DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.036
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1081-03

论著

一氧化氮在急性出血坏死性胰腺炎大鼠胰肾损伤中的作用

任晓葆[1],何振平[2],文 亮[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]急救部;[2]全军肝胆外科中心、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨一氧化氮(NO)在不同时机及剂量条件下对急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)胰、肾损伤的作用。方法 观察不同时机、不同剂量的L-精氨酸(L-Arg)催化NO生成后的AHNP大鼠血浆淀粉酶、肌酐、尿素氮、内毒素、NO,胰、肾组织NO及血流变化,并分析动物死亡情况。结果 小剂量L-Arg即时给予明显降低AHNP大鼠血淀粉酶,改善胰、肾血循环、保护肾功能、降低大鼠死亡率,延时给予对AHNP病情无影响,大剂量L-Arg无论即时或延时给予,明显加重胰、肾血循环紊乱,肾功能明显受损,大鼠死亡率明显增加。结论 AHNP大鼠产生的NO对胰、肾组织具有截然不同的生物学作用,这种作用与NO产生明显存在着时机与量的关系,对于临床应用NO供体治疗AHNP具有重要意义。

关键词:急性胰腺炎;一氧化氮;肾损伤;大鼠
中图法分类号:R576;R914.3;R977.4 文献标识码:A

Effect of nitric oxide on the pancreas and kidney organ damage in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis

REN Xiao-bao, HE Zheng-ping, WEN Liang (Department of Emergency Service, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstrat: Objective To determine the role of different doses and time of nitric oxide (NO) on the pancreas and kidney organ damage in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis (AHNP). Methods After the model of AHNP was established by injection of 5% sodium taurocholate into the biliary-pancreatic duct in rats, the changes of amylase, creatinine, ureanitrogen, endotoxin, No in blood and NO in pancreatic and kidney tissue and blood flow of pancreas and kidney were observed in AHNP model treated by different doses and time of L-arginine, and the mortality was analyzed. Results Concentration of amylase and the mortality was decreased, blood flow of pancreas and kidney was improve in AHNP model treated immediately by low doses of L-arginine but high doses of L-arginine could induced severe pancreatic and renal histolcagic damage and the mortatity was incereased. Conclusions Effect of NO in the pathogenesis of pancreas and kidney organ damage in rats with AHNP which is positively correlated with time and doses.

Key words: acute pancreatitis; nitric oxide; kidney injury; rats

肾功能损伤是急性出血坏死性胰腺炎(Actue hemorrhagic necrotizing pancreatitis, AHNP)最早受累的器官,而病理条件下一氧化氮(Nitric oxide, NO)的生成具有截然不同的生物学作用[1]。AHNP大鼠NO变化在其胰、肾损伤中的作用,目前未见报道。本实验通过观察不同时机、不同剂量的L-精氨酸(L-Arg)催化NO生成后的AHNP大鼠胰、肾损伤变化,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

成年健康Wistar大鼠120只,体重180~250 g,雌雄不拘,随机分组:正常对照组,AHNP组,小剂量L-Arg$_{100}$即时治疗组(L-Arg$_{100}$Ⅰ)、延时治疗组(L-Arg$_{100}$Ⅱ),大剂量L-Arg$_{1000}$即时治疗组(L-Arg$_{1000}$Ⅰ)、延时治疗组(L-Arg$_{1000}$Ⅱ)每组20只。

1.2 模型制备

参照Aho等[2]人方法稍加改进。大鼠术前禁食12 h,2.5%戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉(0.1 ml/100 g),腹壁正中切口入腹,5号头皮针经肠壁从十二指肠乳头插入胆胰管约1 cm深,用无损伤血管钳钳夹固定针头进入十二指肠乳头处,近肝门处用动脉夹阻断胆总管,注入5%牛磺胆酸钠溶液0.01 ml·g^{-1}·min^{-1}(Sodium taurocholate, Na-Tc, Sigma),去掉血管钳及动脉夹,双层缝合腹壁,建立AHNP模型。L-Arg治疗组在模型制备后0.5 h(即时治疗)或3 h(延时治疗)经股静脉注射L-Arg(上海康达氨基酸厂生产),小剂量100 mg/kg或大剂量1 000 mg/kg。所有动物于12 h测定胰、肾血流量,下腔静脉抽静脉血。

1.3 观察指标和方法

1.3.1 血浆淀粉酶测定 下腔静脉抗凝血2 ml,4 ℃ 4 000 r/min离心10 min后取血浆0.5 ml,采用比色法反应测定淀粉酶活性。

1.3.2 血浆内毒素测定 血浆制备同上,采用上海生化所提供试剂盒说明进行。

1.3.3 血肌酐、尿素氮测定 采用全自动生化分析仪(日本生化室工业株式会社)测定。

1.3.4 血浆、胰及肾组织NO测定 血浆制备同上,取血浆0.5 ml,加入4 mol/L过氯酸0.1 ml,混匀后离心2 000 r/min,15 min,取全部上清加0.1% Rivanol 200 μl及12 mol/L盐酸400 μl,加双蒸水至总体积2 ml,520 nm测定吸光度,根据标准曲线计算样本NO含量(μmol/ml);取胰、肾组织100 mg,加入4 mol/L

作者简介:任晓葆(1965-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事危重病方面的研究,发表论文20篇。电话(023)68754000-73048

收稿日期:2001-06-03;修回日期:2001-09-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

过氯酸 1 ml，匀浆后离心 2 000 r/min，15 min，其余操作同血浆 NO 测定，以 μg/g 组织表示。

1.3.5 胰、肾组织血流量测定 采用氢气清除法，用组织末稍血流测定仪(PHG-300，日本松下通信株式会社)进行测定。

1.3.6 死亡观察 观察动物 72 h 内死亡情况，统计死亡率。

1.4 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用华西医科大学 Pems 医用统计软件对实验数据进行统计处理。

2 结果

血浆淀粉酶变化，见表 1。L-Arg$_{100}$ I 组与正常组间无显著性变化($P>0.05$)，但非常显著低于 AHNP 及其余各组($P<0.01$)，AHNP 组及其余各组非常显著高于正常组($P<0.01$)，L-Arg$_{1000}$ Ⅰ、L-Arg$_{1000}$ Ⅱ 组显著高于 AHNP 组($P<0.01$)。

血肌酐、尿素氮变化，见表 1。L-Arg$_{100}$ I 组与正常组间无显著性变化($P>0.05$)，但非常显著低于 AHNP 及其余各组($P<0.01$)，AHNP 组及其余各组非常显著高于正常组($P<0.01$)，L-Arg$_{1000}$ I、L-Arg$_{1000}$ II 组显著高于 AHNP 组($P<0.01$)。

血浆内毒素变化，见表 1。L-Arg$_{100}$ I 组与正常组间无显著性变化($P>0.05$)，但非常显著低于 AHNP 及其余各组($P<0.01$)，AHNP 组及其余各组非常显著高于正常组($P<0.01$)，L-Arg$_{1000}$ I、L-Arg$_{1000}$ II 组显著高于 AHNP 组($P<0.01$)。

表 1 各组血浆淀粉酶、肌酐、尿素氮、内毒素、NO 含量变化($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of concentrations of amyclase, creatinine, urea nitrogen, endotoxin, nitric oxide in plasma($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Amylase (IU·L^{-1})	Creatinine (μmol·L^{-1})	Urea nitrogen (μmol·L^{-1})	Endotoxin (ng·L^{-1})	Nitric oxide (μmol·L^{-1})
Control	973.75±524.12	57.94±8.29	5.86±1.47	80.70±8.71	1.96±0.52
AHNP	3 876.72±1 216.72 △	126.78±11.77 △	10.25±1.76 △	210.76±8.82 △	3.92±0.63 △
L-Arg$_{100}$ I	1 687.63±976.71 *	67.82±10.26 *	7.52±1.67 *	90.77±10.22 *	2.54±0.58 *
L-Arg$_{100}$ II	4 163.64±1 856.23 △#	141.23±13.21 △#	11.77±1.72 △#	230.16±19.38 △#	4.10±0.62 △#
L-Arg$_{1000}$ I	6 837.07±2 764.38 △*	213.70±19.72 △*	23.74±2.31 △*	289.11±21.66 △*	6.16±0.81 △*
L-Arg$_{1000}$ II	6 407.86±2 872.41 △*	214.7±20.13 △*	22.66±2.40 △*	262.72±22.83 △*	6.09±0.79 △*

△：$P<0.01$ *vs* control；*：$P<0.01$ *vs* AHNP；#：$P<0.01$ *vs* treatment at once

血浆、胰及肾组织 NO 变化，见表 2。L-Arg$_{100}$ I 组与正常组间无显著性变化($P>0.05$)，但非常显著低于 AHNP 及其余各组($P<0.01$)，AHNP 组及其余各组非常显著高于正常组($P<0.01$)，L-Arg$_{1000}$ I、L-Arg$_{1000}$ II 组显著高于 AHNP 组($P<0.01$)。

胰、肾血流量变化，见表 2。L-Arg$_{100}$ I 组与正常组间无显著性变化($P>0.05$)，但非常显著低于 AHNP 及其余各组($P<0.01$)，AHNP 组及其余各组非常显著高于正常组($P<0.01$)，L-Arg$_{1000}$ I、L-Arg$_{1000}$ II 组显著高于 AHNP 组($P<0.01$)。

动物死亡情况。正常组动物全部存活，AHNP 组、L-Arg$_{100}$ I 组、L-Arg$_{100}$ Ⅱ 组、L-Arg$_{1000}$ I 组、L-Arg$_{1000}$ II 组，死亡率分别为 58.33%、16.67%、66.67%、100%、91.67%，死亡鼠存活时间分别为(16.50±5.75) h、(26.42±4.75) h、(18.25±6.72) h、(8.70±4.23) h、(9.50±4.60) h。L-Arg$_{100}$ I 组死亡率显著低于 AHNP 组及其余各组($P<0.01$)，死亡时间显著延长($P<0.01$)，L-Arg$_{1000}$ I 组、L-Arg$_{1000}$ II 组较 AHNP 组死亡率显著增加($P<0.01$)，死亡时间显著缩短($P<0.01$)。

表 2 各组胰腺、肾脏组织血流量及 NO 含量($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of blood flow and NO in pancreas and kidney tissue($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Blood flow (ml·s^{-1}·100 g^{-1})		NO(μg·g^{-1})	
	Panceas	Kidney	Pancreas	Kidney
Control	94.20±12.77	124.76±15.23	2.68±0.32	2.98±0.36
AHNP	42.33±5.21 △	96.68±12.73 △	3.52±0.43 △	3.78±0.38 △
L-Arg$_{100}$ I	81.94±10.22 *	110.98±10.45 **	3.05±0.38 **	3.01±0.38 *
L-Arg$_{100}$ II	40.35±8.72 △#	79.67±10.48 △#	4.11±0.58 △#	4.21±0.42 △#
L-Arg$_{1000}$ I	27.68±6.21 △*	56.24±8.36 △*	5.27±0.62 △*	6.12±0.58 △*
L-Arg$_{1000}$ II	30.71±5.70 △*	58.98±8.79 △*	5.26±0.64 △*	6.05±0.61 △*

△：$P<0.01$ *vs* control；*：$P<0.01$ *vs* AHNP；#：$P<0.01$ *vs* L-Arg$_{100}$ I

3 讨论

以 L-Arg 精氨酸(L-Arg)为底物在体内一氧化氮合成酶(NOS)催化生成的 NO，是一种很强生物活性物质，具有广泛且重要的生物学功能，其主要是传递信息、舒张血管和细胞毒作用，参与了多种炎症性疾病的发生、发展过程。Liu 等[3] 通过蛙皮缩胆囊肽(Cerulein)复制大鼠 AP 模型，观察 NO 的作用，发现 AP 大鼠给予适量 NO 供体——L-Arg 后，胰腺血流增加、组织水肿明显减轻，胰腺组织炎症反应减轻。但是 Abe 等[4] 在同样 AP 大鼠模型下，研究认为 NO 通过增加胰血管通透性和蛋白渗出反而促进胰腺水肿和炎症反应加重。由此两种截然不同的结论，正说明 NO 在 AP 时的复杂生物学功能。本实验通过不同时机、不同剂量的 NO 供体——L-Arg，发现：AHNP 时大鼠存在显著血浆及胰组织 NO 增加，胰腺血流量显著下降，胰淀粉酶显著增加；小剂量 L-Arg 即时给予后明显降低血浆、胰组织 NO 及胰淀酶，改善胰腺血循环；延时给予后对 AHNP 大鼠病情无明显影响；大剂量 L-Arg 无论是延时或即时给予后显著增加血浆、胰组织 NO，胰血流显著降低，胰淀粉酶显著增加。结果表明：AHNP 大鼠早期存在 NO 合成相对不足，即时补充适量 NO 供体后，通过其改善胰腺循微环等生物学作用[5]，有利于 AHNP 病程转归；另一方面，随 AHNP 大鼠病程发展，胰酶、内毒素及炎症介质作用下，内皮细胞合成 NO 过多，反之过量 NO 生成通过[6] ①直接抑制靶细胞的氧化呼吸链，致胰腺细胞及胰血管内皮细胞损害；②与铜蛋白及其它氧自由基结合，产生过量 $ONOO^-$，从而对胰组织有毒性作用。

AHNP 并发肾损害为一常见、严重并发症，多种因素多个环节参与了这一过程。AHNP 大鼠 NO 对肾脏的生物学作用未见报道。本实验研究发现：AHNP 大

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

鼠 12 h 时存在内毒素血症，血 BUN、Cr 显著升高，肾组织 NO 显著升高，肾血流显著下降；即时给予小剂量 L-Arg 后明显降低血内毒素及肾组织 NO，肾功能明显改善，明显降低死亡率，显著延长死亡时间；延时给予后对肾功能未见明显影响；大剂量 L-Arg 无论是延时或即时给予后均显著升高血内毒素及肾组织 NO，肾血流量显著下降，肾功能明显受损，死亡率显著增加，死亡时间明显缩短。从而表明：一方面 AHNP 早期加入适量 L-Arg 后生存的 NO，通过改善 AHNP 大鼠全身及肾脏局部血循环作用，减轻内毒素血症，相对减少了胰、肾组织 NO 生成，避免了 AHNP 时过量 NO 生成对胰、肾组织的损害作用，从而起着有益作用[5,7]；另一方面随过量 NO 生存：①NO 与内毒素诱发产生的大量的细胞因子如 TNFα 协同作用对肾脏损害[7]；②随全身 NO 产生增加，降低血管对宿血管物质反应，致肾组织缺血性损害；③局部过量 NO 与 O_2^- 相互作用后对肾组织细胞直接毒性作用[8]。

总之，AHNP 大鼠在不同时机、不同剂量条件下生成的 NO 对胰、肾组织具有截然不同的生物学功能，了解这一变化对于临床应用 NO 供体治疗 AHNP 具有重要意义。

参考文献：

[1] Werner J, Revera J, Castillo C F, *et al*. Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis[J]. Surgery, 1997, 121(1): 23－30.
[2] Aho H J, Koskensal S M L, Nevalainen J J, *et al*. Experimantal pancreatitis in the rat, sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis J scand[J]. J Gastroentorol, 1980, 15(2): 411－416.
[3] Liu X H, Nakano I R, Yamaguchi Hy, *et al*. Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats[J]. Dig Dis Sci, 1995, 40(10): 2 162－2 169.
[4] Abe T, Shimosegawa J, Satoh A, *et al*. Nitric oxide regulates pancreatitis edema formation in rat cearulein-induced pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1995, 30(3): 636－642.
[5] Jaworek J, Jachimcazk B, Bonior J, *et al*. Protective role of endogenous nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide induced pancretic damage[J]. J Physiol Pharmacol, 2000, 51(1): 85－102.
[6] Shimosegawa J, Toyota J. NO and pancreatic diseases[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1999, 96(8): 23－32.
[7] Tom L A, Castro I, *et al*. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia[J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14(5): 1 139－1 145.
[8] Lieberthal W. Biology of ischemic and toxic ranal tubular cell injury: role of nitric oxide and the inflammatory response[J]. 1998, 7(3): 289－295.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2001)09-1083-01

个案与短篇

人端粒酶催化亚单位诱饵融合蛋白表达载体的构建及初步鉴定

Construction and preliminary identification of human telomerase reverse transcriptase bait fusion protein vector

周 平[1]，陈 兵[2]，刘为纹[1]，房殿春[1]，张 雪[3]，黄庆[3]，杨仕明[1]（第三军医大学附属西南医院：[1] 全军消化专科中心；[2] 内分泌科；[3] 检验科；重庆 400038）

端粒是真核细胞染色体末端的一个特殊结构，由一段具有特定重复序列的 DNA 和端粒结合蛋白组成，是维持染色体结构稳定的重要因素。正常细胞随着细胞分裂活动的进行，端粒 DNA 逐渐缩短，当缩短到一定程度时，染色体结构被破坏，细胞进入衰老期并以死亡而告终。但肿瘤细胞似乎丧失了这种能力，表现出永生化而无限制增殖的特性。尽管端粒研究为肿瘤、衰老难题提供了一个重要的研究方向，但有关端粒蛋白组分的结构及其调控机制仍不十分清楚。因此，寻找新的、关键性的端粒、端粒酶调控分子是非常重要的[1]。本课题拟以已发现的端粒相关蛋白中较为重要的人端粒酶催化亚单位(Human telomerase reverse transcriptase, hTRT)为诱饵，构建 hTRT 诱饵融合蛋白表达载体，为从 cDNA 文库中筛选与 hTRT 作用的端粒相关未知蛋白的编码基因奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ、*Hind* Ⅲ(Promega 公司)，T4 DNA 连接酶(Roche 公司)，载体质粒 pGBKT7(Clontech 公司)，hTRT cDNA 质粒 pGRN145 由美国 Geron 公司惠赠。宿主菌 DH5α，蛋白胨及酵母提取物(Difco 公司)，琼脂糖、λ/ hindIII Marker(华美公司)，质粒提取试剂盒(roche 公司)。紫外分光仪(Beckman Du－600)，电洗脱槽。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取及纯化 质粒 DNA 制备按质粒提取试剂盒操作说明。

1.2.2 hTRT 质粒 pGRN145、载体质粒 pGBKT7 经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切，目的片段的回收纯化采用电洗脱法[2]。洗脱槽内灌满 0.5× TBE 溶液，从 v 型孔的垂直侧加入含溴酚蓝的 5 mol/ L NaCl 溶液 300 μl，左侧圆形样品孔内放入割取的含有待回收的

(下转 1087 页)

基金项目：国家自然科学基金高技术探索资助项目(39980010)
作者简介：周 平(1962－)，男，山东省淄博市人，博士研究生，主治医师，主要从事胃癌和肝癌发病机制及早期诊断方面的研究，发表论文 12 篇。电话：(023)68754000-73057
通讯作者：陈 兵，电话：(023)68754138
收稿日期：2001-05-20；修回日期：2001-08-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net