

# 自噬对脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤的影响

张文龙,张培茂,朱月浩,阴文超,高华萍,刘文值  
(攀枝花学院附属医院麻醉科,四川攀枝花 617000)

**[摘要]** **目的** 研究自噬对脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤的影响。**方法** 将 48 只 SD 大鼠平均分为 4 组:(1)生理盐水对照组(NS 组);(2)脂多糖(LPS)模型组(L 组);(3)LPS+自噬组(L+A);(4)LPS+自噬抑制组(L+I)。血气分析检测动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、动脉二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)和 pH 值;计算肺组织干湿比;HE 染色观察肺组织病理学变化并进行肺损伤评分;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清和肺泡灌洗液中微管关联蛋白 LC3b、髓过氧化物酶(MPO)、巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)、白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达。**结果** 与 NS 组比较,L 组动脉血 PaO<sub>2</sub>、pH 值降低,PaCO<sub>2</sub> 升高( $P<0.05$ );与 L 组相比,L+A 组动脉血 PaO<sub>2</sub>、pH 值上升,PaCO<sub>2</sub> 下降( $P<0.01$ );L+I 组动脉血 PaO<sub>2</sub>、pH 值降低,PaCO<sub>2</sub> 升高( $P<0.01$ ),差异具有统计学意义。L 组和 L+I 组血清和肺泡灌洗液中 LC3b 水平降低,MPO、MIP-2、IL-1β 和 TNF-α 水平均升高,而 L+A 组正好相反。**结论** 自噬对脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤起到改善或保护作用。

**[关键词]** 自噬;脂多糖;急性肺损伤;抗炎;肺保护

**[中图分类号]** R563

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)20-2756-04

## Influence of autophagy on rat acute lung injury induced by lipopolysaccharide

Zhang Wenlong, Zhang Peimao, Zhu Yuehao, Yin Wenchao, Gao Huaping, Liu Wenzhi

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the influence of autophagy on lipopolysaccharide(LPS) induced acute lung injury(ALI). **Methods** Forty-eight Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups, 12 cases in each group: (1) normal saline control group (NS), (2) LPS model group (L), (3) LPS and autophagy group (L + A) and (4) LPS and autophagy inhibition group (L+I). Arterial blood samples was obtained for detecting the blood gas, including PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> and pH, and the lung tissue dry/wet ratio was calculated. The HE staining was used to observe the histopathological changes of lung tissue. Moreover the lung lesion score was performed; the expression of microtubule associated protein, light chain protein 3b(LC3b), myeloperoxidase(MPO), macrophage inflammatory protein 2(MIP-2), interleukin-1β(IL-1β) and tumor necrosis factor-α(TNF-α) in serum and bronchoalveolar lavage fluid(BALF) was assessed by ELISA. **Results** Compared with the NS group, arterial blood PaO<sub>2</sub> and pH in the group L were decreased and PaCO<sub>2</sub> was increased ( $P<0.05$ ); compared with the L group, the arterial blood PaO<sub>2</sub> and pH in the L+A group were increased and PaCO<sub>2</sub> was declined ( $P<0.01$ ), the arterial blood PaO<sub>2</sub> and pH in the L+I group were decreased and PaCO<sub>2</sub> was elevated, the differences were statistically significant ( $P<0.01$ ). The LC3b concentration in serum and BALF in the L group and L+I group was declined, while MPO, MIP-2, IL-1β and TNF-α concentrations were increased, while which in the L+A group were just the opposite. **Conclusion** Autophagy plays a improvement and protective effect on LPS induced acute lung injure in rat.

**[Key words]** autophagy; lipopolysaccharide; acute lung injury; anti-inflammation; lung protection

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由多种炎性介质及效应细胞共同参与,多发病环节介导,呈级联放大的瀑布样炎症,多继发弥漫性肺实质损伤和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)<sup>[1]</sup>。ALI 常恶化为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),二者均表现为弥漫性肺泡实质损伤和急性、进行性呼吸窘迫以及顽固性低氧血症,本质是失控的炎性反应。虽对 ALI 进行了大量研究,但病死率仍达 40%~70%,若伴有脓毒症则更高<sup>[2-4]</sup>。自噬(autophagy)即细胞质内大分子物质(如脂质、微生物等)被转运至溶酶体进行水解,包括微自噬(microautophagy)、巨自噬(macroautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)<sup>[5-7]</sup>。微自噬主要是溶酶体膜直接包裹长寿命蛋白,并在溶酶体内降解<sup>[8]</sup>;巨自噬则由内质网来源的膜包裹待降解物形成自噬体(autophagosome),再与溶酶体融合而降解其内容物<sup>[9-10]</sup>;CMA 胞质内蛋白结合分子伴侣后被转运到溶酶体腔,然后被消化为可溶的蛋

白质分子<sup>[11]</sup>。在缺氧、应激及损伤情况下,自噬亦表现为抗炎和细胞保护作用<sup>[12-14]</sup>。本研究以脂多糖诱导大鼠 ALI,探索自噬在 ALI 中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 由攀枝花学院医学院实验动物中心提供的健康清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,体质量(250±30)g,2.5~3.0 月龄,按随机、对照原则分为 4 组( $n=12$ ):即生理盐水对照组(NS 组);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)模型组(L 组);LPS+自噬组(L+A);LPS+自噬抑制组(L+I)。

**1.2 仪器与试剂** 大肠杆菌内毒素 LPS(L2880, Sigma); LC3b、髓过氧化物酶(MPO)、巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)、白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司);苏木素染液(碧云天)。MK3 型酶标仪(赛默飞仪器有限公司);德国 Effendorf 5810R 离心机;BX40F4 型光学显微镜(Olympus, 日本);AxioCam ERC5s 成像系统(德国蔡司);自动血气分析仪(Stat Profile pHox, Nova

Biomedical 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组方法 采用随机数字法将 48 只大鼠平均分为 4 组,各组大鼠分别以 10%水合氯醛经腹腔注射麻醉(4 mL/kg),固定大鼠,无菌操作下作颈部正中切口使气管暴露,按各组要求滴注相关药物:(1)NS 组:气管滴注 0.9%氯化钠注射液 5 mg;(2)L 组:气管滴注 LPS 2.5 mg+0.9%氯化钠注射液 2.5 mg;(3)L+A 组:气管滴注 LPS 2.5 mg+雷帕霉素 2.5 mg;(4)L+I 组:气管滴注 LPS 2.5 mg+3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA)2.5 mg。注入后迅速将动物直立并旋转,使药液均匀分布在肺中,待大鼠呼吸平稳后缝合伤口。注射 0.9%氯化钠注射液、LPS 及相关药物 24 h 后,收集标本。

1.3.2 标本采集 经颈部正中切开皮肤,逐层分离肌肉,暴露气管,用 16 号气管导管进行插管,固定后用预冷的 PBS 进行肺泡灌洗,收集肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),4℃ 1 300 r/min 离心 10 min,收集上清液,-80℃ 保存。经腹部正中切开皮肤,逐层分离肌肉,暴露胸膜;剪破胸膜,打开胸腔,暴露心脏和肺,左心室取血,进行血气分析并离心取上清液 4℃ 1 800 r/min 离心 10 min,-80℃ 保存。分离肺组织,取右肺上叶进行干湿比检测,右肺中叶用 10%中性多聚甲醛固定行 HE 染色,冰面上取左肺置液氮中速冻后放入 -80℃ 低温冰箱保存备用。

1.4 检测指标

1.4.1 肺组织干湿比 取出右肺上叶,滤纸吸干表面水分,置入一洁净的小玻璃瓶中,精确称取湿重(W)后,置 75℃ 恒温烤箱中,烘烤 24 h 至恒重后测定肺组织干重(D),计算 W/D 以评估肺组织的水肿程度。

1.4.2 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色 取右肺中叶用 10%中性甲醛固定 24 h 后,脱水、透明、浸蜡、石蜡包

埋、切片(厚度 4 mm),HE 染色。光镜下观察肺组织病理学变化并进行病理学评分。评分标准:对肺泡充血(alveolar congestion)、出血(hemorrhage)、肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润或聚集(PMN)、肺泡壁增厚和(或)透明膜形成(transparent membrane)4 项指标,分别根据病变轻重评 0~4 分。0 分:无病变或病变非常轻微;1 分:轻度病变;2 分:中度病变;3 分:重度病变;4 分:极重度病变。各项评定分数相加为 ALI 病理学总评分。

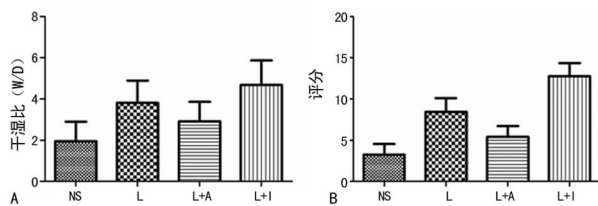
1.4.3 动脉血气分析 测定动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、动脉二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)和 pH 值。

1.4.4 血清和 BALF 微管关联蛋白 LC3b、MPO、MIP-2、IL-1β、TNF-α 检测 用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 LC3b、MPO、MIP-2、IL-1β 和 TNF-α 的水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多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 各组大鼠肺干湿比 与 NS 组比较,L 组大鼠的肺组织干湿比增加;与 L 组比较,L+A 组肺组织干湿比下降,L+I 组肺组织干湿比增加(图 1)。



A: 各组大鼠肺干湿比比较; B: 各组 HE 染色病理学评分比较。  
图 1 大鼠肺干湿比及 HE 病理染色评分比较

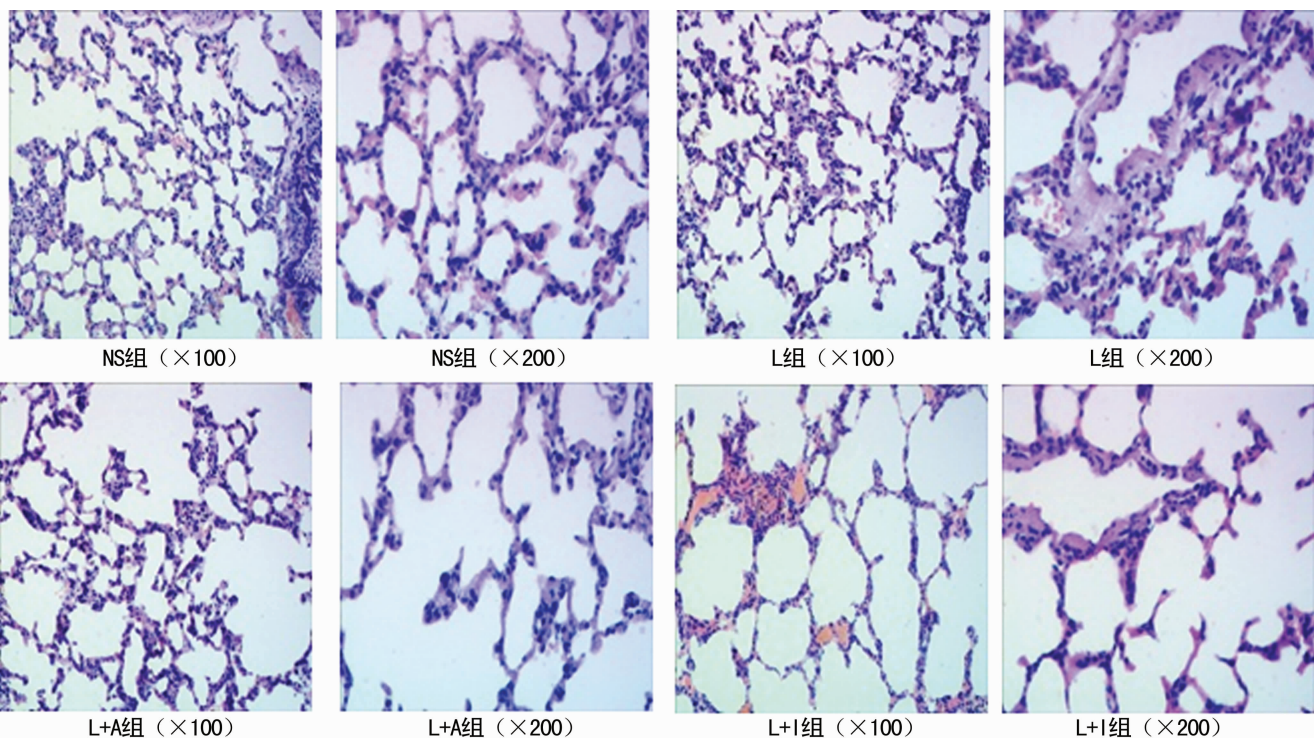


图 2 肺组织 HE 染色病理切片

2.2 HE 染色、ALI 病理学评分比较 与 NS 组比较,L 组

ALI 评分升高(*P*<0.01)。与 L 组比较,L+A 组 ALI 评分降

低( $P < 0.05$ ),而 L+I 组评分较 L+A 组高( $P < 0.01$ ),见图 2。光镜下见 NS 组肺泡结构完整,大小均匀,肺泡腔清晰、壁薄,未见肺水肿和炎性细胞浸润。L 组肺泡腔变窄,肺间质及肺泡腔内有充血、水肿细胞和炎性细胞浸润。L+A 组肺泡腔轻度扩大,肺间质及肺泡腔内少量红细胞和炎性细胞浸润,轻度充血水肿。L+I 组肺泡结构破坏,肺泡腔更窄,肺泡间隔明显增厚,肺间质及肺泡充血、水肿、大量炎性细胞浸润,且肺泡腔内有大量的红细胞及渗出物,HE 染色结果见图 2。

**2.3 动脉血气分析** 各组大鼠间的动脉血气分析差异有统计学意义,其中 L 组和 L+I 组  $\text{PaCO}_2$  显著升高、 $\text{PaO}_2$  和 pH 值降低,可能与肺部损伤较严重有关;而 L+A 组大鼠的  $\text{PaCO}_2$  降低、 $\text{PaO}_2$  升高和 pH 值相对升高,自噬的参与可能缓解了 ALI 的炎症和病理改变,起到肺保护的作用。

**2.4 大鼠血清和 BALF 的炎性因子水平** 通过 ELISA 试剂

盒的检测,大鼠血清和 BALF 的 LC3b、MPO、MIP-2、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平 L+I 组增加明显,而 L+A 组下降。由此可见,L 组炎性反应最重,L+I 组次之,L+A 组较轻,NS 组则最轻(图 4~6)。

表 2 各组大鼠  $\text{PaO}_2$ 、 $\text{PaCO}_2$ 、pH 值变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	$\text{PaO}_2$ (mm Hg)	$\text{PaCO}_2$ (mm Hg)	pH 值
NS	12	87.92 $\pm$ 6.53	39.25 $\pm$ 5.29	7.32 $\pm$ 0.07
L	12	64.58 $\pm$ 10.19	54.33 $\pm$ 4.91	7.18 $\pm$ 0.09
L+A	12	80.25 $\pm$ 8.42	45.50 $\pm$ 4.62	7.25 $\pm$ 0.07
L+I	12	46.00 $\pm$ 7.54	61.58 $\pm$ 4.45	7.11 $\pm$ 0.05
F		60.12	44.77	19.21
P		0.00	0.00	0.00

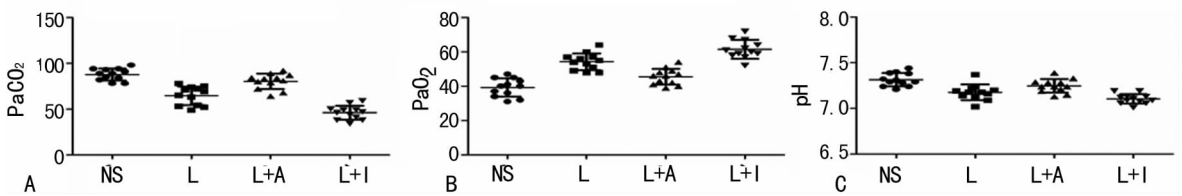
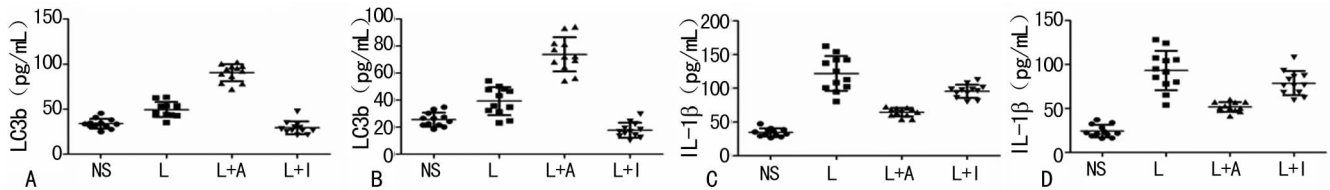
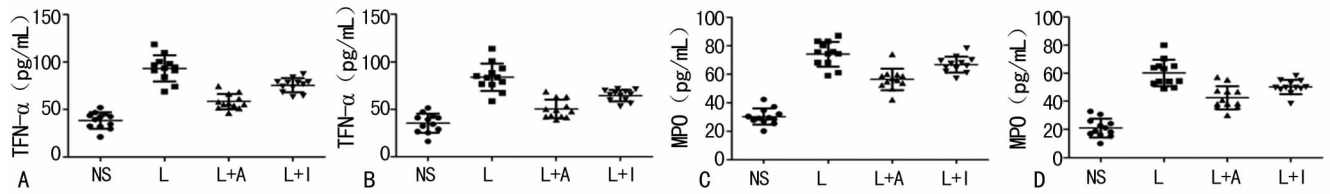


图 3 大鼠动脉血气分析



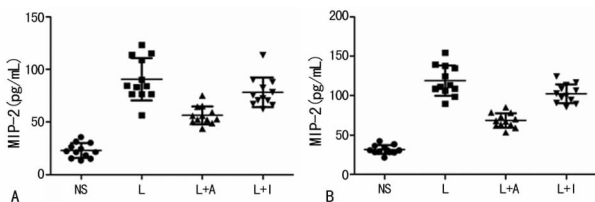
A,C: 血清; B,D: BALF。

图 4 大鼠 BALF 及血清 LC3b、IL-1 $\beta$  表达



A,C: 血清; B,D: BALF。

图 5 大鼠 BALF 及血清 TNF- $\alpha$ 、MPO 的表达



A: BALF; B: 血清。

图 6 大鼠 BALF 及血清 MIP-2 的表达

### 3 讨论

ALI 或 ARDS 为临床常见的危重症,主要引起肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤,造成弥漫性肺间质及肺泡水肿,以肺容积减少、肺顺应性降低、通气/血流比例失调最为常见,导致急性或持续性呼吸功能不全。在缺氧、应激及各种损

伤等情况下,细胞通过自噬维持着细胞及周边的内环境和稳态。自噬可能通过相关的信号通路,如 MAPK、NLRP3 炎症小体和核因子(NF)- $\kappa$ B 等激活细胞内趋化因子、炎症介质及细胞因子的释放,起到调控炎症发生发展的作用<sup>[15-16]</sup>。而自噬在细胞成分更新、保持旺盛的生理状态和维持细胞稳态方面以及肿瘤、心脑血管、自身免疫和神经退化性等疾病中扮演的重要角色已为大家所熟知。在 LPS 诱导的 ALI 模型中,主要通过 TLR4 诱导自噬生成,与受体相关蛋白-Toll 样受体相关的干扰素活化,及线粒体活化蛋白激酶 p38 有密切关系<sup>[7]</sup>。由此推测,在各种原因所致的肺损伤中自噬也发挥重要作用。有研究显示<sup>[17]</sup>,自噬在线粒体氧化磷酸化障碍导致的三磷酸腺苷(ATP)合成不足和活性氧聚集导致的肺损伤中也发挥重要作用,但具体机制尚不清楚。本研究通过 LPS 诱导 ALI 模型的

建立,分别经气管给予促进大鼠肺泡细胞自噬作用的雷帕霉素及抑制肺泡细胞自噬作用的 3-甲基腺嘌呤处理。对比发现,经雷帕霉素处理的大鼠肺组织水肿较其他组明显减轻,干湿比有所下降,肺泡腔轻度扩张,炎性细胞浸润减弱,肺间质充血及水肿等病理评分,较 3-甲基腺嘌呤抑制自噬处理后的大鼠肺组织病理评分更低。雷帕霉素属于新型大环内酯类抗生素,主要用于抗真菌的治疗,同时它可通过不同的细胞因子阻断淋巴细胞等免疫信号的传导,从而具备免疫抑制的功能,起到降低机体炎性反应的目的,一定程度上促进了自噬的发生。3-甲基腺嘌呤作为抑制自噬的常规药物,已在科研中得到广泛应用。微管关联蛋白 LC3b 是目前公认的自噬分子标记抗体,在自噬中扮演重要作用。从 4 组大鼠 BALF 及血清 ELISA 检测可知,雷帕霉素处理后的 LPS 模型中 LC3b 明显升高,且 MPO、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子表达均显著降低(接近于未经 LPS 处理的对照组)。同时,血气分析提示经雷帕霉素处理后的 LPS 模型组氧分压更高,二氧化碳分压接近正常值,对机体的酸碱内环境影响更小。不难看出,经雷帕霉素处理后,大鼠自噬作用增强,对 ALI 起到明显的改善或保护作用,为临床干预或治疗 ALI/ARDS 拓展了新的视野。

#### 参考文献

[1] Monahan LJ. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2013, 43(10): 278-284.

[2] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(21): 2063.

[4] Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(7): 1027-1035.

[5] Leikauf GD, McDowell SA, Wesselkamper SC, et al. Acute lung injury: functional genomics and genetic susceptibility [J]. *Chest*, 2002, 121(3 Suppl): 70-75.

[6] Moran M, Delmiro A, Blazquez A, et al. Bulk autophagy, but not mitophagy, is increased in cellular model of mitochondrial disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842

(7): 1059-1070.

[6] Gomes LC, Scorrano L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(1): 205-212.

[8] 王星童,李恒宇,夏照帆. 自噬与脓毒症肺损伤间关系的研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2014, 30(4): 325-328.

[9] Valdor R, Macian F. Autophagy and the regulation of the immune response [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(6): 475-483.

[10] Ahang J. Autophagy and mitophagy in cellular damage control [J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 19-23.

[11] Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis [J]. *Biol Chem*, 2012, 393(7): 547-564.

[12] Lu SZ, Harrison-Findik DD. Autophagy and cancer [J]. *World J Biol Chem*, 2013, 4(3): 64-70.

[13] Oka T, Hikoso S. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure [J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 251-255.

[14] Bernard NJ. Connective tissue diseases: How do autoreactive B cells survive in SLE--autophagy? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(3): 128.

[15] Takeda W, Kitada M, Kanasaki K. SIRT1 inactivation induces inflammation through the dysregulation of autophagy in human THP-1 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(1): 191-196.

[16] Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(3): 222-230.

[17] Zhao W, Li YL, Jia LX, et al. Atg5 deficiency-mediated mitophagy aggravates cardiac inflammation and injury in response to angiotensin II [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014 (69): 108-115.

(收稿日期: 2015-12-21 修回日期: 2016-03-05)

## 统计资料类型

统计资料共有三种类型: 计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。