

诱导型一氧化氮合酶在博莱霉素致大鼠肺纤维化中的作用研究

李艳荣¹⁾, 刘睿²⁾, 赵珍³⁾, 刘萍¹⁾, 张丹丹¹⁾, 王殿华¹⁾

(1) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650031; 2) 云南省第一人民医院麻醉科, 云南昆明 650034; 3) 昆明医学院学报编辑部, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 研究诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 在大鼠肺纤维化中的作用. **方法** 在博莱霉素 (BLM) 致大鼠肺纤维化模型上, 用免疫组化染色法测定肺组织 iNOS 的表达, 硝酸还原酶法测定肺组织匀浆中 NO 含量, 碱水法测定肺组织匀浆中 HYP 含量, HE 染色法光镜观察肺组织形态学变化, 评价 iNOS 在大鼠肺纤维化形成中的作用. **结果** 肺组织 NO 含量: BLM 组大鼠肺组织中 NO 含量高于对照组 ($P < 0.05$), L-NMMA 组大鼠肺组织 NO 含量低于 BLM 组 ($P < 0.05$). 肺组织 HYP 含量: BLM 组大鼠肺组织中 HYP 含量高于对照组 ($P < 0.05$), L-NMMA 组大鼠肺组织中 HYP 含量低于 BLM 组 ($P < 0.05$). 肺组织 iNOS 表达: BLM 组大鼠肺组织 iNOS 表达明显高于对照组 ($P < 0.05$); L-NMMA 组大鼠肺组织 iNOS 表达低于 BLM 组 ($P < 0.05$). 肺病理形态学: 对照组大鼠肺组织结构正常; BLM 组肺组织出现肺泡炎症、肺间质胶原纤维增生和肺纤维化; L-NMMA 组大鼠肺部炎症和肺纤维化程度明显减轻. **结论** iNOS 抑制剂 L-NMMA 在一定程度上能减轻肺炎反应和肺纤维化程度, iNOS 在肺纤维化中起着重要作用.

[关键词] 大鼠; 肺纤维化; 诱导型一氧化氮合酶

[中图分类号] R969.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 03 - 0022 - 4

Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Bleomycin- induced Pulmonary Fibrosis in Rats

LI Yan - rong¹⁾, LIU Rui²⁾, ZHAO Zhen³⁾, LIU Ping¹⁾, ZHANG Dan - dan¹⁾, WANG Dian - hua¹⁾

(1) Dept. of Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 2) Dept. of Anesthesiology, The 1st People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650034; 3) Dept. of Journal Editorial Board, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of inducible nitric oxide synthase in Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods** We used the pulmonary fibrosis model induced by bleomycin (BLM) to evaluate the role of iNOS in the formation process of pulmonary fibrosis in rats. The expression of iNOS in lung tissue was determined by the immunohistochemical staining method. The NO levels in the lung homogenates were measured by the nitrate reductase assay. The HYP content in lung homogenates was evaluated by the alkaline method. The lung tissue morphological changes were observed by light microscopy after HE staining. **Results** In the NO levels of the lung tissue, BLM group was higher than the control group ($P < 0.05$) and L-NMMA group was lower than the BLM group ($P < 0.05$). In the HYP levels in the lung tissue, BLM group was higher than the control group ($P < 0.05$) and L-NMMA group was lower than the BLM group ($P < 0.05$). In the iNOS expression of the lung tissue, BLM group was obviously higher than the control group ($P < 0.05$) and L-NMMA group was lower than the BLM group ($P < 0.05$). In the pathological morphology of the lung, the lung tissue was normal in rats in the control group, the lung tissue appeared alveolar inflammation, pulmonary interstitial collagen increase and pulmonary fibrosis in

[基金项目] 云南省昆明医学院博士创新基金资助项目 (KM2008D05)

[作者简介] 李艳荣 (1983~), 女, 内蒙古呼和浩特市人, 在读硕士研究生, 主要从事肺部药理学研究工作.

[通讯作者] 王殿华. E-mail:wangdianhuakm@126.com

BLM group and the lung inflammation and pulmonary fibrosis in L-NMMA group was reduced significantly.

Conclusion L-NMMA, a iNOS inhibitor, can reduce in a certain extent the inflammatory response of lung tissue and pulmonary fibrosis, suggesting iNOS plays an important role in the formation of pulmonary fibrosis

[**Key words**] Rats; Pulmonary fibrosis; Inducible nitric oxide synthase

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是由于过多的成纤维细胞聚集和细胞外的基质成分如胶原蛋白沉积而导致正常的肺组织结构改变和功能丧失的一类疾病。流行病学资料显示,全世界肺纤维化患者超过 500 万,近年来患病人数不断上升^[1],男性发病率为 10.7/ (10 万人·a), 女性为 7.4/ (10 万人·a)。肺纤维化患者 5 a 生存率约为 20%, 平均存活期为 2~4 a, 死亡率呈日趋增高趋势^[2]。目前对肺纤维尚缺乏有效的防治药物和手段^[3], 因此, 探索肺纤维化发病的机制以寻找治疗肺纤维化的安全有效方法是当前呼吸系统研究的热点、难点之一。研究发现肺组织氧化应激反应造成的氧化损伤, NO 参与氧化损伤肺组织, 可能是其发病机制之一^[4]。笔者在博莱霉素 (bleomycin, BLM) 大鼠肺纤维化模型上研究诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 表达在肺纤维化形成过程中的作用, 为肺纤维化的防治提供新的干预作用的思路。

1 材料

1.1 动物

SPD 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠, 体重 160~220 g, 昆明医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂

诱导性一氧化氮合酶抗体 (chemicon 公司, AB5382), 一氧化氮试剂盒 (碧云天生物技术研究所, S0023), 羟脯氨酸试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20110113)。注射用盐酸博来霉素 (日本化药株式会社, 批号: 批号: 101510), N-甲基-L-精氨酸 (NG-Monomethyl-L-arginine, L-NMMA) (Enzolifesciences 公司, 批号: L09914)。

1.3 仪器

紫外分光光度计, (北京瑞利分析仪器公司 UV-1600), 台式离心机 (金坛市环保仪器厂 802 型), 酶标仪 (日本 BIO RAD 公司 Model NO 550)。

1.4 方法

1.4.1 博莱霉素致大鼠肺纤维化模型建立 3%的戊巴比妥钠腹腔注射使大鼠麻醉 (0.1 mL/100 g), 气管内插管, 连接呼吸机, 待大鼠呼吸平稳后, 气

管内一次性注入 5 mg/kg 博莱霉素, 复制大鼠肺纤维化模型。实验期间大鼠自由饮水和进食。

1.4.2 动物分组和给药方法 实验随机分为 3 组 (n = 25): (1) 对照组: 气管滴注 NS 0.1 mL/100 G+ 腹腔注射 NS 0.1 mL/100 g; (2) BLM 组: 气管滴注 BLM 5 mg/kg + 腹腔注射 NS 0.1 mL/100 g; (3) L-NMMA 组: 气管滴注 BLM 5 mg/kg + 腹腔注射 L-NMMA 30 mg/kg。各组每天注射一次, 连续 1、3、7、14、28 d。分别于各时间点随机处死大鼠, 取材备用, 观测各项指标。

1.4.3 各项指标测定方法 免疫组化染色法测定肺组织 iNOS 的表达, 采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统半定量评定阳性细胞数量。硝酸酶还原法^[5]测定肺组织匀浆中 NO 含量。碱水法^[6]测定肺组织匀浆中羟脯氨酸 (hydr-oxypoline, HYP) 含量。HE 染色法光镜下观察肺组织形态学变化。

1.5 统计学处理

实验数据采用统计软件 SPSS Statistics 进行单因素方差分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 NO 含量

在整个病程中各时间点, BLM 组和 L-NMMA 组大鼠肺组织中 NO 含量均高于对照组, 第 3、7、14、28 天差异明显 (P < 0.05), 在第 14 天时最高。L-NMMA 组大鼠肺组织 NO 含量低于 BLM 组, 第 7、14、28 天尤其明显 (P < 0.05), 见表 1。

2.2 肺组织 HYP 含量

实验结果表明: 与对照组比较, BLM 组第 14、28 天大鼠肺组织中 HYP 活性明显升高 (P < 0.05), 28 d 最高; 与 BLM 组比较, L-NMMA 组第 14、28 天大鼠肺组织中 HYP 含量降低 (P < 0.05), 见表 2。

2.3 肺组织 iNOS 表达

免疫组化结果显示: 与对照组比较, BLM 组各时间点大鼠肺组织 iNOS 表达明显增加 (P < 0.05); 在 BLM 组中, 第 7 天 iNOS 含量最高, 与同组各时间点比较差异显著 (P < 0.05); 与 BLM

组相比, L-NMMA 组第 3、7、14 天大鼠肺组织 iNOS 表达减少 ($P < 0.05$); 见图 1, 表 3。

表 1 各组不同时间肺组织 NO 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The changes of lung tissues NO content in each group at different time points ($\bar{x} \pm s$)

分 组	剂量 (mg/kg)	NO 含量 [$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g})$]				
		1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
对照组	-	320.8 \pm 16.92	356.4 \pm 35.89	321.7 \pm 28.72	339.7 \pm 56.03	332.0 \pm 42.22
BLM 组	-	370.7 \pm 10.07	431.4 \pm 20.14*	613.3 \pm 25.17*	806.0 \pm 93.32*	557.1 \pm 33.47*
L-NMMA 组	30	347.3 \pm 21.92	399.7 \pm 26.22	545.2 \pm 21.46**	526.7 \pm 47.26**	380.7 \pm 45.63#

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 BLM 组比较, ** $P < 0.05$; 每个时间点 $n = 5$ 。

表 2 各组不同时间肺组织 HYP 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The changes of lung tissues HYP content in each group at different time points ($\bar{x} \pm s$)

分 组	剂量 (mg/kg)	HYP 含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)				
		1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
对照组	-	423.4 \pm 37.14	417.6 \pm 45.28	415.2 \pm 42.31	402.4 \pm 38.67	433.8 \pm 41.46
BLM 组	-	525.5 \pm 57.78	534.6 \pm 43.13	616.5 \pm 38.95	763.7 \pm 47.71*	839.3 \pm 42.29*
L-NMMA 组	30	499.8 \pm 66.80	584.1 \pm 54.21	584.3 \pm 55.34	603.3 \pm 48.42#	646.1 \pm 43.67#

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 BLM 组比较, # $P < 0.05$, 每个时间点 $n = 5$ 。

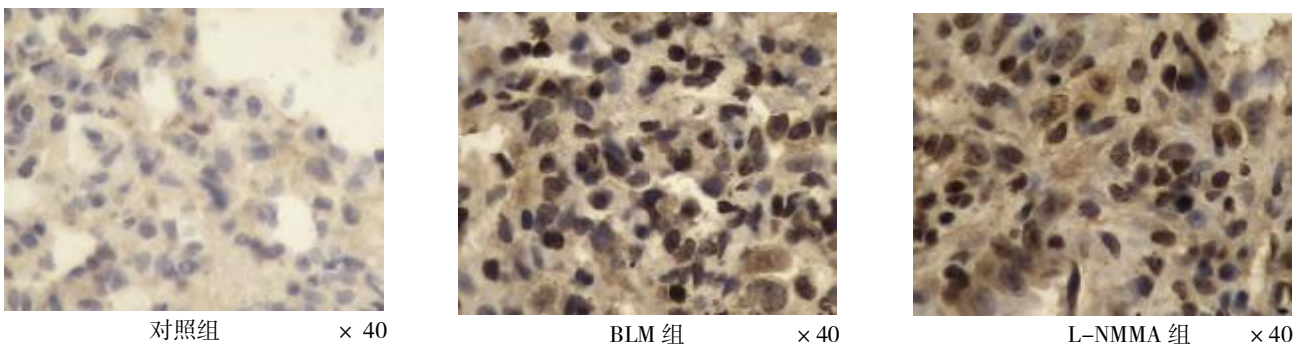


图 1 各组肺组织 (7 d) 免疫组化

Fig. 1 The iNOS expression in the lung tissues by immunohistochemistry at the 7th day

表 3 各组不同时间肺组织 iNOS 表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The changes of the iNOS expression in the lung tissues by immunohistochemistry at different time points ($\bar{x} \pm s$)

分 组	剂量 (mg/kg)	iNOS 阳性单位 (灰度值)				
		1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
对照组	-	41.32 \pm 3.241	43.87 \pm 4.746	43.15 \pm 1.022	40.56 \pm 2.184	44.55 \pm 1.137
BLM 组	-	61.26 \pm 3.753*	64.34 \pm 1.245* Δ	77.49 \pm 3.005*	72.73 \pm 1.472* Δ	66.69 \pm 4.385*
L-NMMA 组	30	55.43 \pm 2.132*	60.22 \pm 2.150**	68.75 \pm 2.359**	63.78 \pm 0.567**	65.51 \pm 4.769*

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 BLM 组比较, ** $P < 0.05$; 与同组第 7 天比较, $\Delta P < 0.05$, 每个时间点 $n = 5$ 。

2.4 肺组织病理形态学变化

HE 染色光镜病理形态学观察结果显示: 对照组中可见肺组织结构清晰, 肺间质无炎症和纤维化现象; BLM 组各时期可见肺组织中不同程度的肺

泡炎, 其中以 7 d 最重, 随着时间推移, 14 d、28 d 时肺间质胶原纤维增生, 出现肺组织纤维化; L-NMMA 组大鼠肺组织随着给药时间推移, 肺部炎症和肺纤维化程度明显减轻, 见图 2。

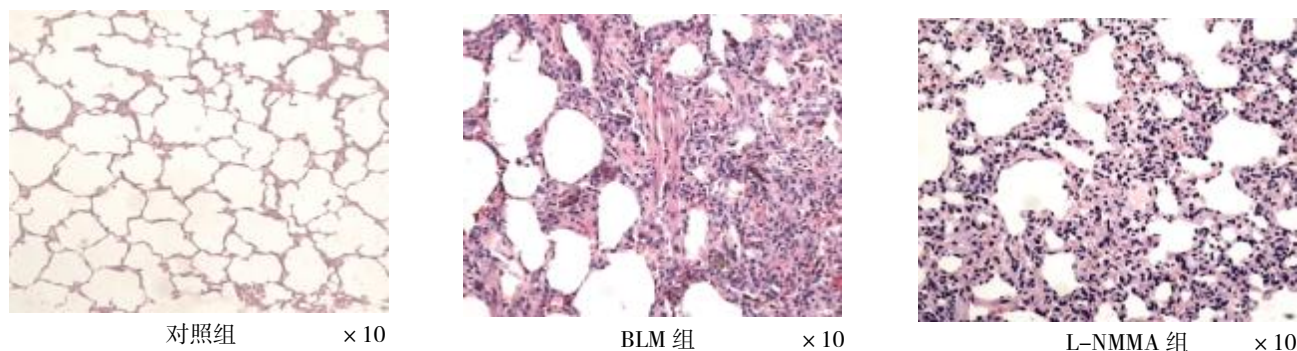


图2 各组肺组织病理形态学变化 (28 d HE)

Fig.2 The histopathological changes of lung tissues at the 28th day (28 d HE)

3 讨论

本研究发现,在肺纤维化的形成中,BLM能够引起大鼠肺组织中NO含量、iNOS表达和肺组织HYP含量增加,肺组织炎症反应和肺纤维化程度增加。iNOS抑制剂L-NMMA能够降低大鼠肺组织中NO含量、iNOS表达和HYP含量,减轻肺组织炎症反应和肺纤维化程度。结果提示iNOS在肺纤维化的形成中起着重要作用。

BLM是由轮生链霉菌分离出来的碱性糖肽类抗癌抗生素,其副作用可导致肺泡上皮细胞的坏死脱离,释放炎症介质,聚集炎症细胞、成纤维细胞等,通过复杂的细胞因子网络导致异常修复,细胞基质的堆积,形成纤维化^[7]。由于BLM诱导的肺纤维化模型其病理形态学改变与人类肺纤维化相似,因此,博来霉素复制动物肺纤维化模型已被广泛用于肺纤维化作用机制的研究^[8],本研究成功复制了博来霉素致大鼠肺纤维化模型。

近年来,氧化应激在肺纤维化发生中的重要作用已受到众多学者的重视。氧自由基释放过多,机体清除氧自由基能力下降,引起肺组织炎症反应,肺组织结构受损,从而发生肺纤维化。研究表明肺纤维化过程中NO参与肺组织的氧化损伤作用,NO是由NOS催化左旋精氨酸生成的,NOS有3种类型,nNOS、eNOS和iNOS。在iNOS在多种诱导因子作用下可大量表达,在氧化应激反应生成NO中起重要作用。因此,本研究在BLM致大鼠肺纤维化模型上,研究iNOS的表达在肺纤维化形成过程中的作用。本实验结果表明,博来霉素致大鼠纤维化肺组织中iNOS表达增加,提示博来霉素能够诱导iNOS的表达,促进NO的生成,从而导致肺炎症反应和肺纤维化的发生。

L-NMMA是一种NOS抑制剂,能抑制iNOS催化左旋精氨酸生成NO。L-NMMA能够减少肺组

织NO含量和HYP的含量从而能够减轻肺炎症反应和肺纤维化程度,其作用机制可能于肺组织L-NMMA抑制了iNOS的表达有关。这提示iNOS在肺纤维化的形成中起着重要作用。因此,及早采取干预措施,抑制iNOS,减少NO的过量产生,有可能延缓肺纤维化^[9]。

[参考文献]

- [1] MELTZER E B, NOBLE P W. Idiopathic pulmonary fibrosis[M]. London: Orphanet J Rare Dis, 2008;3-8.
- [2] SCOTTON C J, CHAMBERS R C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus[J]. Chest, 2007, 132(4):1311-1321.
- [3] XUM, D ENG B, CHOW Y L, et al. Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: A comparison with hydrocortisone [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 112(2):292-199.
- [4] KHALIL N, OCONNOR R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment, 2004, 17(2):153-160.
- [5] SISSON T H, HANSON K E, SUBBOTINA N, et al. Inducible lung-specific urokinase expression reduces fibrosis and mortality after lung injury in mice [J]. Am J Physiol, 2002, 283:1023-1032.
- [6] CIGREMIS Y, TURKOZ Y, TUZCU M, et al. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the formation of peroxynitrite, level of nitric oxide, xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in rat kidney[J]. Mol Cell Biochem, 2006, 291(1-2):127-138.
- [7] CHARBENEAU R P-GM. Eicosanoids: Mediators and therapeutic targets in fibrotic lung disease [J]. Clin Sci (Lond), 2005, 108:479-491.
- [8] CHRISTMAS RJSAP. Revisiting prostacyclin: new directions in pulmonary fibrosis and inflammation am [J]. J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291:142-143.
- [9] GIANANIR JARBOE E, ORLICKY D. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa[J]. Hum Pathol, 2001, 32(1):119-125.

(2012-01-09 收稿)