

兔放射性肺纤维化形成过程中一氧化氮含量变化及诱导型一氧化氮合成酶的表达

党军¹,周朝晖²,缪宏宇³

(1. 中国医科大学附属第一医院放疗科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳市铁西区中心医院; 3. 沈阳市铁西区卫工社区卫生服务中心)

[摘要] 目的: 观察兔放射性肺纤维化形成过程中一氧化氮(NO)含量变化及诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的表达。方法: 实验兔20只,采用6 mV X线对左全肺进行照射,25 Gy,1次。分别于照射前、照射后1,3,6个月各处死5只动物,处死前进行左肺肺泡灌洗。采用铜-镉还原法检测灌洗液中的NO含量,免疫组化法检测肺组织中iNOS的表达。结果: NO含量在照射后1个月明显升高,照射后3~6个月显著降低;在照射前及照射后3~6个月,肺间质细胞内几乎未见iNOS阳性表达;在照射后1个月,肺间质中iNOS表达阳性细胞明显增多。结论: NO可能是放射性肺纤维化形成过程中的一个独立影响因素,其含量的变化可能与iNOS蛋白活性改变有关。

[关键词] 一氧化氮;诱导型一氧化氮合成酶;放射性肺纤维化

[中图分类号] R818.74 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)02-0148-02

Dynamic change of nitric oxide content and expression of inducible nitric oxide synthase during radiation-induced pulmonary fibrosis in rabbits

DANG Jun¹,ZHOU Zhao-hui²,MIAO Hong-yu³

(1. Department of Radiation Oncology, The First affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Central Hospital of Tiexi District, Shenyang; 3. Community Health Service Center of Tiexi District, Shenyang)

[Abstract] Objective: To observe the dynamic change of nitric oxide (NO) content and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) during radiation-induced pulmonary fibrosis in rabbits. Methods: The left lungs of 20 rabbits were irradiated with 6 MV X-rays, with the radiation dose of 25 Gy. The rabbits were killed before and 1, 3, and 6 months after the radiation, respectively. Alveolar lavage of the left lung was performed before the rabbits were killed, and the content of NO in the alveolar lavage fluid was measured by cadmium-copper reduction. The expression of iNOS in the lung was detected by immunohistochemical method. Results: The content of NO significantly increased 1 month after the radiation and significantly decreased from 3 to 6 months after the radiation. The number of pulmonary interstitial cells positive for iNOS increased remarkably 1 month after the radiation, but no expression of iNOS was found in the pulmonary interstitial cells before and 3 and 6 months after the radiation. Conclusion: NO may be an independent factor in the process of radiation-induced pulmonary fibrosis, and the change of NO content is correlated with the activity of iNOS.

[Key words] nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; radiation-induced pulmonary fibrosis

近年来,一氧化氮(nitric oxide,NO)与放射性肺纤维化的关系越来越受到重视,研究的焦点主要集中在放射性肺纤维化形成过程中NO含量变化及一氧化氮合成酶活性改变上。本研究通过建立放射性肺损伤的动物模型,观察NO含量的动态变化及诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达,分析NO在放射性肺纤维化形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:新西兰大耳白兔20只,雌雄不限,体质量1.5~2 kg。

1.1.2 试剂:羊抗兔iNOS多克隆抗体(一抗),即用型SABC试剂盒(包括正常封闭血清、生物素化二抗、SABC、抗原修复液、复合消化液)及DAB染色液,购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 建立实验动物模型及样本采集:将实验兔在模拟定位机下准确定位左全肺的范围,在直线加速器上采用6 mV X线对左全肺进行照射,照射剂量为25 Gy,1次。分别于照射前、照射后1、3、6个月各处死5只动物,进行左肺肺泡灌洗,灌洗液离心后取上清液,-20℃冰箱保存,左肺下叶组织福尔马林固定。

1.2.2 采用铜-镉还原法测定肺泡灌洗液中的NO含量:具体步骤见参考文献[1]。

1.2.3 免疫组化法检测iNOS的表达:操作步骤按

[作者简介] 党军(1968-),男,主治医师,博士。

产品说明书所提供的方法进行。以细胞浆出现棕黄色、棕褐色颗粒为阳性细胞,根据 100 倍视野内阳性细胞的多少来判定 iNOS 的表达程度。

1.2.4 肺损伤的病理分期标准见参考文献[2]。

2 结果

2.1 肺泡灌洗液中 NO 含量的动态变化(图 1)

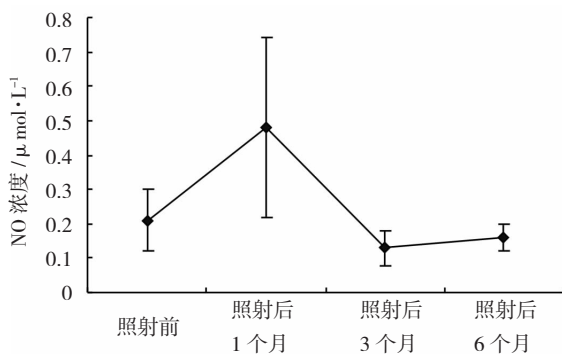


图 1 灌洗液中 NO 含量的动态变化

Fig.1 Dynamic change of NO content in alveolar lavage fluid

NO 含量在放疗后 1 个月内明显升高,放疗后 3~6 个月,NO 含量显著降低。

2.2 iNOS 蛋白在肺组织中表达

在照射前,肺间质细胞内几乎未见 iNOS 阳性表达;在照射后 1 个月,肺间质中 iNOS 表达阳性细胞明显增多(图 2),在照射后 3~6 个月,肺间质中细胞中可见少量 iNOS 表达阳性细胞(图 3)。

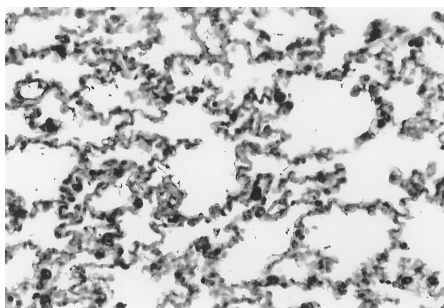


图 2 放疗后 1 个月 iNOS 蛋白在肺组织中的表达 × 100

Fig.2 Expression of iNOS protein in lung 1 month after the radiation × 100

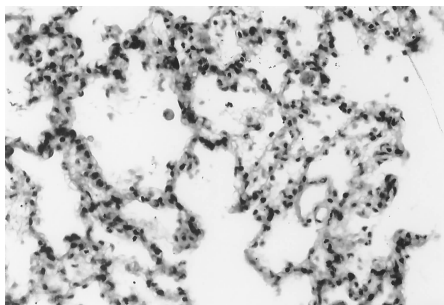


图 3 放疗后 6 个月 iNOS 蛋白在肺组织中的表达 × 100

Fig.3 Expression of iNOS protein in lung 6 months after the radiation × 100

2.3 照射后肺组织病理学改变

在放疗后 1~3 个月,肺损伤的镜下表现以变质渗出和肉芽生长为主;而在照射后 6 个月,肺泡壁轻、中度增厚,肺组织出现片状纤维化。

3 讨论

在正常的生理条件下,NO 主要通过激活鸟苷酸环化酶来发挥其扩张血管平滑肌、抑制血管平滑肌增生等保护作用^[3]。同时,还可与机体内的氧自由基直接作用,产生一个浓度依赖的双向效应;而当 NO 临床过高时,则由于过多的有毒中间体的产生,反而进一步加重细胞的损伤^[4]。

关于 NO 在胸部肿瘤放疗所致的放射性肺纤维化形成中的作用,国内外的研究结果未能达成一致。有学者认为放疗可抑制肺间质细胞 iNOS 的表达,既有利于肿瘤的控制,又能在一定程度上保护正常肺组织^[5];另有学者指出,正是由于放疗过程中 iNOS 的过度表达,从而促进了放射性肺纤维化的发生、发展^[6]。本研究结果显示,在照射后 1 个月,由于受外来因素刺激,iNOS 表达一过性增强,NO 生成大量增多,照射后 3~6 个月,可能由于肺血流进一步下降等因素影响,肺泡巨噬细胞合成 iNOS 能力下降,iNOS 表达降低。

多种迹象表明,NO 在放射性肺损伤的发生发展中可能具有双重作用,何种程度的 NO 水平变化是最适宜的,还需在今后的研究中进一步摸索。另外,单纯 NO 这一因素并非能决定放射性肺纤维化的形成,多种生物因子可能具有协同作用,其与放射性肺纤维化互为因果,至于这个网络是如何调节的,也需要更进一步的分析。

参考文献:

- [1] 陈晓玲,黄善生,李英敏,等.大鼠肺纤维化过程中肺内一氧化氮代谢的动态变化[J].中国病理生理学杂志,2001,17(6):534-537.
- [2] 白蕴文,王德文,崔雪梅,等.转化生长因子 mRNA 在放射性间质性肺炎中的表达[J].中华放射医学与预防杂志,1998,4(18):95-97.
- [3] JOHNPHD, TSADBS, ALLANMPHD. Cardioprotective effects of authentic nitric oxid in myocardial ischemia with reperfusion [J]. Crit-Care Med, 1991, 19(1):244.
- [4] 福山直人,中口博江. NO 的多面的及作用机序[J].医学のあゆみ,1995,172(2):529.
- [5] SONG L, WANG D, CUI X, et al. Kiretic alterations of angiotensior and nitric oxide in radiation pulmorary fibrosis [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1998, 17(21): 141-150.
- [6] NOZAKI Y, HASEGAWA Y, TAKENCHI A, et al. Nitric oxide as ovn rfflammafory mediator of radiation phenmoris rats [J]. Am J Physiol, 1997, 272(4 pt 1):L651-L658.