

• 论著 •

内皮型一氧化氮合酶基因转移对大鼠慢性低氧性肺动脉高压的预防作用

金强 张铁铮 陈卫民 周锦 刘晓江

【摘要】 目的 探讨内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因转移对大鼠慢性低氧性肺动脉高压(CHPH)的预防作用。方法 雄性 Wistar 大鼠 24 只被随机分为常氧(N)组、低氧(H)组、低氧 LacZ(H-LacZ)组和低氧 eNOS(H-eNOS)组,每组 6 只。经气道转基因,H-eNOS 组注入 5×10^{12} pfu/L AdCMVceNOS 50 μ l,重复 12 次,H-LacZ 组注入等量 AdCMVLacZ,其他两组注入等量生理盐水;3 d 后建立大鼠 CHPH 模型。低氧结束后(2 周)检测血动力学指标[体循环平均动脉压(MSAP)、心率(HR)和平均肺动脉压(MPAP)],肺小血管肌化程度(肺小血管中肌型动脉所占比例)和右心室肥厚指数(右心室/(左心室+室间隔)),并行肺组织 eNOS 蛋白检测及环磷酸鸟苷(cGMP)和一氧化氮(NO)含量测定。结果 H-eNOS 组大鼠 MPAP、右心室肥厚指数和肺小血管肌化程度明显低于 H 组与 H-LacZ 组,明显高于 N 组(P 均 < 0.01);各组大鼠 HR 和 MSAP 比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);H 和 H-LacZ 组 eNOS 蛋白含量明显高于 N 组,低于 H-eNOS 组(P 均 < 0.01);H 组和 H-LacZ 组大鼠肺组织 NO 含量明显低于 N 组,而 H-eNOS 组明显高于其他 3 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);N、H 和 H-LacZ 组大鼠肺组织 cGMP 含量明显低于 H-eNOS 组(P 均 < 0.01),且 3 组间比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。结论 经气道 eNOS 基因转移,可增强肺组织 eNOS 活性,增加 NO/cGMP 含量,减少大鼠 CHPH 的发生率。

【关键词】 重组腺病毒; 一氧化氮合酶; 内皮型; 基因转移; 肺动脉高压

Preventive effect of endothelial nitric oxide synthase gene transfer on chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats JIN Qiang*, ZHANG Tie-zheng, CHEN Wei-min, ZHOU Jin, LIU Xiao-jiang.
*Department of Anesthesiology, the General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, Liaoning, China

Corresponding author: Zhang Tie-zheng, Email: tz Zhang@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the preventive effect of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene transfer on chronic hypoxic pulmonary hypertension (CHPH) in rats. **Methods** Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into four groups with 6 rats in each group: normoxia group (group N), hypoxia group (group H), hypoxia with LacZ group (group H-LacZ) and hypoxia with eNOS group (group H-eNOS). AdCMVceNOS, AdCMVLacZ or normal saline (NS) was injected intratracheally 3 days before the beginning of exposure to normoxia or hypoxia. Rats in group H-eNOS received 50 μ l of AdCMVceNOS (5×10^{12} pfu/L), rats in group H-LacZ received equal dose of AdCMVLacZ, rats in group N and group H received equal dose of NS. Hemodynamic parameters (including mean systemic arterial pressure (MSAP), heart rate (HR) and mean pulmonary arterial pressure (MPAP)), pulmonary vascular remodeling (percentage of muscularized arteries in small pulmonary vessels) and right ventricular hypertrophy (ratio of right ventricle to left ventricle + septum weight) were measured after 2 weeks of exposure to normoxia or hypoxia. The expression of eNOS, cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and nitric oxide (NO) level were also measured in lungs. **Results** The MPAP, right ventricular hypertrophy index and pulmonary vascular remodeling in rats in group H-eNOS were obviously lower than those in group H and H-LacZ, but higher than that in group N (all $P < 0.01$). There was no significant difference with regard to HR and MSAP in rats in all groups (all $P > 0.05$). The eNOS protein in group H and H-LacZ was obviously higher than that in group N, but obviously lower than that in group H-eNOS (all $P < 0.01$). The NO level in rat lungs in group H and H-LacZ was obviously lower than that in group N, and value in group H-eNOS was higher than that in the other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). With regard to cGMP in rat lungs, there was no significant difference among group N, H and H-LacZ (all $P > 0.05$), but they were all obviously lower than that in group H-eNOS (all $P < 0.01$). **Conclusion** Intratracheal eNOS gene transfer upregulates the activity of eNOS protein, elevates the level of NO/cGMP in lungs, and alleviates CHPH in rats.

【Key words】 recombinant adenovirus; endothelial nitric oxide synthase; gene transfer; pulmonary hypertension

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.04.009 基金项目:全军“十一五”医学科研基金国际合作项目(06H005)

作者单位:110016 辽宁,沈阳军区总医院麻醉科(金强、张铁铮、周锦、刘晓江);110003 中国医科大学附属盛京医院麻醉科(陈卫民)

通信作者:张铁铮,Email:tz Zhang@hotmail.com

肺动脉高压(PH)的主要病理特点为肺血管异常收缩和进展性结构重塑,研究表明,一氧化氮/环磷酸鸟苷(NO/cGMP)信号通路功能障碍在其病理过程中起重要作用^[1],因此,重建 NO/cGMP 功能十分重要。NO 吸入疗法治疗 PH 虽有效,但常引发不良反应^[2-3]。由于在内皮型一氧化氮合酶(eNOS)源性 NO 在调节肺血管基础张力方面起重要作用。因此,通过 eNOS 转基因重建 NO/cGMP 功能可能成为治疗 PH 的理想方法。鉴于此,本研究通过腺病毒介导经气道转入 eNOS 基因,探讨其对大鼠慢性低氧性肺动脉高压(CHPH)的预防作用。

1 材料与方 法

1.1 材料:健康成年雄性 Wistar 大鼠(由沈阳军区总医院实验动物中心提供)24 只,体重 220~280 g;分别携带人类 eNOS 基因和 LacZ 基因的重组腺病毒 AdCMVceNOS 和 AdCMVLacZ,由美国德克萨斯大学西南医学中心 Gerard 博士惠赠;小鼠抗人 eNOS 单克隆抗体购于美国 BD 公司;免疫组化试剂盒和弹力纤维染色试剂盒购于北京中杉生物技术公司;cGMP 放射免疫试剂盒购于上海中医药大学;NO 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物分组:24 只大鼠按随机数字表法分为常氧(N)组、低氧(H)组、低氧 LacZ(H-LacZ)组和低氧 eNOS(H-eNOS)组 4 组,每组 6 只。

1.3 重组腺病毒在大鼠肺内的转染:腹腔注入水合氯醛和阿托品麻醉大鼠,经气管插管行机械通气,潮气量(V_T)2.5 ml、通气频率(f)60 次/min、吸入氧浓度(FiO_2)1.00。H-eNOS 组向大鼠气管内注入 5×10^{12} pfu/L 的 AdCMVceNOS 50 μ l, H-LacZ 组注入等量 AdCMVLacZ, N 组和 H 组注入等量生理盐水,每 5 min 重复注入 1 次,连续 12 次,向制模大鼠肺内注入 200 μ l 空气使病毒均匀分布于各肺叶。每只大鼠接受的病毒载体总量为 3×10^9 pfu,苏醒后拔出气管导管,腹腔注射氨基苄西林 0.3 ml (100 g/L),单笼饲养 3 d 后继续进行实验。

1.4 大鼠 CHPH 模型的建立:除 N 组外,其他各组大鼠置于含 N_2 的低氧舱内,每日 8 h,连续 2 周。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 血流动力学指标和右心室肥厚程度检测:低氧 2 周后,腹腔注入水合氯醛麻醉大鼠,经左颈动脉置管测量体循环平均动脉压(MSAP)和心率(HR),右心导管法测量平均肺动脉压(MPAP)^[4]。放血处死大鼠,开胸取出心脏,分离右心室自由壁(RV)、左心室及室间隔(LV+S)并称量。计算 $RV/(LV+S)$

代表右心室肥厚程度。

1.5.2 肺血管显微结构观察:取肺组织用中性甲醛水溶液固定制成蜡块,切片后分别行苏木素-伊红(HE)染色和弹力纤维染色,光镜下观察肌型动脉(CMA)、部分肌型动脉(PMA)和无肌型动脉(NMA)的形态。400 倍光镜下计数 CMA 占肺小血管(A)总数的百分比以反映肺小血管肌化程度。每张切片连续观察 5 个以上高倍视野。

1.5.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肺组织 eNOS:取 100 mg 肺组织剪碎后加裂解缓冲液,用乙基苯基聚乙二醇细胞组织裂解液超声粉碎,离心取上清液,二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白含量。取含总蛋白的样本,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上,Tris 缓冲液(TBS)洗涤,室温下脱脂奶粉封闭加小鼠抗人 eNOS 单克隆抗体(TTBS 1:2 500 稀释),孵育过夜。TBS 冲洗后加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG,室温下孵育,免疫印迹化学发光法(ECL)显色,凝胶图像处理系统分析目标条带的吸光度(A)值。

1.5.4 肺组织 NO 含量测定:取大鼠肺组织制成组织匀浆,离心取上清液,硝酸还原酶法检测 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度,用以代表肺组织 NO 含量。

1.5.5 肺组织 cGMP 含量测定:取肺组织,放入冷醋酸缓冲液制成组织匀浆,离心取上清液,采用放射免疫法测定 cGMP 浓度。

1.6 统计学处理:应用 SPSS 10.0 软件,数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析,两两比较用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血流动力学结果(表 1):慢性低氧 2 周各组大鼠 HR、MSAP 差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。与 N 组比较,其他 3 组 MPAP 明显升高,但 H-eNOS 组明显低于 H 组与 H-LacZ 组(P 均 < 0.01)。

2.2 肺小血管肌化和右心室肥厚程度:HE 染色显示,N 组肺小动脉管壁菲薄,内皮细胞扁平连续,细胞分布均匀,大小、厚薄较一致;H 组和 H-LacZ 组肺血管数明显增多,肺小动脉中膜明显增生肥大,管壁普遍增厚伴玻璃样变性,管腔明显狭窄;H-eNOS 组肺小动脉增厚及狭窄程度均较 H 组和 H-LacZ 组显著减轻。弹力纤维染色显示(表 2),H-eNOS 组肺小血管中 CMA 所占比例均明显低于 H 组和 H-LacZ 组,但明显高于 N 组(P 均 < 0.01);H 组和 H-LacZ 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

RV/(LV+S)与CMA/A所测结果一致,表明预先转入eNOS基因可明显减轻慢性低氧引起的肺血管结构重塑和右心室肥厚。

表 1 各组大鼠血流动力学指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	HR (次/min)	MSAP (mm Hg)	MPAP (mm Hg)
N组	6	375.0±16.0	97.0±8.0	16.5±1.6
H组	6	386.0±19.0	101.0±15.0	30.2±3.2 ^{bc}
H-LacZ组	6	392.0±18.0	95.0±15.0	31.0±2.3 ^{bc}
H-eNOS组	6	376.0±19.0	106.0±10.0	24.3±1.4 ^b

注:与N组比较,^b $P<0.01$;与H-eNOS组比较,^c $P<0.01$
1 mm Hg=0.133 kPa

表 2 各组大鼠CMA/A和RV/(LV+S)结果($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	CMA/A	RV/(LV+S)
N组	6	6.5±2.2	22.8±1.5
H组	6	27.4±4.8 ^{bc}	42.8±4.6 ^{bc}
H-LacZ组	6	25.9±4.1 ^{bc}	45.2±4.5 ^{bc}
H-eNOS组	6	16.9±3.3 ^b	33.1±2.5 ^b

注:与N组比较,^b $P<0.01$;与H-eNOS组比较,^c $P<0.01$

2.3 肺组织eNOS蛋白表达(图1):eNOS蛋白在各组均有表达(条带出现在相对分子质量140 000处)。定量分析显示,H组和H-LacZ组eNOS蛋白含量相似(相对A值:2.80±0.68和2.40±0.58),明显高于N组(1.00±0.00, P 均<0.01),明显低于H-eNOS组(4.95±0.86, $P<0.01$)。

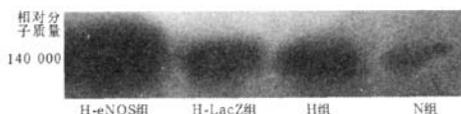


图 1 Western blotting 检测各组大鼠肺组织eNOS蛋白表达结果

2.4 肺组织NO、cGMP含量(表3):H组和H-LacZ组NO含量均明显低于N组,而H-eNOS组则明显高于其他3组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。N组、H组和H-LacZ组之间cGMP含量均明显低于H-eNOS组(P 均<0.01),且3组间比较差异均无统计学意义。

表 3 各组大鼠肺组织NO、cGMP含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	NO(μmol/g)	cGMP(pmol/mg)
N组	6	0.40±0.08	0.15±0.04
H组	6	0.18±0.08 ^{bc}	0.13±0.03 ^c
H-LacZ组	6	0.12±0.06 ^{bc}	0.18±0.06 ^c
H-eNOS组	6	1.02±0.16 ^b	0.60±0.11 ^b

注:与N组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与H-eNOS组比较,^c $P<0.01$

3 讨论

本研究中,H组大鼠肺组织NO含量较N组明显降低、MPAP明显升高,并伴有明显的肺血管结构重塑和右心室肥大,表明慢性低氧对肺组织NO/cGMP通路具有抑制作用,且NO生成不足可能是CHPH发病的重要环节。在体内,内源性NO在NOS的催化下,由L-精氨酸转化生成,并通过第二信使cGMP发挥作用。eNOS是肺血管内皮细胞合成NO最主要的限速酶,凡影响其活性变化及基因转录、翻译的因素均可影响NO的形成^[5-6]。因此,eNOS表达和NO产量常呈正相关。然而本研究中,H组大鼠肺组织eNOS表达明显高于N组,而NO明显低于N组,表明慢性低氧虽可使肺组织eNOS表达上调,但其存在功能障碍。究其原因可能为:①低氧引起的肺血管收缩增加了肺血管的跨比压和剪切力,刺激eNOS表达;②低氧使肺血管eNOS蛋白原位失活、磷酸化受损^[7];③低氧上调了肺内内源性eNOS抑制剂非对称性二甲基精氨酸(ADMA)水平^[8],下调二甲精氨酸二甲氨基水解酶(灭活ADMA的酶)水平。本研究还发现,尽管H组NO明显低于N组,但两组cGMP差异并无统计学意义。这可能因为CHPH过程中肺组织利钠肽上调^[9],而利钠肽是体内cGMP生成的另一途径。

以上提示:CHPH的发病可能与eNOS功能障碍导致的内源性NO生成不足有关,低氧大鼠肺组织cGMP含量虽与正常大鼠无明显区别,但不足以阻止PH发病。因此,我们经气道转入含eNOS基因的重组腺病毒,以恢复eNOS功能、增加NO/cGMP含量,阻止了大鼠发生CHPH。结果显示,与H组、H-LacZ组比较,H-eNOS组肺组织eNOS蛋白、NO和cGMP含量明显增高,MPAP、肺小血管肌化程度及右心室肥厚指数明显降低,而MSAP和HR无显著差异,表明单次吸入AdCMVceNOS后,eNOS转基因表达产生了选择性肺血管扩张作用,并足以减轻低氧引起的大鼠PH和肺血管重塑。在我们前期研究中,经气道转入重组腺病毒可使转基因表达广泛分布于支气管上皮细胞、肺泡细胞及肺内大、中、小血管内皮细胞^[10],因此推测,H-eNOS组大鼠肺阻力血管eNOS转基因表达显著增强了eNOS活性,并通过NO/cGMP途径产生了血管舒张作用。此外,肺泡上皮eNOS转基因表达亦可使肺泡间隙内生成的NO弥散至毛细血管前阻力血管,产生肺血管舒张作用。由于经气道基因转移,转基因表达仅局限于肺内^[10],因此对大鼠MSAP和HR不产生影

响,从而实现选择性肺血管舒张作用。

低氧性肺血管重塑和右心室肥厚是 CHPH 最主要的病理特点,亦是治疗 PH 的关键。研究表明,慢性肺血管收缩在其病理过程中起重要作用^[11-12]。因此,H-eNOS 组 MPAP 下降可能参与减轻了该病理过程;血管平滑肌细胞内 cGMP 水平的升高亦可通过抗肌化作用直接减轻肺血管重塑。

本研究中,治疗措施是在 PH 出现前施加的,这很难使结果推及进展期患者。然而,这对轻度 PH 患者进行早期干预提供了依据。

参考文献

- [1] Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol*, 2005, 98(1): 390-403.
- [2] 熊利泽,刘建平,曾祥龙,等.吸入小剂量一氧化氮降低先天性心脏病肺动脉高压的初步研究. *中国危重病急救医学*, 1997, 9(4): 206-208.
- [3] Lee AJ, Chiao TB, Tsang MP. Sildenafil for pulmonary hypertension. *Ann Pharmacother*, 2005, 39(5): 869-884.
- [4] 章新华,陈磊,王怀良,等.大鼠肺动脉压检测方法学研究. *中国医科大学学报*, 2004, 33(5): 388-389.
- [5] 高剑峰,吴磊,刘柯,等.补阳还五汤对老龄大鼠脑缺血/再灌注核转录因子- κ B 和一氧化氮合酶的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(5): 296-299.
- [6] Michelakis ED. The role of the NO axis and its therapeutic implications in pulmonary arterial hypertension. *Heart Fail Rev*, 2003, 8(1): 5-21.
- [7] Murata T, Sato K, Hori M, et al. Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 44085-44092.
- [8] Millatt LJ, Whitley GS, Li D, et al. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 2003, 108(12): 1493-1498.
- [9] Chen YF. Atrial natriuretic peptide in hypoxia. *Peptides*, 2005, 26(6): 1068-1077.
- [10] 金强,陈卫民,张铁铮,等.重组腺病毒介导 LacZ 基因在大鼠肺脏的表达. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26(9): 856-859.
- [11] 张齐,李志超,罗颖,等. Rho 激酶在缺氧性肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(8): 452-455.
- [12] Chen YF, Oparil S. Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *Am J Med Sci*, 2000, 320(4): 223-232.

(收稿日期: 2009-03-11)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

内科临床适宜技术应用交流会暨第十四期全国内科主任诊疗技术高级研修班将举办

内科临床适宜技术应用交流会暨第十四期全国内科主任诊疗技术高级研修班由中国医师协会主办,中南大学湘雅医院心内科协办。订于 2009 年 5 月 9—17 日在湖南省长沙市举办,学习期满授予国家级 I 类继续教育学分 10 分。

内容:急性冠脉综合征的正确诊断和治疗;心绞痛的分类诊断与治疗;如何选用调脂药;心律失常的药物治理;慢性心力衰竭的主要进展概述;高血压药物治疗新趋势;肺动脉血栓栓塞症诊断与治疗的进展;呼吸衰竭诊治进展;支气管哮喘;糖尿病胰岛素治疗;糖尿病口服药治疗;短暂性脑缺血发作;综合医院对抑郁症的处理;急性缺血性脑血管病的规范化治疗;抗感染药物临床应用进展;反流性食管病新进展;风湿性疾病的诊治进展;类风湿关节炎等内容。

教师:拟邀请长沙中南大学湘雅医院心内科杨天伦主任、张赛丹教授、彭道泉教授,内分泌科雷闽湘主任,神经内科刘运海教授、谷文萍教授,消化科袁伟建教授、张桂英教授、唐丽安教授,急诊科邓跃林教授,呼吸科陈清兰教授、罗百灵教授,心理咨询中心杨放如教授;湖南省人民医院郑昭芬教授;北京阜外心血管病医院袁晋青教授;北京协和医院唐福林教授等。

学员要求:心内科、神经科、内科、老年科主任或具有主治医师以上职称者。报名地址:写清单位、姓名、职务、职称、电话后寄至北京市东城区东四西大街 46 号 中国医师协会事业发展部 曹雪 刘亚杰收,邮编:100711;信封上请注明“内科班”。电话:010-65286512,手机:13391703319,传真:010-87835179,Email:cmdapx@sina.com。可电话、短信、传真或邮件索取正式通知。

(中国医师协会)

第十三次全国复苏与中毒学术论文交流会征文通知

为了提高我国复苏与中毒救治水平,认真总结交流近几年来在这几方面基础与临床的经验和学术研究成果,经中华医学会批准,急诊医学分会第十三次全国复苏与中毒学术论文交流会定于 2009 年 6 月在湖北省武汉市召开,届时有我国复苏、中毒的专家作专题报告介绍这几方面的最新进展,并聘请相关学科的专家进行专题报告。参会者可获得国家级 I 类继续教育学分 8 分,为此现展开征文,内容如下。

征文内容:心肺复苏的基础和临床研究;各种中毒(CO、药物、农药、有害气体)的救治基础和临床研究;猝死、脑死亡、溺水、触电、中暑等理化急诊;多器官功能不全、心力衰竭、肝、肾、呼吸衰竭救治;急诊的新技术、新业务及新经验交流;内、外、妇、儿、皮肤及五官急性疾病的诊断处理及救治原则;人工气道、呼吸机的应用;危重病各种监测技术和经验交流;急危重病救治的新技术、新药物及新方法;复苏与中毒中的组织管理及救治体会;复苏、中毒、院前急救、现场救治及转运;急危重病救治护理经验介绍。

征文要求:文章请用稿纸书写或打印,加盖单位公章或介绍信,来稿一律不退请自留底稿;文章全文 3 000 字以内,并附 300~500 字摘要,同时附电子版。稿件截止日期为 2009 年 5 月 1 日,以邮戳为准。

稿件邮寄地址:北京市朝阳区工人体育场南路 8 号 北京朝阳医院急诊科 邵非收,邮编:100020;电话:13601332960, Email:yining2000@sina.com。稿件经审稿会审查录用后将于 2009 年 5 月 31 日前发出参会通知。

(中华医学会急诊医学分会)