



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.010
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3784.shtml

· 基础研究 ·

肺泡中性粒细胞凋亡与 occludin 蛋白改变在胆道梗阻大鼠肺损伤中的作用

邓雪松¹, 詹勇强¹, 汪长浩¹, 邓通明², 倪勇¹

(1. 深圳大学第一附属医院 / 深圳市第二人民医院 肝胆外科, 广东 深圳 518035; 2. 广州医科大学 2011 级研究生, 广东 广州 510182)

摘要

目的: 观察胆道梗阻 (BDO) 大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中性粒细胞 (PMN) 凋亡情况与肺泡上皮细胞 occludin 蛋白变化, 分析两者与梗阻性黄疸肺损伤的关系。

方法: 72 只 SD 大鼠, 随机抽取 8 只作为正常对照组, 将另 64 只大鼠随机均分为假手术组和模型组; 假手术组大鼠行假手术, 模型组大鼠行胆总管双重结扎建立 BDO 模型。假手术组与模型组大鼠于术后 3、7、10、14 d 分批等量 ($n=8$) 处死, 留取标本; 正常对照组则在实验期间随机处死获取标本。检测大鼠肺组织形态学、BALF 中 PMN 凋亡率和 MMP-9 活性, 肺组织 occludin 蛋白, 并计算肺通透指数 (LPI)。

结果: 与正常对照组比较, 假手术组各项指标在各时间点均无明显差异, 定量指标间差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。模型组肺组织出现明显的病理改变, 且与假手术组比较, BALF 中 PMN 凋亡率逐渐减少, MMP-9 活性逐渐增高, 3~14 d 各时间点差异均有统计意义 (均 $P<0.05$); 肺组织 occludin 蛋白逐渐减少, LPI 逐渐增加, 在 7~14 d 各时间点差异均有统计意义 (均 $P<0.05$)。相关性分析显示, BDO 大鼠 PMN 凋亡率与 MMP-9 活性呈负相关 ($r=-0.935$), MMP-9 活性与肺组织 occludin 蛋白水平呈负相关 ($r=-0.796$), 肺组织 occludin 蛋白水平与 LPI 呈负相关 ($r=-0.800$) (均 $P<0.05$)。

结论: BDO 大鼠肺泡 PMN 凋亡减少、MMP-9 活性增强, 从而引起 occludin 蛋白减少, 造成肺泡上皮屏障损伤、通透性增加, 该病理过程在梗阻性黄疸肺损伤的发生发展中可能发挥了重要作用。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(2):186-191]

关键词

胆汁淤积; 支气管肺泡灌洗液; 中性白细胞; 细胞凋亡; 连接蛋白类; 大鼠
中图分类号: R657.4

Impact of altered alveolar neutrophil apoptosis and occludin protein on lung injury in rats with bile duct obstruction

DENG Xuesong¹, ZHAN Yongqiang¹, WANG Changhao¹, DENG Tongming², NI Yong¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital / the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518035, China; 2. Postgraduate of Guangzhou medical university, 2011 grade, Guangzhou 510182, China)

Corresponding author: NI Yong, Email: szniyong@sina.com

基金项目: 2012 年广东省科技计划资助项目 (2012B031800349); 2012 年深圳市第二人民医院育苗计划资助项目 (20120506); 2013 年深圳市医疗卫生类科研资助项目 (201302079)。

收稿日期: 2013-12-03; **修订日期:** 2014-01-22。

作者简介: 邓雪松, 深圳大学第一附属医院 / 深圳市第二人民医院主治医师, 主要从事肝癌分子生物学与梗阻性黄疸病理改变方面的研究。

通信作者: 倪勇, Email: szniyong@sina.com

ABSTRACT

Objective: To observe the apoptosis of polymorphonuclear neutrophils (PMN) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and occludin protein alteration in the alveolar epithelial cells in rats with bile duct obstruction (BDO), and analyze the relations of the two parameters with obstructive jaundice related lung injury.

Methods: Seventy-two SD rats were used, 8 of them were randomly selected as normal control group, and the remaining 64 rats were equally randomized into sham group and model group. Rats in sham group underwent a sham operation and those in model group were subjected to double ligation of the common bile duct to establish a BDO model. Rats in sham group and model group were sacrificed in four batches with equal number of animals ($n=8$) to harvest specimens at 3, 7, 10 and 14 d after surgery, and rats in normal control group were killed to obtain specimens at random during the experimental period. The morphological analysis of the lung tissue of the rats was performed, PMN apoptosis and MMP-9 activity in the BALF, and occludin protein expression in lung tissue were determined, and the lung permeability index (LPI) was also calculated.

Results: Compared with normal control group, all the parameters in sham group showed no obvious changes at each time point, and quantitative differences had no statistical significance (all $P>0.05$). In model group, evident lung injuries were observed, and compared with sham group, the PMN apoptosis was decreased and MMP-9 activity in the BALF was gradually increased, and the differences at each time point from 3-14 d reached statistical significance (all $P<0.05$); the occludin protein expression in lung tissue was decreased and LPI was gradually increased, and the differences at each time point from 7-14 d reached statistical significance (all $P<0.05$). Correlation analysis showed that in BDO rats, the PMN apoptotic rate was negatively correlated with MMP-9 activity ($r=-0.935$), the MMP-9 activity was negatively correlated with occludin protein level in lung tissue ($r=-0.796$), and the occludin protein level in lung tissue was negatively correlated with LPI ($r=-0.800$) (all $P<0.05$).

Conclusion: In BDO rats, alveolar PMN apoptosis is decreased and MMP-9 activity is increased which may cause attenuation of occludin protein in alveolar epithelial cells, alveolar epithelial barrier damage and increased permeability. This pathological process may contribute greatly to the initiation and development of obstructive jaundice related acute lung injury.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(2):186-191]

KEYWORDS

Cholestasis; Bronchoalveolar Lavage Fluid; Neutrophils; Apoptosis; Connexins; Rats

CLC number: R657.4

中性粒细胞(peripheral polymorphonuclear neutrophil, PMN)凋亡异常是参与急性肺损伤的重要环节^[1-2],导致肺组织炎症反应加强与肺泡结构的受损^[3],但其机制尚未明确。occludin蛋白是肺泡上皮细胞紧密连接蛋白,对维护正常肺泡上皮屏障功能具有重要意义^[4]。有研究^[5]报道,肺内过度炎症反应、血管通透性增加是导致梗阻性黄疸肺损伤的重要因素。然而,关于肺泡上皮屏障功能在梗阻性黄疸肺损伤发生发展中的作用却鲜有报道。为此,本研究建立大鼠胆道梗阻(bile duct obstruction, BDO)模型,检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)PMN凋亡率和肺泡上皮细胞 occludin 蛋白,研究两者对肺泡上皮屏障功能的影响,探讨其在梗阻性黄疸并发肺损伤的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

72只SD大鼠,雌雄不拘,体质量250~300g,清洁级,购自南方医科大学医学动物实验中心。随机抽取8只作为正常对照组,将另64只大鼠随机均分为假手术组和模型组。

1.2 主要仪器与试剂

恒温离心机(Sigma公司,型号-3K-18);CO₂细胞培养箱(上海力申科学仪器公司);流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司,型号EpicsXL);酶标仪(瑞士Hamilton公司,型号-FAME24/20);Olympus倒置显微镜(日本Olympus公司);戊巴比妥钠购于Sigma公司;Annexin V-FITC Kit购自Bender公司;大鼠NE ELISA Kit与MMP-9 ELISA Kit均为武汉华美生物

公司产品；山羊抗鼠 occludin 多克隆抗体为美国 Zymed Laboratories 公司产品；Folin 酚试剂上海喜润生化试剂公司；大鼠淋巴细胞分离液购自 TD 公司。

1.3 模型制备

模型组大鼠经腹腔内注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉，行腹正中线剖开，分离胆总管，在靠近十二指肠处双重丝线结扎，并于两结扎线之间切断胆总管，制备 BDO 模型。假手术组除不结扎和切断胆总管外，其余操作同上。术后各组大鼠分笼喂养，自由饮水和进食专用饲料。

1.4 标本留取与处理

假手术组与模型组大鼠于术后 3、7、10、14 d 分批等量处死，留取标本；正常对照组则在实验期间随机处死获取标本。(1) 血液标本：腹腔麻醉下，剖胸，直视下心脏穿刺抽血 3 mL，收集于 EDTA 抗凝管，离心留取血浆，-80℃ 保存用于测定蛋白含量。(2) BALF 制备：留取血液标本后，游离气管并结扎右侧肺门，在气管下段作“⊥”形切口，采用外径为 1.8 mm 的头皮针导管沿切口插入左主支气管末端分叉处，预热生理盐水 (37℃) 2.5 mL 低压注入肺内，待左肺叶变为膨隆、苍白回抽灌洗液，反复推注一回抽 5 次，最后将回抽液注入离心管，置于冰浴中；上述灌洗操作重复 4 次，共收集 5 次 BALF 约 10 mL；将所得 BALF 在 4℃、1 000 r/min 条件下离心 5 min，上清液分装于 EP 管中，-80℃ 保存用于测定蛋白含量，细胞沉淀用于 PMN 凋亡率的检测。(3) 肺组织标本：气管结扎后立即从右肺上叶切取一块肺组织，放入 10% 甲醛中固定 24 h，进行脱水、包埋、制成蜡块，用于 HE 染色及免疫组化染色。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 PMN 凋亡率检测 取 BALF 细胞沉淀用 PBS 稀释至 3 mL，加入 2 mL 淋巴分离液之上，4℃、2 000 r/min 条件下离心 10 min，取底层细胞经瑞氏染色法检查 PMN 纯度 >90%，重悬于 RPMI 1640 细胞培养液中，调整细胞浓度为 1×10^6 /mL，取 100 μ L 细胞悬液 PBS 洗 2 次，加入 100 μ L Binding Buffer 和 5 μ L Annexin-V FITC，室温避光孵育 20 min，再加入 PI 5 μ L，避光反应 5 min，加入 400 μ L Binding Buffer 悬浮细胞，立即上流式细胞仪分析。采用 Annexin-V 和 PI 双标法分析，Annexin-V+/PI- 为凋亡细胞，计数凋亡细胞所占的百分比作为凋亡率。

1.5.2 ELISA 方法检测 MMP-9 活性 室温下解

冻 BALF 上清液标本，按试剂盒说明书要求操作，根据标准品得出的 OD 值绘制标准曲线，计算 MMP-9 浓度 (ng/mL)。

1.5.3 肺组织 occludin 免疫组化染色 肺组织蜡块切成 20 μ m 切片，脱蜡，梯度酒精水化，PBS 冲洗，0.01 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液修复抗原，3% H₂O₂ 室温孵育 10 min，PBS 冲洗，3 min \times 3 次，滴加山羊抗鼠 occludin 多克隆抗体，以 PBS 代替一抗作为对照，4℃ 冰箱过夜，室温下复温 45 min，PBS 冲洗，5 min \times 3 次，滴加二抗 (生物素化羊抗兔 IgG)，37℃，60 min，PBS 冲洗，5 min \times 3 次，滴加 DAB 显色，显微镜下观察见阳性反应，occludin 蛋白呈棕黄色，终止显色，苏木素复染，脱水，中性树脂胶封片。将切片置于与图象分析系统相连显微镜 ($\times 400$)，每张切片随机选取 10 个视野，采用图象分析软件 IPP6.0 (Image Pro Plus 6.0) 分析，固定窗口面积进行测定 occludin 蛋白阳性染色面积 (positive stained area, PSA) 百分比 (%), 计算平均值，其值愈高则表示 occludin 蛋白含量愈高。

1.5.4 肺通透指数 (lung permeability index, LPI) 室温下解冻 BALF 上清液与血浆标本，采用 Lowry 方法^[6]测定蛋白含量，按 BALF 蛋白含量 / 血浆蛋白含量计算 LPI。肺泡上皮细胞通透性增加，能引起大量水和蛋白质进入肺泡腔。因此，通过计算 LPI 可以反映肺泡上皮细胞通透性的改变。

1.6 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，应用 SPSS 17.0 软件进行统计处理，采用方差分析、*t* 检验和 Pearson 相关性分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理改变

正常对照组：大鼠肺泡结构完整，肺泡腔内清晰，壁光滑，肺泡腔及间隔内无水肿、炎症等改变 (图 1A)。假手术组：仅术后 1 d 肺间质少量 PMN 浸润，其余时间点肺间质无 PMN 浸润，肺组织未见明显水肿、炎症表现 (图 1B-E)。模型组：各时间点均见肺泡腔、间质内 PMN 渗出、浸润，随着梗阻时间延长，肺组织病理改变呈现进行性加重，7 d 可见肺泡腔内较多渗出液，肺泡间隔增厚、结构破坏，丧失连续性，部分严重者肺泡塌陷、不张，肺间质不同程度出血表现 (图 1F-I)。

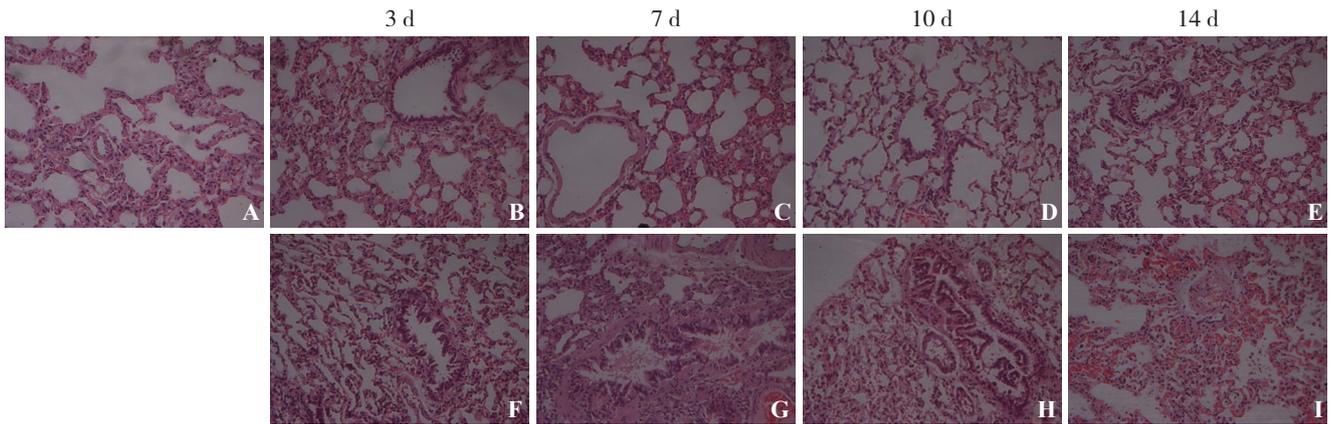


图 1 大鼠肺组织病理改变 (HE × 200) A: 正常对照组; B-E: 假手术组 (分别为术后 3、7、10、14 d); F-I: 模型组 (分别为术后 3、7、10、14 d)

Figure 1 Pathological findings of the rat lung tissues (HE × 200) A: Normal control group; B-E: Sham group (postoperative day 3, 7, 10, 14 respectively); F-I: Model group (postoperative day 3, 7, 10, 14 respectively)

2.2 BLAF 中 PMN 凋亡率与 MMP-9 活性改变

正常对照组大鼠 BLAF 中 PMN 凋亡率为 (70.58 ± 3.76) %、MMP-9 含量为 (14.08 ± 3.07) ng/mL; 假手术组大鼠术后各时间点 BLAF PMN 凋亡率及

MMP-9 含量与正常对照组间的差异均无统计学意义 (均 P > 0.05); 与假手术组比较, 模型组大鼠 PMN 凋亡率逐渐下降, MMP-9 活性逐步增加, 各时间点的差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (表 1)。

表 1 假手术组与模型组大鼠 BLAF PMN 凋亡率、MMP-9 活性的变化

Table 1 Alterations of PMN apoptosis and MMP-9 activity in the BALF of sham group and model group

组别	PMN 凋亡率 (%)				MMP-9 (ng/mL)			
	3 d	7 d	10 d	14 d	3 d	7 d	10 d	14 d
假手术组	68.54 ± 6.73	64.70 ± 7.87	72.25 ± 7.49	71.25 ± 5.92	15.95 ± 2.81	15.35 ± 2.53	14.59 ± 2.82	14.32 ± 2.55
模型组	34.38 ± 5.18 ¹⁾	25.60 ± 4.91 ¹⁾	23.59 ± 4.27 ¹⁾	25.71 ± 5.22 ¹⁾	42.75 ± 3.99 ¹⁾	48.38 ± 5.80 ¹⁾	57.34 ± 5.61 ¹⁾	59.97 ± 5.28 ¹⁾

注: 1) 与假手术组相应时间点比较, P < 0.05

Note: 1) P < 0.05 vs. sham group at the same time point

2.3 肺组织 occludin 免疫组化结果

正常对照组 occludin 蛋白在肺泡上皮细胞胞膜、胞质呈连续的表达, 其 PSA 为 (45.95 ± 4.60) % (图 2A)。假手术组各时间点 occludin 蛋白的表达与正常对照组无明显差异 (图 2B-E)。模型组

肺泡上皮细胞 occludin 蛋白在 3 d 时间点仍为连续表达, 但 7、10、14 d 时间点胞膜呈明显断裂的表达, 并且胞膜、胞质的表达随造模后时间延长而减少 (表 2) (图 2F-I)。

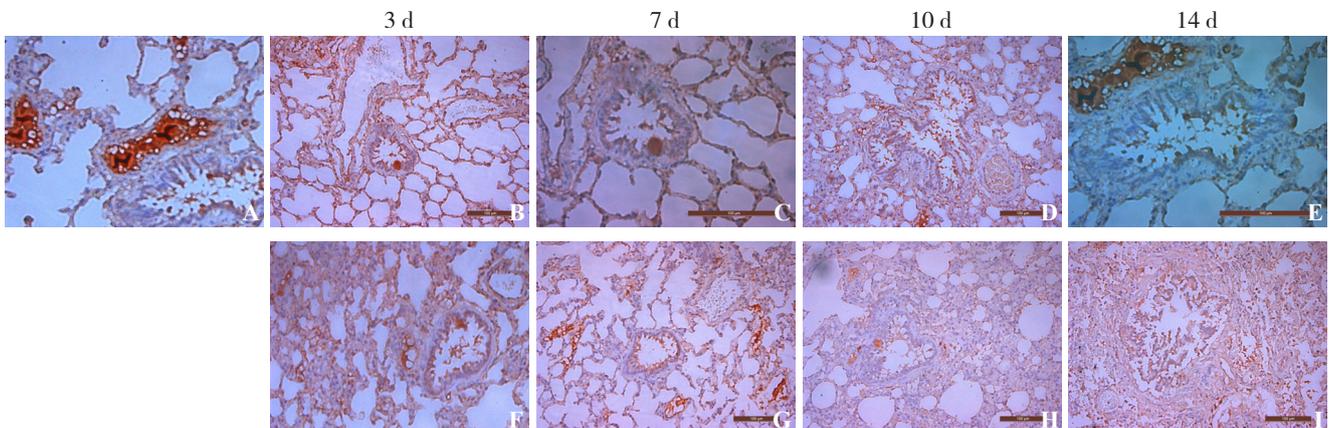


图 2 免疫组化检测肺泡上皮 occludin 蛋白的表达 (× 400) A: 正常对照组; B-E: 假手术组 (分别为术后 3、7、10、14 d); F-I: 模型组 (分别为术后 3、7、10、14 d)

Figure 2 Immunochemical staining for occluding protein expression in the alveolar epithelial cells A: Normal control group; B-E: Sham group (postoperative day 3, 7, 10, 14 respectively); F-I: Model group (postoperative day 3, 7, 10, 14 respectively)

2.4 LPI 改变

正常对照组 LPI 为 $(1.94 \pm 0.17)\%$ ，假手术组术后给时间点的 LPI 与正常对照组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)；与假手术组比较，模型组

大鼠 LPI 在术后 3 d 变化不明显 ($P > 0.05$)，但 7 d 后 LPI 呈进行性增加，7~14 d 各时间点的差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 假手术组与模型组大鼠肺组织 occludin 蛋白 PSA 与 LPI 的变化

Table 2 Alterations of PSA for occluding protein and LPI in lung tissues of sham group and model group

组别	PSA (%)				LPI (%)			
	3 d	7 d	10 d	14 d	3 d	7 d	10 d	14 d
假手术组	42.76 ± 4.12	42.09 ± 4.50	44.72 ± 6.55	45.99 ± 7.09	2.09 ± 0.21	1.93 ± 0.16	1.90 ± 0.17	1.89 ± 0.20
模型组	40.84 ± 5.43	$33.71 \pm 5.81^{1)}$	$23.88 \pm 6.30^{1)}$	$20.18 \pm 4.79^{1)}$	2.08 ± 0.19	$3.10 \pm 0.20^{1)}$	$3.50 \pm 0.29^{1)}$	$5.81 \pm 0.39^{1)}$

注：1) 与假手术组相应时间点比较， $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. sham group at the same time point

2.5 相关性分析

通过 Pearson 相关性分析表明，模型组大鼠 BLAF PMN 凋亡率与 MMP-9 活性呈负相关 ($r = -0.935$, $P < 0.001$)，MMP-9 活性与肺组织 occludin 蛋白 PSA 呈负相关 ($r = -0.796$, $P < 0.001$)，肺组织 occludin 蛋白 PSA 与 LPI 呈负相关 ($r = -0.800$, $P < 0.001$)。

3 讨论

梗阻性黄疸时，大量内毒素进入血液循环，形成内毒素血症^[7-8]，造成肝细胞损伤、Kupffer 细胞功能抑制，内毒素除直接损伤肺组织外，还通过刺激机体释放大促炎因子作用于肺脏，并促使大量 PMN 从血管游走、聚集于肺组织，导致引起炎性肺损伤^[5]。因此，肺脏是梗阻性黄疸造成全身性病理损伤的靶器官之一。本实验发现，各时间点 BDO 大鼠肺泡腔、间质内 PMN 渗出、浸润。随着梗阻时间延长，肺组织病理损伤呈现进行性加重，术后 7 d 可见肺泡腔内较多渗出液，肺泡间隔增厚、结构破坏，丧失连续性，甚至部分肺泡塌陷、不张，肺间质不同程度出血等。这表明 BDO 大鼠均存在不同程度的肺损伤，其损伤在胆总管结扎的早期表现较轻，BDO 7 d 之后病理改变逐步加重。然而，梗阻性黄疸造成肺损伤的机制尚未研究清楚。

PMN 在炎症反应中扮演重要角色^[9]，其渗出血管，游走、浸润外周组织，触发炎症反应，并以凋亡的方式被机体及时清除，有利于炎症的局限与消退^[10]。但在病理状态下^[11-12]，PMN 凋亡的延迟或减少，将可造成滞留外周组织 PMN 数量增多、功能增强，引起活性氧自由基、蛋白水解酶与炎症介质的释放，导致炎症反应的持续与加强，在得不到有效调控的情况下，可进一步引发炎症

“瀑布效应”，甚至诱发全身炎症反应综合征^[13]。笔者的前期实验^[14-16]表明，BDO 大鼠外周血 PMN 凋亡延迟、趋化性增强与 IL-8 活性异常升高容易导致机体的过度炎症反应，是梗阻性黄疸诱发一系列感染并发症与器官损伤的重要因素。本实验通过检测 BDO 大鼠 BALF PMN 凋亡情况，发现 PMN 凋亡率从术后 3 d 的 $(34.38 \pm 5.18)\%$ 逐步降至 14 d 的 $(25.71 \pm 5.22)\%$ ，低于假手术组相应时间点，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，表明 BALF PMN 凋亡减少，PMN 数量增多，引发肺组织过度炎症反应，可能是造成肺损伤原因之一。

MMP-9 是 MMPs 家族中重要的成员之一，又称明胶酶 B，来源于成熟的 PMN，属于降解基底膜及细胞外基质蛋白的肽链内切酶，对细胞外基质成分有降解作用，参与炎症反应与组织器官的损伤^[17]。实验结果发现，BDO 大鼠 BALF 上清液 MMP-9 活性明显增强，并随着梗阻时间延长逐渐升高，从术后 3 d 的 (42.75 ± 3.99) ng/mL 升高至术后 14 d 的 (59.97 ± 5.28) ng/mL，明显高于假手术组相应时间点，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步相关性分析发现，BDO 大鼠 BALF PMN 凋亡率与 MMP-9 活性呈负相关关系。这表明 BDO 大鼠 BLAF 存活的 PMN，在引发炎症反应的同时，通过释放 MMP-9 来放大炎症反应，促进肺损伤的发生发展。据报道，MMP-9 还可通过水解作用造成肺泡上皮屏障的紧密连接蛋白、黏附蛋白损伤，导致肺泡通透性增加，加重肺损伤^[18]。本研究结果表明，BDO 大鼠 BLAF MMP-9 活性与肺组织 occludin 蛋白阳性反应面积呈负相关关系，并且 occludin 蛋白阳性反应面积逐渐减少，提示 MMP-9 活性增强可能是造成 occludin 蛋白减少与后续肺组织病理损伤逐渐加重的原因之一。

正常肺泡上皮细胞具有重要的屏障功能，不

仅能防止肺泡腔内吸入的有害物质侵入肺组织,而且能限制液体和蛋白质过多地渗入到肺泡腔^[19]。该功能的维护依赖于肺泡上皮细胞间的紧密连接(tight junction, TJ),黏附连接、桥粒和缝隙连接,其中前者在维护屏障的完整性中起了关键作用^[19]。occludin 蛋白属于 TJ 特征性蛋白,是构成肺泡上皮屏障的结构基础^[4]。肺泡上皮细胞损伤,细胞间 TJ 受到破坏,屏障功能受损,上皮通透性增高使大量水和蛋白质进入肺泡腔,进而导致肺水肿的发生,是急性肺损伤发生发展的重要病理生理基础^[19-20]。本研究结果显示,BDO 大鼠肺组织 occludin 蛋白与 LPI 的改变呈负相关关系。由此推测,BDO 大鼠肺组织 occludin 蛋白减少,引起肺泡上皮细胞间 TJ 破坏,细胞间隙增大,导致肺泡上皮细胞屏障功能的损伤和肺泡通透性的增加,是梗阻性黄疸造成肺损伤的重要因素。进一步结果显示,BDO 3 d 大鼠肺组织 occludin 蛋白、LPI 无明显改变,但 7 d 之后,大鼠肺组织 occludin 蛋白明显减少、LPI 明显增加。这表明 BDO 大鼠肺组织的损伤是一个渐进的过程,起初仅为肺组织炎症反应的损伤,逐步进展为肺上皮细胞结构破坏与屏障功能受损,与文献报道梗阻性黄疸肺组织病理改变进行性加重的结果一致^[5]。

综上所述,BDO 大鼠肺泡 PMN 凋亡减少,MMP-9 活性增强,不仅引发肺内炎症反应持续与加强造成肺组织损伤,而且随着梗阻时间的延长,可能通过引起肺泡上皮细胞 occludin 蛋白减少,肺泡通透性增加,导致肺泡上皮屏障功能破坏,在梗阻性黄疸诱发和加重急性肺损伤的病理过程中具有重要的作用与意义。

参考文献

- [1] Ma HJ, Huang XL, Liu Y, et al. Sulfur dioxide attenuates LPS-induced acute lung injury via enhancing polymorphonuclear neutrophil apoptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(8):983-990.
- [2] Lin WC, Lin CF, Chen CL, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis via sphingolipid signaling in acute lung injury[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339(1):45-53.
- [3] 李顺乐,陈熹,张心武,等. 卡托普利在大鼠重症急性胰腺炎肺损伤中的保护作用[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(12):2742-2745.
- [4] Wray C, Mao Y, Pan J, et al. Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(2):L219-227.
- [5] 朱敏,黄美英,陈伟新,等. 乌司他丁对梗阻性黄疸大鼠肺的保护作用[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(11):1208-1212.
- [6] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1):265-275.
- [7] Sewnath ME, van der Poll T, van Noorden CJ, et al. Cholestatic interleukin-6-deficient mice succumb to endotoxin-induced liver injury and pulmonary inflammation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169(3):413-420.
- [8] 吴涌宏. 内毒素血症在梗阻性黄疸发生发展中作用的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(8):912-915.
- [9] 脱红芳,李宁波,王丽,等. 急性胰腺炎患者中性粒细胞抗感染功能的相关研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(3):354-357.
- [10] Wright HL, Chikura B, Bucknall RC, et al. Changes in expression of membrane TNF, NF- κ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(3):537-543.
- [11] Chiu DF, Chen JC, Chen HM, et al. Results of treating severe acute pancreatitis with gabexate is associated with neutrophil apoptosis activity[J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50(50):553-558.
- [12] Fotouhi-Ardakani N, Kebir DE, Pierre-Charles N, et al. Role for myeloid nuclear differentiation antigen in the regulation of neutrophil apoptosis during sepsis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(3):341-350.
- [13] Bedirli A, Kerem M, Ofluoglu E, et al. Administration of *Chlorella* sp. microalgae reduces endotoxemia, intestinal oxidative stress and bacterial translocation in experimental biliary obstruction[J]. *Clin Nutr*, 2009, 28(6):674-678.
- [14] 邓雪松,倪勇,高海斌,等. 胆道梗阻大鼠中性粒细胞凋亡与 IL-8 水平的关系[J]. *岭南现代临床外科杂志*, 2008, 8(2):120-122.
- [15] 汪长浩,邓雪松,倪勇,等. 胆道梗阻大鼠中性粒细胞趋化性与 IL-8 水平改变的意义[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2011, 21(5):257-260.
- [16] 邓雪松,倪勇,王成友,等. Caspase-3 活性改变对胆道梗阻大鼠中性粒细胞凋亡的影响[J]. *安徽医学*, 2012, 33(12):1620-1623.
- [17] Teng L, Yu M, Li JM, et al. Matrix metalloproteinase-9 as new biomarkers of severity in multiple organ dysfunction syndrome caused by trauma and infection[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360(1/2):271-277.
- [18] Pirrone F, Pastore C, Mazzola S, et al. In vivo study of the behaviour of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) in mechanical, hypoxic and septic-induced acute lung injury[J]. *Vet Res Commun*, 2009, 33(Suppl 1):121-124.
- [19] Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment[J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2010, 23(4):243-252.
- [20] Singh NR, Johnson A, Peters AM, et al. Acute lung injury results from failure of neutrophil de-priming: a new hypothesis[J]. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42(12):1342-1349.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 邓雪松,詹勇强,汪长浩,等. 肺泡中性粒细胞凋亡与 occludin 蛋白改变在胆道梗阻大鼠肺损伤中的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(2):186-191. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.010

Cite this article as: DENG XS, ZHAN YQ, WANG CH, et al. Impact of altered alveolar neutrophil apoptosis and occludin protein on lung injury in rats with bile duct obstruction[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(2):186-191. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.010