基础研究 文章编号：0253-3626(2009)08-1046-05

褪黑素对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道氧化应激的预防作用

夏峻巍，徐 玲
（重庆医科大学附属第一医院肺科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨褪黑素（Melatonin，MLT）对慢性阻塞性肺疾病（Chronic obstructive pulmonary disease，COPD）大鼠模型气道氧化应激的影响。方法：36 只雄性 Wistar 大鼠随机分成对照组、COPD 组、MLT 组，采用熏烟加气管注入脂多糖（Lipopolysaccharide LPS）复制 COPD 大鼠模型，MLT 组在造模前 30 min 腹腔注入 MLT。28 d 后气管切开测定肺功能，检测肺泡灌洗液（BALF）中白细胞计数及分类，BALF 中一氧化氮（NO）、丙二醛（MDA）、总超氧化物歧化酶（T-SOD）、谷光甘肽过氧化物酶（GSH-PX），以及光镜下观察病理形态。结果：（1）MLT 组 BALF 中白细胞总数、中性粒细胞比例较 COPD 组明显减低（分别为 $P<0.01$，$P<0.05$），单核－巨噬细胞绝对计数下降，与对照组相比差异均无统计学意义。（2）MLT 组大鼠 BALF 中 NO、MDA 较 COPD 组明显减低（$P<0.05$），T-SOD、GSH-PX 较 COPD 组明显增高（$P<0.05$）。（3）MLT 组 0.3 s 用力呼气容积（FEV0.3）、0.3 s 用力呼气容积 / 用力肺活量（FEV0.3/FVC）、峰流速（PEF）较 COPD 组均有增加，但两者之间无显著性差异（$P>0.05$），同时仍较对照组减低（$P<0.05$）。（4）COPD 组支气管、肺实质病理改变具有特征性，MLT 组病理损害减轻，但仍异常于对照组。结论：通过减少氧化应激，增加抗氧化酶类的活性，MLT 早期干预能够部分阻止 COPD 的进程。

【关键词】肺疾病；慢性阻塞性；氧化应激；褪黑素
【中国图书分类法分类号】R563.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-24

Preventative effect of melatonin on airway oxidative stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease

XIA Jun-wei, et al
(*Department of Pulmonary Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of melatonin(MLT) on airway oxidative stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Methods*: 36 male wistar rats were

作者介绍：夏峻巍（1972- ），男，主治医师，硕士，研究方向：慢性阻塞性肺疾病。
通讯作者：徐 玲，女，主任医师，E-mail：vincentxia007@yahoo.com.cn。

pression in advanced serous carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2004, 14(5): 815-823.

[4] 王 东，仲召阳，李增鹏，等.骨肉瘤 VEGF 表达及 VEGF 抗体抑制血管生成的实验研究[J].重庆医学，2006，35(15)：1369-1372.

[5] Mei J, Gao Y, Zhang L, et al.VEGF-siRNA silencing induces apoptosis, inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro[J].Exp Oncol, 2008, 30(1): 29-34.

[6] Kaya M, Wada T, Akatsuka T, et al.Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(2): 572-577.

[7] Khan S A, Nelson M S, Pan C, et al.Endogenous heparan sulfate and heparin modulate bone morphogenetic protein-4 signaling and activity[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(6): C1387-1397.

[8] Jorgensen N R, Henriksen Z, Sorensen O H, et al.Dexamethasone, BMP-2 and 1, 25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts [J]. Steroids, 2004, 69(4): 219-226.

[9] Sotobori T, Ueda T, Myoui A, et al.Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(19): 3927-3938.

[10] Arihiro K, Inai K.Expression of CD31, Met/hepatocyte growth factor receptor and bone morphogenetic protein in bone metastasis of osteosarcoma[J].Pathol Int, 2001, 51(2): 100-106.

[11] Weidner N.Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J].Am J Pathol, 1995, 147(1): 9-19.

[12] Hicklin D J, Ellis L M.Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5): 1011-1027.

[13] Kaya M, Wada T, Nagoya S, et al.Prevention of postoperative progression of pulmonary metastases in osteosarcoma by antiangiogenic therapy using endostatin [J]. J Orthop Sci, 2007, 12(6): 562-567.

[14] Weiss K R, Cooper G M, Jadlowiec J A, et al.VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells[J]. Clin Orthop Relat Res, 2006, 450: 111-117.

（责任编辑：关蕴良）

randomly divided into 3 groups as follows: control group, COPD group and MLT group. The COPD model was established by intratracheal lipopolysaccharide (LPS) and exposure to cigarette smoking for 28 days, the MLT group was given intraperitoneal injection of 10 mg/kg MLT 30 minutes before each cigarette challenge. After incision of trachea, the lung function was measured. Then the rats were lavaged, the total and different white blood cell counts of bronchial alveolar lavage fluid (BALF) were determined; nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (T-SOD), glutathione superoxide (GSH-PX) were carried out respectively. The pathological changes were observed under light microscope. *Result*: (1) Significant decrease in total white blood cells and neutrophils in BALF was found in MLT group than these in COPD group ($P<0.01$, $P<0.05$, respectively), and the ratio of monocyt-macrophage was lower in MLT group. (2) NO and MDA in BALF of MLT group significantly decreased ($P<0.05$), while T-SOD and GSH-PX in BALF of MLT group significantly increased ($P<0.05$), as compared with those of COPD group. (3) Forced expiratory volume in 0.3 second (FEV0.3), forced expiratory volume in 0.3 second /forced vital capacity (FEV0.3/FVC) and peak expiratory flow (PEF) in MLT group were higher than those in COPD group, but there were no obvious differences between these groups. (4) The model rats shared specific pathological features in bronchial walls and lung tissues, and the pathological damages in MLT group were lessened but still abnormal. *Conclusion*: Early intervention with MLT can partly inhibit proceeding of COPD by decreasing airway oxidative stress and increasing activity of antioxidant.

【Key word】Pulmonary disease; Chronic obstructive; Oxidative stress; Melatonin

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstractive pulmonary disease, COPD)是一种具有气流受限特征的可预防和治疗的疾病,发病机制目前认为与气道炎症有关,同时蛋白酶/抗蛋白酶失衡、氧化/抗氧化失衡亦起重要作用[1],抗氧化治疗是目前 COPD 防治的一个重要靶点。褪黑素(Metatonin, MLT)是松果体分泌的主要激素,具有调节情绪、睡眠、性生殖及昼夜节律等多种生理功能,近年来发现 MLT 具有强大的抗氧化、抗炎功能[2],而外源性 MLT 干预对COPD 发生发展的调控作用,鲜见报道。本组研究在预防性应用外源性 MLT 后,观察 COPD 大鼠肺功能、氧化-抗氧化指标等方面的变化,初步探讨 MLT 对 COPD 发生发展的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

清洁级 10 周 Wistar 二级雄性大鼠 36 只(重庆医科大学动物实验中心),平均体重(256.08 ± 20.96) g,按随机数字表法,随机分为 3 组,每组 12 只。(1)MLT 组:参照文献[3],分别于第 1、14 d 气管内滴入脂多糖(Lipopoly saccharide, LPS, sigma 公司)各 200 μg/200 μl,第 2~13 d, 15~28 d 置于 72 L 自制密闭玻璃染毒箱给予 5%香烟烟雾被动吸烟染毒(山城牌,重庆卷烟厂出品),每天各 2 次,每次 0.5 h,每只每日熏烟 30 min 前经腹腔注入 MLT (sigma 公司)10 mg/kg, MLT 用乙醇溶解,加生理盐水稀释至含 5%乙醇的浓度。(2)COPD 组:熏烟加 LPS 造模同 MLT 组,每只每日熏烟 30 min 前经腹腔注入 5%乙醇生理盐水。(3)空白健康对照组:正常喂养,并以等体积生理盐水注入气管, 等体积 5%乙醇生理盐水注入腹腔。所有对象均在第 29 d 行肺功能、肺泡灌洗检查后,股静脉放血处死,留取病理标本。

1.2 实验方法

1.2.1 肺功能测定 3.5%的水合氯醛麻醉后,行气管切开置入导管并固定,外接小动物肺功能检测系统(北京航天新概念软件公司),快速注空气 6 ml 造成大鼠被动深呼吸,测定呼气峰流速(PEF)、0.3 s 呼气容积($FEV_{0.3}$)、用力肺活量(FVC)及 0.3 s 用力呼气容积 / 用力肺活量($FEV_{0.3}$/FVC)等指标。

1.2.2 肺泡灌洗 剪开颈胸部皮肤和肌肉,暴露出气管和双肺。夹闭右主支气管后,在气管下部作横行切口,置入连接注射器的硅胶管,用 9 ml 生理盐水分 3 次灌洗左肺,灌洗液纱布过滤,回收率 80%~90%,肺泡灌洗液(BALF)取 0.1 ml 于血细胞计数板中测定细胞总数,余 BALF 于 4℃离心,沉淀涂片,Wright-Giemsa 染色后进行细胞分类,上清液 -70℃保存进一步送检一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷光甘肽过氧化物酶(GSH-PX)。

1.2.3 病理标本处理 右肺下叶横贯取材,4%多聚甲醛固定(武汉博士德公司),石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察形态(Olympus 公司 BX-40 型光学显微镜,HMIAS-2000 图文分析系统)。

1.2.4 BALF 中 NO、MDA、T-SOD、GSH-PX 测定 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,检测方法按试剂盒说明书进行,比色采用紫外 / 可见全波长扫描酶标仪(Multiscan spectrum,美国 Thermo lab systems),需测定波长为: NO 和 T-SOD 550 nm, MDA 532 nm, GSH-PX 412 nm。

1.3 统计学处理

定量资料数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计软件采用 SPSS13.0,多组间用单因素方差分析,组间两两比较使用 LSD 法。

2 结　果

2.1 一般情况

COPD 组和 MLT 组各有 1 只大鼠死亡，死因分别为熏烟中窒息及肺部感染。余鼠各组间体重无明显差异（$P>0.05$），COPD 和 MLT 组毛发均黄枯，精神较萎靡，而对照组大鼠毛发色白光泽，食欲精神佳。

2.2 病理学

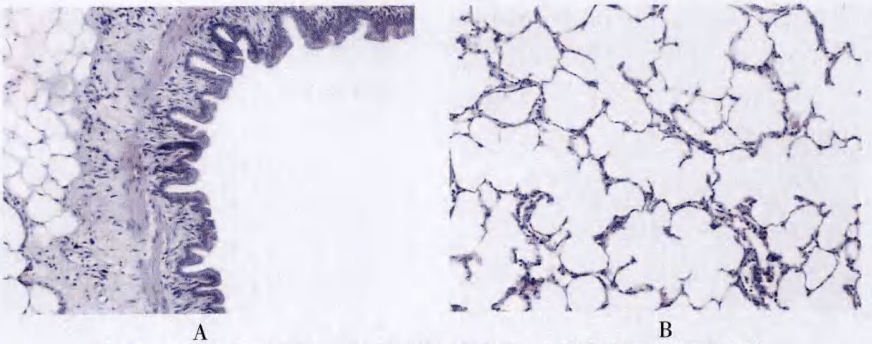
光镜下 HE 染色对照组大鼠支气管黏膜结构完整，纤毛柱状上皮细胞排列整齐，管壁及周围无炎性细胞浸润，无平滑肌体积增加，而肺泡结构完整，大小均匀一致（见图 1）。COPD 组大鼠支气管上皮部分脱落，管壁及周围大量以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润，平滑肌细胞增生，肺泡腔膨大，肺泡壁变薄、断裂，部分肺泡损毁融和（见图 2）。MLT 组大鼠病理损伤轻于 COPD 组，支气管壁炎性细胞浸润较少，肺泡壁虽仍较对照组有变薄和肺泡腔扩大，但融和、毁损情况较轻（见图 3）。

2.3 肺功能

COPD 组大鼠的 $FEV_{0.3}$，$FEV_{0.3}/FVC$，PEF 均较对照组明显减低（$P<0.01$ 及 $P<0.05$），MLT 组上述指标较 COPD 组均有增加，但两者之间无显著性差异（$P>0.05$），同时 MLT 组仍较对照组减低（$P<0.05$）。见表 1。

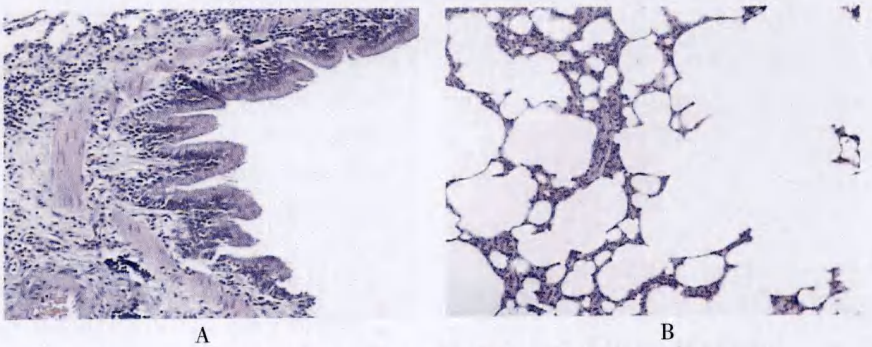
2.4 BALF 中白细胞计数及分类

COPD 组 BALF 的白细胞总数、中性粒细胞比例均明显增高（分别 $P<0.01$，$P<0.05$），单核-巨噬细胞比例明显降低（$P<0.05$），但其绝对计数是增加的；MLT 组同 COPD 组比较，白细胞总数及中性粒细胞比例明显减低（分别 $P<0.01$，$P<0.05$），单核-巨噬细



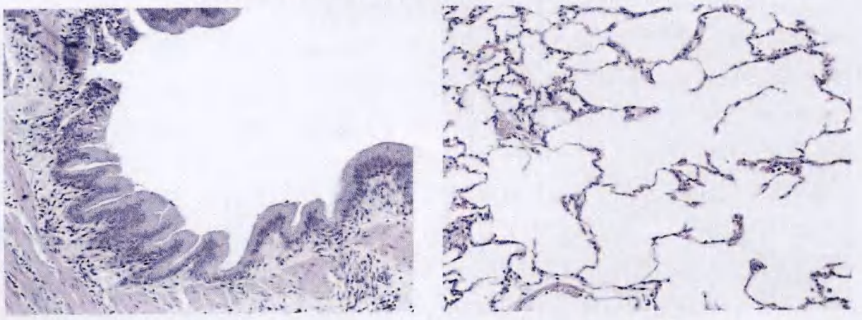
A　　B

图 1　对照组大鼠支气管（A）、肺组织（B）HE 染色结果（HE×100）



A　　B

图 2　COPD 组大鼠支气管（A）、肺组织（B）HE 染色结果（HE×100）



A　　B

图 3　MLT 组大鼠支气管（A）、肺组织（B）HE 染色结果（HE×100）

胞比例增加($P<0.05$),但绝对计数减低,MLT 组各指标基本恢复至对照组水平($P>0.05$),见表 2。

2.5 BALF 中 NO、MDA、T-SOD、GSH-PX 测定

COPD 组大鼠 BALF 中氧化指标 NO、MDA 较对照组大鼠明显增高($P<0.01$),抗氧化指标 T-SOD、GSH-PX 比对照组明显减低($P<0.01$)。MLT 组大鼠 BALF 中 NO、MDA 较 COPD 组明显减低($P<0.05$),T-SOD、GSH-PX 较 COPD 组明显增高($P<0.05$),与对照组比较,NO、MDA 有所增高、GSH-PX 有所减低,但无显著性差异($P>0.05$),而 T-SOD 仍较对照水平减低($P<0.05$)。见表 3。

3 讨 论

氧化应激与吸烟、工业有害气体及反复感染相关,机体氧化/抗氧化平衡被打破,产生大量的氧化剂,可直接损伤气道上皮,并且通过减弱中性粒细胞的变形能力、激活核转录因子 κB、转录因子活化蛋白-1 等,调节白细胞介素-8、肿瘤坏死因子-α 和其他炎性蛋白的基因表达,加重肺部炎症[4],同时氧化应激还加重蛋白酶/抗蛋白酶失衡及 DNA 损伤。氧化应激时,肺内氧化产物如 NO、过氧化氢(H_2O_2)、脂质过氧化物代谢物等明显增加,而肺内抗氧化物是增加还是减少,目前结论尚未统一。Daga 等[5]认为吸烟患者 COPD 血中维生素 E 及 SOD 水平较正常明显减低,而 Hanta 等[6]研究证明,在COPD 患者,SOD 等抗氧化剂明显增加。

我们采用反复熏烟加气道内注入 LPS 法建立 COPD 模型,结果发现,COPD 组肺功能 $FEV_{0.3}$、PEF、$FEV_{0.3}$/FVC 均较对照组显著减低,表明存在气流受限;支气管和肺实质的病理改变提示气道炎症和肺实质的破坏,BALF 中氧化指标 NO、MDA 较对照组明显增高,抗氧化指标 T-SOD、GSH-PX 比对照组明显减低,提示氧化/抗氧化失衡,BALF 中白细胞总数及中性粒细胞比例增加,单核-巨噬细胞绝对计数增加,表明气道腔内存在以中性粒细胞、

表 1 各组肺功能结果($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	$FEV_{0.3}$(ml)	$FEV_{0.3}$/FVC (%)	PEF(ml/s)
对照组	12	2.51 ± 0.36	80.76 ± 12.12	25.82 ± 3.65
COPD 组	11	1.71 ± 0.24**	64.29 ± 12.16*	21.58 ± 1.52*
MLT 组	11	1.82 ± 0.31*	67.67 ± 8.86*	22.71 ± 2.04*
F 值		8.280	4.407	4.313
P 值		0.002	0.025	0.027

注:与对照组比较 *$P<0.05$, **$P<0.01$

表 2 各组 BALF 中白细胞计数及分类($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	白细胞总数($\times 10^7$ 个/L)	细胞分类(%)		
			单核—巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
对照组	12	3.59 ± 1.99	81.20 ± 3.88	13.70 ± 3.13	5.10 ± 1.59
COPD 组	11	11.21 ± 3.38**	66.71 ± 8.54*	29.43 ± 8.69*	4.57 ± 1.51
MLT 组	11	5.99 ± 2.66##	76.38 ± 9.03#	15.57 ± 5.56#	5.57 ± 2.51
F 值		17.349	10.566	13.447	0.495
P 值		0.000 1	0.001	0.000 1	0.616

注:与对照组比较 *$P<0.05$,**$P<0.01$;与 COPD 组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$

表 3 各组 BALF 中 MDA、NO、T-SOD、GSH-PX 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	MDA(nmol/ml)	NO(μ mol/L)	T-SOD(U/ml)	GSH-PX(活力单位)
对照组	12	3.75 ± 0.78	2.05 ± 1.58	71.50 ± 13.69	2143.68 ± 102.37
COPD 组	11	6.61 ± 1.84**	5.19 ± 1.27**	49.40 ± 4.83**	1913.68 ± 113.95**
MLT 组	11	4.06 ± 1.32#	3.40 ± 0.99#	60.48 ± 6.42*#	2090.53 ± 61.40#
F 值		5.911	11.139	10.278	8.937
P 值		0.010	0.001	0.001	0.003

注:与对照组比较 *$P<0.05$,**$P<0.01$;与 COPD 组比较,#$P<0.05$

单核-巨噬细胞为主的炎症。证明模型组具有同人类 COPD 一致的特征。

MLT 是松果体分泌的主要激素，具有调节情绪、睡眠、性生殖及昼夜节律等多种生理功能。1993 年 Tan 等[7]发现 MLT 为强·OH 清除剂，其清除能力是还原型谷胱甘肽的 4 倍，抗氧化机制包括：与大多数生物抗氧化剂通过加氢反应不同，是目前已知唯一有给电子能力的抗氧化剂；MLT 对脂质[8]、DNA 和蛋白质等生物大分子的氧化性损伤均有较强的保护作用以及增强抗氧化酶包括 SOD、GSH-PX 等的活力及其基因表达。研究发现外源性 MLT 能部分阻断哮喘大鼠肺组织核转录因子-κB 的激活，降低其调控的诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)活性及 BALF 中 NO 含量，减轻哮喘大鼠气道炎症和气道高反应性[9]，另外新近发现 MLT 还可抑制哮喘小鼠气道重塑[10]。

本研究在建模之前应用 MLT 干预发现：MLT 组大鼠 BALF 中的 NO、MDA 较 COPD 组明显减低，T-SOD、GSH-PX 较 COPD 组明显增高，表明 MLT 可以减轻 COPD 的气道氧化损伤，提高局部抗氧化酶类水平。BALF 白细胞总数及中性粒细胞、单核-巨噬细胞比例接近对照组，提示 MLT 能够改善 COPD 的慢性炎症。支气管和肺组织的病理损伤较 COPD 组减轻，说明 MLT 一定程度阻止 COPD 的病理进程。

同时，我们看到：MLT 组肺功能无明显改善，BALF 中 T-SOD 仍低于对照组，MLT 组 COPD 病理特征仍较对照组明显，说明其保护作用尚不完全。

总之，本研究初步证实早期应用 MLT，能明显改善氧化损伤，最终能够部分减缓大鼠 COPD 的形成，其具体机制以及对气道炎症、气道重塑、蛋白酶/抗蛋白酶等其他 COPD 发病过程的阻断作用有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J].中华内科杂志，2007，46(1)：254-261.

[2] Kühlwein E，Irwin M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression[J]. Neuroimmunol，2001，117(1-2)：51-57

[3] 宋一平，崔德健，茅培英.COPD 大鼠模型的建立及药物干预的影响[J].中华内科杂志，2000，39(8)：556-557.

[4] Barnes P J. Chronic obstructive pulmonary disease[J] .N Engl J Med，2000，343(4)：269-280.

[5] Daga M K，Chhabra R，Sharma B，et al. Effects of exogenous vitamin E supplementation on the levels of oxidants and antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease [J]. J-Biosci，2003，28(1)：7-11.

[6] Hanta I，Kocabas A，Canacankatan. Oxidant-antioxidant balance in patients with COPD [J]. Lung，2006，184(2)：51-55.

[7] Tan D X，Chen L D，Poeggeler B，et al. Melatonin：a potent，endogenous hydroxyl radical scavenger [J]. Endocrinol J，1993，1(1)：57-60.

[8] Melchiorri D，Reiter R J，Attia A M，et al. Potent protective effect of melatonin On in vivo paraquat-induced oxidative damage[J]. Life sci，1994，56(1)：83-89.

[9] 王亚亭，陈胜利，徐叔云.褪黑素对哮喘大鼠核因子出表达的影响及抗炎作用[J]. 中华儿科杂志，2004，42(2)：94-97.

[10] 周 莉，钱朝霞，李 锋，等. 褪黑素对支气管哮喘小鼠胶原沉积及基质金属蛋白酶 9 和基质金属蛋白酶组织抑制剂 1mRNA 与蛋白表达的动态调节[J].中华结核和呼吸杂志，2007，30(7)：527-532.

（责任编辑：冉明会）

读者·编者·作者

关于论文写作中的作者署名

我国著作权法公布以来，已得到社会各界的广泛重视，作为医学科技期刊必须不折不扣的执行著作版权法。为此将本刊对作者署名的有关要求重申如下。

一、作者署名的意义和应具备的条件

1、署名的意义：(1)表明论文的责任人，文责自负。(2)医学论文是医学科技成果的总结和记录，是作者辛勤劳动的成果和创造智慧的结晶，也是作者对医学事业做出的贡献，并从此获得社会的尊重和承认的客观指标，是应得到荣誉，也是论文版权归作者的一个申明。(3)作者署名便于编辑、读者与作者联系，沟通信息，互相探讨，共同提高。作者姓名在文题下按序排列，排序应在投稿时确定，在排版过程中不应再做更改；作者单位名称及邮政编码位于作者名下方。

2、作者应具备下列条件：(1)参与选题和设计，或参与治疗的分析和解释者。(2)起草或修改论文中关键性理论或其它主要内容者。(3)能对编辑部的修改意见进行核修，在学术界进行答辩，并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备方可作为文章的作者。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者，仅对科研小组进行一般管理者应列为致谢部分。对文章中的各主要结论，均必须至少有 1 位作者负责。在每篇文章中需要确定 1 位能对该论文全面负责的通讯作者。通讯应在投稿时确定，若在来稿中未特俗标明，则视为第一作者为通讯作者。第一作者与通讯作者不是同一人时，应在论文首页脚注通讯作者姓名、性别、职称和电子邮箱。作者中有外籍作者，应附本人亲笔签名同意在本刊发表的函件。

本刊编辑部