DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.04.015

一氧化氮检测在新生儿败血症中的应用*

史源 李华强 沈际皋 汪江淮** 章世文 潘捷 刘韧** (第三军医大学大坪医院儿科) 630042

提要 为探讨一氧化氮(NO)在新生儿败血症中的作用,测定了20例新生儿败血症外周血亚硝酸/硝酸根离子(NO_2^-/NO_3^-)水平。结果表明:新生儿败血症外周血NO_2^-/NO_3^-水平较对照组显著增高($P<0.05$),并发休克者亦较未并发休克者显著增高($P<0.05$),而且外周血NO_2^-/NO_3^-水平与肿瘤坏死因子水平密切相关($P<0.05$)。8例外周血NO_2^-/NO_3^-水平高于200 μmol/L者,6例发生休克;其余12例NO_2^-/NO_3^-水平低于此标准者,无一例发生休克,差别显著($P<0.05$)。本文显示:外周血NO_2^-/NO_3^-水平对于指示新生儿败血症是否并发休克具有重要价值。

关键词 一氧化氮;婴儿,新生;败血症;休克,脓毒性
中图法分类号 R722.131

近年来,一氧化氮(NO)在败血症、感染性休克发病机理中的作用日益得到重视。外周血NO_2^-/NO_3^-水平为指示NO产生水平的良好指标[1]。我们采用镉还原柱层析和比色法测定了正常新生儿和新生儿败血症病人的外周血NO_2^-/NO_3^-水平,以探讨NO在新生儿败血症中的作用。

1 研究对象及方法

1.1 研究对象

1991年1月至1992年12月根据《新生儿败血症修订诊断标准》[2]确诊的住院新生儿败血症病人20例(男15例,女5例),其中革兰氏阳性菌败血症7例,革兰氏阴性菌败血症13例。确诊并发感染性休克依据《小儿感染性休克诊断标准(草案)》[3],为具有下述两项者:(1)全身皮肤苍白或苍灰发花;(2)股动脉或桡动脉搏动细弱或摸不到;(3)低血压:收缩压<6.6 kPa,平均动脉压<5.28 kPa。本文病例中并发感染性休克者6例,其余14例未并发感染性休克。所有病例于入院后立即采血,采血前无使用丙种球蛋白、血浆、全血或糖皮质激素史。30例正常新生儿(男20例,女10例)作为对照组。外周血标本收集于肝素抗凝管中,4℃离心(3 000 rpm,15 min)分离血浆置于-20℃冰箱保存2~6周待检。

1.2 研究方法

1.2.1 外周血NO_2^-/NO_3^-水平测定:NO_2^-/NO_3^-为NO的稳定代谢产物,外周血NO_2^-/NO_3^-水平已被证实为NO产生水平的良好指标。我们采用镉还原柱层析和比色法[4],略加改良。上述血浆标本首先去蛋白(30%硫酸锌,0.05 ml/ml标本),然后通过一经重蒸水、0.1 mol/L盐酸、重蒸水和氢氧化铵缓冲液(0.1 mol/L,pH9.6)各5 ml顺序预处理的镉还原柱(100×8 mm)。通过这一柱层析过程后,NO_3^-被还原为NO_2^-。使用的洗脱液为氯化铵缓冲液(0.05 mol/L,pH9.6)。收集镉还原柱层析析出液5 ml,加入0.5 ml磺胺溶液(29.0 mmol/L),混合3 min,再加入0.2 ml萘乙二胺(19.3 mmol/L),20 min后以单光束分光光度计(721型,四川仪表三厂)在540 nm波长下测定光密度值。以系列亚硝酸钠溶液建立标准曲线。

1.2.2 外周血肿瘤坏死因子(TNF)水平测定:采用L929细胞生物学活性法[5]。以重组人类TNF(Sigma)校准(1 u=1.67 pg),并经抗重组人类TNF抗血清中和试验证实。。

1.3 统计学处理

以Wilcoxon两样本法,Spearman相关法,χ^2检验或四格表精确检验法作相应的统计学处理。数据以$\bar{x}\pm s$表示,显著性水平取$P<0.05$。

2 结果

表1示新生儿败血症病人的外周血NO_2^-/NO_3^-水平显著高于正常对照组,但革兰氏阴性菌败血症亚组和革兰氏阳性菌败血症亚组之间的NO_2^-/NO_3^-水平却无显著差异。表2示6例并发休克者的外周血NO_2^-/NO_3^-水平又显著高于其余14例未并发休克者。外周血NO_2^-/NO_3^-水平高于200 μmol/L者与感染性休克的发生密切相关:8例NO_2^-/NO_3^-水平高于200 μmol/L者,6例并发感染性休克;而12例NO_2^-/NO_3^-水平低于200 μmol/L者,无一例发生休克,差别显著($P<0.05$)。对于指示感染性休克的发生,此标准的敏感性为100%(6/6),特异性为86%(12/14),阳性预测值为25%(6/8),阴性预测值为100%(12/12)。

* 第三届国际一氧化氮生物学大会交流(德国科隆,1993.10)
** 野战外科研究所二室

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

表1 革兰氏阴性菌败血症和革兰氏阳性菌败血症血浆 NO_2^-/NO_3^- 水平比较

Tab 1 Plasma NO_2^-/NO_3^- levels of Gram-negative and Gram-positive sepsis

Group	n	NO_2^-/NO_3^- (μmol/L)		
		$\bar{x}\pm s$	Median	Range
Control	30	34.97± 13.41※	35.20	10.1～ 60.4
Sepsis	20	263.04±300.01	150.25	34.8～1230.4
Gram-negative	13	334.79±348.19	242.1	50.7～1230.4
Gram-positive	7	129.77±103.29	87.00	34.8～ 342.7

※: $P<0.05$ Compared with other groups

表2 各组间血浆 NO_2^-/NO_3^- 水平比较

Tab 2 Plasma NO_2^-/NO_3^- levels of the study population

Group	n	NO_2^-/NO_3^- (μmol/L)		
		$\bar{x}\pm s$	Median	Range
Control	30	34.97± 13.41	35.20	10.1～ 60.4
Sepsis without shock	14	126.22± 85.83	97.95	34.8～ 341.7※
Sepsis with shock	6	582.22±348.82	491.50	242.1～1230.4※△

※: $P<0.05$ compared with control group,

△: $P<0.05$ compared with sepsis group without shock.

外周血 NO_2^-/NO_3^- 水平还与TNF水平显著相关($\gamma_s=0.6207$, $P<0.05$),表3示研究对象的临床和实验室数据,可见并发休克者的外周血TNF水平亦显著高于未并发休克者。

表3 研究对象的临床和实验室数据

Tab 3 Characteristics of the study population

	Sepsis		Controls ($n=30$)
	With shock ($n=6$)	Without shock ($n=14$)	
Age (d)	3 (1～7)	3.5 (1～17)	2.5 (1～14)
Gestation (wk)	36.5 (36～40)	38 (26～42)	39 (36～41)
Birthweight (g)	2150 (1266～3700)	2950 (1800～3950)	3025 (1750～4250)
TNF (U/ml)	1280 (320～1920)※	280 (20～1280)	—
Time to entry (d)	1 (1～2)	3 (1～11)	—
No. of gram-negative sepsis (%)	5 (83)	8 (57)	—

※: $P<0.05$ compared with sepsis group without shock

Values are expressed as median, with range in parentheses except those for gram-negative sepsis (percentages)

3 讨论

本文揭示新生儿败血症病人的外周血 NO_2^-/NO_3^- 水平较正常对照组显著增高,而且并发休克者的外周血 NO_2^-/NO_3^- 水平又较未并发休克者增高,外周血 NO_2^-/NO_3^- 水平高于 200 μmol/L 对于指示感染性休克的发生具有重要价值。外周血 NO_2^-/NO_3^- 水平还与 TNF 水平密切相关,而革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌败血症之间的 NO_2^-/NO_3^- 水平无显著差异。

自 1986 年发现内皮细胞源性舒张因子(EDRF)与 NO 具有同源性后,NO 在败血症、感染性休克发病机理中的作用十分引人注目。目前已证实至少有两种类型的 NO 合成酶,主要分布于血管内皮细胞的基本型 NO 合成酶所产生的适量 NO 具有调节血管张力,血压和组织灌注的生理作用,而主要由分布于血管内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞的诱导型 NO 合成酶在内毒素、TNF 等细胞因子的刺激下所产生的大量 NO,可导致血管持续舒张,血压降低,组织灌注异常,乃至休克,并可损伤血管内皮细胞,造成弥漫性血管内凝血(DIC)[6]。

许多研究表明,NO 可激活鸟苷酸环化酶,鸟苷酸环化酶上的亚铁原卟啉(Heme)基团就是 NO 的受点,NO 激活鸟苷酸环化酶使环磷酸鸟苷(cGMP)水平增高,即所谓 NO：鸟苷酸环化酶：cGMP 系统,在人类和动物的各种组织和细胞中普遍存在,参与或介导 NO 的舒张血管,调节血压和组织灌注和拮抗血小板聚集等生理作用。在败血症、感染性休克的发生发展过程中,由于 TNF 等细胞因子刺激 NO 大量合成并释放,可使该系统异常,导致持续血管扩张、血压降低、组织灌注异常,甚至休克。大剂量 NO 更可作用于 Fe-S 蛋白类如辅酶 Q 氧化还原酶和琥珀酸氧化还原酶等,影响细胞呼吸和能量代谢,特别是 NO 还作用于非 Heme 的 Fe 蛋白,抑制核糖核苷酸还原酶,进而抑制 DNA 合成,导致血管内皮细胞 DNA 损伤,引起基因

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

毒性。近来。NO 还被发现可与超氧化阴离子结合，产生硝基过氧化物，具有很强的细胞毒性作用[6]。

已发现，静注 NO 的前体——左旋精氨酸，可致低血压和心动过速，与 NO 合成和释放有关。Ochoa 等发现成年败血症病人血浆 NO_2^-/NO_3^- 水平增高，且与外周阻力降低密切相关[7]。近年来，NO 合成酶抑制剂如一甲基左旋精氨酸(L-NMMA)已被证实可逆转内毒素或 TNF 所致休克，并已试用于临床治疗感染性休克病人。然而，对于 L-NMMA 的应用似有争议，因为 L-NMMA 既抑制诱导型 NO 合成酶，又抑制基本型 NO 合成酶，从而可能干扰生理性调节血管张力和组织灌注的功能，特别是新近发现 NO 还具有重要的抗感染能力[8]。因而，应用仅抑制诱导型 NO 合成酶，而不影响基本型 NO 合成酶的制剂，如左旋刀豆氨酸、糖皮质激素或抗 TNF 抗体等值得注意[9]。

不少证据表明 TNF 在败血症、感染性休克的发病机制中起着重要的介质作用，TNF 的这一介质作用可能由 NO 的途径而发挥。TNF 的致休克作用可完全被 L-NMMA 所逆转[10]，本文也证实外周血 NO_2^-/NO_3^- 水平与 TNF 水平显著相关。

本文显示 NO 在新生儿败血症的发病机理中占有一定地位，检测外周血 NO_2^-/NO_3^- 水平对于指示感染性休克的发生具有重要价值。NO 又被称为活性氮介质，具有广泛的多样化的生物学效应，既可调节免疫反应，还可拮抗血小板聚集，既可调节血管张力，又具有神经递质功能。有关 NO 的生物学效应和临床意义的研究，方兴未艾，令人注目。

参考文献

1 Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 7738～7742

2 吴仕孝. 新生儿败血症诊断标准修订方案. 中华儿科杂志, 1988, 26: 163

3 胡皓夫. 关于小儿感染性休克临床诊断标准的建议(草案). 中华儿科杂志, 1980, 18: 48～49

4 Hegesh E, Shiloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. Clin Chim Acta, 1982, 125: 107～115

5 史　源，沈际皋，汪江淮，等. 肿瘤坏死因子在新生儿败血症中的作用. 中华儿科杂志, 1993, 31: 79～80

6 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, 1991, 43: 109～142

7 Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. Ann Surg, 1991, 214: 621～626

8 Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol, 1991, 3: 65～70

9 Shi Y, Li HQ, Shen CK, et al. Association between protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor and suppression of nitrc oxide production in neonatal rats with fatal infection. Pediatr Res, 1993, 34: 345～348

10 Kilbourn RG, Griffith OW. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. J Natl Cancer Inst, 1992, 84: 827～832

(收稿：1993-11-03；修回：1994-04-13)

Clinical significance of the determination of blood nitrogen monoxide level in neonatal sepsis

Shi Yuan, Li Huaqiang, Shen Jigao, Wang Jianghuai, Qing Shiwen, Pan Jie, Liu Ren (Department of Pediatrics, Daping Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract The blood level of nitrogen monoxide can be reflected by the plasma level of nitrite/nitrate. Nitrite/nitrate level of the peripheral blood was determined in 20 cases of neonatal sepsis. It was found that the nitrite/nitrate level was higher in newborns with sepsis than in the control ($P<0.05$) and also higher in those without the complication ($P<0.05$). 6 out of the 8 cases with a nitrite/nitrate level over 200 μmol/L suffered from septic shock and none of the 12 cases with a nitrite/nitrate level lower than that mentioned above was inflicted with the complication. Moreover, the nitrite/nitrate level was positively correlated with the level of tumor necrosis factor in the peripheral blood ($P<0.05$). Nitrite/nitrate level was elevated in sepsis due to either gram-positive or gram-negative bacteria. We conclude that the determination of the nitrite/nitrate level in the peripheral blood in neonatal sepsis is helpful to predict the occurrence of septic shock.

Key words nitric xide; infant, newborn; septicemia; shock, septic

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