0.010	0.148 ± 0.016
H-V _{T0.5h} 组	8	0.142 ± 0.014 ^a	0.166 ± 0.010
H-V _{T2h} 组	8	0.190 ± 0.020 ^{ab}	0.377 ± 0.037 ^{ab}

注:A 值为平均光密度值,与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 H-V_{T0.5h} 组比较,^b $P < 0.01$

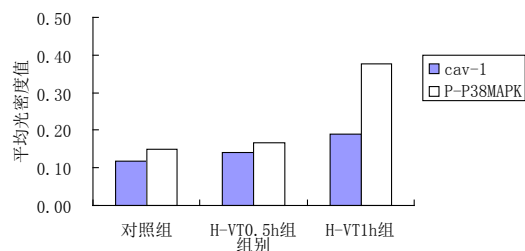


图 1 各组 cav-1、p-P38 MAPK 蛋白表达平均光密度值变化图

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 H-V_{T0.5h} 组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

机械通气所致肺损伤(VILI)是使用呼吸机治疗呼吸衰竭患者的严重并发症之一,临床主要通过使用保护性机械通气策略来减少其发生。VILI 的病理生理基础主要是机械牵拉刺激引起肺组织细胞膜结构的改变并引发与之相关的信号传递链变化,最终引发炎症因子的广泛释放和肺部病变。而近年来研究发现,作为细胞膜主要结构蛋白的 cav-1 与多条信号转导通路的活化密切相关,并且在介导炎症信号通路方面也起着关键作用。

小窝蛋白-1(caveolin-1, cav-1)是小窝的主要结构蛋白,在肺组织中主要分布于内皮细胞、肺泡上皮细胞、成纤维细胞、平

滑肌细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等的表面,与急性肺损伤的发生密切相关^[1]。Miyawaki-Shimizu K 等^[2]研究表明,采用小分子 siRNA 技术干扰鼠肺组织 cav-1 的表达,发现肺血管内皮细胞间连接间距迅速增大,当 cav-1 表达恢复时血管间隙恢复正常,从而减轻了肺水肿的发生,发挥了肺组织保护作用。本实验通过建立不同时间大潮气量机械通气大鼠肺损伤动物模型,模拟临床上机械通气所致肺损伤的过程,观察各组大鼠肺组织病理学改变、BALF TP 含量、肺组织 W/D 比值、cav-1 及 p-P38MAPK 表达的变化,探讨 cav-1 表达及 cav-1 对 P38MAPK 活性调控在 VILI 发生中的作用。实验结果显示,H-V_{T0.5h} 组大鼠肺组织 cav-1 表达较对照组明显增高($P < 0.01$),p-P38MAPK 表达及 BALF TP 含量、肺组织 W/D 比值与对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),肺组织病理学损伤不明显,提示:大潮气量机械通气半小时内,机械牵拉刺激肺组织 cav-1 表达增多,以维持肺组织细胞膜的稳定性,从而发挥了肺保护作用,与 Miyawaki-Shimizu K 等^[2]研究结果相似。而 Sun 等^[3]研究发现,cav-1 参与了血清白蛋白从血管腔运输到肺泡的过程,cav-1/-/- 大鼠,白蛋白不被内皮细胞内吞,反之,血浆中白蛋白减少,血管内胶体渗透压降低,与肺水肿的发生密切相关;Elizabeth 等^[4]研究表明,当 cav-1 与水通道蛋白结合增多时,通道会灭活、关闭,进而发生细胞凋亡。小窝中富含水通道蛋白,而钠离子在细胞内外的经通道易化扩散依赖于浓度梯度,因此,cav-1 与细胞内外水、电解质的转运密切相关。另外,Sundivakkam 等^[5]研究发现,cav-1 的手脚架结构域(CSD)可调节内皮细胞 Ca^{2+} 储存库释放 Ca^{2+} ,当细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,内皮细胞间间距会增大,从而使得血管通透性增高,是导致急性肺损伤发生时肺水肿产生的重要原因之一。Hu 等^[6]研究表明,cav-1/-/- 可减少中性粒细胞与内皮细胞间的黏附,抑制中性粒细胞的趋化及迁移作用,降低微血管的通透性,反之,肺水肿加重。上述研究结果均提示,cav-1 表达增多可导致血管内皮细胞的通透性增加,是导致急性肺损伤时肺水肿发生的重要因素之一。同时,本实验结果显示:H-V_{T2h} 组大鼠肺组织 cav-1 表达、BALF TP 含量及肺组织 W/D 比值均较对照组和 H-V_{T0.5h} 组明显增高,且出现显著病理学改变,且随通气时间延长 cav-1 的表达逐渐增多,肺组织水肿程度逐渐加重,与上述几项研究结果相似,提示:随着通气时间的延长,cav-1 可能通过激活其他途径,从而导致了肺组织损伤。

P38MAPK 是近年来在急性肺损伤中研究较多的与炎症及氧化应激反应发生密切相关的信号转导途径。冯丹等^[7]研究发现,在机械通气致大鼠肺损伤时,随着潮气量的增大,p-P38MAPK 表达逐渐增多,且大鼠肺组织中炎症因子的含量及肺组织损伤程度也随之逐渐增多或加重。本实验结果中显示,随通气时间延长大鼠肺组织中 p-P38MAPK 表达逐渐增高,肺组织损伤程度也随之逐渐加重,与冯丹等^[7]研究结果一致。同时本实验结果显示肺组织中 p-P38MAPK 表达与 cav-1 含量呈正相关。提示,大潮气量机械通气时,P38MAPK 活性增高可能与 cav-1 的过表达密切相关。

本实验通过大潮气量机械通气,形成机械牵拉应力损伤,观察肺组织细胞表面 cav-1 的表达,而随时间延长 cav-1 的表达逐渐增强,大潮气量通气 2 小时后 p-P38MAPK 表达也随之逐渐增多,且与 cav-1 的表达呈正相关,肺水肿及肺组织病理学损伤程度也随之逐渐加重,表明大潮气量机械通气可能通过刺激肺组织细胞表面 cav-1 的表达,使得 P38MAPK 活性增加,从而引发一系列炎症、氧化应激等反应,造成了肺组织损伤。

Hoetzel 等^[8]证实,机械通气可致 cav-1/-/- 小鼠出现更加严重的肺损伤,吸入一氧化碳(CO)对野生型机械通气小鼠有明显的保护作用,但 CO 吸入对 cav-1/-/- 小鼠肺无保护作用,该项实验结果显示,cav-1 在机械通气过程中有保护作用。但从 cav-1 对水通道蛋白、 Ca^{2+} 浓度及 P38MAPK 等与炎症及氧化应激反应相关信号链调控的研究来看,cav-1 可能促进了机械通气过程中肺损伤的发生。

附图

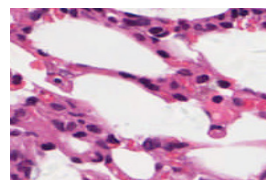


图 1 对照组大鼠肺组织结构 HE×400

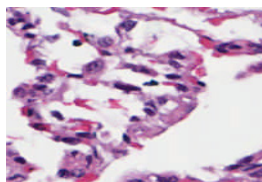


图 2 通气半小时组大鼠肺组织结构 HE×400

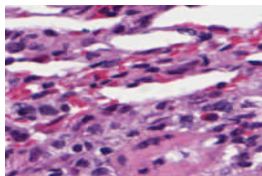


图 3 通气 1 小时组大鼠肺组织结构 HE×400

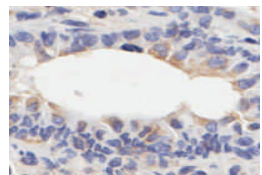


图 4 对照组大鼠肺组织 cav-1 蛋白表达 SABC×400

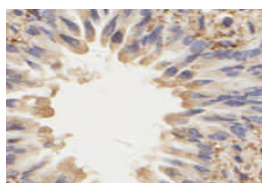


图 5 通气半小时组大鼠肺组织 cav-1 蛋白表达 SABC×400

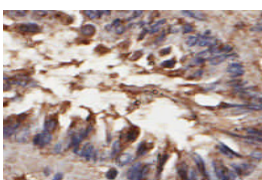


图 6 通气 1 小时组大鼠肺组织 cav-1 蛋白表达 SABC×400

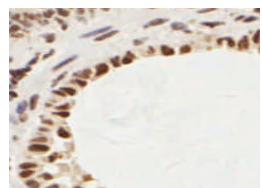


图 7 对照组大鼠肺组织 P-P38MAPK 蛋白表达 SABC×400

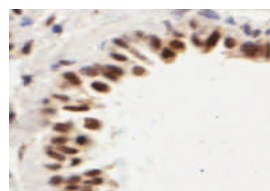


图 8 通气半小时组大鼠肺组织 P-P38MAPK 蛋白表达 SABC×400

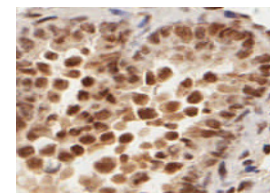


图 9 通气 1 小时组大鼠肺组织 P-P38MAPK 蛋白表达 SABC×400

参考文献

- [1] 吕学军,李玉英,钱桂生. Caveolin-1 在急性肺损伤 / 急性呼吸窘迫综合征发病机制中的作用进展 [J]. 重庆医学, 2009, (38)13:1660-1661.
- [2] Miyawaki-Shimizu K, Predescu D, Shimizu J, et al. siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290(2):L405-L413.
- [3] 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: 676-685.
- [4] Elizabeth M, Jablonski, Francis M, et al. The potential role of caveolin-1 in inhibition of aquaporins during the AVD [J]. Biol Cell, 2006, 98: 33-42.
- [5] Sundivakkam PC, Kwiatek AM, Sharma TT, et al. Caveolin-1 scaffold domain interacts with TRPC1 and IP3R3 to regulate Ca²⁺ store release-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(3):C403-C413.
- [6] Hu G, Ye RD, Dinauer MC, et al. Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(2):L178-L186.
- [7] 冯丹, 姚尚龙, 尚游, 等. 大鼠机械通气所致肺损伤时 P38 丝裂原活化蛋白激酶通路的激活 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19 (2):77-80.
- [8] 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.