

N-乙酰半胱氨酸和维生素 C 抗大鼠急性肺损伤作用的比较研究

虞洁, 陈澜, 虞和永* (浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

摘要:目的 比较研究 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 和维生素 C (Vc) 抗大鼠急性肺损伤 (ALI) 作用。方法 采用大鼠油酸 (OA) 所致急性肺损伤模型, 随机分为正常对照组 (NS 组)、ALI 模型组 (OA 组)、维生素 C 干预组 (Vc 组)、NAC 干预组 (NAC 组)。观察 NAC 和 Vc 对大鼠急性肺损伤时 MDA、SOD 和 GSH-PX 水平, 病理改变, 肺系数, 免疫组化 iNOS 等的影响。结果 NAC 组和 Vc 组可明显降低损伤所致肺系数、iNOS 表达、组织 MDA 等水平的升高; 同时, 又能显著升高肺组织 SOD、GSH-PX 水平, 且 Vc 组和 NAC 组之间无显著性差别 ($P > 0.05$)。结论 抗氧化剂 NAC 和 Vc 可通过抑制 MDA、iNOS 表达, 改善 SOD、GSH-PX 等方式减少氧自由基的产生, 减轻肺损伤程度, 对油酸所致急性肺损伤后的肺纤维化有一定防护作用。

关键词: N-乙酰半胱氨酸; 维生素 C; 急性肺损伤; 自由基

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)01-0010-03

Comparison Study on the Effect of N-acetyl-cysteine and Vitamin C Against Acute Lung Injury in Rat

YU Jie, CHEN Lan, YU He-yong* (Women's Hospital Zhejiang University School Of Medicine, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the effect of N-acetyl-cysteine and Vitamin C against acute lung injury in rat. **METHODS**

Using acute lung injury rat induced by oleic acid, animals were randomly divided into four groups and there were ten rats in each group: control group (NS group), ALI model group (OA group), NAC pretreatment group (NAC group) and Vc pretreatment group (Vc group). Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) and lung coefficient were detected. Simultaneously, the pathological slices and the immunohistochemical staining of the iNOS expression in lung tissues were observed. **RESULTS** Comparing with the control group, the lung coefficient, MDA and expression of iNOS were obviously down-regulated by N-acetyl-cysteine and Vitamin C. N-acetyl-cysteine and Vitamin C significantly increased the levels of SOD and GSH-PX.

CONCLUSION Our present results suggest that N-acetyl-cysteine and Vitamin C might inhibit the level of MDA and the expression of iNOS, increase the levels of SOD and GSH-PX, and hence reduce releasing of free radicals. N-acetyl-cysteine and Vitamin C had a protective effect on acute lung injury.

KEY WORDS: N-acetyl-cysteine; vitamin C; acute lung injury; free radicals

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是指各种肺内外致病因素, 如严重感染、创伤、休克等所致的弥漫性的肺实质损伤。表现为单核巨噬细胞等炎症细胞的浸润、多种细胞因子及黏附分子的过度表达, 通过吞噬、脱颗粒和呼吸爆发等反应释放溶酶体酶及氧自由基等一系列代谢产物, 在消灭炎

症的同时也损伤肺组织, 因此, 氧自由基与肺损伤有密切关系^[1]。研究表明, 抗氧化剂能降低毛细血管通透性、刺激凝血功能、增加对感染的抵抗等作用^[2], 从而用于治疗急性肺损伤, 国内外已对 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 和维生素 C (Vc) 对 ALI 的治疗作用已经进行了广泛的研究和探讨, 但是对于

作者简介: 虞洁, 女, 通讯作者: 虞和永, 男, 主任药师, 硕士生导师

Tel: (0571) 87087370 E-mail: yuhy@zju.edu.cn

两种药物的疗效比较研究进行的较少。本研究旨利用油酸诱导大鼠 ALI^[3],通过观察肺病理改变,肺系数,免疫组化 iNOS,并测定 MDA, SOD和 GSH-PX的水平,比较 NAC和 Vc对 ALI的疗效,并对其相关作用机制进行讨论,探讨早期选择性药物干预治疗,尤其是针对氧自由基造成的二次损伤的干预性治疗,为急性肺损伤的临床防治提供新思路,并提供理论和实践指导。

1 材料与方

1.1 材料

SD大鼠, 220~250 mg,浙江医学科学院实验动物中心提供,合格证:医动字第 2001-001号。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。兔抗 iNOS多克隆, Santa Cruz产品。抗链霉素亲和素生物素复合物法(streptavidin biotin complex, SABC)免疫组化试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司产品。N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine)和维生素 C(vitamin C), Sigma产品。油酸(OA)等均为国产分析醇。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型建立 动物分组:SD大鼠, 220~250 mg,随机分为4组,各组10只。即:正常对照组(NS组)、ALI模型组(OA组)、维生素C干预组(Vc组)、NAC干预组(NAC组)。胃饲药物剂量:NAC组:40 mg·kg⁻¹·d⁻¹, Vc组:100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, NS组和 ALI模型组给予同体积的生理盐水。给药时间为1周。各组大鼠分别于末次给药后1h尾静脉注射油酸0.1 mL·kg⁻¹;正常组注射等量生理盐水,注射油酸后2h处死,取肺组织待生化检测。称全肺、左肺湿重及表1 各组肺组织肺系数、SOD、MDA及 GSH-PX水平(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Level of lung coefficient, SOD, MDA and GSH-PX in different groups(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺系数	GSH-PX (酶活力单位)	MDA /nmol·mg ⁻¹ prot	SOD /μmol·mg ⁻¹ prot
NS组	0.52 ± 0.13 ¹⁾	86.31 ± 28.82 ¹⁾	5.14 ± 2.06 ¹⁾	47.52 ± 7.58 ¹⁾
OA组	0.98 ± 0.35	68.23 ± 24.27	9.05 ± 2.54	25.01 ± 3.89
Vc组	0.75 ± 0.21 ¹⁾	81.33 ± 4.09 ¹⁾	5.33 ± 1.08 ¹⁾	31.89 ± 3.81 ¹⁾
NAC组	0.66 ± 0.22 ¹⁾²⁾	80.75 ± 15.49 ¹⁾²⁾	6.93 ± 1.60 ¹⁾²⁾	32.84 ± 2.73 ¹⁾²⁾

注:与 OA组比较,¹⁾ P<0.01;与 Vc组比较,²⁾ P>0.05

Note: Compared with the OA Group,¹⁾ P<0.01; Compared with the Vc Group,²⁾ P>0.05

2.2 肺大体观察

OA组肺组织肉眼观察,可见明显的肺扩张,肺表面可见片状淤血斑,肉眼观,有散在出血斑、出血点,并可见呈暗红色略凹陷的斑片状肺萎陷区;NS组则呈正常粉红色,无扩张、淤血斑。与 OA组比较,NAC组和 Vc组肺组织少见出血斑、出血点。

2.3 肺组织 iNOS免疫组化检测

肺组织免疫组织化学光镜下结果可见(×200), NS组气道壁及肺组织仅见少量散在的 iNOS免疫反应阳性细胞,分布于气道黏膜上皮和肺泡上皮细胞,且胞浆见阳性着色,胞核着色较少,见图 1A; OA组气道黏膜上皮细胞、炎症细胞、肺泡上皮细胞及血管内皮细胞有大量的 iNOS阳性蛋白颗粒,分布于细胞核内,同时,气道上皮细胞的细胞核呈典型串

其制备 10%肺组织匀浆待测。

1.2.2 观察指标及检测方法 通过肺系数的观察,评定急性炎症和肺水肿程度,肺系数:肺系数=肺湿重×100/体重;测定每组肺组织匀浆中丙二醛(MDA)含量作为氧化损伤的指标,测定肺组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力,以监测机体的抗氧化能力。

免疫组化(S-P)法检测肺组织 iNOS。5 μm厚肺组织石蜡切片,经脱蜡、水化、3% H₂O₂灭活内源性过氧化物酶后,加 1:500兔抗鼠 iNOS抗体,37℃,30 min;加生物素标记的羊抗兔第二抗体、过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白(S-P),37℃,30 min;DAB显色,甲基绿复染,脱水、透明、光学树脂封片,镜下观察,阳性结果为胞浆呈现棕黄色颗粒。阴性对照:以 PBS代替第一抗体。

1.2.3 统计学分析 数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$),各组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两样本均数比较用采用 t检验,以 P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.2 肺组织肺系数、SOD、MDA及 GSH-PX水平的检测

NS组、NAC组和 Vc组肺系数明显低于 OA组(P<0.01),且 NAC组和 Vc组之间无明显差异(P>0.05);同 OA组相比,NS组、NAC组和 Vc组 SOD与 GSH-PX明显升高(P<0.01),且 NAC组和 Vc组之间无明显差异(P>0.05);NS组、NAC组和 Vc组 MDA水平明显低于 OA组(P<0.01),且 NAC组和 Vc组之间无明显差异(P>0.05),以上结果,提示与抗氧化剂 Vc相比^[5],NAC同样具有缓解油酸所致的急性肺水肿、以及抗自由基的作用。见表 1。

珠样阳性反应,胞核明显阳性着色,胞浆亦见阳性着色,见图 1B; NAC组与 Vc组大鼠的气道和肺组织中, iNOS阳性细胞的分布与模型组相类似,气道上皮细胞及其他阳性细胞较 OA组明显减少,胞核着色较 OA组明显降低,较 NS组略高,见图 1C、D。替代对照和空白对照均为阴性。

3 讨论

目前,氧化应激反应在肺损伤发病机制中的作用已经得到了证实^[3]。由于在炎症过程中可产生超氧阴离子(O₂⁻)等氧自由基,可使脂质过氧化终产物 MDA水平上升,引起蛋白质交联变性、DNA断裂,从而破坏肺组织结构;同时,炎症过程中产生的过量 NO,也可与氧自由基生成许多衍生物,形成脂质过氧化物,引起肺细胞损伤。因此,补充外源性抗氧化剂或抗氧化酶,重建机体内氧化与抗氧化平衡,可对抗氧自由基对

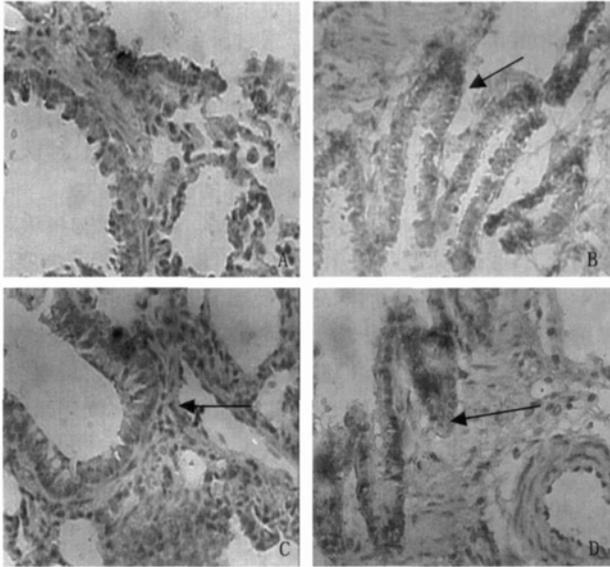


图 1 不同组大鼠肺组织 iNOS 表达的免疫组化染色 ($\times 200$)
A - NS 组; B - OA 组; C - Vc 组; D - NAC 组

Fig 1 Immunohistochemical staining of the iNOS expression in lung tissues of different rat groups ($\times 200$)

A - the NS group; B - the OA group; C - the Vc group; D - the NAC group
肺细胞的破坏,对肺损伤可起到一定的治疗作用^[4]。

维生素 C 和 NAC 是体内重要的抗氧化剂,维生素 C 在生物氧化及还原过程和细胞呼吸中起重要作用,还参与氨基酸代谢、神经递质的合成、胶原蛋白和组织细胞间质的合成,具有降低毛细血管通透性、刺激凝血功能、解毒增加对感染的抵抗作用^[5]。NAC 是一种小分子抗氧化剂,张琅等^[6]证实 NAC 通过抑制细胞内信号转导的重要信号分子 (NF- κ B) 的活化,降低多种炎症介质的释放而减轻炎症反应,对抗氧自由基引起的组织损伤^[7],对 ALI 有很好的防治作用。

在本实验中,以油酸诱导急性肺损伤 (ALI) 的大鼠为动物模型,经过灌胃给予维生素 C 和 NAC,考察抗氧化剂维生素 C 和 NAC 对 ALI 治疗的作用和相关机制。通过对大鼠肺组织内 MDA 含量的检测,发现两者都可显著降低 ALI 的 MDA 水平,升高 SOD、GSH-PX,表明机体脂质过氧化程度

降低,间接反映出肺细胞损伤的程度减轻。同时对诱生型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达进行了观察,该酶可产生 NO,从而对肺细胞产生损伤。免疫组化结果表明,NAC 和 Vc 能显著降低肺组织内 iNOS 的表达,从而改善肺损伤程度。

综上所述,本研究观察到抗氧化剂 NAC 和 Vc 通过下调 iNOS,MDA 含量,提高 SOD、GSH-PX 等减轻自由基的释放,改善急性肺损伤大鼠的炎症浸润,组织水肿、出血等病理改变,且 NAC 和 Vc 的作用疗效未见明显差别。因此,本研究从抗自由基角度出发,为 ALI 临床抗氧化干预治疗提供理论和实践指导,但其具体机制仍有待进一步探讨。

REFERENCES

- [1] MCINTYRE R C, PULIDO E J, BENSARD D D, *et al.* Thirty years of clinical in acute respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28 (9) : 3314-3331.
- [2] VAN DER V A, CROSS C E. Oxidants, nitrosants, and the lung [J]. *Am J Med*, 2000, 109 (5) : 398-421.
- [3] COSTA B, CONTI S, GIAGNONI G, *et al.* The therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palm itoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems [J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 137 (4) : 413-420.
- [4] SCIUTO A M, STRICKLAND P T, KENNEDY T P, *et al.* Protective effects of N-acetylcysteine treatment after phosgene exposure in rabbits [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151 (3 Pt 1) : 768-772.
- [5] CAO H L, JIANG Y X, LU S J, *et al.* The influence of vitamin C to anti-oxygen free radical of ALI on big rats [J]. *J Jilin Med Coll (吉林医学院学报)*, 2006, 27 (1) : 1-4.
- [6] ZHANG J, LI S Q, LI H Z, *et al.* NF- κ B expression in lung tissue of acute lung injury rat model and the influence by antioxidant N-acetylcysteine [J]. *Chin J Cell Moll Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2004, 20 (6) : 712-715.
- [7] ALKAN A, EROGLU F, EROGLU E, *et al.* Alsancak, Guleren a b Protective effects of N-acetylcysteine and erdosteine on hemorrhagic shock-induced acute lung injury [J]. *Eur J Emerg Med*, 2006, 13 (5) : 281-285.