经验交流

文章编号:1000-5404(2005)08-0806-02

内毒素诱导急性肺损伤幼鼠血NO、ET-1含量和肺NOS活性及mRNA表达的研究

Expression of NO, NOS, ET-1 and the mRNA of NOS in LPS-induced acute lung injury in young rats

许 峰,金海燕,卢仲毅,匡凤梧,王兴勇 (重庆医科大学儿童医院ICU,重庆 400014)

本研究通过内毒素(LPS)诱导的ALI模型,动态观察血浆NO和ET-1浓度变化、肺组织NOS活性改变、以及肺组织内源型一氧化氮合酶(eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA的表达,探讨NO、NOS和ET参与ALI的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

4~5周Wistar大鼠52只,雌雄各半,随机分为急性肺损伤组(ALI组)和生理盐水对照组(NS组),ALI组又分为注射后第1、3、7小时组(ALI_1、ALI_3、ALI_7)。10%乌拉坦(1 ml/100 mg)腹腔麻醉,舌下静脉注射内毒素(LPS 20 mg/kg)复制ALI模型,NS组用等量生理盐水替代LPS处理。两组分别于注射后第1、3、7小时采静脉血测NO和ET-1含量,取股动脉血作PaO_2分析。放血处死动物后打开胸腔,取右肺上中叶置-20 ℃保存,用于检测NOS活性;右肺下叶经4%甲醛充分固定后作病理学检查。左侧肺用0.9%生理盐水行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)做蛋白定量。部分动物放血处死后,右肺作肺系数测定;左肺置-70 ℃液氮保存,用于检测NOS mRNA。

1.2 检测指标

1.2.1 血NO含量测定 NO检测试剂盒购自中国医学科学院北京邦定公司,严格按药盒说明书进行。

1.2.2 血ET-1含量测定 取静脉血2 ml,注入含10% EDTA二钠30 μl和抑肽酶40 μl的试管中,混匀,4 ℃,3 000 r/min,离心10 min,分离血浆。内素放免试剂盒购自北京东亚放射免疫公司,严格按药盒说明书进行。

1.2.3 肺组织NOS活性测定 肺组织冰浴中匀浆,4 ℃,2 000 r/min离心20 min,收集上清液,即NOS提取液,用Lowry法测定NOS提取液蛋白浓度,用H-精氨酸转化实验测定提取液NOS活性。NOS测试盒购自中国医学科学院北京邦定公司。

1.2.4 肺组织NOSmRNA水平测定 取50 mg肺组织,使用总RNA提取试剂盒提取总RNA。iNOS、NOS和β-actin引物按参考文献[1]方法由中国科学院上海生物工程研究中心合成。iNOS引物序列:上游引物为5′-GCTACCTACCTGGGGAACAC 3′,下游引物为5′-TGGGTGGGAGAGGTAGTGATG-3′。eNOS引物序列:上游引物为5′-ATCCTGGCAGCCCTAAGACC-3′,下游引物为5′-TGGTAGCGTTGCTGATCCCG-3′。β-actin引物序列:上游引物为5′-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3′,下游引物为5′-TCATACTGCTGCTCAGGCCGGGGA-3′。PCR循环完成后,取PCR产物15 μl于2%琼脂糖凝胶电泳,用Bio Rad图像分析软件进行分析。以iNOS、eNOS与β-actin的积分分光密度比值表示mRNA相对表达量。

1.2.5 肺系数和BALF总蛋白及肺组织学检测 取左侧上肺称重,记为湿重,再置于80 ℃烤箱中24 h至重量恒定即干重,计算干/湿重比。BALF总蛋白Lowry法检测,病理切片作HE染色后用普通显微镜观察,PaO_2用ABL330型血气分析仪检测。

1.3 统计学方法

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 11.0统计学软件行单因素方差分析和Newman-Keuls检验。

2 结果

2.1 肺损伤指标

所有ALI组可见肺间质弥漫性充血,大量炎性淋巴细胞浸润,肺泡内大量红细胞渗出。对照组无明显异常。ALI组各时段肺系数、血PaO_2和BALF总蛋白变化见表1。

表1 动脉血气PaO_2(kPa),肺系数及BALF蛋白的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PaO_2(kPa)	肺系数	BALF蛋白 g/L
NS	10	13.04±0.64*★▲	0.22±0.02*★▲	0.20±0.06*★▲
ALI_1	6	10.01±0.58	0.20±0.09	0.25±0.03
ALI_3	6	8.62±0.34*	0.18±0.07*	0.34±0.03*
ALI_7	6	7.27±0.42*★	0.17±0.06*★	0.40±0.07*★

*:与ALI_1组比较 $P<0.05$;★:与ALI_3组比较 $P<0.05$;▲:与ALI_7组比较 $P<0.05$

2.2 血NO含量、肺组织NOS活性、血ET-1含量及NOS基因表达变化(表2,3)

表2 NO, NOS, ET-1含量 and ET-1/NO比值的动态变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO(μg/ml)	NOS(U/mg)	ET-1(pg/ml)	ET-1/NO
NS	10	44.43±6.33*★▲	0.24±0.03*★▲	150.25±17.78*★▲	3.38±0.04*★▲
ALI_1	6	64.46±11.69	0.30±0.05	517.96±33.21	8.05±0.07
ALI_3	6	101.40±21.32*	0.34±0.03*	603.61±54.74*	5.95±0.05*
ALI_7	6	120.30±16.67*★	0.45±0.09*★	681.21±54.74*★	5.66±0.04*★

*:与ALI_1组比较 $P<0.05$;★:与ALI_3组比较 $P<0.05$;▲与ALI_7组比较 $P<0.05$

表3 肺组织eNOS mRNA、iNOS mRNA表达动态变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	eNOS	iNOS
NS	5	0.96±0.26	0*▲
ALI_1	5	0.96±0.25	0.70±0.20
ALI_3	5	0.95±0.25	1.88±0.31*
ALI_7	5	0.94±0.28	2.64±0.38*★

*:与ALI_1组比较 $P<0.05$;★:与ALI_3组比较 $P<0.05$ ▲:与ALI_7组比较 $P<0.05$

3 讨论

NOS作为NO合成的关键酶,直接调节NO生成量及其生

基金项目:国家人事部回国人员优先资助课题(17202)
Supported by Priority Funds for the Personnel Returning From Overseas by the National Ministry of Personnel (17202)

作者简介:许 峰(1963-),男,重庆市人,主任医师,教授,主要从事肺损伤方面的研究,发表论文20余篇。

收稿日期:2004-04-28;修回日期:2004-11-30

物学效应。NOS分为eNOS和iNOS两类，eNOS主要在生理情况下表达，iNOS主要在各种炎症情况下表达，LPS、肿瘤坏死因子、ET等均能诱导iNOS mRNA表达增加[2]。本研究表明LPS作用后1 h血中NO开始升高，肺组织NOS活性增加，而NOS mRNA表达以iNOS增高为主，并随时间进行性增高，eNOSmRNA表达无显著性变化。提示此时NO的大量产生可能来源于iNOS诱导表达。目前推测ALI时，肺组织炎症细胞因子大量产生，诱发iNOS mRNA表达增加，使NO大量生成对细胞产生毒性作用[2]。本实验提示，在NO升高的同时伴有肺组织进行性损伤的病理变化，可见iNOS诱导产生的大量NO参与肺损伤的病理生理过程[3]。

血浆ET受多种代谢因素影响，尤其是ALI时缺氧、细胞因子等诱导血管内皮细胞合成释放ET增加，同时缺氧可使多种活性物质释放，如血栓素A_2、血管紧张素Ⅱ等，这些物质也能刺激内皮细胞释放ET-1。本研究表明ET-1在LPS作用后1 h开始显著增高，维持到LPS后7 h，并随着ET-1含量的增高、肺损伤程度越来越严重，说明ET-1也参与了ALI的病理生理过程。与NS组比较ALI组ET-1/NO比值显著增高，LPS注射1 h后ET-1/NO比值出现高峰，并随时间呈下降趋势，提示早期ET较NO增高更为显著，可能对NO产生诱导和促进作用。Yoshidaka等证明ET受体阻滞剂可以减少ALI过程中NO的产生及逆转肺损伤的严重程度，认为ET是通过刺激NO参与ALI。

NO和ET参与了ALI病理生理过程，ET通过诱导NO过量释放而间接发挥细胞毒性损伤作用，两者相互关联，相互制约推动着肺损伤的发生发展。如能及早干预、合理治疗和阻断ET、NO过量释放可减轻ALI的继续发展。因此，探索和寻求理想的ET受体拮抗剂，NOS抑制剂将是防治ALI的有效途径。

关键词：内毒素；肺损伤；NO；NOS；ET-1
中图法分类号：R563.02 **文献标识码**：A

参考文献：

[1] McMillen M A, Sumpio B E. Endothelins: polyfunctional cytokines[J]. J Am Coll Surg, 1995, 180(5): 621-637.
[2] Mercer R R, Costa D L, Crapo J D. *et al*. Effects of prolonged exposure to low doses of nitric oxide or nitrogen dioxide on the alveolar septa of the adult rat lung[J]. Lab Invest, 1995, 73(1): 20-28.
[3] Kutzsche S, Lyberg T, Bjertnaes L J, *et al*. Effects of adenosine on extravascular lung water content in endotoxemic pigs[J]. Crit Care Med, 2001, 29(12): 2371-2376.

（编辑 栗 嘉）

文章编号：1000-5404(2005)08-0807-01

个案与短篇

耳后岛状皮瓣修复外耳道黑色素瘤术后皮肤缺损1例

A case report of cutaneous deficiency plerosis in external auditory meatus with postauricular island skin flap after melanoma resection

周亚光，薛希均，宋 锐，刘 颖 （成都军区昆明总医院耳鼻咽喉-头颈外科，昆明 650032）

患者，女，15岁，因“发现右外耳道黑色新生物12年”于2003年9月入院。入院查体：右耳甲腔内1/3及右外耳道骨部可见约2 cm×3 cm黑色新生物，表面光滑无溃破，纯音测听示：右耳传导性耳聋，耳后、耳前及颈部未触及肿大淋巴结，颞骨CT扫描示：右耳外耳道可见软组织影约2 cm×2 cm，靠位于骨性外耳道后壁及耳甲腔，增强影无强化，听小骨及听骨链完整，乳突规等，耳蜗正常，B超检查：耳周及颈部无肿大淋巴结，术前血常规、凝血功能、生化、肝功、胸片及心电图正常，各项检查无手术禁忌证。遂于局麻下行右外耳道新生物摘除术+耳后岛状皮瓣修复外耳道。手术步骤：于耳后1 cm作皮肤切口，分离皮下组织至骨膜，沿耳后2 cm作骨膜切口，剥离骨膜至外耳道前面掀起皮瓣，充分暴露黑色新生物蒂部，沿蒂缘约0.3 cm切除新生物，切削钻头打磨扩大骨性外耳道；钝性分离耳后皮肤及皮下组织，作岛状皮瓣，蒂位于岛状皮瓣中央，分离中将蒂周围皮瓣剪薄，将皮瓣潜行入外耳道术后皮损处及耳甲腔，对位整合外侧缘，碘伤填塞，耳后逐层缝合骨膜及皮肤，轻压包扎，术后给予抗感染，活血化淤治疗。病理检查显示：黑色素瘤（良性），术后20 d，修复外耳道皮损处皮瓣成活，无复发征象，随访1年，无复发，外耳道皮瓣成活，耳廓无畸形，外耳道无狭窄；听力正常。

讨论

耳廓、外耳道新生物并不少见，为良性黑色素瘤、基底细胞癌和上皮细胞癌好发的部位，恶性黑色素瘤少见。外耳道术后的皮肤缺损，除了一部分小缺损让其自行修复外，对较大的缺损通常采用替尔氏植状皮片修复，但该方法的操作麻烦，皮瓣不易铺平，易坏死，成活率不高，且色泽有明显差异，外耳道狭窄或闭锁的几乎无一我们采用耳甲腔对应耳廓附着处做隧道，用耳后岛状皮瓣修复外耳道、耳甲腔皮肤缺损，由于有耳后动脉提供血供，能保证丰富的血液循环，不致因血液循环不良或张力过大导致皮瓣坏死，成活率高；另外，皮瓣来源丰富，操作方便，成活的皮肤颜色与邻近外耳道及耳甲腔肤色一致，而且供皮区隐蔽，不影响美容[1]。

关键词：岛状皮瓣；修复；皮肤缺损
中图法分类号：R622.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李德忠，冯建中，刘大响，等. 耳后带蒂肌皮瓣修复外耳道皮肤缺损的疗效[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2003，17(1)：55.

（编辑 陈聪连）

作者简介：周亚光(1971-)，男，湖北省浠水县人，主治医师，主要从事面部缺损修复和创伤性运输方面的研究。电话：(0871)3341218，E-mail：yaguangzhou@yahoo.com.cn

收稿日期：2004-12-27；修回日期：2005-01-11