

糖皮质激素对机械通气大鼠肺组织 iNOS、NO 表达的影响

刘 芳, 张新日, 张 岩

(山西医科大学第一临床医学院呼吸科, 太原 030001)

【摘要】 目的 通过观察糖皮质激素对机械通气大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及一氧化氮(NO)表达的影响,探讨糖皮质激素对呼吸机所致肺损伤(ventilator induced lung injury, VILI)的干预作用。方法 24 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、机械通气组、地塞米松(DXM)干预组。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肺组织 iNOS mRNA 表达,用免疫组织化学染色法检测肺组织 iNOS 蛋白表达,用硝酸还原酶法测定肺组织和血浆 NO 含量。结果 机械通气组和 DXM 干预组大鼠肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白表达水平,以及血浆和肺组织 NO 含量均明显高于对照组($P < 0.01$);DXM 干预组上述指标与机械通气组比较均明显降低($P < 0.01$)。结论 糖皮质激素可通过抑制肺组织 iNOS 的表达,减少 NO 的生成,对机械通气大鼠肺组织具有保护作用。

【关键词】 机械通气; 肺损伤; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 地塞米松

【中图分类号】 R329.435; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)01-0012-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.01.003

The Effects of Glucocorticoid on Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Expressed in the Lung of Rats with Ventilation

LIU Fang, ZHANG Xin-ri, ZHANG Yan

(Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To explore the role of glucocorticoid in the course of prevention and treatment in ventilator induced lung injury(VILI) by investigating glucocorticoid effect on expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) and nitric oxide(NO) in lung of rats in mechanical ventilation. **Methods** Twenty-four health male Wistar rats were randomly divided into control group, ventilation group and dexamethasone pretreatment group(DXM group). The expression of iNOS mRNA and protein in the pulmonary tissues were detected by RT-PCR and immunohistochemistry respectively. The contents of NO in plasma and lung tissue were detected with nitrate reductase method. **Results** The expression of iNOS mRNA and protein in the pulmonary tissues and the content of NO in plasma and lung tissue in ventilation group and DXM group were significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). Compared with ventilation group, all of above targets in DXM group were decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Glucocorticoid might exert protective effects on rats' ventilated lung tissue by inhibiting the expression of iNOS and the production of NO in the lung.

【Key words】 Mechanical ventilation; Lung injury; Nitric oxide; Inducible nitric oxide synthase; Dexamethasone

呼吸机所致肺损伤(ventilator induced lung injury, VILI)是影响机械通气临床疗效的一个重要

因素,研究 VILI 的发生机制和防治措施对提高机械通气的应用水平以及危重症患者的救治水平均具

基金项目】 山西省科技攻关资助项目(2007032016-4);太原市科技资助项目(0801041)。

作者简介】 刘芳(1982-),女,硕士生。

通讯作者】 张新日(1961-),男,教授。研究方向:机械通气与肺损伤。E-mail:ykdzxr61@yahoo.com.cn。

有重要意义^[1]。本研究拟通过动物试验,探讨糖皮质激素对大潮气量机械通气大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及一氧化氮(NO)表达的干预作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组与模型制备

雄性健康 Wistar 大鼠 24 只(山西医科大学实验动物中心提供) [SCXK(晋)2009-001], 体重 310 ~ 380 g, 随机分为 3 组①对照组:未行机械通气;②机械通气组: $V_T = 40$ mL/kg;③地塞米松干预组: $V_T = 40$ mL/kg, 通气前 1 h 经腹腔注入 DXM (6 mg/kg)。

用 25% 乌拉坦 4 mL/kg 腹腔注射将大鼠麻醉后行气管切开。除对照组外,其余大鼠均通过胶管与动物人工呼吸机(DH-450 型,浙江大学医学仪器厂制造)连接,进行机械通气。各组大鼠的通气参数除潮气量外,其余参数均相同,即 I:E = 1:3, $FiO_2 = 21\%$, $F = 60$ 次/min, 通气时间为 90 min。

通气结束后经腹主动脉取血 2 ~ 3 mL, 肝素钠抗凝,离心取上清液置于 EP 管中, -80℃ 冻存备用。然后将大鼠放血处死,切取肺脏。在无菌状态下取右肺上叶置于已消毒的 EP 管中, -80℃ 冰箱保存,用于 RT-PCR 及肺组织 NO 测定。取右肺下叶以 10% 中性福尔马林灌注固定,24 h 后行常规石蜡包埋,用于 HE 及免疫组织化学染色。

1.2 RT-PCR 法检测肺组织 iNOSmRNA 的表达

用 Trizol (TaKaRa 宝生物工程有限) 提取肺组织总 RNA, 以大鼠 GAPDH (磷酸甘油醛脱氢酶) 作为内参。大鼠 iNOS 及内参引物由北京奥科生物技术有限公司合成。大鼠 iNOS 及内参 (GAPDH) 引物由北京奥科生物技术有限公司合成。iNOS 上游引物: 5'-GGC TCC AGC ATG TAC CCT-3'; 下游引物: 5'-TCC TGC CCG CTG AGT TCG T-3'; 反应条件: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 70℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 70℃ 延伸 2 min。GAPDH 上游引物: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; 下游引物: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'; 反应条件: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 变性 30 s, 59℃ 复性 30 s, 70℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 70℃ 延伸 5 min。取 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 用天能 2500 凝胶图像分析系统扫描条带密度, 以目的基因光密度值与内参光密度值的比值表示肺组织 iNOS mRNA 的相对表达量。

1.3 肺组织 iNOS 免疫组织化学染色

采用链霉素亲和-生物素-过氧化酶复合物 (SABC) 法检测大鼠肺组织 iNOS 蛋白表达。操作步骤按试剂盒说明 (购自武汉博士德生物有限公司) 进行。兔抗大鼠抗体工作浓度为 1:50, 以 PBS (磷酸盐缓冲液) 代替一抗作阴性对照。

结果判断: 阳性表达为细胞质呈棕褐色, 阳性表达细胞多集中于细支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞。采用 MIAS-2000 医学图像分析系统检测每个高倍视野 (40 × 10) 的目标平均灰度 (G_0)、视场平均灰度 (G_V) 和面积密度 (A_{AR}), 并计算出阳性单位, 即 $PU = [1 - G_0 - G_V] \times 100 / [1 - A_{AR}] \times G_{max}$, 其中 G_{max} 为最大灰度 (255) [1]。

1.4 肺组织和血浆 NO 测定

采用硝酸还原酶法测定肺组织和血浆 NO 含量, 方法及操作步骤按试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所) 说明进行。

1.5 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件包进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析, 各组均数间两两比较用 SNK-q 检验法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白表达

各组大鼠肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白表达测定结果见表 1 和图 1 ~ 5。结果显示, 机械通气组和 DXM 干预组肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白表达水平均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而 DXM 干预组肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白表达水平较机械通气组明显降低 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠肺组织 iNOSmRNA 及其蛋白表达

Tab. 1 The expression of iNOS mRNA and protein in lung in groups

组别 Group	鼠数 Number	iNOSmRNA	iNOS 蛋白 iNOS protein
对照组 control group	8	0.21 ± 0.07	2.91 ± 0.75
机械通气组 ventilation group	8	1.08 ± 0.09*	15.77 ± 1.33*
地塞米松干预组 DXM group	8	0.64 ± 0.06* ^Δ	9.12 ± 0.94* ^Δ

注: 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与机械通气组比较: ^Δ $P < 0.01$

Note: Compared with the control group: * $P < 0.01$; compared with the ventilation group: ^Δ $P < 0.01$

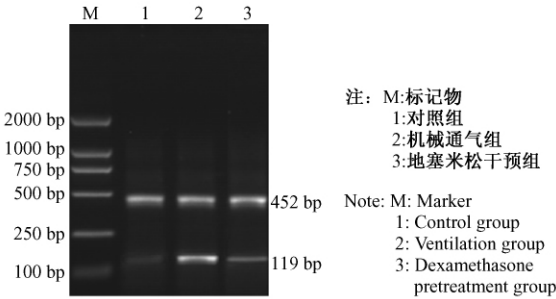


图 1 各组大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达 (RT-PCR)
Fig. 1 The expression of iNOS mRNA in lung tissue in groups (RT-PCR)

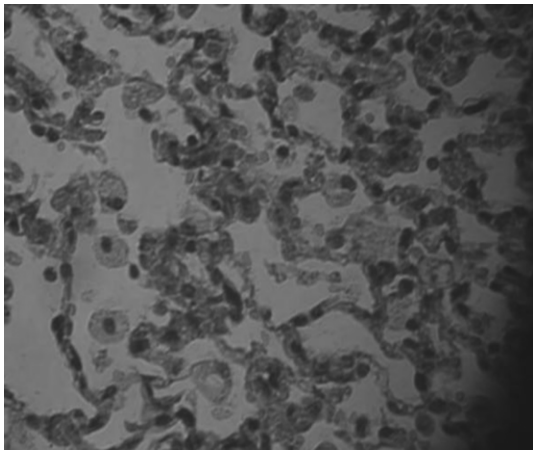


图 2 机械通气组大鼠肺组织弥漫性肺间质水肿和炎性细胞浸润

Fig. 2 Different levels of interstitial and alveolar edema, infiltration and activation of inflammation cells could be seen in ventilation group

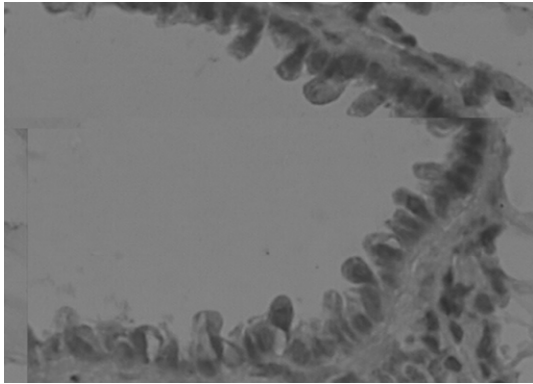


图 3 对照组大鼠肺组织 iNOS 蛋白 (SABC)
Fig. 3 iNOS protein in lung tissue in control group (SABC)

2.2 血浆和肺组织 NO 测定

各组大鼠血浆和肺组织 NO 含量测定结果见表 2。结果显示:机械通气组和 DEX 干预组血浆和肺

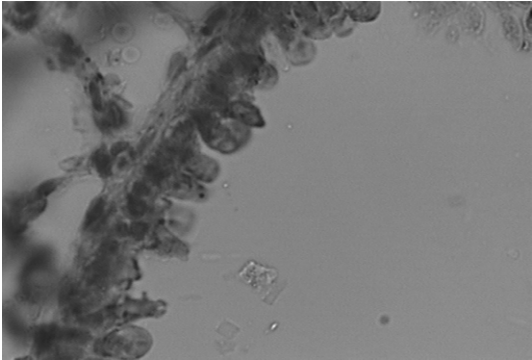


图 4 机械通气组大鼠肺组织 iNOS 蛋白 (SABC)
Fig. 4 iNOS protein in lung tissue in ventilation group (SABC)

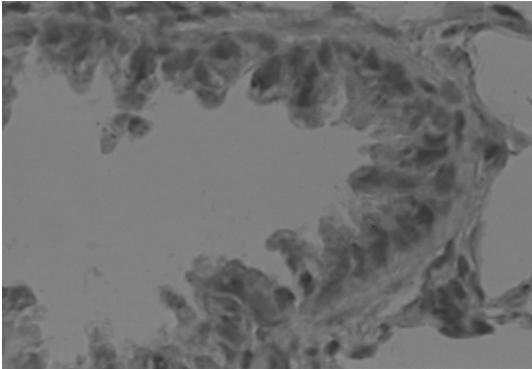


图 5 DXM 干预组大鼠肺组织 iNOS 蛋白 (SABC)
Fig. 5 iNOS protein in lung tissue in DXM group (SABC)

组织 NO 含量均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而 DXM 干预组血浆和肺组织 NO 含量较机械通气组明显降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠血浆和肺组织中 NO 含量
Tab.2 NO in lung and blood in groups

组别 Group	鼠数 Number	血浆 NO ($\mu\text{mol/L}$) NO in plasma	肺组织 NO ($\mu\text{mol/L}$) NO in lung tissue
对照组 control group	8	36.76 ± 5.50	26.12 ± 4.25
机械通气组 ventilation group	8	$78.77 \pm 11.65^*$	$71.31 \pm 5.88^*$
地塞米松干预组 DXM group	8	$61.60 \pm 6.39^{*\Delta}$	$48.06 \pm 5.71^{*\Delta}$

注:与对照组比较: $^* P < 0.01$; 与机械通气组比较: $^{\Delta} P < 0.01$
Note: $^* P < 0.01$, Compared with the control group; $^{\Delta} P < 0.01$, compared with the ventilation group

3 讨论

呼吸机所致肺损伤 (ventilator induced lung injury, VILI) 是影响机械通气临床疗效的一个重要因素,其发病机制相当复杂,涉及面非常广泛,是目

前医学界研究的热点之一^[1]。研究表明,大潮气量机械通气可引起炎症细胞在局部肺组织聚集、活化,并释放多种炎性介质和细胞因子^[1]。这些炎性介质和细胞因子不但可直接造成肺组织损伤,还可激活更多的炎症细胞释放炎性介质或细胞因子,从而形成瀑布效应,使机体损害因素进一步放大。本研究结果显示,机械通气组大鼠肺组织可见弥漫性肺间质水肿和炎症细胞浸润,进一步证实大潮气量机械通气可导致急性肺损伤的发生。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是由多种细胞产生的广泛存在于生物体内的小分子物质,体内 NO 主要由一氧化氮合酶(NOS)催化生成。NOS 依其激活条件可分为固有型(cNOS)和诱导型(iNOS)两种类型^[8,9]。正常时,cNOS 催化体内生成少量 NO,具有多种重要的生理功能。在病理条件下,由 iNOS 诱导产生的大量 NO 则可作为一种炎性介质参与多种疾病(如支气管哮喘、急性呼吸窘迫综合征)的发病过程,日益受到了人们的关注^[6,7]。然而,NO 是否参与 VILI 的发生过程,目前文献报道甚少。本实验结果显示,机械通气组大鼠肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白表达水平,以及血浆和肺组织 NO 含量均明显高于对照组,说明大潮气量机械通气可诱导局部肺组织 iNOS 高表达而合成大量 NO,后者不但具有细胞毒性作用,还可参与体内氧自由基形成,促进体内炎症反应,从而直接和间接引起肺组织损伤^[1]。

糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)是一种药理作用广泛的药物,对非特异性炎症反应具有明显抑制作用。研究表明,GCs 不但能抑制 PMN 和血小板聚集、活化,还能促进肺表面活性物质的合成,稳定溶酶体膜,减少溶酶体酶及相关介质的释放,因而很早就用于 ALI/ARDS 的治疗^[8,9]。近年来,GCs 对 iNOS 及 NO 的作用逐渐被人们所认识。有人在 LPS 诱导的急性肺损伤动物实验中采用逆转录-聚合酶链反应技术证明,地塞米松可使肺组织 iNOS mRNA 表达量明显减少,且具有剂量相关性,提示 GCs 可在转录水平上抑制 iNOS 的活性,从而减少 NO 的生成^[10]。本实验结果显示,DXM 干预组大鼠肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白表达水平,以及血浆和肺组织 NO 含量均较机械通气组明显降低,说明糖皮质激素可通过抑制肺组织 iNOS 的表达,减少 NO 生成,对机械通气大鼠肺组织具有一定保护作用。然而,糖皮质激素究竟通过何种途径抑制肺组织 iNOS 表

达,目前尚不清楚,推测其作用可能与其抑制 PMN 等炎症细胞活化及释放炎性介质有关,但其具体作用机制还有待进一步研究^[11]。

综上所述,机械通气可使肺泡上皮及毛细血管内皮细胞受到过度牵拉,导致气血屏障结构受损,使炎症细胞、炎性介质和细胞因子构成的调节网络失控,从而诱导 iNOS mRNA 及其蛋白高表达,产生大量内源性 NO 而引起肺组织损伤。糖皮质激素可通过抑制肺组织 iNOS mRNA 及其蛋白的表达,减少 NO 的生成,对 VILI 具有一定防治作用。

参考文献:

- [1] Lionetti V, Recchia FA, Ranieri VM. Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms [J]. Curr Opin Crit Care, 2005,11:82-86.
- [2] Ventrice EA, Martí-Sistac O, Gonzalvo R, et al. Molecular and biophysical mechanisms and modulation of ventilator-induced lung injury [J]. Med Intensiva. 2007,31:73-82.
- [3] 张新日,杜永成,姜宏英,等.呼吸机所致大鼠急性肺损伤病理学研究 [J]. 山西医科大学学报,2006,37(1):35-37.
- [4] Liu R, Hotta Y, Graveline AR, et al. Congenital NOS2 deficiency prevents impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in murine ventilator-induced lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007,293:L1300-1305.
- [5] Gadton B, Drazen JM, Joscalzo J, et al. The biology of nitrogen oxides in the airways [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149:538-541.
- [6] Kharitonov SA, Yates DH, Robbins RA, et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients [J]. Lancet, 1994, 343: 133-138.
- [7] Feder LS, Stelts D, Chapman RW, et al. Role of nitric oxide on eosinophilic lung inflammation in allergic mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997,17:436-442.
- [8] 林敏芳,何权瀛. 糖皮质激素治疗 ARDS 疗效论文的回溯性分析评价 [J]. 中国危重病急救医学杂志,2004,16:368-370.
- [9] Adhikari N, Burns KE, Meade MO. Pharmacologic treatment for acute respiratory distress syndrome and acute lung injury: systematic review and meta-analysis [J]. Treat Respir Med, 2004,3:307-328.
- [10] Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, et al. Role of transcriptional activation of IkBa in mediation of immunosuppression by glucocorticoids [J]. Sciences, 1995, 270:283-286.
- [11] Berkman N, Jose PJ, Williams TJ, et al. Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages [J]. Am J Physiol, 1995, 269: L443-452.

修回日期)2010-07-13