

## N-乙酰半胱氨酸对急性呼吸窘迫综合征肺纤维化的抑制作用

李晓峰 欧阳彬 吴健锋 陈娟 管向东

**【摘要】** 目的 从细胞水平观察 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对脂多糖(LPS)诱导氧自由基损伤致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)肺纤维化形成的影响。方法 体外培养人胚肺成纤维细胞,分为空白对照组、LPS 刺激组、NAC 处理组、地塞米松(DEX)处理对照组 4 组,分别加入不含处理因素的培养液及含有 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、NAC(1  $\text{mmol}/\text{L}$ )+LPS(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、DEX(1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )+LPS(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的培养液。培养 24 h 后测定细胞内胶原蛋白和还原型谷胱甘肽(GSH)的含量,以评价各因素对肺纤维化的影响。结果 与空白对照组比较,LPS 刺激组肺成纤维细胞中胶原蛋白含量( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )显著增加(78.97 $\pm$ 1.79 比 72.90 $\pm$ 1.70,  $P < 0.05$ ),GSH 含量( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )显著减少(23.27 $\pm$ 0.92 比 26.34 $\pm$ 0.83,  $P < 0.05$ );NAC 与 DEX 均可明显抑制 LPS 的作用(胶原蛋白含量:72.23 $\pm$ 1.35、73.64 $\pm$ 1.89 比 78.97 $\pm$ 1.79;GSH 含量:26.52 $\pm$ 0.62、25.85 $\pm$ 0.60 比 23.27 $\pm$ 0.92,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );NAC 与 DEX 的作用无差异。结论 NAC 可抑制氧自由基损伤及 ARDS 肺纤维化。

**【关键词】** N-乙酰半胱氨酸; 急性呼吸窘迫综合征; 肺纤维化; 氧自由基; 脂多糖

**N-acetylcysteine (NAC) inhibited pulmonary fibrosis in acute respiratory distress syndrome (ARDS)** LI Xiao-feng\*, OUYANG-Bin, WU Jian-feng, CHEN Juan, GUAN Xiang-dong. \* Department of Cardiovascular Surgery of Intensive Care Unit, Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510100, Guangdong, China  
Corresponding author: GUAN Xiang-dong, Surgical Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China, Email: carlg@163.net

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of NAC treatment on lipopolysaccharide (LPS) treated human embryonic lung fibroblasts (HELFB), in regard to oxidant injury and changes in indexes related to pulmonary fibrosis in ARDS. **Methods** Four groups of cultured HELFB were treated with: vehicle, LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), NAC (1  $\text{mmol}/\text{L}$ )+LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and dexamethasone (DEX, 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )+LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hours. The content of collagen and the  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine (GSH) in the cells were determined. **Results** As compared to the control group, the collagen content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ : 78.97 $\pm$ 1.79 vs. 72.90 $\pm$ 1.70) and GSH content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ : 23.27 $\pm$ 0.92 vs. 26.34 $\pm$ 0.83) in LPS group were significantly ( $P < 0.05$ ) higher and lower, respectively; NAC and DEX both suppressed the effect of LPS on collagen content (72.23 $\pm$ 1.35, 73.64 $\pm$ 1.89 vs. 78.97 $\pm$ 1.79); and GSH content (26.52 $\pm$ 0.62, 25.85 $\pm$ 0.60 vs. 23.27 $\pm$ 0.92) significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) in the treated cells. No significant difference was found between NAC+LPS and DEX+LPS group, either in the content of collagen or GSH. **Conclusion** NAC can inhibit oxidant injury and pulmonary fibrosis in ARDS.

**【Key words】** N-acetylcysteine; Acute respiratory distress syndrome; Pulmonary fibrosis; Oxidant; Lipopolysaccharide

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是在肺内外一系列严重疾病影响下,发生的以肺泡毛细血管损伤为主要表现的临床综合征。肺纤维化是影响 ARDS 患者抢救成功率及预后的主要因素,因此,关于肺纤维化形成机制及有效干预治疗的研究非常重要。胶原

含量是肺纤维化程度的重要指标,肺内胶原 85% 由肺成纤维细胞产生,因此,本研究从 ARDS 肺纤维化的发生机制出发,力图在细胞水平探究抑制氧自由基损伤对 ARDS 肺纤维化的阻断作用,以寻求新的防治 ARDS 肺纤维化的有效途径。

### 1 材料与方法

**1.1 主要实验试剂:**低糖型 DMEM 细胞培养基(美国 GBICO 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),内毒素脂多糖(LPS)、N-乙酰半胱氨酸(美国 Sigma 公司),地塞米松磷酸钠(DEX)注射液,考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(南京建

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.10.009

基金项目,国家自然科学基金资助项目(81071536);广东省自然科学基金资助项目(8151008901000079);广东省科技计划项目(2010B031600314);中山大学临床医学研究 5010 计划(2007015)

作者单位,510100 广州,广东省医学科学院,广东省人民医院,广东省心血管病研究所心外科重症监护病房(李晓峰);中山大学附属第一医院重症医学科(欧阳彬、吴健锋、陈娟、管向东)

通信作者:管向东,Email:carlg@163.net

成生物工程公司), Sircol 胶原测定试剂盒(英国 Biocolor 公司)。

**1.2 实验细胞与分组:**将体外培养的人胚肺成纤维细胞(中山大学动物实验中心提供)制成  $1 \times 10^5$ /ml 细胞悬液,接种于 20 个培养皿中,每个培养皿中约 3 ml。将 20 个培养皿分成 4 组,每组 5 个培养皿,4 组培养皿中分别加入含有 LPS(1  $\mu$ g/ml)、NAC(1 mmol/L)+LPS(1  $\mu$ g/ml)、DEX(1  $\mu$ mol/L)+LPS(1  $\mu$ g/ml)以及不含有处理因素的培养液(DMEM+10%胎牛血清)各 12 ml,依次标记。细胞培养约 24 h 后,提取细胞内总蛋白进行后续实验。

**1.3 实验方法:**提取细胞内总蛋白,用考马斯亮蓝法测定细胞内总蛋白,GSH 试剂盒测定细胞内的 GSH 含量,Sircol 胶原试剂盒测定胶原蛋白含量,分别比较各组细胞内胶原蛋白以及 GSH 含量在细胞内总蛋白中所占比例的变化。

**1.4 统计学处理:**采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理。数据均以均数 $\pm$ 标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞内胶原含量变化(表 1):**LPS 刺激组细胞内胶原蛋白含量较空白对照组显著升高( $P < 0.05$ );NAC 和 DEX 干预后细胞内胶原蛋白含量较 LPS 刺激组明显下降(均  $P < 0.05$ ),但两个干预组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明 LPS 可明显诱导肺成纤维细胞产生胶原;NAC 和 DEX 可明显抑制 LPS 所诱导的肺成纤维细胞胶原产生,而 NAC 与 DEX 在抑制 LPS 所诱导的肺成纤维细胞胶原产生方面的作用无明显差异。

表 1 NAC 对 LPS 刺激体外培养细胞氧自由基损伤致肺纤维化的影响( $\bar{x} \pm s_x$ )

组别	样本数	胶原蛋白含量( $\mu$ g/mg)	GSH 含量( $\mu$ g/mg)
空白对照组	5	72.90 $\pm$ 1.70	26.34 $\pm$ 0.83
LPS 刺激组	5	78.97 $\pm$ 1.79 <sup>a</sup>	23.27 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>
NAC+LPS 组	5	72.23 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>	26.52 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>
DEX+LPS 组	5	73.64 $\pm$ 1.89 <sup>b</sup>	25.85 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>

注:NAC,N-乙酰半胱氨酸,LPS,脂多糖,DEX,地塞米松,GSH,还原型谷胱甘肽,与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 刺激组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$

**2.2 细胞内 GSH 含量变化(表 1):**LPS 刺激组细胞内 GSH 含量较空白对照组明显降低( $P < 0.05$ );NAC 和 DEX 干预后细胞内 GSH 含量较 LPS 刺激组明显升高( $P < 0.01$ 和  $P < 0.05$ ),并接近空白对照组水平;而两个干预组间比较差异无统计学意义

( $P > 0.05$ )。说明 LPS 可明显减少肺成纤维细胞内的 GSH 含量;NAC 和 DEX 可明显改善 LPS 所引起的肺成纤维细胞内 GSH 含量减少,而 NAC 与 DEX 在改善 LPS 所诱导的肺成纤维细胞内 GSH 含量减少方面无明显差异。

## 3 讨论

LPS 是革兰阴性(G<sup>-</sup>)菌细胞壁的特征性成分,具有较强地促进多种固有细胞和炎性细胞分泌细胞因子的能力。以往的研究多是通过 LPS 作用于体外培养的炎性细胞,将所产生的细胞因子或活化的炎性细胞碎片与肺成纤维细胞共同培养,从而诱导肺成纤维细胞产生胶原<sup>[1-3]</sup>。本实验中应用大肠杆菌 O55:B5 的 LPS 1  $\mu$ g/ml 作用于体外培养的人胚肺成纤维细胞,作为 ARDS 的细胞模型,该模型成功地诱导了成纤维细胞胶原产生的增加。结果表明,LPS 可作用于肺成纤维细胞,直接刺激其产生胶原,而无需其他细胞或外源性细胞因子介导。提示 G<sup>-</sup>菌的感染可促进 ARDS 时肺纤维化的发生进展,同时为以后的肺纤维化研究提供了新的模型。本实验中 LPS 刺激肺成纤维细胞产生胶原的同时,伴随着成纤维细胞内的 GSH 含量下降,提示 LPS 可诱导肺成纤维细胞产生氧化应激,生成大量的氧自由基,氧自由基本身即可诱导肺成纤维细胞增殖。

既往研究发现,糖皮质激素能够抑制成纤维细胞的增生以及组织培养中成纤维细胞所致的胶原合成<sup>[4-5]</sup>。本实验中使用 1  $\mu$ mol/L 的糖皮质激素能明显抑制 1  $\mu$ g/ml LPS 所致的体外肺成纤维细胞胶原合成增加,同时可抑制 LPS 所致的成纤维细胞 GSH 含量减少。提示糖皮质激素可通过阻断氧化应激,从而抑制 LPS 的致纤维化作用。但是,糖皮质激素临床应用可引起多种并发症,这在很大程度上限制了糖皮质激素的临床应用,因此,有必要寻求一种更为安全、有效的途径,以防治 ARDS 肺纤维化的发生进展。

已经证实,GSH 缺失和氧化剂损伤是 ARDS 产生的原因<sup>[6]</sup>。GSH 对脓毒症大鼠的急性肺损伤(ALI)具有肺脏保护作用<sup>[7]</sup>。成纤维细胞的激活、分化、增殖以及凋亡也与氧化剂/抗氧化剂的平衡有关,维持细胞内 GSH 的高浓度可以给细胞提供一个还原环境、使细胞免受氧化应激的损害。

NAC 作为抗氧化剂可清除多种氧自由基,已在增加肺 GSH 含量、改善慢性阻塞性肺疾病(COPD)和特发性肺纤维化患者的炎症状态方面取得了一定的成功<sup>[8]</sup>。本实验中,给予 1 mmol/L 的 NAC 处理

可使 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 引起的肺成纤维细胞中减少的 GSH 含量增加,增加的细胞内胶原蛋白含量减少。这与 Jafari 等<sup>[9]</sup>报道的结果一致。

从已有的临床研究中发现,NAC 增加肺 GSH 含量的方法是安全可行的。抗氧化治疗能对特发性肺纤维化患者和艾滋病感染个体的病程产生正面的影响,且没有副作用<sup>[10]</sup>。作为溶黏蛋白剂,NAC 可降低黏液黏滞性,改善黏膜纤毛清除率<sup>[11]</sup>。虽然 NAC 和 DEX 在抑制 LPS 所致的胶原产生增加方面没有明显差异,由于 NAC 的安全性较好,在临床应用上的限制相对较少。而且,NAC 还可使痰中糖蛋白多肽链中的二硫键断裂,降低痰的黏滞性,使之液化而易于咯出,这使 NAC 在 ARDS 肺纤维化防治中的应用更具有临床优势。当然,鉴于体外实验的局限性以及以往研究者的不同结论,NAC 治疗 ARDS 肺纤维化的临床效果究竟如何,以及 NAC 和 DEX 两者治疗效果的差异如何,则需要大样本的前瞻性、多中心临床研究加以明确。

#### 参考文献

- [1] Zapal WM, Trelstad RL, Coffey JW, et al. Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 119:547-554.
- [2] Kovacs EJ, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective

tissue production. *FASEB J*, 1994, 8:854-861.

- [3] Elias JA, Freundlich B, Kern JA, et al. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest*, 1990, 97:1439-1445.
- [4] Hesterberg TW, Last JA. Ozone-induced acute pulmonary fibrosis in rats, prevention of increased rates of collagen synthesis by methylprednisolone. *Am Rev Respir Dis*, 1981, 123:47-52.
- [5] Thompson BT. Glucocorticoids and acute lung injury. *Crit Care Med*, 2003, 31:S253-S257.
- [6] Ruffmann R, Wendel A. GSH rescue by N-acetylcysteine. *Klin Wochenschr*, 1991, 69:857-862.
- [7] 廖秀玉,林建东,倪秀雄,等.还原型谷胱甘肽对脓毒症大鼠肺部超微结构及血中细胞因子水平的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22:282-284.
- [8] Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*, 2000, 16: 534-554.
- [9] Jafari B, Ouyang B, Li LF, et al. Intracellular glutathione in stretch-induced cytokine release from alveolar type-2 like cells. *Respirology*, 2004, 9:43-53.
- [10] Buhl R, Meyer A, Vogelmeier C. Oxidant-protease interaction in the lung, prospects for antioxidant therapy. *Chest*, 1996, 110:267S-272S.
- [11] Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur J Clin Pharmacol*, 1988, 34:77-82.

(收稿日期:2011-08-31)

(本文编辑:李银平)

#### • 科研新闻速递 •

##### 在左心室辅助装置植入术后吸入一氧化氮:一个前瞻性、随机、双盲、多中心、安慰剂对照试验

虽然吸入一氧化氮(NO)频繁应用于右心室功能障碍(RVD),但其临床效果仍不明确。德国的研究人员采用前瞻性、随机、双盲、多中心、安慰剂对照试验,以检验吸入 NO 对左心室辅助装置植入(LVAD)术后结果的影响。他们选取了 150 例接受 LVAD 治疗且肺血管阻力 $\geq 200 \text{ kPa} \cdot \text{s} \cdot \text{L}^{-1}$ 的患者为研究对象。在患者脱离体外循环、拔除管路后 48 h 内、或者已经出现 RVD 时,吸入  $40 \times 10^{-6}$  的 NO,或含有相当氮浓度的安慰剂。考虑伦理因素,如果患者在 48 h 的治疗期间出现 RVD,则转入非盲试验吸入 NO。结果发现:吸入 NO 组 73 例患者中有 7 例出现 RVD,占 9.6%(95%可信区间 2.8~16.3),安慰剂组 77 例患者中出现 RVD 12 例,占 15.6%(95%可信区间 7.5~23.7),两组比较  $P=0.330$ 。吸入 NO 组机械通气时间较安慰剂组缩短(2 d 比 3 d,  $P=0.077$ ),且较少出现 RVD(5.6%比 10.0%,  $P=0.468$ )。两组患者住院时间、住重症监护病房(ICU)时间、28 d 病死率及不良事件发生率无明显差异。35 例转入非盲试验吸入 NO,其中吸入 NO 组 15 例,安慰剂组 20 例;18 例患者转入非盲试验时未出现 RVD,其中吸入 NO 组 9 例,安慰剂组 9 例。因此研究人员认为,在 LVAD 围手术期吸入  $40 \times 10^{-6}$  NO 并未显著降低 RVD 的发生率,同样也未能缩短机械通气时间、住院时间、住 ICU 时间,并且 LVAD 术后右心室支持治疗的必要性也没有显著提高。

崔倩,编译自《J Heart Lung Transplant》,2011-04-28(电子版);赵志伶,审核

##### 经右腋下小切口植入无支架生物瓣的主动脉瓣置换术:一个初步经验

主动脉瓣置换术(AVR)是目前能降低患者病死率和复发率的安全手术,其微创趋势日渐增加。但至今尚无经右腋下小切口植入无支架生物瓣的 AVR 报道,而意大利研究人员的经验可能对其他外科医生有所帮助。研究人员于 2009 年 6 月至 2010 年 3 月对 7 例主动脉瓣狭窄的女性患者(平均年龄(79.9 $\pm$ 5.7)岁)进行了经右腋下小切口无支架生物瓣的 AVR。对数分析欧洲心脏手术风险评分为(11.3 $\pm$ 6.1)分,左心室射血分数为 0.607 $\pm$ 0.045。其中 5 例患者通过第二肋间进行手术,另外 2 例患者通过第三肋间进行手术。大多数情况下选择股静脉和升主动脉(5/7)进行置管;当需要横向胸骨切开时则夹闭右乳房动脉。结果发现:体外循环时间为(110 $\pm$ 41) min,主动脉阻断时间为(80 $\pm$ 35) min;2 例患者需要行胸骨横向切开术,平均出血量为(484 $\pm$ 469) ml;机械通气时间为(22.0 $\pm$ 12.5) h,住重症监护病房(ICU)时间为(3.3 $\pm$ 2.2) d,平均住院时间为(11.6 $\pm$ 5.4) d;住院期间无死亡事件发生。因此研究人员认为,经右腋下小切口植入无支架生物瓣的 AVR 是一个安全适用的方法。通过采用横向胸骨开胸扩大切口可降低手术视野暴露不充分或发生并发症的风险。然而,通过该研究也发现,这种方式植入瓣膜时比常规的方法要难,因此需要一名对无支架生物瓣植入有经验并且自信的专科医生来进行手术。

崔倩,编译自《Heart Lung Circ》,2011-04-27(电子版);赵志伶,审核