DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.009



# 急性肺损伤时大鼠肺组织一氧化氮及其合酶的变化*

杨自力** 王正国 朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室) 重庆,400042

**提 要** **目的**:研究急性肺损伤早期肺组织一氧化氮及其合酶的变化,初步探讨一氧化氮在急性肺损伤发病机制中的作用。**方法**:采用大鼠油酸肺损伤模型,测定伤后早期不同时相点肺组织 $NO_2^-/NO_3^-$(亚硝酸盐)含量、iNOS(诱导型一氧化氮酶)和cNOS(结构型一氧化氮酶)活性、MDA(丙二醛)、MPO(髓过氧化物酶)活性,并研究了一氧化氮酶抑制剂LNNA(硝基左旋精氨酸)对以上指标的影响。**结果**:伤后早期 $NO_2^-/NO_3^-$ 和iNOS升高,LNNA抑制 $NO_2^-/NO_3^-$ 和iNOS的同时,可降低MDA、MPO活性。**结论**:急性肺损伤早期一氧化氮自由基生成急剧增加,并在其发病机制中具一定意义。

**关键词** 急性肺损伤;一氧化氮;一氧化氮合酶
**中图法分类号** R563

内源性一氧化氮(NO)是一种活性很强的自由基,具广泛的生物作用,既是细胞信使分子又是细胞毒性分子。这一双重特性决定了其在急性肺损伤发病机制中可能具有多种作用,内源性NO过多或过少都会损害组织细胞,破坏机体平衡。本研究观察NO在急性肺损伤过程中变化以探讨NO在急性肺损伤中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型与分组

按Eierman[1]方法制备动物模型。Wistar大鼠,体重200 g左右,雌雄不拘,随机分为:①对照组(C组,$n=8$):生理盐水(100 μl/kg)处理。②油酸致伤组(OA组,$n=40$):油酸(100 μl/kg)致伤。③LNNA处理组(OA+LN,$n=40$):按4 mg/kg LNNA股静脉注射,5 min后,按前法油酸致伤。OA组和OA+LN组又分为伤后2、4、8、16、24 h等时相点。于规定时相点活杀动物,取肺标本贮于−70 C。

### 1.2 指标测试

1.2.1 肺组织亚硝酸盐($NO_2^-/NO_3^-$)的测定[2] 按Greiss法测定。

1.2.2 肺组织一氧化氮合酶(NOS)的测定[3] 应用$^3$H-精氨酸转化生成$^3$H-胍氨酸测定法测定iNOS和cNOS活性。采用医学科学院基础医学研究所提供的药盒,操作按说明书进行。NOS活性以每分钟毫克蛋白生成的$^3$H-胍氨酸的fmol数表示,即 $fmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$。

1.2.3 肺组织丙二醛(MDA)测定 采用南京建成生物研究所药盒,操作按说明书进行。

1.2.4 肺组织髓过氧化物酶(Myeloperoxidase,MPO)活性测定[4] 称取待测肺组织0.2 g,加入含0.5% HTAB(溴化十六烷基三甲胺)的PB缓冲液(50 mol/L,pH6.0)4 ml,冰浴匀浆,超声破碎(100w,10 s,3次)后,4 C,2 000 g离心45 min,取上清0.1 ml测定MPO活性,以u/g组织表示。

### 1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用EXCEL软件和SPSS统计程序包进行 $t$ 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 肺组织 $NO_2^-/NO_3^-$ 的变化

伤后肺组织 $NO_2^-/NO_3^-$ 迅速升高,2 h即与对照组相差非常显著($P<0.01$),伤后4 h达峰值($P<0.01$),然后逐渐下降。OA+LN组肺组织 $NO_2^-/NO_3^-$ 与OA组相比,明显降低,其中伤后4 h为甚($P<0.01$),见表1。

**表1 伤后肺组织 $NO_2^-/NO_3^-$ 含量变化($m_B$/nmol · mg$^{-1}$蛋白)**

**Tab 1 The changes of $NO_2^-/NO_3^-$ in lung tissue after injury ($m_B$/nmol · mg$^{-1}$ protein)**

| Group | $n$ | Postinjury time ($t$/h) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 | 4 | 8 | 16 | 24 |
| OA | 40 | 0.27±0.11* | 0.82±0.29** | 0.75±0.051** | 0.29±0.19* | 0.38±0.35 |
| OA+LN | 40 | 0.20±0.09 | 0.47±0.16**△△ | 0.41±0.24* | 0.26±0.12* | 0.21±0.19* |
| C | 8 | | | 0.14±0.04 | | |

*:$P<0.05$,**:$P<0.01$ *vs* C;△:$P<0.05$,△△:$P<0.01$ *vs* OA

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39470707;广东自然基金资助项目,No. G3-960670

** 杨自力,男,34岁,主治医师,博士,现在广州军区总医院危重病研究所 广州,510010

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

### 2.2 肺组织 iNOS 活性变化

伤后肺组织 iNOS 活性迅速升高，2 h 即与对照组相差非常显著（$P<0.01$），伤后 4 h 达峰值（$P<0.01$），然后逐渐下降，至伤后 24 h 仍显著高于对照组。OA+LN 组肺组织 iNOS 活性基本处于正常水平，但与 OA 组相比，活性仍明显降低，其中伤后 4 h 为甚（$P<0.01$），见表 2。

**表 2 伤后肺组织 iNOS 活性变化（$m_B$/pmol·mg$^{-1}$蛋白）**

**Tab 2 The changes of iNOS activity in lung tissue ($m_B$/pmol·mg$^{-1}$ protein)**

| Group | Postinjury time ($t$/h) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 4 | 8 | 16 | 24 |
| OA | 19.41±4.25** | 55.41±16.28** | 25.48±10.80* | 21.28±11.35* | 24.33±15.67* |
| OA+LN | 11.95±5.45 | 16.18±10.46**△△ | 9.98±7.52**△△ | 8.36±5.52△ | 8.91±5.27△ |
| C | | | 9.8±7.50 | | |

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* C；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* OA

### 2.3 肺组织 cNOS 活性变化

伤后肺组织 cNOS 活性维持正常水平，无明显降低。OA+LN 组 cNOS 活性略有下降趋势，但无统计学差异，见表 3。

**表 3 伤后肺组织 cNOS 活性变化（$m_B$/fmol·mg$^{-1}$蛋白）**

**Tab 3 The changes of cNOS activity in lung tissue ($m_B$/fmol·mg$^{-1}$ protein)**

| Group | Postinjury time ($t$/h) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 4 | 8 | 16 | 24 |
| OA | 1.24±0.65 | 1.12±0.64 | 1.14±0.53 | 0.96±0.39 | 0.93±0.78 |
| OA+LN | 0.97±0.66 | 0.93±0.82 | 0.89±0.41 | 0.73±0.30 | 0.31±0.38 |
| C | | | 1.54±0.93 | | |

### 2.4 肺组织 MDA 含量变

伤后肺组织 MDA 迅速升高，2 h 即差异显著（$P<0.05$），4 h 达峰值（$P<0.01$），以后虽有下降趋势，但至 24 h，相差仍然显著。OA+LN 组肺组织 MDA 伤后维持在正常水平，但和 OA 组相比，程度不同的下降，4 h、24 h 相差非常显著（$P<0.01$），其余各点相差均显著（$P<0.05$），见表 4。

**表 4 伤后肺组织 MDA 含量变化（$m_B$/nmol·g$^{-1}$）**

**Tab 4 The content of MDA in lung tissue ($m_B$/nmol·g$^{-1}$)**

| Group | Postinjury time ($t$/h) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 4 | 8 | 16 | 24 |
| OA | 4.19±2.48* | 8.47±2.91** | 4.41±1.55** | 4.61±2.35* | 4.03±1.56* |
| OA+LN | 2.46±0.61△ | 3.32±1.33△△ | 2.66±1.15△ | 2.88±1.05△ | 1.99±0.44△△ |
| C | | | 2.59±0.87 | | |

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* C；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* OA

### 2.5 肺组织 MPO 活性变化

伤后肺组织 MPO 活性逐渐升高，伤后 4 h 与对照组比较差异显著（$P<0.01$），此后逐渐下降，24 h 回落至正常范围。LN 组动物肺组织 MPO 活性在伤后 4 h 与对照相比，差异显著（$P<0.05$）；OA+LN 组肺组织 MPO 活性高于 OA 组，其中伤后 4 h 差异显著（$P<0.05$），伤后 8 h 差异非常显著（$P<0.01$），见表 5。

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

表 5　伤后肺组织 MPO 活性的变化($m_B$/u·g$^{-1}$)

Tab 5　The changes of MPO activity in lung tissue after injury ($m_B$/u·g$^{-1}$)

| Group | Postinjury time ($t$/h) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2 | 4 | 8 | 16 | 24 |
| OA | 6.51±2.21 | 14.54±5.13** | 13.03±4.21** | 8.98±2.69* | 5.98±2.19 |
| OA+LN | 7.54±1.73* | 8.91±3.68*△△ | 6.97±3.33△△ | 7.10±3.59 | 6.19±2.66 |
| C | | | 4.93±1.57 | | |

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* C；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* OA

## 3　讨论

### 3.1　急性肺损伤过程中内源性 NO 的产生

油酸肺损伤早期，大鼠肺组织 $NO_2^-/NO_3^-$ 迅速升高，伤后 2 h 达峰值，此后持续在较高水平略有下降，24 h 接近正常水平。LNNA 能降低肺损伤过程中 $NO_2^-/NO_3^-$ 的含量，说明 $NO_2^-/NO_3^-$ 增高是由于内源性 NO 产生过多所致。伤后早期 cNOS 活性略有下降，但变化不明显，而 iNOS 活性经历了和 $NO_2^-/NO_3^-$ 含量变化相似的过程，且 LNNA 能抑制伤后 iNOS 活性升高，提示伤后 NO 早期的升高是由于 iNOS 被激活、诱导所致。

肺组织表达 NOS 活性的细胞很多[5]。许多细胞既表达 cNOS 活性，又表达 iNOS 活性，NOS 活性细胞的多样性决定了肺损伤过程的复杂性。iNOS 催化生成 NO 的能力比 cNOS 强数千倍。Berisha[6]的研究表明，急性肺损伤过程中 NO 增多，这种增多不依赖于 $Ca^{2+}$，提示 iNOS 活性介导的 NO 在急性肺损伤中发挥作用。伤后早期 cNOS 无明显变化，这可能与肺损伤程度、刺激强度、病程有关。

### 3.2　NO 自由基与氧自由基的关系

实验发现，急性肺损伤早期 MDA 的变化与 $NO_2^-/NO_3^-$ 的变化一致；LNNA 抑制内源性 NO 的增高，同时亦能降低急性肺损伤过程中产生的 MDA 的含量。有人分析，增多的 NO 通过 cGMP 的作用，使细胞内钙离子增加，从而激活细胞膜上的 NADPH 氧化酶，使其由"休止"状态进入"激活"状态，导致 $O_2^-$ 大量增多[7]。有人报道，iNOS 本身也具有氧自由基生成活性，它能诱导 $O_2^-$ 的产生[8]。如果一旦 iNOS 被抑制，NO 生成减少的同时，$O_2^-$ 也减少，进而 $ONOO^-$ 亦降低，其意义在于减轻 NO，$O_2^-$ 对肺组织的损伤。

### 3.3　NO 与多形核白细胞"扣押"

组织 MPO 活性的增加主要反映血液中多形核白细胞在组织中的滞留增多。实验表明，急性肺损伤时，伴随着 NO 产生的增多，肺组织 MPO 活性亦升高；抑制损伤过程中 NO 的增加，则肺组织 MPO 活性降低。提示内源性 NO 的急性增加，可能通过某种暂时不明的机制增加 PMN 在肺组织的"扣押"。Ischiropoulos[9]推测，肺损伤过程中肺组织对 PMN 的"扣押"主要是通过 NO 激活白细胞本身所致。

## 参考文献


1　Eiermann G J. Polymorphonuclear leukocyte participation in acute oleic acid-induced injury. Am Rev Respir Dis, 1983;128(5):845

2　Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. FASEB J,1993;7(3):349

3　Morley J E, Kumar V B, Mattammal M *et al*. Measurement of nitric oxide synthase and its mRNA in genetically obese mice. Life Sci,1995;57(14):1327

4　罗武生，郭兆贵. 用髓过氧化酶定量测定心肌组织中的中性白细胞. 中国药理学通报，1990;6(4):264

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

6　Berisha H I, Pakbaz H, Absood S I. Nitric oxide as a mediator of oxidant lung injury due to paraquat. Proc Natl Acad Sci USA,1994;91(16):7445

7　陈　媛，周　玫. 自由基医学. 北京：人民军医出版社，1991:112～115

8　Klatt P. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. J Biol Chem,1993;268(20):14781

9　Ischiropoulos H, Mendiguren I, Tisher D *et al*. Role of neutrophils and nitric oxide in lung alveolar injury from smoke inhalation. Am J Respir Crit Care Med,1994;150(2):337


（收稿：1998-01-16；修回：1998-05-09）

（编辑　汪勤俭）

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

# The changes of NO and its synthase in the lungs during acute lung injury in rats*

Yang Zili, Wang Zhengguo, Zhu Peifang (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

**Abstract** **Objective**: To investigate the changes of NO and NOS in the lung tissues in the early stage and their possible effects after acute lung injury. **Methods**: The rat model of acute lung injury with oleic acid was established and the content and biological activity of $NO_2^-/NO_3^-$、iNOS、cNOS、MDA、MPO of lung tissue at different time points after injury determined and the effect of LNNA on NO production and its relationship with NOS、MDA and MPO studied. **Results**: The content and activity of $NO_2^-/NO_3^-$ and iNOS went up, LNNA inhibited the production of NO and iNOS, also down-regulated the activety of MDA and MPO. **Conclusion**: The production of NO free radical went up after acute lung injury, and played an important role in the development of this injury.

**Key words** acute lung injury; nitric oxide; nitric oxide synthase

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39470707

# 结核性腹膜炎并发腹膜后鞘巨大脓肿和脐瘘一例报告

# A case of tuberculous peritonitis complicated with giant retroperitoneal abscess and umbilical fistula

胡 辂* 冷恩仁 王 阁 (第三军医大学附属大坪医院消化内科) 重庆, 400042

患者女性，28岁，于1994年患结核性胸膜炎，服用"异烟肼、利福平"一年后停药。1996年10月因腹痛、腹胀，结核性腹膜炎(渗出型)住院，经抗痨治疗好转，院外继续服"异烟肼、利福平"。今年4月，因乏力、纳差、腹痛、腹胀6月，脐部流脓3 d入我科。入院查体：心肺无异常，腹饱满，脐部有脓性分泌物，右下腹可触及一5 cm×10 cm包块，边界不清、固定，无触痛。全腹轻压痛，无肌紧张及反跳痛，肝脾肋下未及，移动性浊音阴性，肠鸣音正常。初步诊断为结核性腹膜炎、脐部瘘管。入院后查血沉48 mm/h，肝功酶谱、肾功生化血糖、血象均正常，CT检查示：右下腹腔囊性肿与脐部相接且伴有瘘道形成。8 d后转外科于5月15日在全麻下行右中腹脐旁正中切口，在后鞘与腹膜间见一葫芦状包块，包膜完整，囊为黑褐色，壁厚约0.5 cm，上及膈肌，下达膀胱与膀胱顶部粘连，最宽处达7 cm×5 cm×4 cm，位于脐-膀胱间，向上呈一指头粗囊性窦道达膈肌，与脐瘘管相通，张力较大，内充满鱼肉样和稀薄混浊无色液体，将包块全部切除。病理检查示：慢性脓性炎及炎性肉芽，伴纤维组织增生、透明变性。术后14 d病情好转出院。

## 讨论

患者青年女性，起病缓，病程长，既往有"结核性胸膜炎"及"结核性腹膜炎"史，经抗痨治疗好转，仍一直服用"异烟肼、利福平"，因病情未得以良好控制，向干酪型转化，结核干酪物质腐蚀腹膜并穿透到腹膜后鞘，因广泛粘连而未向腹腔内播散，仅沿腹膜后鞘间隙扩散，并随干酪样坏死范围扩大面不断液化包裹，病程呈慢性化，最终穿透腹壁侵犯脐管形成脐部瘘管[1,2]。

结核性腹膜炎常继发体内其他结核病，多数患者曾接受过抗痨治疗，或多或少对药物产生耐药性；而抗结核药物对结核性腹膜炎的疗效一般均差于肺结核及肠结核的疗效。在粘连型合并渗出或干酪型的病人，由于纤维增生，并有活动性病灶，病变不易控制，患者病情的演变与之相符。因此，宜尽量选用以前未用或少用的药物治疗，并加强抗结核化疗的联合应用，疗程也应适当延长，同时加强治疗后定期随访。

**关键词** 结核性腹膜炎；脓肿；瘘
**中图法分类号** R572.2

## 参考文献

1 徐采朴. 结核性腹膜炎的治疗. 消化病现代治疗. 南京：江苏科学出版社，1993：489～491
2 麦灿荣. 结核性腹膜炎. 现代胃肠病学. 北京：科学出版社，1994：1932～1935

(收稿：1997-11-25；修回：1998-06-05)
(编辑 刘 鹏)

* 胡 辂，男，26岁，住院医师，学士

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