



氯沙坦对机械通气大鼠肺组织 TNF- α 和 MPO 表达的影响

牛志红, 张新日

(山西医科大学第一医院呼吸科, 太原 030001)

【摘要】 目的 通过观察 Ang II 受体拮抗剂——氯沙坦对呼吸机所致肺组织 TNF- α 水平和髓过氧化物酶 (MPO) 活性的影响, 探讨氯沙坦对呼吸机所致肺损伤的保护作用。方法 24 只健康雄性 Wister 大鼠随机分为对照组、呼吸机所致肺损伤组 (VILI) 和氯沙坦干预组 (LAP), 分别采用 ELISA 法测定大鼠肺组织中血管紧张素 II (Ang II) 含量, 采用免疫组织化学染色法测定大鼠肺组织 TNF- α 蛋白表达水平, 采用化学比色法测定肺组织匀浆中 MPO 活性。结果 VILI 组大鼠肺组织 Ang II 含量、TNF- α 蛋白表达水平以及肺组织匀浆中 MPO 活性均明显高于对照组 (均 $P < 0.01$)。氯沙坦干预组大鼠肺组织 Ang II 含量与 VILI 组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 但肺组织 TNF- α 蛋白表达水平、肺组织匀浆中 MPO 活性和肺 W/D 比值均较 VILI 组明显降低 (均 $P < 0.01$), 同时肺组织病理损伤程度也较 VILI 组明显减轻。结论 Ang II 通过调控肺组织中 TNF- α 的表达在 VILI 发病中起重要作用, 氯沙坦可阻断 Ang II 与 AT1 受体的结合, 下调肺组织 TNF- α 表达, 降低 MPO 的活性, 对 VILI 具有一定防治作用。

【关键词】 机械通气; 肺损伤; 血管紧张素 II; 肿瘤坏死因子- α ; 氯沙坦; 大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0049-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.012

Effect of Losartan on the Expression of TNF- α and MPO in the Lung of Mechanically Ventilated Rats

NIU Zhi-hong, ZHANG xin-ri

(Department of Respiratory Medicine, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of an AT1 inhibitor losartan on the expression of TNF- α and myeloperoxidase (MPO) in the lung of mechanically ventilated rats, and further study the protective effect of losartan on ventilator induced lung injury. **Methods** Twenty-four healthy male Wister rats were randomly divided into three groups: control group, ventilator induced lung injury (VILI) group and losartan group. ELISA in situ was used to determine the blood content of angiotensin II (Ang II) in the lung tissue, immunohistochemical staining was employed to detect the expression level of TNF- α protein, and colorimetry was applied to measure the activity of myeloperoxidase (MPO) in the homogenate of lung tissue. **Results** The Ang II concentration and expression level of TNF- α protein in the lung tissue, and MPO activity in the homogenate of lung tissue of the VILI group were significantly higher than those in the control group

[基金项目] 山西省科技攻关资助项目 (编号:2007032016-1) 太原市科技资助项目 (编号:0801041)

[作者简介] 牛志红 (1984 -), 女, 硕士生。E-mail: n_zhihong918@126.com。

[通讯作者] 张新日, E-mail: ykdzxr61@yahoo.com.cn。

($P < 0.01$). There was no significant difference between the Ang II concentration and MPO activity in the losartan group and VILI group ($P > 0.05$). However, the expression level of TNF- α protein, MPO activity and wet/dry lung weight (W/D) ratio were significantly decreased in the losartan group in comparison with that of the VILI group ($P < 0.01$), and the lung injury was apparently less serious than that in the VILI group. **Conclusions** Ang II regulates the expression of TNF- α in the lung tissue and play an important role in the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. Losartan may block the binding of Ang II and AT1 receptor, down-regulate the expression of TNF- α protein and decrease the MPO activity of lung tissue homogenate, and may have preventive and therapeutic effect on ventilator-induced lung injury to some degree.

【Key words】 Mechanical ventilation; ventilator-induced lung injury; Angiotensin II; TNF- α ; Losartan; Rats

呼吸机所致肺损伤 (ventilator-induced lung injury, VILI) 是机械通气最严重的并发症, 研究其发病机理和防治措施对提高机械通气应用水平有重要价值。近年来研究发现, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 不但在急性肺损伤 (ALI) 时炎症反应、氧化应激和细胞凋亡中发挥了重要作用, 而且在 VILI 发病中也具有重要作用^[1-4]。因此, 适当应用血管紧张素 II (Ang II) 受体拮抗剂或血管紧张素转化酶抑制剂对 VILI 应具有一定防治作用。本实验通过观察氯沙坦对机械通气大鼠肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达量及髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性的影响, 探讨氯沙坦对机械通气肺损伤的抗炎保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组与模型制备

健康成年雄性 Wister 大鼠 24 只 (山西医科大学动物中心提供, 合格证号: SXCK (晋) 2009—0001, 清洁级), 体重 300 g ~ 350 g, 随机分为 3 组: ①对照组: 未行机械通气; ②呼吸机致肺损伤组 (VILI 组): 潮气量 40 mL/kg; ③氯沙坦干预组 (LAP 组): 机械通气前 30 min 腹腔注射氯沙坦 30 mg/kg。

大鼠经 25% 的乌拉坦 4 mL/kg 腹腔注射麻醉后行气管切开。除对照组外, 其余大鼠均通过橡胶管与小动物呼吸机 (DH-150 型, 浙江大学医学仪器厂制造) 相连接行机械通气。通气参数: 潮气量 40 mL/kg, 频率 60 次/min, 吸/呼比 1:3, PEEP 为 0, 吸入气体为室内空气, 通气时间为 2 h。

通气结束后, 腹主动脉放血将大鼠处死, 切取肺脏, 肉眼观察肺脏的大体改变, 取右肺中叶用中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 行 HE 染色病理学检查及 TNF- α 免疫组织化学染色检测。取右肺中叶行肺湿/干重 (W/D) 比值测定。取左肺上叶 -20℃ 保存, 用于 Ang II 含量测定。取左肺下叶 -20℃ 保存, 用于 MPO 活性测定。

1.2 肺组织 TNF- α 免疫组织化学染色

采用链霉亲和素-生物素-过氧化物复合物法 (SABC) 对肺泡上皮细胞和细支气管上皮细胞进行 TNF- α 免疫组织化学染色, 具体操作步骤参照试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司) 说明进行。兔抗大鼠抗体工作浓度为 1:100, 以磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。结果判断: 阳性染色为细胞浆内出现棕黄色颗粒。在 400 倍光镜下对每张组织切片随机选取 5 个高倍视野进行观察。采用 BI-2000 医学图像分析系统分别检测每个视野 TNF- α 染色阳性细胞的平均光密度值 (A), 以上述 5 个视野的平均值作为该大鼠细支气管上皮细胞 TNF- α 蛋白表达的相对含量。

1.3 肺组织 W/D 比值测定

取右肺中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), 然后置于烤箱中 60℃ 过夜后再称重 (干重), 计算肺湿/干 (wet/dry, W/D) 比值。

1.4 肺组织匀浆 Ang II 含量检测

将肺组织称重后置于裂解液中, 用组织匀浆机打碎后离心, 取上清液用 ELISA 法测定肺组织中 Ang II 含量。Ang II ELISA 试剂盒由美国 GBD 公司提供, 操作过程严格按试剂说明书进行。先在酶标仪 (Wellscan Mk3, 芬兰) 上测出标准品吸光度并绘制出标准曲线, 然后测定样品吸光度并在标准曲线上读出样品浓度。

1.5 肺组织匀浆 MPO 活性测定

将肺组织称重后制备组织匀浆, 采用髓过氧化物酶检测试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所) 测定肺组织中 MPO 活性。测定方法及操作步骤按试剂盒说明进行。

采用 721 分光光度计进行比色, 波长 460 nm, 光径 1 cm, 蒸馏水调零, 测定各管吸光度值。MPO 活性用酶活力单位表示, 即每克组织蛋白在 37℃ 的反应体系中使 H₂O₂ 分解 1 μ mol 为 1 个酶活力单位。

1.6 统计学方法

全部数据以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析,组间差异比较采用方差分析,各组均数间两两比较用 SNK-q 检验,相关性分析采用直线相关分析法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变

HE 染色光镜下观察,对照组大鼠肺泡结构和各级支气管上皮完整,肺间质无明显炎症细胞浸润。VILI 组大鼠可见弥漫性肺间质水肿和炎症细胞浸润,肺泡间隔增厚,部分肺泡破裂融合,小血管断裂,肺泡腔内有血性液体渗出。LAP 组大鼠也可见到肺间质水肿和炎症细胞浸润,但较 VILI 组明显减轻(图 1~3 见彩插 5)。

2.2 肺湿/干比值测定结果

各组大鼠肺湿/干重比值(W/D)测定结果见表 1。结果显示,VILI 组大鼠肺 W/D 比值均明显高于对照组和 LAP 组(均 $P < 0.01$);VILI 组与对照组比较无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 肺组织 Ang II 含量检测结果

各组大鼠肺组织匀浆中 Ang II 含量检测结果见表 1。结果显示,VILI 组和 LAP 组大鼠肺组织匀浆中 Ang II 含量均明显高于对照组(均 $P < 0.01$),VILI 组与 LAP 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 肺组织 TNF-α 免疫组织化学染色测定结果

各组大鼠肺组织细支气管上皮细胞 TNF-α 免疫组织化学染色测定结果见表 1 和图 4~6,(图 1~6 见彩插 5)。结果显示,VILI 组大鼠肺组织 TNF-α 表达水平明显高于对照组和 LAP 组(均 $P < 0.01$);LAP 组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 大鼠肺组织匀浆中 MPO 活性测定结果

各组大鼠肺组织匀浆中 MPO 活性测定结果见表 1。结果显示,VILI 组大鼠肺组织匀浆中 MPO 活性明显高于对照组和 LAP 组(均 $P < 0.01$);LAP 组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 肺组织 TNF-α 蛋白表达与 Ang II 含量的相关性分析

相关分析结果表明,对照组与 VILI 组大鼠肺组织 TNF-α 蛋白表达与肺组织 Ang II 含量之间呈正相关($r = 0.681, P < 0.05$)。

表 1 各组肺湿/干比重、Ang II 含量、TNF-α 表达水平及 MPO 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of W/D, Ang II content, TNF-α level and MPO activity in all groups($\bar{x} \pm s$)

检测指标 (Indexes)	对照组 (Control group)	VILI 组 (VILI group)	LAP 组 (LAP group)
例数 n	8	8	8
肺湿/干比重 (W/D)	4.389 ± 0.065	8.546 ± 0.374 [*]	4.711 ± 0.194 [#]
Ang II 含量 (Ang II content)	112.051 ± 7.777	451.159 ± 19.803 [*]	457.660 ± 15.660 ^{##}
TNF-α 水平 (TNF-α level)	0.133 ± 0.017	0.655 ± 0.029 [*]	0.166 ± 0.023 [#]
MPO 活性 U/L (MPO activity)	1.638 ± 0.027	6.762 ± 0.423 [*]	1.677 ± 0.026 [#]

注:与对照组比较:^{*} $P < 0.01$;与 VILI 组比较:[#] $P < 0.01$;与对照组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

NOTE: ^{*} $P < 0.01$, compared with the control group; [#] $P < 0.01$, compared with the VILI group; ^{##} $P < 0.01$, compared with the control group.

3 讨论

近年来,肾素-血管紧张素系统(RAS)在急性肺损伤中的作用引起了人们的广泛关注。大量研究表明,RAS 主要成分-Ang II 及其受体活性与急性肺损伤的发生密切相关^[1-3]。Ang II 作为一种致炎因子可调控多种炎症细胞因子如 TNF-α、IL-1、IL-6 及 IL-8 等在肺组织中表达,是引起急性肺损伤的重要原因之一。Ruiz-Ortega 等^[5]研究发现,ALI 时多种炎症细胞在肺内募集、活化,通过激活 RAS 产生大量 Ang II。后者又可加剧肺部炎症反应,从而形成恶性循环,最终导致肺组织损伤^[6]。

研究证实,RAS 在 VILI 发病中也具有重要作用^[7]。机械通气可直接或间接激活 RAS 系统,使其效应物质 Ang II 表达增多。Ang II 通过激活炎症细胞产生一系列炎症细胞因子,这些炎症细胞和细胞因子相互作用,构成庞大而复杂的网络体系,是引起肺生物伤的主要原因^[5]。

在众多的细胞因子中,TNF-α 是炎症反应中最主要的促炎因子,可介导急性肺损伤时中性粒细胞在肺部聚集和活化,并启动炎症反应级联放大效应。研究表明^[8],在机械通气肺损伤早期即可出现 TNF-α 高表达,提示 TNF-α 可能是引起炎症反应的始动因素。然而,TNF-α 表达是通过何种途径来调控的目前尚不完全清楚。本实验结果显示,VILI 组大鼠肺组织 Ang II 含量及 TNF-α 水平表达明显高于对照组,而且 TNF-α 蛋白表达与 Ang II 含量呈正

相关。说明 Ang II 作为肺部炎症反应复杂网络中的一个关键物质,对调控 TNF- α 表达有重要作用。

目前认为,Ang II 介导肺部炎症反应的主要受体是 AT1 受体^[7]。动物实验研究表明,在各种原因所致的急性肺损伤中,肺组织中 Ang II 及其受体 AT1 的表达水平均显著增高^[3,9,10,]。因此我们推测,Ang II 所介导的 VILI 发病过程有可能是通过 AT1 受体来实现的,因此,阻断 Ang II 与 AT1 结合对防治 VILI 发生至关重要。

氯沙坦是一种二苯四咪唑类 AT1 型受体拮抗剂,具有选择性好,特异性高等特点,可特异性阻断 Ang II 与 AT1 结合而发挥拮抗作用。研究表明,氯沙坦不仅具有抗炎作用,而且还有抗氧化和防止细胞凋亡等作用^[10,11]。本实验结果显示,氯沙坦干预组大鼠肺组织 Ang II 含量与 VILI 组比较无明显差异,但肺组织 TNF- α 蛋白表达水平、肺组织匀浆中 MPO 活性和肺 W/D 比值均较 VILI 组明显降低,同时,肺组织病理损伤程度也较 VILI 组明显减轻。说明氯沙坦可通过阻断 Ang II 与 AT1 受体结合而抑制 TNF- α 的表达,减轻肺组织炎症性损伤,对 VILI 具有一定保护作用。

综上所述,Ang II 通过调控肺组织中 TNF- α 的表达在 VILI 发病中起着重要作用,氯沙坦可阻断 Ang II 与 AT1 受体的结合,抑制 TNF- α 的表达,对 VILI 具有一定防治作用,但 Ang II 通过何种信号转导途径来调控 TNF- α 表达尚有待深入研究。

参考文献:

- [1] Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC, et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(1):156 - 164.
- [2] Raiden S, Pereyra Y, Nah mod V, et al. Losartan, a selective inhibitor of subtype AT1 receptors for angiotensin II, inhibits neutrophil recruitment in the lung triggered by fMLP [J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 68(5):700 - 706.
- [3] Lukarinen H, Laine J, Lehtonen J, et al. Angiotensin II receptor blockade inhibits pneumocyte apoptosis in experimental meconium aspiration [J]. *Pediatr Res*, 2004, 55(2):326 - 333.
- [4] Yao SL, Feng D. Losartan attenuates ventilator-induced lung injury [J]. *J surg Res*, 2008, 145(1):25 - 32.
- [5] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, et al. Proinflammatory actions of angiotensin [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001, 10(3):321 - 329.
- [6] 刘玲, 邱海波, 杨毅, 等. 血管紧张素 II-血管紧张素 II 1 型受体途径在介导肺部炎症反应中的作用 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2007, 16(6):601 - 605.
- [7] Wösten-van Asperen RM, Lutter R, haitsma JJ, et al. ACE mediates ventilator-induced lung injury in rats via angiotensin II but not bradykinin [J]. *Eur Resp J*. 2008, 31(2):363 - 371.
- [8] 谢丽娟, 朱晓东, 沈艺, 等. TNF- α 和 IL-8 在幼兔机械通气肺损伤炎症反应中的作用 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2005, 25(4):392 - 395.
- [9] Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure [J]. *Nature*, 2005, 436(7047):112 - 116.
- [10] Raiden S, Nah mod K, Namod V, et al. Nonpeptide antagonists of AT1 receptor for Angiotensin II delay the onset of acute respiratory distress syndrome [J]. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002, 30(1):45 - 51.
- [11] 沈利汉, 莫红缨, 蔡立华. 氯沙坦对血管内皮细胞凋亡的影响 [J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(16):973 - 975.
- [1] Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC, et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury [J]. *Am J*

[修回日期]2012-02-10