

· 实验研究 ·

一氧化氮吸入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

杜靖, 杜立中, 蒋静静, 唐兰芳, 吴西玲

(浙江大学医学院 附属儿童医院新生儿科, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的 通过观察吸入一氧化氮(iNO)对新生大鼠高氧肺损伤时表面活性蛋白 A(SP-A)和肺组织甘露糖结合力(MBA)的影响,探讨 iNO 对高氧肺损伤保护作用的可能机制。方法 新生大鼠随机分为对照组(空气);高氧组($>95\% O_2$, 6 d);NO 组(空气 + 10 ppm NO, 24 h);高氧 + NO 组($>95\% O_2$, 6 d + 10 ppm NO, 24 h)。观察暴露后 2 d 和 6 d 肺组织病理变化,肺 SP-A mRNA 基因表达、蛋白含量和 MBA 的变化。结果 高氧组病理损伤明显,暴露后 2 d 时 SP-A 的 mRNA 含量(0.81 ± 0.04 vs 1.53 ± 0.25)和蛋白表达(59.45 ± 18.37 vs 89.77 ± 16.41)比对照组减少,6 d 时分别比对照组增加(0.81 ± 0.02 vs 0.63 ± 0.03), (93.57 ± 13.71 vs 47.73 ± 21.69), ($P < 0.05$)。高氧 + NO 组暴露后 2 d 时病理损伤比高氧组明显减轻,SP-A mRNA(0.55 ± 0.91)比对照组和高氧组降低,SP-A 蛋白表达(55.12 ± 17.53)比对照组降低($P < 0.01$);6 d 时 SP-A 蛋白表达(67.33 ± 18.59)比高氧组降低($P < 0.05$)。甘露糖结合力在暴露后 2 d 时 NO 组比对照组增加(0.821 ± 0.133 vs 0.580 ± 0.158)、高氧 + NO 组比高氧组增加(0.430 ± 0.175 vs 0.738 ± 0.141)($P < 0.05$)。结论 小剂量 NO 吸入可降低高氧肺组织 SP-A 蛋白表达的升高,增加肺组织的 MBA,减轻肺组织的病理损伤。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(6):486-490]

[关键词] 高氧肺损伤;表面活性蛋白 A;甘露糖结合力;吸入一氧化氮;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)06-0486-05

Effect of inhaled nitric oxide on surfactant protein A and mannose binding ability in the lung of neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury

DU Jing, DU Li-Zhong, JIANG Jing-Jing, TANG Lan-Fang, WU Xi-Ling. Department of Neonatology, Children's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China (Du L-Z, Email: dulizhong@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the effect of inhaled nitric oxide (NO) on surfactant protein A (SP-A) and mannose binding ability (MBA) in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury. **Methods** Sixty-four neonatal rats were randomly exposed to room air (Control group), $>95\%$ oxygen for 6 days (Hyperoxia group), 10 ppm NO for 24 hrs (NO group), and $>95\%$ oxygen for 6 days along with 10 ppm NO for 24 hrs (Hyperoxia + NO group). After 2 and 6 days of exposure, the lung pathologic changes, gene and protein expressions of SP-A and MBA were measured. **Results** The rats from the Hyperoxia group presented with obvious lung injuries. The SP-A expressions of mRNA (0.81 ± 0.04 vs 1.53 ± 0.25) and protein (59.45 ± 18.37 vs 89.77 ± 16.41) in the Hyperoxia group decreased significantly 2 days after exposure but increased significantly 6 days after exposure (SP-A mRNA 0.81 ± 0.02 vs 0.63 ± 0.03 ; SP-A protein 93.57 ± 13.71 vs 47.73 ± 21.69) compared with those of the Control group ($P < 0.05$). NO treatment alleviated the hyperoxia-induced pathologic injuries 2 days after exposure. The SP-A mRNA expression (0.55 ± 0.91) in the Hyperoxia + NO group was significantly reduced as compared to both the Control and Hyperoxia groups ($P < 0.05$), and the SP-A protein expression (55.12 ± 17.53) in the Hyperoxia + NO group was noticeably lower than that of the Control group ($P < 0.01$) 2 days after exposure. The SP-A protein expression in the Hyperoxia + NO group (67.33 ± 18.59) was significantly lower than that of the Hyperoxia group 6 days after exposure ($P < 0.05$). Two days after exposure, the NO group had significantly higher MBA than the Control group (0.821 ± 0.133 vs 0.58 ± 0.158); the Hyperoxia + NO group had significantly higher MBA than the Hyperoxia group (0.43 ± 0.175 vs 0.738 ± 0.141) ($P < 0.05$). **Conclusions** Inhaled low dose NO may decrease SP-A protein expression and increase MBA of the lung tissue. This lessens the pathologic lung injury in neonatal rats with hyperoxia. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(6):486-490]

Key words: Hyperoxia-induced lung injury; Surfactant protein A; Mannose binding ability; Inhaled nitric oxide; Neonatal rats

[收稿日期] 2006-06-14; [修回日期] 2006-08-12

[基金项目] 国家自然科学基金资助(No:31371498)。

[作者简介] 杜靖,女,博士,主治医师。主攻方向:新生儿重症监护。

[通讯作者] 杜立中,教授,博士生导师。浙江大学医学院附属儿童医院新生儿科。邮编:310003。

表面活性蛋白 A (SP-A) 属胶原凝集素超家族 (简称胶凝素)^[1,2], 胶凝素均具有糖识别区域, 可以和细菌或病毒表面的甘露糖特异性结合, 再通过甘露糖凝集素 (mannose binding lectin, MBL) 途径激活补体系统, 因而 SP-A 在肺部的免疫防御过程中发挥着重要的作用^[4]。高氧肺损伤和大剂量一氧化氮 (nitric oxide, NO) 吸入都可使蛋白硝基化^[5]。SP-A 的硝基化使其甘露糖结合力 (mannose binding ability MBA) 减低^[6]。研究发现小剂量 NO 吸入可以减轻高氧肺损伤^[7], 其确切的机制仍未完全明了, 特别是对高氧时肺内 SP-A 的影响仍不清楚; 对 NO 吸入后对肺 MBA 和肺损伤的影响未见报道。本研究采用 NO 吸入干预高氧暴露新生鼠, 探讨高氧和 NO 吸入治疗对新生大鼠的 SP-A 的基因表达和蛋白含量影响, 以及对肺组织甘露糖结合力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

浙江省医学科学院提供的 64 只 SD 足月新生大鼠, 体重在 6~8 g。总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Bio Basic Inc 公司, RT-PCR 试剂购自 Takara 公司。兔抗大鼠 SP-A 抗体购自 Santa Cruz 公司, MBA ELISA 试剂盒购自 Antibody Shop 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理 出生满 24 h 的新生鼠与母鼠同时放入密闭有机玻璃箱, 氧气分析仪监测氧气浓度, 钠石灰吸收二氧化碳, 保证二氧化碳浓度在 1% 以下。室温控制在 25~26°C, 湿度维持在 60%~70%。每天开箱 1 h 更换垫料, 自由进食水。动物随机分成 4 组: 对照组, 高氧组, NO 组, 高氧 + NO 组。对照组箱内通入空气, 箱内氧气浓度维持在 21% 左右。高氧组箱内通入氧气至满 6 d, 4 L/min, 维持箱内氧气浓度 >95%, 每天与空气对照组交换母鼠, 以防止母鼠氧中毒。NO 组箱内通入 10 ppm NO 至满 24 h。箱内 NO 和 NO₂ 浓度用持续监测仪检测, 保证箱内 NO 浓度在 10 ppm, NO₂ 浓度在 0.5 ppm 以下。高氧 + NO 组箱内持续通入氧气 (>95%) 至满 6 d, 同时通入 10 ppm NO 至 24 h。

1.2.2 肺组织标本的留取 各组动物分别于处理后 2 d 和 6 d 给予腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液 (35~50 mg/kg), 腹主动脉放血。每组取 8 只仔鼠 (分别来自 4 只母鼠), 右肺上叶放入 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 剩余肺立即放入液氮冷冻, -80°C

冰箱保存。

1.2.3 SP 基因表达分析 采用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 观察 SP-A mRNA 水平。取 0.1 g 肺组织用 Trizol 一步法提取总 RNA, Du-640 紫外分光光度仪测 RNA 纯度及浓度, 计算核酸量。采用 20 μL 反应体系逆转录合成 cDNA, cDNA 于 -20°C 保存备用。SP-A 的引物上、下游序列为: 5'-CTG-GAGGACGTGGAGACA-3', 5'-GCCTCCTGCTCTGG-TACACA-3'。为控制实验操作时的加样误差和各反应管扩增效率的差异, 设立 β-actin 作为内参照。按以下条件进行 PCR 反应: 94°C, 5 min; 从 94°C, 1 min; 57°C, 45 s; 72°C, 45 s, 30 个循环; 72°C, 7 min。用 SP-A 与 β-actin 扩增产物的光密度比值表示每个标本的相对 mRNA 水平。

1.2.4 Western Blot 检测 SP-A 蛋白含量 肺组织匀浆测定蛋白含量后加入等量的 3 倍 SDS-PAGE 缓冲液, 96°C 加热 5 min, 样本用 10% Tris-Glycine 胶电泳分离蛋白后转移到硝酸纤维素膜上。用 5% 的脱脂牛奶室温作用 1 h, 洗膜 4 次, 每次 15 min。与 SP-A 抗体室温作用 1 h, 洗膜。与羊抗兔二抗室温作用 1 h, 洗膜。暗房内加入显影液 A + B, 曝光 7 min, 显影。用 BIO-RAD 公司的 Quantity One 软件对显影条带进行光密度分析, 将 SP-A 与 β-actin 的光密度比值作为 SP-A 的相对表达量。

1.2.5 ELISA 试剂盒检测 MBA 甘露糖结合蛋白 (mannose binding protein/lectin, MBP/MBL) 具有和甘露糖结合的能力, 检测标本中蛋白与固相支持物上的甘露糖结合的多少, 可反映甘露糖结合力的大小。根据说明书步骤检测肺组织匀浆中蛋白的 MBA。

1.2.6 统计学分析 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异比较采用 SPSS 统计软件的方差分析与 *q* 检验。

2 结果

2.1 病理改变

对照组肺泡结构清晰, 肺泡内无渗出及出血。高氧组暴露后 2 d 可见肺泡腔狭窄, 肺泡壁毛细血管扩张充血, 间质和肺泡腔内中性粒细胞浸润, 部分肺泡明显扩张气肿。暴露后 6 d 可见明显肺实变, 组织结构紊乱和大量白细胞浸润, 部分肺组织代偿性气肿。NO 组暴露后 2 d 肺泡内可见少量充血, 局部肺组织可见充血水肿; 暴露后 6 d 肺组织与对照组相比无明显变化。高氧 + NO 组暴露后 2 d 肺组织可见明显充血水肿、中性粒细胞浸润, 与高氧组相

比无明显变化;暴露后6 d肺组织可见肺轻度水肿,也可见组织结构紊乱和白细胞浸润,实变程度较高氧组减轻。(见图1,2)。

2.2 SP-A mRNA

暴露后2 d高氧组、NO组和高氧+NO组的肺SP-A mRNA含量比对照组显著减少($P<0.05$);暴露后6 d高氧组比对照组显著增加($P<0.05$)。见表1,图3。

表1 肺组织匀浆中SP-A mRNA相对含量($\bar{x}\pm s$)

分组	2 d	6 d
对照组	1.53±0.25	0.63±0.03
高氧组	0.81±0.04 ^a	0.81±0.02 ^a
NO组	0.76±0.11 ^a	0.72±0.04
高氧+NO组	0.55±0.91 ^{a,b}	0.64±0.12

a 与对照组比较 $P<0.05$; b 与高氧组比较 $P<0.05$

2.3 SP-A 蛋白含量变化

暴露后2 d高氧组和高氧+NO组SP-A含量比对照组显著减少;暴露后6 d高氧组比对照组显著

增加,高氧+NO组比高氧组显著降低($P<0.05$)。见表2,图4。

2.4 MBA变化

2 d时NO组比对照组显著增加($P<0.05$),高氧+NO组比高氧组显著增加($P<0.05$),见表3。

表2 肺组织匀浆中SP-A蛋白含量变化($\bar{x}\pm s$)

	2 d	6 d
对照组	89.8±16.4	47.7±21.7
高氧组	69.5±18.4 ^a	93.6±13.7 ^a
NO组	70.2±1.9	44.3±8.2
高氧+NO组	55.1±17.5 ^b	67.3±18.6 ^c

a 与对照组比较 $P<0.05$; b $P<0.01$; c 与高氧组比较 $P<0.05$

表3 肺组织匀浆MBA变化($\bar{x}\pm s$)

	2 d	6 d
对照组	0.580±0.158	0.361±0.178
高氧组	0.430±0.175	0.361±0.178
NO组	0.821±0.133 ^a	0.564±0.161
高氧+NO组	0.738±0.141 ^b	0.505±0.167

a 与对照组比较 $P<0.05$; b 与高氧组比较 $P<0.05$

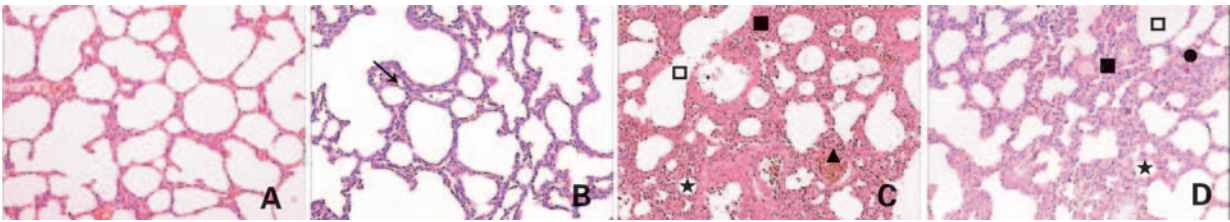


图1 暴露后2 d各组光镜下病理变化(苏木精-伊红染色,×100) A:对照组:肺泡结构清晰;B:NO组:局部少量充血;C:高氧组:肺泡腔狭窄★,肺泡壁毛细血管扩张充血▲;间质和肺泡腔内中性粒细胞浸润■;部分肺泡明显扩张□;D:高氧+NO组与高氧组相比有明显变化。

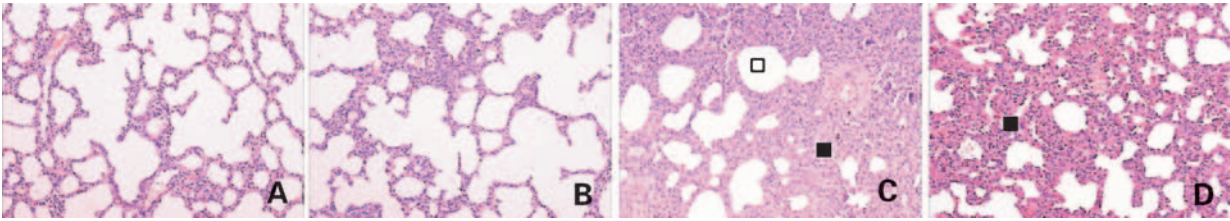


图2 暴露后6 d各组光镜下病理变化(苏木精-伊红染色,×100) A:对照组肺泡结构清晰,动态正常;B:NO组肺泡结构清晰形态正常;C:高氧组明显肺实变■;结构紊乱大量白细胞浸润,部分代偿气肿□;D:高氧+NO组肺轻度水肿,结构紊乱白细胞浸润,肺实变较轻。

3 讨论

临床研究表明,高氧肺损伤已成为危重新生儿救治的主要并发症之一,甚至可能发展为严重的后遗症BPD^[8]。高氧肺损伤时过量的活性氧和氮氧化物严重损伤了表面活性物质的组成^[9]。表面活性物质主要由磷脂和表面活性蛋白(surfactant pro-

tein,SP)组成,SP-A作为SP的主要成分,在SP的功能和活性中发挥重要的作用^[10]。SP-A属胶原凝集素超家族^[1],具有糖识别区域,可以和细菌或病毒表面的甘露糖特异性结合,再通过MBL途径激活补体系统,或结合C1q-R,从而模拟和放大C1q激活经典的补体途径,并能激活巨噬细胞及其他吞噬细胞。SP-A的甘露糖结合力代表了一系列肺内的免疫防御功能^[11]。

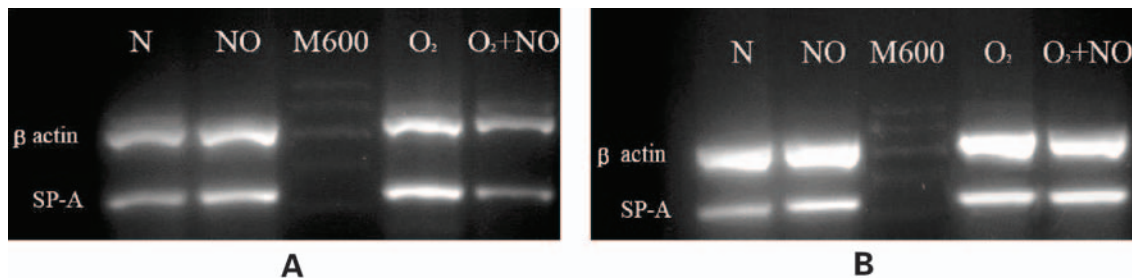


图3 RT-PCR检测SP-A mRNA的表达琼脂糖凝胶电泳图 A:暴露2 d;B:暴露6 d。图中符号分别代表N:对照组,NO:NO组,O₂:高氧组,O₂+NO:高氧+NO组,M600:为Mark。

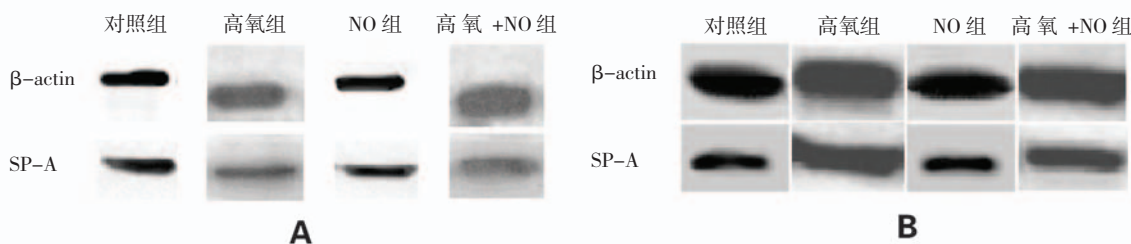


图4 Western Blot检测SP-A蛋白表达的SDS-PAGE图 A:暴露2 d;B:暴露6 d

研究发现动物长期暴露于高氧(>95% O₂)环境下,损伤肺泡上皮和PS^[12]。暴露于100%氧气中72 h的家兔出现磷脂降低,肺泡灌洗液(BALF)中白蛋白水平增加,表面张力增加,肺顺应性减低,肺容积减低。暴露于100%氧气中的豚鼠出现磷脂酰甘油三酯减少,SP-A,SP-B和SP-C的mRNA减少^[13]。呼吸窘迫综合征(ARDS)或即将发生ARDS的患者肺泡总磷脂和SP-A,SP-B的水平降低^[14]。

iNO可影响肺内表面活性蛋白的功能和组成。Howlett^[15]和Issa等^[16]的研究发现,低浓度iNO(10~20 ppm)可以有效防止高氧肺损伤,增加高氧肺BALF中SP-B和PS的表面张力和表面吸附率。一些研究发现NO虽能抑制氧介导的脂质过氧化,但却增强了氧介导的SP硝基化的反应^[17~19]。但是也有研究发现小剂量iNO治疗可减轻ONOO⁻引起的氧化和硝基化损伤作用^[11]。我们的研究发现高氧早期给予10 ppm NO吸入24 h可以减轻肺组织的病理损伤,而对后期的病理损伤作用不明显,可能是由于iNO吸入时间相对较短所致。

高氧早期肺组织SP-A的mRNA表达降低,后期表达增加,与SP-A蛋白含量的变化趋势一致。高氧肺损伤后期SP-A基因过度表达可能与肺泡II型细胞异常增殖而影响肺组织结构重建,造成BPD有关。在高氧肺损伤早期,iNO加重SP-A的mRNA表达的降低,但是未加重SP-A蛋白含量的减少。在高氧肺损伤后期,iNO未影响SP-A的mRNA的含量,但是减少了高氧肺内SP-A的蛋白含量。这个结果

显示iNO在高氧肺损伤发生的早期确实减轻了肺组织的病理损伤,并且同时降低了肺组织SP-A蛋白表达的升高,增加肺组织的MBA,提示iNO对SP-A表达的影响与iNO对高氧肺损伤保护作用有关。而高氧暴露6 d时无明显影响的原因可能是NO吸入时间较短。

甘露糖结合力是指具有与甘露糖结合能力的蛋白质结合甘露糖的能力或效力,反映蛋白的免疫调理能力和机体的固有性免疫防御功能。我们用全肺总蛋白的甘露糖结合力检测代替SP-A特异性蛋白甘露糖结合力的检测,探讨NO吸入对蛋白的免疫调理能力的影响。研究发现,高氧时肺组织MBA无明显变化,而iNO可使正常和高氧肺组织MBA增加,这提示小剂量NO吸入可能通过增加肺组织的免疫调理功能而发挥对高氧肺损伤的保护作用。

综上所述,小剂量iNO可减轻高氧肺损伤的病理改变,降低SP-A蛋白表达的升高,增加肺组织的MBA,发挥对高氧肺损伤的保护作用。

[参 考 文 献]

- [1] Stuart LM, Henson PM, Vandivier RW. Collectins: opsonins for apoptotic cells and regulators of inflammation[J]. Curr Dir Autoimmun, 2006, 9(9): 143-161.
- [2] Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease[J]. Mol Immunol, 2003, 40(7): 423-429.
- [3] Presanis JS, Kojima M, Sim RB. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL) [J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(Pt 4): 748-752.

- [4] Konishi M, Nishitani C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Sano H, Harimaya A, et al. Alloicoccus otitis is a ligand for collectins and Toll-like receptor 2, and its phagocytosis is enhanced by collectins [J]. Eur J Immunol, 2006, 36 (6): 1527-1536.
- [5] Narasaraaju TA, Jin N, Narendranath CR, Chen Z, Gou D, Liu L. Protein nitration in rat lungs during hyperoxia exposure: a possible role of myeloperoxidase [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285 (5): L1037-1045.
- [6] Cotton RB, Sundell HW, Zeldin DC, Morrow JD, Roberts LJ, Hazinski TA, et al. Inhaled nitric oxide attenuates hyperoxic lung injury in lambs [J]. Pediatr Res, 2006, 59 (1): 142-146.
- [7] Davis IC, Zhu S, Sampson JB, Crow JP, Matalon S. Inhibition of human surfactant protein A function by oxidation intermediates of nitrite [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33 (12): 1703-1713.
- [8] Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia and oxidative stress: are we closer to an understanding of the pathogenesis of BPD [J]. Acta Paediatr, 1997, 86 (12): 1277-1287.
- [9] Nelin LD, Morrissey JF, Effros RM, Dawson CA, Schapira RM. The effect of inhaled nitric oxide and oxygen on the hydroxylation of salicylate in rat lungs [J]. Pediatr Res, 2003, 54 (3): 337-343.
- [10] Sano H, Kuroki Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity [J]. Mol Immunol, 2005, 42 (3): 279-287.
- [11] Frerking I, Gunther A, Seeger W, Pison U. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options [J]. Intensive Care Med, 2001, 27 (11): 1699-1717.
- [12] Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury [J]. Chest, 2002, 122 (6 Suppl): 314S-320S.
- [13] Minoo P, King RJ, Coalson JJ. Surfactant proteins and lipids are regulated independently during hyperoxia [J]. Am J Physiol, 1992, 263 (2 Pt 1): L291-L298.
- [14] Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects [J]. Lung, 1997, 175 (1): 1-39.
- [15] Howlett CE, Hutchison JS, Veinot JP, Chiu A, Merchant P, Fliss H. Inhaled nitric oxide protects against hyperoxia-induced apoptosis in rat lungs [J]. Am J Physiol, 1999, 277 (3 Pt 1): L569-L605.
- [16] Issa A, Lappalainen U, Kleinman M. Inhaled nitric oxide decreases hyperoxia-induced surfactant abnormality in preterm rabbits [J]. Pediatr Res, 1999, 45 (2): 247-254.
- [17] Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S. Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163 (1): 166-172.
- [18] Zhu S, Kachel DL, Martin WJ 2nd, Matalon S. Nitrated SP-A does not enhance adherence of Pneumocystis carinii to alveolar macrophages [J]. Am J Physiol, 1998, 275 (6 Pt 1): L1031-1039.
- [19] Zhu S, Haddad IY, Matalon S. Nitration of surfactant protein A (SP-A) tyrosine residues results in decreased mannose binding ability [J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 333 (1): 282-290.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

新生儿颅脑 B 超诊断学习班通知

为了提高对围产期脑损伤及其他中枢神经系统疾病的诊断水平,充分利用已有的医疗资源,推广颅脑 B 超诊断技术,北京大学第一医院儿科按计划于 2007 年 3 月下旬举办为期 5 天的新生儿颅脑 B 超诊断学习班。本班属国家级继续教育项目,授课教师为本科及北京市著名专家教授。学习结束授予 10 学分。主要授课内容包括:相关中枢神经系统疾病;不同疾病颅脑 B 超诊断;不同影像检查方法的比较与选择;B 超检查原理方法;B 超有影像实习。招收学员对象:儿科新生儿专业医师,B 超专业医师、技师。学费 850 元。欲参加者请与我们联系:北京大学第一医院儿科(邮编 100034)王红梅、周丛乐。电话:010-66551122 转 3213 或 3461。E-mail: xsxxb1122@126.com。我们将给您寄去正式通知。

北京大学第一医院儿科
2006 年 10 月