DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.014

大鼠胆道感染后肺中一氧化氮的变化及其作用的研究

朱锡光 韩本立* 杨自力** 宋 丰 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所创伤急救科) 重庆,630042

提 要 目的:探讨一氧化氮(NO)在重症急性胆道感染(ACST)时大鼠肺损伤中的作用。方法:利用ACST模型,测定其肺组织中亚硝酸盐/硝酸盐(NO_2^-/NO_3^-)、环-磷酸鸟苷(cGMP)及水含量的变化。结果:肺组织中 NO_2^-/NO_3^- 的含量随时间的进展而逐渐增加($P<0.05$);肺组织的水含量也明显增高($P<0.05$);肺组织中 NO_2^-/NO_3^- 含量的变化与 cGMP含量的变化及肺水量的变化呈正相关关系($P<0.001$)。结论:肺组织中 NO含量增加可能是 ACST时肺损伤的因素之一;ACST时鸟苷酸环化酶-cGMP-蛋白激酶 C系统活性的改变可能是 NO致肺功能障碍的机理之一。

关键词 一氧化氮;胆道感染;肺损伤
中图法分类号 575.7

在重症急性胆管炎(ACST)所致多器官功能衰竭(MOF)的发生发展过程中,急性呼吸衰竭常常是MOF发展过程中极为重要的环节,其发病机理尚不清楚。既往主要集中在对肝脏损伤的研究,本研究通过观察 ACST时一氧化氮(NO)在肺损伤中的作用,探讨严重感染后肺损伤的机理。

1 材料与方法

1.1 动物模型

采用 Wistar大鼠,体重 200 g~300 g,无菌操作行胆总管注 0.3 ml大肠杆菌($O_{14}B_4$,K 10^9 cfu/ml)后结扎胆总管,制成急性胆管炎的动物模型,即胆道感染组(ACG)。手术对照组(OG)只注射无菌生理盐水。正常对照组(NG)不作任何处理。

1.2 标本采集

NG活杀动物取肺组织;ACG及 OG分别于术后 6、12、24、48 h活杀动物取肺组织,即置于 -70℃待测。病理学检查标本置于 4%多聚甲醛固定。

1.3 肺组织病理学观察

将 4%多聚甲醛固定的肺组织标本常规石蜡包埋、切片、HE染色,光镜下观察。

1.4 NO的测定

NO_2^-/NO_3^- 是 NO代谢的终产物,通常以 NO_2^-/NO_3^- 浓度来反映 NO的量其测定方法见文献[1]。因 NO_2^- 易被氧化生成 NO_3^-,所以 NO代谢的终产物以 NO_3^- 为主。NO_2^- 能对氨基苯磺酸反应,生成化学发光物质,易被敏感的方法测定。因而需要将 NO_3^- 还原为 NO_2^-,其有效方法是将待测标本进行镉过柱。

将 0.5 g肺组织匀浆,取上清 100 μl,加 Griess试剂 100 μl,反应 15 min后,测定 540 nm波长的光密度值。以 1-100 μmol $NaNO_2$ 为标准,测定方法同上(不过柱)。求出还原曲线,根据还原曲线计算出标本的 NO_2^- 值。还原曲线为:

$$y = 10.84349 + 849.8293X$$

组织中 NO_2^-/NO_3^- 的含量以 nmol/g(组织)表示。

1.5 环-磷酸鸟苷(cGMP)测定

严格按上海中医学院 cGMP测定药盒的说明书进行。

1.6 肺含水量的测定

去除气管、支气管,滤纸吸干周围水份,称重后于 75℃真空干烤 12 h,再称,以(湿重-干重)/湿重的百分率表示肺水含量。

1.7 统计方法

统计分析采用 t 检验;两指标间相关性用直线相关分析进行。统计处理用美国微软公司软件 Excel 5.0中的统计程序完成。

2 结果

2.1 肺组织的病理学改变

肺组织大体观察:12 h时可见充血;24 h时充血非常明显;48 h可见肺表面有斑片状出血,并有灰暗的实变区域。光镜观察:24 h见肺泡隔增宽,小血管周围及肺泡隔大量炎性细胞浸润,见图 1。48 h时见肺间隔进一步增宽、出血,肺泡腔积液,见图 2,肺泡腔出血、大量炎性细胞浸润,肺实变,见图 3。

2.2 肺组织中 NO_2^-/NO_3^- 含量变化

急性胆道感染后,肺组织中 NO_2^-/NO_3^- 的含量随时间的进展而逐渐增加,从 12 h开始,各时相点均明显高于 OG及 NG($P<0.01$);且 ACG内各时相点也有显著的差别($P<0.01$)见表 1。

2.3 肺组织中 cGMP含量的变化

肺组织中 cGMP含量随感染时间而逐渐增加,ACG除 6 h时间点外,余各时相点均明显高于 OG及 NG相应时相点,$P<0.01$;ACG内各时点间相互比较,也有明显差别($P<0.05$),以 48 h的含量最高,见表 2。

* 附属西南医院肝胆中心 重庆,630038
** 广州军区广州总医院 ICU 广州,510010

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

2.4 肺组织含水量的变化

ACG肺组织的水含量明显高于 NG, 24 h后也明显高于 OG($P < 0.05$); ACG内各时相点间两两相互比较,除术后 6 h与 12 h两时相点间差异不明显($P > 0.05$)外,余各时相点间比较相差均明显($P < 0.05$),见表 3

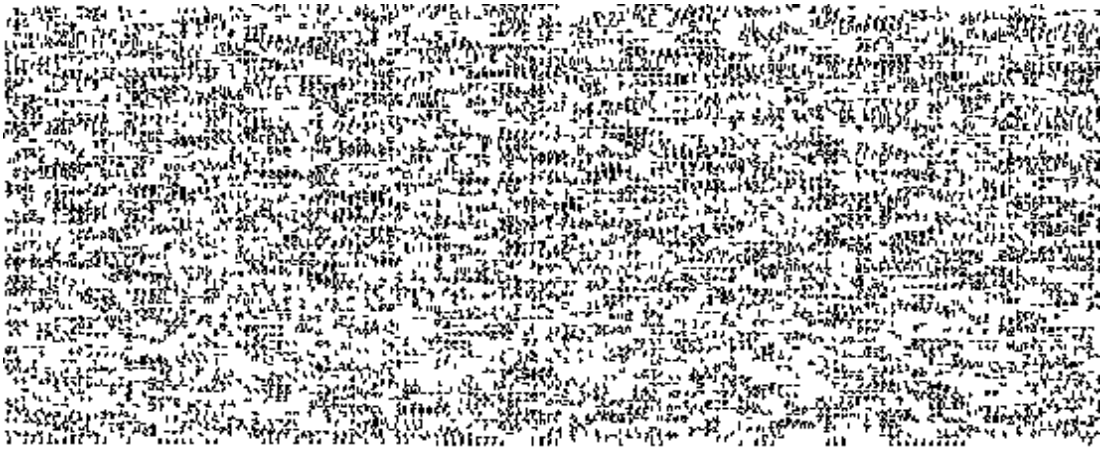


图 1 术后 24 h,肺泡隔增宽,小血管周围及肺泡隔大量炎性细胞浸润 (HE× 200)

Fig 1 Thickness of alveolar septum increased and infiltration of inflammatory cells in periphery of blood capillary and alveolar septum 24 h after operation (HE× 200)

图 2 术后 48 h,肺间隔显著增宽、出血,肺泡腔积液 (HE× 200)

Fig 2 Thickness of alveolar septum increase dremarkably with bleed of alveolar saeptum and effusion of alveolar cavity 48 h after operation (HE× 200)

图 3 术后 48 h,肺泡腔出血、大量炎性细胞浸润肺实变 (HE× 200)

Fig 3 Remarkable bleeding, infiltration of inflammatory cells in alveolar cavity, and consolidation of lung 48 h after operation (HE× 200)

表 1 肺组织 NO_2^-/NO_3^- (C_B/nmol·mg^{-1}蛋白)含量变化

Tab 1 Contents of NO_2^-/NO_3^- (C_B/nmol·mg^{-1} pro) in lung tissue

Group	n	Before operation	After operation (t/h)			
			6 h	12 h	24	48
NG	10	0.26± 0.11				
ACG	10		0.34± 0.09	0.59± 0.16*△△	1.38± 0.43*△△	2.18± 0.59*△△
OG	10		0.29± 0.06	0.38± 0.14	0.43± 0.12	0.41± 0.15

There were 9 rats at 24 h and 48 h after operation in ACG. * : $P < 0.01$ *vs* OG; △△: $P < 0.01$ *vs* NG

表 2 肺组织 cGMP (C_B/pmol·mg^{-1}蛋白)含量变化

Tab 2 Contents of cGMP (C_B/pmol·mg^{-1} protein) in lung tissue

Group	n	Before operation	After operation (t/h)			
			6 h	12 h	24	48
NG	10	0.15± 0.09				
ACG	10		0.39± 0.14	0.56± 0.18*△△	0.84± 0.31*△△	1.27± 0.41*△△
OG	10		0.19± 0.08	0.25± 0.14	0.41± 0.16	0.39± 0.17

There were 9 rats at 24 h and 48 h after operation in ACG. * : $P < 0.01$ *vs* OG; △: $P < 0.01$ *vs* NG

表 3 肺组织水含量(%)的变化

Tab 3 Water of contents(%) in lung tissue

Group	n	Before operation	After operation (t/h)			
			6 h	12 h	24 h	48
NG	10	77.18± 0.89				
ACG	10		78.81± 1.54△	79.05± 1.69△△	80.64± 1.03*△△	82.12± 1.75*△△
OG	10		77.59± 1.41	78.02± 1.25	79.32± 0.95	78.98± 1.12

There were 9 rats at 24 h and 48 h after operation in ACG. * : $P < 0.01$ *vs* OG; △: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$ *vs* NG

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

2.5 肺组织中 NO与 cGMP及含水量变化的相关性分析

在 ACG,4个时相点共 38只大鼠,肺组织中 NO_2^-/NO_3^- 含量的变化与 cGMP含量的变化呈正相关关系,$r = 0.8267$, $P < 0.001$;与含水量的变化也呈正相关关系,$r = 0.7028$, $P < 0.001$。

3 讨论

MOF是严重外科感染常见的并发症,也是重症急性胆管炎的常见死亡原因之一。在外科感染所致的 MOF病理过程中,肺组织的损伤、功能障碍、以致呼吸衰竭是其重要环节[2]。有研究表明,在内毒素休克时一氧化氮合成酶(NOS)的活性增高[3],加用 NOS活性抑制剂单甲基左旋精氨酸(L-NMMA)后,能降低肺损伤的程度[4]。NOS是体内 NO合成的关键酶,因此,这些研究结果提示内源性 NO可能参与了内毒素性休克的肺损伤过程。我们的研究结果表明,在重症急性胆管炎时,肺组织中 NO的含量随感染时间的延长而逐渐增加,各时相点 NO含量变化相差显著,也明显高于手术对照组及正常对照组。而肺组织的病理学改变则随感染时间的延长而逐渐明显,48 h时已有明显的肺实变;且肺组织中 NO含量变化与肺组织中含水量的变化呈正相关关系,提示 NO含量的增加是肺损伤的因素之一,NO参与了重症急性胆道感染后肺损伤的过程。

NO是近年来发现的细胞信使分子,参与了机体许多重要生理功能的调节。然而 NO又是如何造成组织损伤以及影响肺功能的呢?目前认为,这可能与 NO自由基活性有关。Haddad[5]发现过氧阴离子(O_2^-)与 NO生成过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$),后者不仅可损伤肺泡上皮,肺泡表面活性物质,也导致内皮细胞损伤。同时,内源性 NO合成及释放能力增加,激活细胞内鸟苷酸环化酶,使 cGMP合成增加,降低蛋白激酶 C磷酸化作用,引起一系列生物学效应。我们的研究结果证实,随感染时间的延长肺组织中 cGMP的含量逐渐增加,且与肺组织中 NO含量的变化呈正相关关系,说明严重急性胆道感染时鸟苷酸环化酶-cGMP-蛋白激酶 C系统活性的改变可能是 NO致肺功能障碍的机理之一。

参考文献

1 Hegesh E, Shiloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. Clin Chim Acta, 1982; 125(1): 107

2 Poole G V, Muakkassa F F, Criswold J A. The role of infection in outcome of multiple organ failure. Am Surgg, 1993; 59(11): 727

3 Cook H T, Bune A J, Jansen A S *et al*. Cellular localization of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock in the rat. Clin Sci, 1994; 87(2): 179

4 Westenberger U, Thanner S, Ruf H H *et al*. Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. Free Radic Res Commun, 1990; 11(1-3): 167

5 Haddad I Y, Pataki G, Hu P *et al*. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. J Clin Invest, 1994; 94(6): 2407

(收稿: 1996-06-14;修回: 1997-01-21)

(编辑　汪勤俭)

Role of nitric oxide in lung injury during biliary infection in rats

Zhu Xiguang, Han Benli, Yang Zili, Song Fen (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract **Objective**: To evaluate the role of nitric oxide (NO) in lung injury during biliary infection in rats. **Methods**: After the ACST model was established in rats, the changes of contents of NO_2^-/NO_3^-, cGMP and water in the lung tissue were measured. **Results**: The contents of NO_2^-/NO_3^- and water were gradually increased with time prolongation ($P < 0.05$) and the change of the former was positively correlated to that of cGMP. **Conclusion**: The increase of NO content in the lung tissue might be one of the causes for lung injury during acute biliary infection in rats.

Key words nitric oxide; acute biliary infection; lung injury; rat

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