

热应激预处理对创伤性休克大鼠早期肺组织中 NO、iNOS 的表达与肺损伤的影响

汪海涛 凌 敏

摘要 目的 研究热应激预处理对创伤性休克早期大鼠肺组织一氧化氮(NO)浓度、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA表达量与肺组织病理改变的影响。方法 98只SPF级雄性SD大鼠随机分为热应激未处理组和热应激处理组,每组又分别设对照组、休克后0h组、0.5h组、1.0h组、1.5h组、2.0h组、3.0h组7个亚组,每组7只。热应激预处理后建立创伤性休克模型,留取肺组织,观察肺组织病理学和检测肺组织NO浓度、iNOS mRNA表达量的变化。结果 病理观察可见热应激处理组各时间点肺病理损伤较热应激未处理组病理损伤轻,肺组织病理学评分较低;NO浓度热应激处理组均低于同时间点热应激未处理组,休克后0h时均有升高,热应激处理组峰值较未处理组出现晚;iNOS mRNA表达量热应激处理组均低于同时间点热应激未处理组,热应激处理组2.0h时峰值出现,热应激未处理组则在1.5h时出现,与肺损伤病理学评分呈正相关。结论 热应激预处理能明显降低创伤性休克大鼠早期肺组织中NO、iNOS的表达,推迟和减轻创伤性休克早期大鼠肺损伤。

关键词 热应激;创伤性休克;肺脏;损伤

中图分类号 R 641

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1246-04

热应激是指机体在高环境温度中做出的一系列非特异性全身应答反应。该实验主要是经高温预处理后建立创伤性休克模型,探讨热应激预处理对创伤性休克大鼠早期肺组织中一氧化氮(NO)、一氧化氮诱导合酶(iNOS)的表达及对肺损伤的影响,并对其变化规律进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康SPF级SD雄性大鼠98只,体重280~320g,由新疆医科大学实验动物中心提供。大鼠随机分成两组:热应激预处理组和热应激未处理组,每组又分别设对照组、休克后0h

组、0.5h组、1.0h组、1.5h组、2.0h组、3.0h组7个亚组,每组7只。

1.2 主要实验器材及实验环境 BL-420F生物机能监测系统、BI-2000电子计算机图像分析仪(成都泰盟公司);酶标仪、荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);CS101-2D型电热鼓风干燥箱(重庆四达实验仪器厂);NO测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);TRIzol总RNA提取试剂(北京康为世纪生物科技有限公司);反转录试剂盒和荧光定量Mix(美国Invitrogen公司);iNOS上游引物(由上海生物工程有限公司合成):5'-GAAAGCGGTGTTCTTTGCT-TCT-3',下游:5'-CTTATCTGTTCCATGCAGACAAC-CT-3'; β -actin上游引物:5'-AACCCTGAAAAGAT-GACCCAGAT-3',下游:5'-GTGGACAGTGAGGCCAG-GAT-3'。热应激实验环境将大鼠置于铁笼中,然后放入电热鼓风干燥箱中进行。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制作 实验前大鼠常规禁食、水6h,热应激处理组大鼠置于铁笼中放入电热鼓风干燥箱内使大鼠的肛温缓慢达到42℃并维持15min,然后参照孙英刚等^[1]建立的创伤失血性休克模型,采用3%戊巴比妥腹腔麻醉,使用静脉留置针行右颈动、静脉和右股动脉插管,右颈动脉插管接BL-420F生物机能监测系统,用于测量血压等血流动力学指标;颈静脉插管建立简易补液通道;右股动脉插管以备放血。大鼠稳定10min后,利用2500g铁轮于30cm高度击中大鼠左下肢股骨中上段造成粉碎性骨折,致伤后简易包扎伤口;经右股动脉放血使平均动脉压(mean arterial pressure,MAP)维持在(4.67±0.67)kPa,若经打击后血压不能维持则通过右颈静脉补液通道输注生理盐水以维持MAP。大鼠行动静脉插管及创伤打击模型完成时间控制在15~20min,并以大鼠MAP达到(4.67±0.67)kPa,为休克0h时间点。热应激未处理组除不进行热应激处理外,其方法同热应激处理组,热应激未处理组和处理组中对照组除不致伤外其余步骤同各实验组。

1.3.2 肺组织取样 按休克后0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0h6个时间点处理各组实验大鼠,达到休克

2013-11-01 接收

基金项目:中华医学会慢性呼吸道疾病专项基金(2007年)(编号:07010160024)

作者单位:新疆维吾尔自治区人民医院呼吸二科,乌鲁木齐 830000

作者简介:汪海涛,男,主治医师;

凌 敏,女,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:ling-min990@126.com

维持时间点后,快速切取肺脏组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜观察组织病理变化,其余肺组织置于 -80°C 冻存,热应激未处理组和处理组中对照组在插管完成后即进行肺组织取样。

1.4 观测指标及方法

1.4.1 肺组织 NO 测量 称取 0.1 g 肺组织,在 4°C 生理盐水中漂洗、拭干,于玻璃匀浆管中手工匀浆,用 1 ml 生理盐水冲洗转移至 1.5 ml EP 管内制备成 10% 组织匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液,测定吸光度(optical density, OD)值,根据公式计算各样本浓度。

1.4.2 肺组织 iNOS mRNA 表达量 按照厂家提供的说明书方法,提取肺组织总 RNA 并测量浓度,计算 20 μl 反转录体系所需体积,然后进行反转录得到 cDNA,最后以反转录出来的 cDNA 为模板配成 20 μl 体系,在 Bio-Rad 实时荧光定量仪器上设定扩增参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s,75 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s,共 41 个循环;最后于 75 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,得出 iNOS 和内参 β -actin 的 Ct 值。

1.4.3 病理学变化及肺损伤病理学评分 根据 Pirrat et al^[2] 标准做肺损伤评分,光镜下观察各肺组织水肿、出血、炎性细胞浸润和小气道损伤等各项病理改变,各按程度分为 5 个等级:0 分为无该项病理改变或极轻;1 分为病理变化轻且很局限;2 分为病理变化中等;3 分为病变中等但广泛或局部显著;4 分为非常显著的广泛性病理改变。每张切片随机取 10 个高倍($\times 400$)视野,每个视野病理评分为每项评分之和,10 个视野的平均值即为病理评分。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;两组间比较采用 SNK- q 检验,最后进行 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 肺组织 NO 浓度 热应激未处理组和处理组休克后各时间点肺组织 NO 浓度均高于对照组($P < 0.05$);热应激处理组在休克后肺组织 NO 浓度均低于同时间点未处理组($P < 0.05$);热应激处理组峰值(2.35 ± 0.31) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{prot})$ 出现在 3.0 h,小于未处理组最大值(3.53 ± 0.35) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{prot})$,及峰值晚于未处理组(峰值出现在 2 h);热应激未处理组和处理组中对照组浓度分别为(1.31 ± 0.34)、(0.97 ± 0.31) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{prot})$,休克后 0 h

时浓度分别为(2.29 ± 0.51)、(1.89 ± 0.42) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{prot})$,热应激未处理组和处理组在休克后 0 h 时肺组织 NO 浓度较对照组均有显著升高($P < 0.05$);热应激未处理组和处理组在休克后 0.5 h 时肺组织 NO 浓度分别为(2.19 ± 0.44)、(1.33 ± 0.25) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{prot})$ 较休克 0 h 组均有明显降低($P < 0.05$);未处理组 $F = 224.89$, $P = 0.000$;处理组 $F = 110.26$, $P = 0.000$ 。见图 1。

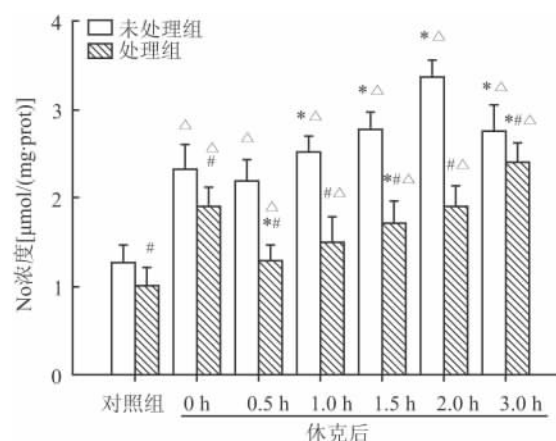


图1 两组肺组织 NO 浓度变化

与对照组比较: $\Delta P < 0.05$; 与同时间点未处理组比较: $\# P < 0.05$; 与前一时间点组比较: $* P < 0.05$

2.2 肺组织 iNOS mRNA 表达量 热应激未处理组和处理组在休克后各时间点均高于对照组($P < 0.05$);热应激处理组休克后均低于同时间点未处理组($P < 0.05$);热应激处理组峰值(2.77 ± 0.063) 出现在 2.0 h,晚于未处理组峰值(3.49 ± 0.050) (未处理组峰值出现在 1.5 h);未处理组休克后各时间点较前一时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而处理组休克后 0.5 h 组、1.5 h 组、2.0 h 组、3.0 h 组较前一时间点比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);未处理组 $F = 335.61$, $P = 0.000$,处理组 $F = 273.29$, $P = 0.000$ 。见图 2。

2.3 病理学变化及肺损伤病理学评分 显微镜下可以发现热应激未处理组肺泡间隔明显增宽,肺泡腔狭窄,支气管壁及部分肺泡间隔中可见大量炎症细胞渗出,肺泡壁血管明显充血、渗出性出血,支气管存在散在出血;热应激处理组各时间点病理变化较未处理组轻,见图 3。热应激未处理组与处理组肺损伤评分在休克后各时间点均高于对照组($P < 0.05$),热应激未处理组峰值(6.51 ± 0.27) 出现在 1.5 h 时,处理组峰值(5.40 ± 0.28) 在 2.0 h 时出

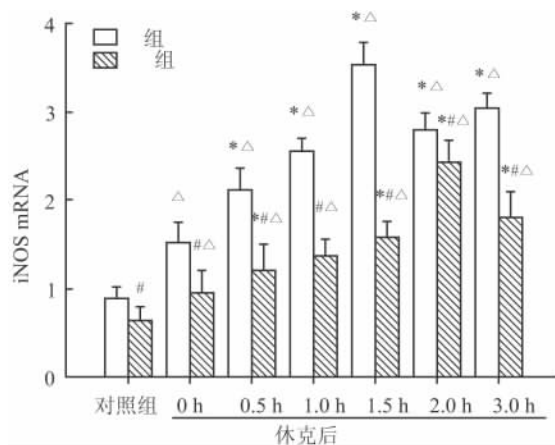
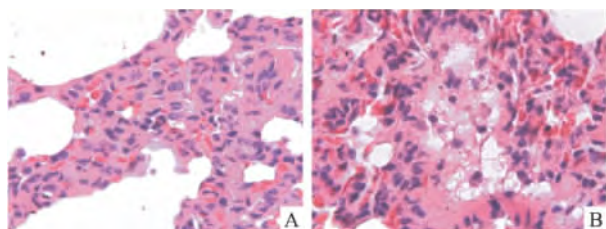


图2 两组肺组织 iNOS mRNA 浓度变化

与对照组比较: $\Delta P < 0.05$; 与同时时间点未处理组比较: $\# P < 0.05$; 与前一时间点组比较: $* P < 0.05$

现, 休克后各时间点比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表1。相关性分析显示 iNOS mRNA 表达量与肺损伤评分呈正相关 $R_{\text{未处理组}} = 0.875$ 、 $R_{\text{处理组}} = 0.894$ ($P < 0.05$), 与肺组织 NO 浓度也呈正相关, $R_{\text{未处理组}} = 0.675$ 、 $R_{\text{处理组}} = 0.482$ ($P < 0.05$)。

图3 两组肺组织切片 HE $\times 400$

A: 处理组休克后 1.5 h; B: 未处理组休克后 1.5 h

3 讨论

本实验研究结果显示热应激处理组肺病理损伤较未处理组轻, 热应激未处理组肺泡间隔明显增宽, 肺泡腔狭窄, 肺泡壁血管明显充血、渗出性出血, 支气管存在散在出血, 支气管壁及肺泡间隔中可见大量炎症细胞浸润; 热应激未处理组与处理组肺损伤评分比较存在差异, 热应激处理组休克后各时间点均低于未处理组, 热应激未处理组最大值出现在 1.5 h 时, 处理组最大值在 2.0 h 时出现。本实验结果显示创伤性休克大鼠致伤前给予热应激处理延缓

了肺病理损伤的发生时间和减轻了肺损伤的程度, 这可能是由于热应激预处理诱导了热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 表达增加有关。HSP 是一组非特异性细胞保护蛋白, 具有多种功能, 因应激诱导机体表达 HSP 增加了机体细胞耐受不利因素的作用, 减轻了不利因素对机体细胞的损伤^[3], 可见热应激预处理的保护作用是体现在多方面的, 包括减轻肺组织的充血、出血、水肿和炎细胞浸润。

NO 是机体内重要的信使分子和效应分子且具有多种生理功能, NO 产生过量通过氧化应激可促进急性肺损伤的进展^[4-5]。临床研究^[6-7]显示, 内源性 NO 产生过量损伤肺泡毛细血管屏障引起肺水肿, 炎症介质刺激引起的内毒素休克使肺组织 iNOS mRNA 过度表达, 敲除 iNOS 基因的小鼠表现出轻度急性肺损伤, 最近研究^[8]显示硫氢化钠可通过抑制 iNOS/NO 途径可对肢体爆炸创伤引起的肺损伤具有保护作用。本实验研究显示热应激未处理组与处理组肺组织 NO 浓度比较存在明显差异, 两组在休克后各时间点均高于对照组, 未处理组休克后均高于同时时间点处理组, 热应激处理组峰值出现在 3 h 晚于未处理组峰值, 未处理组峰值在 2 h 出现; 另外热应激未处理组与处理组肺组织 iNOS mRNA 表达量同时时间点比较存在差异, 且各时间点均高于对照组, 热应激未处理组均低于同时时间点处理组, 热应激处理组峰值出现在 2.0 h 晚于未处理组峰值 (常温组峰值出现在 1.5 h), 未处理组休克后各时间点较前一时间点比较差异有统计学意义, 而处理组休克后 0.5 h 组、1.5 h 组、2.0 h 组、3.0 h 组较前一时间点比较差异有统计学意义。由此可见, 热应激未处理组随着休克时间的延长, 可能是肠道内细菌转移, 导致内毒素休克进而激发 iNOS 表达量增加, NO 大量产生, 进而生成强毒性的氧自由基造成肺的广泛性损伤, 而热应激预处理组由于热应激作用使大鼠机体增加了对休克的耐受能力, 或者是热应激抑制了 iNOS/NO 途径, 从而与同时时间点的未处理组相比 iNOS 的表达明显降低。

另外, 肺组织 NO 浓度峰值出现较 iNOS 推迟, 而相关性分析显示 iNOS mRNA 表达量与肺损伤评分结果呈正相关。未处理组与处理组 NO 浓度在休

表1 大鼠肺损伤病理学评分 ($n=7 \bar{x} \pm s$)

组别	对照组	休克后 0 h	休克后 0.5 h	休克后 1.0 h	休克后 1.5 h	休克后 2.0 h	休克后 3.0 h	χ^2 值	P 值
热应激未处理	1.34 $\pm$ 0.32	4.21 $\pm$ 0.24 Δ	4.75 $\pm$ 0.33 Δ^*	5.43 $\pm$ 0.30 Δ^*	6.51 $\pm$ 0.27 Δ^*	5.38 $\pm$ 0.27 Δ	4.80 $\pm$ 0.21 Δ^*	25.75	0.000
热应激处理	0.62 $\pm$ 0.34 $\#$	3.54 $\pm$ 0.35 $\Delta^\#$	3.77 $\pm$ 0.38 $\Delta^\#$	4.50 $\pm$ 0.36 $\Delta^\#$	4.19 $\pm$ 0.46 $\Delta^\#$	5.40 $\pm$ 0.28 $\Delta^\#$	4.35 $\pm$ 0.34 $\Delta^\#$	26.48	0.000

与对照组比较: $\Delta P < 0.05$; 与同时时间点未处理组比较: $\# P < 0.05$; 与前一时间点组比较: $* P < 0.05$

克后 0 h 时均有显著升高,应考虑是在建立创伤性休克模型过程中,由于有效循环血量锐减、剧烈疼痛等多种因素致使大鼠为维持正常生理状态产生过多 NO 所引起;热应激未处理组与处理组 NO 浓度在休克后 0.5 h 时均有显著降低,以往研究^[9]显示,在应激和一些疾病条件下,NO 的合成明显升高,似乎与以往的研究结果矛盾,但多为 NO 在应激、创伤或疾病几天后的变化,最早也是在 4~6 h。休克后 NO 浓度下降的原因可能是由于热应激或者创伤休克时,由于机体大量出汗或血容量的减少造成 NO 丢失^[10];热应激使机体产生大量的 HSP,HSP 可以在转录水平上抑制 iNOS 的表达,而细胞因子对 NO 合成的促进作用恰是通过高水平的 iNOS mRNA 来实现的,因此在应激早期,HSP 对 NO 生成起到了一种抑制作用,而且处理组较未处理组降低的更明显,表明热应激预处理诱导机体合成了更多的 HSP。

参考文献

- [1] 孙英刚,黄宗海,冯浩森等.创伤性休克大鼠模型建立[J].解放军医学杂志,2002,27(12):1086-7.
- [2] Pirat A,Zeyneloglu P,Aldemir D,et al. Pretreatment with simvastatin reduces lung injury related to intestinal ischemia-reperfusion in rats[J]. *Anesth Analg* 2006,102(1):225-32.
- [3] Riordan M,Sreedharan R,Wang S,et al. HSP70 binding modulates detachment of Na-K-ATPase following energy deprivation in renal epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005,288(6):F1236-42.
- [4] Yang Y L,Huang K L,Liou H L,et al. The involvement of nitric oxide,nitric oxide synthase,neutrophil elastase,myeloperoxidase and proinflammatory cytokines in the acute lung injury caused by phorbol myristate acetate[J]. *J Biomed Sci* 2008,15(4):499-507.
- [5] Su C F,Yang F L,Chen H I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007,34(4):339-46.
- [6] Mehta S. The effects of nitric oxide in acute lung injury[J]. *Vascular Pharmacol* 2005,43(6):390-403.
- [7] Peng X,Abdulnour R E,Sammani S,et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2005,172(4):470-9.
- [8] Ning J,Mo L,Zhao H,et al. Sodium Hydrosulphide alleviates remote lung injury following limb traumatic injury in rats[J]. *PLoS One* 2013,8(3):e59100.
- [9] Faletti A G,Mastronardi C A,Lomniczi A. Beta-Endorphin blocks luteinizing hormone releasing hormone release by inhibiting the nitric oxide pathway controlling its release[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,96(4):1722-6.
- [10] Rodeberg D A,Chaet M S,Bass R C,et al. Nitric oxide:a review[J]. *Am J Surg* 1995,170(3):292-303.

Changes of NO and iNOS expression in lung tissues and injury of lungs in traumatic shock rats of early stage preconditioned with heat stress

Wang Haitao,Ling Min

(Dept of Respiratory Medicine,People's Hospital of Xinjiang,Urumuqi 830000)

Abstract Objective To research nitric oxide(NO) concentration,induced nitric oxide synthase(iNOS) mRNA expression and the pathological changes of lung tissue in traumatic shock rats of early stage preconditioned with heat stress. **Methods** A total of 98 male SD rats were equally divided randomly into heat stress untreated group and heat stress treatment group,and each group were equally divided into 7 subgroup: control group and shock 0 h group,0.5 h group,1.0 h group,1.5 h group,2.0 h group,3 h group. To established the model of traumatic shock after heat stress pretreatment and remained lung tissue,observed the changes of pulmonary pathology,measured the changes of the NO concentration and iNOS expression in lung tissues. **Results** The lesions of lung tissue structure were more lighter in heat stress treatment group than the corresponding time point of heat stress untreated group and lung histopathology score lower. The NO concentration of heat stress treatment group were lower than the corresponding time point of heat stress untreated group,the two groups have a rise at shock 0 h,the peak value of NO concentration in heat stress treatment group appeared later than the heat stress untreated group. iNOS mRNA expression quantity of heat stress treatment group were lower than the corresponding time point of heat stress untreated group,the peak value of heat stress untreated group in 2.0 h and heat stress treatment group in 1.5 h,it was positively correlated with lung injury score. **Conclusion** Heat stress pretreatment can drop NO concentration and iNOS mRNA expression in lung tissues significantly,delayed and reduced the lung injury in traumatic shock rats of early stage.

Key words heat stress; traumatic shock; lungs; injury