DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.003
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
1126 2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1126-03

烧伤大鼠胃组织中一氧化氮合酶的变化观察

颜 洪,彭 曦,汪仕良,王 裴 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究烧伤后大鼠胃组织中一氧化氮合酶(NOS)的变化及与一氧化氮(NO)的关系。方法 采用30%TBSA Ⅲ度烧伤大鼠模型,分别检测了胃组织中NO含量及原生型NOS(cNOS)和诱导型NOS(iNOS)的活性,并分析了NO的变化规律及其与两型NOS之间的关系。结果 烧伤后胃组织中iNOS活性大幅上升,与NO的变化趋势一致,二者呈显著正相关($r=0.94$, $P<0.01$),而cNOS活性呈下降趋势,与NO相关不显著($r=-0.53$, $P>0.05$)。结论 烧伤后胃组织中NO的变化主要受iNOS活性影响,iNOS活性上升,cNOS活性下降可能与烧伤后胃肠道病理变化密切相关。

关键词:一氧化氮;一氧化氮合酶;胃;大鼠;烧伤
中图法分类号:R345.44;R644.02 文献标识码:A

Alterations of nitric oxide synthase in gastric tissues of burned rats

YAN Hong, PENG Xi, WANG Shi-liang, Wang Pei (Institute of Burns Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the changes of nitric oxide synthase (NOS) after burns and its relationship with nitric oxide (NO) in stomach of rats. Methods Wistar rats with 30% TBSA full thickness burns were used as models, the activity of inducible NOS (iNOS) and constitute NOS (cNOS) as well as the content of NO in gastric tissues were detected. Results The iNOS activity and the content of NO were increased significantly after burn injury, and there was a positive correlation between them ($r=0.94$, $P<0.01$). On the other hand, the cNOS activity was decreased remarkedly, it has no correlation with the NO ($r=-0.53$, $P>0.05$). Conclusion The changes of NO in gastric tissues is mainly affected by iNOS activity. The changes of activity of iNOS and cNOS are related with some pathological changes in stomach after burns.

Key words: nitric oxide; nitric oxide synthase; stomach; rat; burn

严重烧伤可引起胃肠道运动紊乱,血液循环障碍,胃肠粘膜上皮坏死脱落等病理变化[1]。有人认为某些神经递质的变化是导致上述病理过程的重要因素[2]。近年来研究表明一氧化氮(Nitric oxide, NO)是胃肠道中非肾上腺素能非胆碱能(Nonadrenergic noncholinergic, NANC)神经的抑制性递质,广泛参与胃肠生理功能。关于烧伤后肠道NO的变化规律特别是与胃组织中不同类型的一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)之间的关系尚未见报道。为此,本实验以烧伤大鼠为模型,动态观察了胃组织中NO含量及原生型NOS(Constitute NOS, cNOS)和诱导型NOS(Inducible NOS, iNOS)的变化规律,分析了它们之间的相互关系,并对其病理生理学意义进行初步讨论。

1 材料和方法

1.1 动物分组及致伤

健康成年Wistar大鼠80只,雌雄不拘,体重(220±30)g,随机分为正常对照及伤后1、3、6、12、24、48、72 h共8组,每组8只,除正常对照组外,其余各组均按本所建立的方法致成背部

作者简介:颜 洪(1971-),男,四川省成都市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤营养代谢方面的研究。电话:(023)68754148-8046

收稿日期:2000-06-08;修回日期:2000-09-24

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

30%TBSA Ⅲ度烧伤[3]。

1.2　NO 的测定

采用深圳晶美公司提供的 NO 试剂盒测定胃组织中 NO 的浓度, 具体操作严格按说明书进行。

1.3　NOS 活性测定

于各时相点活杀大鼠, 迅速取胃并沿胃大弯剪开, 用预冷的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)冲洗干净, 在胃窦处取一块组织约 200 mg(每只大鼠取材部位尽量一致), 滤纸吸干精确称量后加入 3 ml NOS 提取液, 内含 50 mmol/L Hepes, 0.1 g/L PMSF, 0.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 320 mmol/L 蔗糖, 0.1 g/L 亮肽素, 0.1 g/L 胰蛋白酶抑制剂, 0.02 g/L 抑肽酶。冰浴匀浆, 4℃, 100 000× g 离心 30 min, 收集上清液即为 NOS 提取物, 置 -30 ℃保存, 1 周内测试。

取 NOS 提取液 0.6 ml 加入反应液约 2.4 ml, 包括 0.6 ml (1 mmol/L)$CaCl_2$, 0.6 ml(5 mmol/L)$MgCl_2$, 0.6 ml(250 mmol/L) L-缬氨酸, 0.6 ml(0.2 mol/L) PBS, 10 μl(480 μmol/L)H_4B_2, 10 μl(30 mmol/L)NADPH。37 ℃水浴 10 min, 加入 10 μl(30 mmol/L) L-精氨酸, 立即计时, 每 30 s 测量 1 次, 采用双波长 λ 401-421 nm, 共测量 3 min。按 Douglas[4] 的方法计算总 NOS 活性, 在反应液中除去 $CaCl_2$, 并加入 10 μl(6 mmol/L) EGTA, 使依赖 Ca^{2+} 的 cNOS 失活, 可测得 iNOS 的活性, 用总 NOS 减去 iNOS 即为 cNOS 活性。

1.4　统计学处理

按华西医科大学 PEMS 程序作统计学处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 做 t 检验和相关分析。

2　结果

烧伤早期胃组织中 NO 含量上升, 与 NOS 总活性上升趋势一致, 烧伤后胃组织中 iNOS 活性大幅上升, 而 cNOS 活性呈下降趋势, 见表 1; 烧伤后胃组织中 NO 含量同 iNOS 活性呈显著正相关(r=0.94, P<0.01), 而与 cNOS 相关不显著(r=-0.53, P>0.05)。

表 1　烧伤后大鼠胃组织中 NO 及 NOS 活性的变化($\bar{x} \pm s$)

Fig 1　Change of NO and NOS in gastric tissues of burned rats($\bar{x} \pm s$)

Group	n	NO (ω_B/μg·g^{-1})	cNOS (nmol·min^{-1}·g^{-1})	iNOS (nmol·min^{-1}·g^{-1})	Total NOS (nmol·min^{-1}·g^{-1})
Control	8	30.47±3.32	3.32±0.42	0.46±0.16	3.51±0.55
PB 1 h	8	24.21±3.69	2.26±0.38 *	0.72±0.17	3.12±0.51
PB 3 h	8	37.98±3.58 *	1.37±0.46 **	3.67±0.49 **	5.11±0.67 *
PB 6 h	8	45.43±6.32 **	1.14±0.21 **	4.52±1.02 **	5.28±1.12 *
PB 12 h	8	47.96±7.32 **	1.38±0.23 **	6.13±1.14 **	7.34±1.06 **
PB 24 h	8	40.32±3.41 *	2.01±0.23 **	3.76±0.65 **	5.87±0.63 **
PB 48 h	8	38.83±4.53 *	2.64±0.53	3.52±0.51 **	6.34±0.84 **
PB 72 h	8	38.48±4.27 *	2.75±0.43	3.79±0.64 **	6.66±0.98 **

PB: Post burn;　*: P<0.05,　**: P<0.01 *vs* control

3　讨论

文献报道 NOS 分为两类 3 型同功酶, 包括脑型(Ⅰ型)和内皮细胞型(Ⅲ型)同功酶, 它们属于 cNOS, 另一种为 iNOS, 主要来源于巨噬细胞(Ⅱ型)。它们之间在区域分布、生化特点及生理功能方面均存在较大差异[5]。cNOS 主要分布于神经细胞和血管内皮细胞中, 由它催化生成的 NO 主要起神经递质和第二信使的作用; iNOS 主要分布于巨噬细胞、内皮细胞等处, 催化生成的 NO 具有细胞毒作用, 参与介导免疫反应。由此推测烧伤后胃肠道血液灌流不良, 运动功能紊乱及粘膜受损可能与烧伤后胃肠道 NO 含量增加及不同类型的 NOS 活性异常有关。为此, 本实验着重观察了胃组织中 iNOS 和 cNOS 活性的变化规律及其与 NO 含量的关系。结果显示烧伤后胃组织中 iNOS 和 cNOS 的变化规律相反, iNOS 呈上升趋势, 与 NO 的变化规律一致, 二者呈显著正相关(r=0.94, P<0.01), 而 cNOS 则呈下降趋势, 与 NO 相关不显著(r=-0.53, P>0.05)。提示烧伤后胃组织中 NO 含量的变化主要受 iNOS 活性的影响。

由于 NO 半衰期短, 仅在局部发挥生物学效应, 故 NOS 的分布与 NO 的生理功能密切相关。目前已知, cNOS 广泛分布于消化道壁内神经丛中, 其产物 NO 是消化道中 NANC 神经的抑制性递质, 可引起胃肠道血管扩张和平滑肌松弛[6]。Niclos 等[7] 采用组织化学染色发现 NOS 阳性神经穿行于胃肠道平滑肌之间, 其中肌间神经丛中 NOS 阳性神经元密度最高, 粘膜下层和小血管周围也有较密集的 NOS 阳性神经元。烧伤刺激引起肾上腺素能神经兴奋, 使 NANC 神经受到抑制, 导致主要分布于 NANC 神经中的 cNOS 活性下降, 由其催化产生的 NO 也随之下降, 引起平滑肌过度收缩, 可能是导致胃肠道血液灌流不良和运动功能障碍的重要原因。由于 cNOS 的活性调节主要由神经系统支配, 故伤后 1 h 就发现 cNOS 活性低于伤前水平, 伤后 6 h 达最低值。此后, 随着 NANC 神经受抑状态的逐步解除, cNOS 活性于伤后 48 h 接近伤前水平。生理状况下胃组织中 iNOS 活性极低, 只有在内毒素及 γ-干扰素、IL-1、IL-6 和 TNF 等多种细胞因子的作用下, iNOS 才被激活表达酶活力。iNOS 的诱生涉及基因转录、蛋白质合成等过程, 并要形成二聚体才具生物活性, 因此, 诱导时间较长, 但一经诱导合成, 酶活性持续时间

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

长[8]。本实验发现伤后 3 h 胃组织中 iNOS 活性明显高于伤前($P<0.01$),12 h 达峰值,至 72 h 仍显著高于伤前。实验表明,烧伤后大鼠体内内毒素、IL-1、IL-6 及 TNF 明显高于伤前,并持续很长时间[9]。在其不断刺激下 iNOS 活性始终处于很高水平,由于 iNOS 活性变化幅度远大于 cNOS 因此大鼠胃组织中 NO 含量也明显高于伤前,二者呈显著正相关。我们推测 iNOS 的过度表达可能与烧伤后胃肠道受损有关,因为高浓度的 NO 具有较强的细胞毒性。Laszlo 等[10] 在研究内毒素介导的肠道血管损伤中发现应用 iNOS 专一抑制剂氮 G-单甲基-L-精氨酸(L-NMMA)可明显减轻肠道损伤。上述结果均提示,烧伤后胃肠道的一系列病理改变与 iNOS 活性持续升高、cNOS 活性下降密切相关,利用 i-NOS 专一抑制剂降低 iNOS 活性和有效刺激 NANC 神经使 cNOS 活性保持正常水平,可能有利于减轻烧伤后胃肠道受损程度。

参考文献:

[1] Izzo A A, Mascolo N, Capasso F, *et al*. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport[J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(8): 16 05—16 20.

[2] Gonzalez-Bosc L V, Capani F, Lopez-Costa J J, *et al*. Atrial natriuretic peptide effect on NADPH-diaphorase in rat intestinal tract [J]. Peptides, 1999, 20(5): 615—621.

[3] 朱佩芳. 烧伤动物实验方法[A]. 见: 黎 鳌, 杨宗城 主编. 烧伤治疗学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 654—657.

[4] Douglas J, Wikthlin S L, Joseph J, *et al*. Gastrointestinal transit during endotoxemia: the role of nitric oxide[J]. J Surg Res, 1996, 60(2): 307—312.

[5] Klemm K, Moody F G. Regional intestinal blood flow and nitric oxide synthase inhibition during sepsis in the rat[J]. Ann Surg, 1998, 227(1): 126—133.

[6] Yugai Y, Price K J, Bersimbayev R I, *et al*. Effect of lipolysaccharide on nitric oxide synthase activity in muscle layers of the rat small and large intestine[J]. Biochem Soc Trans. 1997, 25(3): 395—403.

[7] Nichols K, Krantis A, Staines W. Histochemical localization of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular sites in the guinea pig intestine[J]. Neurosci, 1992, 50(4): 791—802.

[8] Spain D A, Fruchterman T M, Matheson P J, *et al*. Complement activation mediates intestinal injury after resuscitation from hemorrhagic shock[J]. J Trauma, 1999, 46(2): 224—233.

[9] Tilton R G, Chang K C, LeJeune W S, *et al*. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40 (3): 689—696.

[10] Laszlo F, Whittle B J, Moncada S. Time-dependent enhancement or inhibition of endotoxin-induced vascular injury in rat intestine by nitric oxide synthase inhibitors[J]. Br J Pharmacol, 1994, 111(4): 1 309—1 315.

(编辑 郭建秀)

(上接 1125 页)

保持钙离子浓度的稳定性有利于心脏复苏和功能恢复[2],我们常规给予补充氯化钙 0.15~0.5 g。此外,由于婴幼儿对酸碱调节能力较弱,特别是肾脏对酸碱的缓冲能力有限[3],所以 ECC 期间易导致酸碱紊乱,特别是预充液中血液制品、灌注过程中机体的缺血缺氧等增加了导致代谢性酸中毒的因素,因此在 ECC 期间应及时纠正酸中毒。

高质量膜肺的应用:膜式氧合器可明显减少血液有形成分的破坏,减轻 ECC 对机体各系统的损害。因此,对低体重婴幼儿应尽量采用膜式氧合器,以提高转流的安全性。

对输入液体的管理:预充液及术中补液应选择不含糖溶液以防止术中严重高血糖[4]。此外,婴幼儿血容量小,肾脏浓缩和稀释功能均较差,对水的调节范围窄,在预充时应尽量选择细小管道,减少预充量,维持适当的胶体和晶体比例以及血细胞压积。我们的体会是胶体和晶体之比为(0.5~0.6):1,血细胞压积为 0.25~0.28 较为合适,可保持一定的血浆渗透压,减少钠水潴留,减轻心脏负荷,而胶体则以白蛋白和血浆为好。

关键词:体外循环;心内直视手术;婴幼儿

中图法分类号:R726.542 文献标识码:B

参考文献:

[1] 李佳春, 李功宋 主编. 体外循环灌注学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993. 383—385.

[2] Fujiwara T, Heinle J, Britton I, *et al*. Myocardial preservation in neonatal lambs. Comparison of hypothermia with crystalloid and blood cardioplegia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991, 101(4): 703—712.

[3] Gruenwald C, Andrew M, Burrows F, *et al*. Cardiopolmonary bypass in the neonate[J]. Adv Card Surg, 1993, 4(1): 137—144.

[4] Ratchiffe J M, Wyse R K H. The role of the priming fluid in the metabolic response to cardiopulmonary bypass in children of less than 15 kg body weight undergoing open heart surgery[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1988, 36(2): 65—74.

(编辑 谢义霞)

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