

论著 · 实验研究

高氧暴露对早产大鼠肺组织中 HO-1 与 iNOS 表达的影响

全裕凤¹ 郑明慈² 张华¹ 张培林¹ 张红¹

(1. 桂林医学院附属医院新生儿科, 广西 桂林 541001;

2. 桂林医学院围产医学研究室, 广西 桂林 541001)

[摘要] **目的** 探讨血红素加氧酶-1(HO-1)与诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在高氧肺损伤大鼠中的表达及作用。**方法** 将3日龄早产 Sprague-Dawley 大鼠64只随机分为高氧组、空气组(每组32只),于实验3d及7d时,分别检测空气组和高氧组肺组织 HO-1 活性、肺泡灌洗液中 NO、肺组织病理学改变及 HO-1、iNOS 在肺内的分布和表达(免疫组织化学方法)。**结果** 3d、7d 高氧组存在明显急性肺炎症性改变,iNOS 在中性粒细胞的表达、灌洗液中 NO 含量明显高于空气组($P < 0.01$),且7d高氧组高于3d高氧组($P < 0.05$);3d、7d时高氧组巨噬细胞 HO-1 表达高于空气组(分别 $P < 0.05$, $P < 0.01$),且7d高氧组显著高于3d高氧组($P < 0.01$)。**结论** HO-1 与 iNOS 在高氧肺损伤大鼠中的表达是增高的,HO-1 与 iNOS 均可能参与了高氧肺损伤。

[中国当代儿科杂志,2011,13(7):577-580]

[关键词] 血红素加氧酶;诱导型一氧化氮合酶;高氧;肺;早产大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)07-0577-04

Expression of heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in the lungs of hyperoxia-exposed preterm rats

QUAN Yu-Feng, ZHENG Ming-Ci, ZHANG Hua, ZHANG Pei-Lin, ZHANG Hong. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China (Zheng M-C, Email: Zhengmc_cn@163.com)

Abstract: Objective To study the expression and the role of heme oxygenase-1 (HO-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in preterm rats with hyperoxia-induced lung injuries. **Methods** Sixty-four three-day-old preterm Sprague-Dawley rats were randomly assigned to a hyperoxia group (90% oxygen exposure) and a control group (room air exposure), with 32 rats in each group. After 3 days or 7 days of exposure, the lung activity of HO-1 and nitric oxide (NO) contents in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), pulmonary histopathologic changes, and the cellular distribution and expression of HO-1 and iNOS in the lungs were measured. **Results** After 3 days and 7 days of exposure, the hyperoxia group showed acute lung injuries characterized by the presence of hyperaemia, red cell extravasation and inflammatory infiltration. The NO contents in BALF and the iNOS expression in the lungs increased significantly in the hyperoxia group compared with those in the control group 3 and 7 days after exposure. The expression of HO-1 in macrophages in the lungs increased significantly in the hyperoxia group compared with that in the control group 3 and 7 days after exposure. The NO contents in BALF and the iNOS and HO-1 expression in the lungs increased significantly 7 days after hyperoxia exposure compared with 3 days after hyperoxia exposure. **Conclusions** iNOS and HO-1 levels in the lungs increase in preterm rats with hyperoxia-induced lung injuries, suggesting that iNOS and HO-1 may play roles in hyperoxia-induced pulmonary injuries. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (7):577-580]

Key words: Heme oxygenase-1; Inducible nitric oxide synthase; Hyperoxia; Lung; Preterm rats

支气管肺发育不良是婴儿时期最常见的慢性肺疾病,与早产、长期吸入高浓度氧等密切相关。近年来血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在

氧化应激性肺损伤中的作用受到关注^[1-4],iNOS 和 HO-1 均为血红素蛋白,一氧化碳(CO)和一氧化氮(NO)系统在形式和调节上相似,但 HO 的相关研究资料不多,其在高氧肺损伤中发挥了怎样的作用及

[收稿日期] 2010-06-19;[修回日期]2010-10-18

[基金项目]广西科技厅科技攻关基金(0472002-35);广西卫生厅医药卫生基金(Z2001061)。

[作者简介]全裕凤,女,硕士研究生,副主任医师。

[通信作者]郑明慈,教授。

其机理尚存在争议,iNOS 和 HO-1 间相互作用怎样?本研究建立早产儿高氧肺损伤动物模型,观察高氧对早产鼠肺 iNOS 及 HO-1 表达的影响,初步探讨二者在高氧肺损伤中的相互作用,为临床上防治早产儿高氧肺损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

动物模型制备参照文献^[5]。雌、雄成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由广西医科大学动物实验中心提供。提前 1 d 剖宫产出生的新生大鼠作为早产鼠。生后 3 d 随机分为:空气组和高氧组,每组 32 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(CYS21 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℃。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氧中毒。每组分别于实验的第 3 天、第 7 天取早产鼠麻醉处死(每时间点 16 只),取右肺中叶常规病理切片行苏木精-伊红染色,证实模型制备成功后分别留取标本待测。

1.2 支气管肺泡灌洗液中 NO 含量测定

每组 8 只早产鼠处死后行气管插管进行支气管肺泡灌洗^[6],取上清液检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中 NO 含量。NO 测定用硝酸还原酶法(试剂盒购自南京建成生物工程研究所),以 NO²⁻/NO³⁻含量表示。

1.3 肺组织病理学检查、HO-1 和 iNOS 免疫组织化学染色

每组各 8 只早产鼠,麻醉处死后结扎右肺,整

左肺肺组织福尔马林液固定,石蜡包埋、切片。苏木精-伊红染色光镜下行肺组织病理学检查;SABC 法检查 HO-1 和 iNOS 的表达,HO-1 和 iNOS 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,阴性对照用正常山羊血清代替一抗。阳性显色为亮棕黄色颗粒。应用 Image Proplus 5.1 软件进行图像分析对阳性细胞进行灰度扫描,取其平均值代表该片的吸光度(OD)值。计算阳性信号指数:阳性信号指数=阳性细胞百分比×阳性信号平均灰度值×100。

1.4 肺组织 HO-1 活性测定

采用考马斯亮蓝法测定。每组各取 8 只早产鼠右肺组织匀浆。以每小时每毫克蛋白生成胆红素量[nmol/(mg·h)]代表 HO-1 活性^[7]。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 中 NO 含量

高氧组 3 d 及 7 d BALF 中 NO 含量较同时间点空气组明显上升(分别 *t*=21.35,26.66,*P*<0.01)。见表 1。

2.2 肺组织 HO-1 活性

与空气组比,3 d 时高氧组 HO-1 活性轻度增加(*t*=8.58, *P*<0.05),7 d 时高氧组 HO-1 活性明显高于同时间点空气组(*t*=24.12, *P*<0.01)和高氧 3 d 组(*t*=16.26, *P*<0.01),见表 1。

表 1 肺组织 HO-1、iNOS 表达、HO-1 活性及 BALF 中 NO 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HO-1	HO-1 活性(nmol/mg·h)	iNOS	NO(μmol/L)
空气 3 d	8	7.2±2.6	4.3±1.6	6.02±1.78	5.6±1.1
高氧 3 d	8	18.5±6.6 ^b	6.1±1.6 ^b	32.62±5.87 ^a	17.1±5.8 ^a
空气 7 d	8	4.1±1.8	5.8±1.9	8.53±1.83	7.9±1.6
高氧 7 d	8	51.2±10.3 ^{a,c}	32.4±5.5 ^{a,c}	55.16±7.33 ^{a,d}	23.8±4.1 ^{a,d}
<i>F</i> 值		38.25	23.15	124.56	25.21
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.001	<0.01

与同时时间点的空气组相比,a:*P*<0.01,b:*P*<0.05;与高氧 3 d 组相比,c:*P*<0.01,d:*P*<0.05

2.3 肺组织病理学检查

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;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。空气组无明显的炎症反应和肺泡结构破坏。

2.4 HO-1 在肺内的分布和表达

空气组 HO-1 蛋白微弱表达,3 d 及 7 d 时无显

著差别($t=2.66, P>0.05$)。高氧组 HO-1 蛋白主要在炎症细胞,特别是在巨噬细胞胞浆中表达。实验第3天,高氧组 HO-1 呈弱阳性;实验第7天,呈强阳性,均高于同时间点空气组(分别 $t=7.12, 21.47,$

$P<0.05, P<0.01$), 且高氧 7 d 组高于 3 d 组($t=13.44, P<0.01$)。HO-1 阳性表达呈棕黄色颗粒,阴性对照无阳性染色。见表1、图1。

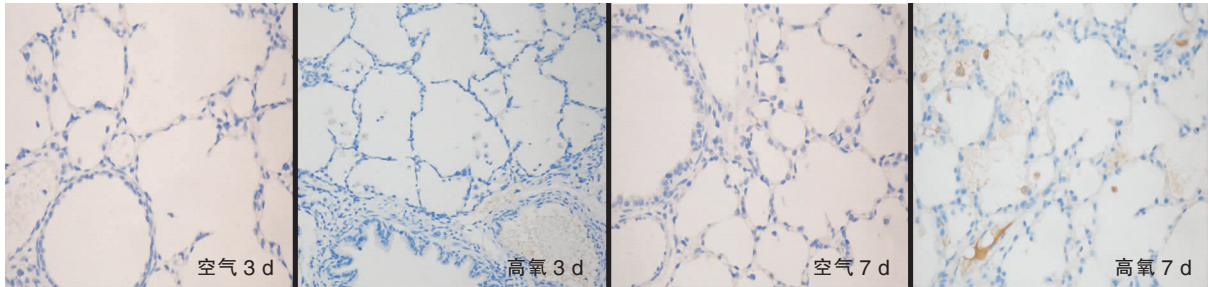


图1 HO-1 在早产大鼠肺组织的表达(免疫组化, ×100) 空气3 d组和空气7 d组 HO-1 均微弱表达,高氧3 d组 HO-1 呈弱阳性表达,高氧7 d组呈强阳性表达,且高于高氧3 d组。HO-1 阳性表达呈棕黄色颗粒。

2.5 iNOS 在肺内的分布和表达

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($P>0.05$)。iNOS 在高氧3 d组、7 d组的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,强度均高于同时间点空气组(t 分别 = 14.24, 28.37, 均 $P<0.01$), 且高氧7 d组 iNOS 表达高于3 d组($t=7.42, P<0.01$)。见表1、图2。

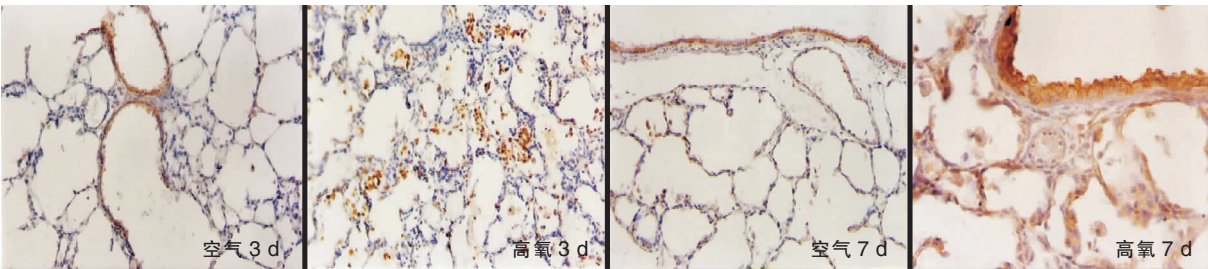


图2 iNOS 在各组早产大鼠肺组织中的表达(免疫组化, ×100) iNOS 在空气组主要分布于气道上皮细胞和少数肺泡巨噬细胞,呈弱阳性,iNOS 在高氧组主要分布于气道上皮和肺泡上皮细胞、炎症细胞包括多形核白细胞和巨噬细胞,呈阳性表达,高氧组的表达均明显高于相应的空气组,且高氧7 d组表达高于高氧3 d组。iNOS 阳性表达呈棕黄色颗粒。

3 讨论

一氧化氮合酶(nitricoxide synthase, NOS)是 NO 合成的催化酶,共有 3 种类型:eNOS、iNOS、nNOS, 其中 iNOS 受诱导后释放的大量的 NO 介导免疫系统的细胞毒和细胞生长抑制。已有的实验研究表明,当细胞同时产生大量的 NO 和 O₂⁻时,生成有毒的强氧化剂—ONOO⁻, ONOO⁻是 NO 的主要毒性作用形式,可介导产生大量的活性氧自由基,导致神经细胞 DNA 损伤^[8]。高氧急性肺损伤时 eNOS 及 iNOS 的表达均明显升高^[9];用 NOS 的抑制剂可以

通过抑制 NOS 活性来降低 NO 介导的早产儿高氧肺损伤^[10]。本研究发现,高氧暴露 3、7 d 都可显著诱导早产大鼠肺 iNOS 的表达, BALF 中 NO 浓度显著升高,同时伴随着肺组织充血、出血及炎性渗出,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,NO 在高氧肺损伤中可能发挥了重要的病理作用。

HO 是血红素代谢的限速酶,其 3 种同工酶中 HO-1 为诱导型,可被血红素、金属元素、氧化应激等因素诱导激活,催化降解血红素生成 CO、胆绿素和铁离子。肺是 HO 表达的重要器官之一。研究表明高氧能上调新生鼠肺组织及呼吸窘迫综合征早产新

生儿 HO-1 的表达^[1-2]。氧化应激状况下可诱导肺组织及胎肺成纤维细胞 HO-1 的表达^[3-4]。本研究发现,高氧组 3 d 时 HO-1 仅轻度表达;7 d 时高氧组巨噬细胞 HO-1 表达显著增加,且高氧组较空气组显著增加达 10 倍以上,HO-1 活性显著增加达 5 倍以上,说明持续吸入高浓度氧可诱导肺组织 HO-1 蛋白的表达,而且有可能发挥了重要的损伤作用,因为近年来的研究发现 HO-1 表达量过高时,会促进乳酸脱氢酶的释放和降低谷胱甘肽转移酶含量,破坏细胞膜完整性^[11]。Suttner 等^[12]的实验证明,HO-1 在活性增加 5 倍以上时,其产生的过量铁离子可能成为氧化剂的前身,导致活性氧自由基的大量产生,造成组织损害。

近来研究发现了 HO-1/CO 系统与 iNOS/NO 系统存在相互作用。iNOS 含有血红素等辅助因子。血红素被认为是合成 NO 的催化活性中心,NOS 的催化活性可被血红素结合剂如 CO 等所阻断。而已有的研究表明 NOS 对 HO 系统的影响是复杂的^[13-14]:一方面 NO 的自由基性质能诱导 HO-1 的表达;同时,NOS 产生的 NO 能抑制 HO 活性^[15]。因此,在不同的实验条件下或不同的采集时间,NO 的抑制和刺激效应均可能存在。而 NO 在诱导 HO/CO 的生成时,HO/CO 又能反馈抑制 NO 的产生从而发挥保护作用。

NO 与环磷酸鸟苷(cGMP)的亲合力比 CO 强 50 倍^[16],因此在生理状态下 NO 的调节起主要作用。氧化应激反应中 HO/CO 和 NOS/NO 系统则显示出互补及代偿性调节作用。从本研究可以得知,高氧组肺组织在高氧 3 d 时即表现为充血、出血及炎性渗出,此时 iNOS 显著表达,HO-1 仅轻度表达;7 d 时 iNOS 的表达进一步加强,HO-1 表达的虽明显增加,也仅仅见于巨噬细胞,说明在高氧暴露早期肺损伤中,iNOS/NO 系统可能发挥了更重要的作用,另外,由于 iNOS 和 HO-1 均为血红素蛋白,CO 和 NO 系统在形式和调节上有着神奇的相似,所以有理由推测 CO/HO-1 体系对高氧肺损伤的影响可能被 NO 等的诱导作用所掩盖,具体机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

(本文编辑:王霞)

[1] Farkas I, Maróti Z, Katona M, Endreffy E, Monostori P, Mäder

K, et al. Increased heme oxygenase-1 expression in premature infants with respiratory distress syndrome [J]. *Eur J Pediatr*, 2008, 167(12):1379-1383.

[2] Dennery PA, Rodgers PA, Lum MA, Jennings BC, Shokoohi V. Hyperoxic regulation of lung heme oxygenase in neonatal rats [J]. *Pediatr Res*, 1996, 40(6): 815-821.

[3] Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M. Aging affects lipopolysaccharide-induced upregulation of heme oxygenase-1 in the lungs and alveolar macrophages[J]. *Biogerontology*, 2009, 10(2): 173-180 .

[4] Pascal T, Debaq-Chainiaux F, Boilan E, Ninane N, Raes M, Toussaint O. Heme oxygenase-1 and interleukin-11 are overexpressed in stress-induced premature senescence of human WI-38 fibroblasts induced by tert-butylhydroperoxide and ethanol [J]. *Biogerontology*, 2007, 8(4): 409-422.

[5] 全裕凤,郑明慈,张华,邓毅,张红. 高体积分数氧暴露早产大鼠肺组织血红素加氧酶-1 的表达及活性变化 [J]. *实用儿科临床杂志*,2009,4(6):428-430.

[6] 全裕凤,郑明慈,张华,张培林,张红. 血红素氧合酶-1 抑制剂锌原卟啉对早产鼠高氧肺损伤的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*,2009,24(18): 1409-1411.

[7] 戎小平,邵勤,郭秀霞,江莲. 足月小于胎龄儿脐血中血红素氧合酶-1 的测定及其在脐血管上的表达 [J]. *中国实用儿科杂志*,2008,23(1):21-24.

[8] Chen W, Jia Z, Zhu H, Li Y, Misra HP. Ethyl pyruvate inhibits peroxynitrite-induced DNA damage and hydroxyl radical generation: implications for neuroprotection[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35(2): 336-342.

[9] 张向峰,梁瑛. 高氧所致小鼠急性肺损伤时一氧化氮合成酶的表达(英文) [J]. *中华急诊医学杂志*,2004,13(6):365-367.

[10] Auten RL, Mason SN, Whorton MH, Lampe WR, Foster WM, Goldberg RN, et al. Inhaled ethyl nitrite prevents hyperoxia-impaired postnatal alveolar development in newborn rats [J]. *Am J Res Crit Car Med*, 2007, 176(3): 291-299.

[11] Suttner DM, Sridhar K, Lee CS. Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells[J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(3 Pt 1): 443-448.

[12] Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron[J]. *FASEB J*, 1999,13(13):1800-1805.

[13] 张帆,夏中元,欧阳静萍. 肠缺血再灌注致肺损伤时肺内 HO-1/CO 与 iNOS/NO 相互作用的研究[J]. *中国急救医学*,2005,25(10):728-730.

[14] Yang NC, Lu LH, Kao YH, Chau LY. Heme oxygenase-1 attenuates interleukin-1β-induced nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells [J]. *Biomed Sci*, 2004, 11(6): 799-809.

[15] 吕勇,孙波. 吸入一氧化氮对儿科患者高铁血红蛋白浓度的影响[J]. *中国当代儿科杂志*,2008,10(2):257-258.

[16] Siow RC, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signaling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 41(2): 385-390.