

高频振荡通气联合肺表面活性物质对吸入性损伤肺组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 和 p73 的影响

郭光华 王少根 付忠华 吴星恒 杨明 陈晓

【摘要】 目的 探讨高频振荡通气(HFOV)联合肺表面活性物质(PS)对吸入性损伤兔肺组织细胞凋亡的影响。方法 采用兔蒸汽吸入性损伤模型,将 32 只兔按不同通气治疗方式分为常规控制机械通气(CMV)组、HFOV 组、CMV+PS 组及 HFOV+PS 组 4 组,每组 8 只。治疗 4 h 后处死动物,取右肺中叶组织,分别检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、p73 的含量及其 mRNA 表达水平。结果 ①HFOV 组和 HFOV+PS 组肺组织 caspase-3 和 p73 的含量分别较 CMV 组和 CMV+PS 组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);加入外源性 PS 后,CMV+PS 组和 HFOV+PS 组的 caspase-3 和 p73 含量也较相应未加入组明显减少,差异也有统计学意义(P 均 < 0.05)。②HFOV 组和 HFOV+PS 组 caspase-3 mRNA 和 p73 mRNA 表达分别较 CMV 组和 CMV+PS 组明显减少,差异有统计学意义(P 均 < 0.01);加入外源性 PS 后,CMV+PS 组和 HFOV+PS 组肺组织 caspase-3 mRNA 和 p73 mRNA 的表达也明显低于相应未加入组,差异也有统计学意义(P 均 < 0.05)。结论 与 CMV 或 CMV+PS 比较,HFOV 或 HFOV+PS 能减少吸入性损伤肺组织细胞中 caspase-3、p73 的含量及其 mRNA 表达,从而可能减少通气肺的肺细胞凋亡。

【关键词】 高频振荡通气; 控制机械通气; 肺表面活性物质; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3

Effect of high frequency oscillatory ventilation combined with exogenous pulmonary surfactant on apoptosis of lung tissue in rabbit with acute respiratory failure induced by steam inhalation injury GUO Guang-hua*, WANG Shao-gen, FU Zhong-hua, WU Xing-heng, YANG Ming, CHEN Xiao. * Department of Burn, The First Hospital Affiliated to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of high frequency oscillatory ventilation (HFOV) combined with exogenous pulmonary surfactant (PS) on apoptosis of lung tissue in rabbit suffering from steam inhalation injury. **Methods** Thirty-two New Zealand rabbits were randomly divided into four groups, and acute respiratory failure model was reproduced by severe steam inhalation injury. Then they were ventilated and treated by controlled mandatory ventilation (CMV), HFOV, CMV + PS or HFOV + PS, respectively. After the animals were euthanized at 4 hours treatment time point, the right middle lobe of rabbit lung was harvested for the examination of caspase-3 and p73 contents and relative values, as well as mRNA expression of caspase-3 and p73. **Results** ① Contents of caspase-3 and p73 in lung tissue homogenates in HFOV group and HFOV + PS group were significantly lower than those in CMV group and CMV + PS group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and also contents of caspase-3 and p73 in lung tissue homogenates in groups with exogenous PS were significantly lower than those of groups without exogenous PS (all $P < 0.05$). ② Caspase-3, p73 mRNA expressions in lung tissue in HFOV group and HFOV + PS group were significantly lower than those of CMV group and CMV + PS group (all $P < 0.01$). Caspase-3 and p73 mRNA expression in lung tissue in groups with exogenous PS group were significantly lower than those of the corresponding group without exogenous PS (all $P < 0.05$). **Conclusion** Compared with CMV or CMV + PS, HFOV or HFOV + PS can decrease the concentration of caspase-3 and p73, reduce the mRNA expression of caspase-3 and p73 in the lung homogenates, as a result lung tissue apoptosis in inhalation injury may be suppressed.

【Key words】 high frequency oscillatory ventilation; conventional mandatory ventilation; pulmonary surfactant; caspase-3

现对急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的通气治疗

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30460134)

作者单位:330006 江西南昌,南昌大学第一附属医院烧伤科(郭光华,王少根,付忠华),儿科(吴星恒,杨明,陈晓)

作者简介:郭光华(1960-),男(汉族),湖南省人,医学硕士,教授,博士生导师,主任医师,曾赴美国麻省大学医学院医学中心研修,入选首批国家级新世纪百万人才工程、卫生部有突出贡献的中青年专家、国务院特殊津贴获得者,Email:guoguo2000@hotmail.com。

多采用肺保护性通气策略,高频振荡通气(HFOV)是理想的通气方法之一,能减轻 ARDS 时的呼吸机诱导性肺损伤,其机制主要是通过减轻 ARDS 通气肺组织的炎症反应来实现^[1],但 HFOV 对难治性呼吸衰竭的治疗效果欠佳^[2]。研究发现,内源性肺表面活性物质(PS)的减少能增加肺组织细胞的凋亡^[3],外源性 PS 的应用能减少因常规机械通气所致的肺

组织凋亡^[4]。为探讨 HFOV 单独或联合 PS 对吸入性肺损伤的细胞凋亡有何影响,以蒸汽吸入性损伤动物为模型,我们观察了 HFOV 联合 PS 通气治疗后,肺组织细胞中相关凋亡蛋白激酶及基因的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及术前准备:新西兰大白兔 32 只,由南昌大学医学院动物实验中心提供,体重(2.25±0.25)kg。实验前动物禁食 12 h、不禁水,用氯胺酮(40 mg/kg)肌肉注射麻醉后,将动物仰卧位并固定于手术台上,行气管切开,插入气管导管,耳缘静脉穿刺输液,静脉注射肌松剂司可林(首次 10 mg/kg,维持 0.1 mg·kg⁻¹·h⁻¹)后,接高频振荡呼吸机(SLE 5000,英国)行控制机械通气(CMV),参数设置:潮气量 10 ml/kg,通气频率 30 次/min,吸气时间 1 s,吸入氧浓度(FiO₂)0.21,呼气末正压(PEEP)0 cm H₂O(1 cm H₂O=0.098 kPa)。耳缘静脉输注生理盐水 15 ml·kg⁻¹·h⁻¹,伤后 1 h 内加输生理盐水 50 ml,以补充家兔气道烫伤后的液体丢失。

1.2 动物模型制备:参照文献[5]方法制备重度蒸汽吸入性损伤模型。以改制的高压锅盛水加热为蒸汽发生源,预热管道,当锅内温度为 102 ℃、蒸汽压力达 0.125 kgf/cm²(1 kgf/cm²=98.066 5 kPa)时,将蒸汽与气管导管相连,按下自动计时器,向肺内释放蒸汽 3 s,随后继续通气同前。当兔动脉血氧分压(PaO₂)降至 60 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)以下视为制模成功。

1.3 动物分组:将制模后的动物按随机数字表法分为 CMV 组、HFOV 组、CMV+PS 组和 HFOV+PS 组,每组 8 只。CMV 组、CMV+PS 组行定容通气,参数设置:潮气量 10 ml/kg,通气频率 30 次/min,吸气时间 1 s,FiO₂ 为 1.00,PEEP 为 5 cm H₂O;HFOV 组、HFOV+PS 组将通气模式转为 HFOV,参数设置:平均气道压 10 cm H₂O,FiO₂ 1.00,振幅 20 cm H₂O,频率 10 Hz,吸呼比(I:E)1:1。通气治疗后 4 h 处死动物,取右肺中叶组织分别测定天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、p73 的含量及其 mRNA 表达水平。

1.4 PS 气管内灌注:外源性 PS 是从新鲜猪肺中提取的天然型 PS(由复旦大学儿科医院研制,红旗药厂生产)。制模后予以纯氧通气 10 min,经气管插管侧口将 100 mg/kg 的 PS 用无菌硅胶管以动物 3 种体位(仰卧、左侧卧和右侧卧)均匀注入肺内。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 肺组织 caspase-3 活性测定:测定硝基苯胺

(pNA)标准曲线,取 400~600 mg 肺组织,以 50 mg 加入 100 μl 裂解液的比例加入裂解液,在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到 1.5 ml 离心管中,冰浴再裂解 5 min。4 ℃下 16 000~20 000×g 离心 10~15 min。取 10 μl 上清液,加入 80 μl pNA 和 10 μl 的 Ac-YVAD-pNA(2 mmol/L),混匀,颜色变化比较明显时测定 405 nm 处吸光度(A)值,样品的 A₄₀₅减去空白对照的 A₄₀₅即为样品中 caspase-3 催化产生 pNA 产生的量,与获得的标准曲线进行对比,并计算出样品中催化产生的 pNA 量。将一个酶活性单位定义为:当底物饱和时,在 37 ℃时可以剪切 1 nmol Ac-YVAD-pNA 产生 1 nmol pNA 的 caspase-3 酶量,计算出样品中含有酶活性单位的 caspase-3。采用 Bradford 法检测待测样品中的蛋白浓度,再计算出一个样品的单位重量蛋白中所含 caspase-3 酶活性单位。

1.5.2 肺组织 p73 含量测定:取 50 mg 肺组织制成匀浆后进行超声裂解,用 Bradford 法检测裂解物中蛋白浓度,然后行蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜及免疫反应和显、定影,最后采用法国 Bio-profil 图像分析系统对印迹结果进行图像分析,根据条带的积分 A 值对 p73 进行蛋白量的调平,以样本 p73 与 β-肌动蛋白(β-actin)的积分 A 值比值代表蛋白质含量。

1.5.3 肺组织 caspase-3 mRNA 和 p73 mRNA 表达测定:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)。提取总 RNA,用 260 nm 波长的分光测定 RNA 浓度,A 值为 1 时相当于大约 40 mg/L 的单链 RNA。用 ddH₂O 稀释 DNA 样品 n 倍,并以 ddH₂O 为空白对照,根据此时读出的 260 nm 处的 A 值计算出样品稀释前的浓度,经 RNA 逆转录、PCR 扩增后进行电泳,采用凝胶图像分析系统,对电泳条带进行密度扫描。分别测定目的基因的 PCR 产物条带与内参照 β-actin 条带的 A 值,计算 p73 mRNA 和 caspase-3 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学分析:结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用华西医科大学 PEMS 3.1 数据统计包,组间比较用方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

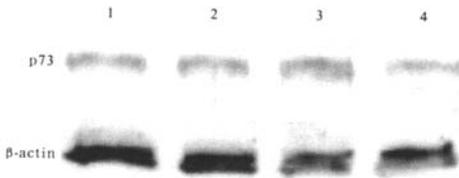
2.1 肺组织 caspase-3 和 p73 的含量(表 1;图 1):HFOV 组和 HFOV+PS 组肺组织 caspase-3 及 p73 含量均显著低于 CMV 组和 CMV+PS 组(P<0.05 或 P<0.01);加用外源性 PS 后,CMV+PS 组和

HFOV+PS 组的 caspase-3 及 p73 含量也明显低于相应未加组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

表 1 各组肺组织 caspase-3 和 p73 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

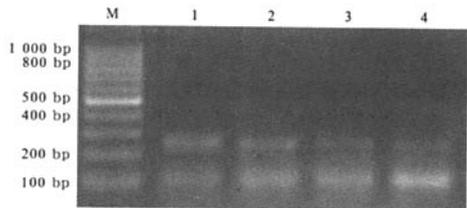
组别	动物数	caspase-3(U/g)	p73(A 值)
CMV 组	8	1.34 ± 0.27	0.446 0 ± 0.027 0
CMV+PS 组	8	0.74 ± 0.24 ^a	0.267 4 ± 0.074 0 ^a
HFOV 组	8	0.62 ± 0.31 ^a	0.212 8 ± 0.031 0 ^b
HFOV+PS 组	8	0.41 ± 0.22 ^{cd}	0.126 1 ± 0.022 0 ^{cd}

注: 与 CMV 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 HFOV 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 CMV+PS 组比较, ^d $P < 0.01$



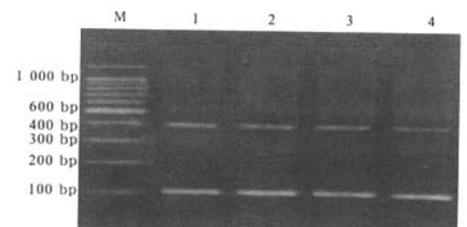
1:CMV 组; 2:CMV+PS 组; 3:HFOV 组; 4:HFOV+PS 组
图 1 各组兔肺组织 p73 含量相对表达强度的变化

2.2 肺组织 caspase-3 和 p73 的 mRNA 表达(图 2, 图 3; 表 2): HFOV 组和 HFOV+PS 组 caspase-3 和 p73 的 mRNA 表达明显弱于相应的 CMV 组和 CMV+PS 组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 加用外源性 PS 后, CMV+PS 组和 HFOV+PS 组 caspase-3 和 p73 的 mRNA 表达也明显弱于相应未加组 (P 均 < 0.05)。



M:100 DNA ladder Marker; 1:CMV 组; 2:CMV+PS 组; 3:HFOV 组; 4:HFOV+PS 组

图 2 各组兔肺 caspase-3 mRNA 相对表达强度的变化



M:100 DNA ladder Marker; 1:CMV 组; 2:CMV+PS 组; 3:HFOV 组; 4:HFOV+PS 组

图 3 各组兔肺 p73 mRNA 相对表达强度的变化

表 2 各组肺组织 caspase-3 和 p73 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$) A 值

组别	动物数	caspase-3 mRNA	p73 mRNA
CMV 组	8	0.748 2 ± 0.142 8	0.542 4 ± 0.114 0
CMV+PS 组	8	0.516 5 ± 0.116 5 ^a	0.271 6 ± 0.086 5 ^a
HFOV 组	8	0.403 2 ± 0.078 5 ^b	0.232 8 ± 0.105 8 ^b
HFOV+PS 组	8	0.308 7 ± 0.126 8 ^{cd}	0.108 7 ± 0.062 8 ^{cd}

注: 与 CMV 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 HFOV 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 CMV+PS 组比较, ^d $P < 0.01$

3 讨论

细胞凋亡是一种程序性死亡, 是有核细胞在一定条件下启发其内部遗传机制, 主要通过内源性的 DNA 内切酶激活而发生的细胞死亡过程。蛋白酶家族 caspase-3 在凋亡程序的启动和执行过程中均发挥了非常重要的作用, 他们直接参与了凋亡早期的启动、凋亡信号传递, 以及凋亡晚期时作用于不同凋亡底物(主要是一些 DNA 酶和一些细胞骨架蛋白), 产生细胞皱缩、膜出泡、DNA 断裂等凋亡特征现象。凋亡过程分为凋亡信号转导、凋亡基因激活、凋亡执行、凋亡细胞的清除 4 个阶段。细胞凋亡信号可通过线粒体途径和死亡受体途径导致细胞凋亡, caspase-3 是激活细胞凋亡的中心环节。

对 ARDS 与凋亡的关系最近研究颇多, 目的是人们希望通过减少细胞凋亡来保护 ARDS 的肺组织。HFOV 是理想的肺保护性通气策略之一, 抑制 ARDS 通气肺的炎症反应, 减轻通气机诱导性肺损伤, 从而保护通气肺组织。然而, HFOV 能否通过抑制肺组织细胞的凋亡途径来减轻通气机诱导性肺损伤, 保护 ARDS 通气肺组织, 则未见相关报道。Hammerschmidt 等^[6]在体外培养鼠 II 型肺泡上皮细胞, 先使其经细胞循环性过度伸展后, 用流式细胞技术检测发现细胞凋亡明显增加, 用分光光度技术见培养液中 caspase-1 浓度升高。Sanchez-Esteban 等^[7]采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测细胞凋亡及 caspase-8, 在体外培养胎鼠肺的纤维母细胞中也发现了同样的结果。dos Santos 等^[8]还对过度伸展的人肺泡上皮细胞的凋亡相关基因进行了相应的监测, 发现其凋亡相关基因表达明显升高。说明细胞变型、扭曲及过度伸展能通过相应的细胞内蛋白激酶和基因变化直接影响到细胞凋亡, 也直接导致了细胞的分子结构损伤。我们的实验结果显示, 通气 4 h 后, HFOV 组肺组织细胞的凋亡指数明显较 CMV 组减少, 说明 HFOV 能减轻吸入性损伤的肺组织细胞凋亡。由于 HFOV 具有高呼吸频率、低潮

气量和相对恒定的气道压特点,可以有效减轻肺细胞的扭曲和过度伸展。Caspase 蛋白酶家族介导了细胞凋亡和炎症损伤,其中 caspase-3 主要介导了细胞凋亡,是细胞凋亡发生的中心环节。本实验发现,HFOV 组肺组织匀浆中 caspase-3 含量明显减少,caspase-3 mRNA 表达也明显降低,说明 HFOV 能减轻吸入性损伤肺组织中 caspase-3 的激活。

p73 基因作为一个 p53 的类似物,于 1997 在 cos 细胞中被偶然发现。它全长 22 kb,共含 14 个外显子,定位于 1 号染色体的短臂。现认为它是一个能诱导细胞凋亡的基因^[9]。我们研究发现,HFOV 组肺组织中 p73 mRNA 表达和 p73 蛋白含量较 CMV 组均明显降低。进一步说明了 HFOV 能直接影响细胞内的 DNA 改变而减轻吸入性损伤的肺组织细胞凋亡。研究发现,肺组织中细胞凋亡的减少是由于 HFOV 使 ARDS 肺中炎症反应减轻所致。但通过本次研究和相应的文献资料^[6-8,10]分析发现,我们推测 HFOV 致细胞凋亡减少可能在不依赖炎症反应的途径,而阻断细胞凋亡的途径可能是减少通气机诱导性肺损伤和保护 ARDS 肺组织损伤的又一新途径。外源性 PS 能通过增加巨噬细胞的功能而清除凋亡细胞,减少吸入性损伤和急性肺损伤肺组织中的凋亡细胞数^[11]。本实验结果显示,外源性 PS 无论是和 CMV 还是 HFOV 合用,通气肺组织的凋亡细胞数均较相应未加 PS 组减少,说明在吸入性损伤和机械通气中应用外源性 PS,除了补充缺乏和消耗的内源性 PS 外,确有增加巨噬细胞的功能和减少凋亡的作用,至于其能否不通过炎性细胞而直接减少肺泡上皮细胞和内皮细胞的凋亡,尚需作进一步研究。在 HFOV+PS 组,肺组织细胞凋亡最少,显示了最好的协同作用。可能有两方面原因,一是外源性 PS 和 HFOV 作用于凋亡形成的不同环节;二

是 HFOV 可能更有利于外源性 PS 在吸入性损伤的均匀分布和活性维持。

参考文献

- [1] von der Hardt K, Kandler M A, Fink L, et al. High frequency oscillatory ventilation suppresses inflammatory response in lung tissue and microdissected alveolar macrophages in surfactant depleted piglets[J]. *Pediatr Res*, 2004, 55(2): 339-346.
- [2] 杨骢宇, 曾其毅, 陶建平, 等. 高频振荡通气治疗小儿难治性呼吸衰竭时的影响因素分析[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(11): 694-695.
- [3] Bhandari V, Johnson L, Smith-Kirwin S, et al. Hyperoxia and nitric oxide reduce surfactant components (DSPC and surfactant proteins) and increase apoptosis in adult and fetal rat type I pneumocytes[J]. *Lung*, 2002, 180(6): 301-317.
- [4] May M, Ströbel P, Preissshofen T, et al. Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants[J]. *Eur Respir J*, 2004, 23(1): 113-121.
- [5] 刘志远, 黎黎, 杨宗城. 免蒸汽吸入性损伤后肺表面活性物质的变化[J]. *第三军医大学学报*, 1984, 5(1): 1-7.
- [6] Hammerschmidt S, Kuhn H, Grasenack T, et al. Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type I cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30(3): 396-402.
- [7] Sanchez-Esteban J, Wang Y, Cicchiello L A, et al. Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(3): L448-456.
- [8] dos Santos CC, Han B, Andrade C F, et al. DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNF-alpha, LPS and cyclic stretch[J]. *Physiol Genomics*, 2004, 19(3): 331-342.
- [9] 胡晓娟, 张吉翔. P73 基因与细胞凋亡[J]. *国外医学遗传学分册*, 2003, 26(5): 257-260.
- [10] 宋勇, 施毅, Harken A H, 等. 内毒素诱导小鼠肺泡 II 型上皮细胞凋亡不依赖 TNF- α 的研究[J]. *医学研究生学报*, 2003, 16(6): 420-423.
- [11] 李长军, 杨宗城, 李二红, 等. 烟雾吸入性损伤对大鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能和炎性细胞凋亡的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2003, 19(3): 163-166.

(收稿日期: 2008-03-09 修回日期: 2008-04-05)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

血浆游离 DNA 对严重脓毒症和脓毒性休克预后的预测

芬兰的科研人员最近发现:脓毒症及危重病患者血浆游离 DNA 有所增加,并与患者的器官功能障碍和疾病严重程度有关,通过检测血浆游离 DNA 含量可预测重症加强治疗病房(ICU)和住院患者病死率。科研人员通过实时定量聚合酶链反应(PCR)对 255 例严重脓毒症或脓毒性休克患者入院时及入院 72 h 后血浆游离 DNA 含量进行了分析。结果显示:ICU 脓毒症死亡患者入院时及入院 72 h 后血浆游离 DNA 量均高于存活者(15 904 基因组当量(GE)/ml 比 7 522 GE/ml, 15 176 GE/ml 比 6 758 GE/ml, P 均 < 0.01)。住院死亡患者血浆游离 DNA 含量也高于存活者($P < 0.01$)。通过相对运行特性分析发现,血浆游离 DNA 与 ICU 病死率有关,血浆浓度时间曲线下面积(AUC),为 0.70~0.71。通过多元回归分析发现,入院时血浆游离 DNA 含量可以作为预测 ICU 病死率的独立指标($P < 0.01$);线性回归分析表明,乳酸盐最大值和序贯性器官衰竭评分与入院 1 d 血浆游离 DNA 含量独立相关。以上实验结果表明,减少血浆游离 DNA 含量对严重脓毒症和脓毒性休克的治疗有临床应用价值。

包呈梅, 编译自《Clin Chem》, 2008-04-17(电子版); 胡森, 审校