

诱导型一氧化氮合酶和髓过氧化物酶基因多态性与肝炎后肝硬化合并肝肺综合征的相关性研究

戚秋藤 王燕颖 王文多 张艳霞 赵欣

【摘要】 目的 探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和髓过氧化物酶(MPO)表达的基因多态性与肝炎后肝硬化肝肺综合征(HPS)易感性的关系。**方法** 以 63 例肝炎后肝硬化 HPS 患者为病例组,182 例非 HPS 患者为病例对照组,检测两组患者腹水沉渣包埋细胞块中 iNOS 和 MPO 的表达;以 35 例无肝病者为正常对照组,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)技术检测 3 组中 iNOS Ser608Leu 和 MPO 463 位点的多态性。**结果** 病例组中有杵状指 41 例(65.1%),蜘蛛痣 49 例(77.8%),食管静脉曲张(EV)51 例(81.0%),腹水细胞块中 MPO 和 iNOS 表达阳性率和高表达率分别为 100%,92.7% vs 97.6%,75.6%;100%,71.4% vs 100%,75.6%;98.0%,68.7% vs 100%,75.6%。iNOS 608 核苷酸位点 CC、CT 和 TT 基因型在病例组和病例对照组的分布频率分别为 81.0%、19.0%、0% 和 57.1%、40.0%、2.9% ($P < 0.05$);MPO 463 核苷酸位点 GG、GA 和 AA 基因型在两组间的分布频率分别为 76.2%、22.2%、1.6% 和 51.4%、42.9%、5.7% ($P < 0.05$)。iNOS 608 和 MPO 463 核苷酸位点多态性与 HPS 患病遗传易感性间有相互促进作用,同质性检验不同层间存在显著差异 ($P < 0.01$)。**结论** iNOS 和 MPO 表达与 HPS 临床表现具有一定的相关性,iNOS 基因 608 位点 16 外显子 C→T 突变可能是抵抗 HPS 发生和发展的因素,与 MPO 463 G/A 位点基因多态性在 HPS 发病的遗传易感因素中起协同作用。

【关键词】 肝肺综合征;诱导型一氧化氮合酶;髓过氧化物酶;多态性,单核苷酸;疾病遗传易感性

Gene polymorphism of inducible nitric oxide synthase and myeloperoxidase correlate with posthepatic cirrhosis combined with hepatopulmonary syndrome

QI Qiu-teng, WANG Yan-ying, WANG Wen-duo, ZHANG Yan-xia, ZHAO Xin. Department of Gastroenterology, Heilongjiang Hospital, Haerbin 150036, China

Corresponding author: WANG Yan-ying, Email: liuyuzhe1972@163.net

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.03.005

基金项目:黑龙江省科技攻关项目(GB07C32506)

作者单位:150036 哈尔滨,黑龙江省医院消化内科

通讯作者:王燕颖,Email:liuyuzhe1972@163.com

【Abstract】 Objective To investigate whether the expression and gene polymorphism of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and myeloperoxidase (MPO) are more susceptible to posthepatic cirrhosis combined with hepatopulmonary syndrome (HPS). **Methods** Expression of iNOS and MPO in 63 cases with posthepatic cirrhosis combined with HPS and 182 cases with non-HPS were determined by examining cell blocks from ascites. Gene polymorphism of MPO 463 and iNOS Ser608Leu were determined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 63 cases with HPS, 182 cases with non-HPS and 35 cases with normal tissue. **Results** There were 41 cases with clubbing finger (65.1%), 49 cases with spider angioma (77.8%) and 51 cases with esophageal varices (EV) (81.0%) in HPS patients. The positive rates and expression rates of MPO and iNOS in cell blocks from ascites were 100%, 92.7% vs 97.6%, 75.6%; 100%, 71.4% vs 100%, 75.6%; 98.0%, 68.7% vs 100%, 75.6%, respectively. The prevalence rate of genotype CC, CT and TT in iNOS 608 nucleotide site were 81.0%, 19.0%, 0% in HPS patients and 57.1%, 40.0%, 2.9% in non-HPS patients ($P < 0.05$), respectively. The prevalence rate of genotype GG, GA, AA in MPO 463 nucleotide site were 76.2%, 22.2%, 1.6% and 51.4%, 42.9%, 5.7%, respectively ($P < 0.05$). Allele polymorphism of MPO 463 and iNOS 608 interacted on each other, with significant difference among different layers through homogeneity test ($P < 0.01$). **Conclusions** Clinical features of HPS correlated with the expressions of MPO and iNOS. C to T mutation on the 16th exon of iNOS gene might resist the development and progression of HPS, which may have synergetic effect with MPO 463 G/A gene polymorphism in genetic susceptibility of HPS.

【Key words】 Hepatopulmonary syndrome; Inducible nitric oxide synthase; Myeloperoxidase; Polymorphism, single nucleotide; Genetic predisposition to disease

肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)的发生是由于肝病或门脉高压(portal hypertension, PTH)患者的肺微血管扩张损害了动脉氧合,临床表现为低氧血症。研究表明一氧化氮(NO)生成过多导致肺血管扩张^[1-2]。NO的生成主要来源于诱导型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, iNOS)^[3]。iNOS主要分布于巨噬细胞(M ϕ)、成纤维细胞、气管及支气管上皮细胞中,在生理状态下不表达,而在慢性肝病尤其是肝硬化患者,其基因受内毒素、细胞因子等刺激后转录过量的 mRNA,其半衰期特别长,一旦诱导合成即可持续翻译合成 iNOS^[4]。肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM)在肝硬化所致的 HPS 中起重要作用^[5-8]。大鼠肝硬化 HPS 模型中,大鼠肺组织内毒素水平明显高于其他脏器并且持续居高不下,肺组织髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性显著上升,造成肺血管内皮损伤^[9]。IETM 刺激免疫系统形成炎症瀑布。炎症递质级联释放参与肺泡-

毛细血管损伤过程,此过程反复进行,引起肺内 $M\phi$ 和中性粒细胞(PMN)大量聚集,这可能是肺血管内皮损伤的病理基础之一^[10-11]。本研究通过 iNOS 和 MPO 基因表达及多态性与肝炎后肝硬化 HPS 形成的关系,以探讨 iNOS 和 MPO 在 HPS 发病机制中的作用,以期 HPS 早期诊断开辟新的思路以及治疗手段的选择提供理论基础。

资料与方法

一、研究对象

收集 2006 年 3 月至 2010 年 10 月于黑龙江省医院消化内科住院的 245 例肝炎后肝硬化患者,根据有无发生 HPS 将其分为 2 组,其中 HPS 组 63 例,男性 48 例,女性 15 例,平均 46.2(32~68)岁;非 HPS 组 182 例,男性 139 例,女性 43 例,平均 47.8(31~71)岁。所有病例均依据内科学第 6 版肝硬化临床分期标准^[12],排除其他器官原发疾病史。平均病程(6.8±4.7)年,诊断肝硬化后至本次就诊的平均时间为 3.2 年;有肝硬化家族史者 29 例,占 11.8%。有脾切除史者 35 例。另纳入 35 例健康者为正常对照组,均无亲缘关系,其中男 28 例,女 7 例,平均 46.8(34~59)岁;肝酶谱正常,病毒标志物均为阴性;无原发性心肺肾疾病及高血压病。

二、肝硬化病因

病例组中乙型肝炎后肝硬化患者占 79.37%(50/63),丙型肝炎后肝硬化患者占 20.63%(13/63);病例对照组中乙型肝炎后肝硬化患者占 77.47%(141/182),丙型肝炎后肝硬化占 22.53%(41/182)。两组间导致肝硬化的原因比较差异无统计学意义($\chi^2=0.0517, P>0.05$)。

三、HPS 诊断标准^[13]

1. 无原发性心、肺及血液系统疾病。
2. 血气分析动脉血氧分压(PaO_2) < 10.7 kPa,直立性低氧血症, PaO_2 下降 10 mmHg 以上。
3. 振动盐水微泡静脉注射经胸超声心动图阳性。

四、样本采集

1. 血液样本采集:3 组研究对象均禁食 12 h,于次日早晨抽取外周静脉血 3 ml,加 EDTA 抗凝。4000 rpm/min 离心 10 min,取上层血浆保存于 -70℃,下层血细胞保存于 -20℃。

2. 腹水样本采集:无菌下行常规腹腔穿刺,要求送检样本 100 ml 以上,并行常规及病理检查。

五、检测方法

1. 腹水沉渣包埋细胞块免疫组织化学检测:(1)腹水沉渣包埋细胞块制作:向腹水中加入 40% 的甲醛静止 2 h 后,加入 0.9% NaCl 沉淀 24 h,将沉淀物注入到 20 ml 离心管,3000 rpm/min 离心 15 min。向离心沉淀中加入 10% 的福尔马林固定 2 h 后,脱水、透明、浸蜡,包埋后行常规 HE 切片、染色及免疫细胞化学染色。

(2) 免疫组织化学检测:石蜡包埋蜡块连续切片,厚度 3 μm 。常规脱蜡至水,经 30 ml/L H_2O_2 室温下浸泡 15 min,以灭活内源性酶。0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复 20 min,取出冷却。PBS 冲洗后切片分别滴加一抗(鼠抗人 iNOS、兔抗人 MPO,均购自美国 Novus 公司),室温下孵育 1 h, PBS 冲洗后滴加通用型抗-IgG(Fab 段)-HRP 多聚体溶液,室温湿盒中放置 15 min, PBS 冲洗后应用 DAB 显色 5 ~ 10 min,苏木素复染后,脱水透明封片,光镜下观察。(3) 染色结果判定:以上步骤中,以 PBS 代替一抗为阴性对照,iNOS 阳性颗粒呈棕黄色,定位于 $\text{M}\phi$ 、PMN 细胞质;MPO 阳性颗粒呈棕黄色,定位于 $\text{M}\phi$ 、PMN 细胞浆。表达强度参照 Klaes 等^[14]的研究资料:每例随机观察 10 个视野,每个视野 10 个细胞,计数 100 个细胞中染色阳性细胞数,阳性细胞 < 5% 为阴性(-);阳性细胞数 5% ~ 25% 为弱阳性(+);阳性细胞数 25% ~ 50% 为中等强度阳性(++);阳性细胞数 > 50% 为强阳性(+++)。

2. iNOS 基因 608 核苷酸位点 C/T 多态性和 MPO 基因 463 核苷酸位点 G/A 多态性检测:(1) 主要试剂和材料:蛋白酶 K、Taq 聚合酶、dNTPs、琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、限制性内切酶 *Tas* I 和 *Aci* I (MBI 公司),琼脂糖(BBI 公司),引物由上海生物工程有限公司合成。仪器有紫外分光光度计(Shimadzu, Ur120-02)、9600 型 PCR 仪(PE 公司)、电泳槽(Pharmacia Biotech, EPS1000)、垂直电泳仪、低温循环仪、Gel Doc 2000 凝胶成像仪(Bio-RAD 公司)。

(2) 基因组 DNA 抽提:按改进的盐析法,从已分离的外周静脉血淋巴细胞中提取基因组 DNA,溶于 200 ~ 400 μl TE 中,用紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度, A_{260}/A_{280} 为 1.6 ~ 1.8。DNA 模板保存于 -20℃ 备用。

(3) iNOS 基因的 PCR 扩增:上游引物:5'-ACTTCCGTGGTGGGCTGTGA-3' 和下游引物:5'-GAGGGACTTGTTTCTGTGGTTTG-3'。取 1 μl 全基因组 DNA(约 50 ng),每条引物 0.5 μl (浓度为 0.1 mmol/L),2 \times PCR mix 12.5 μl , ddH₂O 10.5 μl 混合成 25 μl 反应体系。反应条件:95℃ 变性 5 min, 94.0℃ 45 s, 57.5℃ 45 s, 72℃ 45 s, 32 个循环后于 72℃ 延伸 10 min。分别取 5 μl PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示 PCR 产物为 349 bp。

(4) iNOS 扩增产物的 RFLP 分析:酶切反应体系:Buffer 液 2 μl 、限制性内切酶 *Tas* I 酶 0.5 μl (5 U)、PCR 产物 5 μl 、ddH₂O 17.5 μl 混合成 20 μl 反应体系。反应条件:将反应体系充分混匀,置 37℃ 水浴中过夜。条件为 100 V、1h, EB 染色,在凝胶成像系统上观察结果。

(5) MPO 基因的 PCR 扩增:上游引物 5'-CGGTATAGGCACACAATGGTGAG-3', 下游引物 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC-3'。25 μl PCR 反应液含 100 μg 模板 DNA, 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 mmol/L NTP, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 1.0 U Taq 聚合酶及反应缓冲液。反应条件为 95℃ 变性 2 min, 94.2℃ 30 s, 63.6℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环后于 72℃ 延伸 8 min。分别取 5 μl PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示 PCR 扩增产物为 350 bp。

(6) MPO 扩增产物的 RFLP 分析: 酶切反应体系: Buffer 液 2 μl , 限制性内切酶 *Aci* I 8 U, PCR 产物为 10 μl , ddH₂O 补足体积至 20 μl 。将反应体系充分混匀, 置 37℃ 水浴中过夜。进行琼脂糖凝胶电泳, 电压 220 V、25 min, 应用凝胶成像系统观察结果。

(7) 实验对照: 实验均设阴性对照和阳性对照。基因分型实验在双盲状态下进行。采取对部分样本进行重复基因分型策略以控制随机分型误差。

六、统计学处理

采用 SPSS 10.0 建立数据库并进行统计分析。两组或多组间 CTE 以方差分析进行比较, χ^2 检验分析不同基因型在两组人群及各亚组中的构成比, 计算特定基因型人群患 HPS 的比值比(OR)及其 95% 可信区间(95% CI)。

结 果

一、病例组和病例对照组腹水细胞块中 iNOS、MPO 的表达与其临床表现的相关性

详见表 1。有杵状指表现的病例组和病例对照组中 MPO、iNOS 的表达强度均以中等强度阳性为主(53.7% vs 43.9%, 100% vs 100%), 且二者呈正相关; 有蜘蛛痣表现的病例组中 MPO 和 iNOS 的表达均以中、高强度阳性为主(占 71.4% vs 75.6%), 而病例对照组中 MPO 的表达以阴性和弱阳性为主(占 66.7%), iNOS 的表达以弱阳性和中等强度阳性为主(占 80.0%); 有食管静脉曲张(EV)表现的病例组中 MPO 的表达以中等强度阳性为主(占 41.2%)(图 1), iNOS 表达以高强度阳性为主(占 41.2%)(图 2), 而在病例对照组中 MPO 和 iNOS 的表达均以弱阳和中等强度阳性为主(占 71.4% vs 92.9%)。

表 1 有杵状指、蜘蛛痣、EV 表现的病例组与病例对照组腹水细胞块中 MPO、iNOS 表达水平比较 [例(%)]

蛋白表达	临床表现	病例组			病例对照组		
		杵状指	蜘蛛痣	EV	杵状指	蜘蛛痣	EV
	例数	41/63 (65.1)	49/63 (77.8)	51/63 (81.0)	1/38 (2.63)	15/38 (39.5)	28/38 (73.7)
MPO	-	0/41 (0)	0/49 (0)	1/51 (1.96)	0/1 (0)	4/15 (26.7)	4/28 (14.3)
	+	3/41 (7.32)	14/49 (28.6)	15/51 (29.4)	0/1 (0)	6/15 (40.0)	9/28 (32.1)
	++	22/41 (53.7)	23/49 (46.9)	21/51 (41.2)	1/1 (100)	2/15 (13.3)	11/28 (39.3)
	+++	16/41 (39.0)	12/49 (24.5)	14/51 (27.5)	0/1 (0)	3/15 (20.0)	4/28 (14.3)
	-	1/41 (2.4)	0/49 (0)	0/51 (0)	0/1 (0)	2/15 (13.3)	1/28 (3.55)
iNOS	+	9/41 (22.0)	12/49 (22.4)	17/51 (33.3)	0/1 (0)	5/15 (33.3)	15/28 (53.6)
	++	18/41 (43.9)	17/49 (32.7)	13/51 (25.5)	1/1 (100)	7/15 (46.7)	11/28 (39.3)
	+++	13/41 (31.7)	20/49 (42.9)	21/51 (41.2)	0/1 (0)	1/15 (6.67)	1/28 (3.55)

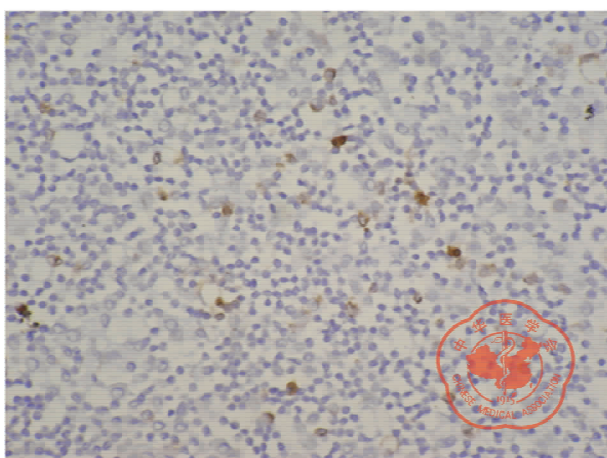


图1 MPO在病例组腹水沉渣包埋细胞块中中等阳性表达(HE,400×)

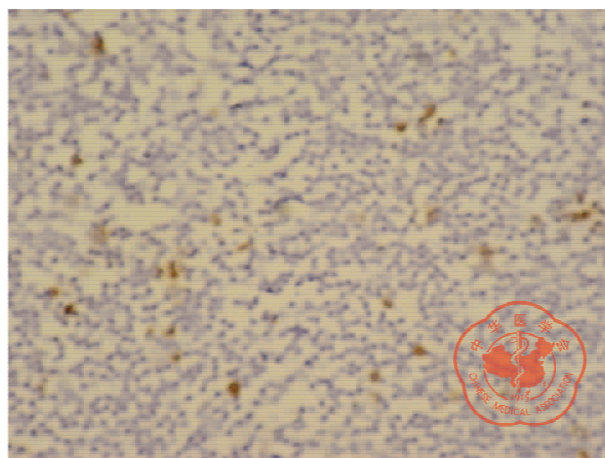


图2 iNOS在病例组腹水沉渣包埋细胞块中强阳性表达(HE,400×)

二、iNOS 608 核苷酸位点和 MPO463 核苷酸位点基因型分布

iNOS 608 核苷酸位点 CC、CT 和 TT 基因型在病例组和病例对照组、正常对照组间的分布频率分别为 81.0%、19.0%、0%、59.9%、37.4%、2.7% 和 57.1%、40.0%、2.9%，病例对照组与正常对照组相比差异无显著统计学意义($P > 0.05$)；病例组与病例对照组相比差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。MPO 463 核苷酸位点 GG、GA 和 AA 基因型在病例组和病例对照组、正常对照组间的分布频率分别为 76.2%、22.2%、1.6%、57.7%、37.9%、4.4% 和 51.4%、42.9%、5.7%，病例组与正常对照组相比差异有显著统计学意义($P < 0.05$)；病例对照组与正常对照组相比差异无显著统计学意义($P > 0.05$)。经 Hardy-Weinberg 定律验证证实达到遗传平衡($P > 0.05$)。结果表明 iNOS Ser608Leu 和 MPO 463G/A 的多态性分布在病例组与对照组存在显著性差异。iNOS 基因 C/T 多态性：病例对照组患者的 T 等位基因频率和 TT + CT 基因型频率分别为 29.2% 和 40.1%，略低于正常对照组 (34.0% 和 40.0%)，差异无显著统计学意义($P > 0.05$)，而在病例组分别为 16.0% 和 19.0%，明显低于正常对照组，差异有显著统计学意义($P < 0.05$)；MPO 基因 G/A 多态性：A 等位基因频率和 AA + GA 基因型频率在病例对照组分别为 30.7% 和 42.3%，低于正常对照组 34.0% 和 48.6%，但差异无显著统计学意义($P > 0.05$)；而在病例组分别为 19.5% 和 23.8%，明显低于正常对照组，差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。

三、iNOS 608 和 MPO463 核苷酸位点基因多态性与肝硬化 HPS 遗传易感性的关联分析

详见表 2。病例组 iNOS 608 杂合子的携带率低于正常对照组 (19.0% vs 40.0%)，在肝硬化背景下，携带杂合子的个体发生 HPS 的风险是携带野生纯合子者的 0.24 倍，携带 T 等位基因的个体患 HPS 的危险性比野生纯合子携带者低 ($OR = 0.47$, 95% CI: 0.28 ~ 0.91)。病例组 MPO 463 杂合子的携带率低于正常

对照组(22.2% vs 42.9%),在肝硬化背景下,携带杂合子的个体发生 HPS 的风险是携带野生纯合子的 0.29 倍,携带 A 等位基因的个体患 HPS 的危险性比野生纯合子携带者低($OR = 0.39, 95\% CI: 0.14 \sim 1.00$)。

表 2 iNOS 608、MPO463 基因多态性与 HPS 遗传易感性的关系[例(%)]

基因型	iNOS 608			MPO 463		
	C/ C	C/ T	T/ T	G/ G	G/ A	A/ A
正常对照组	20(57.1)	14(40.0)	1(2.9)	18(51.4)	15(42.9)	2(5.7)
病例组	51(81.0)	12(19.0)	0(0)	48(76.2)	14(22.2)	1(1.6)
cOR	1.00	0.45	0.96	1.00	1.62	0.97
95 % CI	0.26 ~ 0.74		0.17 ~ 5.36	0.79 ~ 3.0		0.17 ~ 5.93
ORadj	1.00	0.46	0.95	1.00	1.56	1.07
95 % CI	0.25 ~ 0.75		0.17 ~ 5.38	0.78 ~ 3.02		0.18 ~ 6.71

讨 论

Krowka 等^[15]指出:当患者同时存在皮下蜘蛛痣、门脉高压和杵状指时,应诊断为 HPS。本研究中病例组有杵状指表现者 41 例,占 65.1%,MPO 和 iNOS 表达阳性率为 100% vs 97.6%,高表达率达 92.7% vs 75.6%。肺血管扩张(肺蜘蛛痣)常在有皮下蜘蛛痣的肝病患者中发现,而有皮下蜘蛛痣者更易出现低氧血症,因此皮下蜘蛛痣被认为是肝外血管侵犯的标志。病例组出现皮下蜘蛛痣者 49 例,占 77.8%,MPO 和 iNOS 表达阳性率 100% vs 100%,高表达率达 71.4% vs 75.6%。病例组存在 EV 者 51 例,占 81.0%,MPO 和 iNOS 表达阳性率 98.0% vs 100%,高表达率达 68.7% vs 66.7%。

HPS 增加了肝硬化患者的病死率,并可影响 PTH 并发症的发生频率和严重程度,但只有约 25% 的肝硬化患者最终发展成 HPS^[16]。HPS 的形成可能存在遗传易感性因素,即不同个体即使在同一致病因素(PTH)作用下,也只有少数患者发生 HPS。Schroeder 等^[17]研究发现 PTH 时 iNOS 活性增强在 HPS 形成中发挥作用。iNOS 通过“肠-肝轴(gut-liver axis)”直接刺激 Kupffer 细胞产生细胞因子的级联释放反应^[18],可同时引起肝脏和肺脏产生大量 NO。人的 iNOS 基因位于第 17 号染色体长臂(17q11.2 ~ 17q12),全长约 37kb,含有 26 个外显子,其第 16 外显子的第 14 位碱基有 C/T 突变,使编码的氨基酸由丝氨酸(Ser)改变为亮氨酸(Leu),从而导致 iNOS 酶活性的改变^[19]。MPO 是 PMN 和 Mφ 嗜天青颗粒产生的过氧化物酶,为组织炎症反应程度的标志。MPO 同时作为一种氧化应激相关酶,常被用作衡量组织氧化代谢的指标^[20]。人的 MPO 基因位于染色体 17q23 ~ q24,由 12 个外显子和 11 个内含子组成,其在加工过程中 Alu 激素反应元件(HRE)中一个 SP-1 转录结合位点的丧失^[21],造成基因编码区上游 463 位点处 G → A 突变。MPO 的 mRNA 转录起始活性不同导致 MPO 基因表达水平不同,从而影响酶的活性,导致个体对疾病易感性差异。

本研究结果表明,iNOS C 等位基因和 MPO G 等位基因在中国东北地区部分 HPS 患者中可能占有主导地位。舒血管因子 NO 合成关键酶 iNOS 的 Ser608Leu 和氧化应激相关酶 MPO 的 463G→A 变异与 HPS 发生风险下降有关。笔者推测,iNOS 基因第 16 外显子的第 14 位碱基 C→T 突变可能促进 TT + CT 基因型 iNOS 基因表达减弱,调节内皮 NO 生成和(或)抑制其生物利用度的能力较 CC 基因型降低。而位于同一染色体的 MPO 基因可能为 HPS 的另一个易感基因,同时可能是 iNOS 的修饰基因之一,其 463 位点 G→A 突变促进 AA + GA 基因型 MPO 的活性,从而加速其上游调控因子与其受体间的调控失衡,NO 产生减少,从而抑制 HPS 的形成。

参 考 文 献

- 1 Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol*, 2005,39(4):S138-S142.
- 2 Zhang XJ, Katsuta Y, Akimoto T, et al. Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. *J Hepatol*,2003,39(5):724-730.
- 3 Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*,2001,11(2):66-75.
- 4 Wei CL, Lee KH, Khoo HE, et al. Expression of haem oxygenase in cirrhotic rat liver. *J Pathol*,2003,199(3):324-334.
- 5 Li X, Han DW, Zhao LF, et al. Effect of glycine on the expression of peroxisome proliferators-activated receptor α in the rat non-alcoholic fatty liver. *Zhongguo Binglishengli Zazhi*,2006,22(8):1829-1832.
- 6 Spittler A, Reissner CM, Oehler R, et al. Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF- α production and accelerated IL-10 expression. *FASEB J*,1999,13(3):563-571.
- 7 Bruck R, Wardi J, Aeed H, et al. Glycine modulates cytokine secretion, inhibits hepatic damage and improves survival in a model of endotoxemia in mice. *Liver Int*,2003,23(4):276-282.
- 8 Wheeler MD, Thurman RG. Production of superoxide and TNF- α From Alveolar macrophages is blunted by glycine. *Am J Physiol*,1999,277(5):L952-959.
- 9 朱义用,景炳文,姜永华. 大鼠腹腔感染致早期肺损伤的实验研究. *中国急救医学*,2000,20(3):131-133.
- 10 Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med*,1998,157(5):1666-1680.
- 11 Blackford JA, Antonini JM, Castranova V, et al. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*,1994,11(4):426-431.
- 12 叶任高,陆再英. 内科学. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社. 2004:440-449.
- 13 Rodríguez-Roisin R, Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome - A liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med*,2008,358(5):2378-2387.
- 14 Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*,2001,92(2):276-284.
- 15 Krowka MJ, Dickson ER, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome. Clinical observations and lack of therapeutic response to somatostatin analogue. *Chest*,1993,104(2):515-521.
- 16 Krowka MS, Wiseman GA, Burnett OL, et al. Hepatopulmonary syndrome: a prospective study of relationships between severity of liver disease, PaO₂ response to 100% oxygen, and brain uptake after 99mTcMAA lung scanning. *Chest*,2000,118(3):615-624.
- 17 Schroeder RA, Ewing CA, Sitamann JV, et al. Pulmonary expression of iNOS and HO-1 protein is upregulated in a rat model of prehepatic portal hypertension. *Dig Dis Sci*,2000,45(12):2405-2410.
- 18 Halpern MD, Holubec H, Dominguez JA, et al. Hepatic inflammatory mediators contribute to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2003,284(4):695-702.
- 19 Shen J, Wang RT, Wang LW. Tsp polymorphism of iNOS gene was found and identified in Chinese by denaturing high perform-

ance liquid chromatography. J Pek U, 2001, 33(6):486.

- 20 Ohnishi S, Murata M, Kawanishi S. DNA damage induced by hypochlorite and hypobromite with reference to inflammation -associated carcinogenesis. Cancer Lett, 2002, 178(1): 37-42.
- 21 Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant Q, et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP 1-thyroid hormone-retinoic acid response element. J Biol Chem, 1996, 271(24):14412-14420.

(收稿日期:2011-06-12)

(本文编辑:孙荣华)

戚秋藤,王燕颖,王文多,等. 诱导型一氧化氮合酶和髓过氧化物酶基因多态性与肝炎后肝硬化合并肝肺综合征的相关性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2011, 5(3):288-296.