·论著·

血红素类物质与哮喘发作关系的初步探讨

王虹¹, 栾维莉¹, 宋丽颖¹, 李华强²

(1. 中国人民解放军第463医院儿科, 辽宁沈阳 110042; 2. 重庆第三军医大学大坪医院儿科, 重庆 400042)

[摘要] 目的 探讨血红素类物质在哮喘中的变化及与哮喘发作的关系。方法 60只豚鼠随机分为正常对照组、哮喘、哮喘自然缓解、地塞米松、血红素氧合酶-1(HO⁻¹)特异性激动剂血晶素和抑制剂锡原卟啉6组。每组均检测肺组织病理和HO⁻¹的蛋白表达(免疫组化染色法),应用分光光度法检测肺组织HO⁻¹活性、血一氧化碳血红蛋白(COHb)和NO含量,放射免疫竞争抑制法测定肺环磷酸鸟苷(cGMP)。结果 哮喘组和血晶素组肺HO⁻¹活性;血COHb;NO;肺cGMP含量与正常组比较,差异非常显著(*t*值分别为5.69,9.29,6.28,10.19,5.77,8.92,9.74,6.96,*P*<0.01),血晶素组更为显著。肺HO⁻¹活性:每小时(1449±426)pmol/mg;血COHb(7.43±2.07)%;血NO(90.9±16.7)μmol/L;肺cGMP:(1.96±0.65)pmol/mg;肺有明显的嗜酸细胞浸润,HO⁻¹蛋白表达4级。锡原卟啉抑制、地塞米松防治和哮喘自然缓解组各项检测指标显著下降,与哮喘组比较差异显著(*P*<0.01)。结论 哮喘时,体内血红素代谢产物CO和NO、降解血红素的HO⁻¹酶类及其血红素酶类增加;血红素类物质增加,可能参与哮喘气道高反应性。

[关键词] 血红素;血红素氧合酶-1;一氧化碳;哮喘;豚鼠

[中图分类号] R562.2⁺5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)04-0244-04

Relationship between Heme Substances and Asthmatic Attack

WANG Hong, LUAN WeiLi, SONG Li Ying, et al.

Department of Pediatrics, PLA 463 Hospital, Shenyang 110042, China

Abstract: **Objective** To explore the change of heme substances in asthma and the relationship between heme substances and asthmatic attack. **Methods** Sixty guinea pigs were equally separated into 6 groups. Except for normal control group (NCG), asthmatic models were divided into 5 groups. Two of them were treated with the specific stimulator (hemin) and the inhibitor (Sn-PP) of HO⁻¹ respectively, the other group received dexamethasone as a preventive measure, and the last were asthmatic and nature rescuing asthmatic groups (NRAG). In all the tested animals, the COHb and NO in blood, lung HO⁻¹ activity, and lung cGMP were examined. The lung tissues were pathologically observed and stained immunohistochemically. **Results** In the asthmatic (AG) and heme stimulated groups (HG), the levels of the COHb, NO, lung HO⁻¹ activity and cGMP were significantly increased compared with NCG (*t* values were 5.69 in AG, 9.29 in HG, 6.28, 10.19, 5.77, 8.92, 9.74, 6.96, *P*<0.01, respectively). Lung HO⁻¹ activities were (1449±426) pmol/mg. COHb in blood (7.43±2.07)%, NO in blood (90.9±16.7) μmol/L, lung cGMP (1.96±0.65) pmol/mg, and lung HO⁻¹ protein expression 4 grade in hemin stimulated group respectively. Whereas, in the Sn-pp inhibited, dexamethasone and NSAG groups, they were markedly reduced compared with the asthmatic group (*P*<0.01). **Conclusions** In asthma, the increased NO, cGMP induced by NOS and sGC, and HO⁻¹ protein suggest that heme substances catalyzed by HO are enhanced. These may be contributory to airway hyperresponsiveness.

Key words: Heme; Heme oxygenase-1; Carbon monoxide; Asthma; Guinea pig

血红素以广泛及多种形式存在于体内,包括细胞色素、组织血红素蛋白、肌红蛋白、血红蛋白、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS),可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)等,因它们的辅基或配位体都是由一个卟啉环整合一个金属离子(Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{4+} , Cd^{2+} 和 Co^{3+} 等)构成的金属卟啉,即血红素分子,因此都属于血红素类物质^[1]。近年来,许多研究表明哮喘发作时 NOS, sGC 等血红素类物质增加,参与哮喘的气道高反应性炎症^[2]。但此类物质是通过何种途径或者何种方式参与哮喘发病机制及其作用尚不清楚。本研究利用哮喘豚鼠模型及血晶素处理探讨此类问题。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

选择 2 月龄、饲养条件一致的健康雄性豚鼠 60 只,体重(150 ± 20) g,随机分为 6 组,每组 10 只。

正常对照组; 哮喘发作组(哮喘组); 血晶素激动组(血晶素组); 锡原卟啉抑制组(抑制组); 地塞米松防治组(地塞米松组); 哮喘自然缓解组(自然缓解组)。

1.2 哮喘模型制作和药物干预

参照以前的方法^[3],后 5 组在实验第 1, 4, 7 d 将 1% 卵蛋白(OVA)用 402 型超声雾化器面罩雾化吸入 3 min 致敏豚鼠,第 21 d 用 2% OVA 雾化吸入 5 min 诱发其哮喘发作;正常对照组用生理盐水代替 OVA 致敏豚鼠,诱发同哮喘组。血晶素组在诱发后 12 h 腹腔注射 1 次血晶素 125 μmol/kg(美国 Sigma 公司)。抑制组因锡原卟啉从给药时至峰值浓度的时间(即达峰时间)较血晶素长,故在诱发后 8h 腹腔注射 1 次锡原卟啉 125 μmol/kg(第三军医大学史源副教授赠送)。地塞米松组在实验第 16 d 给予地塞米松每日 0.5 mg/kg 腹腔注射,连续 6 d,诱发前 12 h 停药。自然缓解组诱发后任其自然缓解 11 d。实验过程中各组豚鼠因咬伤和摔伤等自然因素和诱导哮喘发作因素导致不同数目的死亡。

1.3 生化指标检测与方 法

1.3.1 标本采集 缓解组 11 d 后采集标本,其余各组在诱发后 24 h 采集标本。具体方法:实验豚鼠麻醉后,开胸暴露心脏,先经右心室采集血液标本,然后经左心室、主动脉灌注生理盐水,同时剪开左心耳,将血排净。将左肺门结扎摘除左肺后,经气管和主动脉灌注 4% 多聚甲醛固定右肺,分别用于以下

项目检测。

1.3.2 HO^{-1} 活性测定 根据我们以前所描述的原理与方法^[3]测定左肺匀浆上清液反应物中胆红素生成量代表 HO^{-1} 活性,在分光光度计上用 464 nm 和 530 nm 双波长测定(胆红素摩尔吸光系数为 0.025 nm/cm)^[4]。肺匀浆上清液蛋白含量测定采用劳里(Lowry)法。

1.3.3 一氧化碳血红蛋白(CO-Hb)双波长定量测定 参照乐宏元等^[5]法,新鲜血加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (保险粉),使样品中多组份的血红蛋白转化为 Hb 和 CO-Hb 两个组份,在分光光度计上用 420 nm 和 432 nm 两个波长测定全血 CO-Hb 的百分比含量(%)。

1.3.4 血浆一氧化氮(NO)水平测定 按试剂盒(军事医学院提供)说明操作,在分光光度计上 540 处测其吸光度,以 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ 浓度代表血浆 NO 含量(μmol/L)。

1.3.5 肺匀浆上清液 cGMP 测定 采用¹²⁵I 标记的环一磷酸鸟苷(¹²⁵I-cGMP)放射免疫竞争抑制分析法,按试剂盒(上海中医学院)说明操作。

1.4 肺组织光镜检查及免疫组化测定 HO^{-1} 蛋白表达

采用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋的肺组织块切片,厚度 5 μm,常规 HE 染色后光镜检查。免疫组织化学染色采用同种切片常规脱蜡,用 3% H_2O_2 孵育 5 min 后,加 10% 正常山羊血清置室温 10 min,滴加一抗(1:2500 鼠单克隆抗 HO^{-1} 抗体),4 过夜。再滴加生物素标记的二抗(1:200 羊抗鼠 IgG)孵育 30 min 后滴加 1:200 辣根酶标记的链霉卵白素,孵育 30 min 后用 3,3'-二氨基苯联胺(DAB)显色^[3],复染后封片。细胞浆呈现褐色或褐色颗粒为阳性细胞,采用图像分析法进行定量分析。具体方法:在光镜 10 × 10 放大倍数下,每一切片用目镜网格任选 25 个方形视场,在视场内取 25 个点,对其着色强度进行分级,结果表示为 0~4 级(阴性 0 级,微染色 1 级,弱染色 2 级,较强染色 3 级,强染色 4 级)。

1.5 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理用 *t* 检验、*F* 检验及直线相关分析。

2 结果

2.1 哮喘豚鼠模型临床表现及光镜所见

哮喘豚鼠模型均在致敏后第 21 d,用 2% OVA 诱导出典型的哮喘发作症状,如烦躁、咳嗽、打喷嚏、

呼吸深快,严重者口唇发绀等。地塞米松组症状较轻,正常对照组未出现前述症状。哮喘组和血晶素组与正常对照组比较,肺组织内浸润的炎性细胞数(尤其嗜酸粒细胞)明显增多,气道粘膜水肿、气道上皮部分脱落等改变,血晶素组更为显著。抑制组和地塞米松组见少量的炎性细胞浸润,气道粘膜无明显或轻微水肿,气道上皮尚完整。缓解组肺组织无异常改变。

2.2 肺组织 HO⁻¹活性的变化

哮喘组和血晶素组肺组织 HO⁻¹活性同时增加,与正常对照组比较,差异有显著性($t = 5.69, 9.29, P < 0.01$)。地塞米松组和抑制组其活性较哮喘组和血晶素组明显下降($t = 4.51, 6.47, P < 0.01$),抑制组抑制 HO⁻¹活性达 68%。缓解组略高于正常对照组($P > 0.05$)。经 F 检验,组间差异非常显著,见表 1。

表 1 豚鼠生化指标检测结果

Table 1. Biochemical Results of the Assays in Guinea Pig

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肺 HO ⁻¹ 活性(pmol/(mg 蛋白))	全血 CO 含量(%)	血浆 NO 含量(μ mol/L)	肺 cGMP 含量(pmol/mg)
正常对照组	9	193 $\pm$ 46	0.44 $\pm$ 0.21	31.9 $\pm$ 9.7	0.42 $\pm$ 0.13
哮喘组	8	881 $\pm$ 361 ^b	4.94 $\pm$ 2.15 ^b	69.7 $\pm$ 16.8 ^b	1.56 $\pm$ 0.32 ^b
血晶素组	7	1449 $\pm$ 426 ^{b,c}	7.43 $\pm$ 2.07 ^{b,c}	90.9 $\pm$ 16.7 ^{b,c}	1.96 $\pm$ 0.65 ^b
抑制组	8	285 $\pm$ 96 ^{a,d,e}	1.28 $\pm$ 0.60 ^{b,d,e}	29.0 $\pm$ 7.9 ^{d,e}	0.58 $\pm$ 0.12 ^{d,e}
地塞米松组	8	258 $\pm$ 46 ^{a,d}	0.82 $\pm$ 0.26 ^{a,d}	34.5 $\pm$ 11.2 ^d	0.53 $\pm$ 0.15 ^d
自然缓解组	6	312 $\pm$ 146 ^{a,d}	0.47 $\pm$ 0.22 ^d	34.7 $\pm$ 11.4 ^d	0.59 $\pm$ 0.25 ^d
F 检验值		33.25 ^f	35.38 ^f	30.71 ^f	32.41 ^f

注:与正常对照组比较 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与发作组比较 c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$; 与血晶素组比较 e: $P < 0.01$; f: $P < 0.001$

2.3 全血 COHb、血浆 NO、肺组织 cGMP 变化

哮喘组和血晶素组此三项检测指标与正常组比较,差异非常显著(t 值分别为:全血 COHb $t = 6.28, 10.19$;血浆 NO $t = 5.77, 8.92$;肺组织 cGMP $t = 9.74, 6.96$; P 值均 < 0.01)。地塞米松组和抑制组较哮喘组明显下降($t = 2.36 \sim 8.17, P < 0.01$)、仍略高于正常组($P < 0.05$)。缓解组与正常组之间无显著性差异($P > 0.05$)。此三项检测指标分别经 F 检验,组间差异均非常显著,见表 1。

肺组织 HO⁻¹活性与血 COHb 呈显著正相关($r = 0.7543, P < 0.001$)、与肺 cGMP 亦呈显著正相关($r = 0.8620, P < 0.001$)。血 COHb 和血浆 NO 分别与 cGMP 水平呈显著正相关($r = 0.7711, 0.7589, P < 0.001$)。

2.4 肺组织 HO⁻¹蛋白表达

肺组织 HO⁻¹蛋白免疫化学染色结果显示:哮喘组肺内 HO⁻¹蛋白增加,其支气管和血管平滑肌细胞、内皮细胞、气道上皮细胞、肺泡壁细胞和肺泡腔内渗出的嗜酸细胞等胞浆呈现褐色或褐色颗粒的阳性结果,染色程度(3~4 级)较正常组(0~1 级)明显加深,血晶素组较哮喘组染色更强(4 级以上)。抑制组和地塞米松组染色程度明显变浅(1~2 级),但仍然较正常对照组略深染。缓解组 0~1 级。

3 讨论

本研究参照 Huston 法制作的哮喘豚鼠模型在诱发 1~3 min 内均出现了典型的哮喘发作症状,如烦躁、打喷嚏、咳嗽、呼吸深快,口唇发绀等。光镜检查显示肺组织嗜酸细胞浸润等明显增多,说明哮喘模型制作成功。

本组实验证明,哮喘豚鼠肺组织 HO⁻¹蛋白合成和活性明显增加。血晶素的铁原卟林环能与 HO 系统(由 HO⁻¹、HO⁻²和 HO⁻³构成)产生氧化偶联的特异性结合作用,因 HO⁻²和 HO⁻³几乎不能被诱导^[6],因此血晶素诱导的 HO 系统蛋白合成和活性增加,主要是 HO⁻¹。故血晶素是 HO⁻¹的特异性激动剂,它在加重哮喘症状的同时,能使肺组织 HO⁻¹蛋白合成和活性增加更明显。由于 HO 系统不能识别金属原卟林的金属部分,而只是特异地识别卟林环的侧链,因此非生理性金属卟啉如锡原卟啉能有效的与铁原卟啉竞争,抑制血红素氧合酶的活性,使肺组织 HO⁻¹活性降低,从而明显减轻哮喘的症状,本研究发现锡原卟啉使肺组织 HO⁻¹活性降低 68%,与文献报道^[6]的短期内有效抑制率达 50%~70%相一致。这提示 HO⁻¹参与了哮喘气道的高反

性,同时提示哮喘时血红素类物质增加,诱导了 HO^{-1} 蛋白合成和活性增加。

本组实验豚鼠无吸烟及CO中毒史,所以全血COHb含量能代表内源性CO水平。哮喘豚鼠体内内源性CO水平在发作期伴随 HO^{-1} 蛋白和活性水平升高而上升,而在恢复期随着 HO^{-1} 水平下降而降低,这提示 HO^{-1} 与CO在哮喘发病机制中存在着一定的联系。Maines等^[6]认为HO系统是产生内源性CO的唯一途径,血红素经HO系统降解生成胆红素和CO,而经其它方式降解的血红素不生成CO。因此,哮喘时体内 HO^{-1} 产物CO水平升高,也提示体内血红素类物质增加。

实验结果还显示哮喘时体内cGMP增加与血红素代谢产物CO增加相关。已证明CO与NO一样具有第二信使分子样作用,它与可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)结合而激活sGC^[2],间接介导cGMP生成增加^[6],介导哮喘的病理生理过程,如哮喘导致缺氧时,由NO介导内皮细胞释放内皮细胞衍化松弛因子(EDRF)的机制受抑制,主要依靠CO^[6,7]直接或间接通过cGMP抑制内皮素-1(ET-1)诱导气道平滑肌细胞强烈收缩和增生肥大的作用,可使气道阻力减少而缓解缺氧状态,这在缓解哮喘症状方面具有很重要的作用。但另一方面, HO^{-1} ,CO和cGMP又能促进肺巨噬细胞、肥大细胞、嗜酸细胞等合成和释放炎症介质和细胞因子,如组胺、白三

烯、血小板活化因子、前列腺素、IL-1,IL-4,IL-5和肿瘤坏死因子(TNF-)等,从而参与哮喘气道的变应性炎症,进而又导致气道平滑肌收缩、增生肥大,使气道阻力增加而增强哮喘的气道高反应性。因此, HO^{-1} 降解的血红素产物CO和cGMP在哮喘中的双重作用及相互作用需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] 王虹,综述. 血红素加氧酶的研究进展[J]. 国外医学儿科学分册 1999,26(增刊): 95-99.
- [2] Zayasu K, Sekizawa K, Okinaga S, et al. Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156 (4 Part 1): 1140-1143.
- [3] 王虹,李华强,潘捷. 哮喘豚鼠血红素氧合酶1的表达与调节[J]. 中华结核和呼吸杂志,1999,22(10): 605-609.
- [4] Yet SF, Pellacani A, Patterson C, et al. Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cell [J]. J Biol Chem, 1997, 272(7): 4295-4301.
- [5] 乐宏元,宋小兴,刘和平. 一氧化碳血红蛋白双波长定量测定[J]. 临床检验杂志,1996,14(2): 87-88.
- [6] Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997, 37: 517-554.
- [7] Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide [J]. J Clin Invest, 1995, 96(12): 2676-2682.

(本文编辑:尹飞)

国家级继续医学教育项目 ——小儿脑水肿与颅内高压诊治进展学习班通知

小儿急性脑水肿与颅高压是儿科临床较常见的危急症。近20余年,湖南医科大学附属湘雅医院儿科对小儿脑水肿及颅高压的基础和临床作了大量的研究工作,在国内外有一定的影响。为了提高我国儿科医务人员对脑水肿的理论和临床认识,经卫生部继续医学教育委员会批准,由湘雅医院儿科于2000年11月15日开始主办《小儿脑水肿与颅内高压诊治进展学习班》(项目编号:990601017),学分25分。教学内容,包括其病因、病理、临床表现、诊断、治疗、前囟门压力监测、渗透压、呼吸模式与脑水肿关系及动物模型制作。该班由全国知名小儿脑水肿专家虞佩兰、杨于嘉教授主讲,同时中国当代儿科杂志编辑部将派人参加,欢迎儿科及相关各科医务工作者报名参加,欢迎携带有关论文参加学术活动,中国当代儿科杂志社将择优刊登有关学术论文。

为便于寄发正式通知,请有意者速与湘雅医院儿科教研室。地址:湖南省长沙市湘雅路141号 湖南医科大学附属湘雅医院儿科教研室,李清香同志。邮政编码:410008;电话:0731-4327208,传真:0731-4327402。

中国当代儿科杂志编辑部