

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01811886.0

[45] 授权公告日 2009 年 5 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 100488497C

[22] 申请日 2001.6.22 [21] 申请号 01811886.0

[30] 优先权

[32] 2000.6.28 [33] US [31] 09/605,900

[86] 国际申请 PCT/US2001/041102 2001.6.22

[87] 国际公布 WO2002/000175 英 2002.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.27

[73] 专利权人 综合医院有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 肯尼思·布洛克 一之濑文人

沃伦·M·扎波尔

[56] 参考文献

CN1387441A 2002.12.25

CN1174513A 1998.2.25

congenital NOS2 deficiency protects mice from
lps - induced hyporesponsiveness to inhaled nitric
oxide. WEIMANN et al. Anesthesiology, Vol. 91
No. 6. 1999

审查员 王彩虹

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图 13 页

[54] 发明名称

白三烯阻滞剂在制备药物中的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种减少、部分防止或完全防止哺乳动物与吸入一氧化氮(NO)有关的缺氧的肺血管收缩的损伤的方法。该方法包括通过吸入给该哺乳动物使用有效治疗量的一氧化氮,并同时给予有效量的抗活泼氧类物质(抗 ROS 剂),例如 N-乙酰半胱氨酸,或白三烯阻滞剂。还公开了一种减少、部分防止或完全防止哺乳动物作为一氧化氮吸入的响应的肺血管舒张响应的损失的方法。该方法包括通过吸入给哺乳动物使用有效治疗量的一氧化氮,并同时给予有效量的抗 ROS 剂和治疗有效量的白三烯阻滞剂。

1. 白三烯阻滞剂在制备减少、部分防止或完全防止哺乳动物与吸入一氧化氮有关的缺氧性肺血管收缩的损伤的药物中的应用。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其中白三烯阻滞剂和一氧化氮同时给予。

3. 白三烯阻滞剂在制备减少、部分防止或完全防止哺乳动物作为一氧化氮吸入响应的肺血管舒张损失的药物中的应用。

4. 如权利要求 3 所述的应用，其中白三烯阻滞剂和一氧化氮同时给予。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用，其中所说的白三烯阻滞剂是潘库司特、MK-571、MK-591、MK-886、BAYx1005、西那司特、乙二胺泊比司特、MK-679 和 ZD2138。

6. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用，其中所说的白三烯阻滞剂是孟鲁司特、扎鲁司特或齐留通。

7. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用，其中所说的哺乳动物具有急性肺部损伤。

8. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用，其中所说的哺乳动物具有急性呼吸窘迫综合征。

9. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用，其中所说的哺乳动物具有败血症。

10. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用,其中所说的哺乳动物具有肺部炎症。

11. 如权利要求 1-4 中任一项所述的应用,其中所说的白三烯阻滞剂是两种以上不同的。

白三烯阻滞剂在制备药物中的应用

技术领域

本发明涉及肺生理学和心脏病学。

背景技术

一氧化氮(NO)是由机体的许多细胞产生的一种高活性的自由基化合物。它可以通过与细胞质鸟苷酸环化酶的血红素部分结合,激活鸟苷酸环化酶并增加细胞内的环鸟嘌呤核苷 3',5'-单磷酸酯(cGMP)水平而松弛血管平滑肌,导致血管舒张。

当被吸入时,NO 气体作为人和动物肺部脉管的选择性血管舒张药。因此,NO 吸入剂被用来促进在肺的空气通透性良好的区域的血管舒张。在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中,肺部组织空气通透的减少降低了动脉血的氧合作用。一氧化氮吸入剂常常可以改善 ARDS 病人的氧合作用。这实际上是通过扩张肺部空气通透性良好部分的血管,向空气通透性良好的区域重新分配血流并从接受很少的 NO 的空气通透性差的区域带走血流来实现的。但是,对于 30-40%的 ARDS 病人而言,NO 吸入剂不能改善动脉的氧合作用(Bigatello 等人,1994, *Anesthesiology* 80: 761-770; Dellinger 等人,1998, *Crit. Care Med.* 26: 1523)。很难预知患有 ARDS 的病人不会对 NO 吸入剂产生反应或仅产生短暂的反应。但是,已知高至 60%的患有与败血症有关的 ARDS 的病人不会对吸入的 NO 产生反应(Krafft 等人,1996, *Chest* 109: 486-493)。

正常的肺部脉管系统对肺泡缺氧的反应是收缩。在患有肺损伤如 ARDS 的病人中,缺氧性肺血管收缩(HPV)通过将血流带离空气通透性差(缺氧)的肺部区域或将血流带向空气通透性良好的(含氧量正常的)

肺部区域的血流重新分配而升高了全身动脉氧合作用的水平。败血症和内毒素血症损害了 HPV，使得动脉氧浓度极大的降低(Hutchinson 等人,1985, J. Appl. Physio., 58:1463-1468)。这种全身氧合作用水平的降低可能对生命构成威胁。期望一氧化氮吸入剂在败血症期间能通过增加肺部空气通透性良好的区域的血流量而改善氧合作用或动脉血。但是，实际上，在败血症期间，NO 吸入剂常常无效，并且有时甚至因为 NO 吸入剂与 HPV 的损伤有关而是有害的。参见例如 Gerlach 等人,1996, “在急性肺损伤中吸入低水平的一氧化氮”，第 271-283 页，Nitric Oxide and the Lung, (Zapol 和 Bloch 编辑), Marcel Dekker Inc,纽约。

内源性 NO 是由氧化氮合酶在存在氧的情况下通过将 L-精氨酸转换成 L-瓜氨酸而产生的(Knowles 等人,1994,Biochemistry 298: 249-258)。已经对氧化氮合酶(NOS)的不同形式的特性进行了描述。神经元的 NOS(NOS1)和内皮的 NOS(NOS3)都是组成酶。一种可诱导的被称为 NOS2 的能够产生大量 NO 的 NOS 能可被内毒素(也被称为脂多糖或 LPS)和细胞素所诱导产生(Knowles 等人, 同上)。尽管已经证明了 NO 吸入剂对于各种适应症的治疗有价值，但是被损伤的肺部血管对 NO 吸入剂的反应延迟并且 NO 与 HPV 损伤有关的事实在急性呼吸疾病中仍然是重要的问题。

概述

本发明人发现对于在败血症期间的 HPV 损伤而言，增加肺部 NO 水平是必须的，并且这种 HPV 损伤可以通过活性氧类清除剂或白三烯阻滞剂来得到改善。因此，本发明开发了一种保留 NO 吸入剂的血管舒张作用以改善有肺部损伤的病人的动脉血氧合作用，而同时又改善了 NO 吸入剂的 HPV 损伤作用的方法。本发明已经发现 HPV 的损伤不仅仅是由于 NO-介导的血管舒张。本发明人还发现在用内毒素激发的小鼠中，肺部 NO 水平的升高和其它的脂多糖诱导剂对于损伤 NO 吸入剂的肺血管舒张响应是必须的。

一方面，本发明的特征是一种减少、部分防止或完全防止哺乳动物的与 NO 吸入剂有关的 HPV 损伤的方法。在一个实施方案中，该方法包括给哺乳动物使用治疗有效量的 NO 吸入剂，并同时给予有效量的抗-活性氧类(抗-ROS)物质。该抗-ROS 剂可以是例如 N-乙酰半胱氨酸、别嘌呤醇、抗坏血酸(维生素 C)、胆红素、咖啡酸、过氧化氢酶、PEG-过氧化氢酶、血浆铜蓝蛋白、二异丙基水杨酸铜、甲磺酸去铁胺、二甲基脲、依布硒(2-苯基-1,2-苯并异硒唑-3(2H)-酮; Pz51)、EUK-8、FeTMTPyP(5,10,15,20-四(N-甲基-4'-吡啶基)卟吩合铁(III)氯化物)、FETPPS(5,10,15,20-四(4-磺化苯基)卟吩合铁(III)氯化物)、糖皮质激素、谷胱甘肽、MnTBAP(四(4-苯甲酸)卟吩合 Mn(III)氯化物)、MnTMPyP(四(1-甲基-4-吡啶基)卟吩合 Mn(III)五氯化物)、硒代蛋氨酸、过氧化物歧化酶(SOD)、聚乙二醇-共轭的-SOD(PEG-SOD)、黄衫素(双氢槲皮苷;3,3',4',5,7-五羟基黄酮)，和维生素 E。N-乙酰半胱氨酸是优选的抗-ROS 剂。在可供替代的一个实施方案中，该方法包括通过吸入给予治疗有效量的 NO，并且同时给予有效量的白三烯阻滞剂。在其它的实施方案中，可将两种或多种抗-ROS 剂、或抗-ROS 剂和白三烯阻滞剂与 NO 吸入剂共同给药。

在另一方面，本发明的特征是用于减少、部分防止或完全防止哺乳动物对 NO 吸入剂有响应的肺血管舒张的损失。在一个实施方案中，该方法包括通过吸入的形式给哺乳动物使用治疗有效量的 NO，并同时给予有效量的抗-ROS 剂。在可供替代的一个实施方案中，该方法包括通过吸入使用治疗有效量的 NO，并且同时给予有效量的白三烯阻滞剂。在其它的实施方案中，可以将两种或多种抗-ROS 剂、或抗-ROS 剂和白三烯阻滞剂与 NO 吸入剂共同给药。

除非另有定义，这里所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属的熟练技术人员公知的含义相同的含义。在二者产生冲突的情况下，将由本说明书所包括的定义来决定。这里所提及的所有的出版物、

专利、以及其它文件都被引入作为参考。

虽然与这里所描述的方法和材料相似或同等的方法和材料都可用于本发明的实践和试验，但优选的是下面所描述的方法和材料。该材料、方法和实施例都是仅用于说明本发明，而不是要对本发明进行限制。本发明的其它特征和优点将从对本发明的详细说明和权利要求书中表现出来。

附图说明

图 1 是在从未进行处理的野生型小鼠获得的分离-灌注的肺中进行肺动脉压(PAP;等于灌注压)和左心房压力(LAP)测定的实验的示踪图。注入稳定的血栓素 A2 类似物 U46619，以便于 PAP 增加 5 或 6 mmHg。分别将各种剂量(0.4、4.0、和 40 ppm)的 NO 气体给药 5 分钟。在每次给药后，使 PAP 恢复到 给予 NO 前的水平。

图 2A 是用脂多糖进行预处理（实心圆）和未进行处理（空心圆）的野生型小鼠对于 NO 吸入剂的剂量-响应曲线。与未用脂多糖进行处理的野生型小鼠相比，用脂多糖进行了预处理的野生型小鼠对 NO 吸入剂的响应受到了损害(*P < 0.001)。数据用平均值±SE 表示。 Δ PAP = 肺动脉压的改变，以其 U46619 诱导增加的百分比表示。

图 2B 是用脂多糖进行预处理（实心正方形）和未进行处理（空心正方形）的 NOS2 缺失小鼠的 NO 吸入剂的剂量-响应曲线。与未进行处理的 NOS2 缺失小鼠(+P < 0.05)和用脂多糖进行预处理的野生型小鼠(‡P < 0.001)相比，用脂多糖进行了处理的 NOS2 缺失小鼠对 NO 吸入剂的响应更大。数据用平均值±SE 表示。 Δ PAP = 以其 U46619 诱导增加的百分比的方式表示的肺动脉压的改变。

图 3 是在从用脂多糖进行预处理（野生型/LPS）和未处理（野生型/对照）野生型小鼠上获得的分离-灌注的肺中通过短期 NO 吸入剂而产生的血管舒张的汇总数据图，并且在环境空气中，将用脂多糖预处理（ko/LPS）和未处理（ko/对照）的 NOS2 缺失小鼠获得的分离灌注肺预先在 20 ppm 的 NO 中暴露 16 小时。在进行长期 NO 暴露后，

用脂多糖预处理的 NOS2 缺失小鼠对短期 NO 吸入剂的响应比未接受脂多糖的 NOS2 缺失小鼠对短期 NO 吸入剂的响应低 (* $P < 0.05$)。类似地, 在进行长期 NO 暴露后, 用脂多糖预处理的野生型小鼠对短期 NO 吸入剂的响应比未接受脂多糖的野生型小鼠对短期 NO 吸入剂的响应低 (* $P < 0.05$)。数据用均值 $\pm$ SE 表示。

图 4 是由在从 NOS2 缺失小鼠所获得的分离-灌注的肺内进行的, 在脂多糖激发后, 吸入 0、0.2、2.0 和 20 ppm 的 NO 16 小时, 对随后的对 0.4 ppm 的 NO 气短期吸入剂的血管舒张响应的作用的实验所获得的汇总数据的矩形图。暴露于 2 和 20 ppm 的 NO 气体时增加了肺血管舒张对 NO 的响应。数据用均值 $\pm$ SE 表示。对 0 ppm 的 NO 暴露 16 小时, * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ 。

图 5 是从用脂多糖激活的小鼠(实心圆)和对照小鼠(空心圆)的血管舒张对 NO 吸入剂的响应的实验中所获得的汇总数据的图, 在用脂多糖进行处理的同时, 将用脂多糖激活的小鼠用 N-乙酰半胱氨酸(150 mg/kg, 腹膜内给药)进行处理, 并且 3.5 小时之后重复进行(实心三角形)。与对照小鼠相比, 用脂多糖进行处理的小鼠对 NO 吸入剂的响应减少(* $P < 0.001$)。N-乙酰半胱氨酸(150 mg/kg)的两次给药可以完全保护糖类诱导的对于 NO 吸入剂的血管反应性的减少。血管舒张%是用 U46619-诱导的增加的百分比表示的肺动脉压变化。数据用均值 $\pm$ SE 表示。

图 6 是从同时用腹膜内注射 N-乙酰半胱氨酸或生理盐水进行处理的用脂多糖(LPS)激发的小鼠对 NO 吸入剂的肺血管舒张响应的实验获得的汇总数据的图, 并且该小鼠吸入室内空气或室内空气加上 20 ppm 的 NO 气体 16 小时。在长期吸入 NO 期间, N-乙酰基-半胱氨酸 150 mg/kg 对于用脂多糖激发的小鼠对 NO 的肺血管舒张药的响应的保护作用受到了保护。(对两组中的 LPS+生理盐水* $P < 0.05$)。

图 7 是从用内毒素进行激发 3 小时后, 用生理盐水(对照, 空心柱; $n = 7$)、内毒素(内毒素, 实心柱; $n = 6$)、或内毒素与 5 mg/kg L-NIL(内毒素与 L-NIL(选择性 NOS2 抑制剂), 有斑纹的柱; $n = 5$)腹膜内给药进行处理的野生型小鼠 (+/+) 和 NOS2 缺失小鼠 (-/-), 在左主干支气

管阻塞(LMBO)后 5 分钟左肺血流量的变化分数(QLPA/QPA)实验所得的汇总数据的矩形图。(内毒素对对照, $*P < 0.05$; 野生型对 NOS2 缺失, $P < 0.01$; 内毒素+L-NIL 对只用内毒素, $\#P < 0.01$)。测量是在吸入空气或含 40 ppm NO 的空气 22 小时的过程停止后 1 小时进行的(NO 对无 NO, $\S P < 0.05$)。在 LMBO 后, 内毒素激发造成野生类型小鼠的肺血流重新分配显著减少, 但是在 NOS2 缺失小鼠中却并不显著。在长时间吸入 40 ppm 的 NO 后, 在停止吸入 NO 后 1 小时对用内毒素进行处理的 NOS2 缺失小鼠进行测定, 表明 HPV 的损伤与用内毒素处理的野生型小鼠相同。在停止吸入 NO 后 1 小时进行测定, 吸入 22 小时 40 ppm NO 的用生理盐水进行处理的 NOS2 缺失小鼠和野生型小鼠在 LMBO 后仍然保留着重新分布肺血流的能力。

图 8 是从测定对作为 LMBO 的响应的左肺血管阻力的增加的改变, $\Delta iLPV$, 的实验一缺氧性肺血管收缩(HPV)的测定实验所获得的汇总结果的矩形图。用内毒素激发的野生型小鼠的 HPV 受到了损伤(ETX;与生理盐水激发的小鼠比较, $\#P < 0.05$)。用 500 mg/kg N-乙酰半胱氨酸(NAC;与内毒素同时腹膜内给药)进行处理的用内毒素激发的小鼠的 HPV 得到了保护(与用内毒素激发的小鼠比进行比较, $\ddagger P < 0.05$), 但是用 150 mg/kg N-乙酰半胱氨酸(NAC;与内毒素同时腹膜内给药)处理的小鼠的 HPV 没有得到保护(与用生理盐水激发的小鼠进行比较, $*P < 0.05$)。用 EUK-8, 一种过氧化物、过氧化氢和过硝酸盐清除剂进行处理的用内毒素激发的小鼠的 HPV 被完全保护(与未用内毒素激发的小鼠进行比较, $\ddagger P < 0.05$)。

图 9A-9C 表示的是在带有和不带有短暂的左肺动脉(LPA)堵塞的 LMBO 之前和 LMBO 期间进行的肺和全身血液动力学测定示踪图。描述了在 LMBO 之前(a)和期间(b 和 c)由作用于中枢血流动力学的 LBMO 所诱导的单侧肺泡缺氧作用。在 LBMO 1 分钟后出现全部肺泡萎缩。连续记录用生理盐水进行处理的野生型小鼠在基值和 LMBO 后的右肺动脉(QRPA)平均流量、平均肺动脉压(PPA)、平均全身动脉压(PSA)、和平均导气管压力(PALV)。为了评价右和左肺动脉之间的血流分布, 将左侧肺动脉短暂堵塞, 在该点 $QRPA = QPA$ (见 a 和 c)。

QPA-QRPA 的差等于 QLPA。测定是在基准和 LMBO 后 5 分钟进行的。箭头表示左侧肺动脉的阻塞(90 秒)和释放。

图 10A 是表示通过用静脉注射荧光微球(直径 $15\ \mu\text{m}$)和通过用超声流量探针同时测定 QRPA 而评估的左或右肺血流量百分比的相关性图。其中的数值被表示为在 LMBO 之前或之后右侧或左侧肺的流量分数(用生理盐水进行处理的野生型小鼠; $n = 4$)。注意两种方法之间非常一致($r^2 = 0.967$)。

图 10B 是表示用生理盐水处理的野生型小鼠($n = 6$)在 LMBO 前(基准)和 LMBO 5 分钟后左肺流量-压力关系实验结果的图。左肺动脉流量(QLPA)是用超声流量探针进行测定的,斜率是由于下静脉腔短暂堵塞造成 QPA 减少而产生的(斜率与基准不同, $P < 0.05$)。

图 10C 是说明用生理盐水进行处理的野生型小鼠($n = 3$)在萎缩的左肺重新膨胀期间总的左肺肺脉管阻力(TLPVR)变化的图。该值表现为具有 95%置信区间的所有数据点都线性相关。

图 11 是表示用在内毒素进行处理的野生型小鼠(粗线)和用内毒素进行处理的 NOS2 缺失小鼠(细线)中由 LMBO 诱导的局部缺氧对氧气的全身动脉部分氧压力(PaO_2)的影响的图。在研究开始前 22 小时,通过腹膜内注射 $10\ \text{mg/kg}$ 的大肠杆菌内毒素来进行内毒素的给药。用位于主动脉弓上的 Clark 型氧电极连续记录 PaO_2 。数据是分别用野生型小鼠($n = 5$)和 NOS2 缺失小鼠($n = 3$)所进行的各实验的均值。

图 12 是由血液动力学测定所获得的数据表。在血液动力学实验前 22 小时,用生理盐水(对照组)或内毒素(内毒素组)对野生型小鼠(NOS2 +/+)和 NOS2 缺失小鼠(NOS2 -/-)进行激活,并且进行或不进行 22 小时含 40 ppm 的 NO 的吸入(同样在 NO 吸入停止后 1 小时进行测定),在 LMBO 前(基准)和左肺缺氧(LMBO)后 5 分钟进行血液动力学测定。 $\text{HR} = \text{心率}(\text{min}^{-1})$, $\text{P}_{\text{SA}} = \text{全身动脉压}(\text{mmHg})$, $\text{P}_{\text{PA}} = \text{平均肺动脉压}(\text{mmHg})$, $\text{QPA} = \text{在左肺动脉阻塞期间通过右肺动脉流量}(\mu\text{l} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}\text{bw})$, $\text{Q}_{\text{RPA}} = \text{通过右肺动脉流量}(\mu\text{l} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}\text{bw})$, $\text{Q}_{\text{LPA}} = \text{通过左肺动脉流量}(\mu\text{l} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}\text{bw})$, $\text{Q}_{\text{LPA/QPA}} = \text{左肺动脉流量与在短暂的左肺动脉阻塞期间右肺动脉流量的比率}$ 。通过 ANOVA 将

各组间在 LMBO 前的所有基准值进行比较。对各组结合其后的特定比较用 ANOVA 分析 LMBO 对各参数的影响(与基准比, ^AP < 0.05, ^BP < 0.01, ^CP < 0.001)。

图 13 是从用生理盐水进行激发的野生型小鼠 (n = 7)、用生理盐水进行激发的 5-LO-缺失小鼠(n = 7)、用内毒素进行激发的野生型小鼠 (n = 8)、用内毒素进行激发的 5LO-缺失小鼠(n = 9)、用 5-LO-活化蛋白抑制剂 MK886 进行处理的内毒素激发的野生型小鼠(n = 8),和用 cysLT₁-受体拮抗剂—MK571 进行处理的内毒素激发的野生型小鼠(n = 7)所进行的 LMBO 诱导左肺肺脉管阻力(左 PVR)增加实验所获得的汇总数据的矩形图。与用生理盐水进行激发野生型小鼠比, *P < 0.01; 与用内毒素激活的野生型小鼠比, #P < 0.01。

详细说明

NO 吸入剂

通过吸入的方法安全有效的给予 NO 的方法在现有技术中是已知的。参见例如 Zapol, 美国专利 5,570,683; Zapol 等人, 美国专利 4,938; Frostell 等人, 1991, *Circulation*, 83: 2038-2047。用于吸入的 NO 在商业上是可以获得的(INOmax™, INO Therapeutics, Inc., Clinton, NJ)。在本发明中, NO 吸入优选地与已有的医学实践相吻合。

通过吸入给药的 NO 的适宜起始剂量是 20 ppm。参见例如, INOmax™ 包装说明书(www.inotherapeutics.com)。但是, 该剂量可以根据病人的年龄和状况、所治疗的疾病或病症、以及其它一些主治医师认为相关的因素而进行调整, 例如可从 0.1 ppm 至 100 ppm。优选地吸入最低有效剂量。为了获得经验上的最低有效剂量, 可以从 20 ppm 的剂量开始给药, 然后逐渐降低给药剂量, 直至血管舒张作用消失。在认为 20 ppm 的剂量不能用作有效吸入剂量的情况中, 可逐渐增加 NO 的剂量直至出现血管舒张作用。这种剂量调整是本领域技术人员所惯用的。本发明的一个优点是在许多情况中能用比 NO 单独给药时所需剂量更低的剂量来获得所希望获得的结果。此外, 本发明的方法

还可使在不会对吸入的 NO 发生响应的情况中,例如败血症的肺损伤中对吸入的 NO 产生响应,或即使在急性肺损伤的过程中也可以保留响应。

抗-ROS 剂

活泼氧类(ROS)包括过氧化物自由基($O_2 \cdot$)、过氧化氢(H_2O_2)、以及羟基自由基($OH \cdot$)。这里所说的“抗-ROS 剂”指的是如下的化合物:(1)抑制活泼氧类产生的化合物;或(2)清除活泼氧类的化合物,即一旦产生活泼氧类就与其迅速反应的化合物。在本发明中所用的各种抗-ROS 剂都是已知的。抗-ROS 剂的实例包括:N-乙酰半胱氨酸(Mucosil™)、别嘌呤醇、抗坏血酸(维生素 C)、胆红素、咖啡酸、过氧化氢酶、PEG-过氧化氢酶、儿茶素、血浆铜蓝蛋白、二异丙基水杨酸铜、甲磺酸去铁胺、二甲基脲、依布硒、EUK-8、FeTMTPyP、FETPPS、糖皮质激素、谷胱甘肽、MnTBAP、MnTMPyP、硒代蛋氨酸、过氧化物歧化酶、PEG-过氧化物歧化酶、黄衫素和维生素 E。在本发明的一些实施方案中,可以联合使用两种或多种抗-ROS 剂。优选的抗-ROS 剂是 N-乙酰半胱氨酸(MUCOSIL™, Dey, Napa, CA),它是一种在商业上可获得的,用于气雾剂,例如用常用的喷雾器的适用于吸入的无菌溶液(10%或 20%)。

一些抗-ROS 剂还可清除由 NO 与过氧化物反应而产生的有毒的活泼氮类—过硝酸盐。清除活泼氮类可以减少、部分防止或完全防止与 NO 吸入剂有关的 HPV 损伤,和由于 NO 吸入剂而产生的肺血管舒张的减少。

抗-ROS 剂的给药剂量和途径取决于所使用的特定制剂。各种抗-ROS 剂安全有效的给药剂量和给药途径在现有技术中是已知的,参见例如 Physician's Desk Reference(PDR®),临床药理学 2000,Gold Standard Multimedia (<http://cp.gsm.com/fromcpo.asp>),或销售商的包装说明书。

一种优选的抗-ROS 剂是 N-乙酰半胱氨酸,可以买到如 MUCOMYST™、MUCOSIL-10™、和 MUCOSIL-20™ 的商品。对于 N-乙酰半胱氨酸而言,适宜的给药途径包括口服、直肠给药、雾化气雾剂、和静脉给药。超声或常规的雾化器可用于 N-乙酰半胱氨酸给药。(由于 N-乙酰基-半胱氨酸会与某些金属例如铁、铜和橡胶发生反应,所用与 N-乙酰半胱氨酸接触的雾化装置的任何部件都应当由塑料或玻璃制成)。示范性的 N-乙酰半胱氨酸(MUCOSIL™)给药方案非限制性的包括如下的方案:

20-小时 IV 方案: 15 分钟内用 150 mg/kg IV (用 200 ml 的 D5W 稀释), 随后 4 小时内用 50 mg/kg IV (用 500 ml 的 D5W 稀释), 然后在 16 小时内用 100 mg/kg IV (用 1000 ml 的 D5W 稀释)。

48-小时 IV 方案: 1 小时内用 140 mg/kg IV (按 1:5 的比例用 D5W 稀释), 接着在给予初始负荷剂量后 4 小时给予 12 次给药中的第一个剂量 70 mg/kg IV (按 1: 5 用 D5W 稀释), 每 4 小时给药一次, 总剂量 980mg/kg。48 小时剂量方案中的各剂量是在 1 小时内给药 IV 的。

用面罩、接口管或气管造口术雾化: 成人和青少年: 每 6-8 小时使用 20% 的溶液 5-10 ml, 或 10% 的溶液 10-20 ml。儿童: 每 6-8 小时使用 20% 的溶液 3-5 ml, 或 10% 的溶液 6-10 ml。婴儿: 每 6-8 小时使用 20% 的溶液 1-2 ml, 或 10% 的溶液 2-4 ml。

用 tent 或 croupette 雾化: 成人和儿童: 能提供浓雾的足够容积的 10% 或 20% 的溶液, 可使用多至 300 ml 的溶液。

儿童口服或直肠给药: 5-30 ml 10% 的溶液, 每天给药 3-6 次, 例如每天 4 次, 每次 10 ml。

优选地, 抗-ROS 剂的给药与开始吸入 NO 同时进行。抗-ROS 剂

给药的持续时间取决于所使用的药剂以及吸入 NO 的持续时间。

白三烯阻滞剂

白三烯是一类天然存在于白细胞中的具有生物学活性的化合物。白三烯能产生与组胺所产生的过敏和炎症反应相类似的过敏和炎症反应。花生四烯酸通过 5-脂肪氧合酶(5LO)和 5LO-活化蛋白(FLAP)的作用而被转化成白三烯 A₄。白三烯 A₄ 被迅速转化成白三烯 B₄(LTB₄)和白三烯 C₄(LTC₄)。LTC₄ 又被转化成白三烯 D₄(LTD₄)和 E₄(LTE₄)。LTC₄、LTD₄ 和 LTE₄ 也被称为半胱氨酰白三烯,与 Cys LT₁ 和 Cys LT₂ 受体相互作用。这里所说的“白三烯阻滞剂”指的是如下的化合物:(1)抑制白三烯生物合成途径中的步骤的化合物;或(2)抑制白三烯受体活化作用的化合物。白三烯阻滞剂的实例包括: 孟鲁司特(montelukast)(SINGULAIR®;Merck;选择性和口服的白三烯受体拮抗剂)、扎鲁司特(zafirlukast)(ACCOLATE®;AstraZeneca;选择性肽白三烯受体拮抗剂)、齐留通(zileuton)(ZYFLO®;Abbott;口服活性 5LO 抑制剂)、潘库司特(prankulast)、MK-571、MK-591、MK-886、BAYx1005、西那司特(cinalukast)、乙二胺泊比司特(pobilukast edamine)、MK-679 和 ZD2138。在本发明的一些实施方案中,可联合使用两种或多种白三烯阻滞剂。优选的白三烯阻滞剂是孟鲁司特(SINGULAIR®),一种选择性和口服的白三烯受体拮抗剂;扎鲁司特(ACCOLATE®),一种白三烯 D₄ (LTD₄)和白三烯 E₄ (LTD₄)的选择性和竞争受体拮抗剂;和齐留通(ZYFLO®),一种口服活性 5LO 抑制剂。

一种或多种白三烯阻滞剂的给药剂量和给药途径取决于所用的特定药剂。各种白三烯阻滞剂安全有效的给药剂量和给药途径在现有技术中是已知的,参见例如 Physician's Desk Reference (PDR®) 或销售者的包装说明书。例如,优选的扎鲁司特(ACCOLATE®)成人给药剂量为 20 mg,一天两次,以片剂的形式口服给药。在另一个实施例中,孟鲁司特(SINGULAIR®)的成人给药剂量为 10 mg,一天一次,以片剂的形式口服给药。

优选地，在开始吸入 NO 时同时进行白三烯阻滞剂的给药。白三烯阻滞剂给药的持续时间取决于所用的药剂和吸入 NO 的持续时间。

肺损伤

虽然在一般的 NO 吸入治疗期间可以有利的利用本发明，但本发明尤其用于改善患有肺损伤，包括急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的病人的氧合作用。急性肺损伤的实例包括：弥散性肺感染(例如 病毒性、细菌性、真菌性肺感染)；吸引术 (aspiration) (例如胃内容物、在接近淹溺情况中的水、新生儿胎便)；吸入毒物和刺激物(例如氯气、NO₂ 烟尘、臭氧、高浓度的氧气)；麻醉剂过量的肺水肿(例如海洛因、美沙酮 (methadone)、吗啡、右旋丙氧吩)；非麻醉药物的影响(例如硝基呋喃妥因)；对于宿主抗原的免疫反应(例如古德帕斯切综合症、全身性红斑狼疮)；与肺的外部作用引发的全身反应(例如革兰氏阴性的败血症、出血性胰腺炎、羊水栓塞症、脂肪栓)有关的伴有低血压的非胸部创伤的影响(“肺休克”)；和包括肺挫伤、肺移植、心肺分流术肺损伤、以及肺切除术后肺水肿在内的外伤后肺损伤。

HPV 损伤

本发明的方法可用于减少、部分防止或完全防止与 NO 吸入剂有关的 HPV 损伤。存在 HPV 损伤的迹象包括可通过病人的蓝色来显现出来的低血氧合作用(低血氧)、氧饱和度减少、精神状况的改变、神经机能障碍、呼吸困难、心动过速和低血压。存在 HPV 损伤的症状包括呼吸短促和胸痛。HPV 损伤或减少的诊断是现有技术中的常用技能。

可能会出现 HPV 损伤或减少的病人包括患败血症的病人和患有潜在的肺部炎症的病人。肺部炎症可由例如肺炎或急性呼吸窘迫综合征的情况而导致。

NO 吸入响应的损伤

本发明的方法可用于减少、部分防止或完全防止作为 NO 吸入响应的血管舒张的减少。作为 NO 响应的肺血管舒张减少意味着 NO 不能增加氧合作用或不能降低肺动脉压(PAP)。不能降低 PAP 的迹象包括心输出量减少和右心衰竭，表现为如休克、浮肿和全身水肿。

可能会出现作为 NO 响应的肺血管舒张减少的病人包括患败血症的病人和患有潜在的肺部炎症的病人。肺部炎症可由例如肺炎或急性呼吸窘迫综合征的情况而导致。

实验资料

实施例 1: 抗-ROS 剂和作为对 NO 的响应的肺脉管的损伤

从用内毒素进行激发的小鼠所获得的实验证据表明对活泼氧和活泼氮类的清除可以防止作为 NO 响应的肺脉管的损伤。这些实验是用 NOS2 缺失小鼠进行的，其中将长期 NO 吸入剂与除 NO 之外的内毒素诱导因素一起给药会损伤肺部脉管系统对随后的 NO 吸入剂的血管舒张的反应能力。可以用 U46618 进行预收缩的分离-灌注肺来对吸入 NO 后的响应进行评估。在进行肺分离前用内毒素处理 16 小时的野生型小鼠对 NO 吸入剂的响应受到了损害(图 2A)。用内毒素进行处理的 NOS2 缺失的小鼠对 NO 吸入剂的响应没有受到损害(图 2B)。在进行肺分离前暴露于 20 ppm 的 NO 达 16 小时的野生型小鼠对 NO 吸入剂的响应没有受到损害。用内毒素进行处理和暴露于 NO 吸入剂 16 小时的小鼠对 NO 吸入剂的响应受到了损害(图 3)。用生理盐水替代内毒素对 NOS2 缺失对照小鼠进行处理并将其暴露于 20 ppm 的 NO 吸入剂下 16 小时，该小鼠对于 NO 吸入剂的响应能力没有受到损害。在用内毒素进行处理的野生型小鼠中，活泼氧和活泼氮类的清除剂，包括 N-乙酰半胱氨酸(图 5)、二甲基脲、EUK8、和过氧化氢酶，也可防止对 NO 吸入剂响应的损伤。尽管长时间的吸入 NO，但 N-乙酰基-半胱氨酸可以防止内毒素激发的野生型小鼠的肺脉管对 NO 吸入剂的响应受到损害(图 6)。

图 5 所示的实验结果证明用 N-乙酰半胱氨酸进行处理可以保护内毒素激发的野生型小鼠对 NO 吸入剂的响应。图 6 所示的实验结果证明了 N-乙酰半胱氨酸的保护机理不仅仅是对内毒素诱导的肺 NOS2 表达的抑制。

方法和材料

这些研究是经过麻萨诸塞州中心医院的实验动物管理委员会批准的。用列于表 1 中的和在这里所述的 78 只重 20-35 g 的成年雄性小鼠来进行研究。NOS2 缺失小鼠(MacMicking 等人,1995,Cell, 81 : 641-650)是由 Dr.Carl Nathan 所提供的。用具有相同背景的小鼠(双亲品系为 SV129 和 C57 Black/6 的 F1 代)作为野生型小鼠(Hickey 等人,1997,FASEB J.,11: 955-964)。

分离的、灌注的并进行通气的小鼠肺模型 通过腹膜内注射戊巴比妥钠(200 mg/kg 体重)处死的小鼠,并将其放置在 37℃的水冷却室中(Isolated Perfused Lung Size 1 Type 839; Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany)。将气管分离出来并进行插管,并用限制容量的通风机(687 型; Harvard Apparatus, South Natick, MA)以 85 次/分的通气速率和 2cm H₂O 的末端呼气压力向肺中通入 21%的 O₂、6%的 CO₂ 和 73%的 N₂。在各研究中将潮流般的气量调节至能提供 10cm H₂O 的吸气峰压。通过胸骨中线切开术而将肺暴露出来,在肺的主动流出通道上进行结扎。在向右心室中注射 10 IU 的肝素后,通过右心室用不锈钢套管(1 mm 的内径)对肺动脉进行插管。经由一根通过左心室顶端穿过二尖瓣瓣膜并穿入到左心房中的不锈钢套管(内径为 1 mm)将肺静脉流出物排出。将左心房压力维持在 2 mmHg。在 37℃将一种非循环体系恒速灌注到肺中(50ml · kg 体重⁻¹ · min⁻¹; Ismatec Reglo-Analogue 滚轴泵;Laboriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Germany)。所用的灌注液是包含 1.26 mM CaCl₂、5.33 mM KCl、0.44 mM KH₂PO₄、0.50 mM MgCl₂、0.41 mM MgSO₄、138.0 mM

NaCl、4.0 mM NaHCO₃、0.3 mM Na₂HPO₄、以及 5.6 mM 葡萄糖的 Hanks 平衡盐溶液(GibcoBRL,Grand Island, NY) 。将 5%的牛血清蛋白和 5%的葡聚糖(二者均得自 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)加入到该灌注液中以防止肺水肿, 该肺水肿与 Holzmann 等人,1996, Am. J. Physiol. 271: L981-L986 在被分离、灌注和通气的大鼠肺中所描述的基本相同。将 30 mM 的消炎痛 (Sigma Chemical Co.) 和 1mM L-NAME (Sigma Chemical Co.) 加入到该灌注液中以分别抑制内源性前列腺素和 NO 的合成。向其中加入碳酸氢钠以便将该灌注液的 pH 值调节到 7.34-7.43。

如果肺具有同质的白色外观, 没有止血或膨胀不全的迹象, 并且在开始的 10 分钟基准灌注期间的第二个 5 分钟期间表现出低于 10 mmHg 的稳定灌注压, 则该肺可用于本研究。根据这两个标准, 在研究之前各组中有大约 15%的肺制品被丢弃。

分别经由与流入和流出套管侧口相连的填充生理盐水的膜压力转换器(Argon, Athens, TX)来测定肺动脉压力(PAP)和左心房压力。导气管压力(Paw)是用与恰好位于 Y 段前的吸气枝相连的微分压力转换器(MP-45-32-871 型; Validyne Engineering Corp.,Northridge, CA)来进行测定的。压力转换器与生物学放大器(Hewlett Packard 7754B, Andover,MA)相连, 数据是在 150 Hz 下在个人电脑上用带有数字采集系统(DI-220; Dataq Instruments, Akron, OH)的数字模拟界面来进行记录的。在每次试验前要对该系统进行校准。

对于 NO 吸入剂而言, NO 气体(氮气中 800 或 80 ppm NO, Airco, Murray Hill,NJ)与氧气、二氧化碳、以及氮气进行混合(氧气混合机; Bird Corporation, Palm Springs, CA) 以得到 21% O₂、6% CO₂,和所希望 NO 浓度的最终浓度。对 NO 和较高氧化状态的 NO(NO_x;CLD 700 AL;Eco Physics, Dumten, Switzerland)、氧 (Hudson Ventronics Ddivision, Temecula, CA)、以及二氧化碳(Datex C02 监测器; Puritan-Bennett

Corpration, Los Angeles,CA)的浓度进行连续监测。

在用脂多糖进行激发后肺脉管对 NO 吸入剂的响应 在分离的肺进行灌注前 16 小时,将野生型小鼠和 NOS2 缺失小鼠以 50 mg/kg 体重的量腹膜内注射溶解于生理盐水中的大肠埃希氏杆菌 0111 : B4 脂多糖(LPS; Difco Laboratories, Detroit, MI)。该时间点的选择是以前用大鼠进行的研究为基础的 (Holzmann 等人, 1996, Am. J.Physio. 271: L981-L986)。用未进行处理的野生型和 NOS2 缺失小鼠作为对照。

在开始的 10 分钟基准灌注期间,通过连续输入血栓素 A2 类似物 U-46619 (Cayman Chemicals,Ann Arbor, MI)来诱导肺血管收缩。调节灌注速率以使得 PAP 稳定增加 5 或 6 mmHg。然后,通过随后分别向肺各通入 5 分钟的 0.4、4 和 40 ppm 的 NO 来获得吸入 NO 后的剂量-响应曲线。在 NO 通气的各周期后,使 PAP 回到被 NO 升高前的基准水平上。如果在停止吸入 NO 后 5 分钟,PAP 不在吸入 NO 前的值 $\pm 10\%$ 的范围内,则重新调整 U-46619 的输入。对于吸入的 NO 的血管舒张响应(Δ PAP)的测定同由吸入 NO 而产生的 PAP 的变化一样(在吸入 NO 后 5 分钟 PAP 减去吸入 NO 前的 PAP)是用 U-46619 诱导的 PAP 增加的百分比表示的(NO 前的 PAP 减去最初基准的 PAP)。

NO 暴露对吸入 NO 的肺脉管响应的作用 四组小鼠吸入 20 ppm 的 NO 16 小时。一组野生型小鼠和一组 NOS2 缺失小鼠在临暴露于 NO 前被腹膜内注射 50 mg/kg 的脂多糖。另外的野生型和 NOS2 缺失小鼠不用脂多糖进行处理就接受 NO 吸入剂。在暴露于 NO 16 小时后,如前面所描述的那样将肺分离出来并进行灌注。通过输入 U46619 来诱导肺血管收缩,并测定对 0.4、4 和 40 ppm NO 的血管舒张反应。

在进行环境压力的 NO 暴露期间,动物被关在 40l 丙烯酸小室内。在如前所述的新鲜 NO(在氮气中含 10,000 ppm NO;Airco,Murry Hill, NJ)、空气、以及氧气的高流速下用碱石灰下小心控制 NO 和 NO_x 的

浓度(Steudel 等人, 1998,101: 2468-2477)。

将另外两组 NOS2 缺失小鼠用脂多糖进行处理(50 mg/kg, 腹膜内给药), 然后将其分别暴露于 0.2 和 2 ppm 的 NO 吸入剂。16 小时以后, 进行分离肺灌注研究, 测定吸入 0.4、4 和 40 ppm 的 NO 所产生的肺血管舒张度。

肺湿重-干重比例 在各实验结束时, 将不包括肺门结构的两叶的肺切除下来并进行称重(湿重)。其后, 用以前所描述的方法(Holzmann 等人, 同上), 将该肺用微波炉干燥 60 分钟, 然后重新称重(干重)。通过用湿重除以干重来计算肺的湿-干重比例。

统计学分析 所有数据都被表示为均值±标准偏差(SE)。为了对各组进行比较, 采用方差的双侧分析。当通过方差分析发现有显著差异时, 用一种在后的最小显著差异试验来进行有计划的比较(Statistica for Windows; StatSoft, Inc., Tulsa,OK)。统计学显著被定为 P 值<0.05。

结果

以恒定的灌注液流速输入 U46619 能引起 PAP 的稳定增加, 在实验结束时, 这种增加在停止输入 U46619 后可以被逆转。U46619 的剂量必须能使 PAP 增加 5 或 6 mmHg, 在用脂多糖进行预处理和未进行处理的野生型和 NOS2 缺失小鼠中没有差别。

腹膜内注射脂多糖的小鼠出现与野生型和 NOS2 缺失小鼠程度相似的竖毛、腹泻、和嗜眠。在注射脂多糖后 16 小时的死亡率约为 15%, 在两种小鼠种属间没有差别。

肺脉管对于 NO 吸入剂的响应 在所有的组中, 吸入 NO 能以剂量依赖的方式降低 PAP。图 1 是表示用未进行处理的野生型小鼠的分离

灌注的肺测定肺动脉压(PAP;等于灌注压)和左心房压力(LAP)实验的示踪图。将稳定的血栓素 A2 类似物 U46619 进行输入以将 PAP 增加 5 或 6 mmHg。将肺用各种浓度的 NO 气体 (0.4、4.0 和 40 ppm) 进行通气,各通入 5 分钟。在停止输入 NO 后,使 PAP 恢复到吸入 NO 前的水平。这些结果表明,在小鼠的分离灌注肺中,易于测定肺动脉压力、易于诱导稳定的肺血管收缩、易于通过通入低浓度的 NO 气体来减少肺血管收缩。

在用脂多糖进行激发的野生型小鼠的分离灌注肺中,吸入 0.4 和 4 ppm 的 NO 时, PAP 分别下降 79%和 45%, 低于未进行处理的动物相($P < 0.001$; 图 2A)。这些组之间对于 40 ppm NO 的肺血管舒张响应没有差别。未进行处理的 NOS2 缺失小鼠与未进行处理的野生型小鼠对于 NO 的响应没有差别。相反,从用脂多糖进行激发的 NOS2 缺失小鼠所获得的肺对吸入的 NO 表现出比脂多糖处理的野生型小鼠的肺更强的血管舒张(在各 NO 剂量下 $P < 0.001$;图 2B)。此外,与未进行处理的 NOS2 缺失小鼠相比,用脂多糖进行处理的 NOS2 缺失小鼠的 NO 诱导的血管舒张增强(在各剂量下, P 分别 < 0.05 ; 图 2B)。

图 2A 中的数据表明,在通入 0.4 和 40 ppm 的 NO 时,内毒素激发损害了野生型小鼠扩张其肺部脉管系统的能力($*P < 0.001$)。图 2B 中的数据表明内毒素激发不损害对吸入 NO 的肺血管舒张响应。内毒素增加了 NOS2 缺失小鼠肺部脉管系统对所通入的 0.4、4 和 40 ppm 的 NO 的扩张反应($+P < 0.05$)。内毒素激发的 NOS2 缺失小鼠对于吸入的 NO 的肺血管舒张反应高于内毒素激发的野生型小鼠($\dagger P < 0.001$)。

在暴露 NO 吸入剂后肺脉管对 NO 的响应 为了研究 NO 分子在 NO 吸入剂响应低下的形成中所扮演的角色,我们研究了吸入带有 20 ppm NO 的空气 16 小时的用脂多糖进行了处理和未进行处理的 NOS2 缺失和野生型小鼠。预先暴露于 NO 吸入剂并不能改变随后由未进行

处理的野生型或 NOS2 缺失小鼠或用脂多糖进行了预处理的野生型小鼠所获得的灌注肺对吸入的 NO 的响应。相反,与未进行 NO 暴露的用脂多糖进行了预处理的小鼠相比,暴露于环境 NO 下 16 小时用脂多糖进行了预处理的 NOS2 缺失小鼠对 NO 吸入剂的肺血管舒张响应降低。在将由在 20 ppm 的环境 NO 中暴露 16 小时的小鼠所获得的分离灌注肺中,在用脂多糖进行预处理(对未处理的对照组比)后,在 0.4(Δ PAP-24 $\pm$ 4%与-42 $\pm$ 4%比; $P < 0.05$)和 4 ppm(Δ PAP-39 $\pm$ 5%与-58 $\pm$ 4%比; $P < 0.01$)的 NO 时,随后对 NO 吸入剂的血管舒张响应受到了损害,但是在 NO 为 40 ppm 时却并没有受到损害(Δ PAP-55 $\pm$ 3% 与-62 $\pm$ 5%比; $P =$ 不显著;图 3)。类似于预先未进行 NO 吸入剂暴露的动物,与未进行处理的在肺灌注实验前吸入 16 小时 20 ppm NO 的野生型小鼠相比,用脂多糖进行了预处理的野生型小鼠的 NO 诱导的血管舒张减少(图 3)。

在进行长时间的 NO 暴露后,内毒素激发的 NOS2 缺失小鼠对短期 NO 吸入剂的响应比未接受脂多糖的 NOS2 小鼠低(* $P < 0.05$)。类似地,在进行长时间 NO 暴露后,用脂多糖进行了预处理的野生型小鼠对于短期 NO 吸入剂的响应比未用脂多糖进行预处理的野生型小鼠低(* $P < 0.05$)。这些观察到的结果证明了 20 ppm NO 的长期吸入不损害未进行处理的野生型或 NOS2 缺失小鼠对随后通入的 NO 的肺血管舒张响应。相反,20 ppm NO 的长期吸入显著损害用内毒素进行了激发的 NOS2 缺失小鼠对随后吸入的 NO 的肺血管舒张响应(与图 2B 中的数据进行比较)。

为了测定吸入 16 小时低水平的 NO 是否会损害对肺灌注期间短期 NO 吸入剂的血管反应性,将用脂多糖进行了处理的 NOS2 缺失小鼠暴露于 0.2 和 2 ppm 的 NO 吸入剂。在 NOS2 缺失小鼠中,在脂多糖给药后吸入 16 小时 0.2 ppm 的 NO 不会引起随后的对短期吸入 NO 的响应性低下。但是,与对照组小鼠的响应相比,吸入 16 小时 2 ppm 的 NO 降低了对 0.4 ppm NO 吸入剂的血管舒张响应($P < 0.05$;图 4)。

肺湿-干重比例 在灌注后通过没有变化的肺湿-干重比例可以证明没有出现肺水肿。在用脂多糖进行预处理的野生型(湿重-干重: 4.3 ± 0.2)和 NOS2 缺失(4.8 ± 0.1)小鼠间、或在未进行处理的野生型(4.6 ± 0.1)和未进行处理的 NOS2 缺失(4.6 ± 0.1)小鼠间没有差异。与未进行暴露的小鼠相比,暴露于 NO 吸入剂 16 小时不影响用脂多糖进行预处理的野生型(4.9 ± 0.1)和 NOS2 缺失(5.1 ± 0.2)小鼠或未进行处理的野生型(4.5 ± 0.3)和未进行处理的 NOS2 缺失(4.8 ± 0.1)小鼠的肺湿-干重比例。肺湿-干重比例与对吸入 NO 所产生的血管舒张响应并不相关。

N-乙酰半胱氨酸的作用 我们对用 N-乙酰半胱氨酸(NAC)来清除活泼氧类是否能预防用内毒素激发的小鼠对 NO 吸入剂的肺血管舒张响应进行了研究。野生型小鼠用内毒素进行处理(大肠杆菌 011:B4-LPS, 50 mg/kg, 腹膜内给药), 然后立即和在 3.5 小时之后给予生理盐水或 NAC(150 mg/kg, 腹膜内给药)($n=5$)。另外的用内毒素激发的用 NAC 处理的小鼠吸入 16 小时的 20 ppm 的 NO。

在内毒素激发后, 将小鼠的肺分离出来, 进行 16 小时的灌注和通气。将仅用生理盐水处理并吸入室内空气的小鼠的肺作为对照($n=10$)。用 U46618 诱导肺血管收缩, 并测定吸入 0.4、4.0 和 40 ppm 的 NO 的血管舒张响应。与对照小鼠相比, 用内毒素激发的小鼠对于 0.4、4.0 和 40 ppm 的 NO 的血管舒张反应分别为 $32 \pm 13\%$ 、 $43 \pm 10\%$ 、和 $53 \pm 8\%$ (与对照比, $p < 0.001$)(图 6)。相反, 用 NAC 进行了处理的用内毒素进行激发的小鼠对 NO 吸入剂的血管舒张响应分别为 $75 \pm 14\%$ 、 $103 \pm 15\%$ 、和 $91 \pm 7\%$, (与 LPS 比, $p < 0.001$)(图 6)。还可以保护用内毒素进行激发的用 NAC 进行了处理的并暴露于 20 ppm 的 NO 的小鼠对 NO 吸入剂的响应。这表明 NAC 不能通过防止内毒素诱导的肺 NO 水平的增加而防止对急性 NO 吸入剂的响应。这些结果证明了 NAC(一种活泼氧类清除剂)在防止内毒素诱导的 NO 吸入剂响应损伤中的效能。

实施例 2: HPV 和活泼氧类清除剂

所得的实验证据表明活泼氧类清除剂可以防止用内毒素激发的小鼠的 HPV 损伤。为了研究 NOS2 在内毒素诱导的 HPV 损伤中所扮演的角色, 我们比较了野生型小鼠和先天 NOS2 缺失的小鼠在主流支气管阻塞(LMBO)后重新分配肺血流量重的能力。对于这些实验而言, 我们研制出一种鼠 LMBO 模型。这使得我们可以用无伤小鼠来评估内毒素对 HPV 的影响。

图 7 所示的结果证明 LMBO 使得肺血流量重新分布, 离开缺氧的左肺, 反映为左肺血流量与总肺血流量比例(QLPA/QPA 比例)的负变化。在 LMBO 后, 野生型小鼠的内毒素激发可引起肺血流量重新分配显著减少(内毒素与对照比, $*P < 0.05$), 但是 NOS2 缺失小鼠不这样(与野生型小鼠比, $P < 0.01$)。早给予 L-NIL 可以防止 LMBO 诱导的肺血流量重新分布的减少(与用内毒素激发但不用-NIL 进行处理的小鼠比, $\#P < 0.01$)。在长期吸入 40 ppm 的 NO 后, 用内毒素进行了处理的 NOS2 缺失小鼠表现出与用内毒素进行了激发的野生型小鼠一样的 HPV 损失(与不吸入 NO 的比, $\$P < 0.05$)。在停止吸入 NO 后, 进行了 40 ppm NO 16 小时吸入的用生理盐水进行激发的 NOS2 缺失小鼠和野生型小鼠保留了在 LMBO 后重新分配肺血流量的能力。这些结果表明, 由于内毒素诱导的 NOS2 表达或由于 NO 吸入而导致的肺 NO 水平增加是用内毒素进行激发后 HPV 的减少所必须的。但是, 只是长期暴露于增加的肺 NO 水平对于减少 HPV 而言并不够(正如在 NO 吸入停止后 1 小时所测定的那样)。

我们对作为 LBMO 响应的增长的左肺脉管阻力的变化, $\Delta iLPV$ 进行了实验—HPV 的测定。用内毒素进行激发的野生型小鼠的 HPV 受到了损害(图 8)。用 500 mg/kg 的 N-乙酰半胱氨酸进行了处理(与内毒素一起被腹膜内给药)的内毒素激发小鼠的 HPV 受到了保护, 但是用 150 mg/kg 的 N-乙酰半胱氨酸进行处理的小鼠的 HPV 受到了

损害。在用 EUK-8, 一种过氧化物、过氧化氢和过硝酸盐清除剂进行了处理的用内毒素进行激发小鼠的 HPV 受到了完全保护。

从上述实验我们发现, NOS2 缺失可以保护小鼠不受内毒素诱导的 HPV 损伤。我们进一步发现活泼氧类清除剂可以防止内毒素激发的野生型小鼠的 HPV 损伤(图 8)。

支持这些结论的六个证据是: (1)在野生型小鼠中, LMBO 能增加左肺的肺脉管阻力(PVR), 但是在内毒素激发 22 小时后, LMBO 诱导的左肺血管收缩受到了损害; (2)在未暴露于 NO 的内毒素激发的 NOS2 缺失小鼠中, LMBO 诱导的左肺血管收缩没有受到损害(图 7); (3)在暴露于 40 ppm 的 NO 22 小时的用内毒素进行激发的 NOS2 缺失小鼠中, LMBO 诱导的左肺血管收缩受到了损害(图 7); (4)仅仅长期吸入 NO 不损害小鼠的 HPV, (图); (5)N-乙酰半胱氨酸或 EUK-8 防止了内毒素激发的野生型小鼠的 HPV 损害(图 8); 和(6)用 N-乙酰半胱氨酸进行处理并暴露于 20 ppm 的 NO 22 小时的用内毒素进行激发的野生型小鼠的 HPV 没有受到损害。

方法和材料

在获得麻萨诸塞州中心医院实验动物委员会组织机构的批准后, 我们用 SV129/B6F1 野生型小鼠(SV129 和 C57 BL/6 小鼠的 F1 代)和 SV129 野生型小鼠 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA), 和带有 SV129 和 C57BL/6 杂交背景的 NOS2 缺失小鼠(MacMicking 等人, 1995, Cell, 81 : 641-650)(由 C.Nathan, Cornell University, New York, NY 提供)进行了研究。在追加的研究中, 用在 C57BL/6 背景上逆代杂交 10 代(C57BL/6 Nos2tmlLau,N10-逆代杂交代;The Jackson Laboratory)的 NOS2 缺失小鼠 (18), 以及野生型 C57BL/6 小鼠进行研究。

使用动物年龄、体重、以及性别相匹配的实验组。用年龄在 2-5 个月、体重 18-30 g 范围的雄性和雌性小鼠进行研究。

组 1： 对照组。将 SV129/B6F1 野生型小鼠(n = 5)、SV129 野生型小鼠(n = 7)和 NOS2 缺失小鼠(n = 7)腹膜内注射 0.2 mL 的生理盐水，22 小时后进行研究。

组 2： 用内毒素进行处理的组。 在通过腹膜内注射 10 mg/kg 溶解于 0.2 mL 生理盐水中的大肠埃希氏杆菌 011B4 内毒素进行激发后 22 小时，对 SV129/B6F1 野生型小鼠(n = 5)、SV129 野生型小鼠(n = 6)、以及 NOS2 缺失小鼠(n = 6)进行研究。此外，在通过腹膜内注射 10 mg/kg 溶解于 0.2 mL 生理盐水中的内毒素进行激发后，对 C57BL/6 野生型小鼠(n = 7)和 C57BL/6Nos2tmlLau 小鼠(n = 5)进行研究。

组 3： 用内毒素+L-NIL 进行处理的组。 将 SV129/B6F1 野生型小鼠(n = 5)腹膜内注射 10 mg/kg 的溶解于 0.2 mL 生理盐水中的大肠杆菌 011B4 内毒素。在内毒素激发后 3 小时，通过腹膜内给予 L-NIL 5 mg/kg 来对小鼠进行处理。在用内毒素进行激发后 22 小时进行研究。另外，在 LMBO 期间，对预先进行了(n=5)或未进行(n=4)内毒素激发（22 小时前）的 SV129/B6F1 小鼠静脉注射给予 5 mg/kg L-NIL 后的急性反应进行了研究。我们选择 5 mg/kg 的 L-NIL 腹膜内给药剂量是因为已经表明类似的剂量可以有效的抑制啮齿类动物炎症模型体内的 NOS2 活性(Schwartz 等人, 1997, J. Clin. Invest. 100: 439-448)。

组 4： 长期暴露于 4 或 40 ppm 的 NO。 用生理盐水进行处理的 SV129 野生型小鼠(n = 5)和 NOS2 缺失小鼠 (n = 5)，吸入含有 40 ppm 的 NO 的空气 22 小时，在停止吸入 NO 后 1 小时进行研究。在用 10 mg/kg 内毒素腹膜内给药进行激发后，使 SV129 野生型小鼠(n = 5)和 NOS2 缺失小鼠(n = 5)吸入含有 40 ppm NO 的空气 22 小时，在停止吸入 NO 后 1 小时进行研究。在用 10 mg/kg 内毒素腹膜内给药进行激发后，使另外的 NOS2 缺失小鼠 (n = 4)吸入含有 4 ppm NO 的空气 22 小时，在停止吸入 NO 后 1 小时进行研究。

组 5: 连续的 PaO_2 和 PvO_2 测定。在用 10 mg/kg 内毒素腹膜内给药进行激发后 22 小时, 在 LMBO 前和 LMBO 期间, 对 SV129/B6F1 野生型小鼠($n = 3$)和 NOS2 缺失小鼠($n = 3$)的 PaO_2 连续进行评价。在用 100mg/kg 内毒素腹膜内给药进行激发后 22 小时, 在 LMBO 之前和期间, 对 SCV129/B6F1 野生型小鼠 ($n=4$) 和 NOS2-缺失小鼠 ($n=4$) 的 PvO_2 连续进行评价。在用生理盐水进行处理的 SV129 野生型小鼠中, 没有预先进行内毒素激发, 在控制条件下对 LMBO 前和 LMBO 期间的 PaO_2 ($n = 4$)和 PvO_2 ($n = 4$)进行研究。

组 6: 对于增加剂量的静脉血管紧张素 II 的肺脉管响应。在激发后 22 小时, 对用内毒素($n = 5$)或生理盐水($n = 3$)进行处理的 SV129/B6F1 野生型小鼠进行研究。

实验准备 通过腹膜内注射氯胺酮(0.1 mg/g 体重[bw])对小鼠进行麻醉。用以前所描述的方法来进行气管造口术和动脉导管插入术(Steudel 等人, 1997, Circ. Res., 81: 34-41)。将一种与 2 French Fogarty 动脉栓塞导管(Baxter Healthcare Corp., Irvine, California, USA) 相连的专门定制的气管内插管(22G Angiocath; Becton Dickinson Healthcare Systems, Sandy,Utah, USA)插入到气管中, 使得头上剩余的 Fogarty 导管的囊状末端留在气管内。以每分钟 110-120 的呼吸速率、1.0 的 FiO_2 、13 cm H_2O 的吸气峰压力和 23 cm H_2O 的正末端呼气压力开始进行控制容积的通气。实施右胸骨旁的胸廓切开术, 并将小管的超声流量探针(1RB ;Transonic Instruments, Ithaca, NY)放置在右肺动脉周围并用微型操纵器(X-tra Hand;TechniTool, Plymouth, PA)将其固定于一定的位置上。用 4-0 丝质缝合线将其固定在左主肺动脉上以造成短暂的脉管阻塞。将一根肺动脉导管(PE 10)通过直接穿刺而插入到主肺动脉中。在其它的实验中, 按以前所报道的方法(Steudel 等人, 同上)放置低级胸主动脉流量探针。

在一些研究中, 用与 PE10 管相连的 30G 针刺穿从右中叶流出的肺静脉, 并用微型夹进行固定, 以评估左心房压力(PLA)。为了测定主动脉中的氧分压 (PaO_2), 经由颈动脉将一种柔软的极谱的 Clark 型 PO_2 电极 (LICOX A3-Revoxode, 1.5 Fr.; GMS Gesellschaft fuer medizinische Sondentechnik, Kiel, Germany) 引入到主动脉弓上。为了测定肺动脉中的氧分压 (PvO_2), 将右心室流出通道刺穿, 并将氧电极放入肺动脉中。在每次实验前和实验后, 在空气中, 环境压力下, 用试验探针套管对电极进行校准。用腹膜内注射氯胺酮(0.1 mg/g bw)和甲苯噻嗪(0.01 mg/g bw)来维持麻醉, 并同时腹膜内注射巴夫龙(0.002 mg/g bw)以产生肌肉松弛效果。

血流量和压力测定 用生物医学放大器(Hewlett Packard 8805C, Palo Alto, CA; Siemens Sirecust 960, Danvers, MA)对平均全身动脉压(PSA)、平局肺动脉压(PPA)、和一些研究中的 PLA 进行连续监测。用与流量计(T106 ; Transonic Instruments)相连的小管流量探针来测定平均降低的胸廓主动脉流量(QLTAF)和右肺动脉流量(QRPA)。在一些实验中, 用 1.4 Fr. Millar 导管来测定左心室末端舒张压。该导管通过右颈动脉被导入到左心室中。所有的测定信号都被传递到一个数字模拟转换器中, 被显示于计算机屏幕上, 并用个人电脑上的数据采集系统(DI 220; Dataq Instruments, Akron, OH)在 640 Hz 下进行记录。在各实验前对所有的监测装置进行校准。

左和右肺动脉流量的鉴别测定 为了评价 QRPA 和左肺动脉流量(QLPA)对总肺动脉流量(QPA)的贡献, 进行左肺动脉(QLPA)的短暂阻塞(90 秒)。在急性左肺动脉阻塞期间的 QRPA 被认为是 QPA(即心输出量)并与 QLTAF 紧密相关($r^2 = 0.88$; $y = 0.95x + 0.38$; $n = 9$)。QLPA 是通过左肺动脉阻塞期间的 QRPA(QPA)和左肺动脉的放开期间的 QRPA 间的差异计算出来的 ($\text{QLPA} = \text{QPA} - \text{QRPA}$)。各自流量的绝对值被记录了下来, 可以计算出右和左肺流量的分布分数(QRPA/QPA 和 QLPA/QPA)。

当在较低的胸廓主动脉处进行测定时，由于血流流失到上端和顶端，所以在左肺动脉(QLPA)的短暂阻塞期间，可以通过 QRPA 的测定来对 QPA 进行评估。此外，增加第二流基探针可能会增加误差，由于小鼠的体积小，所以会增加手术创伤和对动物的压力。

单侧肺泡缺氧 为了诱导局部(即左肺)肺泡缺氧，通过视觉的控制向左主干支气管中导入一根具有扁平的囊状末端的 Fogarty 导管来可逆性的阻塞该左主干支气管(LMBO)。在大约 1 分钟内可以用眼观察到左肺完全萎缩，并且可以通过右肺短暂的过度膨大来得到证实。在 LMBO 期间，连续测定 PPA、PSA、和 QRPA。在一些实验中，用含有 5%CO₂ 的 N₂ 使萎缩的左肺重新膨胀以得到 30 cm H₂O 的导气管峰压力。在 LMBO 之前和 LMBO 后 5 分钟对 QLPA 进行测定。

血管紧张素 II 的输入 用一种输入泵(Pump 11; Harvard Apparatus Co., South Natick, MA)，经由中枢静脉导管输入溶解于无菌的普通生理盐水中的剂量递增的血管紧张素 II(每分钟 0.05、0.5、和 5.0 ng/g bw)。连续测定 PLA、PPA、PSA 和 QLTAf。

呼吸补充的 NO 将小鼠放在具有特别结构的小室中(Steudel 等人，同上)，在其中它们自然呼吸 22 小时具有 0.21 氧分数 (FiO₂) 的气体，该呼吸气体混合物中被加入了 40 ppm 的 NO。在进行暴露后，将小鼠从小室中转移出来，并呼吸诱导麻醉期间的气体。在从小室中拿出来后 60 分钟测定其血液动力学。在测量期间，用 FiO₂ 1.0，不加入 NO 的气体对动物进行机械通气。

肺血流量测定的检验 在用生理盐水进行处理的野生型小鼠中(n = 5)，我们用静脉注射荧光标记微球(Glenny 等人, 1993, J. Appl. Physiol., 74: 2585-2597)进行测定而得到的各部分肺血流量与本文中如前所述的用超声流量探针同时进行测定所获得的结果进行了比较。在 LMBO

前,将混悬于 0.2 mL 生理盐水中的 50,000 个染色的微球(15 μ m NuFlow Spheres; Interactive Medical Technologies Ltd., West Los Angeles, CA)进行涡旋,在所说的 0.2 mL 生理盐水中包含 0.05%吐温-80 表面活性剂以防止聚集,然后将其立即(在 30 秒内)通过颈静脉的插管进行输入。在完全注入后,将该导管用 0.1 mL 的生理盐水进行冲洗。在 LMBO 5 分钟后,用不同颜色的微球重复进行注入。将动物处死,取出肺,分别进行称重。用流动细胞计数分析来对总微球计数进行分析。用右肺总微球数和左肺总微球数与总的微球数来计算右肺与左肺血流量的分数。

另外,在用生理盐水进行处理的野生型小鼠中($n = 6$),为了证实 LMBO 能诱导通过左肺脉管阻力增加而反映出来的肺血流量的重新分布,我们在下静脉的短暂阻塞期间直接测定 QLPA,并且计算左肺动脉压力-流量关系的斜率和截距。

肺湿/干重比例 在用戊巴比妥(0.1 mg/g, 腹膜内给药)进行安乐死后,将不包括肺门结构的两侧的肺切除下来,吸去残血,立即称重。其中,如前所述(20)的那样,将该组织用微波炉干燥 60 分钟,重新称重。计算肺湿/干重比例。

统计学分析 肺血流量的变化被表示为基准血流量的下降百分比。各组间的差异用双侧 ANOVA 来决定。当用 ANOVA 发现有显著差异时,使用一种在后的 Fisher 检验(Statistica for Windows; StatSoft Inc., Tulsa, OK)。P 值小于 0.05 表明有显著差异。所有的数据都被表示为均值 $\pm$ SEM。

结果

单侧肺泡缺氧对肺血流量的作用。 为了在体评价 HPV,我们提出了一种鼠动物模型,在该模型中,在左肺单侧肺泡缺氧前和期间可以获得有差别的肺血流量测定(图 9A-9C)。由于右主干支气管的阻塞

造成了严重的低血氧和血液动力学的不稳定性，所以我们选择闭合左主干支气管(LMBO)，这样就产生了一个稳定的单侧肺萎缩模型。在胸廓切开术中用放在右肺动脉周围的超声流量探针来测定肺血流量差量，并且通过左肺动脉的短暂闭合来评价右肺和左肺间的流量分布(图 9A-9C)。

图 9A-9C 表示的是在有和没有短暂的左肺动脉(LPA)阻塞的情况下，在 LMBO 前(图 9A)、开始时(图 9B)和 LMBO 后 5 分钟(图 9C)时肺和全身血流动力学的扫描图。左动脉流量的短暂阻塞并不会对全身血液动力学产生任何作用(图 9A)。在 LMBO 后约 1 分钟，发生整个的肺萎缩。联机记录用生理盐水进行处理的小鼠在基准和出现 LMBO 后通过左肺动脉的平均流量(Q_{RPA})、平均肺动脉压(P_{PA})、平均全身动脉压(P_{SA})、以及平均导气管压力(P_{ALV})。为了评价右肺和左肺动脉间血流量的重新分布，将左肺动脉短暂堵塞，在该点 $Q_{RPA} = Q_{PA}$ (见图 9A 和图 9C)。 Q_{PA} 和 Q_{RPA} 之差等于 Q_{LPA} 。在基准和 LMBO 后 5 分钟进行测定。箭头表示阻塞(90 秒)和左肺动脉的松弛。这些代表性的扫描图突出了用小鼠在体测定肺血流量分布的能力。

图 10A-10C 表示用于对测定小鼠肺血流量分布方法的进行验证的实验方法。图 10A 表示通过静脉注射荧光微球(直径 15μ)和通过用超声流量探针同时测定的 Q_{RPA} 而评价的左肺或右肺肺血流量百分比的相关性。在后者的方法中，通过左肺动脉的短暂阻塞来评价右肺和左肺间血流量分布的差异。数值用 LMBO 前和 LMBO 后右肺或左肺流量分数表示(用生理盐水进行处理的野生型小鼠; $n = 4$)。注意两种方法之间的接近一致性($r = 0.967$)。图 10B 表示了用生理盐水进行处理的野生型小鼠($n = 6$)在 LMBO 前(基准)和 LMBO 后 5 分钟左肺肺流量-压力关系实验的结果。注意到斜率显著增加，这代表了由 LMBO 诱导的增加的左肺肺脉管阻力的增加。在这些研究中，用超声流量探针对左肺动脉流量(Q_{LPA})进行直接测定，斜率是通过由于下腔静脉短暂阻塞而导致的 Q_{PA} 的减少而产生的(斜率差别与基准比, $P < 0.05$)。

图 10C 说明了用生理盐水进行处理的野生型小鼠($n = 3$)在萎缩左肺的重新膨胀期间整个左肺肺脉管阻力(TLPVR)的变化。通过连续输入包含 5%CO₂ 的 N₂ 而使左肺重新膨胀并升至 30 cm H₂O 的吸气峰压。用 95% 的置信区间内的所有数据点的线性回归来表示数值。这些结果证明在 LMBO 后肺血流量的重新分配可归因于缺氧而不是左肺萎缩。

在 LMBO 前, 野生型小鼠和 NOS2 缺失小鼠间的血流动力学参数没有差别。在 LMBO 后 5 分钟, 用生理盐水进行处理的野生型小鼠的 QLPA/QPA 下降 $46 \pm 5\%$, 用生理盐水处理的 NOS2 缺失小鼠的 QLPA/QPA 下降 $50 \pm 7\%$ (图 7)。在补充的研究中, 用位于左肺动脉周围的流量探针来直接测定 QLPA, 我们观察到 LMBO 诱导的肺血流量重新分配是通过增加的左肺脉管阻力从 $102 \pm 18 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增加到 $210 \pm 38 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 而反映出来的(图 10B)。LMBO 诱导的肺血流量重新分布不能归因于与左肺萎缩有关的机械因素, 因为当用包含 5%CO₂ 的 N₂ 使萎缩的肺在直接目测下重新膨胀到正常的肺容积时, 左肺脉管阻力(LPVR)并没有发生变化($n = 3$; 图 10C)。

在单侧肺泡缺氧期间内毒素性血症对肺和全身血流动力学的作用在通过用腹膜内注射 10 mg/kg 的大肠杆菌内毒素进行激发后, 小鼠出现伴有竖毛和腹泻的嗜眠。在用内毒素进行激发后 1 周内, 约有 50% 的小鼠死亡, 并且在野生型和 NOS2 缺失小鼠的死亡率之间没有差异(数据没有表示出)。在 LMBO 前, 用生理盐水进行处理的小鼠和用内毒素进行处理的小鼠间的血液动力学参数间没有差异(图 12), 但是用内毒素处理的野生型小鼠的 QPA 趋向于高于 NOS2 缺失的小鼠(230 ± 35 比 $120 \pm 32 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}$), 虽然这种差异并没有达到统计学显著的程度。对所有被研究的用内毒素进行激发的野生型和 NOS2 缺失小鼠的 QPA 进行的比较证实了在两种遗传型间没有显著差异(野生型小鼠每克 $180 \pm 20 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$; NOS2 缺失小鼠每克 $140 \pm 15 \text{ } \mu\text{L}/\text{min}$; n 分别等于 21 和 15)。因为 QPA 间的差异可能会影响肺血流的重新分布, 所以我们对 QLPA/QPA 的改变是否依赖于 QPA 的改变进行了

研究。线性回归分析显示在 LMBO 期间, QPA 和 QLPA/QPA 之间没有相关性($r^2=0.03$,对于所有的小鼠和对于所有用内毒素进行了处理的小鼠, $P < 0.001$; 图 7)。在 LMBO 后, 用生理盐水进行处理的小鼠的 QLPA/QPA 减少 $46 \pm 5\%$, 用内毒素进行处理的小鼠的 QLPA/QPA 减少 $18 \pm 5\%$ 。相反, 在生理盐水处理的 NOS2 缺失小鼠中, LMBO 将 QLPA/QPA 减少 $50 \pm 7\%$, 在用内毒素处理的 NOS2 缺失小鼠中, LMBO 将 QLPA/QPA 减少 $51 \pm 6\%$ (图 7)。在 SV129、SV129B6F1 或 C57BL/6 野生品系之间或在有 SV129B6F1 杂交背景的 NOS2 缺失小鼠和 C57BL/6 背景逆代杂交第 10 代 NOS2 缺失小鼠间对于内毒素的响应没有差别(数据没有表示出)。

在单侧肺泡缺氧期间内毒素性血症对 PaO_2 和 PvO_2 的影响 为了测定野生型和 NOS2 缺失小鼠在用内毒素进行激发后, LMBO 诱导的肺血流量重新分布的差异是否可以反映出 LMBO 诱导的动脉氧合作用的改变, 在 LMBO 前和 LMBO 后对 PaO_2 进行连续测定。在分别用内毒素进行处理的野生型和 NOS2 缺失小鼠中, 评价了 LMBO 对 PvO_2 的作用。用生理盐水进行处理的野生型小鼠($n = 4$), 在 FiO_2 1.0 进行呼吸, LMBO 5 分钟可以将 PaO_2 从 432 ± 7 mmHg 降到 225 ± 13 mmHg。用内毒素进行处理的野生型小鼠的 PaO_2 为 342 ± 23 mmHg, 用内毒素进行处理的 NOS2 缺失小鼠的 PaO_2 为 347 ± 33 mmHg。在 LMBO 进行 5 分钟后, 用内毒素进行处理的野生型小鼠的 PaO_2 下降(145 ± 9 mmHg), 比用内毒素进行处理的 NOS2 缺失小鼠中的 PaO_2 下降更大(230 ± 18 mmHg; $P < 0.05$; 图 11)。

用内毒素进行处理的野生型小鼠和用内毒素进行处理的 NOS2 缺失小鼠的 PvO_2 没有差别(在 LMBO 前:分别为 39 ± 5 和 44 ± 8 mmHg; 在 LMBO 后:分别为 34 ± 4 和 43 ± 7 mmHg; 两组的 n 都等于 3)。

NOS2 活性的长期药理学抑制作用 为了测定 NOS2 的长期药理学抑制是否能保持 HPV, 将野生型小鼠($n = 5$)腹膜内注射 10 mg/kg 的内

毒素, 3 小时后, 用一种 NOS2 活性选择性抑制剂—L-NIL 对其进行处理(5 mg/kg, 腹膜内注射)。L-NIL 的这种剂量足以防止在内毒素激发后 7 小时野生型小鼠肺 cGMP 水平的增加(数据没有表示出来)。在内毒素激发后 22 小时进行肺血流量研究。在用 L-NIL 处理进行内毒素暴露的小鼠中, 与用生理盐水进行处理或用内毒素进行处理的野生型小鼠相比, 在 LMBO 前我们测得的全身和肺血流动力学没有差异。用 L-NIL 进行了处理的用内毒素激发的野生型小鼠中的 QLPA/QPA 下降高于只用内毒素进行处理的野生型小鼠中的下降(分别为 $53 \pm 10\%$ 对 $18 \pm 5\%$, $P < 0.01$; 图 7)。

L-NIL 对 NOS2 的急性药理学抑制 为了测定在 LMBO 期间的急性抑制是否能增加 HPV, 在 LMBO 后, 对用生理盐水进行处理和用内毒素进行处理的野生型小鼠进行 L-NIL 给药(5 mg/kg, 腹膜内给药), 然后进行肺血流量研究。在用生理盐水进行处理的野生型小鼠中($n = 5$), 急性 L-NIL 给药在 LMBO 期间并不能进一步减少 QLPA/QPA(在给予 L-NIL 前为 $49 \pm 3\%$; 在给予 L-NIL 后为 $56 \pm 3\%$)。在注射 L-NIL 后所有的其它血液动力学参数都没有发生变化。在 22 小时前用内毒素进行处理的野生型小鼠中($n = 4$), 急性 L-NIL 给药在 LMBO 期间并不能进一步减少 QLPA/QPA(在给予 L-NIL 前为降低 $22 \pm 11\%$; 在给予 L-NIL 后为降低 $24 \pm 18\%$)。

长期吸入 4 或 40 ppm NO 为了了解 NO 的肺浓度是否增加, 或者更恰当的说是另外一种 NOS2 产物是否有助于内毒素诱导的 HPV 损伤, 使生理盐水处理的和用内毒素进行激发的野生型和 NOS2 缺失小鼠呼吸 22 小时的包含 40 ppm NO 的空气。在 1 小时后, 在使得有足够的时间使吸入的 NO 的任何血管舒张作用都消失后, 进行血液动力学研究。吸入 40 ppm 的 NO 22 小时并不损害用生理盐水进行处理的野生型小鼠和 NOS2 缺失小鼠的 HPV: 在吸入 40 ppm NO 22 小时后, 在 LMBO 后, 用生理盐水进行处理的野生型小鼠 QLPA/QPA 的减少是 $51 \pm 10\%$, 用生理盐水进行处理的 NOS2 缺失小鼠的减少是 50

±11%(图 7)。除了心率有适中的差异外,长期吸入 40 ppm 的 NO 达 22 小时的用内毒素进行处理和用生理盐水进行处理的小鼠间的 LMBO 前的血流动力学间没有发现其它差异(图 12)。与没有吸入追加的 NO 的用内毒素进行处理的 NOS2 缺失小鼠相比,在长时间的吸入 40 ppm 的 NO 后,用内毒素处理的 NOS2 缺失小鼠表现出显著的 HPV 减弱(QLPA/QPA 的减少分别为: $20 \pm 7\%$ 与 $50 \pm 11\%$; $P < 0.05$; 图 7)。相反,长时间的吸入 NO 并不影响野生型小鼠中内毒素诱导的 HPV 的损伤(用内毒素进行处理的野生型小鼠呼吸 40 ppm 的 NO 22 小时后, QLPA/QPA 的减少为: $19 \pm 10\%$, 而未暴露于 NO 的用内毒素进行处理的野生型小鼠的减少为 $18 \pm 5\%$; 图 7)。相反,呼吸 22 小时 4 ppm 的 NO 并不损害用内毒素进行处理的 NOS2 缺失小鼠的 HPV(QLPA/QPA 的减少为: $62 \pm 2\%$; $n = 4$)。

对血管紧张素 II 的肺血管反应性 为了测定内毒素对 HPV 的影响是否有助于内毒素对肺脉管收缩功能的非特异性作用,我们测定了在用生理盐水进行处理野生型小鼠和用内毒素进行激发后 22 小时的野生型小鼠对于血管紧张素剂量增加的肺血管收缩反应。没有使用内毒素的用生理盐水进行了处理的野生型小鼠在每分钟 $5.0 \mu\text{g/kg}$ 血管紧张素 II 时, PVR 从基准值的 74 ± 24 增加到 $184 \pm 25 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$), 在用内毒素进行了激发的野生型小鼠中, 从 55 ± 11 增加到 $174 \pm 40 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.001$)。在血管紧张素 II 的任何输入剂量水平上, 用内毒素进行处理和用生理盐水进行处理的小鼠间的 PVR 都没有差异。用生理盐水进行处理的野生型小鼠($6 \pm 1 \text{ mmHg}$)和用内毒素进行处理的野生型小鼠($5 \pm 1 \text{ mmHg}$)间的 PLA 基准值间没有差异, 在各组中进行血管紧张素 II 输入时 PLA 也不会产生变化。

肺湿/干重比例 用内毒素进行激发的野生型小鼠(湿重/干重: 5.0 ± 0.5)和 NOS2 缺失小鼠(4.6 ± 0.2)间、或用生理盐水进行处理的野生型小鼠(4.6 ± 0.1)和用生理盐水进行处理的 NOS2 缺失小鼠(4.5 ± 0.1)间的

湿/干肺重比例没有差异。呼吸 4 或 40 ppm 的 NO 22 小时并不会改变湿/干肺重比例。

实验的概述和解释 为了研究 NO 和 NOS2 在败血症的 HPV 损伤中所扮演的角色，我们建立了一种体内小鼠模型以用来评价作为由 LMBO 诱导的单侧肺泡缺氧响应的肺血流量的重新分布。在没有接触内毒素的小鼠中，LMBO 使左肺 PVR 加倍，因此，50% 的左肺血流量都转移到了右肺，从而引起 PaO₂ 适度下降。用胸廓切开术中所放置的超声流量探针测定的鼠科动物肺血流量的改变与用荧光微球静脉注射所获得的测定结果紧密相关(见图 10A)，并且与研究了大量动物模型的研究者所提供的报告相似(Domino 等人, 1984, *Anesthesiology*, 60: 562-566; Sprague 等人, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8711-8715)。

在用内毒素激发后 22 小时的野生型小鼠中，我们观测到了作为局部肺缺氧响应的肺血流量的重新分布能力受到了严重损伤，导致了全身动脉氧合作用的显著降低。这种内毒素诱导的小鼠肺血流量重新分布的损伤与用清醒的绵羊所进行的在静脉注射活的细菌(Fischer, 等人, 1997, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156: 833-839)或内毒素(Hutchison 等人, 1985, *J. Appl. Physio.*, 58: 1463-1468)后所观察到的结果相似。

并不能表明内毒素诱导的 HPV 损伤是由于血管舒张收缩装置的非特异性功能紊乱而导致的，因为我们发现在用内毒素进行激发和用生理盐水进行处理的小鼠间，血管紧张素 II 收缩肺部脉管系统的能力并没有差别。此外，内毒素对鼠科动物肺部脉管系统的有害作用是可逆的，在进行内毒素给药后 14 天时，HPV 重新恢复(数据没有表示出来)。

在之前 22 小时用内毒素进行激发的 NOS2 缺失小鼠中，HPV 没

有受到损伤，在 LMBO 期间全身动脉氧合所用得到了保护。类似地，在内毒素激发后 3 小时用一种特异性的 NOS2 酶活性抑制剂—L-NIL 进行处理的野生型小鼠的 HPV 能力也得到了保护。这些结果证明，NOS2 酶活性是产生内毒素诱导的 HPV 损伤的关键。

和 LMBO 后立即进行 L-NIL 的急性给药并不能重建 HPV 一样，在用内毒素激发后 22 小时野生型小鼠的 HPV 损伤不能归因于肺 NO 水平的额外增加。这些结果证明内毒素诱导的肺 NOS2 表达是损害 HPV 所必须的，但持续的 NOS2 活性并不是内毒素激发后 22 小时所测得的 HPV 损伤所需要的。

在一些情况中，NOS2 可产生过氧化物和 NO(28)。我们通过使内毒素激发的 NOS2 缺失小鼠进行吸入，重新补充肺部的 NO 水平而验证了由 NOS2 产生的 NO 是否有助于内毒素诱导的 HPV 损伤。NOS2 缺失小鼠被用内毒素进行激发，并被放置于包含各种浓度的 NO 的小室中进行 22 小时的暴露。在从该小室中取出后 1 小时测定作为 LMBO 响应的肺血流量重新分布，并不期望在该时间内肺 NO 水平会增加。呼吸了 40 ppm 的 NO 的用内毒素激发的 NOS2 缺失小鼠的 HPV 受到了损伤(见图 7)。相反，呼吸 22 小时 4 ppm 的 NO 并不损害用内毒素进行了处理的 NOS2 缺失小鼠的 HPV。这些数据表明，肺 NO 水平显著增加(通过 NOS2 内源性的产生或通过吸入)是损伤 HPV 所需要的。如果将我们用小鼠所观测到的结果外推到人类，我们的研究的一个重要的临床暗示就是使患有肺部炎症的病人吸入高浓度的 NO 可以减少 HPV，这将会反常的降低动脉氧合作用。此外，这些结果支持了目前当治疗患有急性呼吸衰竭的病人时，吸入较低的有效浓度的 NO 的临床实践(Zapol,1993,Intensive Care Med., 19: 433-434)。

在用生理盐水进行了处理的野生型和 NOS2 缺失小鼠中，当对从暴露小室中取出 1 小时后的动物进行研究时，吸入 40 ppm 的 NO 22 小时并不损伤 HPV(见图 7)。这些结果表明仅仅由于肺 NO 水平的持

续增加并不足以引起持续的 HOV 损伤。此外，吸入 22 小时 40 ppm 的 NO 并不能进一步损害内毒素激发的野生型小鼠的 HPV。因此，显然吸入 NO 和内毒素诱导的肺 NO 产生并不能增加损伤的 HOV。我们的研究表明在内毒素激发后的 HPV 持续损伤需要肺 NO 水平的增加，并且需要附加的内毒素诱导的炎性产物。

实施例 3：白三烯阻滞剂和 HPV 的损伤

所获得的实验证据证明了白三烯合成抑制剂和白三烯受体活化作用抑制剂能防止内毒素激发的小鼠的 HPV 损伤。我们发现当存在 5LO-活化蛋白(FLPA)时，用内毒素进行激发的催化花生四烯酸转化成白三烯 A4 的 5-脂肪氧合酶(5LO) 缺失的小鼠的 HPV 可以受到保护。我们发现在野生型小鼠中，用 FLAP 抑制剂 MK886，或 CysT1 受体阻滞剂 MK571 进行处理的内毒素激发的小鼠的 HPV 受到了保护。在这些实验中，我们使用单侧肺缺氧的体内小鼠模型。

将野生型(SV129B6/F1)小鼠和 5LO-缺失小鼠进行麻醉并在胸廓切开的条件下进行研究。连续测定左肺动脉流量(QLPA)和肺(PPA)以及全身(PSA)动脉压。通过下静脉腔的短暂阻塞而获得左肺循环的压力-流量关系。

在左主支气管阻塞(LMBO)后，用左肺脉管阻力增加百分比(P/Q-关系的斜率，LPVR)来对 HPV 进行评估。LMBO 可将 5LO 缺失小鼠的 LPVR 增加 $99 \pm 13\%$ ，将野生型小鼠增加 $100 \pm 11\%$ 。数据被概括于图 13 中。这些结果证明对半胱氨酰-白三烯合成或受体活化作用的抑制可以防止内毒素诱导的 HPV 损伤。

其它实施方案

已经对本发明的实施方案进行了描述。然而，应当清楚所作的各种修改并没有脱离本发明的主旨和范围。例如本发明可以用除这里所列出的物质之外的其它抗 ROS 剂和白三烯阻滞剂来进行实施。因此，其它的实施方案是在下面的权利要求书的范围内的。

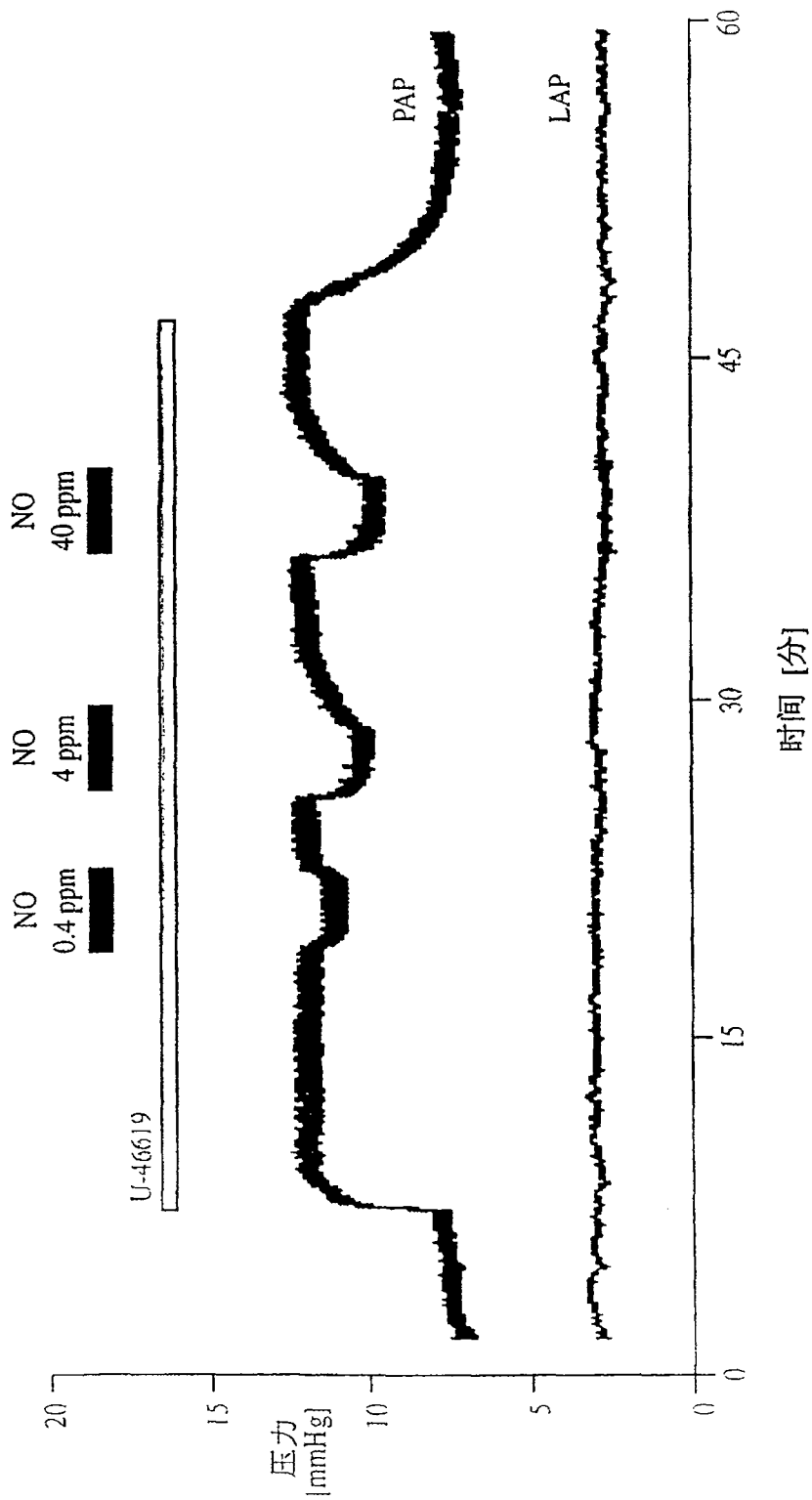


图1

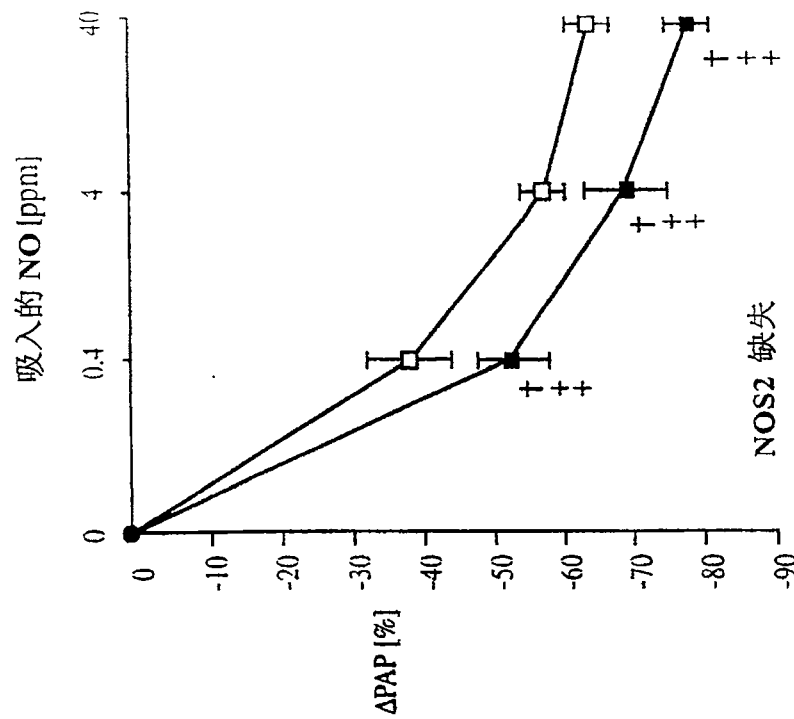


图2B

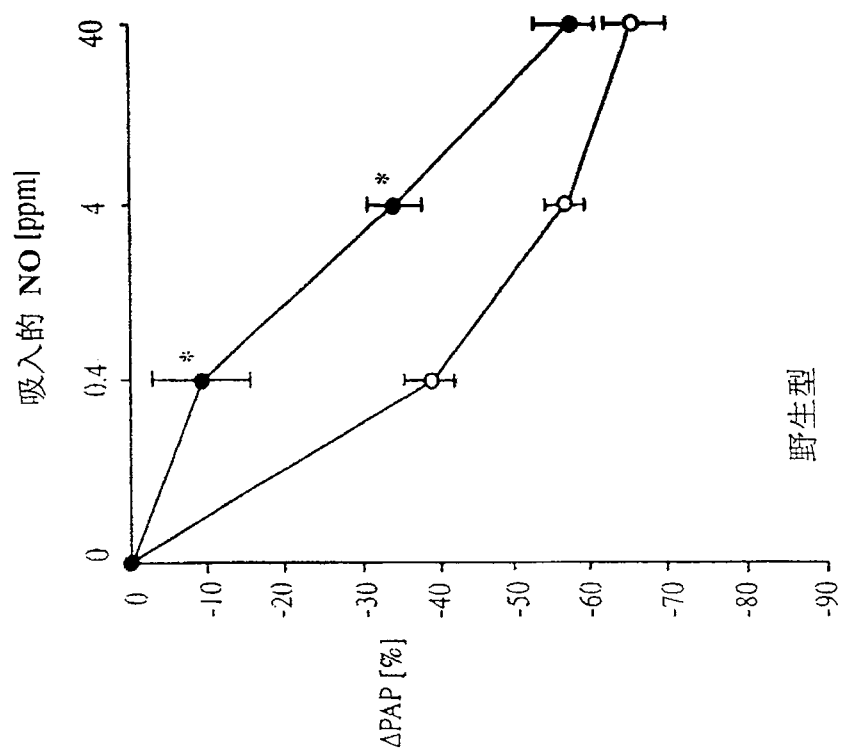


图2A

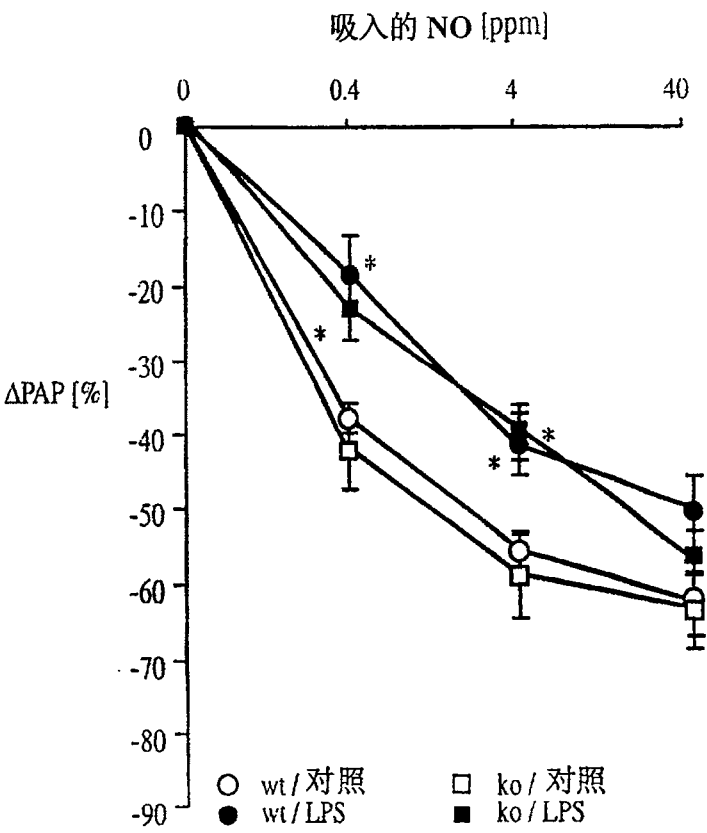


图3

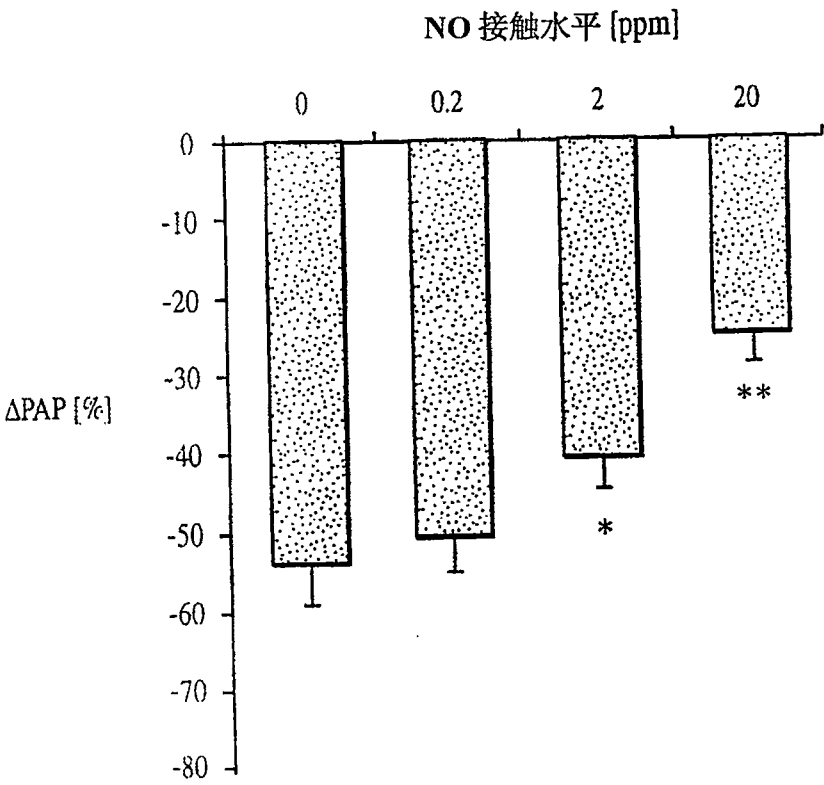


图4

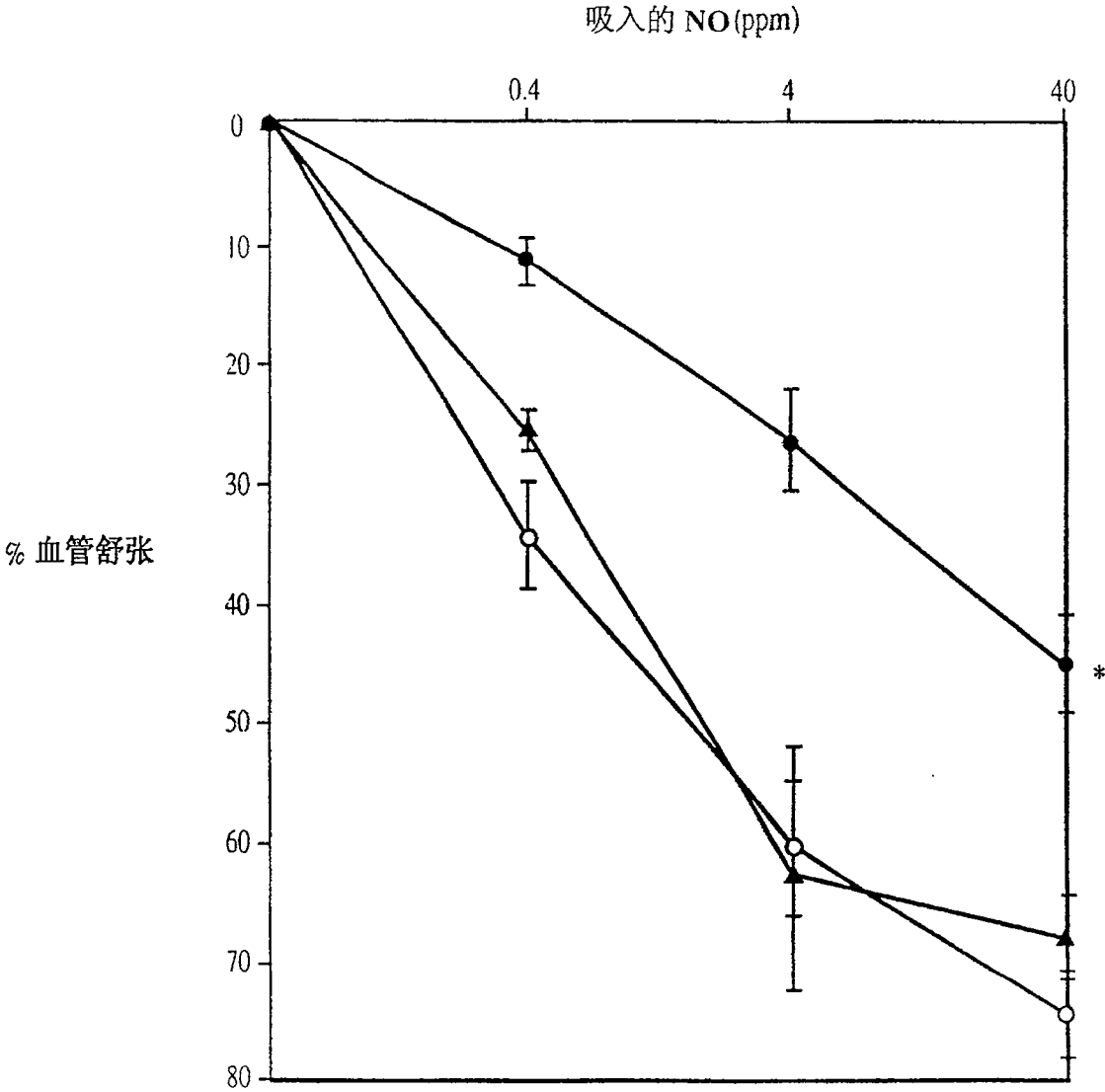


图5

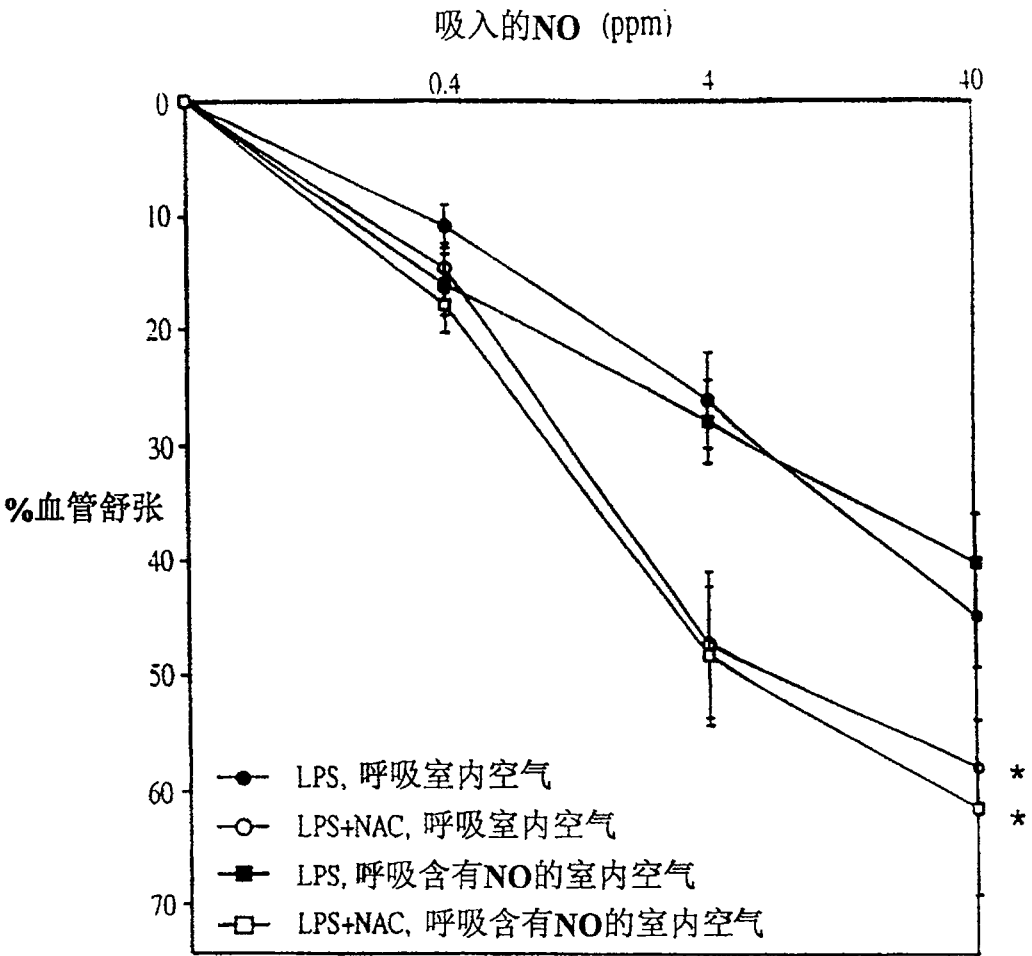


图6

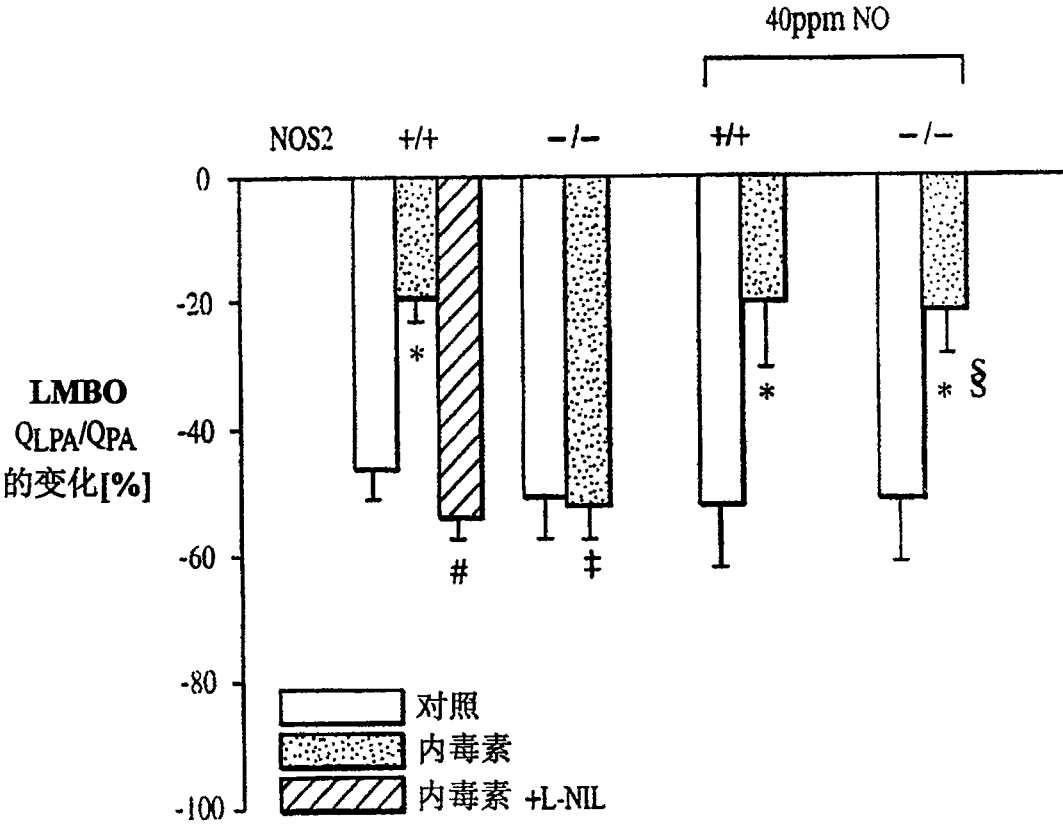


图7

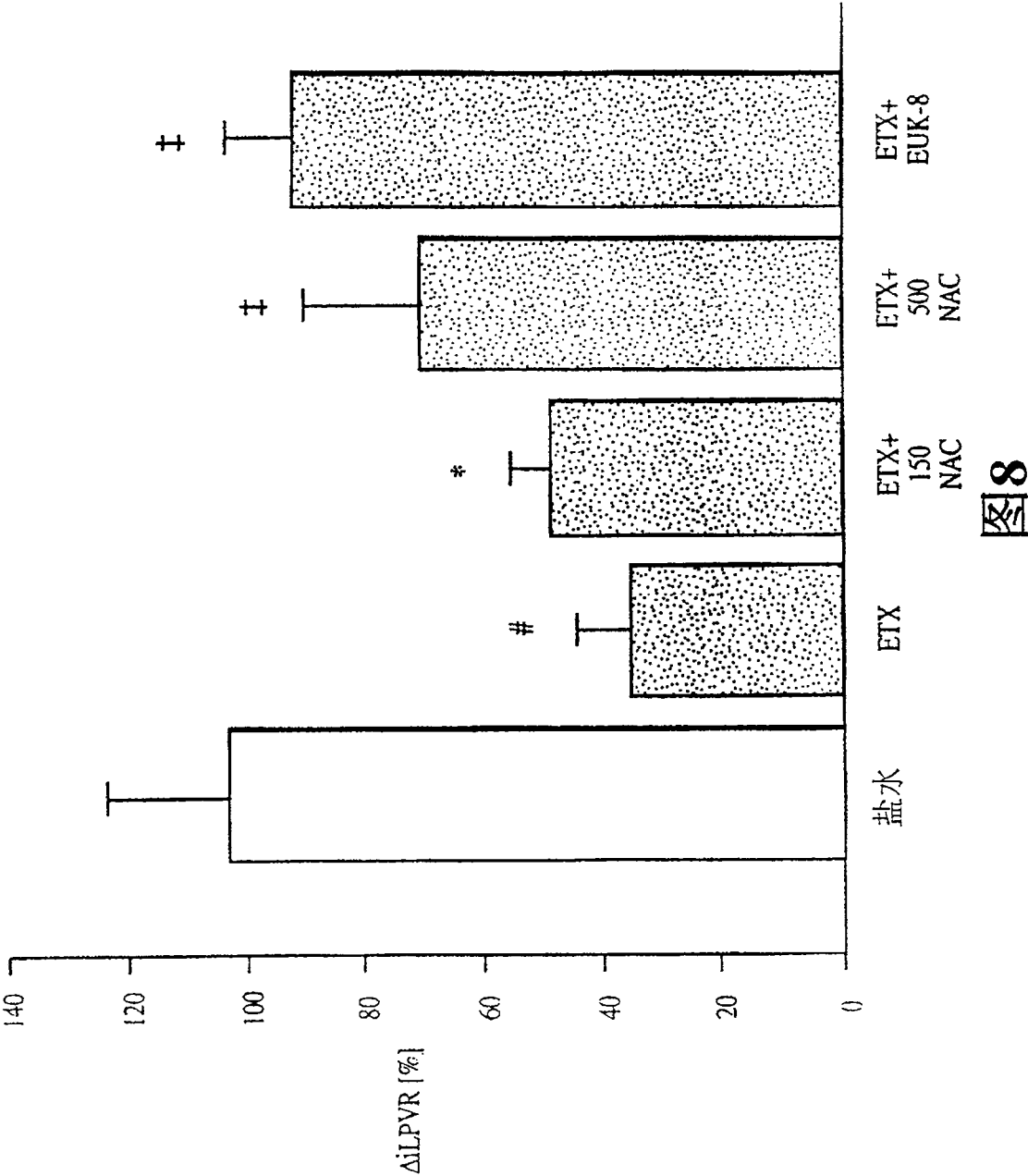


图8

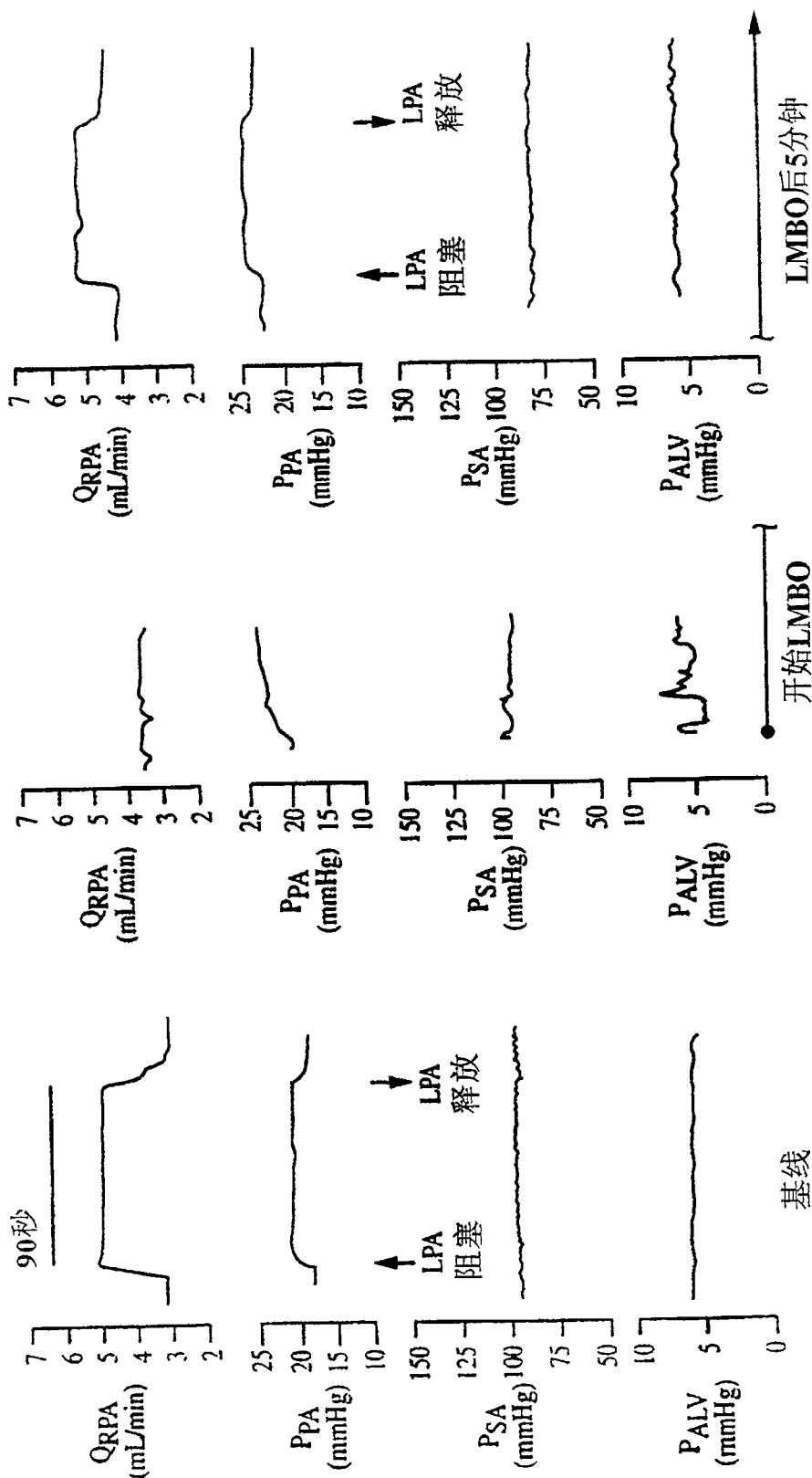


图9A

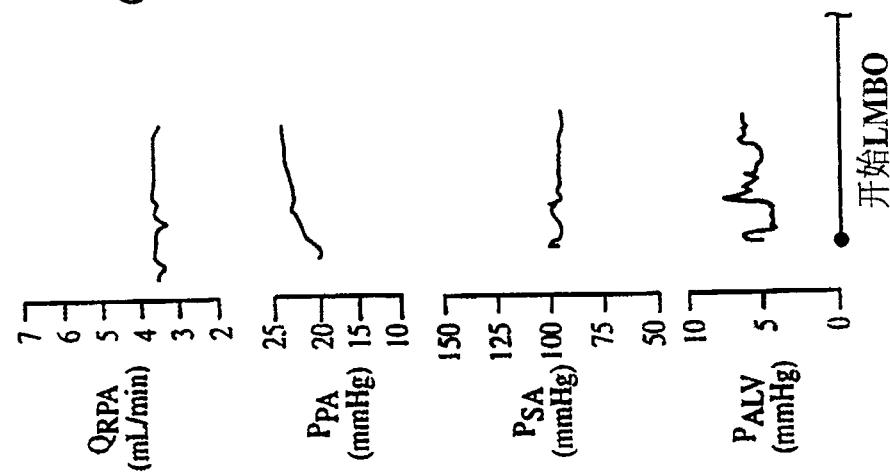


图9B

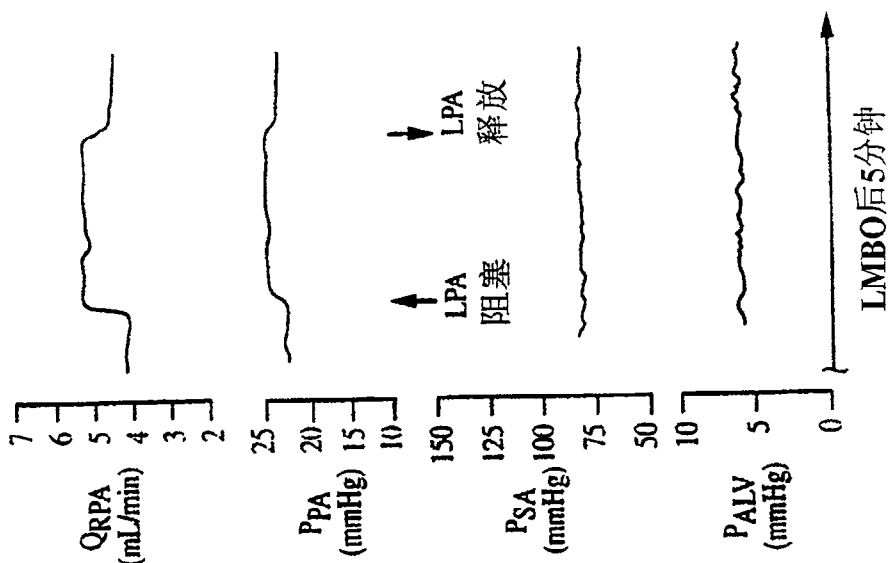


图9C

图10A

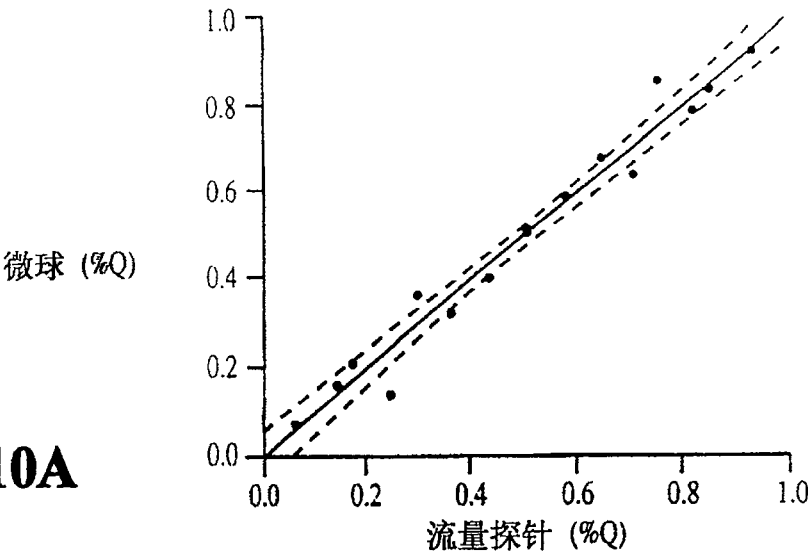


图10B

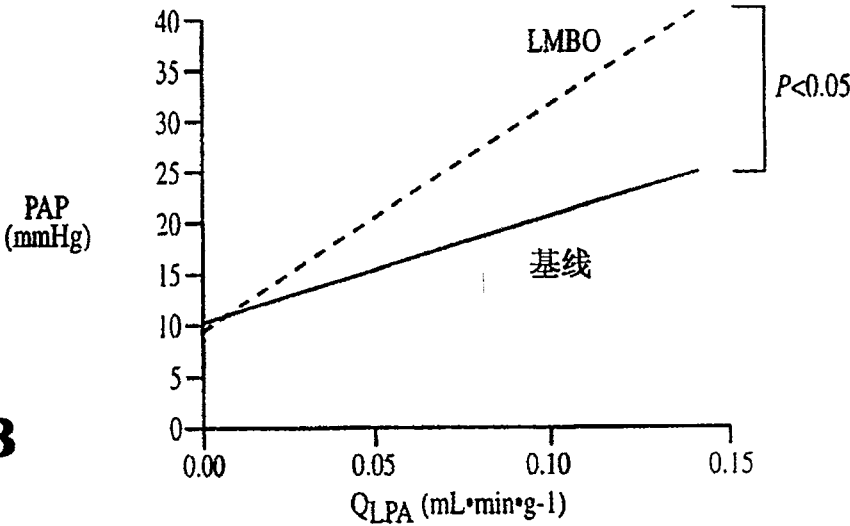
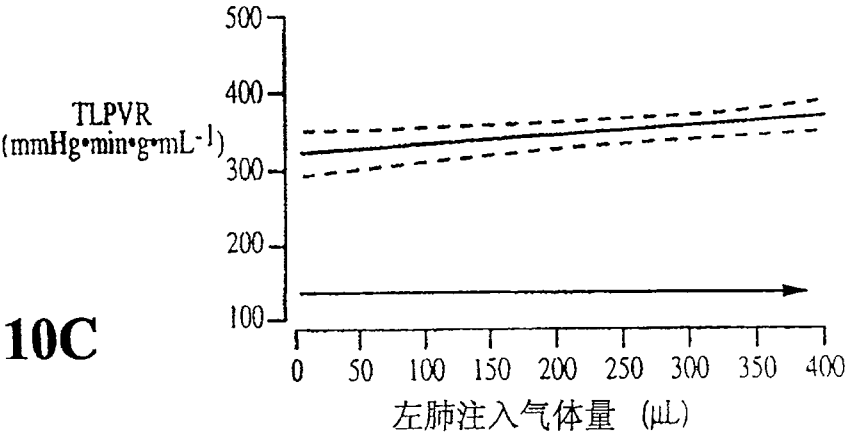


图10C



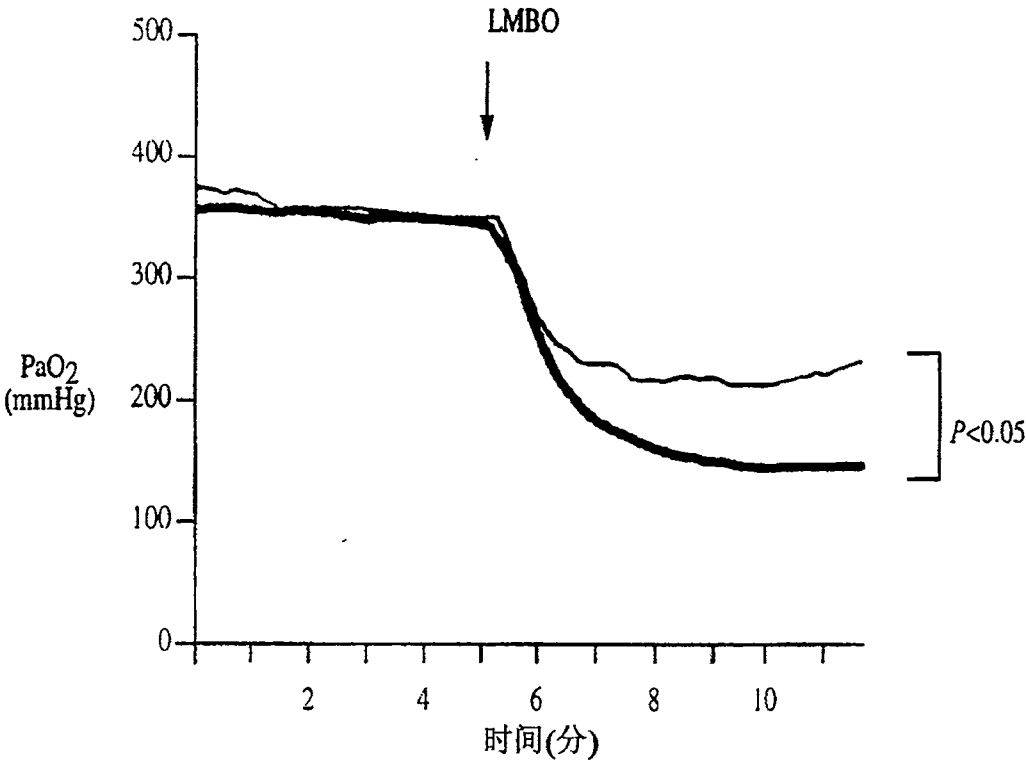


图11

	NOS2+/+ 对照	NOS2-/- 对照	NOS2+/+ 内毒素	NOS2-/- 内毒素	NOS2+/+ 对照	NOS2-/- 对照	NOS2+/+ 内毒素	NOS2-/- 内毒素
N	7	7	6	6	5	5	5	5
HR	394 ± 15	423 ± 21	338 ± 13	374 ± 17	412 ± 18	450 ± 27	348 ± 27	398 ± 25
(每分钟心跳)	LMBO	446 ± 34	347 ± 32	372 ± 23	412 ± 21	438 ± 25	343 ± 24	441 ± 18
PSA	113 ± 5	107 ± 11	100 ± 4	103 ± 5	97 ± 13	105 ± 16	97 ± 7	113 ± 4
(mmHg)	LMBO	94 ± 12	92 ± 8	87 ± 5	103 ± 7	100 ± 20	88 ± 6	104 ± 9
PpA	15 ± 2	15 ± 1	16 ± 2	14 ± 1	15 ± 3	15 ± 3	21 ± 3	19 ± 1
(mmHg)	LMBO	16 ± 2	17 ± 2	15 ± 2	16 ± 2	18 ± 3	21 ± 3	16 ± 1
QPA	200 ± 32	160 ± 9	230 ± 35	120 ± 32	140 ± 19	130 ± 24	200 ± 59	170 ± 17
(μL/min / g BW)	LMBO	170 ± 23	210 ± 29	130 ± 4	150 ± 33	130 ± 32	180 ± 47	190 ± 32
QRPA	130 ± 18	90 ± 5	150 ± 20	80 ± 26	80 ± 7	80 ± 18	130 ± 37	110 ± 10
(μL/min / g BW)	LMBO	140 ± 19	150 ± 21	110 ± 39A	130 ± 18C	110 ± 27A	130 ± 35	140 ± 28A
QLPA	80 ± 15	60 ± 6	80 ± 16	50 ± 7	50 ± 12	50 ± 8	70 ± 22	60 ± 8
(μL/min / g BW)	LMBO	30 ± 5C	60 ± 11	20 ± 3A	30 ± 11A	30 ± 8A	50 ± 12	50 ± 6
QLPA/QPA	36 ± 3	40 ± 2	35 ± 2	42 ± 4	36 ± 4	41 ± 4	36 ± 4	36 ± 2
(%)	LMBO	19 ± 2C	29 ± 3	21 ± 3B	18 ± 5B	20 ± 4B	28 ± 2A	29 ± 2A

图12

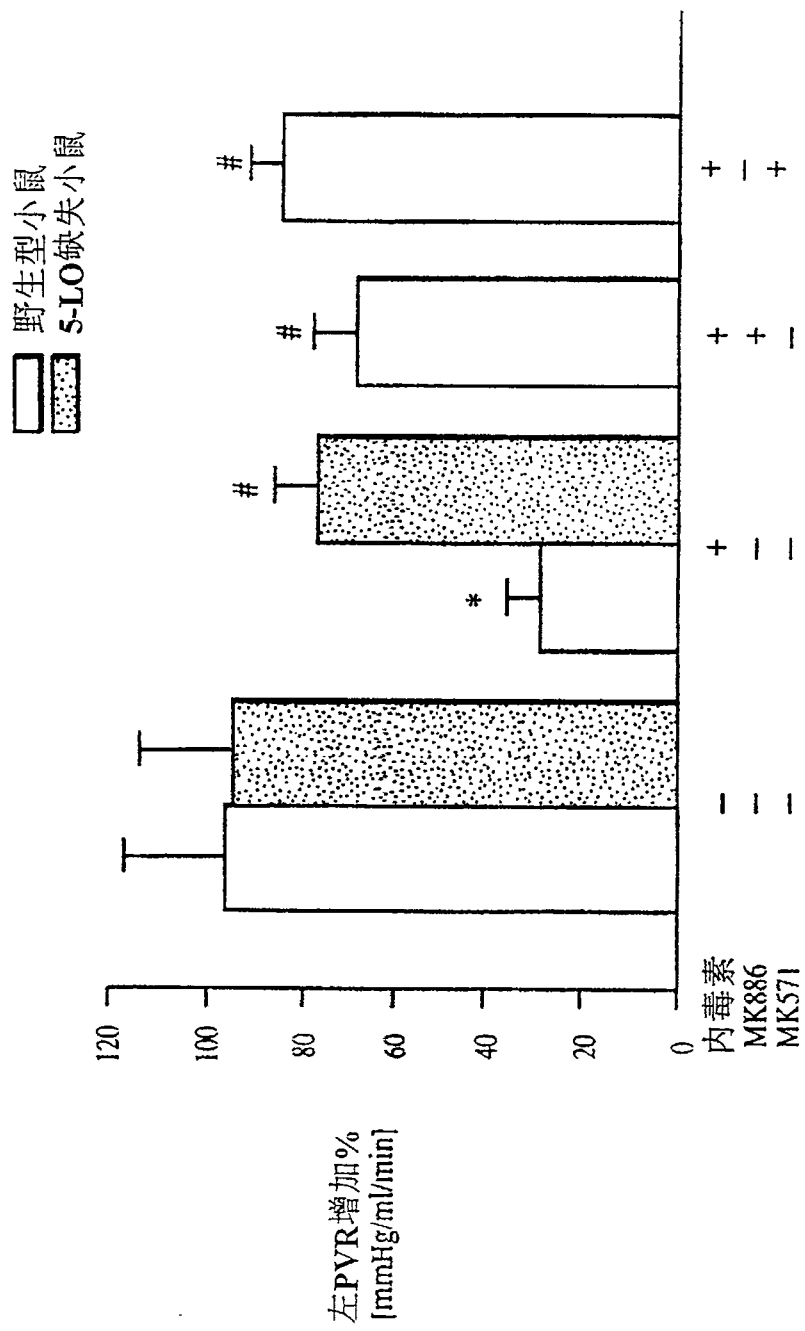


图13