

西地那非对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的作用

汤慧芳, 毛连根, 何 威, 汪雪峰, 谢强敏, 陈季强*

(浙江大学医学院国家食品药品监督管理局浙江呼吸药物研究实验室, 浙江 杭州 310058)

摘要: 目的 明确西地那非对急性肺损伤 (ALI) 的治疗作用及可能机制。方法 采用脂多糖 (LPS, $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 气道滴入诱导的小鼠 ALI 模型。随机分为生理盐水组、LPS 模型组、西地那非 3, 10 及 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、地塞米松 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。测定肺干/湿重比值, 常规细胞形态学检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞, 肺组织切片观察病理改变; 测定肺组织匀浆髓过氧化物酶 (MPO) 活性、NO 含量、NOS 活性及 TNF- α 含量。结果 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺干/湿重比值明显下降; BALF 中白细胞总数及中性粒细胞比例明显增加; 肺毛细血管通透性明显增加; 肺组织间隙大量中性粒细胞浸润和红细胞渗出; 肺组织匀浆 TNF- α 含量和 MPO 活性明显增加, NO 含量、总 NOS 活性及 iNOS 活性明显增加。同时腹腔注射西地那非可剂量依赖性地降低 ALI 小鼠肺干/湿重比值; 减少 BALF 中的白细胞总数及中性粒细胞的比例; 降低肺毛细血管通透性; 改善肺组织病理变化; 抑制肺组织匀浆 TNF- α 含量、MPO 活性及 NO 含量、总 NOS 活性及 iNOS 活性的增加。结论 西地那非对 LPS 诱导的 ALI 有保护作用, 提示 NO-cGMP 途径可能在 ALI 中起重要作用。

关键词: 西地那非; 急性肺损伤; 肿瘤坏死因子; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 髓过氧化物酶

中图分类号: R974

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)04-0259-06

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是多种因素引起肺泡毛细血管弥漫性损伤, 导致肺水肿和肺不张, 临床表现为急性呼吸窘迫和难治性低氧血症, 也是全身失控性炎症反应导致的多器官功能障碍综合症的肺部表现。严重的 ALI 就被称为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 死亡率高, 目前不论是国内还是国外都没有治疗急性肺损伤的有效手段。ARDS 存在低氧肺血管收缩和肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH), 且 PH 在 ARDS 中持续存在, 因此, 缓解 PH 可能有利于 ARDS 的治疗。NO 通过活化鸟苷酸环化酶, 产生 cGMP 而扩张血管。NO 吸入治疗在 ARDS 动物模型上显示出一定作用^[1-2], 但临床试验结果显示, 吸入 NO 对 ARDS 的死亡率并没有明显的改善作用^[3]。磷酸二酯酶 5 (phosphodiesterases 5, PDE5) 是广泛分布于肺组织的 PDE 亚型之一, 专一性水解 cGMP, 是 NO 引起生物效应的第二信使。已有研究表明, PDE5 抑制剂西地那非 (sildenafil) 能有效治疗肺动脉高压, 且对肺血管的选择性较高^[4]。对于 PDE5 抑制剂能否用于 ALI/ARDS 的治疗, PDE5 能否成为一个 ALI/ARDS 的治疗靶点? 目前尚无直接证据支持。本研究旨在探索西地那非对 ALI 的作用及可能机制, 为其应用于 ALI/ARDS 治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂、动物与仪器

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 源自大肠杆菌 O127: B8) 购于美国 Sigma 公司; 柠檬酸西地那非 (纯度 98%)、西安高维制药公司提供; 地塞米松 (dexamethasone), 购于浙江仙琚制药公司。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 测定试剂盒购于武汉博士德公司, 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 测定试剂盒、NO 及一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 分型试剂盒、考马斯亮蓝蛋

收稿日期: 2007-06-05 接受日期: 2007-07-05

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Z204198); 浙江省教育厅项目 (20061416)

作者简介: 汤慧芳 (1973-), 女, 讲师, 研究方向为呼吸药理、抗炎免疫药理学和临床药理, Tel: (0571) 88208230, E-mail: tanghui芳@zju.edu.cn

* 联系作者 E-mail: chenjq@zju.edu.cn Tel: (0571) 88208232

白测定试剂盒均购于南京建成生物工程公司。健康雄性 ICR 小鼠, 体重 19 ~ 21 g, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供。合格证号: SCXK (浙) 2003-0001。全波长酶标仪 (Thermo Electron 公司), 低温离心机 (Eppendorff 公司), SHZ-88 台式水浴恒温振荡器 (江苏太仓实验设备厂), DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司)。

1.2 小鼠急性肺损伤模型的建立及分组处理

60 只 ICR 小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 气道滴入 LPS $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后立即腹腔注射西地那非 (3, 10 及 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、地塞米松 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及生理盐水等进行干预, 对照组气道滴入生理盐水。LPS 滴入后 6 h 处死小鼠, 结扎右肺, 行气管插管, 用生理盐水 1.5 mL 分 3 次进行支气管肺泡灌洗, 回收支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 混匀后进行细胞总数计数, 以 $250 \times g$ 离心 10 min, 取细胞沉淀涂片, 凉干后行瑞氏染色, 做细胞分类计数。取右上肺叶用中性甲醛固定, 石蜡切片, HE 染色; 取右肺中、下叶, 立即放入 -80°C 保存, 用于 TNF- α 、NO 含量及 NOS、MPO 活性等的测定。另取 60 只 ICR 小鼠, 同上随机分组, 小鼠处理前 30 min 尾静脉注射 1% 伊文思蓝染料 0.1 mL, 留取全部肺组织, 左肺用于测定肺干重/湿重比, 右肺用于测定肺毛细血管通透性。

1.3 肺干重/湿重比测定

静脉注射伊文思蓝的小鼠取左肺, 滤纸吸干, 称取湿重, 60°C 烘烤 48 h, 称取干重, 计算肺组织干重/湿重比, 定量肺含水量。

1.4 肺毛细血管通透性检查

取小鼠右肺, 去除血液, 称湿重后放入 2 mL 甲酰胺液中, 42°C 放置 72 h, $250 \times g$ 离心 10 min 后取上清液, 620 nm 处测吸光度值, 根据伊文思蓝的标准曲线计算各组小鼠肺组织中伊文思蓝的含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), 对肺毛细血管通透性进行定量。

1.5 TNF- α 、NO 含量及 NOS、MPO 活性的测定

取肺组织匀浆液, 采用酶联免疫吸附法测定 TNF- α 含量。按试剂盒说明书方法测定 NO 含量、NOS 及 MPO 活性。考马斯亮蓝法测定蛋白含量。

1.6 统计学处理

实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 用 SPSS 10.0 统计软件进行统计处理。各组均数先行方差齐性检验, 样本均数的比较采用方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 西地那非对肺含水量及 BALF 中白细胞计数的影响

从表 1 的结果看出, LPS 组肺干重/湿重比较生理盐水对照组明显下降, 西地那非各剂量组肺干重/湿重比均明显上升, 呈剂量依赖性, 提示西地那非对 LPS 诱导肺水肿有明显抑制作用。

LPS 组 BALF 中的白细胞总数及中性粒细胞比例较生理盐水对照组均明显增加, 西地那非各剂量组 BALF 中的白细胞总数及中性粒细胞比例均明显下降, 呈剂量依赖性, 提示西地那非对 LPS 诱导的中性粒细胞聚集有抑制作用。

Tab 1. Effect of sildenafil on inflammation of acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice

Drug/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Dry weight: wet weight	Bronchoalveolar lavage fluid	
		WBC/ $\times 10^7 \text{ L}^{-1}$	Neutrophil/%
Control (Normal saline)	0.28 ± 0.02	38.9 ± 13.9	10.3 ± 5.8
LPS (Model)	$0.23 \pm 0.01^{**}$	$103.9 \pm 34.1^{**}$	$79.3 \pm 7.6^{**}$
Sildenafil 3	$0.28 \pm 0.01^{##}$	$57.6 \pm 28.2^{##}$	$58.5 \pm 23.4^{**}$
10	$0.29 \pm 0.01^{##}$	$48.0 \pm 16.3^{##}$	$46.4 \pm 17.9^{**##}$
30	$0.29 \pm 0.01^{##}$	$48.5 \pm 18.3^{##}$	$39.1 \pm 17.7^{**##}$
Dexamethasone 5	$0.25 \pm 0.06^{\#}$	$25.7 \pm 8.3^{##}$	$43.8 \pm 22.7^{* \#}$

LPS $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were given intratracheally, and sildenafil and dexamethasone were given ip at once after the administration of LPS. Six hours later, the mice were sacrificed. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with LPS group.

2.2 西地那非对肺毛细血管通透性的影响

LPS 组肺毛细血管通透性明显增加,与生理盐水对照组比较,伊文思蓝的渗出增加了 1.6 倍,西地那非各剂量组肺毛细血管通透性均有不同程度下降,其中以西地那非 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组抑制作用最明显,而西地那非 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组抑制作用反而不明显。提示西地那非对 LPS 诱导的肺毛细血管通透性增加有抑制作用,但大剂量可能扩张血管,增加肺内分流(表 2)。

Tab 2. Effect of sildenafil on lung permeability of LPS-induced mice

Drug/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		Lung permeability/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ lung tissue
Control (Normal saline)		153.9 ± 44.4
LPS (Model)		$230.5 \pm 32.3^*$
Sildenafil	3	$161.9 \pm 11.3^{##}$
	10	$167.1 \pm 13.2^{\#}$
	30	172.3 ± 18.5
Dexamethasone 5		$160.0 \pm 20.0^{\#}$

See legend of Tab 1 for the treatment. The lung permeability was expressed by the leakage of Evans blue in lung tissue. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. $^* P < 0.05$, compared with control; $^{\#} P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$, compared with LPS group.

2.3 西地那非对 LPS 诱导的肺部病理改变的影响

大体观察可见,对照组肺外观无明显异常改变;

LPS 组肺组织表面有点状出血点、水肿区域。组织病理切片镜下可见(图 1), LPS 组气道管腔内和血管腔内有大量中性粒细胞聚集,肺组织间隙可见大量中性粒细胞浸润和红细胞渗出,肺泡内有蛋白水肿液,肺泡间隙边缘有轻度透明膜形成。西地那非各组病变均较 LPS 组减轻,气道周围及肺组织间隙中性粒细胞浸润和红细胞渗出明显减少,肺泡内水肿情况明显减轻,肺泡间隙边缘透明膜形成明显减少。

2.4 西地那非对肺组织 TNF- α 含量和 MPO 活性的影响

表 3 结果可见, LPS 组肺组织匀浆 TNF- α 含量

Tab 3. Effect of sildenafil on tumor necrosis factor (TNF)- α level and myeloperoxidase (MPO) activity of lung tissues in LPS-induced ALI mice

Drug / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	MPO activity/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ wet tissue
Control (Normal saline)		241.8 ± 83.5	5.62 ± 0.35
LPS (Model)		$693.3 \pm 204.9^{**}$	$9.80 \pm 2.86^{**}$
Sildenafil	3	$424.1 \pm 107.4^{*##}$	$7.34 \pm 2.27^{*##}$
	10	$361.5 \pm 122.8^{##}$	$6.99 \pm 1.79^{##}$
	30	$339.8 \pm 145.3^{##}$	$6.39 \pm 1.99^{##}$
Dexamethasone 5		$263.2 \pm 50.13^{##}$	$4.16 \pm 0.44^{##}$

See legend of Tab 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$, compared with control; $^{##} P < 0.01$, compared with LPS group.

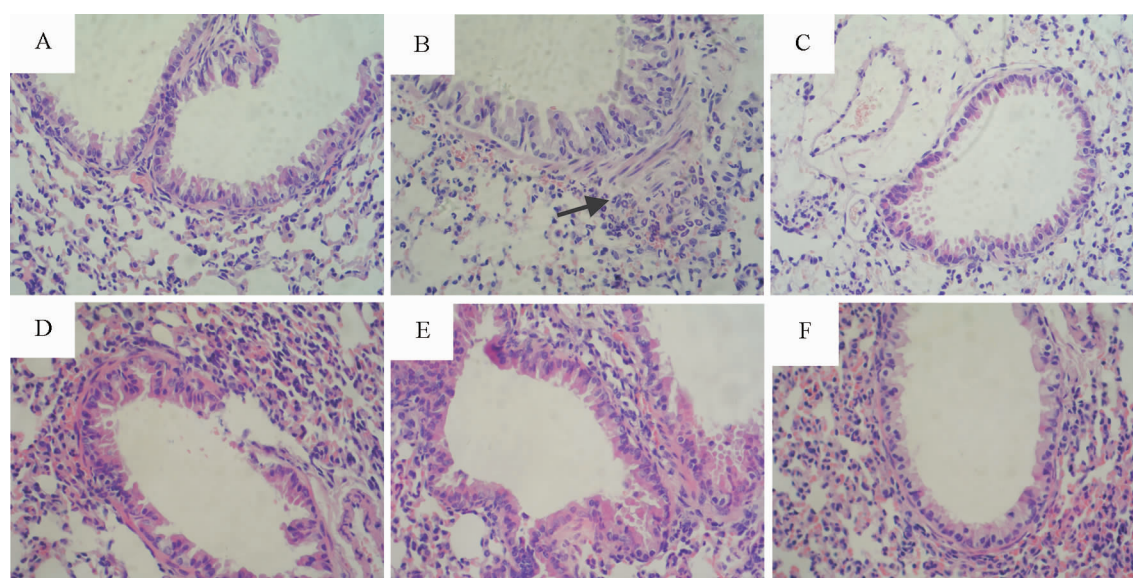


Fig 1. Effect of sildenafil on pathological changes of ALI induced by LPS (HE, $\times 400$). See Tab 1 for the treatment. A: control group; B: LPS group; C: dexamethasone group; D, E and F: sildenafil 3, 10 and $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Black arrow directs the neutrophil recruit.

和 MPO 活性较生理盐水对照组均明显增加,而西地那非各剂量组肺组织匀浆 TNF- α 含量和 MPO 活性较 LPS 组均明显下降,呈剂量依赖性,提示西地那非对 LPS 诱导的 TNF- α 的释放和中性粒细胞浸润有抑制作用。地塞米松对肺组织匀浆 TNF- α 含量和 MPO 活性的抑制作用较西地那非强。

2.5 西地那非对肺组织 NO 含量及 NOS 活性的影响

LPS 组肺组织匀浆 NO 含量、总 NOS 活性及 iNOS 活性较生理盐水对照组均明显增加,而西地那非可剂量依赖性地减少肺组织匀浆 NO 含量、总 NOS 活性及 iNOS 活性,提示西地那非对 LPS 诱导的 NO 释放及 NOS 活性增强有抑制作用。地塞米松对肺组织匀浆 NO 的释放抑制作用较西地那非强,但对总 NOS 活性及 iNOS 活性的抑制作用略弱于西地那非,提示地塞米松抑制 NO 释放的作用机制不仅是抑制 NOS 及 iNOS 活性,可能还有其他机制参与(表 4)。

3 讨论

从 PDE5 的功能进行分析,PDE5 抑制剂存在抗炎潜能^[5]。PDE 非选择性抑制剂己酮可可碱能有效抑制 LPS 诱导的大鼠 ALI,通过抑制 NF- κ B DNA 结合和活化,下调前炎症细胞因子的产生^[6]。同时 PDE5 抑制剂能改善 ALI/ARDS 存在的肺动脉高压表现。有研究报道,在 ALI 伴随肺动脉高压患者,采用适量的西地那非,在不降低肺动脉压的情况下,能改善 NO 治疗 ALI 的作用^[7]。而 NO 供体硝普钠能改善 LPS 诱导的大鼠 ALI,其机制可能与抑制 iNOS 的表达有关^[8]。此外,可溶性鸟苷酸环化酶在 LPS 诱导的 ALI 中也有一定的保护作用,抑制此酶会使

ALI 炎症加重^[9]。这些研究提示 NO-cGMP 通路在 LPS 诱导的 ALI 中具有重要作用,调节 NO-cGMP 途径可能对 ALI/ARDS 产生保护作用,PDE5 抑制剂可能对 ALI 有治疗作用。

本研究结果表明,西地那非对 LPS 诱导的炎性水肿抑制作用强,可剂量依赖性地抑制 MPO 的活性,降低 TNF- α 的释放,明显抑制 BALF 中白细胞渗出,同时对于 NO 的释放也有明显的抑制作用,对于 NOS 的活性尤其是 iNOS 的活性抑制作用明显。这些结果提示西地那非可能有效治疗 ALI/ARDS。同时西地那非对肺水肿的改善和 iNOS 的抑制作用比地塞米松强,提示它们在作用机制上的不同,地塞米松可能通过可溶性鸟苷酸环化酶或其上游调节者产生作用,而不单依赖 cGMP 信号通路。

Ryhammer 等^[1]用肺损伤的小猪模型研究发现,西地那非可增加氧合指数,在低剂量即可降低系统血管阻力,而在非肺损伤动物需要在高剂量才出现这一作用。Kleinsasser 等^[10]用麻醉猪研究了西地那非对动脉血氧分压(P_{aO_2})的影响,结果表明西地那非引起心指数和肺内分流增加,高剂量西地那非会引起平均动脉压明显下降,肺动脉压下降及 P_{aO_2} 下降。临床研究报告显示,西地那非可明显增加低氧肺动脉压患者的动脉血氧饱和度和降低肺动脉收缩压^[12]。ALI 动物模型肺血管内分流存在,西地那非可能改善肺内分流,增加动脉血氧饱和度,从而减轻肺水肿。本实验室在 LPS 诱导的大鼠 ALI 模型上观察了地塞米松对动脉血气的影响,结果提示,LPS 诱导 ALI 组 P_{aO_2} 明显降低,而 P_{aCO_2} 明显上升,地塞米松对 P_{aO_2} 的改善作用不明显,但能降低

Tab 4. Effect of sildenafil on NO content, total nitric oxide synthase (NOS) activity and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity of lung tissues in LPS-induced ALI mice

Drug/mg·kg ⁻¹		NO content /μmol·g ⁻¹ protein	Total NOS activity /kU·g ⁻¹ protein	iNOS activity /kU·g ⁻¹ protein
Control(Normal saline)		2.77 ± 1.35	1.68 ± 0.84	1.17 ± 0.31
LPS(Model)		13.20 ± 7.00 ^{**}	4.61 ± 0.83 ^{**}	3.79 ± 0.98 ^{**}
Sildenafil	3	4.39 ± 1.86 ^{##*}	2.87 ± 0.68 ^{##}	1.06 ± 0.55 ^{##}
	10	4.48 ± 0.82 ^{##}	2.4 ± 1.24 ^{##}	0.77 ± 0.29 ^{##}
	30	3.68 ± 1.29 ^{##}	2.29 ± 0.91 ^{##}	0.74 ± 0.39 ^{##}
Dexamethasone	5	2.15 ± 0.36 ^{##}	3.89 ± 1.49 ^{**}	1.77 ± 0.92 [#]

See legend of Tab 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control; ^{##} $P < 0.01$, compared with LPS group.

P_{aCO_2} (数据未发表)。这可能可以解释西地那非对水肿的作用较地塞米松强的原因。

关于 NO 和 NOS 在 ALI 的发病过程中的作用尚存争议。iNOS 主要在各种炎症情况下表达, LPS、TNF- α 等均能启动细胞内基因转录, 诱导 iNOS mRNA 表达增加。不同的 NO 浓度以及在机体所处的不同炎症反应阶段, NO 作用不同^[12]。在动物模型中, 吸入适当浓度 NO 可改善通气血流比例, 增加动脉血氧饱和度^[13-15], 降低肺水肿和中性粒细胞肺部聚集^[15-16]。但随着 ARDS 的进展, 这些有利因素就随着进入肺循环的 NO 的有害扩散而消失^[17]。本研究结果表明, LPS 处理 6 h 后引起大量的 NO 释放, 肺组织总 NOS 活性明显增加, 以 iNOS 增高为主, 说明 NO 的大量产生可能来源于 iNOS 诱导表达。在 NO 升高的同时伴有肺间质水肿、出血、大量的炎症细胞浸润、肺泡结构破坏, 说明过量的 NO 及 iNOS 参与了内毒素诱导的肺损伤过程。西地那非对 NO、NOS 和 iNOS 活性均有明显抑制, 且呈剂量依赖性, 推测其可能通过作用于 PDE5, 抑制 cGMP 水解, 使胞内 cGMP 水平增加, 从而负反馈调节 NOS 的活性, 减少 NO 的产生, 进而阻断其促炎作用, 但确切的机制还需进一步研究。

TNF- α 是介导 ALI 的主要细胞因子之一, 除了其直接毒性外, TNF- α 还可与多种分子、细胞相互作用, 对组织产生更为广泛的损害效应。西地那非对 TNF- α 的分泌抑制作用明显, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 即有明显作用, 剂量增加其作用进一步增强, 但不及地塞米松, 也提示与地塞米松作用机制的差异。地塞米松抗炎作用强大而且机制复杂, 西地那非主要的靶点在 PDE5。MPO 活性可反映中性粒细胞浸润, 与 TNF- α 的变化趋势相似, 与肺部炎症密切相关。

综上所述, 西地那非可通过抑制 TNF- α 和 NO 释放、抑制 NOS 和 MPO 活性而对 LPS 诱导的 ALI 产生保护作用, 提示 NO-cGMP 途径可能在 LPS 诱导的 ALI 的发生中起重要作用。

4 参考文献:

- [1] Ryhammer PK, Shekerdemian LS, Penny DJ, Ravn HB. Effect of intravenous sildenafil on pulmonary hemodynamics and gas exchange in the presence and absence of acute lung injury in piglets[J]. *Pediatr Res*, 2006, **59** (6): 762-766.
- [2] Nagata K, Iwasaki Y, Takemura Y, Harada H, Yokomura I, Fushiki S. Effect of inhaled N^G -nitro-L-arginine methyl ester on *Candida*-induced acute lung injury[J]. *Chest*, 2003, **124**(6): 2293-2301.
- [3] Adhikari NK, Burns KE, Friedrich JO, Granton JT, Cook DJ, Meade MO. Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ*, 2007, **334**(7597): 779.
- [4] Leibovitch L, Matok I, Paret G. Therapeutic applications of sildenafil citrate in the management of paediatric pulmonary hypertension[J]. *Drugs*, 2007, **67**(1): 57-73.
- [5] Tang HF, Chen JQ, Wang P. The potential role of phosphodiesterases in the development of multiple organ dysfunction syndrome[J]. *J Organ Dysfunction*, 2007, **3**(1): 18-30.
- [6] Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Porcides RD, Wolf P, Tobar M, et al. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression[J]. *J Trauma*, 2006, **60** (1): 115-125.
- [7] Klein A, Zils U, Bopp C, Gries A, Martin E, Gust R. Low-dose phosphodiesterase inhibition improves responsiveness to inhaled nitric oxide in isolated lungs from endotoxemic rats[J]. *J Surg Res*, 2007, **138**(2): 224-230.
- [8] Xia ZY, Wang XY, Chen X, Xia Z. Effect of NO donor sodium nitroprusside on lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats[J]. *Injury*, 2007, **38**(1): 53-59.
- [9] Glynnos C, Kotanidou A, Orfanos SE, Zhou Z, Simoes DC, Magkou C, et al. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in LPS-induced lung injury[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, **292**(4): R1448-R1455.
- [10] Kleinsasser A, Loeckinger A, Hoermann C, Puehringer F, Mutz N, Bartsch G, et al. Sildenafil modulates hemodynamics and pulmonary gas exchange[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **163**(2): 339-343.
- [11] Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, et al. Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial[J]. *Ann Intern Med*, 2004, **141**(3): 169-177.
- [12] Frostell CG. Reassessment of inhaled nitric oxide in

- acute lung injury[J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2003, **24**(12):1314-1315.
- [13] Weitzberg E, Rudehill A, Alving K, Lundberg JM. Nitric oxide inhalation selectively attenuates pulmonary hypertension and arterial hypoxia in porcine endotoxin shock[J]. *Acta Physiol Scand*, 1991, **143**(4):451-452.
- [14] Ogura H, Saitoh D, Johnson AA, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr, Cioffi WG Jr. The effect of inhaled nitric oxide on pulmonary ventilation-perfusion matching following smoke inhalation injury[J]. *J Trauma*, 1994, **37**(6):893-898.
- [15] Ogura H, Cioffi WG, Offner PJ, Jordan BS, Johnson AA, Pruitt BA Jr. Effect of inhaled nitric oxide on pulmonary function after sepsis in a swine model[J]. *Surgery*, 1994, **116**(2):313-321.
- [16] Sheridan BC, McIntyre RC Jr, Meldrum DR, Fullerton DA. L-arginine prevents lung neutrophil accumulation and preserves pulmonary endothelial function after endotoxin [J]. *Am J Physiol*, 1998, **274** (3 Pt 1):L337-L342.
- [17] Shah NS, Nakayama DK, Jacob TD, Nishio I, Imai T, Billiar TR, *et al.* Efficacy of inhaled nitric oxide in oleic acid-induced acute lung injury [J]. *Crit Care Med*, 1997, **25**(12):2066.

Effect of sildenafil on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice

TANG Hui-Fang, MAO Lian-Gen, HE Wei, WANG Xue-Feng, XIE Qiang-Min, CHEN Ji-Qiang*
(Zhejiang Respiratory Drugs Research Laboratory of State Food and Drug Administration of China,
School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: **AIM** To investigate the effect of sildenafil on acute lung injury (ALI) and its anti-inflammation mechanism. **METHODS** ALI was induced in male ICR mice by intratracheal administration of lipopolysaccharide (LPS, $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). All mice were randomly divided into six groups: control group, LPS group, dexamethasone $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sildenafil 3, 10 and $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The effect of sildenafil on ALI was observed 6 h after LPS instilled. Lung dry weight/wet weight ratio and permeability were detected. Neutrophil infiltration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues were determined by cell count and morphological analysis. The level of tumor necrosis factor (TNF)- α was detected with ELISA. Myeloperoxidase (MPO) activity, nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) were measured according to the specification. **RESULTS** LPS induced a decrease in lung dry weight/wet weight ratio, and significantly increased in total leucocyte number and neutro-

phil percent in the BALF at 6 h after intratracheal administration with LPS. Neutrophil infiltration and lung edema in the lung tissue, the level of MPO, NO and NOS activity markedly increased. TNF- α level was sharply increased. Sildenafil ($3, 10$ and $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip) decreased the total leucocyte number and neutrophil in the BALF, MPO activity, NO content and NOS activity of lung tissue in dose-dependent manner. **CONCLUSION** Sildenafil has protective effect on ALI mice, suggesting that it be used in ALI.

Key words: sildenafil; acute lung injury; tumor necrosis factor; nitric oxide; nitric oxide synthase; myeloperoxidase

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Z204198); and Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (20061416)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)