文章编号:1000-5404(2005)15-1569-04

论著

重症急性胰腺炎大鼠肺脏 iNOS mRNA 表达及丹参的干预效应

张 莹[1],石承先[1],别 平[2],任娟娟[1],李玉祥[3],黄 平[3] ([1]贵州省人民医院普通外科,贵阳 550000;[2]第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038;[3]遵义医学院组织与胚胎学教研室,遵义 563003)

提 要:目的 探讨重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠肺脏诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA的表达及其与肺组织损伤的关系和丹参的治疗效应。**方法** 45只Wistar大鼠随机分为3组。SAP模型组、丹参组均以5%牛磺胆酸钠经胰管内逆行注射(1 ml/kg)复制SAP模型,丹参组则在制模后立即肌肉注射丹参(2 ml·kg^{-1}·d^{-1}),每6 h 1次,共给药4次。对照组仅行假手术。各组动物在术后24 h测血一氧化氮(NO)、淀粉酶(AMY)和腹水量。使用原位杂交和图像分析检测肺iNOS mRNA的表达强度,并观察其病理变化。**结果** AP模型组血中NO、AMY、腹水量和肺脏iNOS mRNA表达显著高于丹参组和对照组($P<0.05$, $P<0.01$);丹参组病理改变较模型组减轻。**结论** SAP时肺组织iNOS mRNA高表达导致NO过度生成并与肺脏损伤有关;丹参能抑制肺组织iNOS mRNA的过度表达,从而对肺组织起保护作用。

关键词: 重症急性胰腺炎;肺脏;iNOS mRNA;丹参;保护
中图法分类号: R282.71; R563; R576.02 **文献标识码:** A

Effect of salvia miltiorrhiza on inducible nitric oxide synthase mRNA expression in lungs of rats with severe acute pancreatitis

ZHANG Ying[1], SHI Cheng-xian[1], BIE Ping[2], REN Juan-juan[1], LI Yu-xiang[3], HUANG Ping[3] ([1]Department of General Surgery, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550000, [2]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [3]Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in lungs and the effect of salvia miltiorrhiza on lung injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** A total of 45 Wistar rats were randomly divided into 3 groups: SAP model group (SP, $n=15$), salvia miltiorrhiza group (SM, $n=15$) and sham operation group (SO, $n=15$). Severe acute pancreatitis was induced by intraductal injection of 5% sodium taurocholate (1.0 ml/kg) in SP group and SM group. Sham operation was only made in SO group. Salvia miltiorrhiza (2 ml·kg^{-1}·d^{-1}) was intramuscularly injected immediately after SAP was induced in SM group, and the same dose was administrated every 6 h. The same volume of physiological saline was administrated in SP group and SO group. The volume of ascites and serum nitric oxide (NO) and amylase (AMY) were determined. iNOS mRNA expression in lung were examined by *in situ* hybridization. The pathologic changes of lung was observed after 24 h of rat model establishment. **Results** The volume of ascites and serum levels of AMY and NO and the expression of iNOS mRNA in lung in SP group were higher than in SM group and SO group ($P<0.05$, $P<0.01$). The pathologic changes of lung in SM group were less than in SP group. **Conclusion** Over-expression of iNOS mRNA in lung plays an important role in lung injury in SAP rat models and salvia miltiorrhiza inhibits the expression of iNOS mRNA and ameliorate the lung injury.

Key words: severe acute pancreatitis; lung; iNOS mRNA; salvia miltiorrhiza; protection

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)起病急,变化快,病情凶险,常并发多器官衰竭(MOF),其中呼吸功能衰竭最为常见,但其确切机制不明。研究表明,微循环障碍在SAP发生与发展过程中起重要作用[1]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是调节血液循环的重要介质,是内皮细胞以L-精氨酸(L-

基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长基金资助项目(黔科教办2001-06)
Supported by the Nomarch Funds for Excellent Sci & Tech Teachers of Guizhou Province (2001-06)

作者简介: 张 莹(1974-),男,陕西省铜川市人,博士研究生,医师,主要从事肝移植和重症胰腺炎的实验与临床方面的研究。现在第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所读博,电话:(023)68754169

收稿日期: 2005-06-13;**修回日期:** 2005-07-05

Arg)为底物,在一氧化氮合酶(nitric oxid synthase, NOS)作用下生成,是一种易透过细胞膜的细胞内信使分子,具有多种生物学功能。SAP时,肺脏组织中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)mRNA的表达如何,其与血中NO水平及与肺脏病理改变的关系尚不清楚。本实验通过观察肺脏iNOS mRNA表达的情况对于肺脏损伤的关系,并用丹参注射液进行干预,以探讨SAP肺损伤的机制及丹参的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和主要仪器

牛磺胆酸钠购于Sigma公司。iNOS原位杂交试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。NO试剂盒购于南京建成生物工程研究所。α淀粉酶试剂盒购于上海科华-东菱诊断用品有限公司。丹参注射液(10 ml/支)购于四川五粮液集团宜宾制药厂。

1.2 实验动物和SAP模型制备

1.2.1 实验动物 45只Wistar大鼠(遵义医学院动物饲养中心提供),体质量220~280 g,雌雄不限,按随机数字表法分成3组,每组15只。第1组为SAP模型组(SAP model group, SP);第2组为丹参组(salvia miltiorrhiza group, SM);第3组为对照组(sham operation group, SO)。

1.2.2 制备SAP模型 SP组术前禁食12 h,禁水4 h。1%戊巴比妥钠(25 mg/kg)腹腔内注射麻醉。按外科无菌要求手术,采用上腹壁正中切口入腹,寻及十二指肠及胰胆管,用一小动脉夹夹闭胆管近肝门端,4.5号针头经肠壁从十二指肠乳头刺入胰胆管约0.8 cm,以0.2 ml/min的速度向胰胆管内逆行推注5%牛磺胆酸钠溶液(sodium taurocholate, Na-Tc, Sigma),1.0 ml/kg,注毕压迫5 min,见胰腺出血坏死后去除小动脉夹关腹。SM组按SP组方式复制SAP模型,关腹时腹股沟肌肉内注射丹参注射液(2 ml·kg^{-1}·d^{-1}),以后按上述剂量,每6小时肌注1次,共给药4次。SO组仅开腹并轻轻触动十二指肠,然后关腹。SP组、SO组肌肉注射0.9%氯化钠溶液,剂量、给药时间同SM组。3组动物均分笼饲养,自由进水。制模至24 h,在1%戊巴比妥钠腹腔内注射(15 mg/kg)麻醉下经颈动脉插管采血并处死动物,取肺组织备检。

1.3 观察指标和方法

1.3.1 血浆NO、AMY和腹水量测定 采血样1 ml,加少许肝素混匀,2 500 r/min离心15 min,取血浆-20 ℃保存批量测定。NO检测按试剂盒说明书操作。AMY检测用全自动生化分析仪按试剂盒说明书操作。处死动物开腹后用注射器抽尽腹水并计量。

1.3.2 病理观察 肺组织标本固定于4%多聚甲醛溶液中(含0.1% DEPC),常规脱水,石蜡包埋、切片做HE染色和原位杂交。

1.3.3 iNOS mRNA原位杂交 原位杂交过程按试剂盒说明操作。判断结果的标准:iNOS mRNA阳性表达的细胞胞浆中出现棕黄色颗粒。

1.3.4 图像分析和半定量分析 应用Biomias99图像分析系统(四川大学图像图形研究所),在10×20倍视野下,每张切片取50%组织测定积分光密度(IOD)表示阳性颗粒相对含量。

1.4 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件行方差分析和q检验。

2 结果

2.1 动物情况

所有动物均在术后0.5~1 h清醒,SP组动物神志萎靡,对外界刺激反应迟钝,进食饮水差,畏寒,肌力弱,6只动物在制模后20~24 h死亡(40%),在濒死时取血和肺组织标本;SM组动物神志清醒,对外界刺激反应较敏捷,进食饮水尚可,肌力较强,3只动物在制模后20~24 h死亡(20%),在濒死时取血和肺组织标本;SO组动物一般状况良好,神志清,活动敏捷,肌力基本正常,无死亡。

2.2 血浆NO、AMY和腹水量变化

SP组、SM组大鼠血NO、AMY和腹水量均显著高于SO组($P<0.01$),SM组NO、AMY和腹水量明显低于SP组($P<0.05$、$P<0.01$),见表1。

表1 血NO、AMY和腹水量($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Serum levels of NO, AMY and the volume of ascites($\bar{x}\pm s$)

Group	n	NO (μmol/L)	AMY (U/L)	Volume of ascites(ml)
SP	15	163.36±20.40	2156.05±355.87	9.87±2.34
SM	15	146.27±24.3*	1439.21±332.99**	5.27±2.81**
SO	15	69.84±18.06*#	215.67±37.27*#	0

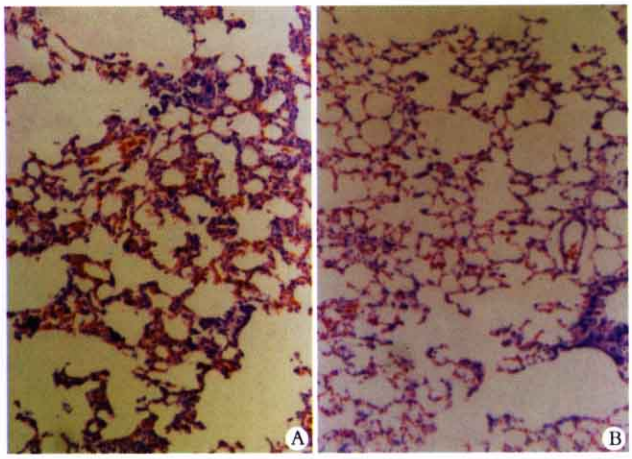
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* SP; #: $P<0.01$, *vs* SM

2.3 病理观察

2.3.1 肉眼观察 SP组开腹见淡红色或淡黄色腹水,量多,胃肠胀气明显;胰腺大片出血坏死,呈暗红色,表面及周围腹膜、系膜见皂化斑;肺表面高度充血,可见点状出血,胸腔内少量积液,呈血性。SM组见中量或少量腹水,呈淡红色或淡黄色,胃肠胀气较模型组轻;胰腺见片状出血坏死,呈暗红色,表面及周围腹膜、系膜可见皂化斑;肺表面充血明显,无胸腔积液。SO组无腹水,腹内器官及肺脏未见异常改变。

2.3.2 光镜观察 SP组部分肺泡腔内有出血,少量渗出,肺泡大小不一,肺泡壁明显增厚,毛细血管高度充血,有炎症细胞浸润,支气管壁水肿,管腔内有渗出物(图1A);SM组仅有肺泡壁轻度增厚,间质毛细血管扩张、充血,少量炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主,支气管壁轻度水肿(图1B);SO组肺脏结构完整未见异常。

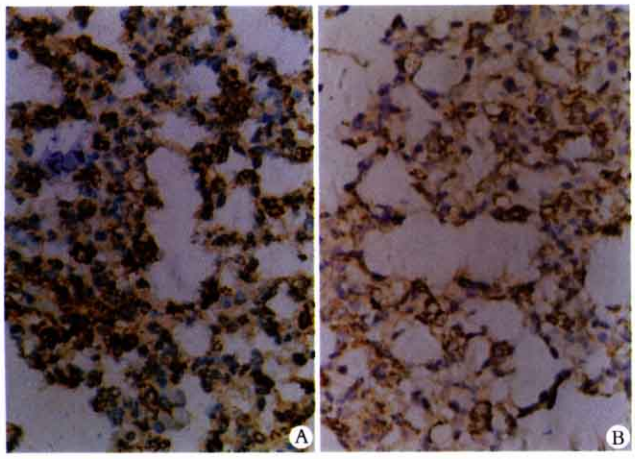
2.3.3 肺脏iNOS mRNA的表达 SO组肺未见iNOS mRNA的表达。SP组和SM组的支气管、肺泡毛细血管均有iNOS mRNA表达,SP组显著高于SM组($P<0.01$,图2),其中在SM组内支气管表达高于肺泡毛细血管表达($P<0.05$,表2)。



A：SP group；B：SM group

图 1　光镜下丹参组肺泡病理改变　（HE×100）

Fig 1　The pathological changes of lung alveolus in SM group under light microscope　（HE×100）



A：SP group；B：SM group

图 2　肺脏 iNOS mRNA 表达　（原位杂交×400）

Fig 2　iNOS mRNA expression in SP group　（*In situ* hybridization　×400）

表 2　肺脏 iNOS mRNA 表达（IOD，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　iNOS mRNA expression in lung（IOD，$\bar{x}\pm s$）

Group	*n*	iNOS	
		Blood capillary of alveolus	Bronchus
SP	15	28.57±1.18	28.45±1.4
SM	15	22.84±1.37△*	23.87±1.18△

*：$P<0.05$，*vs* bronchus；△：$P<0.01$，*vs* SP

3　讨论

SAP 是一种常见的外科急腹症，病情凶险复杂，常并发多器官损伤，其中以肺脏损伤最为常见。许多专家认为 SAP 是全身微循环紊乱综合征，微循环紊乱不仅是 SAP 起始因素或加重因素，也是 SAP 并发全身炎症反应引发胰腺炎相关的 MOFS 的一个因素[2]。作为重要的血管活性物质——NO 在此病理生理过程中可能起重要作用。

3.1　SAP 时肺脏 iNOS mRNA 表达与组织损伤的关系

NOS 可分为结构型（cNOS）和诱导型（iNOS），前者又可分为内皮细胞型（eNOS）和神经元型（nNOS）。cNOS 依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白（CaM）激活。iNOS 表达于多种细胞，通常在细菌脂多糖、干扰素、IL-1、TNF 等诱导下表达，其活性不依赖于 Ca^{2+}-CaM，而且 iNOS 比 cNOS 存在时间长，可产生更多的 NO。NO 生物学效应复杂多样，主要分为促炎和抗炎作用：促炎作用是其作为氧自由基，发挥组织细胞损伤作用[3]；抗炎作用是其能抑制多种血液成分如血小板、中性粒细胞和单核细胞，改变血管通透性，改善微循环，减少促炎细胞因子和粘附分子的表达[4]。研究表明 NO 对机体有利还是有害取决于 NO 产生的部位、作用持续的时间和量[5]。

本实验研究表明 SP 组动物肺脏 iNOS mRNA 呈高表达状态，相应的血液中 NO 水平明显升高，血清淀粉酶和腹水量亦上升，肺病理损伤严重，肺间质水肿增厚，大量白细胞和红细胞渗出，肺内毛细血管扩张；相反，使用丹参治疗的动物，肺脏 iNOS mRNA 表达下调，血中 NO 水平降低，血清淀粉酶和腹水量亦下降，肺脏损伤较轻。表明 iNOS mRNA 高表达与肺脏损伤成正比，在 SAP 肺损伤中起重要作用。其作用机制可能是 NO 强烈舒张肺毛细血管，导致内皮间隙增宽，血管通透性增高，增加白细胞与血管内皮的粘附，从而导致白细胞和内皮细胞相互作用，促使大量活性氧弹性蛋白酶和溶酶体酶释放，并激活补体，对血管内皮和器官组织细胞产生损害，使支气管粘膜水肿、肺血管收缩，产生肺动脉高压，通气/血流比值失调，导致缺血和血栓形成，肺血管通透性增强，肺间质水肿，肺出血坏死和低氧血症。这与其它实验显示的一些结果相同，即 SAP 时，iNOS mRNA 表达增强，NO 过度生成，导致低血压，低灌流，及发挥其自由基损伤作用增加，造成胰腺及胰外器官损伤[6]，使用 iNOS 抑制剂，减少 NO 的生成，可减轻胰腺炎病情[7]。

3.2　丹参对 SAP 肺脏 iNOS mRNA 表达的影响及作用机制

丹参是常见的活血化淤药，实验证明具有增加动物肠系膜血流速度，抗凝血和抗氧化作用，能降低血液粘稠度，减少细胞内脂质-DNA 合成物的产生，增加细胞内还原型谷胱甘肽抗氧化剂的含量及活性，使组织损伤明显减轻[8,9]。本实验显示，使用丹参注射液的 SM 组动物，肺脏 iNOS mRNA 表达均比 SP 组动物的表达明显下调，血中 NO 水平亦显著降低，相应的器官

病理改变也减轻，提示丹参具有器官保护效应，同时，本研究还表明丹参治疗的SM组肺泡毛细血管iNOS mRNA表达下调与支气管iNOS mRNA表达下调存在显著差异性，因此作者推测肺泡毛细血管损伤可能是导致SAP肺损伤的机制之一。丹参能减轻肺泡毛细血管损害，改善肺通气、肺换气功能，维持通气/血流比值的相对稳定，从而减少呼吸功能不全或衰竭的发生，其作用机制可能是：一方面通过抑制SAP时肺脏iNOS mRNA的过度表达，减少NO过度生成，降低血管通透性，减轻组织水肿，减少白细胞渗出从而发挥其器官保护效应的作用；另一方面也有可能是丹参具有抗氧自由基的作用，拮抗NO的自由基对肺脏的损伤。

本实验证实丹参对SAP时肺脏损害有明显的治疗作用，通过改善微循环，在一定程度上阻断了胰腺炎的肺脏损害，阻抑呼吸功能衰竭的发生，是一种良好的治疗药物。

参考文献：

[1] Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, *et al*. Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis [J]. Am J Physiol, 1993, 265 (1 Pt 1): G165-G171.

[2] Foitzik T, Eibl G, Hubert G, *et al*. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates [J], Surgery, 2000, 128(3): 399 -407.

[3] Wink D A, Mitchell J B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory , cytotoxic and cytoprotective mechanisms of oxide[J]. Free Radi Biol Med, 1998, 25 (4 -5): 434 -456.

[4] Peralta C, Hotter G, Clods D, *et al*. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemic-reperfusion in the rats: role of nitric oxide and adenosive[J]. Hepatology, 1997, 25 (4): 934 -937.

[5] Taylor B S, Alarcon L H, Billiar T R. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function [J]. Biochemistry, 1998, 63 (7): 766 -781

[6] Ayub K, Serracino I F, Williamson R C, *et al*. Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischemia and reperfusion[J]. Br J Surg, 2001, 88 (9): 1189 -1193.

[7] Rau B, Bauer A, Wang A, *et al* . Modulation of endogenous nitric oxide synthase in experimental acute pancreatitis: role of anti-ICAM-1 and oxygen free radical scavenger[J]. Ann Surg, 2001, 233(2): 195 -203.

[8] 吴咸中，田在善. 证与治则的现代研究[M]. 天津：天津科技翻译出版公司，1999. 141 -156.

[9] 中国科学院药物研究所. 中草药现代研究[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1996. 509 -513.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)15-1572-01

股静脉置管术在肺癌化疗病人的应用

Application of femoral vein catheter in chemotherapy of lung cancer

黄润佳，周蒙丽，周明芳 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸内科，重庆 400042）

静脉置管术输液作为一项新的技术已广泛应用于临床，虽然颈内静脉具有体表标志相对明显、操作简单方便、穿刺成功率高、并发症少等优点[1]，但在肺癌并发上腔静脉阻塞综合征的病人，则限制了颈内静脉置管术的应用。为此，本科于2002年1月至2004年10月对52例肺癌化疗病人进行股静脉置管输液，取得了较好效果。

1 临床资料

1.1 一般资料

52例肺癌化疗病人中，男性37例，女性15例，年龄40～72岁，平均56岁。

1.2 穿刺前评估

评估病人心理状况，做好解释工作，个别恐惧心理较重的病人，可通过已经行此手术的患者告之此手术的优点及方便之处，并将手术的全过程告诉他（她），消除患者心理负担，愉快配合置管。

评估病人肢体运动情况及穿刺部位情况等，如有血栓、疝气及骨转移等，尽量选择对侧。

1.3 穿刺步骤

穿刺前为患者备皮，然后嘱病人清洗会阴部及排空膀胱。病人取平卧位，穿刺侧下肢外展20～30°，外旋45°，极度消瘦者在关节下垫一薄枕[2]，以充分暴露局部。常规消毒、铺孔巾。术者手扪及股动脉搏动处，做股动脉定位，抽取2%利多卡

（下转1583页）

作者简介：黄润佳（1972－），女，四川省自贡市人，主管护师，主要从事呼吸科护理学方面的研究。电话：(023)68757245

收稿日期：2005-01-25；修回日期：2005-04-12