

N-乙酰半胱氨酸对急性肺损伤大鼠肺组织 转化生长因子- β 1 表达影响的研究

胡杰¹, 陆元兰¹, 曾慧¹, 苏德¹, 刘崇梅², 陈森¹

(1. 遵义医学院附属医院, 贵州 遵义 563003; 2. 湖南省岳阳市第二人民医院, 湖南 岳阳 414000)

【摘要】 目的 观察 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对急性肺损伤(ALI)肺组织转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达的影响。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、ALI 模型组、地塞米松干预组和 NAC 干预组 4 组, 每组 6 只。经尾静脉注射内毒素脂多糖(LPS, 5 mg/kg)制备大鼠 ALI 模型, 在肺损伤模型成功后 24 h 处死大鼠, 取左叶肺组织, 观察各组大鼠肺组织病理和 TGF- β 1 免疫组化染色结果。结果 NAC 干预组肺部炎性细胞浸润、渗出、出血较 ALI 模型组明显减轻; ALI 模型组肺组织 TGF- β 1 免疫组化染色灰度值较正常对照组明显减少(155.42 ± 3.58 比 190.81 ± 6.28 , $P < 0.01$), 表示其表达明显增加; NAC 干预组及地塞米松干预组肺组织 TGF- β 1 免疫组化染色的灰度值明显高于 ALI 模型组(187.30 ± 20.92 和 193.99 ± 17.80 比 155.42 ± 3.58 , P 均 < 0.01), 表示其表达明显降低; 且 NAC 干预组、地塞米松干预组与正常对照组间表达水平比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。结论 NAC 在 ALI 的早期可抑制肺组织 TGF- β 1 的表达, 肺组织病理亦显示肺部病变明显改善, 从而达到对 ALI 的保护作用。

【关键词】 N-乙酰半胱氨酸; 肺损伤, 急性; 转化生长因子- β 1; 干预

中图分类号: R256.1; R965 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)01-0051-04

A study of effect of N-Acetylcysteine on expression of lung tissue transforming growth factor- β 1 in rats with acute lung injury HU Jie¹, LU Yuan-lan¹, ZENG Hui¹, SU De¹, LIU Chong-mei², CHEN Miao¹. 1. Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China; 2. The Second People's Hospital of Yueyang, Yueyang 414000, Hunan, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of N-acetylcysteine (NAC) on the expression of lung tissue transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in rats with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). Methods Twenty-four SD rats were randomly divided into four groups: normal control group, ALI model group (ALI group), dexamethasone pretreatment group and NAC pretreatment group, 6 rats being in each group. The model of ALI in rats was reproduced by intravenous injection of LPS in the dose of 5 mg/kg. Twenty-four hours after the model was established, the rats were killed. The lung tissue in the left lobe was adopted for the pathological examination and TGF- β 1 immunohistochemical staining. Results The gray scale value of TGF- β 1 in ALI group was decreased markedly compared with that in the normal control group (155.42 ± 3.58 vs. 190.81 ± 6.28 , $P < 0.01$), it suggested that the expression of TGF- β 1 was significantly increased. Compared with the ALI group, the lung pathological manifestations (phlegmatic cell infiltration, exudation, hemorrhage) were ameliorated in NAC group, and the gray scale value of TGF- β 1 in the lung was increased significantly in NAC and dexamethasone pretreatment groups (187.30 ± 20.92 and 193.99 ± 17.80 vs. 155.42 ± 3.58 , both $P < 0.01$), the result suggested that the expression of TGF- β 1 was significantly decreased, and no significant difference was found among NAC and dexamethasone pretreatment groups and normal control group (all $P > 0.05$). Conclusion NAC can inhibit the expression of lung tissue TGF- β 1 in the early phase of ALI, and the lung pathological manifestations also display obvious pathological improvement, therefore NAC has protective effect at the early phase of ALI.

【Key words】 N-acetylcysteine; acute lung injury; lung tissue transforming growth factor- β 1; pretreatment

急性肺损伤(ALI)的显著特征是大量富含蛋白的渗出液流入到肺泡腔,严重影响肺的换气功能,导

作者简介: 胡杰(1979-),男(汉族),湖北省人,医学硕士,住院医师,Email: stevenhujie@163.com。

致低氧血症、呼吸衰竭,病死率高达 30%~40%^[1]。目前认为,以炎性细胞因子大量释放为特征的过度全身炎症反应是 ALI 的主要发病基础,并伴有纤维组织增生^[2]。根据其病态重构的原理,治疗可分为

3步:①阻止由前炎症因子引起的活跃炎症反应;②避免上皮细胞凋亡刺激组织正常修复;③消灭慢性纤维化的刺激因子^[3]。在ALI早期如何阻止由前炎症因子引起的活跃炎症反应是临床工作者们十分关心的问题。N-乙酰半胱氨酸(NAC)是一种抗氧化剂,本研究拟从NAC对ALI后肺组织转化生长因子-β1(TGF-β1)表达的影响方面来探讨NAC对ALI的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料:冻干精制大肠杆菌内毒素脂多糖(LPS,O55:B5)购自美国Sigma公司,TGF-β1免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,NAC(A7250)购自美国Sigma公司,地塞米松购自贵州光正制药有限责任公司。

1.2 动物模型制备与分组:健康SD大鼠24只,购自第三军医大学实验动物中心,体重180~250g。将大鼠按随机数字表法分为正常对照组、ALI模型组、NAC干预组和地塞米松干预组4组,每组6只。从大鼠尾静脉注射LPS(5mg/kg)建立ALI模型。NAC干预组和地塞米松干预组于尾静脉注射LPS前1h分别经腹腔注射NAC(200mg/kg)或地塞米松(70mg/kg);正常对照组于尾静脉注入等量生理盐水。

1.3 肺组织标本的提取及病理学观察:在ALI模型制备成功后24h处死大鼠,立即取其左叶肺组织,用体积分数为10%的甲醛固定,石蜡包埋,切成4μm厚的切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织形态学改变。

1.4 肺组织中TGF-β1检测:按链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)试剂盒说明书要求对左叶肺组织标本进行ABC染色,每张切片在统一放大倍数下(10×40)随机选取5个视野,然后用Qwin细胞图像分析系统(Leica公司,德国)测定各组切片每个高倍镜视野下的平均灰度值,灰度值越大,表明染色强度越小,TGF-β1表达量越少。

1.5 统计学分析:数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所得数据用SPSS 12.0软件进行统计学处理。组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织病理学改变(彩色插页图1):光镜下,正常对照组肺组织结构完整,肺泡隔无水肿、炎症,肺泡腔清晰;ALI模型组肺泡隔增宽,部分肺泡内见出血,肺间质见多量炎性细胞浸润;NAC干预组与地塞米松干预组肺部炎性细胞浸润、渗出、出血

较ALI模型组明显减轻。

2.2 大鼠肺组织TGF-β1免疫组化染色结果:免疫组化检测显示肺组织TGF-β1阳性染色为棕黄色。彩色插页图2显示,正常对照组见胞质内有阳性着色,胞核着色较少;ALI模型组胞核明显阳性着色,胞质亦见阳性着色;NAC干预组与地塞米松干预组胞核及胞质着色较ALI模型组明显降低,较正常对照组略高。表1结果显示,ALI模型组TGF-β1染色灰度值较正常对照组明显减小($P < 0.01$),表示ALI模型组较正常对照组TGF-β1表达明显增加;NAC干预组与地塞米松干预组较ALI模型组染色灰度值明显增加,说明表达降低(P 均 < 0.01),而NAC干预组、地塞米松干预组及正常对照组间比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

表1 各组大鼠肺组织TGF-β1表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	肺组织TGF-β1表达(灰度值)
正常对照组	6	190.81 ± 6.28
ALI模型组	6	155.42 ± 3.58 ^a
地塞米松干预组	6	193.99 ± 17.80 ^b
NAC干预组	6	187.30 ± 20.92 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与ALI模型组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

NAC是左旋精氨酸的天然衍生物,分子式为C₅H₉NO₃S,是一种含活性巯基化合物。近年国内外大量实验研究结果已经证明,NAC具有强大的抗氧化和细胞保护作用。NAC可通过两种机制发挥其抗氧化功能:通过发挥还原型谷胱甘肽(GSH)前体即半胱氨酸的功能间接起到抗氧化作用,这是NAC发挥抗氧化作用的主要机制^[4];同时,NAC还可以通过提高白细胞内还原巯基水平,抑制白细胞激活和炎症介质的产生,保护抗蛋白酶免于被氧化失活^[5]。NAC本身也是一种直接的抗氧化物质,通过自身巯基的氧化来还原生物大分子中的二硫键,从而保护生物大分子的活性,NAC还可以通过补充细胞内的GSH发挥细胞保护作用。

Marui等^[6]研究发现,NAC可以抑制活性氧所引起的中性粒细胞与血管内皮细胞上某些黏附分子,如血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的过度表达,减少中性粒细胞在肺脏的浸润,抑制其对肺损伤的作用。NAC还可以抑制内毒素诱导的核转录因子-κB(NF-κB)的激活,Paterson等^[7]研究发现,NAC可以减少脓毒症患者NF-κB的激活,降低白细胞介素-8(IL-8)水平,从而

钝化患者对脓毒症的炎症反应。莫红缨等^[8]发现, NAC 能以一种剂量依赖方式抑制由肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在体外刺激激活的人气道上皮细胞的 NF- κ B 表达和下调 IL-8 分泌水平。

TGF- β 是一大类多功能调节细胞生长、分化的细胞因子, TGF- β 1 是 TGF- β 家族的一员。研究表明, TGF- β 1 可增强对组织损伤的效应, 在肺部损伤的早期, TGF- β 1 能减少血管内皮细胞内 GSH 含量而增加其渗透性, 导致大量的红细胞和炎性细胞进入肺泡腔, 释放大炎症介质, 导致肺泡炎并破坏肺泡结构^[9]。de Boer 等^[10]发现 TGF- β 1 具有炎细胞趋化性, 可引起肺内炎细胞聚集, 而聚集的炎性细胞又能释放 TGF- β 1, 形成放大效应。已明确细胞因子 TGF- β 1 有促炎症反应作用, 是成纤维细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的强化学引诱物, 且可刺激 TNF- α 、IL-1 β 和血小板源性生长因子(PDGF)的表达, 也能刺激 ICAM 的表达, 导致大量炎性细胞流向炎症部位^[11]。

NAC 通过下调 IL-1 β 和 ICAM-1 的表达、清除氧自由基、改善钙超载等机制可发挥对心肌细胞缺氧/复氧性损伤的保护作用^[12]。NAC 对肺损伤的治疗作用与提高肺组织超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性或防止其活性下降有关^[13]。周长福等^[14]研究表明, 肺间质纤维化时大鼠肺组织 TGF- β 1 阳性表达不断增加, 表明 TGF- β 1 对上皮细胞生长活性有抑制作用, 具有促进慢性炎症纤维化过程的作用。目前国内外均未见 NAC 对肺组织 TGF- β 1 表达影响的报道, 故本实验从大鼠肺组织病理、肺组织 TGF- β 1 表达方面比较了 NAC 和地塞米松对大鼠 ALI 的防治效果。结果显示, NAC 和地塞米松均能抑制 TGF- β 1 的表达, 肺组织病理学观察亦显示肺部病变明显改善, 且 NAC 和地塞米松的作用效果未见明显差别。说明 NAC 在 ALI 的早期可抑制 TGF- β 1 的表达, 从而达到对 ALI 的保护作用。地塞米松虽然也可有效抑制 TGF- β 1 表达, 但地塞米松在治疗 ALI 时不良反应太大。因此, NAC 为临床上治疗 ALI 提供了更有效的方法, 并为预防肺功能衰竭提供新的途径, 也为 ALI 的保护开拓了广阔的前景。

参考文献

- [1] Ware L B, Matthay M A. The acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2000, 342(18):1334-1349.
- [2] 李燕芹, 吕寒冰, 方马荣, 等. 急性肺损伤时肺部纤维化及血管生成状态的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(11):677-678.
- [3] 余维巍, 刘晓晴. 肝细胞生长因子在急性肺损伤中的修复作用[J]. 中国急救医学, 2005, 25(6):444-445.
- [4] Ortolani O, Conti A, De Gaudio A R, et al. Protective effects of N-acetylcysteine and rutin on the lipid peroxidation of the lung epithelium during the adult respiratory distress syndrome[J]. Shock, 2000, 13(1):14-18.
- [5] Leme A S, Lichtenstein A, Arantes-Costa F M, et al. Acute lung injury in experimental pancreatitis in rats: pulmonary protective effects of crotafopin and N-acetylcysteine [J]. Shock, 2002, 18(5):428-433.
- [6] Marui N, Offemann M K, Swerlick R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells [J]. J Clin Invest, 1993, 92(4):1886-1874.
- [7] Paterson R L, Galley H F, Webster N R, et al. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappaB activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis [J]. Am J Crit Care Med, 2003, 31(11):2574-2578.
- [8] 莫红缨, 钟南山, 郑劲平, 等. NF- κ B 在气道上皮细胞的激活及 N-乙酰半胱氨酸的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2000, 5(3):193-196.
- [9] Pittet J F, Griffiths M J, Geiser T, et al. TGF- β is a critical mediator of acute lung injury[J]. J Clin Invest, 2001, 107(12):1537-1544.
- [10] de Boer W I, van schadewijk A, Sont J K, et al. Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(6):1951-1957.
- [11] Dhainaut J F, Charpentier J, Chiche J D. Transforming growth factor-beta: a mediator of cell regulation in acute respiratory distress syndrome [J]. Crit Care Med, 2003, 31(4 Suppl):S258-264.
- [12] 司良毅, 陈运贞. N-乙酰半胱氨酸对培养心肌细胞缺氧/复氧性损伤的干预研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(10):602-605.
- [13] 刘松, 俞森洋. N-乙酰半胱氨酸对偏二甲肼和四氧化二氮吸入性肺损伤的保护作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(10):611-614.
- [14] 周长福, 李志军, 刘红栓. 血必净联合前列腺素 E₁ 对肺纤维化大鼠转化生长因子- β 1 的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3):186.

(收稿日期:2007-08-28 修回日期:2007-11-11)

(本文编辑:李银平)

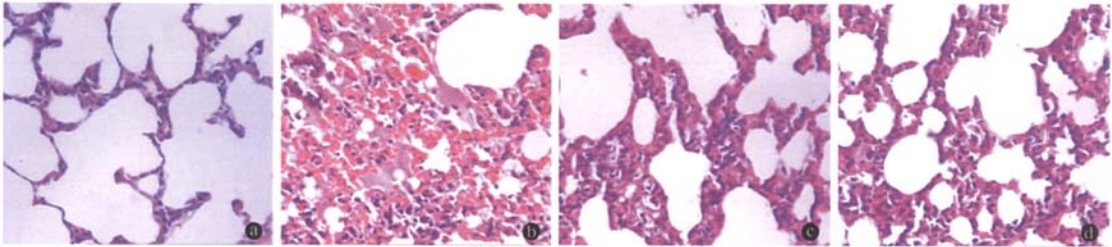
欢迎订阅《中国危重病急救医学》杂志

中华医学会和天津市天和医院主办, 全国各地邮局订阅, 邮发代号:6-58

刊社地址:天津市和平区睦南道 122 号天和医院内 邮编:300050

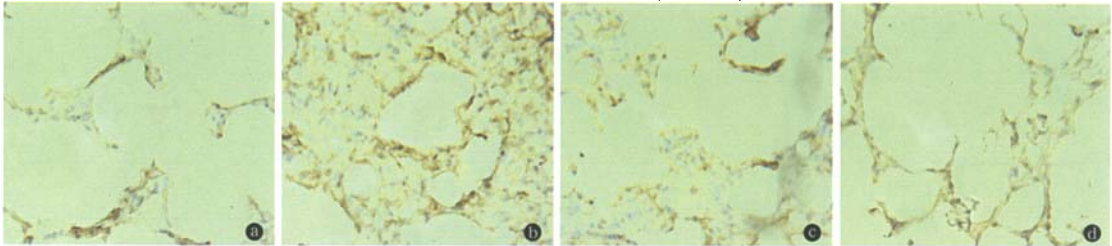
N-乙酰半胱氨酸对急性肺损伤大鼠肺组织 转化生长因子-β1表达的研究

(正文见51页)



①:正常对照组;②:ALI模型组;③:地塞米松干预组;④:NAC干预组

图1 各组大鼠肺组织病理学改变(HE,×400)



①:正常对照组;②:ALI模型组;③:地塞米松干预组;④:NAC干预组

图2 各组大鼠肺组织TGF-β1表达的变化(免疫组化,×400)

葛根素对创伤性休克家兔肾功能及超微结构的影响

(正文见54页)

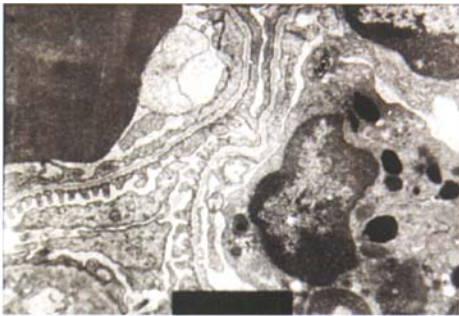


图1 复苏组家兔肾小球毛细血管内皮细胞胀,突向管腔,足细胞肿胀,局灶性足突融合(×12 000)

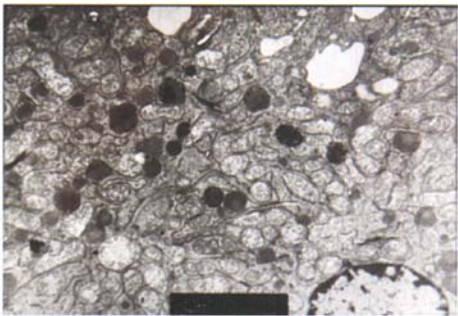


图2 复苏组家兔肾小管上皮细胞线粒体肿胀,内质网扩张,溶解体增多(×7 000)



图3 治疗组家兔肾小球毛细血管内皮细胞无明显肿胀,内皮细胞无管腔内突起,足细胞正常,足突清晰无融合(×7 000)

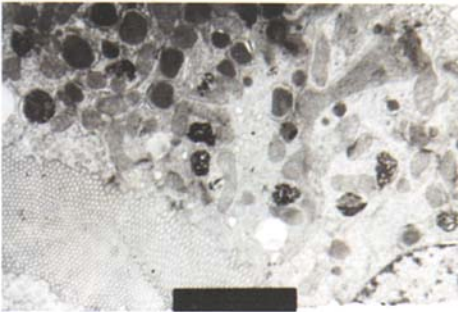


图4 治疗组家兔肾小管上皮细胞和线粒体无明显肿胀,无内质网扩张(×10 000)