

高碳酸血症对大鼠机械通气肺损伤时炎症因子和 p38MAPK 表达的影响 *

程晓辉¹ 徐学森² 岳子勇^{1△} 公维东¹ 王楠¹

(1 哈尔滨医科大学附属第二医院麻醉科 黑龙江省麻醉与危重病学研究重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150086 ;

2 潍坊市妇幼保健院 山东 潍坊 261011)

摘要 目的 探讨高碳酸血症对大鼠机械通气性肺损伤(VILI)时炎症因子和 p38MAPK 表达的影响。方法 :健康雄性 Wistar 大鼠 30 只 ,体重 220~280g ,采用随机数字表法 ,将大鼠随机分 3 组(n=10) :对照组(C 组)、机械通气肺损伤组(V 组)和高碳酸血症组(H 组)。C 组保留自主呼吸 ,V 组和 H 组行机械通气 4 h。采用高气道压机械通气模式制备机械通气性肺损伤模型。H 组通过调整吸入的 CO₂ 浓度来维持动脉血 PaCO₂ 分别为 80~100mmHg。机械通气结束时 ,测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白、TNF- α 和巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)的浓度 ,取肺组织 ,测定湿干重比(W/D 比)、细胞间粘附分子(ICAM-1)和 p38MAPK 蛋白的表达水平以及 p38MAPK 的活性 ,并观察病理学结果 ,进行肺损伤评分。结果 :与 C 组比较 ,V 组肺损伤评分、W/D 比、ICAM-1 表达水平、BALF 中总蛋白浓度、TNF- α 和 MIP-2 浓度和肺组织 p38MAPK 活性升高 ,PaO₂ 降低(P<0.05) ;与 V 组比较 ,H 组肺损伤评分、W/D 比、ICAM-1 表达水平、BALF 中总蛋白浓度、TNF- α 和 MIP-2 浓度和肺组织 p38MAPK 活性降低 ,PaO₂ 升高(P<0.05)。结论 :高碳酸血症通过调节 p38MAPK 的表达 ,从而抑制炎症反应减轻大鼠机械通气肺损伤。

关键词 高碳酸血症 机械通气肺损伤 p38MAPK

中图分类号 :Q95-3 ,R614 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)14-2605-04

Effects of Hypercapnia on Expression of Inflammatory Cytokines and p38MAPK in Ventilator-Induced Lung Injury in Rats*

CHENG Xiao-hui¹, XU Xue-sen², YUE Zi-yong^{1△}, GONG Wei-dong¹, WANG Nan¹

(1 Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University Key Laboratory of Anesthesiology and Critical Care Medicine of Heilongjiang Province, 150086, Harbin, China;

2 Maternal and Child Care Service Centre of Weifang, 261011, Weifang, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of hypercapnia on the inflammatory cytokines and p38MAPK in ventilator lung injury in rats. **Methods:** Thirty male Wistar rats weighting 250~280g were randomly divided into 3 groups (n=10 each): control group (group C), VILI group (group V), hypercapnia group (group H). A rat model of lung injury induced by ventilation with high peak inspiratory pressure (PIP). Parameter of ventilation: PIP=25cmH₂O, PEEP=2cmH₂O, the fraction of inspiratory O₂ 50% and adjusting the level of CO₂ to maintained PaCO₂ of group V and group H at 35~45mmHg and 80~100mmHg respectively. The rats were sacrificed by exsanguination 4h of mechanical ventilation and the lung tissues were removed for microscopic examination, lung wet to dry weight ratio (W/D), determination of ICMA-1 (by immuno-histochemistry), p38 and phosphorylated p38 (p-p38) expression (by Western blotting) and determination of TNF- α , MIP-2 (by enzyme linked immunosorbent assay) and total of protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). **Results:** Compared with group C, the lung injury score, W/D ratio, TNF- α , MIP-2, total protein concentrations in BALF, ICAM-1 expression and p38MAPK activity in lung tissue were increased, PaO₂ were decreased in groups V (P<0.05). Compared with group V, the lung injury score, W/D ratio, TNF- α , MIP-2, total protein concentrations in BALF, and MAD content, ICAM-1 expression and p38MAPK activity in lung tissue were decreased, PaO₂ and were increased in group P (P<0.05). **Conclusions:** Hypercapnia attenuated ventilator-induced lung injury by regulating the expression of p-p38MAPK that inhibit the expression of inflammatory cytokines in rat lung tissues.

Key words: Hypercapnia; Ventilator-induced lung injury; P38MAPK

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)14-2605-04

前言

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 及其严重形式急性呼

吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是临床常见的危重病 , 它可以有多种肺内外因素引起 , 是导致多器官功能障碍综合征或全身炎症反应综合征中最常见的器官组

* 基金项目 : 国家自然科学基金项目 (30772085)

作者简介 : 程晓辉 (1984-) , 女 , 硕士研究生 , 主要研究方向 : 机械通气肺损伤

△ 通讯作者 : 岳子勇 , 电话 : 045-86605452 , E-mail : yueziyong@126.com

(收稿日期 : 2012-01-05 接受日期 : 2012-01-31)

织损伤,多器官衰竭也是造成急性肺损伤的主要原因^[1]。机械通气即是目前危重症病人维持生命最重要的治疗方法,但其本身又可以引起机械通气相关性肺损伤(ventilator-induced lung injury VILI)。有研究表明长时间机械通气的病人有0.2%到5%发展为VILI^[2],所以对VILI发生机制及预防治疗的研究就显得极为重要,大量实验证实炎症反应是VILI的重要机制之一。高碳酸血症具有抑制炎症反应^[3],抑制肺上皮细胞凋亡等肺保护作用^[4]。本实验以高气道压通气模式造成VILI的模型,吸入二氧化碳造成高碳酸血症,探讨高碳酸血症对大鼠VILI形成过程中炎症因子及p38MAPK的影响,以阐明其减轻VILI的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物选择和分组

健康雄性Vistar大鼠30只,体重220~280g,由吉林大学白求恩医学院动物中心提供。采用随机数字表法,将大鼠随机分为3组(n=10):对照组(C组)、机械通气肺损伤组(V组)、高碳酸血症组(H组)。

1.2 VILI模型的制备

采用参考文献^[5]中介绍的方法制备VILI模型,并加以改良。腹腔内注射3%的苯巴比妥钠50mg/kg对大鼠进行麻醉后,行气管切开插管,股动静脉穿刺置管。股动脉插管用于监测动脉压和采血。股静脉插管建立液体通道,以10 ml·kg⁻¹·h⁻¹的速率静脉输注生理盐水。C组保留自主呼吸,V组和H组股静脉注射哌库溴铵1 mg/kg,待自主呼吸消失后,接G09-061小动物呼吸机(Kent公司,美国),缓慢升高气道压力至吸气峰压/呼气末正压为25/2 cm H₂O(1 cm H₂O=0.098 kPa),吸呼比1:2,频率40次/min,FiO₂=0.50,机械通气4 h。V组调整吸入气其中二氧化碳浓度维持PaCO₂在35~45 mmHg,H组逐渐增加吸入气二氧化碳浓度维持PaCO₂在80~100 mmHg。

1.3 项目观察

机械通气结束时,动脉采血测血气并放血处死大鼠,取肺组织。用4 ml生理盐水反复灌洗左肺3次,回收支气管肺泡灌洗液(BALF),4℃下3000转/min离心10 min,离心半径16 cm,上清液于-80℃冰箱中保存。采用BCA蛋白浓度试剂盒测

定BALF中总蛋白浓度,ELASA法测定BALF中肿瘤坏死因子(TNF-α)和巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)的浓度,试剂盒均购自武汉博士得生物工程有限公司。取右肺上叶,滤纸吸干表面水分,称湿重,置于80℃烘干箱72 h至恒重,称干重,计算肺湿干重比(W/D)比。右肺中叶用4℃4%多聚甲醛PBS溶液固定48 h,常规石蜡包埋、切片、HE染色。参考文献^[6],用免疫组化法检测ICAM-1,胞浆为黄色或棕黄色为阳性。双盲法于高倍镜下(×400)选取5个不重复视野,结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱计算免疫组织化学染色评分。阳性细胞百分比:无阳性细胞记0分,<10%记1分,11%~50%记2分,51%~80%记3分,>80%记4分;阳性细胞染色强弱:阴性记0分,弱阳性记1分,中度阳性记2分,强阳性记3分。两项乘积为免疫组织化学评分;用蛋白质免疫印迹法检测p38MAPK,磷酸化p38(p-p38MAPK)的表达,并采用Bio-Rad Gel Doc 1000成像系统采集结果图像,用图像分析软件分析图像条带,并计算其积分光密度值。以p-p38MAPK与p38MAPK积分吸光度比值来反映p38MAPK的磷酸化程度,即p-p38MAPK的表达水平。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析,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,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺功能及形态检测结果

与C组比较,V组和H组在T4时PaO₂降低(P<0.05);与V组比较,H组T4时PaO₂升高(P<0.05)。与C组比较,V组和H组4h时肺组织W/D比值,BALF中总蛋白含量升高(P<0.05);与V组比较,H组4h时肺组织W/D比值,BALF中总蛋白含量降低(见表1)。

与C组相比,V组和H组支气管粘膜皱襞消失,各级支气管、血管周围明显水肿,肺泡腔内有大量炎细胞浸润,肺毛细血管充血,可见弥漫性肺泡扩张融合,较多肺大泡形成,胸膜下尤其严重。与V组相比,H组支气管和血管周围水肿明显减轻,极少量炎细胞浸润,肺泡壁扩张融合和肺大泡形成较少(见图1)。

表1 三组在4h时氧和指数、蛋白含量、W/D比值

Table 1 Comparison of PaO₂, the protein in BALF, W/D ratio changes after mechanical ventilation for 4 hours

Group	PaO ₂ (mmHg)	BALF-pro(g·L ⁻¹)	W/D
Group C	242.61±17.12	0.38±0.11	4.54±0.23
Group V	160.91±60.92 ^a	2.44±0.33 ^a	8.33±0.39 ^a
Group H	192.72±72.55 ^{ab}	1.46±0.29 ^{ab}	6.08±0.65 ^{ab}

注:与C组比较,^aP<0.05;与V组比较,^bP<0.05;

Note: ^aP<0.05 group V or group H compared with group C; ^bP<0.05 group H compared with group V.

2.2 肺组织炎症因子的变化

机械通气4h后,各组肺组织炎症因子的变化显示:与C组比较,V组和H组4h时肺组织ICAM-1的表达及BALF中

TNF-α和MIP-2的表达水平升高(P<0.05);与V组比较,H组以上各种炎症因子表达水平均降低(P<0.05)(见表2)。

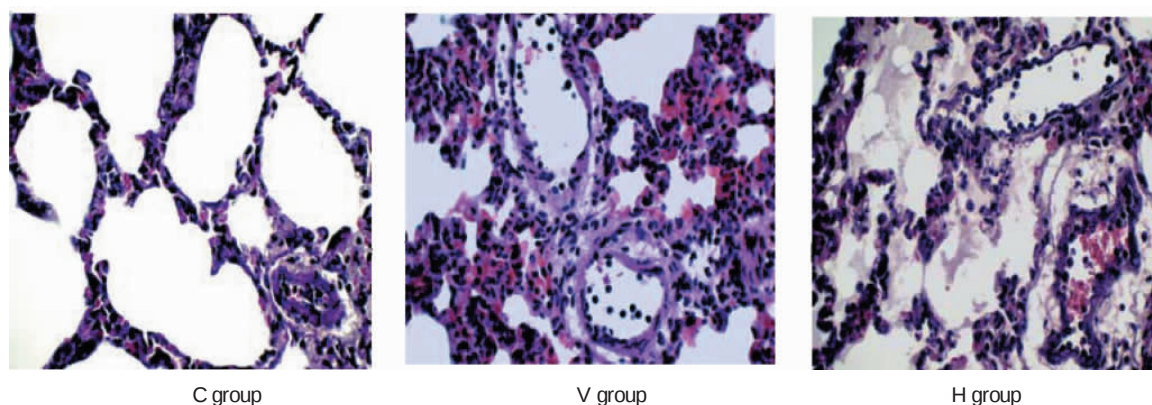


Fig.1 Change of pathology in 3 groups(HE, × 400)

表 2 三组在 4h 时 ICAM-1、TNF- α 、MIP-2 的表达Table 2 ICAM-1, TNF- α , MIP-2 in BALF changes after mechanical ventilation for 4 hours

Group	ICAM-1	TNF- α (ng·L ⁻¹)	MIP-2(ng·L ⁻¹)
C group	14.24± 1.51	75.12± 4.28	0.82± 1.00
V group	43.18± 2.58 ^a	181.34± 8.25 ^a	6.81± 1.13 ^a
H group	34.26± 5.13 ^{ab}	141.27± 3.98 ^{ab}	3.22± 1.05 ^{ab}

注 :与 C 组比较 ,^aP<0.05 ;与 V 组比较 ,^bP<0.05;

Note: ^aP<0.05 group V or group H compared with group C ;^bP<0.05 group H compared with group V.

2.3 肺组织 p38MAPK 的表达

机械通气 4h 后 ,各组肺组织磷酸化 p38MAPK(p-p38MAPK)表达显示 :与 C 组比较 ,V 组和 H 组 4h 时肺组织 p-p38MAPK 的表达水平升高 (P<0.05); 与 V 组比较 ,H 组 p-p38MAPK 的表达水平均降低 (P<0.05), 肺组织中总 p38MAPK 含量三组间无明显发现差异(P>0.05)(见图 2)。

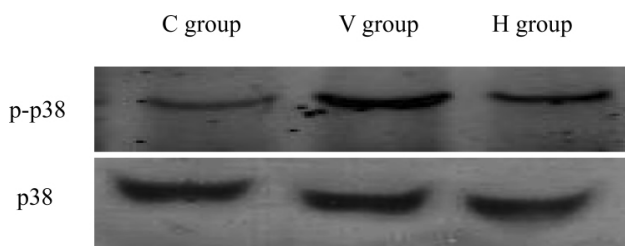


图 2 三组肺组织中 p-p38MAPK 与 p38MAPK 表达

Fig.2 Comparison of expression of p-p38MAPK and p38MAPK

3 讨论

本研究通过高气道压通气复制 VILI 模型 ,结果表明 ,与 C 组相比 ,V 组病理学损伤程度加重 ,W/D 比值和 BALF 中总蛋白含量增加表明肺通透性增加 ,动脉血氧饱和度下降 ,提示大鼠机械通气肺损伤模型制备成功。

高碳酸血症在急性肺损伤中的作用已有大量研究 ,高碳酸血症能增加大潮气量机械通气患者的生存率 ,降低肺通透性 ,提高氧和指数^[3,6,7] ,Hilde R.等^[8]在 VILI 模型中 ,证明高碳酸血症能通过调节炎症反应产生肺保护作用。炎症反应在 VILI 发生过程中普遍存在 ,并且是重要机制之一^[9]。TNF- α 是急性肺

伤的前炎症因子 ,在发生肺损伤时会显著增加 ,它可以与肺血管内皮细胞相互作用 ,从而引起因子和粘附分子的增加^[10]。实验证明晚期 TNF- α 也有明显地表达 ,高碳酸血症对这两个时期内 TNF- α 的增加都有抑制作用^[11] ,从而减少其下游炎症因子的表达。炎症因子的减少可以降低中性粒细胞的趋化、吞噬作用 ,另外高碳酸血症对中性粒细胞也有直接的抑制作用^[12]。抑制中性粒细胞可以降低它与内皮细胞和上皮细胞的相互作用 ,从而降低急性肺损伤时肺通透性的增加 ,提高动脉血氧饱和度^[13] ,降低氧自由基的产生^[14]。研究表明 ,高碳酸血症对氧自由基还有直接抑制作用^[15]。而低碳酸血症则会产生损伤作用^[16] ,对高碳酸血症应用缓冲液会加重肺组织屏障功能障碍^[17]。本实验结果显示 :与 V 组相比 ,H 组病理学损伤程度明显减轻 ,湿干重比降低 ,氧和指数增加 ,多种炎症因子减少 ,这与以前的实验结果相符 ,表明高碳酸血症能通过抑制炎症反应减轻 VILI。

P38MAPK 信号传导通路在炎症反应及细胞应激、迁移、凋亡等方面起重要作用。在机械通气肺损伤模型中已证实 P38MAPK 有明显增加 ,在肺上皮细胞中 p38MAPK/MK-2/HSP 途径参与了细胞骨架的调节 ,抑制这条途径就可以降低肺的通透性^[18]。在人血管内皮细胞的离体实验中证实 ,TNF- α 的激活可通过 p38MAPK-MK2 途径增加 IL-8(MIP-2)和 ICAM-1 的生成^[6] ,而这两者炎症因子是中性粒细胞的聚集和浸润所必需的 ,并且在 VILI 中起着重要作用^[19]。Uhlig 等^[20]证明在应用高气道压通气时 ,p38MAPK 磷酸化程度大约增加 2 倍。Mahendra Damarla 等^[18]应用 p38MAPK 抑制剂进一步证明 p38MAPK 参与了 VILI 的形成 ,其抑制剂能明显改善肺泡毛细血管的通透性。应用 MKK-3 基因敲除鼠的实验也证明 :对 p38MAPK 途径的抑制能明显减轻急性肺损伤过程中炎症反应和凋亡的发生^[21]。

本实验结果显示,与C组相比,V组 p38MAPK 的磷酸化明显增加,与早期试验相符。与V组相比,H组磷酸化程度明显降低($P<0.05$)。所以高碳酸血症对 VILI 的保护作用至少在某种程度上是通过抑制 p38MAPK 的磷酸化,降低炎症细胞和炎症因子的产生,从而产生肺保护作用。

综上所述,高碳酸血症可减轻大鼠机械通气相关性肺损伤,其机制可能与下调 p38MAPK 磷酸化和炎症因子的表达有关。

参考文献(References)

- [1] Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury [J]. *Chest*, 2007, 131(2):554-562
- [2] Licker M. Risk factors for acute lung injury after thoracic surgery for lung cancer [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(6):1558-1565
- [3] Hildebrand R, Andrew D, Heather A, et al. Hypercapnic acidosis modulates inflammation, lung mechanics, and edema in the isolated perfused lung [J]. *Journal of Critical Care*, 2007, 22(4):305-313
- [4] 申东方,王玲,谭晶,等.治疗性高碳酸血症对大鼠移植肺泡型上皮细胞的影响[J].中华麻醉学杂志,2011,31(4):475-477
Shen Dong-fang, Wang Ling, Tan Jing, et al. Effect of therapeutic hypercapnia on alveolar cells in transplanted rats [J]. *Chinese Journal of Anesthesiology*, 2011, 31(4):475-477(In Chinese)
- [5] Mandava S, Kolobow T, Vitale G, et al. Lethal systemic capillary leak syndrome associated with severe ventilator-induced lung injury: an experimental study [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31:885-892
- [6] Xin Su, Lihua Ao, Ning Zou. Post-transcriptional regulation of TNF-induced expression of ICAM-1 and IL-8 in human lung microvascular endothelial cells: An obligatory role for the p38 MAPK-MK2 pathway dissociated with HSP27 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(9): 1623-1631
- [7] Martina Ni Chonghaile, Brendan D, Higgins, J. Hypercapnic acidosis attenuates severe acute bacterial pneumonia-induced lung injury by a neutrophil-independent mechanism [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(12):3135-3144.
- [8] 方向明,谢俊然,陈惠香,等. p38 MAPK 在机械通气所致肺损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2002, 22(9): 546-550
Fang Xiang-ming, Xie Jun-rang, Cheng Hui-xiang, et al. The effect of p38MAPK in ventilator-induced lung injury [J]. *Chinese Journal of Anesthesiology*, 2002, (9):546-550(In Chinese)
- [9] Held HD, Boettcher S, Hamann L, et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163:711-716
- [10] Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology [J]. *Respir Res*, 2006, 7(1):125-133
- [11] Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, et al. High tidal volume ventilation upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury [J]. *Appl Physiol*, 2003, 95: 1385-1393
- [12] O' Croinin DF, Nichol AD, Hopkins N, et al. Sustained hypercapnic acidosis during pulmonary infection increases bacterial load and worsens lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36:2128-2135
- [13] Laffey JG, Tanaka M, Engelberts D, et al. Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following in vivo lung reperfusion [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162:2287-2294
- [14] Shibata K, Clegg N, Engelberts D, et al. Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158:1578-1584
- [15] Broccard AF, Hotchkiss JR, Vannay C, et al. Protective effects of hypercapnic acidosis on ventilator-induced lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164:802-806
- [16] Laffey JG, Kavanagh BP. Hypocapnia [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347: 43-53
- [17] Laffey JG, Engelberts D, Kavanagh BP. Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161: 141-146
- [18] Damarla M, Hasan E, Boueiz A, et al. Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 2 Regulates Actin Polymerization and Vascular Leak in Ventilator Associated Lung Injury [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(2): e4600
- [19] Guochang Hu, Stephen M, David E, et al. Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveolae-mediated pulmonary vascular hyperpermeability [J]. *Circ Res*, 2008, 102(12):e120-e131
- [20] Uhlig U, Haitzma JJ, Goldmann T, et al. Ventilation-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Eur Respir J*, 2002, 20(4): 946-956
- [21] Tama's Dolinay. Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Susceptibility to Ventilator-Induced Lung Injury [J]. *PLoS ONE*, 2009, 3(2): e1601