

[文章编号] 1000-2200(2010)04-0340-03

· 基础医学 ·

大鼠肝肺综合征形成中肺组织 NOS 表达的动态变化

苏艾荣¹, 张慧英², 关宿东¹

[摘要] **目的:**观察肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)形成中大鼠肺组织一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)表达的动态变化。**方法:**将体重 220~250 g 的 24 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组(6 只)和模型组(18 只)。正常组给予正常饲料和自来水;模型组采用复合因素致病法复制大鼠肝硬化动物模型,分别于实验 4 周末、6 周末、8 周末处死大鼠,各时间点至少有 6 只大鼠纳入研究。取肝、肺组织标本备用。**结果:**在大鼠 HPS 形成过程中,第 4 周末肺组织诱导型 NOS 和内皮型 NOS 的蛋白表达较对照组增高($P < 0.05$),且在 6 周和 8 周均呈持续上升趋势($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。**结论:**在大鼠 HPS 形成中,早期即有肺组织 NOS 表达增加。

[关键词] 肝硬化;肝肺综合征;一氧化氮合酶

[中国图书资料分类法分类号] R 657.31 [文献标识码] A

Dynamic change of nitric oxide synthase expression of lung tissue in the development of hepatopulmonary syndrome in rats

SU Ai-rong¹, ZHANG Hui-ying², GUAN Su-dong³

(1. Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Pathophysiology, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the dynamic change of nitric oxide synthase (NOS) expression of lung tissue in the development of hepatopulmonary syndrome (HPS) in rats. **Methods:** Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into control group and model group. The rats in control group were fed with regular food, and the model group were copied HPS by multiple factors causing the disease. The rats were executed at the end of the fourth week, sixth week and eighth week, at least six rats at each time point in each group, the liver and lung tissue samples were collected for study. **Results:** The expressions of induced NOS and endothelial NOS of lung tissue were increased at the end of fourth week in the development of HPS ($P < 0.05$), and increased gradually at the end of sixth week and eighth week ($P < 0.05 \sim P < 0.01$). **Conclusions:** NOS expression increases early in the development of HPS.

[Key words] cirrhosis; hepatopulmonary syndrome; nitric oxide synthase

肝硬化是一个全球性的常见病。在我国,乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)感染者高达 1.2 亿,约占人口的 10%,其中大约有 5%~10% 的 HBV 感染者会发展为慢性乙肝,并约有 2% 会演变为肝硬化^[1]。肝硬化在人类主要死亡原因中居第 6 位,被视为人类健康的“主要杀手”。在肝硬化晚期等待肝移植的患者中,约 50% 伴有动脉血氧异常,其中 13%~47% 合并有肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)^[2]。HPS 患者呼出气体中一氧化氮(NO)含量显著增加,提示 NO 在 HPS 发病机制中发挥重要作用^[3]。至于在 HPS 患者早期呼出气体中 NO 含量如何变化尚未有一致的研究结果。本实验旨在动态观察大鼠 HPS 形成中肺组织表达一氧化氮合酶(NOS)的变化,从而为早期发现及预防 HPS 的发生提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制备 健康雄性 Wistar 大鼠 24 只(山西医科大学动物中心提供),体重 220~250 g,经适应性饲养 1 周后随机分为正常组和模型组。(1)正常组 6 只,给予正常饲料和自来水。(2)模型组 18 只,以掺入胆固醇的玉米面作饲料,胆固醇占饲料重量的 0.5% (前 2 周每 kg 饲料中含 200 g 猪油);以 30% (体积分数)乙醇作为唯一饮料;在实验第 1 天脊背皮下注射 5 ml/kg CCl₄ 原液,以后每隔 3 天皮下注射 40% CCl₄ (用玉米油稀释),按 3 ml/kg 给予;分别于 4 周末、6 周末、8 周末处死大鼠,每个时间点至少 6 只大鼠纳入研究。

1.2 标本采集 在不同时间点给予 1% 戊巴比妥(20 mg/kg)腹腔注射麻醉,取大鼠肝右叶、右 1/2 肺用 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋,5 μm 切片。肝组织 HE 染色,肺组织免疫组织化学染色测定肺组织诱导型 NOS (iNOS) 和内皮型 NOS (eNOS) 蛋白表达水平。

1.3 结果判定标准 以 PBS 代替一抗作阴性对照,免疫组织化学染色阳性反应呈棕黄色。用

[收稿日期] 2009-04-24

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 生理学教研室,安徽 蚌埠 233030; 2. 长治医学院 病理生理学教研室,山西 长治 046000

[作者简介] 苏艾荣(1978-),女,硕士,助教。

Image-Pro Plus 型全自动医学图像彩色分析系统进行图像半定量分析,每张切片随机选取 5 个视野,测定肺组织中的 iNOS 和 eNOS 棕黄色阳性表达颗粒的 IOD 值(值越高表达越强)。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 形态学变化 大鼠肝脏 4 周末脂肪变性明显,已有较薄的纤维束相连接(见图 1);6 周末仍有脂肪变性,纤维增生加重,假小叶形成(见图 2);8 周末纤维间隔进一步加宽,假小叶结构形成明显(见图 3)。4 周末可见肺泡大小不等(见图 4);6 周末肺

间质增厚,血管扩张(见图 5);8 周末肺间质继续增厚,有肺泡融合现象,可以看到肺大泡,肺泡隔有断裂现象,血管扩张明显(见图 6)。

2.2 肺组织 eNOS、iNOS 蛋白表达水平 eNOS 的蛋白表达于 4 周末和 6 周末均高于正常组($P < 0.05$),6 周末与 4 周末差异无统计学意义($P > 0.05$),8 周末继续升高达最高峰,与正常组、4 周末和 6 周末差异均有统计学意义($P < 0.01$)。iNOS 的蛋白表达也于 4 周末升高,6 周末和 8 周末继续升高,差异均有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见表 1)。

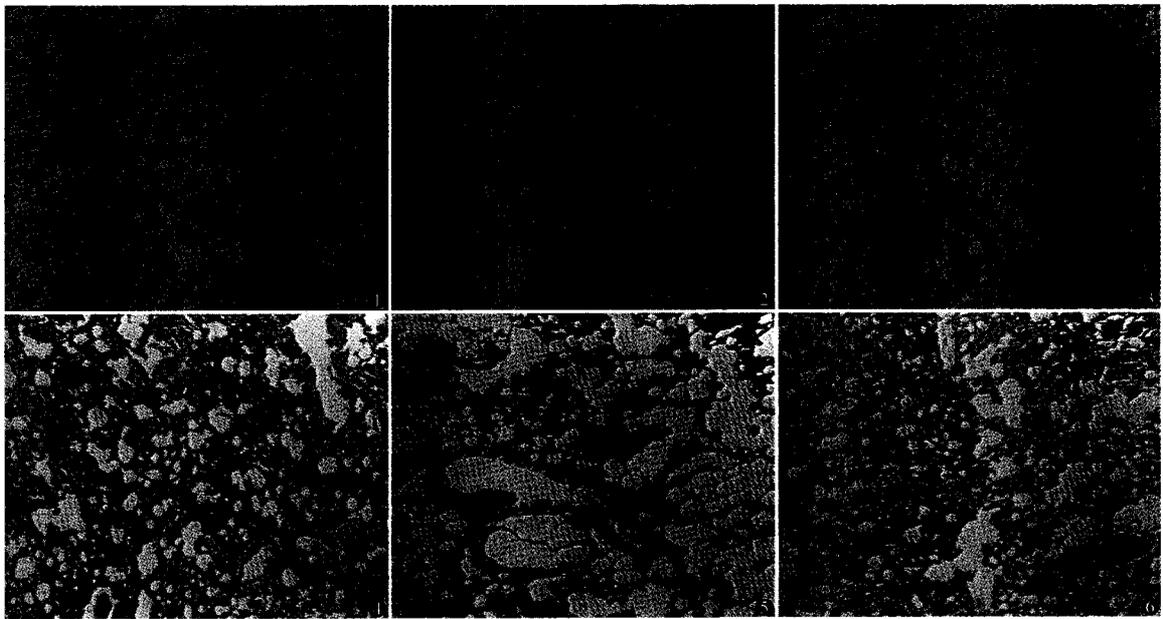


图 1 肝硬化 4 周末肝脏 图 2 肝硬化 6 周末肝脏 图 3 肝硬化 8 周末肝脏 图 4 肝硬化 4 周末肺脏 图 5 肝硬化 6 周末肺脏 图 6 肝硬化 8 周末肺脏(图 1~6 均为 HE 染色)

表 1 不同时间点肺组织 eNOS、iNOS 蛋白表达水平
($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	eNOS	iNOS
正常组	2 385.610 ± 752.437	4 214.777 ± 1 783.730
模型组		
4 周末	6 448.998 ± 922.726 *	8 498.690 ± 2 703.744 *
6 周末	8 008.868 ± 2 812.723 *	12 831.570 ± 4 901.213 ^{△*}
8 周末	14 704.730 ± 5 779.996 ^{##*△△}	19 173.360 ± 2 401.238 ^{##*△△}
<i>F</i>	14.76	24.295
<i>P</i>	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	2 010 684 337.286	2 010 069 939.284

q 检验:与正常组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 4 周末比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 6 周末比较^{##} $P < 0.01$

3 讨论

肝和肺中任意一个器官功能受损都会影响另一器官,肝功能紊乱导致门脉高压会形成高血流、高动

力循环状态,还会导致缩血管物质和扩血管物质以及肝脏代谢或合成其他物质之间失衡,对肺的影响即可导致 HPS。HPS 是一个临床三联征:(1)肝功能异常;(2)肺气体交换异常,有或无低氧血症,但肺泡动脉氧分压差增大(≥ 20 mmHg);(3)肺内血管异常扩张^[3],正常肺毛细血管直径大约 8 ~ 15 μm ,在 HPS 时血管可能扩张到 15 ~ 500 μm ^[4]。关于肺内血管异常扩张的机制尚不清楚,可能与血管的受体后缺陷有关。血管活性物质如前列腺素类、胰高血糖素,特别是 NO 在此发挥重要作用。Rolla 等^[5]研究表明,HPS 患者呼出气中 NO 的水平升高,给予 NO 的合成抑制剂亚甲蓝可改善 HPS 患者低氧血症的症状,提示 NO 可能是 HPS 患者肺内血管异常扩张的重要调节物质。Zhang 等^[6]采用复合因素致病法复制大鼠肝硬化动物模型,于 8 周末自发形成 HPS,HPS 大鼠肺组织 eNOS 和 iNOS 蛋白

表达均增加, NO-cGMP 信号转导系统的活性增强, 从而导致持续的肺血管扩张并继发严重低氧血症, 进一步证实 NO 是 HPS 时肺血管扩张的主要介质。

肝硬化患者一旦发展为 HPS 则预后差、病死率高, 所以 HPS 的预防尤为重要。NO 是导致 HPS 的特征性病理变化(肺血管扩张)的主要原因, NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸而成的。目前至少已发现 NOS 的 3 种同工酶亚型, 两种为结构型 NOS (cNOS), 另一种为 iNOS 或 NOS-II 型。关于在 HPS 时生成增多的 NO 来源于哪个亚型的 NOS, 目前的研究结果尚不一致。本研究结果显示, 4 周末肺组织 iNOS 和 eNOS 的蛋白表达显著升高, 6 周末继续升高, 8 周组与各时间点比较差异均有统计学意义。免疫组织化学方法提示, 在 HPS 形成过程中, iNOS 的表达主要位于肺组织 II 型上皮细胞和肺泡的巨噬细胞, 且发现肺部有大量巨噬细胞聚集; eNOS 主要表达于肺组织血管内皮细胞, 在 HPS 形成过程的中、晚期, 即 6 周末和 8 周末时, 除主要表达于血管内皮细胞外, 肺 I 型、II 型上皮细胞和巨噬细胞也有相对较弱的表达。Nunes 等^[7]采用慢性胆总管结扎的方法建立 HPS 动物模型, 通过免疫组织化学等实验方法, 发现肺内 NO 生成增加是 iNOS 和 eNOS 共同增加的结果, 并且用定量的方法证实主要是 iNOS 表达增多, 其次是 eNOS 增加, 本实验观察结果与之

基本一致。

综上所述, 随着大鼠肝脏病变, 肺组织早期即出现 NOS 表达的增加(同时有 iNOS 和 eNOS 的增加), 据此推测临床肝硬化患者可能在肝功能损伤早期即有呼出气体中 NO 的含量增加, 是否可以通过预防性治疗延缓病情发展以及防止 HPS 的发生, 尚有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 李静. 病毒性肝炎后肝硬化患者的健康教育[J]. 医学信息, 2009, 22(8): 1647-1648.
- [2] Møller S, Hillingsø J, Christensen E, et al. Arterial hypoxaemia in cirrhosis: fact or fiction? [J]. Gut, 1998, 42(6): 868-874.
- [3] Krowka MJ. Hepatopulmonary syndromes [J]. Gut, 2000, 46(1): 1-4.
- [4] Rodriguez-Roisin R, Agusti AG, Roca J. The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities [J]. Thorax, 1992, 47(11): 897-902.
- [5] Rolla G, Brussino L, Colagrande P, et al. Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis [J]. Hepatology, 1997, 26(3): 842-847.
- [6] Zhang HY, Han de W, Su AR, et al. Intestinal endotoxemia plays a central role in development of hepatopulmonary syndrome in a cirrhotic rat model induced by multiple pathogenic factors [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(47): 6385-6395.
- [7] Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, et al. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(5): 879-885.

(上接第 339 页)的 HL-60 细胞培养上清液对淋巴细胞活性的影响, 发现经抗 4-1BBL 单抗作用后的 HL-60 细胞培养上清液对淋巴细胞的增殖抑制作用减弱, 诱导其凋亡作用也下降。进一步研究发现, HL-60 肿瘤细胞可分泌 TGF- β , 阻断其表达的 4-1BBL 信号后分泌水平下降。由其推测, 4-1BB/4-1BBL 信号可调控 TGF- β 产生, HL-60 细胞增殖失控和抑制淋巴细胞活性可能与肿瘤细胞分泌 TGF- β 有关。另外, T 细胞的活化和增殖需要双重信号, 对共刺激信号的要求也有量的限制, 一些肿瘤细胞释放高水平分泌型 4-1BBL, 远远超过体外刺激 T 淋巴细胞增殖所需的剂量, 对淋巴细胞的活性反而起抑制作用^[6]。4-1BBL 在 HL-60 细胞表面高表达, 其是否存在可溶性形式抑制淋巴细胞活性有待于进一步研究。本实验未检测出肿瘤细胞培养上清液对淋巴细胞活化的影响, 其原因可能是肿瘤细胞分泌某些抑制性细胞因子抑制淋巴细胞活化, 另一方面肿瘤细胞分泌到培养上清液里的可溶性蛋白对淋巴细胞而言又是同种异体抗原, 能刺激淋巴细胞活化, 两种作用相抵消, 总的效应表现为实验组和对照组细胞活化无差异。总之, 表达在 HL-60 细胞表面的 4-1BBL 具有生物活性, 它通过介导逆向信号引起肿瘤细胞生理活性改变, 并通过分泌 TGF- β 等抑制性

细胞因子干扰淋巴细胞活性。肿瘤细胞表面表达 FasL 可以使肿瘤逃逸机体的免疫监视^[7], 同样作为 TNF 家族成员之一的 4-1BBL 在肿瘤细胞上的高表达是否起着同样的作用, 有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Li Q, Ai J, Song Z, et al. 4-1BB (CD137) ligand enhanced anti-tumor immune response against mouse forestomach carcinoma *in vivo* [J]. Cell Mol Immunol, 2008, 5(5): 379-384.
- [2] 吕坤, 吴俊英, 李柏青. 人 4-1BB 配体基因真核表达载体的构建、表达及其体外抗肿瘤效应 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(6): 511-514.
- [3] 吴俊英, 钱峰, 张海峰, 等. 4-1BB (CD137) 配体在几种肿瘤细胞株上的表达 [J]. 蚌埠医学院学报, 2003, 28(3): 189-191.
- [4] 仇红霞, 张学光, 居颂光, 等. 4-1BBL 分子在人急性单核细胞白血病细胞系 U937 和 SHI-1 的表达及促生长作用 [J]. 江苏医药, 2006, 32(10): 916-918.
- [5] Shin HH, Lee JE, Lee EA, et al. Enhanced osteoclastogenesis in 4-1BB-deficient mice caused by reduced interleukin-10 [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(12): 1907-1912.
- [6] Salih HR, Schmetzer HM, Bueke C, et al. Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies [J]. J Immunol, 2001, 167(7): 4059-4066.
- [7] Cheng B. Association between up-regulation of Fas ligand expression and apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes in human breast cancer [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26(5): 573-575.