

乌司他丁对脂多糖致小鼠急性肺损伤的保护作用以及 与诱导型一氧化氮合酶和 c-Jun表达的关系

谭正怀², 余凌虹¹, 魏怀玲¹, 刘耕陶^{1*}

(1. 中国医学科学院、中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050; 2. 四川省中药研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 探讨乌司他丁对脂多糖 (LPS) 致小鼠急性肺损伤的作用及其机制。方法 小鼠腹腔注射乌司他丁 (50 和 100 ku·kg⁻¹) 或等体积生理盐水 30 min 后, 分别静脉注射 LPS 15 mg·kg⁻¹ 或等体积生理盐水, 于注射 LPS 后不同时间检测有关各项指标。ELISA 法测定血清和肺组织中 TNF α 水平, RT-PCR 法测定 TNF α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达。Western blotting 法检测 c-Fos, c-Jun 及 iNOS 等蛋白表达。结果 乌司他丁 100 ku·kg⁻¹ 能显著降低 LPS 引起的小鼠的肺脏指数、肺组织及血清中 NO 水平的增加, 下调肺组织 c-Jun 蛋白表达量和 iNOS mRNA 及其蛋白的表达量, 而对小鼠的血清和肺组织冲洗液中 TNF α 含量以及肺组织 MDA 无明显影响。结论 乌司他丁对 LPS 引起的小鼠肺损伤有保护作用, 该作用与其抑制 c-Jun 蛋白和 iNOS mRNA 的表达有关。

关键词: 脂多糖; 急性肺损伤; 乌司他丁; iNOS; c-Jun

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)07 - 0636 - 05

Protective action of ulinastatin against lipopolysaccharides-induced acute lung injury in mice and the relation of it to iNOS and c-Jun expressions

TAN Zheng-hua², YU Ling-hong¹, WEI Hua-ling¹, LIU Geng-tao^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Aim** To study the protective action of ulinastatin against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice and the mechanism of its action. **Methods** Mice were intraperitoneally injected with ulinastatin (50 and 100 ku·kg⁻¹) or saline at a period of 12 h, separately, 30 min after the last injection of ulinastatin, except normal control, all mice of other groups were injected a dose of LPS 15 mg·kg⁻¹ via tail vein. The levels of TNF α in serum and lung were measured by ELISA. The expression of TNF α mRNA and iNOS mRNA in lung was assayed by RT-PCR. The expression of c-Fos and c-Jun protein in lung was measured by Western blotting method. And the NO₂⁻/NO₃⁻ level in serum and MDA in lung were measured with kits. **Results** The levels of NO₂⁻/NO₃⁻ and TNF α in serum, MDA and TNF α in lung all increased after iv injection of LPS. The expressions of TNF α mRNA, iNOS mRNA, c-Fos and c-Jun in lung of LPS-injected mice were enhanced. Pretreatment with ulinastatin 100 ku·kg⁻¹ decreased the levels of NO₂⁻/NO₃⁻ in serum and lung, reduced the index of lung, and inhibited the expressions of iNOS mRNA and c-Jun in lung induced by LPS in mice, while ulinastatin showed no effect on TNF α level in serum and lung. **Conclusion** Ulinastatin protected mice from acute lung injury induced by lipopolysaccharides via inhibiting the activation of c-Jun and iNOS mRNA expression.

Key words: lipopolysaccharides; acute lung injury; ulinastatin; iNOS; c-Jun

收稿日期: 2005-11-17.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2003CB514128).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 63165178,
E-mail: liugt@imm.ac.cn

研究表明, 自由基在急性肺损伤 (ALI) 的发生、发展中起着重要作用。在急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 或正处于 ARDS 的患者的肺泡灌洗液 (BALF) 中过氧化氮类物质 (NO_x) 浓度显著升高, 在

后来发生死亡的患者,其 BALF 中 NO_x 的浓度在发病后 3 d 和 7 d 时显著高于其他患者^[1]。一氧化氮(NO)是活性氮类自由基(reactive nitrogen species, RNS),在一氧化氮合酶(NOS)作用下由 L 精氨酸转化而来。体内存在 3 种 NOS 亚型,其中诱导型 NOS(iNOS)与炎症和免疫反应关系最为密切。许多刺激因子能激活 iNOS 的表达,引起肺内皮细胞、肺泡细胞以及活化的肺巨噬细胞等产生 NO 和过氧化物,两者可形成过氧化硝基化合物,使肺内多种蛋白质如表面活性蛋白 A 等的关键氨基酸发生过氧化反应或形成硝酸盐,导致肺脏功能受损^[2,3]。脂多糖(LPS)由革兰阴性杆菌产生,在严重感染性疾病所致的 ALI 中起着关键性作用,在 LPS 诱导的 ALI 的发病机制中,由 iNOS 生成的 NO 起了重要作用^[4]。

乌司他丁(ulinastatin, ULI)是从男性尿液中分离提纯的糖蛋白,分子质量为 67 kD,由 143 个氨基酸残基组成,是一种典型的 Kunitz 型蛋白酶抑制剂。乌司他丁可减少内毒素大鼠肺循环中粒细胞黏附和 H₂O₂ 生成^[5],可减少 LPS 诱导单核细胞 TNF α 的生成,但不影响其 TNF α mRNA 的表达^[6]。以上结果提示,乌司他丁有可能通过抗氧化而抑制 LPS 诱导的小鼠 ALI,但至今无文献报道。本研究探讨了乌司他丁对 LPS 诱导小鼠 ALI 的保护作用及其作用机制。

材料和方法

药品及试剂 乌司他丁由广东天普生化医药股份有限公司出品,100 ku 瓶,批号:20030531,临用前用无菌生理盐水配成所需浓度的溶液供注射用。LPS 为 Sigma 产品,临用前用无菌生理盐水配成所需浓度的溶液供注射用。Quantikine 小鼠 TNF α 检测试剂盒为 R&D Systems Inc. 出品。RT-PCR 试剂盒系 Promega 公司产品。NO 检测试剂盒为南京建成生物工程研究所出品。

实验动物及分组 雄性 ICR 小鼠,体重 22~24 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2002.0003。将小鼠随机分组,给药组分别腹腔注射乌司他丁 50 和 100 ku·kg⁻¹,模型组和对照组注射等体积生理盐水,6 h 注射 1 次,连续 3 次,在第 1 次给药后 30 min,由尾静脉注射 LPS 15 mg·kg⁻¹(正常对照组给予等体积生理盐水),并于注射 LPS 后不同时间测定各项指标。

肺脏指数测定 在注射 LPS 后 24 h 处死动物,称体重,取肺脏并称湿重,计算其脏器指数。

GSH 测定 在注射 LPS 后 24 h 处死动物,取肺组织用 0.1 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)制成 10% 的组织匀浆。取肺组织匀浆 0.5 mL,按文献^[7]方法测定 GSH 含量。

MDA 测定^[8] 取肺组织匀浆 0.2 mL 用硫代巴比妥酸(TBA)比色法进行检测。

肺冲洗 在注射 LPS 后不同时间,用脱白法处死动物,做气管插管,用注射器取 PBS 灌洗肺脏(1.0 mL/只),来回冲洗 6 遍,收集冲洗液,用于检测各指标。

NO₂⁻/NO₃⁻ 检测(硝酸还原酶法) 在注射 LPS 后 8 h,取肺脏冲洗液及血清按试剂盒所述方法测定 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量。

RT-PCR 测定 TNF α mRNA 及 iNOS mRNA 的表达 小鼠于注射 LPS 1 h 后,取肺组织置于液氮中供提取总 RNA。按 TRIZOL 试剂盒所附说明书提取总 RNA。然后,取总 RNA 提取物 1 μ g,以无 RNase 和 DNase 水溶解,加入 dNTP 混合物、AMV 逆转录酶、Tfl DNA 聚合酶、MgSO₄ 以及上下引物等。48 $^{\circ}$ C 逆转录 45 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7 min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖(含 EB 0.5 μ g·mL⁻¹)电泳分离,电压 50 V,电流 10 mA。电泳约 2 h 后,用 Kodak 科学数字成像系统扫描图像存档。重复检测 1 次。所用 mRNA 引物见表 1。

Table 1 Primers for TNF α , iNOS and β -actin

Gene	Sequence of primer	Product/bp
TNF α	5'-GGC GGT GCC TAT GTC TCA G-3'	364
	5'-GGG CAG CCT TGT CCC TTG A-3'	
iNOS	5'-GCC TCA TGC CAT TGA GTT CAT CAA CC-3'	372
	5'-GAG CTG TGA ATT CCA GAG GCC TGA AG-3'	
β -Actin	5'-CTC CTA CCA CAC CCA TTC TCA TCC-3'	492
	5'-GCA ATG CCT GGG TAC ATG GTG G-3'	

肺组织蛋白的提取 小鼠于注射 LPS 1 h 或 6 h 后,取肺组织置于液氮中,用于提取肺组织中蛋白质。取肺组织 70~100 mg,加 RIPA 裂解液,用玻璃匀浆器制成 10% 的组织匀浆,冰上裂解 30 min。细胞裂解液在 4 $^{\circ}$ C, 10 000 \times g 离心 30 min,取出上清液,于 4 $^{\circ}$ C, 10 000 \times g 再离心 30 min,收集上清液,Lowry 法^[9]测定蛋白,用 RIPA 缓冲液调整蛋白质量浓度为 5 mg·mL⁻¹, -80 $^{\circ}$ C 保存待测。

Western blotting 法检测 c-Jun, c-Fos 及 iNOS 蛋白表达 取蛋白提取物约 50~100 μ g,在 12%

SDS-PAGE或 8% SDS-PAGE进行电泳后,将凝胶在 Tris-甘氨酸-甲醇转移液 (25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.2 mol·L⁻¹甘氨酸, 0.037% SDS, 20%甲醇)中转移至硝酸纤维素薄膜, TBST洗膜后,用含 5%脱脂奶粉的封闭液室温下封闭 2 h,分别加入兔多抗 c-Jun, c-Fos或兔抗小鼠 iNOS一抗 (1:150),冰上孵育 3 h, TBST洗膜后加入山羊抗兔辣根过氧化物酶偶联的 IgG二抗 (1:300),在室温下孵育 2 h, TBST洗膜后加入辣根过氧化物酶 DAB应用液,室温下显色 3 min,终止反应,滤膜扫描存档。重复检测 1 次。

ELISA法检测血清 TNFα 水平 小鼠于注射 LPS 1 h后,取血清及肺冲洗液按试剂盒说明书检测 TNFα 含量。取分析稀释液 50 μL 孔和样品 50 μL/孔,加入 96 孔板中,混匀后密闭,在室温下反应 2 h,洗板 5 次,加入小鼠 TNFα 偶联物应用液 100 μL/孔,室温下密闭反应 2 h,洗板 5 次,加入底物应用液 100 μL 孔,室温下暗处反应 30 min,加入终止液 100 μL 孔,在酶标仪上 450 nm 处读取 A 值 (校正波长为 540 nm)。在标准曲线上查表即得其含量。

统计分析 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student *t* 检验进行组间差异的比较。

结果

1 乌司他丁对 LPS 处理小鼠肺脏指数、肺 GSH 及 MDA 的影响

小鼠静脉注射 LPS 24 h 后,肺脏指数和肺组织 MDA 均明显增加,而肺组织 GSH 水平显著降低。乌司他丁 (50 和 100 ku·kg⁻¹) 可显著防止 LPS 小鼠肺脏 GSH 水平的下降,而对 MDA 无明显影响;乌司他丁 100 ku·kg⁻¹ 可显著降低 LPS 小鼠肺脏指数,与模型组比较有统计学差异 (表 2)。

2 乌司他丁对 LPS 处理小鼠血清、肺组织 NO₂⁻ / NO₃⁻ 水平的影响

小鼠在注射 LPS 8 h 后,血清 NO₂⁻ / NO₃⁻ 水平显著升高,而此时肺组织中的 NO₂⁻ / NO₃⁻ 水平并无

明显升高。乌司他丁 100 ku·kg⁻¹ 则可显著降低小鼠血清和肺组织中的 NO 水平 (表 3)。乌司他丁 50 ku·kg⁻¹ 的作用则不明显。

3 乌司他丁对 LPS 处理小鼠血清、肺冲洗液 TNFα 水平的影响

小鼠注射 LPS 1 h 后,血清及肺冲洗液中 TNFα 水平显著升高,与对照组比较有统计学差异。乌司他丁 100 ku·kg⁻¹ 对小鼠肺冲洗液及血清中的 TNFα 水平均无明显影响 (表 4)。

Table 3 Effect of ulinastatin (ULI) on the level of NO₂⁻ / NO₃⁻ in serum and lung tissue in acute lung injury (ALI) mice induced by LPS

Group	Dose	n	NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻ in serum / μmol·L ⁻¹	NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻ in lung / μmol·mg ⁻¹ (protein)
Control		10	37.9 ± 33.4 ^{***}	2.5 ± 1.8
LPS	15 mg·kg ⁻¹	11	329.2 ± 110.4	2.6 ± 2.2
ULI	50 ku·kg ⁻¹	10	294.4 ± 71.7	1.6 ± 1.8
	100 ku·kg ⁻¹	11	256.8 ± 71.8 ^{**}	0.2 ± 0.4 ^{**}

Mice were pretreated with ulinastatin or NS, and then injected LPS 15 mg·kg⁻¹ or NS. The mice were sacrificed 8 h after LPS or NS injection and their lungs were removed and homogenized. The levels of NO₂⁻ / NO₃⁻ in serum and lung homogenate were measured. ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001 vs LPS group

Table 4 Effect of ulinastatin (ULI) on the level of TNFα in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in acute lung injury (ALI) mice induced by LPS

Group	Dose	n	TNFα in Serum / ng·mL ⁻¹	TNFα in BALF / pg·mL ⁻¹
Control		5	0.169 ± 0.076 ^{***}	2.4 ± 2.1 ^{***}
LPS	15 mg·kg ⁻¹	8	5.203 ± 0.281	197.0 ± 114.1
ULI	100 ku·kg ⁻¹	8	5.127 ± 0.159	221.5 ± 123.8

Mice were pretreated with ulinastatin or NS, and then injected LPS 15 mg·kg⁻¹ or NS. The mice were sacrificed 1 h after LPS or NS injection. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed by injection of phosphate buffer solution (PBS) 1 mL through a plastic catheter, and the fluid was collected and centrifuged for 10 min at 1 800 r·min⁻¹. The TNFα in the supernatant and serum were assayed. ^{***} P < 0.001 vs LPS group

Table 2 Effect of ulinastatin (ULI) on the level of GSH, MDA and lung index in acute lung injury (ALI) mice induced by LPS

Group	Dose	n	Lung index / mg·kg ⁻¹ (×100)	GSH / nmol·g ⁻¹ (tissue)	MDA / nmol·g ⁻¹ (tissue)
Control		10	65.3 ± 1.2 ^{***}	0.43 ± 0.04 [*]	0.28 ± 0.07 ^{***}
LPS	15 mg·kg ⁻¹	12	76.9 ± 3.6	0.27 ± 0.04	0.46 ± 0.10
ULI	50 ku·kg ⁻¹	9	76.4 ± 7.3	0.37 ± 0.07 ^{***}	0.46 ± 0.14
	100 ku·kg ⁻¹	9	71.7 ± 3.5 ^{**}	0.51 ± 0.06 ^{***}	0.45 ± 0.12

After pretreatment with ulinastatin or normal saline (NS), the mice were injected LPS 15 mg·kg⁻¹ or NS via tail vein, 24 h later, the mice were sacrificed. The lung were removed, weighed and homogenized for measurement of GSH and MDA content. ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001 vs LPS group

4 乌司他丁对 LPS 处理小鼠肺组织中 TNF α mRNA 及 iNOS mRNA 表达的影响

正常小鼠肺组织中 TNF α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达甚低。当小鼠静脉注射 LPS 1 h 后,肺组织中 TNF α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达量均显著增加。乌司他丁 100 ku \cdot kg $^{-1}$ 对 iNOS mRNA 的表达有明显的抑制作用(图 1),但对 TNF α mRNA 无明显影响。

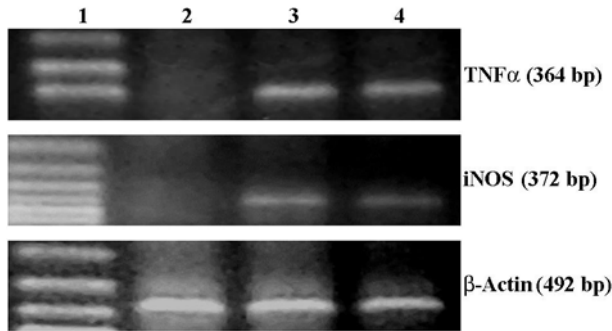


Figure 1 Effect of ulinastatin on the expression of TNF α mRNA and iNOS mRNA in LPS-injected mouse lung. Mice were pretreated with ulinastatin or NS, and then injected LPS 15 mg \cdot kg $^{-1}$ or NS 30 min after the last injection of ulinastatin. The mice were sacrificed 1 h after LPS injection, the total RNA of mouse lung was extracted with TRIzol reagent. The expression of TNF α mRNA, iNOS mRNA and β -actin mRNA were detected by RT-PCR. 1: Marker; 2: Normal; 3: LPS 15 mg \cdot kg $^{-1}$; 4: LPS 15 mg \cdot kg $^{-1}$ + ulinastatin 100 ku \cdot kg $^{-1}$

5 乌司他丁对 LPS 处理小鼠的肺组织中 c-Fos, c-Jun 及 iNOS 蛋白表达的影响

对照组小鼠肺组织的 c-Fos, c-Jun 和 iNOS 蛋白表达均低,于静脉注射 LPS 1 h 后, c-Fos 和 c-Jun 的表达量均显著增加。乌司他丁可显著抑制 c-Jun 的表达。对照组小鼠肺组织有少量的 iNOS 蛋白表达,在静脉注射 LPS 后 6 h,其表达量显著增加。乌司他丁 100 ku \cdot kg $^{-1}$ 可显著减少 LPS 小鼠肺组织 iNOS 蛋白表达量。见图 2。

讨论

在 ALI 中,具有强致炎性的 TNF α 起重要的作用。本研究发现小鼠在注射 LPS 后,小鼠肺指数增大,肺组织 MDA 水平逐渐升高以及肺组织 GSH 水平呈现先降低后升高的现象;同时血清 TNF α 和 NO $_2^-$ /NO $_3^-$ 水平升高,注射 LPS 1 h 后,其血清及肺冲洗液中 TNF α 水平显著升高,肺组织 TNF α mRNA 表达也显著增加。注射乌司他丁能显著降低 LPS 引

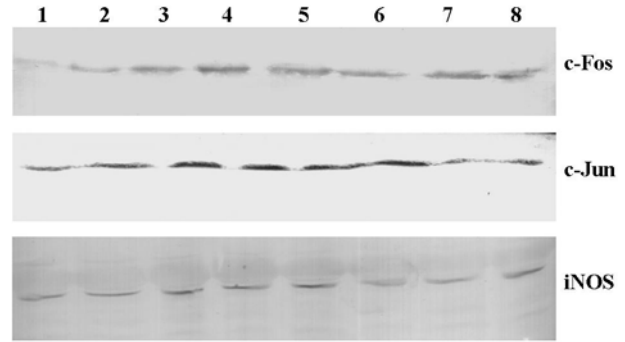


Figure 2 Effect of ulinastatin on the expression of c-Fos, c-Jun and iNOS in LPS-injected mouse lung. Mice were pretreated with ulinastatin or NS, and then injected LPS 15 mg \cdot kg $^{-1}$ or NS 30 min after the last injection of ulinastatin. The mice were sacrificed 1 h after LPS injection, the protein of mouse lung was extracted with RIPA Lyses buffer (contained 25 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris-HCl, 150 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl, 1 mmol \cdot L $^{-1}$ EGTA, 1 mmol \cdot L $^{-1}$ EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P40, 1 μ g \cdot mL $^{-1}$ aprotinin, 1 μ g \cdot mL $^{-1}$ leupeptin, 1 mmol \cdot L $^{-1}$ PMSF). The expression of c-Jun, c-Fos and iNOS was detected by Western blotting method. 1, 2: Normal; 3, 4: LPS 15 mg \cdot kg $^{-1}$; 5, 6: LPS 15 mg \cdot kg $^{-1}$ + ulinastatin 50 ku \cdot kg $^{-1}$; 7, 8: LPS 15 mg \cdot kg $^{-1}$ + ulinastatin 100 ku \cdot kg $^{-1}$

起的小鼠的肺脏指数、肺组织及血清中 NO 水平的增加,下调肺组织 c-Jun 蛋白表达量和 iNOS mRNA 及其蛋白的表达量,但对注射 LPS 小鼠肺组织中 TNF α mRNA 的表达及血清和肺冲洗液中的 TNF α 蛋白水平无明显影响。看来乌司他丁并不是通过减少 TNF α 的生成而对抗 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的作用。

已知 TNF α 所诱导的炎症是通过 AP-1 和 NF- κ B 等转录因子调控细胞核有关基因的表达而实现的。欲使 TNF α 诱导化学因子表达的作用发挥到最大,需要依赖于 AP-1 和 NF- κ B^[10] 这两条截然不同的信号传递途径的激活。c-Jun 蛋白是转录因子 AP-1 的主要组成部分,而 c-Fos 蛋白仅在与 c-Jun 形成异聚体后才有活性, Fos/Jun 异聚体与 TPA 反应元件 (TRE) 的亲合力要远远高于 Jun 同聚体^[11]。本研究发现正常小鼠肺组织的 c-Fos 和 c-Jun 蛋白量表达均较少,当注射 LPS 1 h 后,其肺组织 c-Fos 和 c-Jun 蛋白量显著增加。预先注射乌司他丁可减少 LPS 小鼠肺组织 c-Jun 蛋白的表达。虽然本研究未直接测定肺组织中 AP-1 的表达,但因 c-Jun 蛋白是 AP-1 的主要组成部分,由此间接推测小鼠在注射 LPS

后,可能肺组织的 AP-1 的活化增加,而乌司他丁可能通过抑制 AP-1 活化,从而减轻 TNF α 的致炎作用,使注射 LPS 的小鼠肺组织得到保护。

本研究还发现,小鼠注射 LPS 后其血清和肺冲洗液中 NO $_2^-$ /NO $_3^-$ 水平显著升高,肺组织 MDA 水平逐渐升高以及肺组织的 GSH 水平先降低后升高,提示在 LPS 致小鼠急性肺损伤中有过氧化损伤的参与。NO 在 ALI 中的作用已为大量的实验所证实:静脉注射白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 所致的小鼠 ALI 模型,预先用 L-NAME 抑制 iNOS 活性,小鼠的肺冲洗液中 NO 水平、肺组织中 TNF α 和 iNOS 蛋白表达以及硝基酪氨酸生成量均显著降低,小鼠肺组织损伤减轻、生存率增加。提示在白色假丝酵母引起的 ALI 中,NO 可能起着非常重要的作用,而抑制 NOS 活性可减轻小鼠肺损伤^[12]。给正常 C57BL/6 小鼠和 iNOS 敲除 (iNOS $^{-/-}$) C57BL/6 小鼠滴鼻 LPS,从 iNOS $^{-/-}$ 小鼠血管渗入气道中性粒细胞以及肺灌洗液中 TNF α 和巨噬细胞致炎蛋白-2 水平均显著低于野生型小鼠。提示 NO 可能参与了致炎细胞因子的生成和中性粒细胞的募集^[4]。

本研究发现正常小鼠肺组织的 iNOS mRNA 表达很低,而当静脉注射 LPS 后其表达量逐渐增加,4 h 达高峰,与血清 NO 升高的时间基本一致。用 Western blotting 检测时发现正常小鼠肺组织的 iNOS 蛋白表达亦低,而在静脉注射 LPS 4 h 后其表达量显著增加。预先注射乌司他丁的小鼠在静脉注射 LPS 4 h 后,其肺组织的 iNOS mRNA 及 iNOS 蛋白的表达均降低,同时血清和肺组织 NO 的水平降低,肺脏指数显著减小。由此推测,乌司他丁对 LPS 所致小鼠肺损伤的保护作用与其抑制肺组织中 iNOS mRNA 及 iNOS 蛋白的表达,使 NO 的生成减少有关。至于乌司他丁 100 ku \cdot kg $^{-1}$ 组肺的 NO 水平甚至低于正常对照组,可能与乌司他丁预防给药 3 次对正常小鼠的 iNOS 表达就有抑制作用有关,使肺组织产生的 NO 减少,也可能与乌司他丁可显著升高小鼠肺组织 GSH 水平有关,因过量的 GSH 可降低 NO 水平。

综上所述,小鼠在静脉注射 LPS 后,生成大量的 TNF α ,通过活化肺组织 c-Jun 蛋白和 iNOS mRNA 及其蛋白表达的增加促进 NO 的生成,使肺组织受

到过氧化损伤,导致 ALI。乌司他丁对 LPS 所致小鼠肺损伤具有保护作用,其作用的机制很可能与抑制 c-Jun 的表达和抑制 iNOS mRNA 及其蛋白表达有关。

References

- [1] Lang JD, McArdle PJ, O' Reilly PJ, et al. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury [J]. Chest, 2002, 122: 314S - 320S.
- [2] Wulf D. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. Physiol Rev, 2002, 82: 47 - 95.
- [3] Van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease [J]. Respir Res, 2000, 1: 67 - 72.
- [4] Okamoto T, Gohil K, Finkelstein EI, et al. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286: L198 - 209.
- [5] Cai M, Ogawa R. Effects of free radical scavengers, methylprednisolone, and ulinastatin on acute xanthine and xanthine oxidase-induced lung injury in rats [J]. Circ Shock, 1994, 43: 71 - 78.
- [6] Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, et al. Mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitor on tumor necrosis factor alpha production of monocytes [J]. Shock, 2001, 15: 101 - 105.
- [7] Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components [J]. Anal Biochem, 1972, 46: 639 - 653.
- [8] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. Anal Biochem, 1979, 95: 351 - 358.
- [9] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265 - 275.
- [10] Zhou L, Tan A, Iasvovskaia S, et al. Ras and mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1 coregulate activator protein-1 and nuclear factor κ B-mediated gene expression in airway epithelial cells [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28: 762 - 769.
- [11] Bohmann D, Bos TJ, Admon A, et al. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1 [J]. Science, 1987, 238: 1386 - 1392.
- [12] Nagata K, Iwasaki Y, Takemura Y, et al. Effect of inhaled NG-nitro-L-arginine methyl ester on Candida-induced acute lung injury [J]. Chest, 2003, 124: 2293 - 2301.