

文章编号: 1001-6325(2001)06-0547-04

## 哮喘模型大鼠肺组织一氧化氮合酶的分布

肖彭年, 莫榴琴, 高丰光

(徐州医学院 微生物教研室, 徐州 221002)

**摘要:** 研究一氧化氮(NO)在哮喘大鼠肺组织中的作用。采用组化法观察一氧化氮合酶(NOS)在大鼠哮喘模型肺组织中的分布,应用免疫组化法观察大鼠哮喘模型气道 mL-2R<sup>+</sup>细胞变化。结果显示,哮喘大鼠肺 NADPH 染色呈强阳性,并波及肺泡膈。肺组织中 NOS 含量明显高于对照组[哮喘组(37.44 ± 0.77) pmol/mg,对照组(8.73 ± 0.79) pmol/mg],气道炎性细胞增多,特别是 mL-2R<sup>+</sup>细胞[哮喘组 mL-2R<sup>+</sup>细胞为(23.8 ± 7.9)个,对照组为0个],而 NOS 抑制剂 DMA 组气道炎性细胞少,NADPH 呈阴性。提示 NO 是哮喘大鼠的炎性效应分子。

**关键词:** 一氧化氮;哮喘;大鼠

**中图分类号:** R562.2<sup>+</sup>5 **文献标识码:** A

为了探索 NO 在哮喘过程中所发生的复杂病理作用,本文借助大鼠哮喘模型进行研究,弄清哮喘时 NO 产生水平、NOS 在肺组织内的分布、以及该处 mL-2R<sup>+</sup>细胞被激活状况等,进而探讨 NO 在哮喘病理过程中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

NADPH、NBT、DMA、OVA 为 Sigma 产品,L-arg 为北京化学试剂公司产品,百日咳疫苗为上海生物制品研究所提供,NO 和 NOS 试剂盒、小鼠抗大鼠 mL-2R 单克隆抗体均由北京邦定泰克生物技术有限公司提供,IL-6 和 TNF 试剂盒由第四军医大学免疫室提供。

#### 1.2 动物模型的建立和分组

SD 大鼠 52 只由本院动物饲养中心提供,体重(250 ± 30)g,随机分成四组。哮喘组,根据苗会法<sup>[1]</sup>加以改进。腹腔注入 OVA 1mg,百日咳杆菌疫苗 5 × 10<sup>9</sup> 个,AL(OH)<sub>3</sub> 100mg 致敏,2 周后用 1.25% OVA 超声雾化吸入,每日两次,每次发敏 20min,共 10 天。DMA 组和 L-arg 组致敏同哮喘组,但在每次发敏前 30min,腹腔各注入 DMA 0.4mg/kg、L-arg 300mg/kg。对照组用生理盐水替代。

#### 1.3 方法

在末次发敏后 20min,腹腔注入 1%戊巴比妥钠

30mg/kg,眼球后采血,待查血清中 NO、IL-6、TNF 量。并开胸取肺,结扎切下左下肺叶,取该肺组织 100mg 剪碎,加 40mmol/L 4 pH7.2 磷酸钾缓冲液 0.9mL 制备匀浆,经高速离心机 10 000 r/min 离心 5min,取上清 50μL,再根据试剂盒说明书分别测定 NO、NOS 含量。余肺用 4%多聚甲醛液灌注(压力 1.96kPa)至肺展平,再投入 4%多聚甲醛液固定 2h。左上肺叶作石蜡切片,HE 染色。余下右肺切成 8mm × 8mm × 4mm 方块,经蔗糖处理后在 -20℃ 恒冷切片机上制成 8μm 切片,作 NADPH 组化法和抗生素生物素免疫组化染色。前者应用新配制的 NADPH 染液(每毫升 Tris-HCl 缓冲液含 NADPH 1.25mg,NBT 0.25mg)滴加于切片上,37℃ 孵育 25min 钟,冲洗、封片、镜检;后者用 ABC 法<sup>[2]</sup>对冰冻切片进行 mL-2R 染色,最后在 ×400 光镜下观察细支气管粘膜下的 mL-2R<sup>+</sup>细胞,计算每个视野的细胞数。

#### 1.4 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用 *t* 检验。

### 2 结果

各组大鼠血清中 NO 无明显改变,而肺组织中 NO/NO<sub>2</sub> 及 NOS 水平,哮喘组和 L-arg 组明显高于对照组(表 1)。

收稿日期: 2001-07-23 修回日期: 2001-10-29

表1 各组大鼠肺组织  $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 、NOS 水平Table 1 Levels of  $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 、NOS in the rat lung tissues ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Groups	$\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$		Lung NOS ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )
	Serum( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	Lung tissue( $\text{nmol}/\text{mg}$ )	
Control	23.75 $\pm$ 1.67	0.253 $\pm$ 0.014	8.73 $\pm$ 0.79
Asthma group	25.00 $\pm$ 1.85	1.110 $\pm$ 0.160 *	37.44 $\pm$ 0.77 *
DMA group	22.25 $\pm$ 2.49	0.232 $\pm$ 0.009	8.14 $\pm$ 0.63
L-arg group	26.25 $\pm$ 1.67	1.861 $\pm$ 0.140 *	42.47 $\pm$ 0.71 *

\* $P < 0.01$  vs control

哮喘组和 L-arg 组大鼠血清中 IL-6、TNF 水平高于正常对照组,特异性 NOS 抑制剂 DMA 能减少 NO 产量(表 2)。

表2 各组大鼠血清中 IL-6、TNF 水平

Table 2 Levels of IL-6、TNF in the rat sera( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Groups	IL-6 (ng/L)	TNF (ng/L)
Control	9.88 $\pm$ 3.60	55.25 $\pm$ 32.41
Asthma group	207.75 $\pm$ 35.07 *	358.75 $\pm$ 70.74 *
DMA group	55.88 $\pm$ 7.73	61.75 $\pm$ 30.88
L-arg group	290.50 $\pm$ 52.55 *	392.50 $\pm$ 61.12 *

\* $P < 0.01$  vs control

在哮喘大鼠肺组织切片中,可见小支气管周围有多数炎性细胞(淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞)浸润,并形成淋巴滤泡。小血管周围有多种炎性细胞,并见较多的嗜酸性粒细胞。肺间质高度肿胀,除成纤维细胞、巨噬细胞、浆细胞外,还有较多的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等炎性细胞(图 1)。哮喘大鼠细支气管粘膜下 mL-2R<sup>+</sup> 细胞较对照组明显增多,而 DMA 组肺细支气管粘膜下 mL-2R<sup>+</sup> 细胞数较哮喘组明显减少,局部炎性细胞数及中性粒细胞、淋巴细胞等亦明显减少(表 3,图 2)。

表3 各组大鼠粘膜下 mL-2R<sup>+</sup> 细胞数Table 3 Numbers of mL-2R positive lymphocyte in the rats submucosa ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Groups	mL-2R <sup>+</sup> (cell/HP)
Control	0
Asthma group	23.8 $\pm$ 7.9
DMA group	7.1 $\pm$ 2.6
L-arg group	25.5 $\pm$ 8.3

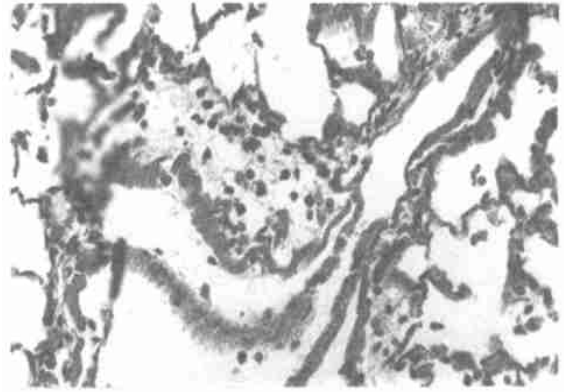


图1 哮喘大鼠肺组织切片

Fig 1 Many inflammatory cells were seen round respiratory bronchiole of asthmatic rats, alveolus septum was swelled remarkably (HE,  $\times 250$ )

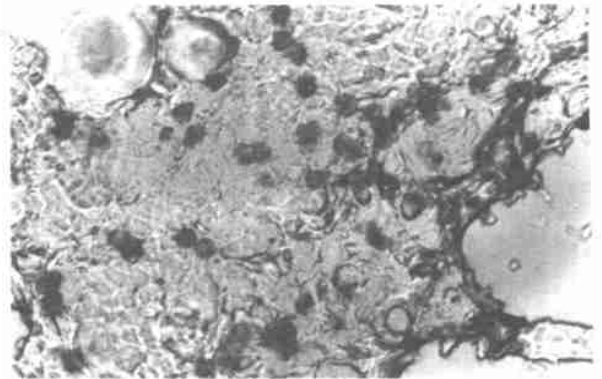


图2 哮喘大鼠小支气管粘膜

Fig 2 The numbers of mL-2R positive lymphocytes were significantly increased in a bronchial submucosa of asthmatic rats (immunohistochemical method,  $\times 450$ )

哮喘大鼠肺组织经 NADPH 组化法显示细支气管平滑肌和上皮细胞及肺小血管平滑肌和内皮细胞呈蓝黑色, L-arg 组尤甚,而对照组着色较浅, DMA 组呈色反应明显减弱(表 4,图 3,4)。

表4 各组大鼠肺 NADPH 组化染色结果

Table 4 Results of NADPH histochemical method in the rats (n = 5)

Groups	bronchial muscle smooth blood ves- sel smooth	bronchial epitheli- um blood vessel endothelium	alveolus septum
Control	+	+	+
Asthma group	+++	+++	+++
DMA group	±	±	±
L-arg group	+++	+++	+++

+++ dark blue; ++ blue; + light blue; ± no color

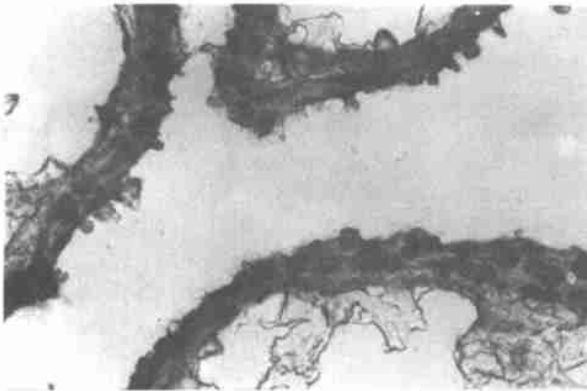


图3 哮喘大鼠细支气管切片, NADPH 组化染色

Fig 3 Bronchial epithelial cells of asthmatic rats were the best positive by NADPH histochemical method (histochemical method, ×1000)

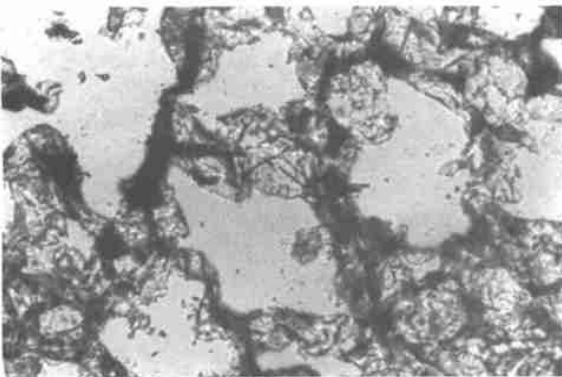


图4 哮喘大鼠肺组织切片, NADPH 组化染色

Fig 4 Alveolus septum of asthmatic rat were the best positive by NADPH histochemical method (histochemical method, ×1000)

### 3 讨论

由于 NO 极不稳定,可迅速与血红蛋白中的血红素结合而失去活性,所以各组大鼠血清中 NO 含量无变化,而哮喘组肺组织中 NO 明显高于对照组,提示 NO 作用有局部性<sup>[3]</sup>。另外在采用 NOS 特异性抑制剂 DMA 后,降低了肺组织中 NO 含量;若增加 NOS 底物 L-arg,又可增加 NO 产量,这就说明哮喘大鼠肺组织中 NO 增多是由于内源性 NO 含量过高引起的。NO 不能作为循环介质起作用,而是从它形成的局部直接弥散到邻近的组织细胞中发挥作用。Fumitochinose 等<sup>[4]</sup>亦指出,外源性 NO 需经过肺泡膜弥散至邻近细支气管和小血管平滑肌细胞,而细胞因子作用方式主要是经过自分泌和旁分泌起作用,因此内源性 NO 很小浓度即可引起生物学作用。从 NADPH 组化法显示 NOS 在哮喘大鼠肺组织中的定位情况来看,虽然对照组大鼠肺细支气管及肺小血管细胞呈阳性反应,但哮喘组和 L-arg 组大鼠肺组织内 NOS 含量更高,使该处细胞呈强阳性反应。从彩色照片中首次发现,肺泡膈呈蓝黑色,表明哮喘大鼠的肺泡膈亦有 NOS 存在,肺泡膈也能产生 NO。我们从病理切片中看到,哮喘大鼠的肺泡膈高度肿胀,组织界限欠清晰,这可能是局部产生大量的 NO 后,引起了肺泡膈内血管扩张,毛细血管网充血,加重了血浆渗出所致<sup>[5]</sup>。另外,过量 NO 可灭活多种细胞生物氧化酶,抑制细胞产能和干扰 DNA 合成<sup>[6]</sup>。

本实验发现哮喘大鼠气道内 mL-2R<sup>+</sup> 细胞明显增多, L-arg 组更甚,组织损伤也较为剧烈;而 DMA 组 mL-2R<sup>+</sup> 细胞则明显减少,提示哮喘大鼠淋巴细胞处于激活状态。由于巨噬细胞有特殊生物学性质:一方面可摄取和处理抗原,向 mL-2R<sup>+</sup> 细胞呈递抗原信息,产生 IL-1、IL-6、TNF 等多种细胞因子,启动免疫应答,引起炎症反应;另一方面又能产生 NO,促进 IL-1、IL-6、TNF 等细胞因子的分泌,从而诱导产生更多的 NO,发挥炎症介质作用。实验结果表明,NO 是哮喘大鼠淋巴细胞激活的主要细胞因子,特别是在 mL-2R<sup>+</sup> 细胞参与的活化过程中,NO 起了关键性的作用<sup>[7]</sup>。

致谢:本研究课题得到李庆明副教授、王梅申老师的大力支持,在此特表示致谢。

## 参考文献:

- [1] 苗会,薛全福,庄逢源,等.哮喘大鼠动物模型的制备[J].基础医学与临床,1998,18(1):72-77.
- [2] 蔡文琴,王泊云.实用免疫细胞化学[M].四川:四川科学技术出版社,1998.116-119.
- [3] Brenner BM, Troy JL, Ballermann BJ. Endothelium-dependent vascular responses, mediators and mechanisms[J]. J Clin Invest, 1989,84:1373-1378.
- [4] Fumitochiose E, Christophe D, William E, et al. Prolonged pulmonary vasodilator action of inhaled nitric oxide by zaprinast in awake lambs[J]. J Appl Physiol, 1995, 78: 1288-1295.
- [5] Barnes PJ. Nitric oxide and airways[J]. Eur Respir J, 1993, 6:163
- [6] 钟慈声,孙安阳.一氧化氮的生物医学[M].上海:上海医科大学出版社,1997.6-26.
- [7] Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation[J]. Immunol Today,1995,16:128-130.

## Distribution of nitric oxide synthase in the rat asthma model lung tissues

XIAO Peng-nian, MO Liu-qin, GAO Feng-guang

(Department of Microbiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 221002, China)

**Abstract:** To investigate the role of nitric oxide (NO) in bronchial asthma, histochemical and immunohistochemical methods were used to find the distribution of nitric oxide synthase (NOS) in the rat asthma model and the changes of membrane interleukin-2 receptor positive lymphocytes. NADPH was found to be a histochemical marker which reflecting NOS activity. Meanwhile there was an obvious increase of NOS activity in asthmatic rat as well as in alveolar septum. The NOS level of asthmatic rat was far more than that of control [asthmatic group (37.44 ± 0.77) pmol/mg, control group (8.73 ± 0.79) pmol/mg]. Airway inflammatory cell numbers of asthmatic rats were increased and mL-2R positive lymphocytes were significantly increased (asthmatic group 23.8 ± 7.9 vs control group nil), but lower in the DMA group. NO was the inflammatory effector molecule of asthmatic rat.

**Key words:** nitric oxide; asthma; rat

(上接 546 页)

高血压的发病相关。邱教授的工作对于从基因水平解释汉、藏、彝原发性高血压发病率明显不同开了一个好头。香港大学医学院药理学系柯嘉敏教授报告了同型半胱氨酸具有激活核转录因子并诱发血管平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白 MCP-1 的作用,这一研究揭示了同型半胱氨酸作为动脉粥样硬化的一个危险因素如何引起动脉粥样硬化,很有创新性。中国医学科学院基础医学研究所生理系曹济民教授关于神经重组与心源性猝死的报告引起了与会者的热烈反响。阜外医院分子医学中心的孟宪敏教授介绍了他们成功地设计并应用 p21 和反义凝血酶受体双基因共表达预防动物损伤血管内膜的增厚、抑制血管平滑肌细胞增殖的研究工作,此项工作受到广泛关注。此外,来自台湾的苏铭嘉和林仁混教授也作了精彩的报告。会上大家还对未来中药现代化研究进行了热烈的讨论。有些论文达到了相关领域的国际水平甚至国际领先水平。总体来看,香港、台湾在心血管临床研究方面与国际接轨优于大陆,临床研究论文的质量高于大陆;大陆在心血管基础研究的水平强于港、台;港、台的基础和临床结合要好于大陆,大陆在心血管研究领域应加强基础与临床的结合。

从本次大会两岸三地一些高水平的报告中,亦可窥见当今心血管科学的国际前沿:动脉粥样硬化、冠心病和心肌梗死研究方面,较活跃的研究领域有血管内皮的损伤机制以及血管壁炎症反应与粥样硬化斑块的形成机制;血管支架的改进以及防治再狭窄措施研究;用干细胞修复坏死心肌甚至培育整个心脏等。在心律失常及心源性猝死研究方面,活跃的研究领域有离子通道基因突变与长 QT 综合症、心脏神经重组与心源性猝死、ICD 的技术改进、射频消融技术的改进等。在心衰研究方面,活跃的研究领域有心脏结构重组的发生机制、新的抗心衰药物的开发等。在高血压研究方面,主要集中在高血压相关基因的寻找及其在高血压发病中的相对意义。从本次会议看国外今后重点发展的研究领域、前沿课题,以及新出现的学科领域与生长点有:用计算机辅助药物设计开发治疗心衰新药;中药现代化;护理理念的现代化;新的心脏介入技术的开发等。

大会安排了法国施维雅国际公司和拜耳医药保健有限公司的 2 个卫星会,分别由阜外医院王文教授和江西医学院附属医院吴印生教授主讲“防止中风的新突破—progress 研究”;“拜新同 INSIGHT 实验新进展”。此外,永信药品工业(昆山)有限公司、北京微信信达科技发展有限责任公司、天津力生制药股份有限公司、成都仪器厂、上海埃德公司、南京美易科技公司和北京普升达科技开发有限公司参加大会,并介绍了药物、仪器等产品。

台湾与香港的主要学者承诺他们将负责主办第四届(2003 年)和第五届(2005 年)海峡两岸心血管科学研讨会。

第三届海峡两岸心血管科学研讨会组委会 供稿