

# NO吸入对肝移植急性肺损伤大鼠肺组织 iNOS、IL-1 $\beta$ 及 IL-6 的影响

罗晨芳, 刘德昭, 张媛兰, 池信锦\*

(中山大学附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】观察一氧化氮(NO)吸入对肝移植急性肺损伤大鼠肺组织诱导型 NO 合酶(iNOS)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)水平的影响与意义。【方法】选用 SD 大鼠 24 只,按随机数字表法分为对照组(C组)、自体原位肝移植组(M组)和 NO 吸入组(T组),每组 8 只。对照组开腹游离肝叶后即关腹,后两组行大鼠自体原位肝移植。对照组及自体原位肝移植组术后于室内吸空气,NO 吸入组术后即放入特制的密封盒内(NO 体积分数为  $20 \times 10^{-6}$ )。手术结束后 8 h 行肺脏病理检查,测定肺组织干湿质量比(W/D),并检测 iNOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平。【结果】① C 组肺组织结构基本正常,M 组肺组织炎症损伤明显,T 组肺组织炎症损伤较 M 组明显减轻。② M 组肺组织 W/D 明显高于对照组,T 组则低于 M 组,但仍高于对照组。③ M 组 iNOS 活性及蛋白表达、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平较 C 组明显升高,T 组则较 M 组降低,但仍高于 C 组。【结论】肝移植术后 NO 吸入可抑制肺组织 iNOS 活性及蛋白表达,降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平,肺组织病理损伤减轻,干湿质量比下降。

**关键词:** 肝移植; 肺损伤; 一氧化氮; 诱导性一氧化氮合酶; 细胞因子

**中图分类号:** R614      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2013)01-0065-05

## Effects of Inhaled Nitric Oxide on iNOS, IL-1 $\beta$ , and IL-6 of Lung Tissue in Rats with Acute Lung Injury Post-Liver Transplantation

LUO Chen-fang, LIU De-zhao, ZHANG Ai-lan, CHI Xin-jin\*

(Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the effects of inhaled nitric oxide (iNO) on iNOS (inducible nitric oxide synthase), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ) and IL-6 (interleukin-6) of lung tissue in rats with acute lung injury post liver transplantation. 【Methods】 Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups: 1) a sham-operation control group (C group), the abdomen was only opened and then closed besides the liver lobes were isolated, without NO inhalation. 2) an autologous OLT group (M group), received autologous OLT, without NO inhalation. 3) an iNO group (T group), received autologous OLT, with  $20 \times 10^{-6}$  NO inhalation. The lung was removed at 8 h after operation and pathological changes were observed. The concentration of iNOS, IL-1 $\beta$ , and IL-6 in lung tissue were respectively examined in each group, lung wet-to-dry weight ratio (W/D) were also measured. 【Results】 (1) The lung pathological section of C group was normal, but in M group it showed inflammatory injury. The lung inflammatory injury was improved in T group. (2) Lung dry-to-wet weight ratio in M group was higher than in C group. It decreased in T group, but still higher than in C group. (3) The levels of iNOS, IL-1 $\beta$ , and IL-6 in M group were higher than in C group. All decreased in T group, but still higher than in C group. The expression of iNOS showed the same change. 【Conclusion】 Inhaled NO after autologous OLT inhibits the activity of iNOS in lung, decreases the production of IL-1 $\beta$  and IL-6, attenuates pathological changes, and decreased lung wet-to-dry weight ratio.

**Key words:** orthotopic liver transplantation; acute lung injury; inducible nitric oxide synthase; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1):65-69]

收稿日期:2012-06-15

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800058);广东省卫生厅基金项目(A2009197)

作者简介:罗晨芳,硕士,主治医师,E-mail:15975604518@139.com; \*通信作者:池信锦,博士,副教授,E-mail:chixinjin@yahoo.com.cn

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是肝移植术后常见并发症,主要表现为进行性的低氧血症和呼吸窘迫。文献报道肝移植术后早期肺部并发症的比率高达 34.2%~77.8%<sup>[1-2]</sup>,合并 ARDS 死亡率可达 76.5%<sup>[2]</sup>,是导致肝移植术后死亡的主要原因。近年研究<sup>[3]</sup>发现一氧化氮(nitric oxide, NO)吸入可提高肺氧合,减少机械通气的应用及强度,甚至减少 ARDS 的发生。为此,我们建立自体原位肝移植模型,观察并评估在 ALI 的早期阶段吸入 NO 对肝移植大鼠肺组织损伤、iNOS 活性及蛋白表达、细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物与分组

健康雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 200~300 g,由中山大学医学实验动物中心提供。随机分为 3 组:对照组 8 只(开腹游离肝叶后即关腹),自体原位肝移植组 8 只(建立大鼠自体原位肝移植模型,术后于室内吸空气)和 NO 吸入组 8 只(建立大鼠自体原位肝移植模型,术后置于 NO 终体积分数为  $20 \times 10^{-6}$  的密封盒内)。

### 1.2 SD 大鼠自体原位肝移植模型的建立

参照文献<sup>[4]</sup>介绍的方法建立大鼠自体原位肝移植动物模型。持续乙醚吸入麻醉,采取腹部正中切口,逆时针方向游离肝脏,游离肝上下腔静脉和肝上上腔静脉,并结扎左膈静脉,脾静脉,右肾上腺静脉。使用肝素 50 U 进行全身肝素化。在肝动脉、肠系膜上静脉和脾静脉汇合处上微血管夹。阻断门静脉和肝上下腔静脉和肝上上腔静脉,在肝下下腔静脉壁剪开约 1 mm 作灌注液流出道,经门静脉穿刺处缓慢持续灌注  $0 \sim 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  12.5 U/mL 肝素醋酸林格液 20~50 mL。当肝脏全部变为土黄色,冷灌注持续时间约 20 min,拔出穿刺针,用 9-0 丝线修补流出道。检查确认修补成功后,开放肝动脉,门静脉,肝上下腔静脉和肝上上腔静脉,结束无肝期。同时用的温热生理盐水浇注肝脏快速复温,仔细止血后,腹腔内喷洒 800 U/mL 庆大霉素生理盐水 1 mL,连续全层缝合腹壁切口。

### 1.3 NO 吸入方法

模型制作完毕,将 NO 吸入组大鼠放入一个

特制的有机玻璃密封盒内,与之连通的 2 根管道分别输入 NO 和氧气以保证密封盒内 NO 终体积分数稳定在  $(20 \pm 3) \times 10^{-6}$  (应用氮氧化物气体分析仪及数码流量质量控制器控制 NO 流量)。对照组和自体原位肝移植组则放置于实验室吸入空气。吸入时间均为 8 h。

### 1.4 标本的采集与处理

术后 8 h 处死大鼠,立即分离、摘取双侧肺脏。右上肺叶用于干湿质量比(W/D)的测定,右中、下肺叶用 100 mL/L 甲醛固定,常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察肺组织病理改变。部分左肺放入液氮中保存,用酶联免疫吸附法测定肺组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平,相关试剂盒由南京凯基生物科技发展有限公司提供,操作方法按说明书。另一部分左肺组织分为两份,一份迅速按 5 mL/g 的比例加入预冷的 Buffer A,在冰浴中匀浆器匀浆,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 000  $\times g$  离心 30 min,收集上清液即为 NOS 提取液,置  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,用于 iNOS 活性测定。另一份肺组织加入事先配置好的蛋白裂解液,在冰浴中充分匀浆后,于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以 12 000  $\times g$  速度离心 30 min,转移上清液于新的 EP 管中,准备定量或存于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。参考文献<sup>[5]</sup>,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳术测定 iNOS 的蛋白含量。常规配制 10%凝胶并放入电泳槽中,检测样品量为 30  $\mu\text{g}$ 。恒压 90 V 开始电泳,当染料前沿进入分离胶后,将电压提高到 100 V,继续电泳至溴酚兰到达分离胶底部。切取含有目的条带和  $\beta$ -actin 蛋白的凝胶,100 V,90 min 转膜。将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉/TBST 液中于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h。1:800 稀释的抗 iNOS 抗体(Santa Cruz)和 1:5 000 稀释的抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(Sigma-Aldrich)与 PVDF 膜孵育过夜。充分洗膜 3 次后,孵育二抗。充分洗膜,并在暗室中曝光、显影、定影。

### 1.5 统计分析

所有数据使用 SPSS 12.0 软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )进行统计描述。组间行独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 一般资料

各组 SD 大鼠的质量,无肝期时间无统计学差异( $P > 0.05$ )。

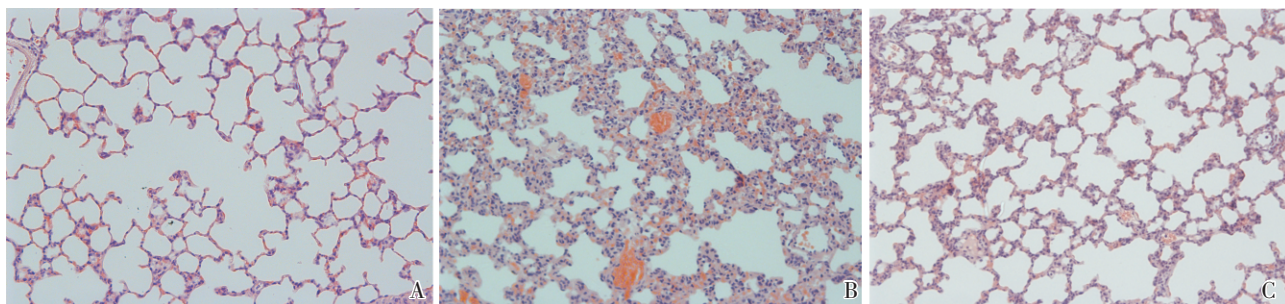


图 1 NO 吸入对肺组织病理的影响

Fig.1 Effects of NO inhaled on the histopathology of lung

A, B, C: Group C, M, T, respectively

### 2.2 肺组织病理学变化

C 组肺组织肺泡结构基本正常(图 1A)。M 组肺组织病理改变明显,肺泡间隔明显增厚,肺泡腔中炎性细胞显著增多,可见明显的血性渗出液(图 1B);T 组大鼠肺组织病理改变明显减轻,肺泡间隔增厚,肺泡腔内可见较多的炎性细胞,部分肺泡腔内有血性渗出液(图 1C)。

### 2.3 肺组织干湿质量比

与 C 组比较,M 组、T 组肺组织干湿质量比明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 M 组比较,T 组肺组织干湿质量比明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2)。

### 2.4 肺组织 iNOS 活性、细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平

与 C 组比较,M 组、T 组肺组织 iNOS 活性、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 M 组比较,T 组肺组织 iNOS 活性、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,图 3)。

### 2.5 肺组织 iNOS 蛋白表达

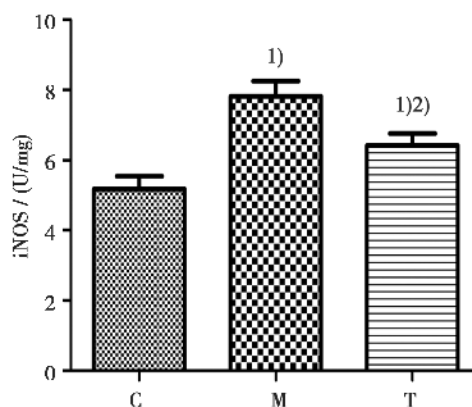


图 2 各组肺组织干湿质量比

Fig.2 The wet-to-dry mass ratio of lung in each group  $n = 8$ ; 1) compared with Group C,  $P < 0.05$ ; 2) compared with Group M,  $P < 0.05$ .

与 C 组比较,M 组、T 组肺组织 iNOS 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 M 组比较,T 组肺组织 iNOS 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 4)。

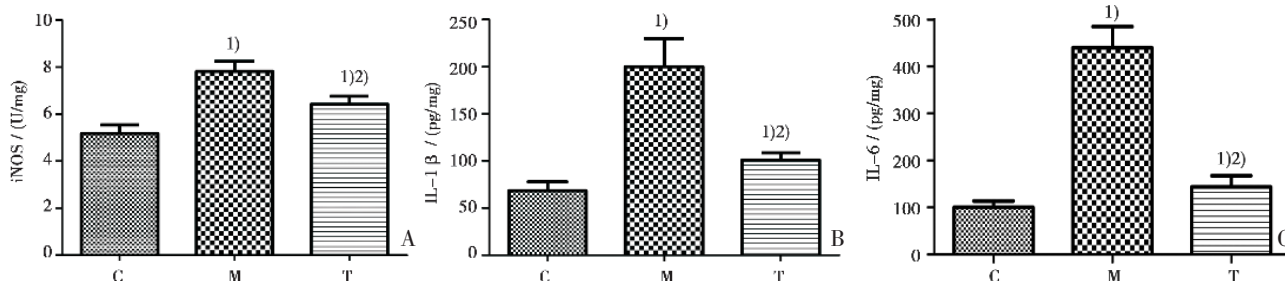


图 3 各组肺组织 iNOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平

Fig.3 The level of iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6 in lung of each group

$n = 8$ ; 1) compared with Group C,  $P < 0.05$ ; 2) compared with Group M,  $P < 0.05$ .

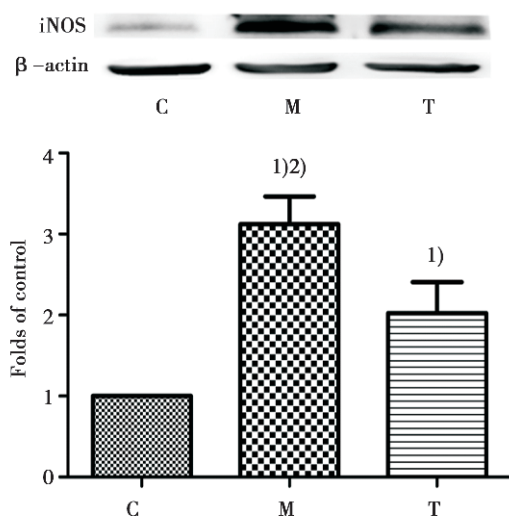


图 4 NO 吸入对肺组织 iNOS 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of inhaled NO on the expression of iNOS in lung

$n = 3$ ; 1) compared with Group C,  $P < 0.05$ ; 2) compared with Group M,  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

肝移植围术期病理生理变化复杂, 门肺高压症、全身炎症反应综合征、高凝状态、大量输血、无肝期过长、冷缺血时间过长等均是导致肝移植早期 ALI 的危险因素<sup>[6]</sup>。由于机制不明, 各种危险因素无法完全避免, 肝移植术后早期 ALI 的发生率居高不下。本实验通过复制大鼠自体原位肝移植模型, 结果显示: 肝移植术后 8 h, 肺组织病理改变明显, 肺泡间隔明显增厚, 肺泡腔炎性细胞显著增多, 并可见明显的血性渗出液, 同时干湿质量比明显高于对照组, 提示肝移植术后 ALT 模型复制成功。

有研究<sup>[7-9]</sup>表明肺部炎症失控是导致 ALT 的重要机制之一, 是炎症介质、细胞因子介导的全身炎症级联反应在肺部的表现。IL-1 $\beta$ 、IL-6 则是由激活的巨噬细胞产生的一种重要的炎症介质, 它们可诱导机体急性期炎症反应的产生, 使白细胞聚集、渗透, 在各种因素导致的 ALT 中发挥了重要作用<sup>[10-11]</sup>。本实验自体原位肝移植组肺组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平增高, 证实炎症反应与急性肺损伤的关系密切, 与我们以往临床研究及前人研究结

果一致。

NO 是由 NO 合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化 L-精氨酸产生的小分子化合物, 具有扩张血管、抗血小板粘附聚集、抗血管平滑肌细胞增生等作用。文献报道<sup>[12]</sup>吸入  $5 \sim 15 \times 10^{-6}$  的 NO 可减少肺组织中中性粒细胞浸润与炎症介质产生, 从而下调炎症介质水平, 减轻 ALI 时肺组织的炎症反应, 改善氧合。本研究结果显示: 与自体原位肝移植组比, NO 吸入组肺组织病理损伤明显减轻, 干湿质量比降低, 表明肺损伤减轻。同期检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平降低, 提示肺组织炎症反应减轻。

iNOS 是 NOS 的一种亚型, 主要位于中性粒细胞和巨噬细胞中。ALI 时 iNOS mRNA 与蛋白的表达明显增加, 活性增强, 中性粒细胞在肺泡腔及肺间质的聚集增加, 大量炎症介质产生, 加重肺组织损伤<sup>[13]</sup>。Zeidler 等<sup>[14]</sup>实验发现敲除 iNOS 基因的大鼠在硅诱导的肺炎性损伤中显示较轻的病变。本研究结果表明: NO 吸入组肺组织 iNOS 活性及蛋白表达较自体原位肝移植组明显降低, 提示吸入外源性 NO 可抑制内源性 iNOS 生成, 进而减少中性粒细胞、巨噬细胞在肺泡腔及肺间质的聚集, 减少炎症介质、细胞因子的产生, 减轻肺组织损伤。临床应用上, 因肝移植术后 ALT 多需呼吸机支持治疗, 可方便 NO 吸入; 通过 NO 抗炎效应达到减轻肺损伤目的, 具有重要意义。

综上所述, 本研究表明 NO 吸入可能通过抑制内源性 iNOS 生成, 减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6 产生, 从而减轻肺组织损伤。

#### 参考文献:

- [1] Hong SK, Hwang S, Lee LS, et al. Pulmonary complications following adult liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(9): 2979-2981.
- [2] 黎尚荣, 沈宁, 黑子清, 等. 肝移植术后患者急性肺损伤及其早期危险因素分析 [J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(43): 3049-3052.
- [3] Li SR, Shen N, Hei ZQ, et al. Early risk factors of acute lung injury following orthotopic liver transplantation [J]. *Nat Med J China*, 2008, 88(43): 3049-3052.
- [4] Dellinger RP, Trzeciak SW, Criner GJ, et al. Association between inhaled nitric oxide treatment and

- long-term pulmonary function in survivors of acute respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care*, 2012, 16 (2): R36.
- [4] 孙国亮, 池信锦, 金亦, 等. 自体原位肝移植大鼠急性肾损伤的研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2011, 32 (1): 47-50.
- Sun GL, Chi XJ, Jin Y, et al. Acute Kidney Injury after Orthotopic Liver Autotransplantation in SD Rat Model [J]. *J Sun Yat-sen Univ: Med Sci*, 2011, 32(1): 47-50.
- [5] Broderick TL, Wang Y, Gutkowska J, et al. Downregulation of oxytocin receptors in right ventricle of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. *Acta Physiol*, 2010, 200(2): 147-158.
- [6] 雷联会, 俞森洋, 韦中余, 等. 原位肝移植术后早期发生急性肺损伤危险因素多元 Logistic 回归分析 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2007, 6(3): 194-196.
- Lei LH, Yu SY, Wei ZY, et al. Multivariate logistic regression analysis of risk factors for acute lung injury early after orthotopic liver transplantation [J]. *Chin J Resp Crit Care Med*, 2007, 6(3): 194-196.
- [7] Yang R, Yang L, Shen X, et al. Suppression of NF- $\kappa$ B pathway by crocetin contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2-3): 391-396.
- [8] Kaido T, Uemoto S. Effects of neutrophil elastase inhibitor on progression of acute lung injury after liver transplantation [J]. *Transplantation*, 2010, 90 (3): 335-337.
- [9] Chi XJ, Cai J, Luo CF, et al. Relationship between the expression of Toll-like receptor 2 and 4 in mononuclear cells and postoperative acute lung injury in orthotopic liver transplantation [J]. *Chin Med J*, 2009, 128 (8): 895-899.
- [10] Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, et al. Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1 $\beta$  in bleomycin-induced lung injury in humans and mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41(6): 661-670.
- [11] Wolters PJ, Wray C, Sutherland RE, et al. Neutrophil-derived IL-6 limits alveolar barrier disruption in experimental ventilator-induced lung injury [J]. *J Immunol*, 2009, 182(12): 8056-8062.
- [12] Fioretto JR, Campos FJ, Ronchi CF, et al. Effects of inhaled nitric oxide on oxidative stress and histopathological and inflammatory lung injury in a saline-lavaged rabbit model of acute lung injury [J]. *Respir Care*, 2012, 57(2): 273-281.
- [13] Lin CC, Hsieh NK, Liou HL, et al. Niacinamide mitigated the acute lung injury induced by phorbol myristate acetate in isolated rat's lungs [J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19: 27.
- [14] Zeidler P, Hubbs A, Battelli L, et al. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2004, 67(13): 1001-1026.

(编辑 徐杰)