

一氧化氮减轻大鼠移植肺缺血/再灌注损伤的作用及机制

何文新 姜格宁 丁嘉安 林若柏 康明强 朱勇

【摘要】 目的 探讨供、受者在肺移植前后吸入低浓度一氧化氮(NO)对移植肺缺血/再灌注损伤的影响及其机制。方法 取 60 只雄性 SD 大鼠,随机配对建立左肺移植模型。实验分为 2 组,NO 组:获取供肺前,供者在移植肺灌注期吸入体积分数为 0.001 % 的 NO;肺移植后,受者在移植肺再灌注后 10 min~2 h 持续吸入相同浓度的 NO。对照组:供、受者肺移植前后不做任何特殊处理,只进行肺移植。供者开胸时及受者再灌注 2 h 后,分别夹闭右肺门 5 min,进行动脉血气分析检测。受者术前及再灌注后 2 h 时分别检测肺功能和动脉血气分析。再灌注 2 h 后,取移植肺组织测定过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)含量、肺湿/干重比(W/D)以及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性及其 mRNA 表达,并观察移植肺的病理学形态。结果 移植肺再灌注 2 h 后,NO 组动脉血氧分压/吸氧浓度(PaO_2/FiO_2)值较对照组升高,氧合指数(OI)值、肺内分流(Q_s/Q_t)值较对照组降低,两组相比,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。NO 组与对照组相比,MPO 活性明显降低,MDA 含量明显增高,W/D 无显著差异。NO 组 iNOS 蛋白活性及其 mRNA 表达均较对照组显著降低,iNOS 主要表达在肺泡上皮细胞、肺泡腔和间质内浸润的炎症细胞。NO 组炎症细胞浸润明显较对照组轻。结论 供、受者在肺移植前后吸入低浓度 NO 能改善移植肺的氧合、减轻缺血/再灌注损伤,其机制可能与 NO 减少肺内分流、下调 iNOS 表达以及减轻肺内炎症细胞浸润有关。

【关键词】 一氧化氮;肺移植;再灌注损伤;大鼠

Nitric Oxide ameliorates ischemia-reperfusion injury after rat lung transplantation HE Wen-xin, JIANG Ge-ning, DING Jia-an, et al. Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai 200433, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of inhaled low dose nitric oxide (NO) on lung ischemia-reperfusion injury during flush and delayed 10 min after reperfusion. **Methods** Sixty health adult male Sprague-Dawley rats were randomly allocated to the control and the NO group. Before the donor lung was harvested, the right hilus was clipped for 5 min (clipping test), then blood sample was collected from carotid artery for arterial blood gas analysis as baseline. Lung transplantation was performed in a "cuff-like" vessel anastomosis technique. Dynamic compliance (C_{dyn}) and resistance of airway (R_{aw}) were monitored before operation (baseline) and after 2-h reperfusion. The graft's gas exchange and oxygenation were assessed by "clipping test" after 2-h reperfusion. The lung graft was harvested for measuring wet/dry weight ratio (W/D), the activity of myeloperoxidase (MPO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), the content of malonyldialdehyde (MDA), and the expression of iNOS gene and protein. **Results** After 2-h reperfusion, compared to the control group, PaO_2/FiO_2 , OI, and Q_s/Q_t were improved significantly in the NO group (277 ± 91 vs. 157 ± 47 , $P < 0.01$; 2.67 ± 0.89 vs. 4.72 ± 1.48 , $P < 0.01$; 21.1 ± 4.57 vs. 27.1 ± 2.37 , $P < 0.01$, respectively). The activities of MPO were significantly reduced in NO group (1.80 ± 0.46 vs. 3.08 ± 0.65 U/g tissue, $P < 0.01$). The content of MDA in the lung tissue of NO group was significantly higher than that of the control group (34.8 ± 7.9 vs. 20.0 ± 11.2 nmol/mg protein, $P < 0.05$). Inflammatory cell infiltration was also significantly reduced ($P < 0.05$). The expression of iNOS gene and protein in the lung tissue of NO group was significantly lower than that of the control group. The activities of iNOS were also significantly reduced in NO group (10.6 ± 10.2 vs. 97.8 ± 82.2 nmol \cdot g $^{-1}$ \cdot min $^{-1}$, $P < 0.05$). The immunohistochemical positive staining of iNOS was localized in the alveolar epithelial cells and the inflammatory cells infiltrated in the alveolar spaces and mesenchymal tissue. But there were no significant differences between two groups in C_{dyn} , R_{aw} and W/D ratio. **Conclusion** Inhaled low dose NO

might mitigate the intrapulmonary shunt, prevent neutrophil sequestration, inhibit the expression of iNOS gene and protein in isograft, thereby ameliorate ischemia-reperfusion injury and improve the oxygenation of the graft.

【Key words】 Nitric oxide; Lung transplantation; Reperfusion injury; Rat

肺移植是治疗终末期肺部疾病唯一有效的手段,但移植肺的缺血/再灌注损伤仍是肺移植早期功能丧失和患者死亡的最常见原因^[1]。一氧化氮(NO)具有舒张平滑肌和局部抗炎的特性,但也有细胞毒性。目前多数研究认为 NO 能减轻缺血/再灌注损伤^[2,3],但确切机制仍不明了。本实验探讨在大鼠左肺移植中,供、受者肺移植前后吸入低浓度 NO 对缺血/再灌注损伤的影响及其可能机制。

资料和方法

1. 实验动物及左肺移植模型的建立:清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 250~350 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。选取体重相近的大鼠分别作为左肺移植的供、受者。供者采用 50 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉,气管切开插管后,用纽邦 E 200 型呼吸机, A/C 模式,吸氧浓度(FiO_2) 1.0、频率为 60 次/min、潮气量 7~8 ml/kg、呼气末正压通气(PEEP)3 cm H_2O 。颈动脉置管监测血压。开胸后用 20 ml 的 4 °C 低钾葡萄糖液(LPD)以 20 cm H_2O 的压力行肺动脉顺行灌注。切除供肺置于 4 °C 的 LPD 液中,保存 6 h。受者麻醉及机械通气状态同供者,然后按“改良三袖套吻合法”^[4]完成左肺原位移植。

2. 实验分组:将 SD 大鼠随机分为 2 组,NO 组:获取供肺前,供者在移植肺灌注期吸入体积分数为 0.001 % 的医用级 NO 气体(NO_x BOX Plus 监测浓度);肺移植后,受者在移植肺再灌注后 10 min~2 h 持续吸入相同浓度的 NO。对照组:供、受者肺移植前后不做任何特殊处理,只进行肺移植。

3. 动脉血气分析及呼吸动力学监测:分别于供者开胸时(0 h)及受者再灌注 2 h 后,夹闭右肺门 5 min 进行夹闭试验^[5],分别采集颈动脉血进行血气分析(ABL-5 自动血气分析仪)。受者术前(0 h)和再灌注 2 h 时分别采用 GM 250 型 Navigator 呼吸力学监护仪记录肺动态顺应性(C_{dyn})和气道阻力(Raw),计算动脉血氧分压/吸氧浓度(PaO_2/FiO_2)值、氧合指数[$OI = (MAP \times FiO_2 \times 100)/PaO_2$]值和肺内分流[$Q_s/Q_t = (700 - PaO_2) \times 5\%$]值。

4. 移植肺湿/干重量比(W/D):再灌注 2 h 后,

每组取 6 只大鼠处死,取移植肺下端肺组织立即称重,记为肺湿重(W),然后置于 80 °C 烘烤 48 h,称重,记为肺干重(D),两者之比即为 W/D^[6]。

5. 移植肺组织中髓过氧化物酶(MPO)、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)活性以及丙二醛(MDA)含量测定:取移植肺上端组织,按试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书方法检测 MPO 和 iNOS 活性及 MDA 含量。

6. 肺组织病理形态学检查:受者再灌注 2 h 后,每组取 6 只大鼠处死,用 40 g/L 多聚甲醛 20 ml 以 15 cm H_2O 的压力自肺动脉灌注固定,灌注结束后,再置于相同浓度的多聚甲醛中继续固定 2 d,石蜡包埋、切片(片厚 5 μm),HE 染色,光镜下观察,作肺损伤评分^[7]。

7. 免疫组织化学法检测移植肺组织中 iNOS 表达:按 SP 法免疫组织化学标准程序操作(iNOS 兔抗大鼠多克隆抗体及 SP 试剂盒均购自 Antibody Diagnostica Inc),磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。iNOS 表达以肺组织细胞染色阳性(有棕黄色颗粒)为检测标准。

8. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测移植肺组织中 iNOS mRNA 表达:取液氮保存后的肺组织,采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA。大鼠 iNOS 的正义和反义引物^[8]分别为 5'-CCCTTC CGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' 和 5'-GGCT GTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3',扩增产物为 497 bp。以 β -actin mRNA 水平作为内参照,其正义和反义引物分别为 5'-GTGGGCCGCTCTAG-GCAC CAA-3'和 5'-CTCTTTGATGTCACGCAG GATTTC-3',其产物为 539 bp。PCR 条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,扩增 35 个循环;最后一次 72 °C 延伸 7 min。取 5 μl PCR 产物在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶(质量浓度为 15 g/L)上进行电泳。用 MUVB-20 凝胶分析系统对各组 PCR 产物条带进行扫描,分别以 iNOS/ β -actin 吸光度(A 值)比值作为 iNOS mRNA 表达的相对含量。

9. 统计学分析:计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。肺损伤评分的组间比较采用

两样本比较法检验。

结 果

1. 一般资料比较: 两组肺移植的灌注时间、供肺获取时间、冷缺血时间及吻合时间相比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组移植肺处理时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	灌注时间 (min)	供肺获取时间 (min)	冷缺血时间 (h)	吻合时间 (min)
对照组	7	13, 14 ± 1, 35	8, 29 ± 0, 81	5, 71 ± 0, 19	35, 29 ± 6, 37
NO 组	7	13, 43 ± 1, 72	8, 14 ± 0, 90	5, 60 ± 0, 20	36, 43 ± 5, 56

2. 血气分析和肺功能检测结果: 移植肺再灌注 2 h 后, NO 组的 PaO₂/FiO₂ 值、OI 值以及 Qs/Qt 值与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

3. 肺损伤评估: NO 组与对照组相比, 肺组织 MPO 活性明显降低, MDA 含量增高 ($P < 0.05$), W/D 差异无统计学意义 (表 3)。肺组织病理学检查示 NO 组炎症细胞浸润明显减轻, 但两组间肺组织的水肿、出血和肺不张无明显差异 (图 1)。

表 3 肺组织中 W/D, MPO 及 MDA 检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	W/D	MPO (U/g)	MDA (μmol/g)
对照组	6	5, 63 ± 0, 60	3, 08 ± 0, 65	19, 99 ± 11, 19
NO 组	6	5, 53 ± 0, 83	1, 80 ± 0, 46*	34, 84 ± 7, 89*

注: *与对照组比较, $P < 0.01$

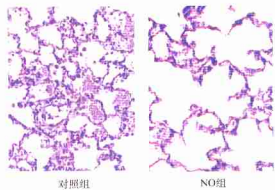


图 1 对照组和 NO 组移植肺镜下改变

4. 移植肺组织中 iNOS 活性及其 mRNA 表达:

表 2 两组动脉血气分析和呼吸力学监测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PaO ₂ /FiO ₂		OI		Qs:Qt		Cdm (ml·cm H ₂ O ⁻¹ ·kg ⁻¹)		Raw (cm H ₂ O·L ⁻¹ ·s ⁻¹)	
		0 h	2 h	0 h	2 h	0 h	2 h	0 h	2 h	0 h	2 h
对照组	7	427, 01 ± 58, 42	157, 20 ± 47, 32	1, 52 ± 0, 25	4, 72 ± 1, 48	13, 65 ± 2, 92	27, 14 ± 2, 37	1, 00 ± 0, 11	0, 77 ± 0, 37	50, 11 ± 5, 62	54, 83 ± 12, 35
NO 组	7	423, 71 ± 77, 55	277, 43 ± 91, 32*	1, 61 ± 0, 31	2, 67 ± 0, 89*	13, 81 ± 3, 88	21, 13 ± 4, 57*	1, 06 ± 0, 25	1, 04 ± 0, 37	49, 66 ± 6, 34	47, 49 ± 4, 73

注: *与对照组比较, $P < 0.05$ 。

NO 组和对照组肺组织 iNOS 活性分别为 (10.61 ± 10.22) nmol·g⁻¹·min⁻¹ 和 (97.75 ± 82.17) nmol·g⁻¹·min⁻¹, NO 组明显较对照组低 ($P < 0.05$)。免疫组织化学法显示对照组 iNOS 蛋白表达较强, 主要分布在气道上皮细胞、肺泡上皮细胞、肺泡腔和间质内浸润的炎症细胞, 而 NO 组表达明显减弱 (图 2)。RT-PCR 的结果亦显示 NO 组 iNOS mRNA 的表达量明显低于对照组 (图 3)。

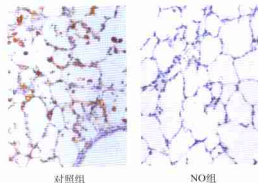


图 2 对照组和 NO 组大鼠移植肺组织的 iNOS 表达



图 3 大鼠肺组织 iNOS mRNA 和 β-actin mRNA 扫描图

讨 论

按照目前的器官保存技术, 仅有 20% 的供肺适合移植; 即使应用这些“理想”的供肺, 仍有 20% 会在早期发生严重的移植功能衰竭^[9], 其中缺血/再灌注损伤是最重要的影响因素^[1]。其确切机制现在仍不明了, 目前认为多形核白细胞 (PMNs) 的激活、粘附、扣押增加是缺血/再灌注损伤发生的中心环节^[10]。而其引发的炎症反应造成的 NOS 系统功能改变 (结构型 eNOS 及其产生的 NO 急剧下降; 同时炎症介质诱导的 iNOS 表达增加, 生成大量 NO), 是炎症氧化损伤反应的一个重要机制^[11, 12]。

已有研究证实,在移植肺的灌洗期或再灌注期给供、受者吸入较低浓度的 NO 能减轻缺血/再灌注损伤,但具体机制及吸入 NO 的浓度和最佳时机尚无定论^[2]。Eppinger 等^[13]认为再灌注延迟 10 min 吸入 NO 可避免 NO 与再灌注瞬间释放的超氧阴离子(半衰期很短)反应,疗效更佳。因此,本实验也采用受者在移植肺再灌注期后 10 min 吸入 NO,研究其对移植肺缺血/再灌注损伤的影响。

本实验结果显示,NO 组的 PaO₂/FiO₂ 和 OI 值明显优于对照组, Q_s/Q_t 值较对照组降低,说明吸入一氧化氮能改善氧合,可能与 NO 扩张肺血管,减少肺内分流,最终改善 V/Q 有关。NO 的局部抗炎特性(抑制白细胞粘附、聚集及趋化)是其减轻移植肺缺血/再灌注损伤的重要机制^[15]。MPO 是存在于中性粒细胞内的一种酶,其含量可间接反映肺内中性粒细胞数目。我们的结果显示 NO 组肺组织 MPO 活性较对照组显著降低,提示吸入 NO 能抑制中性粒细胞渗出和聚集。进一步的结果显示,NO 组肺组织 iNOS 活性较对照组明显降低,免疫组织化学及 RT-PCR 检测结果亦显示 iNOS 蛋白及其 mRNA 表达均较对照组明显减弱,提示外源性 NO 能下调 iNOS 的表达。

综上所述,我们推测外源性 NO 能抑制肺内白细胞聚集,减少炎症介质释放,使 iNOS 表达下调,NO 产生和释放减少,从而减轻移植肺炎症损伤。NO 抑制中性粒细胞聚集的机制可能是通过其对 NF-κB 的负反馈调节,下调促炎因子表达,从而抑制肺内白细胞聚集和炎症介质释放。进一步的研究可对此调控通路作深入探讨。另外,本实验中 NO 组 MDA 含量明显高于对照组,提示 NO 具有潜在加重组织过氧化损伤的副作用,所以吸入 NO 治疗应采用尽可能低的浓度。

参 考 文 献

- 1 De Perrot M, Liu MY, Waddell TK, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 490-511.
- 2 Glanville AR. Inhaled nitric oxide after lung transplantation: no more cosmesis? *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 1463-

1464.

- 3 Murakami S, Bacha EA, Mazmanian GM, et al. Effects of various timings and concentrations of inhaled nitric oxide in lung ischemia-reperfusion. The Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156: 454-458.
- 4 Mizobuchi T, Sekine Y, Yasufuku K, et al. Comparison of surgical procedures for vascular and airway anastomoses that utilize a modified non-suture external cuff technique for experimental lung transplantation in rats. *J Heart Lung Transplant*, 2004, 23: 889-893.
- 5 Hashimoto N, Takeyoshi I, Yoshinari D, et al. Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to Euro-Collins solution on reperfusion injury in canine lung transplantation. *Transplantation*, 2002, 74: 320-326.
- 6 Luh SP, Tsai CC, Shau WY, et al. Protective effects of inhaled nitric oxide and gabexate mesilate in lung reperfusion injury after transplantation from non-heart-beat donors. *J Heart Lung Transplant*, 2002, 21: 251-259.
- 7 Zhou ZH, Sun B, Lin K, et al. Prevention of rabbit acute lung injury by surfactant, inhaled nitric oxide, and pressure support ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161: 581-588.
- 8 Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 1992, 256: 225-228.
- 9 Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: fifteenth official report—1998. *J Heart Lung Transplant*, 1998, 17: 656-668.
- 10 Meade MO, Granton JT, Matte-Martyn A, et al. A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 1483-1489.
- 11 Cardella JA, Keshavjee SH, Bai XH, et al. Increased expression of nitric oxide synthase in human lung transplants after nitric oxide inhalation. *Transplantation*, 2004, 77: 886-890.
- 12 Suda T, Mora BN, DOvidio F, et al. In vivo adenovirus-mediated endothelial nitric oxide synthase gene transfer ameliorates lung allograft ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119: 297-304.
- 13 Eppinger MJ, Ward PA, Jones ML, et al. Disparate effects of nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60: 1169-1176.
- 14 Kesler BS, Mazzone SB, Canning BJ. Nitric oxide-dependent modulation of smooth-muscle tone by airway parasympathetic nerves. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165: 481-488.
- 15 Adhikari N, Granton JT. Inhaled nitric oxide for acute lung injury: no place for NO? *JAMA*, 2004, 291: 1629-1631.

(收稿日期:2006-01-06)