

脂氧素 A₄ 对急性肺损伤肺泡上皮通透性及 claudin - 4 蛋白的影响

杨 艺 程 杨 肖 继 王德明

摘 要 **目的** 探讨脂氧素 A₄ (lipoxin A₄, LXA₄) 对内毒素性急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 肺泡上皮通透性及 claudin - 4 蛋白的影响。**方法** 通过尾静脉注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 制作大鼠内毒素性急性肺损伤模型, 并予以脂氧素 A₄ 治疗。测定各组大鼠肺泡上皮的通透性, 观察肺组织形态学变化, 检测肺组织湿干重比 (wet to dry weight ratio, W/D), 以及测定 claudin - 4 蛋白含量。**结果** 与内毒素损伤组相比, 脂氧素 A₄ 组可显著降低肺泡上皮通透性, 改善肺组织形态, 降低 W/D, 上调 claudin - 4 蛋白表达水平。**结论** 脂氧素 A₄ 可降低急性肺损伤大鼠肺泡上皮通透性, 减轻肺水肿, 其机制可能与其上调 claudin - 4 蛋白表达水平有关。

关键词 急性肺损伤 脂氧素 A₄ 肺泡上皮通透性 claudin - 4

中图分类号 R332; R563

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.011

Effect of Lipoxin A₄ on Alveolar Epithelial Permeability and Protein Expression of Claudin - 4 in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide Yang Yi, Cheng Yang, Xiao Ji, et al. Department of Anesthesiology of the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hunan 421001, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of lipoxin A₄ on alveolar epithelial permeability and protein expression of claudin - 4 in lipopolysaccharide (LPS) - induced acute lung injury (ALI). **Methods** Rats were injected LPS via tail vein to establish the model of ALI. Lipoxin A₄ was given at 6 hour after LPS injection. Alveolar epithelial permeability was evaluated by measuring bronchoalveolar lavage fluid and serum concentrations of evens blue. Lung injury was observed histologically in hematoxylin and eosin (HE) stained tissue sections, and the lung tissue mass alteration was measured by wet to dry weight ratio (W/D). Protein expression level of claudin - 4 was determined by western blot analysis. **Results** After lipoxin A₄ treatment, alveolar epithelial permeability, lung injury and W/D were significantly decreased compared with ALI rats. Protein expression level of claudin - 4 decreased in ALI rats and could increase significantly after lipoxin A₄ treatment. **Conclusion** Lipoxin A₄ could decrease alveolar epithelial permeability and alveolar fluid in ALI rats. The mechanism might be due to up - regulate protein expression of claudin - 4.

Key words Acute lung injury; Lipoxin A₄; Alveolar epithelial permeability; Claudin - 4

急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征是临床常见危及重症, 病死率极高, 其以肺泡上皮屏障损伤所致的肺水肿为主要病理特征。紧密连接是肺泡上皮屏障重要的结构基础。claudin 蛋白作为紧密连接的关键蛋白, 其蛋白表达可调节肺泡上皮的通透性, 从而影响肺水肿的发生及消退^[1]。

脂氧素是炎症反应过程中产生的重要内源性抗炎促炎性消退介质, 称之为炎症反应的刹车信号^[2]。笔者已经发现脂氧素 A₄ 可通过上调肺泡上皮细胞离子通道蛋白表达水平增加肺泡液体清除, 促进肺水肿

消退, 减轻急性肺损伤^[3]。脂氧素 A₄ 治疗急性肺损伤的作用是否与肺泡上皮屏障有关, 以及其对 claudin 蛋白的作用机制还不明确。因此, 本研究通过建立大鼠内毒素性急性肺损伤模型, 探讨脂氧素 A₄ 对肺泡上皮通透性及 claudin - 4 蛋白表达的影响。

材料与方法

1. 主要材料及试剂: Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠, 体重 200 ~ 300g, 购自上海 SLAC 实验动物公司, 脂多糖 (E. coli serotype 055: B5) 及伊文思蓝购自美国 Sigma 公司, 脂氧素 A₄ 购自美国 Cayman 公司, claudin - 4 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

2. 实验分组: 将大鼠随机分为 3 组, 每组 8 只: ①空白对照组 (大鼠仅给予相应溶剂); ② LPS 组 (大鼠尾静脉注射 LPS: 20mg/kg); ③ LPS + LXA₄ 组 (大鼠

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81301625)

作者单位: 421001 衡阳, 南华大学附属第二医院麻醉科 (杨艺、肖继、王德明); 421001 衡阳市中心医院麻醉科 (程杨)

通讯作者: 杨艺, 电子信箱: 418860691@qq.com

尾静脉注射 LPS 后 6h, 经尾静脉给予 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ LXA_4 , 继续作用 1h)。

3. 肺泡上皮通透性的测定: 各组大鼠给予相关药物后, 经尾静脉注入 2% 伊文思蓝 $20\text{mg}/\text{kg}$ 。1h 后, 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 将大鼠固定, 切断腹主动脉, 放血处死动物, 留取动脉血 2ml 备用, 打开胸腔, 钳夹右肺门, 将气管导管插入左主支气管, 用注射器取 2ml 生理盐水经气管导管注入左肺, 然后反复抽吸 10 次, 最后将回抽的灌洗液备用。将上述动脉血经离心后取上清液 $10\mu\text{l}$ 并稀释至 1ml, 在紫外分光光度计 (波长 632nm) 下测定两种液体吸光度, 根据结果计算两者伊文思蓝浓度及比值, 从而反映肺泡上皮通透性。

4. 肺组织病理检测: 固定于 10% 甲醛的右肺组织脱水后包蜡, 并制作成 $3\mu\text{m}$ 厚度的切片。经苏木素 & 伊红染色 (HE 染色) 后, 显微镜下观察。

5. 肺组织湿干比 (W/D) 检测: 取部分右肺组织经 PBS 漂洗, 用滤纸吸干表明水分后, 称重得肺湿重; 然后将其置于 60°C 烤箱中烘烤 48h 再次称重得肺干重。两者比值即为 W/D。

6. Western blot 法检测肺组织中 claudin-4 蛋白表示水平: 肺组织经研磨后离心, 提取上清液, 应用

BCA 法测定总蛋白含量。每个样品槽内 $20\mu\text{l}$ 样本进行 SDS-PAGE 电泳, 通过电转印法将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶上转移 PVDF 膜上, 转印后的 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉 37°C 封闭 2h 后加入一抗, 4°C 过夜, TBST 洗膜后加入二抗, 37°C 孵育 2h, TBST 洗膜, 增强化学发光法检测。Alpha Ease FC 软件对结果进行定量分析。

7. 统计学方法: 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 Graph Pad Prism 5 软件进行分析处理, 多组样本均数比较进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析。方差齐性者两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者进行 Dunnett's T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺组织切片形态学变化: 光镜结果显示, 空白对照组中肺泡腔大小均匀, 结构完整, 肺泡壁薄, 肺泡隔微血管无充血、淤血, 肺泡腔及间质内无出血、水肿及炎性细胞浸润。LPS 组肺泡腔变窄, 渗出物较多, 肺泡壁增厚, 肺间质充血、水肿、炎性细胞浸润。LPS + LXA_4 组上述变化明显减轻, 见图 1。各组 HE 染色肺组织损伤评分数据图见图 2。

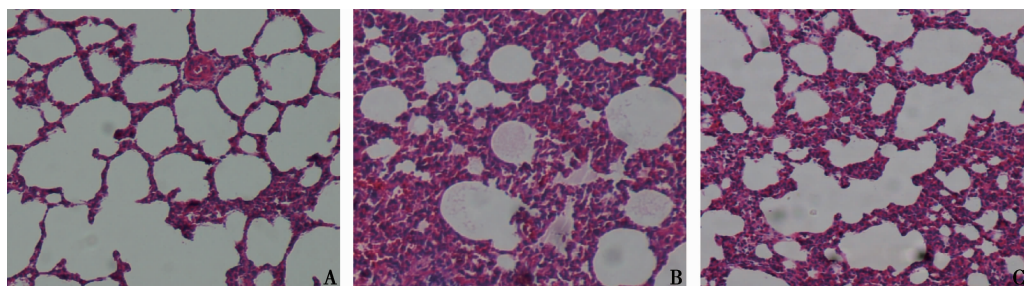


图 1 肺组织形态学变化 (HE, $\times 100$)

A. 空白对照组; B. LPS 组; C. LPS + LipoxinA₄ 组

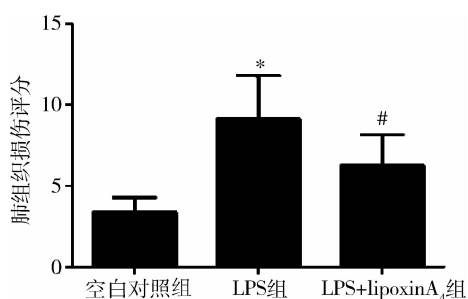


图 2 肺组织损伤评分

与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, # $P < 0.05$

2. 肺组织湿干重比 (W/D): 与空白对照组相比,

LPS 组大鼠肺组织湿/干重比明显增加 ($P < 0.05$); LPS + LXA_4 组肺组织湿/干重比较 LPS 组明显降低 ($P < 0.05$)。空白对照组、LPS 组和 LPS + lipoxinA₄ 组 W/D 值分别为 4.838 ± 0.339 、 6.838 ± 0.387 和 5.200 ± 0.255 。

3. 肺泡上皮通透性: 肺泡灌洗液与血清伊文思蓝浓度的比值反映肺泡上皮通透性, 该比值越大, 表示血液中越多的伊文思蓝经肺泡上皮屏障进入肺泡腔, 肺泡上皮通透性越大。以空白对照组的肺泡灌洗液与血清伊文思蓝浓度的比值为基础值, 各组肺泡上皮通透性见图 3。

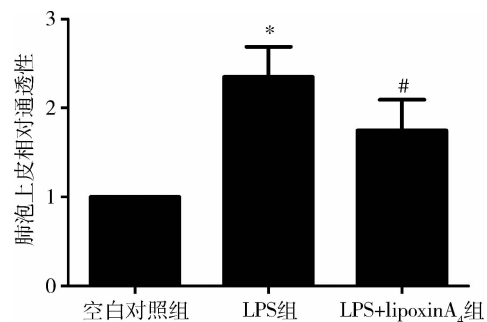


图3 肺泡上皮通透性

与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, # $P < 0.05$

4. claudin - 4 蛋白表示水平: 与空白对照组相比, LPS 组大鼠肺组织 claudin - 4 蛋白表示水平显著下降 ($P < 0.05$); LPS + LXA₄ 组 claudin - 4 蛋白表示水平较 LPS 组显著升高 ($P < 0.05$), 详见图 4。

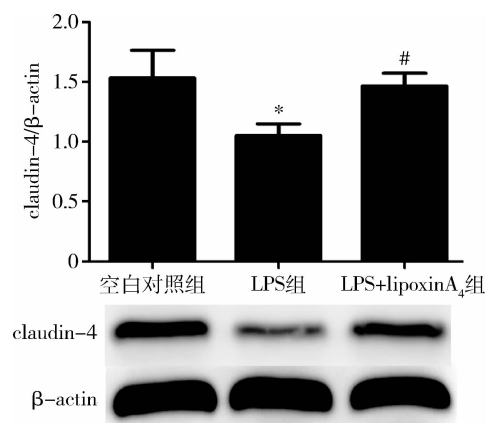


图4 肺组织 claudin - 4 蛋白表示水平

与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, # $P < 0.05$

讨 论

急性肺损伤/急性呼吸窘迫症是一种严重威胁生命的临床综合征, 目前其临床治疗效果并不理想^[4]。急性肺损伤时, 肺泡上皮紧密连接破坏, 肺泡上皮通透性增加, 液体漏入肺泡腔, 导致肺泡水肿液增加, 肺部气体交换功能减弱。减少肺泡水肿液, 对提高肺组织的氧合能力, 改善肺功能, 降低肺组织纤维化, 提高生存率有着重要意义^[5]。尽管有研究证实某些药物如 β 受体激动剂可减少急性肺损伤实验动物肺泡水肿液, 但在一项临床多中心研究中发现其反而增加 ARDS 患者病死率, 究其原因可能与急性肺损伤时机体复杂的炎症反应有关^[4,6]。

脂氧素是炎症消退过程中产生的内源性抗炎促炎症消退介质, 能调节促炎/抗炎因子的平衡, 限制炎症损伤; 促进损伤组织的修复, 防止损伤组织纤维化; 促进中性粒细胞及时凋亡, 促进单核 - 吞噬细胞的趋

化和巨噬细胞对凋亡中性粒细胞的清除等促进炎症消退的独特作用, 称之为炎症反应的停止信号和刹车信号^[7,8]。笔者已经发现脂氧素 A₄ 可减少炎症介质释放, 上调肺泡上皮细胞离子通道, 增加肺泡液体清除^[3,9]。本研究中 LPS 刺激大鼠造成急性肺损伤后给予脂氧素 A₄, 肺水肿减轻, 肺组织结构改善。

肺水肿的消除与肺泡上皮通透性相关, 而肺泡上皮通透性由肺泡上皮间紧密连接调控^[10]。紧密连接由跨膜蛋白、细胞质基质和骨架蛋白构成, 其中跨膜蛋白有 claudin 蛋白家族和 occludin 蛋白。claudin 蛋白胞外结构域可与同型或异型 claudin 蛋白连接, 还能与 occludin 蛋白连接, 从而实现相邻肺泡上皮细胞的连接, 限制离子和溶质的细胞旁通路转运, 调节肺泡上皮的通透性^[11]。在肺泡上皮细胞, claudin - 3、4、18 高度表达, claudin - 4 在气道上皮细胞也有表达^[12]。有研究发现 claudin - 4 蛋白表达水平与肺泡上皮通透性密切相关: 流感病毒可导致 claudin - 4 蛋白减少, 紧密连接受损, 肺泡上皮屏障破坏, 急性肺损伤时产生的 TGF - β 可促使肺泡上皮间质转型 (epithelial to mesenchymal transition, EMT), 导致 claudin 蛋白表达减少, 肺泡上皮通透性增加, 肺泡水肿液增加, 促进 ALI 发展, 基因敲除 claudin - 4 的小鼠更易患急性肺损伤^[13-15]。在移植肺中 claudin - 4 蛋白表达上调, 肺泡上皮通透性降低, 肺水肿减轻^[16]。本研究中笔者进一步发现内毒素可降低肺泡上皮 claudin - 4 蛋白表达水平, 同时增加肺泡上皮的通透性, 给予脂氧素 A₄ 后 claudin - 4 蛋白表示水平上升, 肺泡上皮通透性下降。

综上所述, 在内毒素性急性肺损伤, 内毒素可导致肺泡上皮 claudin - 4 蛋白表示水平下降, 肺泡上皮通透性增加, 肺泡水肿液增加, 脂氧素可能通过上调肺泡上皮 claudin - 4 蛋白表达水平, 降低肺泡上皮通透性, 减轻肺水肿, 从而治疗急性肺损伤。

参考文献

- Schlingmann B, Molina SA, Koval M. Claudins: gatekeepers of lung epithelial function [J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 42(6): 47 - 57
- Uddin M, Levy BD. Resolvins: natural agonists for resolution of pulmonary inflammation [J]. Prog Lipid Res, 2011, 50(1): 75 - 88
- Wang Q, Lian QQ, Li R, et al. Lipoxin A4 activates alveolar epithelial sodium channel, Na⁺, K⁺ - ATPase, and increases alveolar fluid clearance [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(5): 610 - 618
- Smith FG, Perkins GD, Gates S, et al. Effect of intravenous β - 2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI - 2): a multicentre, randomised controlled trial [J]. Lancet, 2012, 379(9812): 229 - 235

(下转第 50 页)

综上所述,本研究通过成功建立 Ang II 诱导的大鼠肾脏炎症损伤模型,发现 FTY720 可以降低肾脏组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6 的表达水平,并且减轻 Ang II 诱导的大鼠肾脏损伤后的蛋白尿,并提高血清白蛋白水平,从而改善肾功能,但 FTY720 减轻 Ang II 诱导的大鼠肾脏损伤的具体机制有待于进一步探讨。

参考文献

- Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005,14(2):125-131
- 马雷雷,孙卫卫,刘忠杰,等. SphK /S1P 信号通路与肾脏炎症研究进展[J]. 医学研究杂志,2012,44(12):170-173
- Markus H, Gräler, Edward J. Goetzl. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptors [J]. FASEB J,2004,18(3):551-553
- Wilson PC, Fitzgibbon WR, Garrett SM, et al. Inhibition of sphingosine kinase 1 ameliorates angiotensin II-induced hypertension and inhibits transmembrane calcium entry via store-operated calcium channel[J]. Mol Endocrinol, 2015,29(6):896-908
- Victoria A, Blaho, Sylvain Galvani, et al. HDL-bound sphingosine-1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation[J]. Nature,2015,523(7560):342-346
- Bajwa A, Rosin DL, Chroscicki P, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-1 enhances mitochondrial function and reduces cisplatin-induced tubule injury[J]. J Am Soc Nephrol,2015,26(4):908-925
- Pitman MR, Woodcock JM, Lopez AF, et al. Molecular targets of FTY720(fingolimod) [J]. Curr Mol Med, 2012,12(10):1207-1219
- 张露,刘必成. 血管紧张素 II 与肾脏血管结构重塑[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2004,24(6):841-844
- 陈朝红,郭啸. 华血管紧张素 II 的致炎作用及机制[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2002,11(3):265-268
- Beatriz SC, Adriana C, Natalia Ri, et al. Nitro-arachidonic acid prevents angiotensin II-induced mitochondrial dysfunction in a cell line of kidney proximal tubular cells[J]. PLoS One,2016,11(3):1-17
- Sun L, Xiao L, Nie J, et al. p66Shc mediates high-glucose and angiotensin II-induced oxidative stress renal tubular injury via mitochondrial-dependent apoptotic pathway[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010,299(5):1014-1025
- 张翠丽,林琳,邹昕,等. 内皮细胞凋亡与动脉粥样硬化[J]. 心血管病学进展, 2007,28(2):235-237
- Xu M, Liu D, Ding LH, et al. FTY720 inhibits tubulointerstitial inflammation in albumin overload-induced nephropathy of rats via the Sphk1 pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014,35(12):1537-1545
- 刘佳丽,刘晓惠. 鞘氨醇激酶信号通路[J]. 中华临床医师杂志, 2016,10(6):886-890
- Martini S1, Krämer S, Loof T, et al. S1P modulator FTY720 limits matrix expansion in acute anti-thy1 mesangioproliferative glomerulonephritis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007,292(6):F1761-1770
- 叶霜,顾越英,沈南,等. FTY720 对 BXSB 小鼠自发性系统性红斑狼疮治疗作用的初步研究[J]. 中华风湿病学杂志,2003,7(7):388-393
- Awad AS, Rouse MD, Khutsishvili K, et al. Chronic sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation attenuates early-stage diabetic nephropathy independent of lymphocytes [J]. Kidney Int, 2011,79(10):1090-1098
- Bajwa A, Jo SK, Ye H, et al. Activation of sphingosine-1-phosphate 1 receptor in the proximal tubule protects against ischemia-reperfusion injury[J]. J Am Soc Nephrol,2010,21(6):955-965

(收稿日期:2016-07-12)

(修回日期:2016-08-02)

(上接第 39 页)

- Levy BD, Serhan CN. Resolution of acute inflammation in the lung [J]. Annu Rev Physiol,2014,76(10):467-492
- Perkins GD, Gao F, Thickett DR. In vivo and in vitro effects of salbutamol on alveolar epithelial repair in acute lung injury [J]. Thorax, 2008,63(3):215-220
- Serhan CN. Resolution phases of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways [J]. Annu Rev Immunol,2007,25(1):101-137
- O'Meara SJ, Rodgers K, Godson C. Lipoxins: update and impact of endogenous pro-resolution lipid mediators [J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol,2008,160(2):47-70
- Yang Y, Cheng Y, Lian QQ, et al. Contribution of CFTR to alveolar fluid clearance by lipoxin A4 via PI3K/Akt pathway in LPS induced acute lung injury[J]. Mediators Inflamm,2013,2013(5):1-10
- Herold S, Gabrielli NM, Vadasz I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2013,305(10):L665-L681
- Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions[J]. Annu Rev Physiol,2013,75(1):551-567
- Frank JA. Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung [J]. Ann NY Acad Sci,2012,1257(2012):175-183
- Short KR, Kasper J, van der Aa S, et al. Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions [J]. Eur Respir J,2016,47(3):954-966
- Fan X, Joshi PC, Koval M, et al. Chronic alcohol ingestion exacerbates lung epithelial barrier dysfunction in HIV-1 transgenic rats [J]. Alcohol Clin Exp Res,2011,35(10):1866-1875
- Kage H, Flodby P, Gao D, et al. Claudin 4 knockout mice: normal physiological phenotype with increased susceptibility to lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2014,307(7):L524-L536
- Rokkam D, Lafemina MJ, Lee JW, et al. Claudin-4 levels are associated with intact alveolar fluid clearance in human lungs [J]. Am J Pathol,2011,179(3):1081-1087

(收稿日期:2016-06-23)

(修回日期:2016-06-30)