

论著·实验研究

褪黑素对高氧致新生鼠慢性肺疾病 肺组织氧化/抗氧化系统的影响

潘丽,许巍,富建华,薛辛东

(中国医科大学附属盛京医院儿科,辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 探讨近年来发现的高效抗氧化剂褪黑素(MT)对高氧致新生鼠慢性肺疾病(CLD)肺组织氧化/抗氧化系统的影响。方法 采用高氧暴露($\text{FiO}_2 = 0.85$)致新生鼠 CLD 模型,足月新生鼠共 90 只随机分为 3 组(每组 30 只):空气对照组、高氧对照组、MT 治疗组。空气对照组置于空气中,高氧对照组、MT 治疗组(连同母鼠)置于玻璃氧箱中,维持 FiO_2 为 0.85;MT 治疗组于生后 0 d 高氧暴露前 30 min 和生后每天给予 MT 4 mg/kg 腹腔注射直至实验结束。每组分别于实验后 3,7,14 d 随机选取 10 只处死,观察肺组织形态改变,分别测定肺组织中总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、髓过氧化物酶(MPO)、过氧化氢酶(CAT)、NO 水平(以 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 衡量)以及丙二醛(MDA)含量改变。结果 MT 治疗组病理改变明显减轻。空气对照组、高氧对照组、MT 治疗组 T-AOC, SOD, GSH-Px 及 CAT 活性随实验时间的延长均逐渐升高,但空气对照组、高氧对照组两组比较各项指标差异均无显著性($P > 0.05$),MT 治疗组各项指标在实验各时点与空气对照组、高氧对照组相比均明显升高($P < 0.05$)。高氧对照组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, MDA 水平以及 MPO 含量在 3,7,14 d 均高于空气对照组($P < 0.05$ 或 0.01)。MT 治疗组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, MDA 水平以及 MPO 含量则明显降低,与高氧对照组比较差异具有显著性($P < 0.05$)。结论 MT 通过提高肺组织的抗氧化能力、抑制氧化应激反应,从而逆转了高氧致新生鼠 CLD 肺组织氧化/抗氧化系统失衡。 [中国当代儿科杂志,2009,11(7):581-584]

[关键词] 自由基;抗氧化酶;肺损伤;褪黑素;高氧;大鼠,新生

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)07-0581-04

Effect of melatonin on hyperoxia-induced oxidant/antioxidant imbalance in the lung of neonatal rats with chronic lung disease

PAN Li, XU Wei, FU Jian-Hua, XUE Xin-Dong. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Xue X-D, Email: xdxue@cmu2h.com)

Abstract: Objective To study the effect of melatonin, a potent antioxidant both *in vitro* and *in vivo*, on hyperoxia-induced oxidant/antioxidant imbalance in the lung of neonatal rats with chronic lung disease (CLD). **Methods** Ninety neonatal rats were randomly divided into three groups ($n = 30$ each): air-exposed, hyperoxia-exposed, melatonin-treated (4 mg/kg melatonin was administered 30 minutes before hyperoxia exposure and once daily after exposure). CLD was induced by hyperoxia exposure ($\text{FiO}_2 = 0.85$). Lung specimens were obtained 3, 7, and 14 days after exposure ($n = 10$ each) for histopathologic examination. The levels of total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), myeloperoxidase (MPO), catalase (CAT), nitrite/nitrate, and malondialdehyde (MDA) in the lung were assayed by the spectrophotometer. **Results** The histopathologic examination showed that lung damage was obviously alleviated in the melatonin-treated group. The levels of T-AOC, GSH-Px, SOD and CAT in the lung were significantly higher in the melatonin-treated group than those in the other two groups at all time points ($P < 0.05$). The levels of MPO, nitrite/nitrate and MDA in the lung increased significantly in the untreated hypoxia-exposed group compared with those in the air-exposed group at all time points ($P < 0.05$ or 0.01), while the levels of MPO, nitrite/nitrate and MDA in the melatonin-treated group were significantly reduced as compared with the untreated hypoxia-exposed group ($P < 0.05$). **Conclusions** Melatonin may reverse oxidant/antioxidant imbalance in hyperoxia-induced lung disease, thus providing a protective effect against CLD in neonatal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (7):581-584]

Key words: Free radical; Antioxidant; Lung damage; Melatonin; Hyperoxia; Neonatal rats

[收稿日期]2008-07-12; [修回日期]2008-09-22

[基金项目]国家自然科学基金(编号 304440056)

[作者简介]潘丽,女,博士研究生,医师。主攻方向:新生儿专业。

[通讯作者]薛辛东,男,教授,中国医科大学盛京医院儿科,邮编:110004。

氧化/抗氧化系统失衡导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度蓄积而造成的损伤,在慢性肺疾病(chronic lung diseases, CLD)发生发展过程中的意义已经得到了学术界的公认,抗氧化治疗也一直是当今研究的热点^[1]。松果体分泌的褪黑素(melatonin, MT)在20世纪90年代初被发现具有高效自由基清除和抗炎作用^[2], Gitto等^[3]将MT应用于呼吸窘迫综合征(RDS)和CLD患儿,发现MT可减轻炎症反应,缩短上机时间,改善临床结局,但MT在CLD中的具体作用机制尚不清楚。本研究利用吸入氧浓度为85%的新生鼠制造CLD模型,并用MT进行防治,动态观察肺组织形态改变,监测肺组织总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性、一氧化氮(NO)以及丙二醛(MDA)含量、髓过氧化物酶(MPO)改变,以阐明MT对CLD氧化/抗氧化系统的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

成年Wistar大鼠由中国医科大学实验动物部提供。MT购自美国Sigma公司, T-AOC, SOD, GSH-Px, CAT, NO水平(以 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 衡量)以及MDA和MPO测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的建立及分组 成年Wistar大鼠雌雄交配(4:1),收集自然分娩的新生鼠共90只,生后12h内随机分为3组(每组30只):空气对照组,高氧对照组,MT治疗组。后两组(连同母鼠)置于玻璃氧箱(60 cm × 50 cm × 40 cm)中,持续输入氧气,氧流量2~3 L/min,维持 $\text{FiO}_2 = 0.85 \pm 0.02$ (美国OM-25ME型测氧仪监测)。钠石灰吸收 CO_2 ,使其浓度 $<0.5\%$ (Dapex气体分析仪),温度22~25℃,湿度60%~70%。每天定时开箱15 min,添水、饲料及更换垫料,并与空气对照组交换母鼠以免因氧中毒而致喂养能力下降。空气对照组吸入空气,具体方法及实验控制因素同高氧对照、MT治疗组。MT治疗组于生后0 d高氧暴露前30 min和生后每天给予MT 4 mg/kg腹腔注射直至实验结束,空气对照和高氧对照组给予等量1%乙醇注射(1%乙醇为MT的溶剂)。

1.2.2 标本收集 每组分别于实验后3,7,14 d随机选取10只,5%水谷氯醛(chloral hydrate)腹腔

注射(0.6 mL/100 mg)麻醉后,分离气管,打开胸腔,暴露心肺,分离左侧支气管并经左支气管缓慢注入4%多聚甲醛至左肺,然后置于4%多聚甲醛中,4℃过夜,石蜡包埋,制作5 μm组织切片,用于肺组织形态学观察。取右肺组织,用预冷的生理盐水洗净残血,吸干水分,置于Eppendorf管中,液氮速冻,-80℃冰箱保存。

1.2.3 实验方法及结果分析 实验步骤按试剂盒说明书进行。应用紫外/可见分光光度计(日本岛津UV-160A)测定其OD值,根据所给公式,分别进行计算。

1.3 统计学分析

应用SPSS 11.5统计软件进行统计学处理,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结 果

2.1 肺组织形态学改变

光镜下,空气对照组3 d表现为肺泡样结构不规则,肺泡腔小,肺泡间隔较厚;7 d肺泡结构逐渐规整,大小较均匀,肺泡间隔变薄;14 d肺泡大小均匀一致,肺泡间隔更薄,肺泡化基本完成。高氧对照组3 d肺泡腔内有少许红细胞渗出、肺泡间隔有炎性细胞浸润;7 d时仍可见出血、肺水肿、炎症细胞浸润、间质细胞增多,并出现终末气腔扩张、小肺泡数量减少、肺泡分隔减少等;14 d时正常肺泡结构消失,数量减少,肺泡腔直径变大,肺分隔明显减少,局部肺泡间隔增厚,出现小灶或多灶性实变;MT治疗组病理改变明显减轻,7 d时肺泡腔内散在红细胞渗出,间隔少量炎细胞浸润;14 d肺泡大小基本均匀一致,间隔增厚不明显,14 d时各组肺组织病理改变见图1。

2.2 肺组织抗氧化酶活性的改变

各组T-AOC, SOD, GSH-Px及CAT活性随实验时间的延长均逐渐升高,但两个对照组比较各指标差异无显著性($P > 0.05$)。MT治疗组T-AOC, GSH-Px, SOD, CAT活性在实验各时点与空气对照组,高氧对照组两组比较均明显升高($P < 0.05$),见表1。

2.3 肺组织NO水平改变

NO水平用 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 来衡量。随吸氧时间的延长,高氧对照组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 明显升高,7 d达峰,与空气对照组比较差异具有显著性($P < 0.01$),MT治疗组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平则明显降低,与高氧对照组比较差异具有显著性($P < 0.05$),见图2。

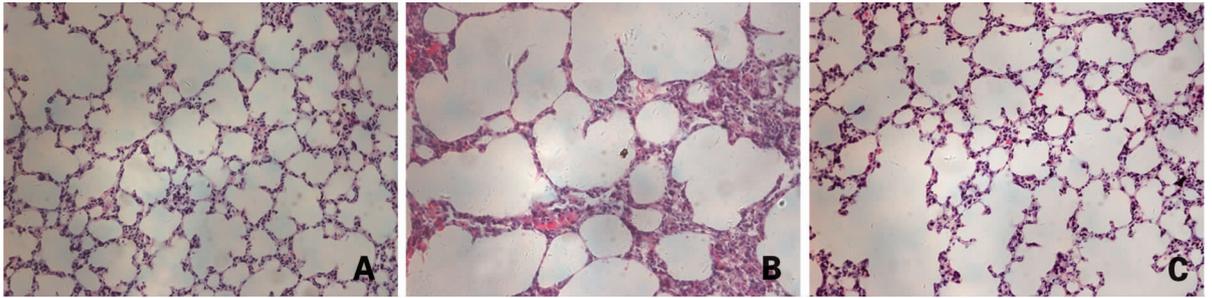


图1 各组14 d时肺组织病理改变(苏木精-伊红染色×200) A:空气对照组,肺泡结构基本规整,大小均匀一致,肺泡间隔较薄,肺泡化基本完成; B:高氧对照组,正常肺泡结构消失,数量减少,肺泡腔直径变大,肺分隔明显减少,局部肺泡间隔增厚,出现小灶或多灶性实变; C:MT治疗组,肺组织病理损伤较高氧组明显减轻,肺泡大小基本均匀一致,间隔增厚不明显。

表1 MT对CLD肺组织T-AOC,SOD,GSH-Px及CAT活性的影响

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

组别	T-AOC			SOD(nU/mg 肺组织)			GSH-Px(U/mg 肺组织)			CAT(U/mg 肺组织)		
	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d
空气对照	29.9±1.7	78.6±1.3	89.9±0.9	28.9±3.0	68.6±3.3	73.7±2.6	2.6±1.7	3.9±0.9	4.8±1.6	6.0±2.1	8.3±2.9	9.0±2.2
高氧对照	31.4±1.3	82.7±0.9	87.2±1.7	36.5±1.5	70.2±2.4	72.8±4.8	2.9±0.5	4.1±1.2	5.0±0.7	6.9±1.9	9.5±2.5	10.4±1.1
MT治疗	46.5±1.6 ^a	102.7±1.8 ^a	122.3±0.8 ^a	44.4±1.9 ^a	105.1±8.5 ^a	119.7±10.2 ^a	4.9±1.0 ^a	9.1±0.6 ^a	11.1±1.3 ^a	9.7±1.9 ^a	25.0±2.1 ^a	29.9±2.1 ^a

a:与空气对照组和高氧对照组相比, $P < 0.05$

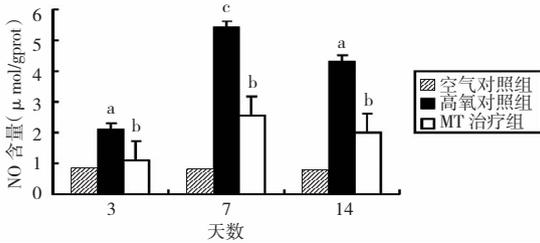


图2 MT对CLD肺组织NO水平动态变化的影响 ($\bar{x} \pm s$) a:与空气对照组相比, $P < 0.05$; b:与高氧对照组相比, $P < 0.05$; c:与空气对照组相比, $P < 0.01$

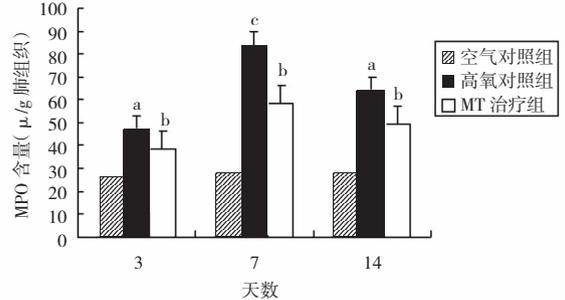


图4 MT对CLD肺组织MPO动态变化的影响 ($\bar{x} \pm s$) a:与空气对照组相比, $P < 0.05$; b:与高氧对照组相比, $P < 0.05$; c:与空气对照组相比, $P < 0.01$

2.4 肺组织MDA含量改变

实验各时点高氧对照组MDA水平均明显高于空气对照组($P < 0.05$ 或 0.01),MT治疗组MDA水平较高氧对照组显著下降($P < 0.05$),见图3。

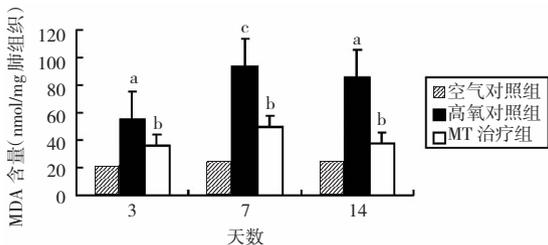


图3 MT对CLD肺组织MDA含量动态变化的影响 ($\bar{x} \pm s$) a:与空气对照组相比, $P < 0.05$; b:与高氧对照组相比, $P < 0.05$; c:与空气对照组相比, $P < 0.01$

2.5 肺组织MPO活性改变

高氧对照组MPO含量增加,7 d达高峰($P < 0.01$)。MT治疗组肺组织MPO含量较高氧对照组明显降低($P < 0.05$),见图4。

3 讨论

肺组织是对氧毒性最敏感的器官之一。当患有严重疾病的早产儿需要吸入高氧进行氧疗时,无疑更是加重了肺组织的氧化负担,可引发一系列慢性肺损伤,重者可致CLD的发生,CLD患儿多于1年内死于呼吸衰竭,幸存者也因肺功能障碍需长期(数年或数月)依赖氧气或机械通气治疗,严重影响了早产儿的生活质量,是目前新生儿致残的主要疾病之一。

大量临床和动物实验均表明,ROS生成过多和清除能力相对不足与早产儿CLD的发生发展密切相关。本课题组以往的研究已表明,高氧致CLD中存在有脂质过氧化物水平的升高^[4],这与Ogihara等^[5]的报道一致。本研究结果再次证实脂质过氧化物MDA以及NO含量在高氧致新生鼠CLD肺组织中明显升高。而MT可明显减少其产生,直接减轻ROS对肺组织的损伤。ROS在肺组织内可由活化的上皮细

胞、巨噬细胞、浸润的中性粒细胞等产生, MPO 主要存在于白细胞, 是肺组织 ROS 的重要来源之一。本研究表明, 暴露于高氧环境中 MPO 活性明显增强, 而 MT 可明显降低其活性, 一方面减少 ROS 的产生, 另一方面减轻炎症反应, 减少组织损伤。

本研究探讨了 MT 对肺组织抗氧化系统的影响。孕期后 3 个月, 伴随着表面活性物质系统的成熟, 胎肺产生的抗氧化酶类 (antioxidant enzymes, AOE) 也逐渐增多, 以适应宫外相对高氧的环境。足月出生的动物和胎儿均有成熟的对抗外界氧毒性的抗氧化系统。而早产儿尤其是极低体重出生儿的抗氧化系统则明显发育不完善^[6]。但也有学者指出早产儿对高氧的适应能力可能比人们预料的强, 如孕 17 周 SOD 已在胎肺组织中出现表达, 且虽然随着年龄增长, 肺组织 Mn-SOD, CuZn-SOD 基因表达明显增强, 其蛋白表达水平和活性在早产儿和成人并无明显差异^[7], 然而早产儿自低氧 (氧浓度 3%) 的宫内进入相对高氧 (氧浓度 21%) 的空气就承受着氧压的威胁, 而当由于某些原因必须给予外源性的氧气进行治疗时, 肺组织产生的 ROS 则远远超出了内在抗氧化剂的清除范围, 故相对较弱的抗氧化能力可能是导致早产儿 CLD 发生的主要原因^[8]。本研究表明在高氧环境中, 肺组织 T-AOC, SOD, GSH-Px 及 CAT 活性并未见明显升高, 其原因可能是: ①肺组织缺乏对高氧刺激后迅速增加 AOE 活性的能力; ②高氧可能诱导了 AOE 活性的迅速增加, 但因为氧化产物如 MDA 等的大量生成而又被消耗了。总之, 在面临着强大的氧化损伤时, 肺组织的抗氧化能力明显未得到相应提高。但给予了外源性高效抗氧化剂 MT 后, 肺组织抗氧化酶活性明显增强, 抗氧化能力明显提高。

MT 作为近年来发现的一种高效抗氧化剂, 其抗氧化作用的机制可能在于: ①MT 以其独特的化学结构及作为目前已知唯一有给电子能力的抗氧化剂, 能有效地清除羟自由基、过氧烷自由基、过氧亚硝基 (OONO⁻)、超氧阴离子 (O₂⁻) 及单线态氧 (¹O₂)^[9]。其清除羟自由基的能力是还原型谷胱甘肽 (GSH) 的 4 倍, 甘露醇的 14 倍; 清除过氧烷自由基的活性是维生素 E 的 2 倍^[10]; ②MT 可以通过调节抗氧化酶系的表达间接发挥抗氧化作用^[11]; ③MT 可与其他抗氧化剂抗坏血酸、维生素 E 衍生物 Trolox 及 GSH 协同作用, 共同抵抗氧化剂的攻击。自发现 MT 强抗氧化、清除自由基作用以来, 已有文献报道了 MT 的临床应用前景问题^[12,13]。

氧自由基及其造成的氧化性损伤在早产儿 CLD 的病理过程中占有重要地位^[14,15]。本研究结果表

明, MT 不仅自身具有清除自由基, 减轻氧化损伤的能力, 还可以通过上调其他抗氧化酶的活性, 提高肺组织的抗氧化能力, 从而保护肺组织免受高氧损伤。此外, 由于 MT 对母体和胎儿均无明显毒性^[16], 早期适当地补充 MT 可能是保护早产儿高氧肺损伤、防治 CLD 的重要手段。

[参 考 文 献]

- [1] Asikainen TM, White CW. Pulmonary antioxidant defenses in the preterm newborn with respiratory distress and bronchopulmonary dysplasia in evolution: implications for antioxidant therapy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(1):155-167.
- [2] Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin [J]. *Prog Neurobiol*, 1998, 56(3):359-384.
- [3] Gitto E, Reiter RJ, Sabatino G, Buonocore G, Romeo C, Gitto P, et al. Correlation among cytokines, bronchopulmonary dysplasia and modality of ventilation in preterm newborns: improvement with melatonin treatment [J]. *J Pineal Res*, 2005, 39(3):287-293.
- [4] 富建华, 薛辛东. 慢性肺疾病早产鼠 BALF 及肺组织中脂质过氧化物的同步研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2004, 12(6):32-37.
- [5] Ogihara T, Hirano K, Morinobu T, Kim HS, Hiroi M, Ogihara H, et al. Raised concentration of aldehyde lipid peroxidation products in premature infants with chronic lung disease [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1999, 80(1):F21-F25.
- [6] Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula VL. Distribution of antioxidant enzymes in developing human lung, respiratory distress syndrome, and bronchopulmonary dysplasia [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(9):1231-1240.
- [7] Asikainen TM, Raivio KO, Saksela M, Kinnula VL. Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(6):942-949.
- [8] Dani C, Cecchi A, Bertini G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant [J]. *Minerva Pediatr*, 2004, 56(4):381-394.
- [9] Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? [J]. *J Pineal Res*, 2007, 42(1):28-42.
- [10] Bandyopadhyay D, Biswas K, Bandyopadhyay U, Reiter RJ, Banerjee RK. Melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical [J]. *J Pineal Res*, 2000, 29(3):143-151.
- [11] Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2004, 36(1):1-9.
- [12] Giacomo CG, Antonio M. Melatonin in cardiac ischemia/reperfusion-induced mitochondrial adaptive changes [J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2007, 7(3):163-169.
- [13] Maharaj DS, Glass BD, Daya S. Melatonin: new places in therapy [J]. *Biosci Rep*, 2007, 27(6):299-320.
- [14] 侯伟, 刘海燕, 李丹, 周骥平, 陈玺. 新生大鼠高氧肺损伤血管内皮生长因子蛋白及其 mRNA 表达变化研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(2):207-210.
- [15] 杜靖, 杜立中, 蒋静静, 康兰芳, 吴西玲. 一氧化氮对新生鼠高氧肺损伤时表面活性蛋白 A 和肺甘露糖结合力的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(6):486-490.
- [16] Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administration orally to pregnant Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicol Res*, 1999, 50(2):271-279.

(本文编辑: 吉耕中)