

·论著·

高浓度氧对早产鼠肺一氧化氮合酶表达的影响

马丽亚,常立文,全裕凤

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,湖北 * 武汉 430030)

[摘要] 目的 明确高浓度氧对早产大鼠肺一氧化氮(nitric oxide, NO)合成及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)表达的影响,以探讨内源性NO在新生儿高氧肺损伤中的作用。方法 3日龄早产鼠随机分为空气组和高氧组,检测实验3d及7d时两组肺湿重/干重比值(W/D),肺组织病理学改变,支气管肺泡灌洗液中NO含量及诱导型NOS(iNOS),内皮细胞型NOS(eNOS)在肺内的分布和表达(免疫组织化学方法)。结果 3d时高氧组表现为急性肺损伤:充血、出血、炎性渗出;7d时,W/D值高于空气组(5.54 ± 0.41) vs (5.00 ± 0.15), ($P < 0.05$),病理改变依然明显。与空气组相比,暴露3d及7d时,高氧组灌洗液中的NO含量(17.06 ± 5.86)和(23.75 ± 4.07) $\mu\text{mol/L}$ 较空气组(5.59 ± 2.03)和(7.93 ± 2.33) $\mu\text{mol/L}$ 明显上升(P 均 < 0.01)。高氧组肺气道和肺泡上皮细胞、炎症细胞iNOS表达强阳性,强度高于空气组($P < 0.01$),且高氧7d组高于3d组($P < 0.01$)。与空气组比较,7d时高氧组气道上皮细胞eNOS表达增加($P < 0.05$)。结论 高氧可上调早产大鼠肺炎症细胞、上皮细胞NOS的表达,促进NO合成,提示内源性NO介导参与了高氧诱导的肺损伤。

[关键词] 一氧化氮;高氧;肺;大鼠

[中图分类号] R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2001)03-0232-04

Effect of Hyperoxia on Nitric Oxide Synthase
Expression in the Lung of Preterm Rats

MA Li-Ya, CHANG Li-Wen, QUAN Yu-Feng

Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: **Objective** To investigate the role of endogenous nitric oxide (NO) in hyperoxia-induced lung injury, by studying the effect of hyperoxia on NO synthesis and nitric oxide synthase (NOS) expression in the lung of preterm rats. **Methods** Three-day-old preterm rats were randomly assigned to a hyperoxia group (90 % oxygen) and room air group. After 3 days or 7 days of exposure, the ratio of lung wet weight/ dry weight (W/D), lung morphometry, NO content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and the cellular distribution and expression of endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS) in the lung were measured. **Results** After 3 days of exposure, when compared with the control group, the hyperoxia group showed acute lung injury characterized by the presence of hyperaemia, red cell extravasation, and inflammatory infiltration. After 7 days of exposure, W/D was also increased in the hyperoxia group compared to the controls (5.54 ± 0.41 VS 5.00 ± 0.15 , $P < 0.05$), in addition to the pathologic changes. After 3 and 7 days of exposure, the NO content in BALF was significantly elevated in the hyperoxia group compared with that of the air group [$(17.06 \pm 5.86) \mu\text{mol/L}$ vs (5.59 ± 2.03) $\mu\text{mol/L}$ and (23.75 ± 4.07) $\mu\text{mol/L}$ vs (7.93 ± 2.33) $\mu\text{mol/L}$, respectively, $P < 0.01$]. In the lungs of the hyperoxia group, immunostaining for iNOS was observed in the airway and alveolar epithelium, and in inflammatory cells, to a greater degree than in the air group. The expression of iNOS in rats was stronger after 7 days of hyperoxic exposure than after 3 days. After 7 days of exposure, stronger immunostaining for eNOS in the airway epithelium of the hyperoxia group than of the air group was seen. **Conclusions** Hyperoxia can significantly upregulate the expression of iNOS and eNOS in inflammatory cells and epithelium in the lungs of preterm rats and thus promote NO generation, suggesting that endogenous NO may mediate hyperoxia-induced pulmonary injury.

[收稿日期] 2000-06-26; [修回日期] 2000-09-29
[作者简介] 马丽亚(1971-),女,硕士,主治医师。

Key words: Nitric; Oxide; Hyperoxia; Lung; Rat

尽管氧中毒作为新生儿支气管肺发育不良(BPD)的致病因素之一已成为人们的共识,但其发病机制尚未完全阐明。近年的研究结果表明,一氧化氮(nitric oxide, NO)这一新型细胞信使分子在高浓度氧诱导的肺损伤中发挥了不可忽视的作用^[1~3],但尚无一致的结论,且缺乏与临床相近的早产动物的报道。本实验建立早产新生大鼠高氧肺损伤模型,明确高氧对早产鼠肺 NO 合成及内皮细胞型一氧化氮合酶(endothelia nitric oxide, eNOS),诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)表达强弱和分布的影响,探讨内源性 NO 在新生儿高氧肺损伤中的作用,为临床研究提供理论依据。

1 对象及方法

1.1 实验动物

提前 1 d 剖腹产出生的 Sprague-Dawley (SD) 新生大鼠作为早产鼠(早产鼠的获得参考文献^[4]报道并结合本实验室经验,雌、雄成年 SD 大鼠由同济医科大学动物实验中心提供),生后 3 d 随机分为:高氧组和空气组,每组 24~28 只,高氧组置于氧箱中,持续输入氧气,氧浓度 ≥90 %,每日监测 3 次(CYS-1 数字式测氧仪,上海嘉定学联仪表厂),钠石灰吸收二氧化碳;空气组置同一室内空气中。温度 25~26 ℃,湿度 60 %~70 %。高氧组每天开箱 1 h,添加水及饲料,更换垫料,并与空气组互换母鼠以避免母鼠因氧中毒致护理能力下降。

1.2 方法

1.2.1 支气管肺泡灌洗液(BALF)中 NO 含量测定

在实验的 3 d 及 7 d 时,分别取早产鼠麻醉处死,气管插管,向肺内缓缓注入 0.5~1 ml 冷生理盐水至出现阻力,然后轻轻回抽,将回收液注入冷试管内。重复操作 3 次,将 3 次灌洗液汇集,于 4 000 转/min 离心 10 min,取上清液检测 NO 含量。NO 的测定采用硝酸还原酶法(试剂盒购自南京建成生物工程研究所),以 NO²⁻/NO³⁻含量表示。

1.2.2 肺组织病理学检查 3 d 及 7 d 时,另取未灌洗的动物处死后,打开胸腔,结扎右支气管;气管插管,经导管向左肺缓缓注入 10 %福尔马林至肺尖膨胀,结扎左支气管,固定 15 min 后取下左肺浸泡于福尔马林液中,24 h 内石蜡包埋。5 μm 切片,HE 染色,光镜下检查肺组织病变。

1.2.3 肺湿重/干重比值(W/D)测定 从结扎的

右支气管取下右肺,轻轻擦干表面,立即称重,记为肺湿重,然后置于 60 ℃烤箱内,每日称重至重量恒定 2 d,记为肺干重,计算 W/D,反映肺水肿程度。

1.2.4 肺组织 iNOS 和 eNOS 免疫组织化学染色(SABC 法,iNOS 和 eNOS 的多克隆抗体及 SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司 5 μm 石蜡切片(取材同上)脱蜡至水,3 % H₂O₂ 灭活内源性酶,微波修复抗原,依次滴加正常封闭血清、一抗(4 ℃过夜)、生物素化二抗、SABC 复合物,DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精脱色,最后脱水、透明、封片,光镜观察。PBS 液代替一抗作为阴性对照。NOS 表达的半定量分析:高倍镜下每张切片随机选择 5 个视野,半定量评分标准参见文献报道^[5]:0 分 = 细胞未染色;1 分 = 灶性染色(散在的阳性细胞,少于总数的 25 %);2 分 = 弥漫性弱阳性;3 分 = 弥漫性中等强度的染色;4 分 = 弥漫性强阳性染色。

1.3 统计方法

资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 软件系统的 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 BALF 中 NO 含量

与相应的空气组比较,高氧组 3 d 及 7 d 时,BALF 中 NO 含量均明显上升(P 均 < 0.01)(见表 1)。

2.2 肺 W/D

与空气组比,3 d 时,高氧组肺 W/D 无明显升高(P > 0.05);7 d 时,高氧组显著高于空气组(P < 0.05),提示随着暴露时间的延长,高氧诱导的肺水肿逐渐明显(见表 1)。

表 1 早产鼠肺 W/D 及 BALF 中 NO 含量变化
Table 1 Ratio of lung W/D and NO content in BALF in preterm rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肺 W/D		NO 含量(μmol/L)	
		3 d	7 d	3 d	7 d
空气组	12	4.97 ±0.24	5.00 ±0.15	5.59 ±2.03	7.93 ±2.33
高氧组	12	5.01 ±0.43	5.54 ±0.41 ^b	17.06 ±5.86 ^a	23.75 ±4.07 ^a
<i>t</i> 值		0.185	2.494	4.53	8.34
<i>P</i> 值		0.869	0.046	0.003	0.000

注:与空气组比较,a * " P < 0.01; b * " P < 0.05

2.3 肺组织病理学检查

与空气组(见图 1,封)相比,高氧组 3 d 时表现为小血管扩张、充血,肺泡腔内出现大量红细胞及以中性粒细胞为主的炎症细胞,间质内细胞增多(见图 2,封);7 d 时,肺泡内仍可见炎症细胞,肺间隔增宽,其中细胞及胶原样物质增生,肺结构紊乱(见图 3,封)。

2.4 NOS 在肺内的分布和表达

eNOS 及 iNOS 染色阳性信号均为棕黄色颗粒,定位于胞浆;阴性对照无阳性染色(见图 4~6,封)。

2.4.1 iNOS iNOS 在空气组主要分布于气道上皮细胞和少数肺泡巨噬细胞,呈弱阳性,3 d 及 7 d 时无显著差别($P > 0.05$),肺泡内无中性粒细胞。

高氧组 :iNOS 在气道上皮和肺泡上皮细胞、炎症细胞(包括多形核白细胞和巨噬细胞)均有阳性表达(见图 4,封),强度均高于空气组(P 均 < 0.01),且高氧 7 d 组高于 3 d 组($P < 0.01$)。见表 2 肺泡腔内出现大量染色强阳性的炎症细胞(主要为多形核白细胞)是高氧组的一个显著特点(见图 5,封)。

2.4.2 eNOS 两组均主要分布于气道上皮细胞及血管内皮细胞,高氧组肺泡巨噬细胞也有阳性表达,中性粒细胞无阳性染色。(见图 6,封)。3 d 时两组间无显著差别,7 d 时高氧组上皮细胞表达强度较对照组明显升高($P < 0.05$),内皮细胞虽也有增高趋势但未达统计学水平,见表 2。

表 2 早产鼠肺 NOS 表达强度
Table 2 Expression of NOS in the lungs of preterm rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间 (d)	例数	iNOS 表达		eNOS 表达		
			炎症细胞	上皮细胞	巨噬细胞	上皮细胞	内皮细胞
空气组	3 d	6	0.21 $\pm$ 0.43	1.87 $\pm$ 0.64	-	2.07 $\pm$ 1.07	2.50 $\pm$ 1.02
空气组	7 d	6	0.31 $\pm$ 0.47	2.13 $\pm$ 1.25	-	2.47 $\pm$ 0.92	3.08 $\pm$ 0.76
高氧组	3 d	6	2.22 $\pm$ 1.08 ^a	2.96 $\pm$ 0.99 ^a	1.00 $\pm$ 0.89	2.50 $\pm$ 1.17	2.91 $\pm$ 1.22
高氧组	7 d	6	3.11 $\pm$ 0.96 ^{a,c}	3.53 $\pm$ 0.72 ^{a,c}	1.40 $\pm$ 1.12	3.29 $\pm$ 0.99 ^b	3.23 $\pm$ 0.73
F 值			48.56	10.86		2.31	1.50
P 值			< 0.01	< 0.01		< 0.05	> 0.05

注:与同时期的空气组比较,a * " $P < 0.01$; b * " $P < 0.05$;与高氧 3 d 组比较,c * " $P < 0.01$

3 讨论

已有大量研究证实,高氧暴露可导致肺部不同程度的急慢性损伤,但其发病机制并未完全阐明。建立合适的动物模型是研究高氧肺损伤的前提,本实验中高氧组肺组织在实验 3 d 时即表现为充血、出血及炎性渗出,7 d 时肺水肿也逐渐明显,提示高氧暴露诱导了早产鼠急性肺损伤,且急性炎症反应是其早期表现,与国外报道相符^[1,2],表明我们已成功建立早产鼠高氧急性肺损伤模型。

NO 是由 NOS 催化 L - 精氨酸、分子氧及其它辅因子合成的一小分子物质,广泛参与体内多种生理及病理过程。NO 合成的调节主要受 NOS 表达及活化的影响,因此 NOS 成为研究 NO 功能的重要工具。本研究表明, $\geq 90\%$ O_2 暴露可显著诱导早产大鼠肺 NOS 的表达伴随 NO 合成的增加,且随着时间的延长而增强,提示内源性 NO 参与了高氧肺损伤。本结果验证了 Potter^[1],Radomski 等^[2]关于

高浓度氧暴露可上调足月新生大鼠肺 iNOS 及 eNOS mRNA 表达的报道,并进一步明确了其细胞来源,炎症细胞(特别是多形核白细胞)及肺上皮细胞强烈表达 iNOS 可能是高氧促进 NO 大量合成的主要原因。高氧诱导肺组织 iNOS 大量表达可能与高氧暴露时各种细胞因子如肿瘤坏死因子- α ,干扰素- γ ,白介素等水平增加有关。

不同类型 NOS 活化的意义可能不同。eNOS 为结构型酶,主要通过 Ca^{2+} / 钙调蛋白依赖途径持续合成基础水平的 NO,在调节气道和血管紧张性,抑制血小板聚集,对抗中性粒细胞附壁和激活等生理活动中发挥重要作用^[6]。高氧时肺 eNOS 表达的增加可能是对损伤的一种保护性反应。iNOS 的活化不依赖 Ca^{2+} / 钙调蛋白,不存在于休眠状态的细胞内,受细胞因子和/或脂多糖刺激后诱导基因转录合成,活化后可催化合成大量的 NO,主要参与介导细胞毒作用,iNOS 的大量合成及活化常提示 NO 的病理效应^[6]。有学者认为 NO 的毒性主要通过超氧阴离子(O_2^-)迅速反应生成的过氧亚硝基阴离子

(ONOO⁻)而发挥作用^[7]。ONOO⁻是一强氧化剂,可损害肺泡上皮细胞、肺表面活性物质及各种酶,加重炎症反应^[8],而内源性 NO 的过量合成是 ONOO⁻在体内生成的主要来源^[9,10]。本研究表明,高氧暴露可显著上调肺上皮细胞和巨噬细胞 i-NOS 的表达,并随着时间的延长而增加同时伴随 NO 的大量合成,而这些细胞也是 O₂⁻,ONOO⁻的主要产生地,提示内源性 NO 在高氧肺损伤中可能也发挥了重要的病理作用。

本研究表明,≥90 % O₂ 暴露可显著上调早产大鼠肺 iNOS 和 eNOS 表达,促进 NO 合成,提示内源性 NO 参与介导了高氧肺损伤。特异性抑制 iNOS 而不改变结构型 NOS 对血管张力、细胞完整性及信息传导等的生理控制,对减轻 NO 介导的有关疾病必有潜在的临床应用价值。

[参 考 文 献]

[1] Potter CF, Kup NT, Farver CF, et al. Effects of hyperoxia on nitric oxide synthase expression, nitric oxide activity, and lung injury in rat pups [J]. *Pediatr Res*, 1999, 45(1): 8 - 13.

[2] Radomski A, Sawicki G, Olson DM, et al. The role of nitric oxide and metalloproteinases in the pathogenesis of hyperoxia-induced lung injury in newborn rats [J]. *Br J Pharmacol*, 1998,

125(7): 1455 - 1465.

[3] Garat C, Jayr C, Eddahihi S, et al. Effects of inhaled nitric oxide or inhibition of endogenous nitric oxide formation on hyperoxic lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care*, 1997, 155(60): 1957 - 1964.

[4] Tanswell AK, Wong L, Possmayer F, et al. The preterm rat: a model of acute and chronic neonatal lung disease [J]. *Pediatric Res*, 1989, 25(5): 525 - 529.

[5] Saleh D, Barnes PJ, Gaid A. Increased production of the potent oxidant peroxyniteite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Res Crit Care Med*, 1997, 155(5): 1763 - 1769.

[6] Whittle BR. Nitric oxide in physiology and pathology [J]. *Histochemical J*, 1995, 27(10): 727 - 737.

[7] Bechman TS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(5): C1424 - C1437.

[8] 谷振勇,丛斌. 过氧亚硝基阴离子与肺损伤 [J]. *国外医学呼吸系统分册*, 1997, 17(4): 203 - 206.

[9] Haddad IY, Pataki G, Hu P, et al. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(6): 2407 - 2413.

[10] Banks BA, Ishiropoulos H, McClelland M, et al. Plasma 3-nitrotyrosine is elevated in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia [J]. *Pediatrics*, 1998, 10(5): 870 - 874.

(本文编辑:曹励之)

(上接第 226 页)

[参 考 文 献]

[1] 卢彦平,翁霞云,谷志远,等. 人巨细胞病毒感染与先天性畸形关系的探讨 [J]. *中华妇产科杂志*, 1998, 33(3): 133 - 135.

[2] Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, et al. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification [J]. *J Infect Dis*, 1998, 158(6):

1177 - 1184.

[3] Griffiths PD. Current management of cytomegalovirus disease [J]. *J Med Virol*, 1993, 41(Suppl): 106 - 111.

[4] 杨锦华,刘铁夫,余秀蔡,等. 先天畸形与 TORCH 感染关系的研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 1995, 30(7): 486 - 488.

[5] 赵萍,黄绍敏,王琳. 新生儿单纯疱疹病毒感染 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 1998, 6(3).

[6] 蔡定帮,郭亮,梁恩来,等. 细小病毒 B19 与先天性唇腭裂畸形的相关性 [J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(8): 503.

(本文编辑:曹励之)

先天性心脏病肺高压肺血管功能与结构的改变

(见正文 212 页)



图1 病理I级改变。光镜下vwf:Ag免疫过氧化酶染色(×33)
Figure 1 VWF immunostain for pulmonary endothelium in Grade I



图2 病理I级改变。透射电镜下肺血管内皮细胞(×8000)
Figure 2 Pulmonary vascular endothelial cell in Grain I (Heath-Edward classification) under transmission microscopy



图3 病理III级改变。光镜下vwf:Ag免疫过氧化酶染色,染色带明显加深(×33)
Figure 3 VWF immunostain for pulmonary endothelium in Grade III



图4 病理III级改变。透射电镜下肺血管内皮细胞内可见大量分支的未见内质网,纵管微然(×8000)
Figure 4 The change of pulmonary vascular endothelial cell in Grade III under transmission microscopy

高浓度氧对早产鼠肺一氧化氮合酶表达的影响

(见正文 232 页)

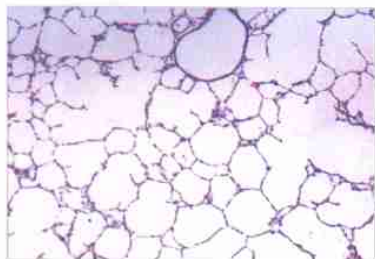


图1 正常空气组(3 d)肺组织形态学表现
Figure 1 Light morphometry of normal lung in air group (day 3)

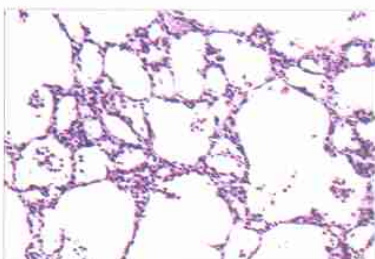


图2 高氧组(3 d)肺组织病理学表现
Figure 2 Light morphometry of lung exposed to hyperoxia (day 3)

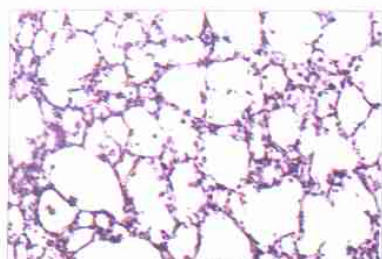


图3 高氧组(7 d)肺组织病理学表现
Figure 3 Light morphometry of lung exposed to hyperoxia (day 7)

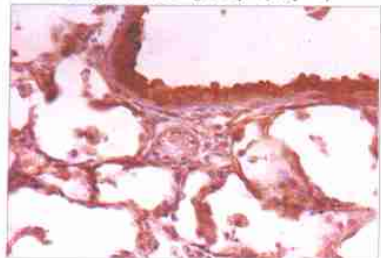


图4 iNOS在高氧组(7 d)炎症细胞、上皮细胞的表达
Figure 4 iNOS expression of inflammatory and epithelial cells in lung exposed to hyperoxia (day 7)

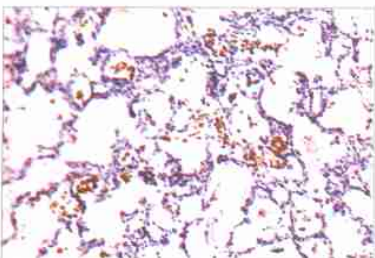


图5 iNOS在高氧组(3 d)肺泡炎症细胞的强阳性染色
Figure 5 Strong immunostaining for iNOS in alveolar inflammatory cells in lung exposed to hyperoxia (day 3)

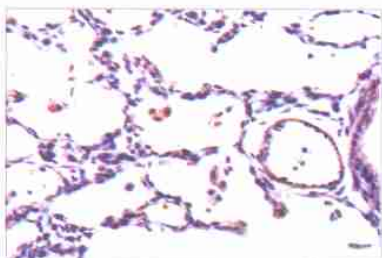


图6 eNOS在高氧组(7 d)内皮细胞、巨噬细胞的表达
Figure 6 eNOS expression of endothelial cells and macrophage in lung exposed to hyperoxia (day 7)