DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.002

烧伤大鼠肠道一氧化氮及一氧化氮合酶的变化*

彭 曦** 冯晋斌 汪仕良 尤忠义 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,630038

提 要 目的: 研究烧伤后肠道一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)的变化规律。方法: 采用30%总体表面积(TBSA)Ⅲ度烧伤大鼠模型,分别检测了肠组织中NO含量及原生型NOS(cNOS)和诱导型NOS(iNOS)的活性,并分析了NO的变化规律及其同两型NOS之间的关系。结果: 烧伤后肠组织中iNOS活性大幅上升,与NO的变化趋势一致,二者呈显著正相关($r = 0.95$, $P < 0.01$)而cNOS活性呈下降趋势,与NO相关不显著($r = -0.61$, $P < 0.05$)。结论: 烧伤后肠组织中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肠道某些病理变化密切相关。

关键词 一氧化氮;一氧化氮合酶;肠道;大鼠;烧伤
中图法分类号 R644

严重烧伤可引起胃肠道运动紊乱,血液循环障碍,肠粘膜上皮坏死脱落等病理变化[1]。有人认为某些神经肽类递质的变化是导致上述病理变化的重要因素[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肠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,本研究以烧伤大鼠为模型,动态观察了肠组织中NO含量及原生型NOS(cNOS)和诱导型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探讨。

1 材料和方法

1.1 动物分组及致伤

健康成年Wistar大鼠66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,除正常对照组外,其余各组均按本所建立的方法致成背部30% TBSAⅢ度烧伤[3]。

1.2 NO的测定

采用军事医学科学院提供的NO_2^-/NO_3^-试剂盒剂盒测定NO_2^-/NO_3^-的浓度,间接反映肠道中NO的水平,具体操作严格按说明书进行。

1.3 NOS活性测定

大鼠活杀后在距回盲部5 cm处取一肠段约500 mg,用预冷的0.01 mol/L PBS(pH7.4)冲洗干净,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℃, 1×10⁴× g,离心30 min,收集上清液即为NOS提取物,置-30℃保存,一周内测试。

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, 10μl(480μmol/L) HbO_2, 10μl(30 mmol/L) NADPH, 37℃水浴10 min,加入10μl(30 mmol/L) L-精氨酸,立即计时,每30 s测量一次,采用双波长λ401 nm-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10μl(6 mmol/L) EDTA,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。

1.4

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

2.1 烧伤早期肠组织中NO含量上升,与总NOS活性上升同步,见表1。

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

Tab 1 Changes of NO and total NOS activity in rat intestine following burn injury($\bar{x} \pm s$)

Group	n	NO (W_B/μg·g⁻¹)	Total NOS [C_B(NO) /nmol·min⁻¹·g⁻¹]
Control	10	30.90±3.48	3.63±0.43
PB1 h	8	25.16±3.96	3.01±0.61
PB3 h	8	38.55±3.72*	5.05±0.77*
PB6 h	8	45.36±6.45**	5.48±1.02*
PB12 h	8	48.86±7.27**	7.27±1.14**
PB24 h	8	40.48±3.67*	5.71±0.72**
PB48 h	8	39.33±4.80*	6.21±0.98**
PB72 h	8	38.65±4.37*	6.78±0.92**

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

* 全军"九五"攻关项目

** 彭 曦,男,28岁,医师,硕士

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

2.2 烧伤后肠组织中 iNOS活性大幅上升,而 cNOS活性呈下降趋势,见表2

表2 烧伤后大鼠肠道 cNOS和 iNOS活性的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of cNOS and iNOS activity in rat intestine postburn($\bar{x}\pm s$)

Group	n	cNOS [NO(NO) /nmol min^{-1} g^{-1}]	iNOS [NO(NO) /nmol min^{-1} g^{-1}]
Control	10	3.30± 0.39	0.38± 0.11
PB1 h	8	2.35± 0.40*	0.68± 0.29
PB3 h	8	1.36± 0.43**	3.72± 0.51**
PB6 h	8	1.03± 0.32**	4.48± 1.06**
PB12 h	8	1.35± 0.24**	6.03± 1.21**
PB24 h	8	1.91± 0.33**	3.83± 0.45**
PB48 h	8	2.80± 0.42	3.45± 0.63**
PB72 h	8	2.95± 0.39	3.85± 0.69**

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

2.3 烧伤后肠组织中 NO含量同 iNOS活性呈显著正相关($r=0.95$, $P<0.01$),而与 cNOS相关不显著($r=-0.61$, $P<0.05$)

3 讨论

Nathan等[5] NOS分为两类三型同功酶,包括脑型(Ⅰ型)和内皮细胞型(Ⅲ型)同功酶,它们属于 cNOS,另一类为 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。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,本实验着重观察了肠组织中 iNOS和 cNOS活性的变化规律及其与 NO含量的关系。结果显示烧伤后肠组织中 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($r=0.95$, $P<0.01$),而 cNOS则呈下降趋势,与 NO相关不显著($r=-0.61$, $P<0.05$)。提示烧伤后肠组织中 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,可引起肠道血管扩张和平滑肌松弛[6]。Nichols等[7]采用组织化学染色发现 NOS阳性神经穿行于肠道平滑肌之间,其中数肌间神经丛中 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。烧伤应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。生理状况下肠组织中 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,酶活性持续时间长[8]。本实验发现伤后3 h肠组织中 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。研究表明,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[9,10]。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因此大鼠肠组织中 NO含量也明显高于伤前,二者呈显著正相关($r=0.95$, $P<0.01$)。我们推测 iNOS的过度表达可能与烧伤后肠道受损有关,因为高浓度的 NO具有较强的细胞毒性。Caszlo等[11]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 iNOS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肠道受损程度。

参考文献

1 Deitch E A. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg, 1992; 216(2): 117

2 Kubes P, Grance N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. Am J Physiol, 1992; 262(5): H611

3 朱佩芳.烧伤动物实验方法.见:黎 鳌,杨宗城 主编.烧伤治疗学.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 Sur

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

Res, 1996; 60(2): 307
5 Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthase: Roles, tolls and controls. Cell, 1994; 78(6): 915
6 Rand M J. Nitrinergic transmission: Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic, non-cholinergic neuro effector transmission. Chin Exp Pharmacol Physio, 1993; 19(1): 147
7 Nichols K, Krantis A, Staines W. Histochemical localization of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular sites in the guinea pig intestine. Neuroscience, 1992; 50(4): 791
8 Prince R G, Gunson D E. Rising interest in nitric oxide synthase. TIBS, 1993; 18(1): 35
9 Liu X S, Luo Z H, Yang Z C *et al*. The significiance of changes in serum TNF activity in severely burned rats. Burns, 1994; 20(1): 40
10 Kowal-Vern A, Walenga J M, Gamelli R L *et al*. Interleukin-2 and interleukin-6 in relation to burn wound size in the acute phase of thermal injury. J Am Coll Surg, 1994; 178(2): 357
11 Caszlo F, Whittle B J R, Moncada S. Time-dependent enhancement or inhibition of endotoxin-induced vascular injury in rat intestine by nitric oxide sythase inhibitors. Br J Pharmacol, 1994; 111(5): 1309

(收稿: 1996-12-30;修回: 1997-04-11)
(编辑 张大春)

Changes of nitric oxide synthase and nitric oxide in the small intestine postburn in rats

Peng Xi, Feng Jinbin, Wang Shiliang, You Zhongyi, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: To explore the regularity of the changes of nitric oxide synthase (NOS) and nitric oxide (NO) in the small intestine postburn. **Methods**: The Wistar rats with 30% TBSA full thickness skin burns were employed to determine the activity of inducible NOS (iNOS) and constitute NOS (cNOS) and the amount of NO in the small intestine. **Results**: The iNOS activity and the amount of NO were significantly increased postburn and there was a positive correlation between them ($r = 0.95$, $P < 0.01$). However, the cNOS activity was remarkably decreased and it was not positively correlated with amount of NO ($r = -0.61$, $P > 0.05$). **Conclusion**: The changes of NO in the small intestine are mainly affected by iNOS activity and the changes of the activity of iNOS and cNOS are related to some pathological changes in the small intestine postburn.

Key words nitric oxide; nitric oxide synthase; intestine; burns; rat

食道异物(针)移行颈内静脉一例报道

个案与短篇

A case report of a swallowed needle migrating from esophagus to the internal jugalar veins

汪 建* 周光耀** 梁传余* (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科)重庆, 630038

患者女, 48岁, 于1994年12月23日入院。主诉因误吞金属异物, 咽部剧疼8 h, 曾在当地县医院反复用食道镜检查, 未发现异物, 转入我院后拍颈部正侧位X线片, 证实金属异物为缝针, 在第六颈椎平面食道入口处。即在局麻下行食道镜检查, 在距门齿14 cm处发现缝针位于食道入口前壁, 横位。钳夹异物, 滑落, 且患者不能忍耐, 即采用气管插管全麻, 再次放入食道镜寻找异物, 未发现异物。术后再拍X线片, 见缝针尾部1/3已断, 余2/3已穿出左侧食道壁, 且下移至第七颈椎平面, 食管周围未见有明显脓肿形成。次日在全麻下行左侧颈侧切开, 暴露气管食道构, 分离颈动脉鞘, 见食管周围脓肿已形成, 破裂后吸出脓液

(下转196页)

* 汪 建, 男, 36岁, 主治医师, 博士
** 华西医科大学附一院耳鼻咽喉科 成都, 610041

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