·论著·

通过抑制小窝蛋白磷酸化调控Nrf2信号通路可以对呼吸机相关性肺损伤起保护作用

钟荣 肖军 戴春光 于志辉 周吉

541001 广西壮族自治区桂林,桂林医学院附属医院重症医学科

通讯作者:钟荣,Email:zhongrong870@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.06.015

【摘要】 目的 探讨在体动物抑制小窝蛋白-1(Cav-1)磷酸化是否可有效调节核因子E2相关因子(Nrf2)信号通路及下游效应分子表达,以及是否对呼吸机相关性肺损伤(VILI)起保护作用。**方法** 将90只健康雄性SD大鼠按随机数字表法分为9组,每组10只:假手术组(Sham)仅做气管切开而不通气;保护性通气(PV)1 h、2 h组;大潮气量(VT)通气(40 mL/kg)1 h、2 h组;酪氨酸蛋白激酶抑制剂PP_2或罗格列酮(Rsg)预处理+大VT通气1 h、2 h组(PP_2或Rsg 1 h、2 h组)。两个预处理组分别于通气前1 h腹腔注射PP_2(15 mg/kg)或灌胃Rsg(5 mg/kg)。制模后处死大鼠,收集支气管肺泡灌洗液(BALF),用伊文思蓝(EB)实验检测肺血管通透性;用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测BALF中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、转录激活因子蛋白1(AP-1)、核转录因子-κB(NF-κB)、白细胞介素-8(IL-8)水平。取肺组织,计算肺湿/干质量比值(W/D),光镜下观察肺组织病理学改变;用比色法测定髓过氧化物酶(MPO)活性;用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测Nrf2 mRNA表达;用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测磷酸化小窝蛋白-1酪氨酸残基14(pCav-1-Y14)、Cav-1、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)、紧密连接蛋白闭合蛋白-5(claudin-5)蛋白表达及Nrf2在胞质和胞核中的蛋白表达;用免疫组化法检测PPARγ、claudin-5阳性表达。**结果** Sham组和PV组肺组织无明显病理学改变,两组各指标均无差异。大VT组肺组织损伤严重,肺W/D比值、EB含量、MPO活性和BALF中TNF-α、AP-1、IL-8、NF-κB水平较Sham组及PV组明显升高,pCav-1-Y14、Cav-1表达均显著高于Sham组及PV组,PPARγ、claudin-5表达则显著低于Sham组及PV组,并呈时间依赖性;胞核和胞质Nrf2表达与Sham组和PV组无统计学差异。PP_2或Rsg预处理后,肺W/D比值、EB含量、MPO活性和BALF中TNF-α、AP-1、IL-8、NF-κB水平均较大VT组明显降低;肺组织Nrf2 mRNA表达明显增加;胞核内Nrf2蛋白表达较大VT组明显上调〔核内Nrf2蛋白(灰度值):1 h为0.61±0.06、0.56±0.06比0.31±0.02,2 h为0.38±0.06、0.43±0.07比0.22±0.03,均$P<0.05$〕,各组胞质内Nrf2蛋白表达无差异。PP_2预处理组pCav-1-Y14表达明显低于大VT组(灰度值:1 h为0.89±0.04比1.48±0.02,2 h为0.86±0.02比1.31±0.01,均$P<0.05$);PP_2或Rsg预处理组PPARγ、claudin-5的蛋白表达均明显高于大VT组〔PPARγ(灰度值):1 h为0.34±0.07、0.42±0.13比0.17±0.07,2 h为0.38±0.09、0.33±0.07比0.16±0.03;claudin-5(灰度值):1 h为0.33±0.05、0.38±0.07比0.14±0.03,2 h为0.30±0.06、0.31±0.04比0.17±0.04;均$P<0.05$〕。**结论** 抑制Cav-1-Y14磷酸化可增加Nrf2的核内表达及其效应分子PPARγ、claudin-5的表达,从而减轻肺组织炎症及降低毛细血管通透性。

【关键词】 小窝蛋白-1磷酸化; 核因子E2相关因子; 过氧化物酶体增殖物激活受体γ; 闭合蛋白-5; 呼吸机相关性肺损伤

基金项目:广西壮族自治区医药卫生经费项目(Z2014323);广西壮族自治区临床重点专科建设项目〔桂卫(2014)13号〕

Regulation of Nrf2 pathway to protect ventilator induce lung injury *in vivo* via inhibition of caveolin phosphorylation

Zhong Rong, Xiao Jun, Dai Chunguang, Yu Zhihui, Zhou Ji

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 investigate whether the inhibition of caveolin-1 (Cav-1) phosphorylation will regulate effectively nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) signal pathway and downstream effector molecules and protest against ventilation induced lung injury (VILI) in an animal model *in vivo*. **Methods** Ninety male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into nine groups (each n = 10): sham group in which rats did not receive ventilation but received tracheotomy; lung protective ventilation (PV) for 1 hour or 2 hours group; mechanical

ventilation (MV) at high volume tidal (VT, 40 mL/kg) for 1 hour or 2 hours group; protein tyrosine kinase inhibitor PP_2 or rosiglitazone (Rsg) pretreatment + high VT ventilation for 1 hour or 2 hours groups. The two pretreatment groups were given intraperitoneal injection PP_2 15 mg/kg or intragastric administration of Rsg 5 mg/kg 1 hour before ventilation respectively. The rats were sacrificed after model reproduction, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected. Pulmonary vascular permeability was measured by Evans blue (EB). The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), activator protein-1 (AP-1), nuclear factor-κB (NF-κB), and interleukin-8 (IL-8) in BALF were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Then the lung tissues were collected, the lung wet/dry ratio (W/D) was calculated, the changes in pathology was observed with light microscope, and myeloperoxidase (MPO) activity was determined by colorimetric analysis. Nrf2 mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expressions of Cav-1 tyrosine residues 14 phosphorylation (pCav-1-Y14), Cav-1, peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPARγ) and claudin-5 as well as Nrf2 in cytoplasm and nucleus were determined by Western Blot. The positive expressions of PPARγ and claudin-5 in lung tissues were assayed with immunohistochemistry staining. **Results** There were no obvious pathological changes in the lung tissue in sham group and PV groups, and there were no significant differences in all the parameters between the two groups either. However, the injury in lung tissue was severe in the high VT groups in which W/D ratio, EB contents, MPO activity, and TNF-α, AP-1, IL-8, NF-κB levels in BALF as well as the protein expressions of Cav-1 and pCav-1-Y14 were significantly higher than those of sham group and PV groups, and the protein expressions of PPARγ and claudin-5 were significant lower than those of sham group and PV groups with a dose-dependent manner; but Nrf2 expressions in cytoplasm and nucleus did not show a statistical increase. After pretreatment of PP_2 or Rsg, W/D ratio, MPO activity, EB contents, TNF-α, AP-1, IL-8, and NF-κB in BALF were significantly decreased as compared with those of high VT group, and RT-PCR showed significant up-regulation of Nrf2 mRNA in lung tissues too. Moreover, there was a statistically significant increase in expressed Nrf2 proteins in nucleus in PP_2 or Rsg groups as compared with those of high VT groups [Nrf2 in nucleus (gray value): 0.61±0.06, 0.56±0.06 vs. 0.31±0.02 at 1 hour, 0.38±0.06, 0.43±0.07 vs. 0.22±0.03 at 2 hours; all $P < 0.05$], but no significant difference was found in the expression of Nrf2 protein in the cytoplasm among all groups. The protein expressions of pCav-1-Y14 in PP_2 pretreatment groups were significantly lower than those of high VT groups (gray value: 0.89±0.04 vs. 1.48±0.02 at 1 hour, 0.86±0.02 vs. 1.31±0.01 at 2 hours; both $P < 0.05$); but expressed PPARγ proteins and expressed claudin-5 proteins in PP_2 or Rsg pretreatment groups were significantly higher than those of high VT groups [PPARγ (gray value): 0.34±0.07, 0.42±0.13 vs. 0.17±0.07 at 1 hour, 0.38±0.09, 0.33±0.07 vs. 0.16±0.03 at 2 hours; claudin-5 (gray value): 0.33±0.05, 0.38±0.07 vs. 0.14±0.03 at 1 hour; 0.30±0.06, 0.31±0.04 vs. 0.17±0.04 at 2 hours; all $P < 0.05$]. **Conclusions** The inhibition of Cav-1-Y14 phosphorylation can increase the expression of Nrf2 in the nucleus, then result in an increase in the protein expressions of PPARγ and claudin-5 of its effector molecules. This effect can reduce the inflammation and capillary permeability of lung tissue in the model of VILI.

【Key words】 Phosphorylation of caveolin-1; Nrf2; Peroxisome proliferators-activated receptor γ; Claudin-5; Ventilator-induced lung injury

Fund program: Health Department Foundation of Guangxi Province (Z2014323); Clinical Specialty Construction Project of Guangxi Province (2014-13)

传统大潮气量(VT)通气产生的周期性牵拉可使肺上皮及内皮细胞生成较多的活性氧簇(ROS)并导致氧化还原失衡,从而引发并放大肺部炎症反应,是导致呼吸机相关性肺损伤(VILI)的重要机制之一[1-2]。核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)是机体抗氧化、抗炎症反应的重要调节中枢[3],对它起调控作用的是小窝蛋白-1(Cav-1)[4-5]。Cho 等[6-7]发现 Nrf2 依赖基因 Pparg 可编码过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARγ),而 PPARγ 的表达取决于 Nrf2。PPARγ 在调节基因介入的炎症反应中至关重要[8],可对抗炎症引发的内皮细胞紧密连接蛋白,特别是闭合蛋白-5(claudin-5)下调及旁细胞渗透性增高[9]。本课题组前期研究证实,大 VT 通气所致牵拉应力升高可增加 Cav-1 表达,并在短时间内引起酪氨酸激酶磷酸化,且伴有小窝蛋白酪氨酸残基 14(Cav-1-Y14)磷酸化(pCav-1-Y14),从而抑制 Cav-1 磷酸化,改善 VILI[10-12]。因此,我们设想大 VT 通气可增加 Cav-1 表达并抑制 Nrf2 的转录活性,引发 PPARγ 表达降低,从而加重氧化通气损伤及炎症反应,增加紧密连接蛋白及旁细胞渗透性;抑制 Cav-1 磷酸化可减轻上述机械通气引起的损伤,为 VILI 的防治提供新的理论基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物分组及模型制备:健康雄性 SD 大鼠,体质量 220~250 g,由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK 桂 2009-0002。按随机数字

表法分为 9 组，每组 10 只。腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠后气管插管。假手术（Sham）组仅行气管切开而不通气；机械通气各组大鼠行气管切开机械通气。

1.2 机械通气参数设置及处理方法：呼吸频率 60 次 /min，吸呼比 1∶2。保护性通气（PV）1 h、2 h 组（PV 1 h、2 h 组）VT 6 mL/kg，呼气末正压（PEEP）5 cmH_2O（1 cmH_2O=0.098 kPa）；大 VT 通气 1 h、2 h 组 VT 30 mL/kg，PEEP 为 0；酪氨酸蛋白激酶抑制剂 PP_2 或罗格列酮（Rsg）预处理 + 大 VT 通气 1 h、2 h 组（PP_2 或 Rsg 1 h、2 h 组）在通气前 1 h 腹腔注射 PP_2 15 mg/kg 或灌胃 Rsg 5 mg/kg。本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 伊文思蓝（EB）实验：通气后各组取 5 只大鼠经颈外静脉注入 EB[8]，1 h 后处死取右肺中叶，用分光光度计测肺组织 EB 含量以反映肺血管通透性。

1.3.2 肺组织病理学观察及弥漫性肺泡损伤系统评分（DAD）：取左肺上叶组织，多聚甲醛溶液固定，苏木素 - 伊红（HE）染色，由病理科医师按双盲法光镜下观察，从肺间质内中性粒细胞浸润、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 5 个方面，按照正常、轻、中、重度分别评为 0～3 分，各项指标之和为 DAD 评分。

1.3.3 免疫组化法检测肺 PPARγ 和 claudin-5 表达：取左肺上叶组织，多聚甲醛溶液固定，免疫组化染色，光镜下随机取 5 个不重叠视野观察棕黄色颗粒（阳性产物），用病理图像分析系统计算阳性颗粒的吸光度（*A*）值即 PPARγ 和 claudin-5 的蛋白量。

1.3.4 肺湿 / 干质量比值（W/D）测定：取左肺中叶称湿质量（W），置于 60 ℃烤箱中烘烤 72 h 至恒重后称干质量（D），计算 W/D 比值。

1.3.5 蛋白质免疫印迹试验（Western Blot）检测胞质和胞核中 Nrf2 以及肺组织 pCav-1-Y14、Cav-1、PPARγ、claudin-5 表达：取左肺下叶 100 mg，提取胞质及胞核蛋白，用 BCA 法提取总蛋白并定量，经凝胶电泳、转膜、封闭后加一抗、二抗，发光、显影后进行图像分析，以目的蛋白与内参照 3- 磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）的灰度值比值作为表达量。

1.3.6 酶联免疫吸附试验（ELISA）检测细胞因子：取右肺支气管肺泡灌洗液（BALF），检测肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 -8（IL-8）、转录激活因子蛋白 1（AP-1）、核转录因子 -κB（NF-κB）水平，按试剂盒（北京达科为生物科技公司）说明书操作。

1.3.7 比色法测定髓过氧化物酶（MPO）活性：取液氮冻存的左肺下叶组织制备匀浆，测定 MPO 活性，按试剂盒（南京建成生物工程研究所）说明书操作。

1.3.8 反转录 - 聚合酶链反应（RT-PCR）检测 Nrf2 mRNA 表达：取肺副叶提取总 RNA。按 GeneBank 公布的 Nrf2 和 β- 肌动蛋白（β-actin）参考 cDNA 序列，利用引物设计软件 Oligi6.71 设计 PCR 引物。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后，用图像分析系统分析 *A* 值，以目的基因与内参基因 *A* 值比值为表达量。

1.4 统计学分析：采用 SPSS 18.0 软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *t* 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理学改变及 DAD 评分：图 1 显示，Sham 组肺组织正常；PV 组无明显肺组织损伤；大 VT 组肺泡结构部分甚至完全破坏，大量炎性细胞浸润；PP_2 或 Rsg 预处理后肺损伤程度明显减轻。表 1 显示：大 VT 组 DAD 评分明显高于 Sham 组，而 PP2 或 Rsg 预处理均可明显降低大 VT 大鼠 DAD 评分（均 $P<0.05$）。

2.2 肺组织和 BALF 中各项指标（表 1）：Sham 组与 PV 组肺 W/D 比值、EB 含量、MPO 活性和 BALF 中 TNF-α、AP-1、IL-8、NF-κB 水平无差异（均 $P>0.05$）；大 VT 组各指标较 Sham 组及 PV 组呈时间

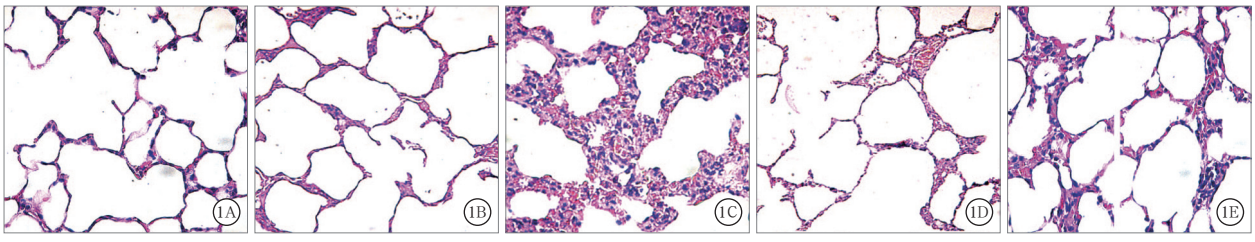

图 1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变 假手术（Sham）组（A）肺组织结构正常；保护性通气 1 h 组（B）肺组织结构较完整；大潮气量（VT）通气 1 h 组（C）肺泡间隔增厚，肺泡腔内可见较多炎性细胞，部分肺泡腔内有血性渗出液；酪氨酸蛋白激酶抑制剂（PP_2）+ 大 VT 通气 1 h 组（D）和罗格列酮 + 大 VT 通气 1 h 组（E）肺组织损伤程度较大 VT 通气 1 h 组明显减轻 HE 染色 高倍放大

表 1　各组大鼠肺组织损伤情况和 BALF 中各细胞因子水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	DAD 评分（分）	W/D 比值	EB（μg/g）	MPO（U/g）	TNF-α（ng/L）	AP-1（ng/L）	IL-8（ng/L）	NF-κB（ng/L）
Sham 组	10	0.61±0.04	4.63±0.43	13.47±0.41（5）	0.70±0.03	52.68± 4.24	0.51±0.06	21.19± 2.25	0.76±0.14
PV 1 h 组	10	0.62±0.05	4.61±0.25	13.62±0.42（5）	0.71±0.03	56.03± 3.97	0.57±0.08	21.70± 2.09	0.79±0.08
PV 2 h 组	10	0.61±0.05	4.67±0.28	13.45±0.27（5）	0.72±0.03	62.26± 4.05	0.66±0.05	24.26± 2.11	0.89±0.06
大 VT 1 h 组	10	6.79±0.48^{ab}	6.00±0.22^{ab}	17.83±0.61（5）^{ab}	2.00±0.08^{ab}	358.96± 7.92^{ab}	1.63±0.08^{ab}	235.30±12.44^{ab}	4.02±0.28^{ab}
大 VT 2 h 组	10	10.19±0.74^{ab}	6.97±0.09^{ab}	23.69±1.37（5）^{ab}	2.52±0.12^{ab}	462.08± 9.82^{ab}	2.66±0.10^{ab}	344.28± 7.24^{ab}	6.77±0.51^{ab}
PP_2 1 h 组	10	5.61±0.46^{c}	5.06±0.17^{c}	15.47±0.42（5）^{c}	1.28±0.04^{c}	291.95± 9.55^{c}	1.06±0.10^{c}	182.08±10.55^{c}	2.29±0.11^{c}
PP_2 2 h 组	10	7.44±0.44^{c}	6.10±0.10^{c}	20.28±0.54（5）^{c}	1.74±0.03^{c}	392.35±16.73^{c}	1.59±0.08^{c}	240.86±12.46^{c}	5.31±0.23^{c}
Rsg 1 h 组	10	5.78±0.23^{c}	5.12±0.23^{c}	15.34±0.48（5）^{c}	1.30±0.03^{c}	300.05± 8.51^{c}	1.18±0.13^{c}	181.33±12.05^{c}	2.37±0.14^{c}
Rsg 2 h 组	10	7.32±0.45^{c}	6.19±0.14^{c}	20.50±0.74（5）^{c}	1.75±0.04^{c}	398.36±15.56^{c}	1.60±0.11^{c}	246.46±13.06^{c}	5.37±0.17^{c}

注：Sham 组为假手术组，PV 组为保护性通气组，大 VT 组为大潮气量通气组，PP_2 或 Rsg 组为酪氨酸激酶抑制剂 PP_2 或罗格列酮预处理＋大 VT 通气组；BALF 为支气管肺泡灌洗液，DAD 为弥漫性肺泡损伤系统评分，W/D 为肺湿/干质量比值，EB 为伊文思蓝，MPO 为髓过氧化物酶，TNF-α 为肿瘤坏死因子-α，AP-1 为转录激活因子蛋白 1，IL-8 为白细胞介素-8，NF-κB 为核转录因子-κB；与 Sham 组比较，$^{a}P<0.05$；与 PV 组同期比较，$^{b}P<0.05$；与大 VT 组同期比较，$^{c}P<0.05$；括号内为动物数

表 2　各组大鼠肺组织 Nrf2 mRNA 表达、胞核和胞质 Nrf2 蛋白表达及肺组织 pCav-1、Cav-1、PPARγ、claudin-5 蛋白表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	Nrf2 mRNA（*A* 值）	Nrf2 蛋白（灰度值）		pCav-1-Y14 蛋白（灰度值）	Cav-1 蛋白（灰度值）	PPARγ 蛋白（灰度值）	claudin-5 蛋白（灰度值）
			胞核	胞质				
Sham 组	10	0.37±0.03	0.16±0.04	0.60±0.03	0.84±0.06	0.94±0.07	0.24±0.06	0.24±0.03
PV 1 h 组	10	0.31±0.02	0.20±0.02	0.62±0.05	0.89±0.06	0.95±0.05	0.28±0.05	0.32±0.04
PV 2 h 组	10	0.37±0.03	0.21±0.04	0.61±0.02	0.97±0.03	0.96±0.06	0.27±0.03	0.30±0.04
大 VT 1 h 组	10	0.36±0.02	0.31±0.02	0.59±0.03	1.48±0.02^{ab}	1.24±0.07^{ab}	0.17±0.07^{ab}	0.14±0.03^{ab}
大 VT 2 h 组	10	0.30±0.01	0.22±0.03	0.62±0.05	1.31±0.01^{ab}	1.28±0.06^{ab}	0.16±0.03^{ab}	0.17±0.04^{ab}
PP_2 1 h 组	10	0.48±0.03^{c}	0.61±0.06^{abc}	0.61±0.04	0.89±0.04^{c}	1.28±0.05^{ab}	0.34±0.07^{abc}	0.33±0.05^{ac}
PP_2 2 h 组	10	0.77±0.06^{c}	0.38±0.06^{abc}	0.60±0.02	0.86±0.02^{c}	1.34±0.04^{ab}	0.38±0.09^{abc}	0.30±0.06^{ac}
Rsg 1 h 组	10	0.62±0.05^{c}	0.56±0.06^{abc}	0.62±0.04	1.41±0.01^{ab}	1.26±0.06^{ab}	0.42±0.13^{abc}	0.38±0.07^{ac}
Rsg 2 h 组	10	0.72±0.07^{c}	0.43±0.07^{abc}	0.61±0.03	1.51±0.03^{ab}	1.27±0.07^{ab}	0.33±0.07^{abc}	0.31±0.04^{ac}

注：Sham 组为假手术组，PV 组为保护性通气组，大 VT 组为大潮气量通气组，PP_2 或 Rsg 组为酪氨酸激酶抑制剂 PP_2 或罗格列酮预处理＋大 VT 通气组；Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2，pCav-1 为磷酸化小窝蛋白-1，Cav-1 为小窝蛋白-1，PPARγ 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ，claudin-5 为闭合蛋白-5；与 Sham 组比较，$^{a}P<0.05$；与 PV 组同期比较，$^{b}P<0.05$；与大 VT 组同期比较，$^{c}P<0.05$

依赖性升高（均 $P<0.05$）；PP_2 或 Rsg 预处理均可明显降低大 VT 通气大鼠肺组织和 BALF 中各项指标（均 $P<0.05$），而两个预处理组间无差异。

2.3　肺组织 Nrf2 mRNA 表达（表 2）：Sham 组、PV 组及大 VT 组肺组织 Nrf2 mRNA 表达无差异（均 $P>0.05$）；PP_2 或 Rsg 预处理均可明显上调肺组织 Nrf2 mRNA 表达（均 $P<0.05$），但两个预处理组无差异。

2.4　胞质和胞核 Nrf2 蛋白表达（表 2）：Sham 组、PV 组及大 VT 组胞核内 Nrf2 蛋白表达无差异（均 $P>0.05$）；PP_2 或 Rsg 预处理均能明显提高胞核内 Nrf2 蛋白表达（均 $P<0.05$），但两个预处理组无差异。各组胞质 Nrf2 蛋白表达均无显著差异。

2.5　肺组织 pCav-1-Y14、Cav-1、PPARγ、claudin-5 蛋白表达（表 2）：Sham 组、PV 组各蛋白表达无差异；大 VT 组 pCav-1-Y14、Cav-1 表达较 Sham 组及 PV 组显著升高，PPARγ、claudin-5 表达显著降低（均 $P<0.05$）；PP_2 预处理组 pCav-1-Y14 表达显著高于大 VT 组（$P<0.05$），但 Cav-1 表达与大 VT 组无差异；PP_2 或 Rsg 预处理组 PPARγ、claudin-5 表达均明显高于大 VT 组（均 $P<0.05$），但两个预处理组无差异。

2.6　肺组织 PPARγ 和 claudin-5 阳性表达（图 2）：PPARγ 和 claudin-5 蛋白阳性产物为细胞核着色为主的棕黄色颗粒。Sham 组可见大量 PPARγ 和 claudin-5 阳性表达，PPARγ 主要表达于肺泡上皮细胞及肺血管内皮细胞，claudin-5 主要表达于肺

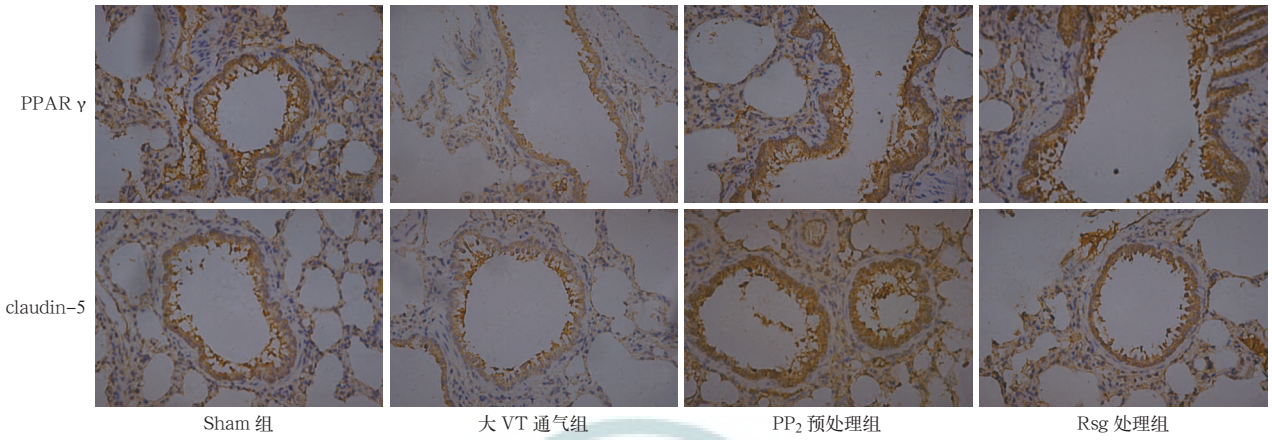

图 2 光镜下观察各组大鼠肺组织过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPAR γ）和紧密连接蛋白闭合蛋白-5（claudin-5）的阳性表达 PPAR γ、claudin-5 蛋白阳性产物为细胞核着色为主的棕黄色颗粒。假手术（Sham）组有大量 PPAR γ、claudin-5 阳性表达，PPAR γ 主要表达于肺血管上皮细胞及内皮细胞，claudin-5 主要表达于肺血管内皮细胞；大潮气量（VT）通气组 PPAR γ、claudin-5 阳性表达减少；酪氨酸激酶抑制剂 PP_2 或罗格列酮预处理均可增加大 VT 通气大鼠 PPAR γ、claudin-5 阳性表达 免疫组化染色 高倍放大

血管内皮细胞；而大 VT 组阳性表达明显减少；PP_2 或 Rsg 预处理均可明显增加大 VT 通气大鼠肺组织 PPAR γ 和 claudin-5 的阳性表达。

3 讨 论

Papaiahgari 等[2]最先证实大 VT 通气可导致 Nrf2 基因缺失鼠氧化还原失衡，从而增加了 VILI 的易感性。然而，我们并不清楚 Nrf2 信号链及其效应分子是如何调控的，以及这种调控在 VILI 中的作用。因此我们进行了本研究并观察到大 VT 可使 pCav-1-Y14 及 Cav-1 的表达快速升高，但核内 Nrf2 蛋白表达无显著变化；而使用 PP_2 预处理后，核内 Nrf2 蛋白表达较 PV 组及 Sham 组显著升高。相关研究已证实 Cav-1 无论在细胞质还是细胞核均可抑制 Nrf2 的转录活性[4]。Cav-1 抑制 Nrf2 信号链，除了增加与 Keap1 蛋白的交互反应并将 Nrf2 锁定在胞质内，同时通过特定的蛋白酶系统促进 Nrf2 解离来达到抑制作用外[4]，还可通过扣留 Nrf2 在小窝细胞膜而限制其移动来完成[5]。近期一项实验证实，在 Cav-1 静默细胞 Keap1 蛋白降低，直接导致 Nrf2 转录活性增加[13]。研究已证实 Cav-1-Y14 是 Cav-1 唯一的可被酪氨酸激酶磷酸化的位点[14]，亦是改变其分子构象、为调控蛋白分子提供结合位点，形成相关蛋白复合物并继发影响下游信号链活性的关键[15]。因此，在大 VT 使 Cav-1 磷酸化增加的情况下，Cav-1 的分子构象发生改变，因而可能增加了更多 Cav-1 与 Nrf2 的结合位点，并将 Nrf2 扣留在小窝细胞膜内，从而使 Nrf2 移动到核中减少。而抑制 Cav-1 磷酸化则可增加细胞核中 Nrf2 的蛋白表达并增加其转录活性。本研究证实，抑制 Cav-1 磷酸化的大 VT 组 Nrf2 核内蛋白表达明显增加，而各组胞质 Nrf2 蛋白水平无差异，这符合在静息状态下细胞质中 Nrf2 经历了 Keap1 调节的迅速解离并在氧化应激后迅速移动到细胞核，从而使细胞质 Nrf2 蛋白保持稳定的观点，与 Volonte 等[5]的实验结果一致。我们还发现，大 VT 组 Nrf2 mRNA 表达与 PV 组并无差异，与 Tao 等[16]的实验结果一致。研究证实 Keap1 空间构象发生改变，在细胞质和细胞核阻断 Nrf2 泛素化是引起 Nrf2 聚集及活化的主要方式[17-18]，故 Nrf2 活化主要涉及蛋白水平的变化而不涉及 Nrf2 mRNA 的变化。本实验也发现 PP_2 或 Rsg 预处理组 Nrf2 mRNA 表达显著升高，可能是与其他转录因子，特别是 PPAR γ 交互反应的结果[7]。

Cho 等[7]最早发现 PPAR γ 是 Nrf2 的下游效应物，Nrf2 基因的缺失与否决定了 PPAR γ 是否有更高的表达和激活。本实验亦发现，Nrf2 核内蛋白表达明显升高时，肺组织 PPAR γ 蛋白表达亦明显升高。多项研究均证实 PPAR γ 有明显的抗炎症效应[7-8,19]。本实验亦发现，PPAR γ 对炎性转录因子及促炎因子有明显的调控作用。当肺组织 PPAR γ 蛋白表达降低时，炎性转录因子及促炎因子均明显升高，反之则结果相反。需要注意的是，Cho 等[7]在研究中还发现当 PPAR γ 表达水平降低时，肺组织中 Nrf2 表达减弱，这意味着 PPAR γ 亦能反向调节 Nrf2 并可通过上游信号链使 Nrf2 激活。本实验亦发现，当用配体激活 PPAR γ 时，Rsg 预处理组核

内 Nrf2 水平亦有明显升高。

Li 等[9]在研究中首次证实 PPARγ 对细胞旁通路有重要的调控作用，发现免疫缺陷病毒（HIV）所致间质性肺炎患者 PPARγ、claudin-5 蛋白表达均降低，且伴有肺毛细血管通透性增加，但 PPARγ 激动剂可逆转 HIV 引起的紧密连接蛋白下调，并可使 claudin-5 保持在合理水平。研究已证实 claudin-5 是唯一集中在血管内皮各细胞间交界处的蛋白且并不分布在上皮细胞交界处，这提示 claudin-5 是血管内皮细胞紧密连接成分的特异蛋白，是微血管屏障功能完整性的重要标志[20]。本实验亦观察到，当 PPARγ 蛋白表达水平降低时，claudin-5 蛋白表达水平亦降低，则此时肺 W/D 比值及肺血管通透性均明显升高，反之则结果相反。这与 Jang 等[21]在丙烯醛引发肺损伤的鼠类模型中发现 claudin-5 表达降低可使实验鼠对损伤的敏感性增加的实验结果相似，亦与 Chen 等[22]证实 claudin-5 表达降低可减弱辛伐他汀减少 LPS 引发肺渗出效应的结果相似。

综上，抑制 Cav-1-Y14 磷酸化可增加 Nrf2 的核内表达，从而增加其效应分子 PPARγ 及 claudin-5 的表达，这对减轻肺组织炎症、降低肺毛细血管旁渗透性具有十分重要的意义。

参考文献

[1] Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, et al. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289 (5): L834-841. DOI: 10.1152/ajplung.00069.2005.

[2] Papaiahgari S, Yerrapureddy A, Reddy SR, et al. Genetic and pharmacologic evidence links oxidative stress to ventilator-induced lung injury in mice [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176 (12): 1222-1235. DOI: 10.1164/rccm.200701-060OC.

[3] 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. DOI: 10.1165/ajrcmb.26.2.4501.

[4] Li W, Liu H, Zhou JS, et al. Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2) [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (25): 20922-20930. DOI: 10.1074/jbc.M112.352336.

[5] Volonte D, Liu Z, Musille PM, et al. Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence [J]. Mol Biol Cell, 2013, 24 (12): 1852-1862. DOI: 10.1091/mbc.E12-09-0666.

[6] Cho HY, Reddy SP, Debiase A, et al. Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38 (3): 325-343. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.013.

[7] Cho HY, Gladwell W, Wang X, et al. Nrf2-regulated PPARγ expression is critical to protection against acute lung injury in mice [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182 (2): 170-182. DOI: 10.1164/rccm.200907-1047OC.

[8] 刘东，曾邦雄，张世范. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 与脓毒症的关系 [J]. 中华危重病急救医学，2005, 17 (4): 244-246. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2005.04.021.
Liu D, Zeng BX, Zhang SF. The relationship between peroxisome proliferators-activated receptor γ and sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2005, 17 (4): 244-246. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2005.04.021.

[9] Li H, Singh S, Potula R, et al. Dysregulation of claudin-5 in HIV-induced interstitial pneumonitis and lung vascular injury. Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor-γ [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190 (1): 85-97. DOI: 10.1164/rccm.201106-1151OC.

[10] 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.03.009.
Lin F, Xiao J, Zhang CT. The effects of mechanical ventilation with different tidal volumes on the expression of caveolin-1 in lung tissue and its related downstream signaling in rats [J]. Chin Crit Care Med 2013, 25 (3): 154-158. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.03.009.

[11] 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. DOI: 10.4103/2045-8932.105033.

[12] 钟荣，肖军，于志辉，等. 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 [J]. 中华危重病急救医学，2015, 27 (7): 568-573. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.006.
Zhong R, Xiao J, Yu ZH, et al. Research on the effect of protection against ventilator-induced lung injury via regulation of caveolin-1/heme oxygenase-1 signaling [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (7): 568-573. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.006.

[13] Petriello MC, Han SG, Newsome BJ, et al. PCB 126 toxicity is modulated by cross-talk between caveolae and Nrf2 signaling [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 277 (2): 192-199. DOI: 10.1016/j.taap.2014.03.018.

[14] Li S, Seitz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src *in vivo* [J]. J Biol Chem, 1996, 271 (7): 3863-3868.

[15] Park H, Ahn KJ, Lee KJ, et al. Protein-protein interaction between caveolin-1 and SHP-2 is dependent on the N-SH2 domain of SHP-2 [J]. BMB Rep, 2015, 48 (3): 184-189. DOI: 10.5483/BMBRep.2015.48.3.249.

[16] Tao S, de la Vega MR, Quijada H, et al. Bixin protects mice against ventilation-induced lung injury in an NRF2-dependent manner [J]. Sci Rep, 2016, 6 : 18760. DOI: 10.1038/srep18760.

[17] Li Y, Paonessa JD, Zhang Y. Mechanism of chemical activation of Nrf2 [J]. PLoS One, 2012, 7 (4): e35122. DOI: 10.1371/journal.pone.0035122.

[18] Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway [J]. Drug Metab Rev, 2006, 38 (4): 769-789. DOI: 10.1080/03602530600971974.

[19] Yao J, Pan D, Zhao Y, et al. Wogonin prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury and inflammation in mice via peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated attenuation of the nuclear factor-kappaB pathway [J]. Immunology, 2014, 143 (2): 241-257. DOI: 10.1111/imm.12305.

[20] Morita K, Sasaki H, Furuse M, et al. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells [J]. J Cell Biol, 1999, 147 (1): 185-194. DOI: 10.1083/jcb.147.1.185.

[21] Jang AS, Concel VJ, Bein K, et al. Endothelial dysfunction and claudin 5 regulation during acrolein-induced lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44 (4): 483-490. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0391OC.

[22] Chen W, Sharma R, Rizzo AN, et al. Role of claudin-5 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 50 (2): 328-336. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0058OC.

（收稿日期：2016-04-14）
（本文编辑：孙茜，李银平）