DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.002

放射损伤、烧伤及放烧复合伤大鼠早期心肌一氧化氮的变化及其对心肌的作用

王卫东* 陈宗荣 李 蓉 楼淑芬 (第三军医大学预防医学系复合伤研究所) 重庆, 630038

提 要 目的: 研究 6 Gy放射损伤 (R)、烧伤 (B)及放烧复合伤 (RB)早期心肌一氧化氮 (NO)合成的变化及其对心肌的作用。方法: 观测三种损伤大鼠伤后 24 h心肌 NO含量、一氧化氮合酶 (NOS)活性的变化, NO供体 SIN-1对正常大鼠心肌 cGMP、Na^+-K^+-ATP酶活性的影响。结果: B组和 RB组心肌 NO的合成及诱生型 NOS活性明显增强, R组无变化 ($P > 0.05$)。NO供体 SIN-1致心肌 cGMP合成增加及心肌膜 Na^+-K^+-ATP酶活性下降,地塞米松对以上变化有明显抑制作用。结论: B和 R组早期心肌 NO合成增强,主要起因于诱生型 NOS的过量表达,进一步引起心肌 cGMP含量和 Na^+-K^+-ATP酶活性的改变。

关键词 放烧复合伤;心肌;一氧化氮
中图法分类号 R818.7; R644

一氧化氮 (NO)是近年来新发现的一种细胞信使分子,它是由一氧化氮合酶 (NOS)催化左旋精氨酸而生成的。目前发现有两大类 NOS:原生型 NOS (cNOS)和诱生型 NOS(iNOS)[1]。烧伤和放烧复合伤早期心功能障碍已为一系列实验证实[2],但复合伤后早期心肌 NO的变化及其对心肌的作用尚待研究。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

Wistar雄性大鼠 (200± 20) g由四川省中药研究所提供。将其分为:① 正常对照组 (C)。② 放射损伤组 (R),接受 6 Gy钴-60γ射线单剂量全身一次照射。③ 烧伤组 (B),光辐射致 30% TBSAⅢ度烧伤(病理切片证实)。④ 放烧复合伤组 (RB),照射后 0.5 h内烧伤。⑤ NO供体 SIN-1处理组 (1 μmol/Kg, 10 μmol/kg i.p.)。⑥ SIN-1(10 μmol/kg)合用 HbO_2 (10 μmol/kg)组。⑦ 复合伤地塞米松治疗组 (4 mg/kg i.p.)。其中 2,3,4组根据需要分别于伤后 1、3、8、12、24 h处死动物。

1.2 心肌组织 NO_2^- 含量测定

参照 Griess法[3], 545 nm波长下读 A 值,以 $NaNO_2$ 作标准曲线。

1.3 心肌一氧化氮合酶活性的测定

采用双波长分光光度法[4]。反应液包括: 1.6 μmol/L HbO_2, 200 μmol/L $CaCl_2$, 1 mmol/L $MgCl_2$, 100 μmol/L L-Arg, 100 μmol/L NADPH, 50 mmol/L L-Val, 40 mmol/L KH_2PO_4, pH7.2 加入 20% (v/v)酶提取液,温度 37℃。通过加入 EGTA(1 mmol/L)或 EGTA+ L-NMMA(1 mmol/L)来区分 cNOS和 iNOS活性。

1.4 心肌 cGMP含量的测定

采用放免法,双抗体分离技术。cGMP-RIA Kit由上海中医药大学提供。

1.5 心肌细胞膜 Na^+-K^+-ATP酶活性的测定

按照 Yazaki等[5]的方法并稍加改进。Na^+-K^+-ATP酶活性为细胞膜总 ATP酶活性减去 Mg^{2+}-ATP酶活性的差值。

结果用均值± 标准差 ($\bar{x}$± s)表示。采用单因素及多因素方差分析程序进行统计学处理。

2 结果

2.1 伤后早期心肌 NO_2^- 含量及 NOS活性的变化

与正常组相比,伤后 24 h内, B和 RB组心肌 NO_2^- 含量显著升高,以 RB组为甚,伤后 8 h达峰值,为正常值的 (163± 11)% (B组)和 (181± 13)% (RB组),见表 1。与心肌 NO_2^- 含量变化相平行, B和 RB组 8 h心肌 iNOS活性较正常组明显升高,以 RB组为甚,分别为正常值的 7.7倍 (B)和 9.6倍 (RB),而 cNOS活性较正常组降低,分别为正常值的 (31.5± 3.2)% (B)和 (15.7± 2.4)% (RB),见表 2。R组心肌 NO_2^- 含量及 NOS活性无明显改变 ($P > 0.05$)。

表 1 三种损伤早期心肌 NO_2^- 含量的变化 (μmol/g Pr)

Tab 1 Dynamic changes of NO_2^- content in myocardium early after radiation, burn and combined radiation-burn injuries (μmol/g Pr)

	Time of post injury (h)				
	1	3	8	12	24
R	2.66± 0.18	2.65± 0.08#	2.68± 0.09#	2.68± 0.15#	2.67± 0.11#
B	2.69± 0.09	3.49± 0.15*	4.32± 0.16*	3.86± 0.12*	3.14± 0.09*
C	2.69± 0.13	3.96± 0.26*#	4.91± 0.39*#	4.18± 0.14*#	3.46± 0.16*#

control value 2.65± 0.26, *: $P < 0.05$ *vs* control; #: $P < 0.05$ *vs* burn. Pr: abbreviation for protein

* 王卫东,男,28岁,住院医师,硕士

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

表 2　三种损伤后 8 h心肌 NOS活性的变化 (μmol/min· g Pr^{-1})

Tab 2　Changes of myocardial NOS activity at 8 h post injuries (μmol/min· g Pr^{-1})

	Control	R	B	RB
cNOS	1.78± 0.12	1.67± 0.24#	0.56± 0.12*	0.28± 0.03*#
iNOS	0.33± 0.04	0.32± 0.06#	2.53± 0.33*	3.16± 0.21*#

*: $P < 0.05$ *vs* control; #: $P < 0.05$ *vs* burn

2.2　NO供体 SIN-1对心肌 cGMP含量及心肌细胞膜 ATP酶活性的影响

与对照组比,SIN-1致心肌 cGMP水平显著升高,使心肌细胞膜 Na^+-K^+-ATP酶活性明显下降,见表 3,且随 SIN-1浓度的增大,以上变化的程度呈剂量依赖性。合用 NO的清除剂氧合血红蛋白,可消除以上改变。

表 3　SIN-1致心肌 cGMP含量及 Na^+-K^+-ATP酶活性的改变

Tab 3　Effects of NO donor SIN-1 on cGMP level and Na^+-K^+-ATPase activity in myocardium

	Control	1uM SIN-1	10uM SIN-1	SIN-1+ HbO_2
cGMP (pmol/mg Pr)	3.08± 0.46	4.99± 0.69*	7.51± 1.73**	3.17± 0.59
Na^+-K^+-ATPase (μmol/h· g Pr^{-1})	8.4± 0.29	7.3± 0.45*	5.6± 0.36**	8.5± 0.42

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* control

2.3　地塞米松的作用

与 RB组相比,地塞米松给药组心肌 NO_2^- 及 cGMP含量均显著下降,但仍明显高于正常对照组。相反,给药组心肌细胞膜 Na^+-K^+-ATPase酶活性较 RB组非常显著的增强,仍在正常组之下,见表 4。

表 4　地塞米松对复合伤心肌 cGMP含量及 Na^+-K^+-ATP酶活性的影响

Tab 4　Changes of myocardial cGMP level and Na^+-K^+-ATPase activity in combined radiation-burn injuriy group treated with dexamethasone

	Control	RB	Dexamethasone
NO_2^- (μmol/g Pr)	2.65± 0.26	4.81± 0.14**	3.16± 0.66*#
cGMP(pmol/mg Pr)	3.08± 0.46	10.33± 0.58**	5.95± 0.81*#
Na^+-K^+ ATPase (μmol/h· g Pr^{-1})	8.41± 0.29	2.58± 0.14**	7.23± 0.22*#

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* control;
#: $P < 0.05$,##: $P < 0.01$ *vs* RB

3　讨论

3.1　三种损伤早期心肌 NO产量的变化及其来源

在本实验条件下,B组大鼠心肌 NO产量从伤后 3 h明显增加,8 h达峰值,24 h尚未恢复正常。R组心肌 NO产量无变化。与 B组相比,RB组心肌 NO的产量变化特征如下:① 动态变化趋势同 B组一致,均呈以伤后 8 h为最大值,都显著高于 R组。说明在本实验条件下,RB组早期心肌 NO产量的升高主要由烧伤决定。② 从变化的幅度看,RB组在各时相点均比 B组更显著 ($P < 0.05$)。可以认为,在本实验条件下复合效应为复合伤较单一伤加重。生物组织内 NO含量由组织内 NOS活性程度和特定环境内的 NO清除速度决定[6]。本实验发现,除 R组心肌 NOS活性无明显变化外,B和 RB组心肌 NOS活性均显著升高,RB组大于 B组。两种 NOS的比值 cNOS/iNOS由正常组的 5 1变为复合伤后 8 h的 1∶10,这种比值的显著变化表明,伤后早期心肌 NO产量的升高主要起因于心肌 iNOS活性的显著增强。

3.2　一氧化氮对心肌的作用

心肌细胞膜上的 Na^+-K^+-ATP酶在维持细胞兴奋活动、正常代谢及膜内外离子梯度中起重要作用。本实验中,NO供体致心肌细胞膜 Na^+-K^+-ATP酶活性显著下降,这将使细胞膜的 Na^+、K^+ 转运能力下降,造成心肌细胞内 Na^+ 潴留和细胞外高 K^+,破坏了细胞膜两测的离子平衡,进一步可引起钙离子超载所致的细胞损伤,细胞兴奋性增加,传导性及窦房结自律性下降等一系列电生理特性的改变。

cGMP是心肌细胞内的第二信使,参与心肌舒缩功能的调节。本实验表明,NO可使心肌 cGMP含量显著升高。其机理是,NO激活细胞浆内的鸟苷酸环化酶 (GC),致 cGMP合成增强[7]。cGMP可通过激活依赖 cGMP的分解 cAMP的磷酸二酯酶,降低 cAMP的水平,抑制钙内流[8]。据文献报道,cGMP类似物有明显的负性肌力作用[9]。地塞米松可通过抑制 iNOS mRNA的转录而阻止 NO的合成[10]。本实验中,地塞米松治疗组大鼠心肌 NO_2^- 及 cGMP含量均显著下降,心肌细胞膜 Na^+-K^+-ATP酶活性明显升高,某种程度上,反证了 NO对心肌的作用。但这种作用除了 NO途径外,是否有其它机理尚有待研究。

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

参考文献

1 Griffith O W, Stuehr D J. Nitric oxide synthase: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol, 1995, 57: 707

2 邹仲敏,陈宗荣.放射损伤、烧伤及放烧复合伤心肌功能障碍的早期改变.第三军医大学学报, 1993, 15: 528

3 Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. J Immunol, 1988, 141: 2407

4 Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+}-independent nitric oxide synthase in the myocardium. Br J Pharmacol, 1992, 105: 575

5 Yazaki Y, Jun F. Depressed Na^+-K^+ ATPase activity in the failure rabbit heart. Jpn Heart J, 1992, 1: 73

6 Nathan C, Xie Q W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem, 1994, 269(19): 13725

7 Kuo P C, Schroeder R A. The emerging multifaced roles of nitric oxide. Annals of Surgery, 1995, 221: 220

8 Mery P F, Pavoine C, Belhassen L *et al*. Nitric oxide regulates cardiac Ca^{2+} current. J Biol Chem, 1993, 268(35): 26286

9 Shah A M, Lewis M J, Henderson A H. Effects of 8-bromo-cyclic GMP on contraction and inotropic response of ferret cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol, 1991, 23: 55

10 Randomski M W, Palmer R M J, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the exepression of an inducible but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 10043

(收稿: 1997-03-26;修回: 1997-06-15)

(编辑 仇玉福)

Changes of nitric oxide production and its effects on myocardium at the early stage after radiation, burn and combined radiation- burn injuries in rats

Wang Weidong, Chen Zongrong, Li Rong, Lou Shufen (Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To observe the changes of nitric oxide (NO) production in and its effects on myocardium at the early stage after radiation, burn and combined radiation-burn injuries. Methods: 1) The myocardial NO content during the first 24 hours and the activity of nitric oxide synthase (NOS) at the 8th hour after injuries were determined; 2) cGMP level and Na^+-K^+-ATPase activity were assessed in the myocardium treated with NO donor SIN-1 in normal animals and that with dexamethasone in those with combined radiation-burn injury. Results: There was a significant increase in NO production and NOS activity in the myocardium with a peak at the 8th hour after burn and combined radiation-burn injuries. No obvious alteration was seen in the animals with radiation injury. Treatment with NO donor Sin-1 caused a marked elevation in cGMP level and an obvious decline in membrane Na^+-K^+-ATPase activity in the myocardium. However, treatment of the animals with combined radiation-burn injury using dexamethasone did inhibit the increase in cGMP level and decrease in Na^+-K^+-ATPase activity. Conclusion: Overproduction of NO, probably caused by excessive expression of iNOS in the myocardium after burn and combined radiation-burn injuries, might be involved in the modulation of cGMP production and Na^+-K^+-ATPase activity in the myocardium.

Key words combined radiation-burn injury; myocardium; nitric oxide; rat

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