

[文章编号] 1000- 4718(2005)03- 0604- 03

# 一氧化氮吸入和重组人超氧化物歧化酶对胎粪吸入肺损伤后肺组织纤维化指标的观察\*

陈湘湘, 杜立中, 卢美萍

(浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310003)

**[摘要]** 目的: 观察一氧化氮(NO)吸入和重组人超氧化物歧化酶(rhSOD)气管内给药对胎粪吸入肺损伤时肺转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和羟脯氨酸的变化,以了解其对胎粪吸入肺损伤后组织修复的影响。方法: 40只雄性SD幼年大鼠,随机分为:(1)对照组(control, C): 气管置管注入1 mL/kg生理盐水,暴露于空气中;(2)胎粪吸入组(Mec): 气管置管注入20%胎粪1 mL/kg,暴露于空气中;(3)NO吸入组(iNO): 胎粪注入后暴露于 $20 \times 10^{-6}$  NO中;(4)rhSOD组(SOD): 胎粪注入后, rhSOD 20 mg/kg 气管内注入并暴露于空气中;(5)联合应用 $20 \times 10^{-6}$  NO和20 mg/kg rhSOD组(iNO/SOD)。用RT-PCR方法测定肺组织TGF- $\beta$ 1 mRNA含量,用羟脯氨酸试剂盒测定肺组织羟脯氨酸含量。结果: 胎粪吸入组肺组织TGF- $\beta$ 1 mRNA含量明显高于正常组( $1.315 \pm 0.394$  vs  $0.676 \pm 0.166$ ,  $P < 0.05$ ), NO吸入、rhSOD及iNO/rhSOD治疗组TGF- $\beta$ 1 mRNA含量明显低于胎粪吸入组( $0.694 \pm 0.187$  vs  $1.315 \pm 0.394$ ,  $0.758 \pm 0.331$  vs  $1.315 \pm 0.394$ ,  $0.566 \pm 0.370$  vs  $1.315 \pm 0.394$ , 均 $P < 0.05$ ), iNO和rhSOD未见协同作用。各组羟脯氨酸含量未见显著差异。结论: NO吸入和rhSOD气管给药能降低胎粪吸入肺损伤时肺组织TGF- $\beta$ 1 mRNA含量,提示这两种治疗方法对胎粪吸入肺损伤后组织纤维化可能具有抑制作用。

**[关键词]** 一氧化氮; 超氧化物歧化酶; 胎粪吸入; 肺损伤; 转化生长因子 $\beta$ ; 羟脯氨酸

**[KEY WORDS]** Nitric oxide; Superoxide dismutase; Meconium aspiration; Lung injury; Transforming growth factor beta; Hydroxyproline

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

胎粪吸入肺损伤是一种常见的新生儿科疾病,重者可引起急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、新生儿持续肺动脉高压(persistent pulmonary hypertension of newborn, PPHN),甚至死亡。与其他损伤一样,胎粪吸入肺损伤在发生发展的同时,机体也进行着抗损伤性修复,表现为肺基质的破坏和重建,成纤维细胞活化,细胞外基质增多等。一氧化氮吸入可减轻胎粪吸入引起的严重低氧血症,减少肺损伤,同时也有研究表明NO可通过调节细胞因子的释放而减轻肺间质胶原的沉积<sup>[1]</sup>。重组人超氧化物歧化酶(recombinant human superoxide dismutase, rhSOD)是氧自由基清除剂,且具有抗炎作用,因而能减轻肺损伤,同时还具有抗纤维化作用<sup>[2]</sup>。但是iNO和rhSOD对胎粪吸入肺损伤后修复的影响尚未见报道。已知细胞外基质沉积的主要成分为胶原,而TGF- $\beta$ 1在促进前胶原基因的表达有重要的作用<sup>[3]</sup>,因而肺组织TGF- $\beta$ 1的mRNA水平可作为肺损伤修复的一个早期检测指标。而羟脯氨酸是胶原的重要组成成份,通过检测其在肺组织的含量可反映肺部胶原的沉积情况。本研究通过建立幼年大鼠胎粪吸入肺损伤模型研究了NO吸入和人

重组超氧化物歧化酶对肺组织TGF- $\beta$ 1及羟脯氨酸的影响以了解其对胎粪吸入肺损伤后修复的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

NO气体由上海比欧西公司提供,浓度为 $800 \times 10^{-6}$ 。rhSOD购自美国Roche公司。胎粪制备:取多个足月健康新生儿头次胎粪,真空冷冻干燥,混匀,然后用生理盐水稀释成20%胎粪混合物,分装-20℃保存待用。NO吸入装置为自行设计的有机玻璃箱,将 $800 \times 10^{-6}$  NO和医用空气混合后通入有机玻璃箱中,空气流量为4 L/min,在入箱前10 cm处通过检测仪持续监测NO和NO<sub>2</sub>浓度,调整NO流量使箱中NO浓度达 $20 \times 10^{-6}$ , NO<sub>2</sub>浓度 $< 2 \times 10^{-6}$ 。箱上有一通气孔与外界相通以保持箱内外压力平衡,箱内用钠石灰吸收二氧化碳,保持环境温度为25℃,大鼠在箱内可自由饮水和食物,箱内废物每4-6 h清理1次。

### 2 动物分组与实验步骤

健康雄性幼年SD大鼠40只,体重130-170 g,由浙江省医科院动物中心提供。采用腹腔注射2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,取仰卧位置于手术台上固定,气管切开插管,维库溴胺2 mg/kg维持肌松,15 min后对照组(control, C组)注入1 mL/kg生理盐水(normal saline, NS),其余动物均由气管置管注入胎粪1 mL/kg,继以3 mL空气注入确保胎粪均匀进

[收稿日期] 2004- 05- 25 [修回日期] 2004- 07- 27

\* [基金项目] 浙江省卫生厅重点课题资助项目(No. W10125)

Tel: 0571- 87230475; E- mail: chenxiangxiang@zju.edu.cn

入支气管及肺泡, 30 min 后随机分组: (1) 胎粪组 (meconium, Mec 组): 1 mL/kg 生理盐水气管内注入并暴露于空气中; (2) NO 吸入组 (iNO 组), 暴露于  $20 \times 10^{-6}$  NO 有机玻璃箱中; (3) rhSOD 组 (SOD 组): 剂量为 20 mg/kg, 溶解于 1 mL/kg 生理盐水中, 气管内注入, 并暴露于空气中; (4) 联合应用  $20 \times 10^{-6}$  NO 和 20 mg/kg rhSOD 组 (SOD/iNO 组): 先予 rhSOD, 剂量同 SOD 组, 然后暴露于  $20 \times 10^{-6}$  NO 有机玻璃箱中。所有动物均在术后 1-1.5 h 拔管, 缝合气管、颈部肌肉和皮肤, 等动物清醒后允许正常活动和饮食。

### 3 样品收集与处理

上述实验 24 h 后麻醉、开胸、心脏放血处死动物, 取右上肺组织-70 °C 保存以测定 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达情况。取右中肺组织, 用组织匀浆器在冰浴下制成 10% 肺组织生理盐水匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清-70 °C 冻存以测定羟脯氨酸。

### 4 TGF- $\beta$ 1 mRNA 基因表达的检测

用 RT-PCR 的方法测定。首先采用 Trizol 一步法抽提细胞总 RNA 溶于适量去核酸水中, 应用 Du-640 紫外分光光度计测定组织总 RNA 的产量和纯度, 再逆转录成 cDNA, 以适量 cDNA 为模板, 在 TaqDNA 聚合酶催化下行 PCR 扩增。引物由上海生工生物技术公司合成, 以  $\beta$ -actin 为内参照。

$\beta$ -actin 上游引物序列为: 5'-ATGCCAACACAGT-GCTGTCT-3'; 下游引物序列为: 5'-CTGCTTGTGATC-CACATCT-3'; TGF- $\beta$ 1 的上游引物为: 5'-GCTAATGGTG-GACCGCAAC-3'; 下游引物为: 5'-GCAGTGAGCACTGAAGCGA-3'。

扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。终产物 TGF- $\beta$ 1 340 bp,  $\beta$ -actin 200 bp。PCR 产物经溴化乙锭染色, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果用 Syngene 成像分析系统扫描及灰度分析, 以 TGF- $\beta$ 1 与  $\beta$ -actin 吸光度比值表示其相对含量。

### 5 羟脯氨酸含量测定

按照试剂盒说明书进行。主要步骤如下: 将 10% 的组织匀浆稀释成 2% 悬液, 37 °C 消化 60 min, 加各种羟脯氨酸检测试剂, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清在 550 nm 处测吸光度值。用羟脯氨酸标准品浓度折算样品浓度。匀浆中总蛋白含量测定按照 Bradford 法进行。

### 6 统计学处理

实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 SPSS 11.0 统计软件对实验数据进行统计学处理, 采用单因素方差分析 ( $F$  检验和  $q$  检验) 进行各组间比较。

## 结 果

### 1 各组肺组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平

对照组具有一定水平的 TGF- $\beta$ 1, 胎粪组 TGF- $\beta$ 1 水平显著高于对照组, NO 吸入治疗组、SOD 治疗组、iNO 联合 SOD 组 TGF- $\beta$ 1 水平均显著低于胎粪组。iNO 联合 SOD 治疗组 TGF- $\beta$ 1 水平与 iNO 组和 SOD 组无显著差异 (见表 1 和图 1)。

### 2 各组肺组织羟脯氨酸检测结果

对照组、胎粪吸入组、各治疗组间均未见显著差异 ( $P > 0.05$ ) (见表 1)。

表 1 各组肺组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达及羟脯氨酸含量的变化

Tab 1 Lung tissue TGF- $\beta$ 1 mRNA expression and hydroxyproline level in all groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Group	TGF- $\beta$ 1 mRNA expression	Hydroxyproline level (g/g protein)
Control	0.676 $\pm$ 0.166*	0.267 $\pm$ 0.033
Mec	1.315 $\pm$ 0.394	0.314 $\pm$ 0.035
iNO	0.694 $\pm$ 0.187*	0.345 $\pm$ 0.034
SOD	0.758 $\pm$ 0.331*	0.290 $\pm$ 0.050
SOD/iNO	0.566 $\pm$ 0.370*	0.291 $\pm$ 0.088

\*  $P < 0.05$  vs Mec group.

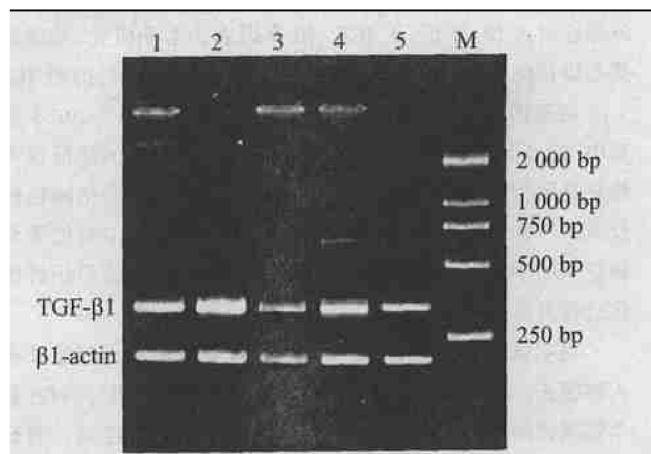


Fig 1 Expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA in all groups. 1: C group; 2: Mec group; 3: iNO group; 4: SOD group; 5: iNO/SOD group; M: DNA marker.

图 1 各组肺组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平的变化

## 讨 论

胎粪吸入肺损伤是一种复杂性多样性的疾病, 在早期阶段, 各种细胞因子、炎症因子趋化活化中性粒细胞, 促使 PMN 脱颗粒, 释放过氧化物酶、金属蛋白酶等蛋白水解酶, 溶解破坏基底膜和细胞外基质, 引起更多炎性细胞、成纤维细胞的活化, 形成恶性循环, 使病情恶化。同时肺组织也进行着抗损伤性修复纤维化的过程: 成纤维细胞的活化导致细胞外基质分泌增多, 细胞外基质的主要成分是胶原, 它的沉积最终导致肺纤维化。

TGF- $\beta$ 1 是一种促进胶原产生和沉积的重要细胞因子, 肺组织发生纤维化时 TGF- $\beta$ 1 及其 mRNA 表达显著增加。它主要作用于胶原的转录和翻译的过程, 能诱导前胶原 mRNA 产生, 从而促进胶原蛋白的形成和沉积<sup>[4]</sup>。因此检测 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平的变化可从一个角度反应肺损伤修复纤维化情况。羟脯氨酸是胶原的重要组成成份, 主要存在于胶原蛋白中, 弹性蛋白中占极少量, 而其他蛋白中均不存在, 所以

可通过检测肺组织羟脯氨酸含量以反应肺部胶原的沉积情况。

本实验结果表明正常大鼠肺组织中存在一定水平的 TGF- $\beta$ 1, 胎粪吸入后, 大鼠肺组织中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 水平明显增高。这与胎粪吸入肺损伤发生后, 肺泡巨噬细胞、气道上皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等表达 TGF- $\beta$ 1 mRNA 增加有关。一氧化氮吸入治疗后, 肺组织的 TGF- $\beta$ 1 mRNA 水平明显较胎粪组下降。这可能与一氧化氮的抗纤维化作用有关<sup>[5]</sup>。有实验研究表明, 抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的作用或者 iNOS 基因敲除可使多种组织 TGF- $\beta$ 1 的表达增加, 促进基质胶原的沉积和组织纤维化。而给予 NO 供体如硝普钠或 NO 前体物质 L- 精氨酸可逆转 iNOS 抑制后的 TGF- $\beta$ 1 的增加, 提示 NO 具有抑制组织 TGF- $\beta$ 1 的表达而抑制组织胶原合成和纤维化。以往的实验大都基于慢性损伤模型的研究, 在本实验中, 我们以胎粪吸入的急性肺损伤为模型, 用外源性吸入 NO 干预, 从 TGF- $\beta$ 1 基因表达水平研究, 发现结果与以往的实验具一致性。提示 NO 本身可能具有抑制 TGF- $\beta$ 1 的基因表达, 从而显示其抗纤维化作用。另外, 在本实验中 NO 干预后肺组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平的降低也可能只是因为 NO 改善氧合, 减轻炎症反应而使肺损伤减轻的反应。不管如何, 在胎粪吸入急性肺损伤模型中, iNO 能降低肺组织的 TGF- $\beta$ 1 的表达, 从而提示其对肺损伤后组织纤维化过程具拮抗作用。

在本试验中, 我们使用了 rhSOD 气管内给药治疗胎粪吸入肺损伤。SOD 是氧自由基清除剂, 具有抗炎作用, 同时在数个临床和动物实验研究中显示了其抗纤维化的性质。有研究表明 SOD 的抗纤维化作用是通过降低 TGF- $\beta$ 1 的表达<sup>[6]</sup>, 从而抑制成纤维细胞的活化, 胶原的产生和沉积。以往对 SOD 的抗纤维化作用主要集中于对放射性纤维化的研究, 在本实验中, 我们在胎粪吸入急性肺损伤模型中给予 rhSOD 后, 发现它也能显著降低 TGF- $\beta$ 1 的表达。其降低 TGF- $\beta$ 1 的表达可能与 SOD 具有抗氧化抗炎作用, 从而减轻急性肺损伤有关。也可能与 SOD 对转录因子如 AP-1 的调节有关, 具体机制尚待研究。

本试验中我们还联合应用了 NO 吸入和 rhSOD 气管内给药, 虽然联用这两种方法后 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平较胎粪组有明显下降, 但是两者并未见协同作用, 这可能与两者的作用机制相似有关。也可能是 iNO 或 rhSOD 均只能使异常增

高的 TGF- $\beta$ 1 降至正常而不能使正常水平的 TGF- $\beta$ 1 进一步降低。

而在本试验中, 我们对各组肺组织羟脯氨酸的检测未发现各组间的差异, 这可能与我们的观察时间(24 h)比较短有关。一般认为胶原的沉积需要一个过程, 通常在损伤后一周发生。本实验结果也提示胎粪吸入肺损伤早期虽有肺基质重建和纤维化的启动, 但未见显著的胶原纤维沉积。对此, 尚需用较长时间的动物模型观察才能解决。

总之, NO 吸入和 rhSOD 气管内给药均能降低胎粪吸入肺损伤后 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平, 而 TGF- $\beta$ 1 是促进胶原产生和沉积, 启动早期纤维化的重要细胞因子, 所以这两种方法可能会减轻胎粪吸入肺损伤后早期纤维化。

#### [参 考 文 献]

- [1] 龙小雅, 杜立中, 何良强, 等. 一氧化氮吸入对实验性胎粪吸入兔肺中性粒细胞表面 CD11b 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(3): 402-405.
- [2] Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ, et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn SOD and Mn SOD: an experimental study [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996, 35(2): 305-312.
- [3] Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, et al. Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon- $\gamma$  and transforming growth factor- $\beta$ : integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators[J]. J Biochem, 2001, 276(14): 11041-11048.
- [4] Bienkowski RS, Gotkin MG. Control of collagen deposition in mammalian lung[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 209(2): 118-140.
- [5] Morrissey JJ, Ishidoya S, McCracken R, et al. Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 1996, 7(10): 2202-2212.
- [6] Kang SK, Rabbani ZN, Folz RJ, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 57(4): 1056-1066.