

单肺通气致兔急性肺损伤的蛋白质组学分析

谭红鹰¹, 林文前¹, 李慧婷¹, 操隆辉¹, 曾维安¹, 戎铁华^{2*}

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1. 麻醉科, 2. 胸科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探讨兔单肺通气肺损伤后肺组织蛋白组表达变化。【方法】新西兰白兔 12 只随机分为双肺通气组(TLV 组)和单肺通气组(OLV 组), 每组 6 只。TLV 组行双肺通气; OLV 组行右肺通气。监测氧合指数(OI)。术后对两组左、右肺行组织学检查并评分。对两组左肺组织提取的总蛋白进行双向差凝胶电泳, DeCyder 软件寻找差异表达的蛋白质点, 进行质谱分析鉴定。【结果】OLV 组在单肺通气 3 h 时 OI < 300 mmHg, 明显低于 TLV 组($P < 0.05$)。OLV 组左、右肺损伤评分均高于 TLV 组左、右肺($P < 0.05$)。OLV 组与 TLV 组之间, 检测并鉴定出 6 个差异蛋白, 包括 ATP 合成酶、肌动蛋白及过氧化氢酶等。【结论】成功建立兔单肺通气急性肺损伤模型; 单肺通气比双肺通气更引起肺损伤。单肺通气肺损伤可引起肺组织蛋白表达改变, 这些差异蛋白主要与能量代谢、细胞骨架及氧化应激相关。

关键词: 蛋白组学; 单肺通气; 肺损伤; 兔

中图分类号: R323.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)03-0346-05

Proteomic Analysis of One-lung Ventilation Induced Acute Lung Injury in Rabbits

TAN Hong-ying¹, LIN Wen-qian¹, LI Hui-ting¹, CAO Long-hui¹, ZENG Wei-an¹, RONG Tie-hua^{2*}

(1. Department of Anesthesiology, 2. Department of Thoracic surgery, State Key Laboratory of Oncology in Southern China// Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the proteomics change in lung tissue after one-lung ventilation (OLV) induced lung injury in rabbits. 【Methods】Twelve New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups: two-lung ventilation (TLV) group ($n = 6$) and one-lung ventilation (OLV) group ($n = 6$). TLV group received two-lung ventilation, while OLV group received right lung ventilation. Oxygenation index (OI) was monitored. Right and left lung tissues were sampled respectively for histological analyses after surgery. Total proteins extracted from the left lung tissue of both groups were separated by 2 dimensional-difference in gel electrophoresis. Differentially expressed proteins were searched using DeCyder soft ware, then analyzed and identified with mass spectrometry. 【Results】Oxygenation index in OLV group was less than 300mmHg after 3h of OLV and significant lower than that in TLV group ($P < 0.05$). The right and left lung damage scores were significantly higher than those in TLV group ($P < 0.05$). Between OLV group and TLV group, 6 differential proteins were detected and identified, including ATP synthases, actin and peroxiredoxins, etc. 【Conclusion】The rabbit model of OLV-induced lung injury can be successfully established. OLV-induced lung injury can lead to the change of proteom in lung tissue, and the differentially expressed proteins are mainly related to energy metabolism, cell skeleton and oxygen stress.

Key words: proteomics; one-lung ventilation; lung injury; rabbit

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3): 346-350]

单肺通气(one lung ventilation, OLV)麻醉技术为胸科手术提供良好视野。随着胸科手术发展, OLV 应用逐渐增多。OLV 过程中由于通气肺过度通气及对侧肺萎陷引起肺组织氧化应激及炎

症反应, 而导致的急性肺损伤, 已引起人们的高度关注^[1-2]。本研究旨在建立兔单肺通气肺损伤模型, 从蛋白组角度研究兔单肺通气肺损伤后肺组织表达的差异蛋白, 探讨单肺通气肺损伤机制。

收稿日期: 2012-01-13

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801152); 广州市科委基金(2004Z3-E0551)

作者简介: 谭红鹰, 博士, 副主任医师, E-mail: tanhongy@sysucc.ogr.cn; * 通信作者: 戎铁华, 博士生导师, 教授, E-mail: rongth@sysucc.ogr.cn

1 材料与方法

1.1 试剂和耗材

硫脲、碳酸钠、碳酸氢钠(美国 Sigma 公司),尿素、Tris 碱、丙磺酸盐、二硫苏糖醇、溴酚蓝、甘油、十二烷基磺酸钠、过硫酸铵、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基丙烯酰胺、四甲基乙二胺、低熔点琼脂糖、固相 pH 值干胶条、蛋白质纯化试剂盒、定量试剂盒、荧光标记试剂盒(瑞典 Amersham Biosciences 公司),冰醋酸、丁醇(德国 Merck 公司),无尘擦拭纸(美国 Kimberly Clark 公司)。

1.2 仪器和设备

HX-200 型动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司),6240B/C 多导生理记录仪(成都仪器厂),DU530 型核酸/蛋白分析仪(美国 Beckman);IPGphor 等电聚焦仪,Ettan DALT six 大型垂直电泳系统、扫描仪 typhoon 9400 和 Decyder 2D 6.0 软件(Amersham Biosciences);质谱仪 Ultraflex III(美国布鲁克);全自动斑点处理工作站 Workstation(Amersham Biosciences);AF100 型制冰机(意大利 Scotsman);Belly Dancer 多维轨道摇床(美国);Mini spin plus 小型台式离心机(德国 Eppendorf);排风柜(美国 Fisher)。

1.3 动物分组及组织标本准备

健康清洁级新西兰白兔 12 只(2.2~2.7 kg),随机分为两组:双肺通气组(TLV 组)和单肺通气组(OLV 组),每组 6 只。所有实验兔均右耳缘静脉注射 20%乌拉坦 5 mL/kg 麻醉,气管切开插入 3.5 号单腔气管导管至气管或右主支气管。游离右侧股动脉置管采集动脉血用作血气分析和监测平均动脉压。微量注射泵从右颈内静脉以 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速度持续输注乳酸林格氏液,并输注 $0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 顺式阿曲库铵维持肌松。实验中连续监测血压及呼吸力学参数,氧合指数(OI,动脉血氧分压与吸入氧浓度比值)。通气参数设置为:吸入氧浓度 FiO_2 0.9,潮气量 VT 12 mL/kg,呼吸频率 RR 40 min^{-1} ,呼吸比 I:E 1:2,氧流量为 1 L/min。两组在左侧约 5~6 肋间模拟开胸并观察肺萎陷及膨胀情况。TLV 组行双肺通气;OLV 组先单肺通气 50 min,再双肺通气 10 min,再重复上述通气过程,每间隔 1 h 测动脉血气,当氧合指数 $< 300\text{ mmHg}$ 时(即产生急性肺损伤)停止通气后放血处死动物。分别取双下肺

叶组织用于组织学检查及评估损伤程度。部分左肺组织存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用于蛋白组实验。

1.4 肺损伤评分

肺组织置入 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色光镜下观察肺损伤程度并评分。按文献[3]的方法判断肺损伤:肺泡水肿、肺间质水肿、肺泡出血、中性粒细胞浸润;按程度计分:无改变 0 分,轻度改变 1 分,中度改变 2 分,重度改变 3 分,然后累计总分。每张切片观察 10 个高倍视野,取 10 次评分均值,以每组标本的均值作为该组肺损伤评分。

1.5 组织蛋白准备

取约 200 mg 的组织标本用纯水洗去血和分泌物后,加入细胞裂解液,充分剪碎,低温下匀浆并进行超声波处理,然后离心 $20\,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min,用纯化试剂盒纯化蛋白后,对蛋白浓度进行定量。将每个样品浓度都调整至 $8\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$,取 $6.25\text{ }\mu\text{L}$ 进行 CyDye 荧光标记:两组样本混合行 Cy2 染色做内标,两组样本随机行 Cy3 或 Cy5 染色。

1.6 双向差分凝胶电泳(2D-DIGE)

将标记好的蛋白质样品涂布在等电聚焦(IEF)胶条槽,放入 IPG 干胶条进行第一向电泳。IEF 电泳参数:电流: $50\text{ }\mu\text{A}/\text{条}$; 30 V 12 h; 500 V 1 h; 1 kV 1 h; 10 kV 2 h,渐变; 10 kV 10 h,阶跃; 500 V 10 h;总电压伏小时数: $85\text{ kV}\cdot\text{h}$ 。IEF 完成后,进行第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。参数: $2\text{ W}/\text{胶}$, 50 min; $17\text{ W}/\text{胶}$,至胶内电泳指示剂跑出凝胶下缘 15 min。

1.7 凝胶扫描与图像分析

使用多功能激光扫描仪扫描凝胶,用 DeCyder V 6.0 软件分析凝胶图谱,采用 Student's t-test,选取平均变化比值大于 1.2 倍、 $P < 0.05$ 的蛋白质斑点。

1.8 质谱分析行蛋白质鉴定

将制备胶放入斑点处理工作站,进行自动化蛋白差异斑点切取、酶解、萃取。进行 MALDI-TOF-TOF 分析,获得肽质量指纹图谱(PMF),将 PMF 强度最大的 4 个峰进行串联质谱分析。并用 Biotools 软件检索,MASCOT 为搜索引擎,搜索参数设置:数据库为 NCBI nr;检索种属为: rabbit,数据检索的方式为 combined;最大允许漏切位点为 1;酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置: $\text{PMF } 75\times 10^{-6}$, $\text{MS } 0.5\text{ u}$ 。

1.9 统计学分析

肺损伤评分的数据采用 SPSS 13.0 软件包进行处理,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用重复测量设计方差分析,秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组氧合指数

双肺通气组和单肺通气组的氧合指数如表 1,两组通气后皆见氧合指数降低,但单肺通气组氧合指数降低较快。

2.2 肺损伤评分

OLV 组镜下双肺均见肺泡及肺间质较多渗出,部分肺泡出血,炎症细胞浸润,左侧肺损伤评分大于右侧 ($P < 0.05$)。TLV 组双肺泡腔少量渗出。组间比较 OLV 组左、右侧肺损伤评分明显大

于 TLV 组左、右肺($P < 0.05$;表 2,图 1)。

表 1 两组间氧合指数比较

Table 1 Comparison of oxygenation index between the two groups ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

Group	n	0 h	1 h	2 h	3 h
TLV	6	451 ± 65	407 ± 42	385 ± 42	382 ± 21 ¹⁾
OLV	6	432 ± 62	378 ± 67	318 ± 34 ¹⁾	279 ± 82 ¹⁾²⁾

1) Compared to 0 h, $P < 0.05$; 2) Compared to Group TLV, $P < 0.05$.

表 2 两组肺损伤评分的比较

Table 2 Comparison of alveolar damage score between two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	left lung	right lung
TLV	6	3.2 ± 0.8	3.7 ± 0.5
OLV	6	8.2 ± 1.3 ¹⁾	6.6 ± 1.2 ¹⁾²⁾

1) Compared to Group TLV, $P < 0.05$; 2) compared to left lung, $P < 0.05$.

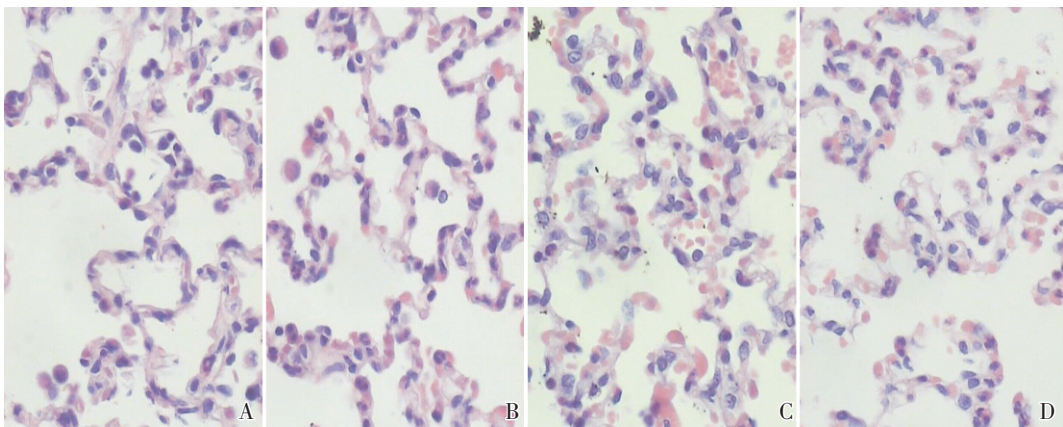


图 1 两组兔双侧肺组织 HE 染色病理学比较

Fig.1 The pathology comparison of both lung tissues between two groups

A: left lung tissue of group TLV; B: right lung tissue of group TLV; C: left lung tissue of group OLV; D: right lung tissue of group OLV; × 400.

2.3 2D-DIGE 图谱分析结果

每一张 2D-DIGE 凝胶经 3 种不同波长的激光扫描后,可得到 3 个分别由 Cy2、Cy3、Cy5 标记的不同蛋白质样品的图像及合并的胶内差异图像。经 DeCyder 软件分析可检测近 3 000 个斑点。对 TLV 组、OLV 组组间进行比较,共确认差异大于 1.2 倍的蛋白质斑点 7 个,其中 6 个斑点在 OLV 组上调,1 个下调。

2.4 差异蛋白质谱分析结果

进行 MALDI-TOF-MS 鉴定的 7 个斑点,其

中有 6 个获得了较好的肽质量指纹图谱(PMF),如斑点 2 509 的 PMF 见图 2。PMF 经本地Profound检索和在线 Mascot 检索,成功鉴定出蛋白质 6 个(表 3)。

3 讨 论

既往有关大鼠^[4]及小猪^[5]的 OLV 模型研究显示单肺通气比双肺通气更易引起肺损伤。本研究建立了兔单肺通气模型,并与双肺通气进行比较。

表 3 OLV 组与 TLV 组肺组织差异蛋白点的鉴定结果

Table 3 Differentially expressed lung tissue proteins detected between group OLV and group TLV

Spot ID	Protein Name	Change Ratio	P Value	Swiss-prot or NCBInr entry No	Mascot Score	Theoretical	
						MM/ku	PI
1490	mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1 complex beta subunit	1.5	0.036	gil89574025	93	45550	5.21
1499	protein disulfide isomerase A6	1.27	0.040	gil291412335	165	56322	5.45
1770	actin, cytoplasmic 1	2.67	0.022	gil6671509	329	42052	5.29
2509	peroxiredoxin 6	-1.71	0.047	gil291397244	84	25077	5.73
2636	peroxiredoxin 3-like isoform 2	1.32	0.005	gil291404903	120	26171	7.74
2729	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d	1.27	0.013	gil291413480	63	18491	5.6

MM: molecular mass; PI: isoelectric point.

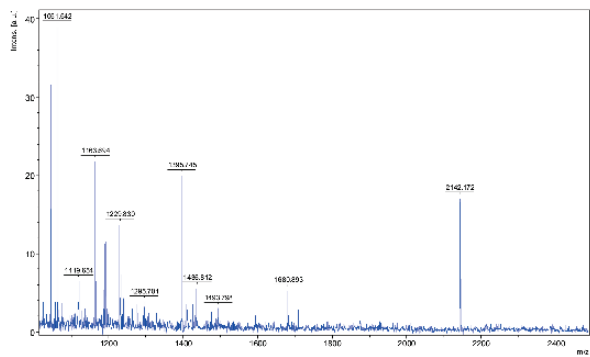


图 2 差异表达蛋白 peroxiredoxin 6 的肽质指纹图

Fig.2 PMF of differentially expressed protein peroxiredoxin 6

氧合指数 (OI) 是反映呼吸功能受损失代偿的指标, 当 OI 小于 300 mmHg 即可诊断急性肺损伤, 该指标示适合动物^[6]。本研究结果显示单肺通气 2 h 后, OLV 组 OI 开始下降, 3 h 后低于 300 mmHg, 表明此时已发生急性肺损伤。

OLV 时全部潮气量进入一侧肺, 相对大的潮气量导致通气侧肺过度通气, 引起肺泡过度牵张与伸展, 直接破坏肺泡上皮可造成容积伤^[7], 还可引起炎性细胞及炎性因子释放, 导致肺炎症损伤。炎性反应以及 OLV 时导致的通气侧肺血流过度灌注^[3]还可使肺泡毛细血管壁受损而通透性升高, 渗出到肺泡及间质中的水分及血成份增加。本研究中肺组织病理切片显示 OLV 组肺泡及间质较多渗出, 部分肺泡出血, 炎症细胞浸润, 肺损伤评分明显高于 TLV 组, 证实采用 VT 12 mL/kg, 单肺通气 3 h 引起了肺损伤。

Funakoshi 等^[8]的一项关于兔的单肺通气模型

研究中, 虽显示有炎性因子上调, 但未显示有肺组织学上的明显肺损伤改变。这可能和实验方法不同有关, 他们的实验采用 OLV 55 min, 再 TLV 65 min, 而且采用了肺保护性通气 (VT 6 mL/kg, PEEP 3 cm, FiO₂ 0.21)。机械通气造成肺损伤的严重程度取决于机械通气的强度和时间的, 其中 VT 是一个独立危险因素^[9-10]。我们的实验采用 VT 12 mL/kg, FiO₂ 为 0.9。而 VT > 10 mL 是大 VT^[9]。高氧本身是一种潜在的氧化应激来源, 可造成氧化应激损伤^[2]。而且本实验 OLV 时间长达 3 h。本研究的 OLV 模型可能模拟了临床中较为严重的情形。

目前, 有关 OLV 肺损伤的研究中, 尚未见从蛋白组水平的角度来探讨 OLV 所致肺损伤的蛋白组表达变化。本研究在建立 OLV 肺损伤模型后, 应用蛋白质组技术发现并鉴定出 TLV 组与 OLV 组之间的 6 个差异蛋白。故此, 这些差异蛋白可能与 OLV 肺损伤的发生、发展有关。

这些差异蛋白中包括两个 ATP 合成酶亚单位, ATP 成酶通过合成 ATP 给细胞提供能量。本研究结果显示, OLV 时其表达上调, 这可能是肺损伤时对能量需求增加的一种自身调节。

肌动蛋白是细胞骨架的主要成分之一, 细胞骨架对保持细胞完整性有重要作用。细胞可感受机械力等物理刺激, 并产生反应和适应^[11]。在高强度力作用下, 细胞膜会受损, 为了保存其屏障功能, 胞膜会迅速地重新封闭, 研究显示肌动蛋白直接参与这一过程^[12]。本研究 OLV 组肌动蛋白, 细胞质 1 表达增多, 这可能是 OLV 肺损伤时的一种自身保护性反应。

Prx是一种抗氧化蛋白超家族。哺乳动物细胞中发现有6种Prxs。Prx3位于线粒体,主要在有收缩性的组织中表达。线粒体在合成ATP时,产生各种活性氧成分。Prx3是线粒体内清除H₂O₂的关键酶,可通过控制H₂O₂浓度抑制细胞凋亡,可被多种氧化应激刺激引起表达增加^[13]。本研究OLV肺损伤时Prx3类似物异构体2表达增加,可能也是对氧化应激的一种代偿机制。

Prx6位于细胞浆,其中肺脏中表达最高,可防止细胞膜磷脂过氧化,对肺抗氧化损伤有重要作用^[14]。Prx6表达上调可抑制肺上皮细胞凋亡,减轻高氧引起的肺损伤^[15]。而Prx6基因敲除的小鼠对氧化应激敏感^[16]。本研究OLV组Prx6表达下调,表明OLV可能通过负调控Prx6使肺组织对氧化应激敏感性增高,引起肺损伤。

综合以上,本研究建立了兔单肺通气肺损伤模型,利用蛋白质组学技术,初步鉴定出6个差异蛋白。这些蛋白可能参与OLV引起的能量代谢改变及氧化应激,与OLV肺损伤机制有关,进一步进行蛋白质验证和功能研究,可为OLV肺损伤的防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] De Conno E, Steurer MP, Wittlinger M, et al. Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(6): 1316-1326.
- [2] Della Rocca G, Coccia C. Ventilatory management of one-lung ventilation [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2011, 77(5): 534-536.
- [3] Kozian A, Schilling T, Freden F, et al. One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study [J]. *Br J Anaesth*, 2008, 100(4): 549-559.
- [4] Tekinbas C, Ulusoy H, Yulug E, et al. One-lung ventilation: for how long? [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 134(2): 405-410.
- [5] Kozian A, Schilling T, Röcken C, et al. Increased alveolar damage after mechanical ventilation in a porcine model of thoracic surgery [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2010, 24(4): 617-623.
- [6] Schreiber T, Niemann C, Schmidt B, et al. A novel model of selective lung ventilation to investigate the long-term effects of ventilation-induced lung injury [J]. *Shock*, 2006, 26(1): 50-54.
- [7] Matthay MA, Bhattacharya S, Gaver D, et al. Ventilator-induced lung injury: in vivo and in vitro mechanisms [J]. *Am J Physiol*, 2002, 283(4): 678-682.
- [8] Funakoshi T, Ishibe Y, Okazaki N, et al. Effect of reexpansion after short-period lung collapse on pulmonary capillary permeability and pro-inflammatory cytokine gene expression in isolated rabbit lungs [J]. *Br J Anaesth*, 2004, 92(4): 558-563.
- [9] Fernandez-Perez E, Keegan M, Brown DR, et al. Intraoperative tidal volume as a risk factor for respiratory failure after pneumonectomy [J]. *Anesthesiology*, 2006, 105(1): 14-18.
- [10] Walder B, Fontao E, Totsch M, et al. Time and tidal volume-dependent ventilation-induced lung injury in healthy rats [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2005, 22(10): 785-794.
- [11] McNeil PL, Steinhardt RA. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19(9): 697-731.
- [12] Valentijn KM, Gumkowski FD, Jamieson JD. The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112(Pt 1): 81-96.
- [13] Nonn L, Berggren M, Powis G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-3) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(9): 682-689.
- [14] Liu G, Feinstein SI, Wang Y, et al. Comparison of glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6 in protection against oxidative stress in the mouse lung [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 15, 49(7): 1172-1181.
- [15] Wang Y, Phelan S A, Manevich Y, et al. Transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6 show increased resistance to lung injury in hyperoxia [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(4): 481-486.
- [16] Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, et al. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(27): 25179-25190.

(编辑 刘清海)