

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.14.008

ω-3 脂肪酸对于大鼠呼吸机相关性肺损伤的预防作用及机制研究

殷辰俞¹, 严洁^{2△}

(1. 江苏省太仓市第一人民医院重症医学科 215400; 2. 江苏省无锡市人民医院重症医学科 214000)

[摘要] **目的** 研究 ω-3 脂肪酸对呼吸机相关性肺损伤(VILI)大鼠炎症反应的影响,探讨 ω-3 脂肪酸对于 VILI 的预防作用及其机制。**方法** 48 只 SD 大鼠按随机数字表法分成对照组(C 组),VILI 模型组(M 组),ω-3 脂肪酸干预 1、2、3、4 组(I1 组、I2 组、I3 组、I4 组,制模前 0.5 h 分别静脉注射 ω-3 脂肪酸 60、120、180、240 mg/kg)。除 C 组外各组均行机械通气,3 h 后处死大鼠。取肺组织测定肺湿/干重(W/D)比值、肺组织髓过氧化物酶(MPO)水平;收集支气管肺泡灌洗液(BALF)测定总蛋白水平;取血测定白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。**结果** 与 M 组比较,随着 ω-3 脂肪酸用量增加,I1、I2、I3、I4 组肺 W/D 比值下降($P<0.01$);BALF 中总蛋白水平、MPO 水平、血 TNF-α 水平逐渐降低($P<0.01$);血 IL-10 水平升高($P<0.05$)。**结论** ω-3 脂肪酸可通过抗炎、抗氧化应激、减少渗出等机制发挥对肺的保护作用,还可减轻 VILI,其最适剂量范围为 120~180 mg/kg。

[关键词] 脂肪酸类,ω3;肺炎,呼吸机相关性;炎症反应;氧化应激
[中图分类号] R563;R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)14-1896-04

Preventive effect and the mechanism of omega-3 fatty acids in rats with ventilator induced lung injury
Yin Chenyu¹, Yan Jie^{2△}

(1. ICU, Taicang First People's Hospital, Taicang, Jiangsu 215400, China;
2. ICU, Wuxi People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214000, China)

[Abstract] **Objective** To invest the influence of omega-3 fatty acids in inflammatory reaction in rats with ventilator induced lung injury (VILI) and to explore the mechanism of preventive effect of omega-3 fatty acids in VILI. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group (group C), VILI model group (group M), omega-3 fatty acids intervention group 1, 2, 3, 4 (group I1, I2, I3, I4, with intravenous injection of omega-3 fatty acids 60, 120, 180, 240 mg/kg respectively, half an hour before models reproduced at 3 hours postdose). All rats except group C were suffered mechanical ventilation, all rats were sacrificed. The lung tissue was collected and the wet-to-dry weight ratio (W/D) and myeloperoxidase (MPO) were determined. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and total protein content was evaluated. Blood was collected and interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor (TNF-α) were measured. **Results** Compared with group M, W/D of lung in group I1, I2, I3, I4 decreased in dose-dependence ($P<0.01$). The total protein in BALF, activity of MPO and content of TNF-α was gradually reduced in dose-dependence ($P<0.01$). The content of IL-10 was upgraded ($P<0.05$). **Conclusion** Omega-3 fatty acids could protect lung tissue and alleviate VILI through anti-inflammatory, anti-oxidative stress and the decreased of effusion. The best dose of omega-3 fatty acids is 120—180 mg/kg.
[Key words] fatty acids, omega-3; pneumonia, ventilator-associated; inflammatory reaction; oxidative stress

重症患者由于呼吸机的应用,虽然其生命可得以维持,但易发生医源性的肺损伤,即呼吸机相关性肺损伤(VILI)。VILI 是机械通气一种常见并发症,可导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者出现较高的病死率^[1]。失控的炎症反应被认为在 VILI 的发病过程中起重要作用^[2]。因此由炎症反应介导的生物伤目前已成为 VILI 研究的热点。ω-3 脂肪酸被认为是具有免疫调理作用的营养素^[3]。ω-3 脂肪酸对于循环内一些炎症介质的水平具有调控作用^[4]。本实验通过研究 ω-3 脂肪酸对呼吸机相关性肺损伤大鼠炎症反应的影响,探讨 ω-3 脂肪酸对于 VILI 的预防作用及其机制,同时寻找 ω-3 脂肪酸对 VILI 发挥保护作用的最适剂量,为 VILI 的发病机制及药物防治研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 ω-3 鱼油脂肪乳注射液购自华瑞制药有限公司;

白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)试剂盒购自武汉博士德公司;大鼠髓过氧化物酶(MPO)试剂盒购自南京建成生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理方法 清洁级雄性 SD 大鼠 48 只(苏州大学实验动物中心),体质量 250~300 g。按随机数字表法将大鼠分成 6 组($n=8$):对照组(C 组)、模型组(M 组)、ω-3 脂肪酸干预组(I1 组、I2 组、I3 组、I4 组)。禁食、禁水 6 h。腹腔注射 1.5%戊巴比妥钠 2.0 mL,40 min 追加 0.2 mL。各组均行气管切开插管,稳定 30 min。机械通气前 0.5 h 时 I1 组、I2 组、I3 组、I4 组分别于静脉缓慢注射 ω-3 脂肪酸 60、120、180、240 mg/kg;C 组、M 组给予等量生理盐水。C 组只行气管切开,保留自主呼吸;M 组、ω-3 脂肪酸干预组给予机械通气 3 h,连接至小动物呼吸机(Harvard Inspira 公司),呼吸机参数:吸

表 1 各组大鼠参数比较(̄x±s)

组别	n	W/D	总蛋白水平(mg/mL)	MPO(U/g)	TNF-α(ng/L)	IL-10(pg/L)
C组	8	4.52±0.11	3.53±0.24	0.69±0.06	6±2	0.33±0.04
M组	8	5.57±0.13 ^a	8.56±0.21 ^a	1.39±0.09 ^a	47±6 ^a	0.44±0.05 ^a
I1组	8	5.20±0.11 ^{ac}	7.46±0.16 ^{ac}	1.18±0.09 ^{ac}	37±6 ^{ac}	0.54±0.08 ^{ab}
I2组	8	5.08±0.09 ^{acd}	7.27±0.13 ^{ac}	1.09±0.07 ^{acd}	31±4 ^{acd}	0.61±0.04 ^{abd}
I3组	8	5.01±0.15 ^{acd}	7.04±0.14 ^{ac}	1.05±0.09 ^{acd}	30±4 ^{acd}	0.64±0.05 ^{abd}
I4组	8	5.04±0.13 ^{acd}	6.97±0.19 ^{ac}	1.06±0.11 ^{acd}	30±6 ^{acd}	0.63±0.08 ^{abd}

^a:*P*<0.01,与C组比较;^b:*P*<0.05,^c:*P*<0.01,与M组比较;^d:*P*<0.05,与I1组比较。

氧浓度(FiO₂)21%,潮气量(V_t)30 mL/kg,呼吸频率(f)40 次/分钟,吸/呼比(I:E)为1:2,呼气末正压(PEEP)0 cm H₂O。

1.2.2 标本采集及指标检测

1.2.2.1 支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白水平测定 通气3 h后,取股动脉血4 mL,随后放血处死大鼠。同时迅速开胸结扎右肺门,用4℃生理盐水4 mL进行支气管肺泡灌洗2次,收集BALF,离心取上清液置于-70℃保存。采用考马斯亮蓝染色法测定BALF中总蛋白水平,操作按照试剂盒说明进行。

1.2.2.2 肺湿/干重(W/D)比值测定 取右下肺称湿重(W),后置于70℃恒温烤箱烘烤至恒重后称干重(D),计算肺组织W/D比值。

1.2.2.3 肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性测定 取右中肺组织,按试剂盒说明,采用分光光度计法测定MPO值。

1.2.2.4 TNF-α、IL-10测定 按照试剂盒说明,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血中TNF-α、IL-10值。

1.3 统计学处理 采用SPSS19.0软件,计量资料用̄x±s表示,采用单因素方差分析,两两比较用*q*检验,检验水准α=0.05,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺W/D比值变化 与C组比较,M组肺W/D比值明显升高(*P*<0.01)。与M组比较,I1、I2、I3、I4组肺W/D比值均有所下降(*P*<0.01)。与I1组相比,I2、I3、I4组肺W/D比值下降更为显著(*P*<0.05)。I2、I3、I4各组之间差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1、图1。

2.2 BALF中总蛋白水平变化 与C组比较,M组BALF中总蛋白水平明显升高(*P*<0.01)。与M组比较,I1、I2、I3、I4组BALF中总蛋白水平逐渐降低(*P*<0.01)。I1、I2、I3各组之间BALF总蛋白水平下降差异有统计学意义(*P*<0.05)。I4组BALF中总蛋白水平虽较I3组有所下降,但无统计学意义(*P*>0.05),见表1、图2。

2.3 肺组织MPO水平变化 与C组比较,M组MPO水平明显升高(*P*<0.01)。与M组相比,I1、I2、I3、I4组MPO水平均有所降低(*P*<0.01)。与I1组比较,I2、I3、I4组MPO下降有统计学意义(*P*<0.05)。I2、I3、I4各组之间差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1、图3。

2.4 血TNF-α水平变化 与C组比较,M组血TNF-α水平明显升高(*P*<0.01)。与M组比较,I1、I2、I3、I4组血TNF-α水平逐渐降低(*P*<0.01)。与I1组相比,I2、I3、I4组血TNF-α水平降低均有统计学意义(*P*<0.05)。I2、I3、I4各组之间差异

无统计学意义(*P*>0.05),见表1、图4。

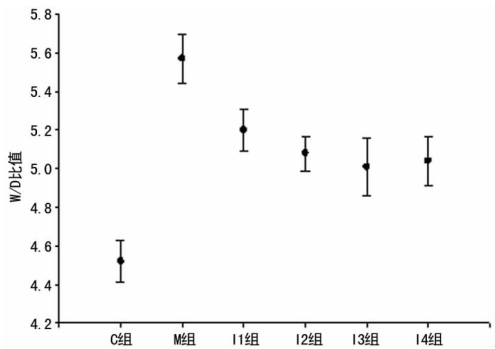


图 1 肺 W/D 比值变化

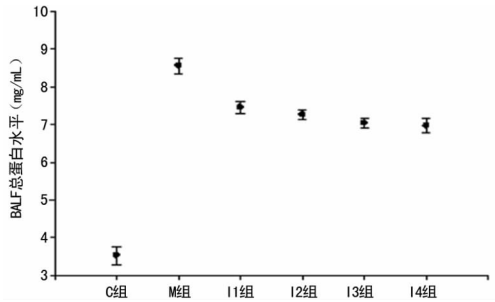


图 2 BALF 中总蛋白水平变化

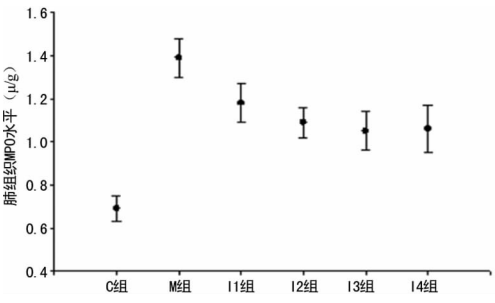


图 3 肺组织 MPO 水平变化

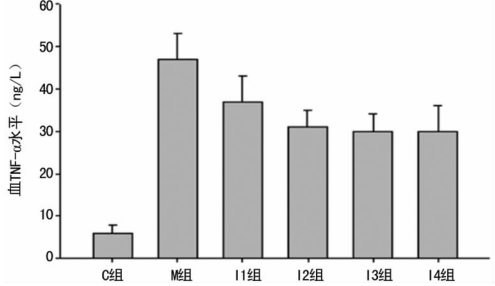


图 4 血 TNF-α 水平变化

2.5 血 IL-10 水平变化 与 C 组比较, M 组血 IL-10 水平明显升高($P<0.01$)。与 M 组比较, I1 组有所升高($P<0.05$), 但 I2、I3、I4 组血 IL-10 水平升高更为显著($P<0.01$)。与 I1 组相比, I2、I3、I4 组血 IL-10 水平升高有统计学意义($P<0.01$)。I2、I3、I4 各组之间差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1、图 5。

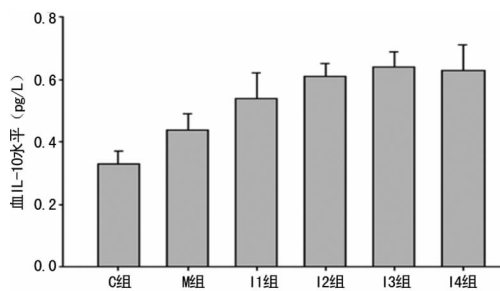


图 5 血 IL-10 水平变化

3 讨 论

尽管采取了小潮气量肺保护性通气策略, 但机械通气仍可能造成医源性的肺损伤, 即 VILI。对于 VILI 的发病机制, 近年来的研究者更倾向于生物伤学说, 即各种生理损伤因素直接损伤肺泡细胞或间接激活上皮细胞、内皮细胞及炎症细胞的细胞信号通路, 造成各种细胞因子释放^[5]。生物伤机制十分复杂, 目前已成为研究的焦点。

本研究采用大 Vt 机械通气复制大鼠 VILI 模型。实验结果显示, VILI 模型复制成功。根据 Borges 等^[6]应用正电子发射计算机断层显像 (PET-CT) 研究表明重力依赖区的萎陷肺泡及过度膨胀的肺组织是 VILI 时最早的受打击目标, 由于过度的应力刺激使肺泡周期性萎陷及复张, 导致肺上皮细胞、毛细血管内皮细胞及肺泡细胞外基质过度破坏。VILI 还可使肺微血管塌陷、肺泡过度膨胀, 这些均可造成呼吸膜结构破坏、肺通透性增加, 最终使大量富含蛋白的液体渗出形成肺水肿、肺泡内透明膜^[7]。本研究中大鼠经 ω -3 鱼油脂肪乳干预后, 肺 W/D 比值及 BALF 中总蛋白水平均有所下降。这可能是由于鱼油作为酶作用底物可与花生四烯酸竞争脂氧合酶及环氧合酶的结合位点, 减少花生四烯酸途径的代谢产物, 影响细胞膜的稳定性, 维持血管内皮结构及功能完整, 减轻毛细血管渗漏^[8]。

VILI 时中性粒细胞大量游走渗出、呼吸爆发, 造成脂质过氧化加剧全身炎症反应, 弱化抗氧化防御机制, 加重组织损伤^[9]。VILI 时, MPO 可催化生成过量的氧自由基, 破坏了氧化/抗氧化平衡, 导致了机体的氧化应激损伤。VILI 可导致早期的嗜中性肺炎, 后期则为伴随单核/巨噬浸润的淋巴性肺炎^[10]。肺泡渗出液中的单核/巨噬细胞的浸润可反映出组织损伤修复的程度, 其释放的趋化因子可诱导成纤维细胞, 加重组织病理性修复^[11]。本实验显示 ω -3 鱼油脂肪乳可明显下调肺组织 MPO 水平。这可能是由于 ω -3 鱼油脂肪乳作为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的配体, 可负性调节巨噬细胞和单核细胞活性, 抑制氧化应激反应^[12]。PPAR γ 作为一类配体活化介导的转录因子, 当其被激活时, 可对抗核转录因子 κ B (NF- κ B) 介导的中性粒细胞活化^[13]。而且 ω -3 鱼油脂肪乳可抑制黏附分子的表达和内皮细胞一氧化氮合酶

的活性, 减弱局部的炎症反应损伤^[14]。Nakagawa 等^[15]研究表明 ω -3 鱼油中的二十二碳六烯酸 (DHA) 有诱导血红素加氧酶-1 (HO-1) 表达的能力, 进一步防止氧化应激对细胞及组织的损害。

有研究表明 ARDS 机械通气患者气压伤的发生率为 50%^[16]。ARDS 患者的肺顺应性降低, 需较高的通气压力才能获得合适的氧合作用, 但这也导致 VILI 的发病风险明显增大。VILI 导致的血浆及肺泡内的炎症介质水平升高、转录促炎介质的 mRNA 上调等均可造成过度的炎症反应^[17]。因此对于 VILI 而言, 炎症介质的水平就可作为肺损伤程度的标准。Wu 等^[18]认为由肺泡过度扩张导致的 VILI, 肺脏会产生大量的 TNF- α 等炎症介质, 且在 6 h 内达到高峰, 本实验表明应用 ω -3 鱼油脂肪乳后大鼠血 TNF- α 水平下降。有研究表明 VILI 造成的生物性肺损伤与 NF- κ B 途径导致炎症反应有重要关联^[19]。 ω -3 脂肪酸可通过恢复 NF- κ B 抑制因子的水平, 减少 NF- κ B 途径炎症因子的产生与释放^[20]。Sabater 等^[21]研究表明静脉注射富含 ω -3 脂肪酸的脂肪乳剂, 短期内可显著降低花生四烯酸类细胞因子的释放, 具有免疫调节的作用。 ω -3 脂肪酸还可增强 B1 淋巴细胞的活性, 促进免疫球蛋白 M 等免疫球蛋白的分泌, 以应对可能发生的二重感染, 而且对于全身炎症反应可更好的维持内环境的稳定^[22]。 ω -3 脂肪酸还可通过促进 IL-10 的释放间接影响巨噬细胞功能, 减少一些炎症介质及趋化因子的释放^[23]。Ferguson 等^[24]研究表明, ω -3 脂肪酸具有相对特异的抗炎作用, 且呈剂量依赖性, 其甚至推荐 ω -3 脂肪酸用量应超过 3 600 mg/d。

综上所述, 本研究表明 ω -3 脂肪酸可通过抗炎、抗氧化应激、减少渗出等多种途径减轻 VILI。 ω -3 脂肪酸对 VILI 大鼠的最适剂量为 120~180 mg/kg, 在此剂量范围内的 ω -3 脂肪酸可对肺组织发挥最大保护作用。

参考文献

- [1] Wilson MR, Takata M. Inflammatory mechanisms of ventilator-induced lung injury: a time to stop and think? [J]. Anaesthesia, 2013, 68(2): 175-178.
- [2] Setzer F, Oschatz K, Hueter L, et al. Susceptibility to ventilator induced lung injury is increased in senescent rats [J]. Crit Care, 2013, 17(3): R99.
- [3] Cotogni P, Muzio G, Trombetta A, et al. Impact of the ω -3 to ω -6 polyunsaturated fatty acid ratio on cytokine release in human alveolar cells [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2011, 35(1): 114-121.
- [4] Jacobs BR, Nadkarni V, Goldstein B, et al. Nutritional immunomodulation in critically ill children with acute lung injury: feasibility and impact on circulating biomarkers [J]. Pediatr Crit Care Med, 2013, 14(1): e45-56.
- [5] Li H, Wang C, Hu J, et al. A study on circadian rhythm disorder of rat lung tissue caused by mechanical ventilation induced lung injury [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 18(2): 249-254.
- [6] Borges JB, Costa EL, Suarez-Sipmann F, et al. Early inflammation mainly affects normally and poorly aerated lung in ex-

- perimental ventilator-induced lung injury[J]. Crit Care Med, 2014,42(4):e279-287.
- [7] Hussein O, Walters B, Stroetz R, et al. Biophysical determinants of alveolar epithelial plasma membrane wounding associated with mechanical ventilation[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013,305(7):L478-484.
- [8] Pontes-Arruda A, Martins LF, De Lima SM, et al. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, γ -linolenic acid and antioxidants in the early treatment of sepsis: results from a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, controlled study: the INTERSEPT study[J]. Crit Care, 2011,15(3):R144.
- [9] Su CL, Du WY, Chiang LL, et al. Amelioration of superoxide dismutase on ventilator-induced lung injury by suppressing leukocyte in the lungs and systemic circulation [J]. Chin J Physiol, 2013,56(4):219-229.
- [10] Contreras M, Ansari B, Curley G, et al. Hypercapnic acidosis attenuates ventilation-induced lung injury by a nuclear factor- κ B-dependent mechanism[J]. Crit Care Med, 2012,40(9):2622-2630.
- [11] Curley GF, Contreras M, Higgins B, et al. Evolution of the inflammatory and fibroproliferative responses during resolution and repair after ventilator-induced lung injury in the rat[J]. Anesthesiology, 2011,115(5):1022-1032.
- [12] Draper E, Reynolds CM, Canavan M, et al. Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF- κ B Independent of PPAR γ [J]. J Nutr Biochem, 2011,22(8):784-790.
- [13] Liu YY, Li LF, Yang CT, et al. Suppressing NF- κ B and NKRF pathways by induced pluripotent stem cell therapy in mice with ventilator-induced lung injury [J]. PLoS One, 2013,8(6):e66760.
- [14] Ott J, Hiesgen C, Mayer K. Lipids in critical care medicine[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011, 85(5):267-273.
- [15] Nakagawa F, Morino K, Ugi S, et al. 4-Hydroxy hexenal derived from dietary n-3 polyunsaturated fatty acids induces anti-oxidative enzyme heme oxygenase-1 in multiple organs[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014,443(3): 991-996.
- [16] Henzler D, Hochhausen N, Chankalal R, et al. Physiologic and biologic characteristics of three experimental models of acute lung injury in rats[J]. Anesth Analg, 2011,112 (5):1139-1146.
- [17] Hennis MP, Bont LJ, Jansen NJ, et al. Tidal volume drives inflammation during mechanical ventilation for viral respiratory infection[J]. Pediatr Crit Care Med, 2014,15(1):e27-31.
- [18] Wu H, Kobayashi T, Wan Q, et al. Effects of surfactant replacement on alveolar overdistension and plasma cytokines in ventilator-induced lung injury[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2010,54(3):354-361.
- [19] Gao M, Liu D, Du Y, et al. Autophagy facilitates ventilator-induced lung injury partly through activation of NF-kappaB pathway[J]. Med Sci Monit, 2013,19:1173-1175.
- [20] Ma L, Li N, Liu X, et al. Arginyl-glutamine dipeptide or docosahexaenoic acid attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice[J]. Nutrition, 2012,28(11/12): 1186-1191.
- [21] Sabater J, Masclans JR, Sacanell J, et al. Effects of an omega-3 fatty acid-enriched lipid emulsion on eicosanoid synthesis in acute respiratory distress syndrome (ARDS): a prospective, randomized, double-blind, parallel group study [J]. Nutr Metab (Lond), 2011,8(1):22.
- [22] Tomasdottir V, Thorleifsdottir S, Vikingsson A, et al. Dietary omega-3 fatty acids enhance the B1 but not the B2 cell immune response in mice with antigen-induced peritonitis[J]. J Nutr Biochem, 2014,25(2):111-117.
- [23] Hao W, Wong OY, Liu X, et al. ω -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes[J]. J Pediatr Surg, 2010,45(12):2412-2418.
- [24] Ferguson JF, Mulvey CK, Patel PN, et al. Omega-3 PUFA supplementation and the response to evoked endotoxemia in healthy volunteers[J]. Mol Nutr Food Res, 2014,58 (3):601-613.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2016-01-17)

统计资料类型

统计资料共有 3 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。