

文章编号:1005-6947(2004)02-0107-04

· 实验研究 ·

选择性、非选择性 NOS 抑制剂及 L-精氨酸对创伤性休克大鼠的影响

孙英刚^{1,2}, 范西红¹, 徐良¹, 张小化¹, 贺青卿¹, 孙力勇¹, 黄宗海²

(1. 济南军区总医院 普外科, 山东 济南 250031; 2. 第一军医大学珠江医院 普外科, 广东 广州 510282)

摘要:目的 探讨一氧化氮合酶(NOS)抑制剂及L-精氨酸(L-Arg)对创伤性休克大鼠的治疗作用。方法 建立创伤性休克大鼠模型,随机分为对照组、左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)处理组、氨基胍(AG)处理组及L-精氨酸(L-Arg)处理组,分别于复苏后1,4,7h检测血清一氧化氮(NO)浓度,复苏后1h检测骨骼肌、肝脏、小肠的组织氧分压,监测血液动力学变化并记录存活时间。结果 与对照组相比,L-NAME可显著降低血清NO浓度,而对组织氧分压及12,24h存活率无显著影响;AG仅在休克后期使NO浓度明显降低,而对早期NO的合成与释放无显著作用,AG可提高肝脏、小肠的组织氧分压,提高休克模型12h存活率;应用L-Arg可显著提高血清NO浓度,并可明显改善肝脏、小肠的组织氧分压,显著提高12,24h存活率。结论 选择性NOS抑制剂AG及L-Arg更能改善创伤性休克动物模型的预后。

关键词: 休克, 创伤性/药物疗法; 一氧化氮合酶/拮抗剂和抑制剂; 精氨酸/治疗应用

中图分类号: R605.971; R977.4

文献标识码: A

Effect of selective, non-selective nitric oxide synthase inhibitor and L-arginine on traumatic shock in rats

SUN Ying-gang¹, FAN Xi-hong¹, XU Liang¹, ZHANG Xiao-hua¹, HE Qing-qing¹, SUN Li-yong¹, HUANG Zong-hai²

(1. Department of General Surgery, General Hospital of Jinan Army of PLA, Jinan, 250031, China;

2. Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of nitric oxide synthase(NOS) inhibitors and L-arginine(L-Arg) on the prognosis of traumatic shock in rats. **Methods** Traumatic shock models of Sprague-Dawley rats were made and randomly divided into control group (n=24), L-NAME treatment group (n=24), AG treatment group (n=24) and L-Arg treatment group (n=24). Serum nitric oxide(NO) levels and oxygen partial pressure in tissues include skeletal muscles, liver and small intestine were detected at 1h, 3h, 5h after resuscitation. Meanwhile, hemodynamic data of the rats and their survival rates of 12h and 24h were monitored and recorded. **Results** Serum NO concentration was statistically lower after resuscitation in L-NAME group than that in control group, while there were no statistical significance of tissues oxygen partial pressure and survival rate in 12, 24h between the two groups. AG could decrease serum NO levels only at late stage of traumatic shock, but no effect on the synthesis and release of NO at early stage of traumatic shock. AG could improve tissues oxygen partial pressure of the liver and small intestine, and prolonged the mean survival time. L-Arg could increase serum NO levels, and improve oxygen partial pressure of intestine and significantly increase the survival rate at 12h and 24h in rats with traumatic shock. **Conclusions** Treatment with AG and L-Arg can improve the prognosis of traumatic shock rats much better than that with L-NAME.

Key words: SHOCK, TRAUMATIC/drug ther; NITRIC OXIDE SYNTHASE/antag; ARGININE/ther use

CLC number: R605.971; R977.4

Document code: A

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(001048)。

收稿日期:2003-06-17; **修订日期:**2003-12-11。

作者简介:孙英刚(1972-),男,山东禹城人,济南军区总医院主治医师,硕士,主要从事创伤性休克方面的研究。

一氧化氮(nitric oxide, NO)在脓毒性休克、烧伤休克等疾病中的意义已引起人们的广泛关注,但在创伤性休克中的作用及机制尚缺乏系统的研究。本研究系在创伤性休克大鼠模型上应用NO合成底物L-精氨酸(L-Arg)以及选择性、非选择性一氧化氮合酶(NOS)抑制剂氨基胍(AG)和左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)进行处理,观察它们对NO和组织氧分压的变化及存活时间的影响,旨在进一步探讨NOS抑制剂及L-Arg在创伤性休克中的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

NO试剂盒为美国Cayman公司产品;L-Arg, AG及L-NAME购自美国Sigma公司;Gilson生理记录仪购自美国Gilson公司;SN-682型放射免疫 γ -计数器购自上海核福光电仪器有限公司; Σ 960E型全自动酶标仪为台湾Metertech公司产品;磷光探针及OxyspotTM phosphorimeter购自美国纽约Greenvale医疗公司。

1.2 动物模型的建立

健康成年SD大鼠由第一军医大学实验动物中心提供,体重(250±20)g,雌雄不拘,实验前禁食12h,禁水8h。采用股骨创伤法建立创伤性休克动物模型^[1]:腹腔注射麻醉后行单侧颈动、静脉插管,连接Gilson生理记录仪监测血压。稳定10min,以2500g铁轮自30cm高处垂直落下,依次击打大鼠双侧股骨中上段。监测血压,待平均动脉压降至40mmHg(1mmHg=0.133kPa)时,加压包扎双侧创面以减少进一步出血,然后通过放血或输液维持此低血压90min记为休克末,制成创伤性休克动物模型。

1.3 实验分组和实验方法

休克模型随机分为对照组、L-Arg处理组、AG处理组和L-NAME处理组,每组24只。对照组于休克末回输失血及1倍失血量的平衡液复苏,使血压恢复至伤前水平的70%以上并维持。其他各观察组在同法复苏的同时分别给予L-Arg 100mg/kg, AG 10mg/kg和L-NAME 10mg/kg静脉注射。每组24只中18只分别于复苏后1,4,7h(每个时间点6

只)于股动脉取血测定NO浓度,6只于复苏后1h测定骨骼肌、肝脏、小肠的组织氧分压。取血后补充等量平衡液,记录存活时间。

1.4 指标测定方法

采用Griess法测定血清NO浓度^[2]。利用氧依赖性的淬灭技术以OxyspotTM phosphorimeter测定组织氧分压。测定前15min经颈静脉注入磷光探针生理盐水溶液20mg/kg。开腹小心暴露小肠和肝脏,切开皮肤暴露大鼠前肢肌肉。测定时探头距组织表面0.5cm。每次测定取值100次,每次做40个扫描。氧分压取其均值。以上操作在避光条件下完成。

1.5 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用SPSS11.0统计软件进行t检验、方差分析和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 血清NO浓度的变化

与对照组相比,L-NAME组大鼠复苏后1,4h血清NO浓度均极明显降低($P < 0.01$),复苏后7h亦有明显降低($P < 0.05$);AG组在复苏后4h已明显降低($P < 0.05$),7h降低更为显著($P < 0.01$);L-Arg组大鼠仅于复苏后1h血清NO浓度显著升高($P < 0.01$),但复苏后4,7h与对照组差异无显著性($P > 0.05$)(附表)。

附表 各组大鼠血浆NO浓度的比较

组别	鼠数	NO浓度($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)		
		复苏后1h	复苏后4h	复苏后7h
对照	6	43.22 ± 10.77	61.40 ± 21.04	73.49 ± 14.17
L-NAME	6	21.86 ± 8.33 ¹⁾	36.27 ± 11.14 ¹⁾	54.73 ± 14.61 ²⁾
AG	6	33.49 ± 7.98	43.81 ± 11.82 ²⁾	50.39 ± 11.55 ¹⁾
L-Arg	6	68.45 ± 14.93 ¹⁾	72.43 ± 12.82	77.65 ± 17.40

注:与对照组比较,1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$

2.2 组织氧分压比较

与休克对照组相比,L-NAME组复苏后1h肝脏、小肠的组织氧分压变化差异无显著性($P < 0.05$),AG组则明显升高,差异有显著性($P < 0.05$),L-Arg组的升高更为显著($P < 0.01$);而3组骨骼肌氧分压与休克对照组比较,差异均无显著性(均 $P > 0.05$)(附图)。

附图 各组大鼠复苏后 1h 组织氧分压比较

2.3 对存活率的影响

与对照组 12h 存活率(45.83%)相比, L-NAME 组(58.33%) 差异无显著性($P > 0.05$); 而 AG 组(75.00%) 及 L-Arg 组(83.33%) 均显著升高($P < 0.05$)。与对照组 24h 存活率(20.83%) 相比, L-NAME 组(29.17%) 及 AG 组(45.83%) 差异均无显著性($P > 0.05$), 而 L-Arg 组(62.50%) 则有明显增加($P < 0.01$)。

3 讨论

NO 作为一种重要的生物第二信使, 参与多种生理功能的调节, 如神经传导, 内皮依赖性的血管松弛和细胞介导的免疫反应等^[3]。内源性 NO 是由 NOS 氧化 L-Arg 产生的。NOS 有 3 种同工酶, 即内皮型(eNOS)、神经型(nNOS)和诱生型(iNOS), eNOS 和 nNOS 又合称结构型一氧化氮合酶(cNOS)。不同的 NOS 催化合成的 NO 其生理功能各异。eNOS 主要分布在血管内皮细胞, 生理情况下 eNOS 合成和释放的 NO 是血管张力的主要调节因子。iNOS 主要分布在巨噬细胞、库普弗细胞、肿瘤细胞及肝细胞中。iNOS 的基因正常情况下不表达, 而在创伤、休克、感染等病理条件下活性增加, 合成大量的 NO。NO 的过量生成可引起细胞核酸亚硝酸化, 破坏 DNA 结构, 并可抑制某些与细胞呼吸和 DNA 复制有关的关键酶活性从而产生细胞毒作用, 参与机体的病理损害^[4,5]。

本研究结果表明: 应用 L-NAME 可显著降低血清 NO 浓度, 作用快速而持久, 而对组织氧分压及 12, 24h 存活率无显著影响; AG 仅在休克后期使 NO 浓度明显降低, 而对早期 NO 的合成与释放无显著作用, 它还可提高肝脏、小肠的组织氧分压, 提高休克模型 12h 存活率; L-Arg 可显著促进 NO 的合

成与释放, 并明显改善肝脏、小肠的组织氧分压, 显著提高 12, 24h 存活率。非选择性 NOS 抑制剂 L-NAME 在抑制 iNOS 的同时, 也抑制了 cNOS 的活性, 使内源性 NO 的合成减少, 调节机体正常生理功能的能力减弱, 因此不能有效改善休克模型的预后。AG 对 iNOS 的抑制活性较对 nNOS 和 eNOS 的抑制活性分别强 50 倍和 500 倍^[6], 可有效抑制休克后期 NO 的大量合成, 减轻其毒性作用, 而对 cNOS 影响很小, 不影响 cNOS 合成调节正常生理功能的 NO, 因而改善了休克模型的预后。L-Arg 是 NO 的合成底物, 通过补充 L-Arg 可以调节内源性 NO 的合成和释放。正常机体内有足够的 L-Arg 供应以合成 NO, 此时 L-Arg 不是 NOS 的限速因素, 故在生理状态下增加外源性 L-Arg 不会增加 NO 合成, 对血管不产生直接作用。在缺血、缺氧条件下, NO 大量合成使机体可利用的内源性 L-Arg 大量消耗, 此时 L-Arg 可作为 NOS 的限速因素增加 NO 合成。外源性 L-Arg 可补充体内大量消耗造成的 L-Arg 不足, 从而增加 NO 合成与释放以调节血管张力; 通过抑制内皮活化、抑制机体的炎症反应来保护血管内皮功能^[7], 并抑制白细胞黏附、聚集, 减轻心肌损伤。研究^[8]表明, L-Arg 可改善创伤及出血大鼠的心排血量和局部灌注。笔者前期的实验结果^[9]也表明, L-Arg 还可降低血浆 ET 浓度, 减轻了休克后期 ET 的异常升高及内脏器官血管的强烈收缩所导致的缺血缺氧状态。关于 NOS 抑制剂及 L-Arg 在休克治疗中的有效药物浓度、用药方式、用药时机、伍用效应等, 仍有待于进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 孙英刚, 黄宗海, 冯浩森, 等. 创伤性休克大鼠模型的建立[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(12): 1094-1095.
- [2] 石胜军, 吴坤莹. 改良的检测生物样品中一氧化氮的方法[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1998, 14(4): 317-318.
- [3] Miyasaka N, Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides[J]. Life Sci, 1997, 61(21): 2073-2081.
- [4] Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, et al. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite[J]. J Clin Invest, 1997, 100(3): 723-735.
- [5] 焦华波, 陆家齐, 谢平初, 等. N-单甲基左旋精氨酸对脾切除后大鼠内毒素休克的治疗作用[J]. 中国普通外科杂志, 1998, 7(2): 83-86.
- [6] Wolff DJ, Lubeskie A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase[J]. Arch Biochem Bio-

phys, 1995, 316(1): 290-301.

- [7] Schulze-Neick I, Penny DJ, Rigby ML, *et al.* L-arginine and substance P reverse the pulmonary endothelial dysfunction caused by congenital heart surgery[J]. *Circulation*, 1999, 100(7): 749-755.

- [8] Angele MK, Smail N, Wang P, *et al.* L-Arginine restores the depressed

cardiac output and regional perfusion after trauma-hemorrhage[J]. *Surgery*, 1998, 124(2): 394-401.

- [9] 黄宗海, 孙英刚, 冯浩森, 等. L-精氨酸在创伤性休克治疗中的作用初探[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(1): 46-49.

文章编号: 1005-6947(2004)02-0110-01

· 病例报告 ·

肝胆管囊腺瘤 3 例

许春森, 黄长玉, 沈娟, 陈燕凌, 黄建富, 陈大良

(福建医科大学附属协和医院 普外科, 福建 福州 350001)

关键词: 胆管肿瘤; 囊腺瘤; 胆管, 肝内

中图分类号: R735.8; R322.47

文献标识码: D

1 病例报告

例1 女, 66岁。入院前1周B超检查发现左肝胆管囊状扩张, 大小约10cm×3cm; 胆管壁不规则增厚, 可见多个高回声乳头状突起, 大者约3cm×1cm; 胆总管扩张, 直径约2cm; 未见实体回声。肝脏CT扫描提示: 左肝内胆管瘤样扩张, 局部隆起约4cm×1cm; 胆总管扩张。肝功能检查: 总蛋白61.8g/L, 白蛋白33g/L, 总胆红素26.4μmol/L, 间接胆红素16.7μmol/L, 碱性磷酸酶113U/L, 谷氨酰转氨酶211U/L。术前诊断为左肝胆管囊状扩张症, 行胆总管探查, 术中探查见左肝外叶胆管囊状扩张, 大小约12cm×10cm×5cm, 内触及多个乳头状肿瘤, 质地中等, 未浸润至肝包膜; 余肝质地、大小正常, 未触及明显结节, 肝门淋巴结无肿大, 胆总管扩张, 直径约2cm, 内有大量胶冻样物质, 清除胶冻样物质后, 探查胆总管下端未见结石或肿瘤, 乃行左半肝切除术。手术过程顺利。术后解剖标本见扩张的左外叶上下段胆管壁上有乳头状肿瘤5个, 最大3cm×3cm×3cm, 最小1cm×1cm×1cm; 胆管内充满黏液胶

冻样物质。术后病理报告: 肝内胆管乳头状腺瘤伴小区癌变。术后恢复顺利, 随访3年未见复发。

例2 女, 40岁。6年前体检B超发现左肝囊肿, 大小约6cm×5cm×5cm; 无伴腹痛或其他不适, 未给予特殊治疗。4年前在外院行经皮肝穿刺肝囊肿引流治疗, 每3~6个月1次, 共3次。每次穿刺后B超检查囊肿有所缩小, 最小至2cm×1cm×1cm, 之后又反复增大。术前B超复查提示左肝一巨大液性暗区, 约15cm×10cm×10cm, 界清, 内可见多个厚薄不均匀分隔带。CT检查示左肝内一巨大低密度灶, 边缘光滑, 增强后可见分隔带。肝功能检查基本正常。术前诊断为左肝囊肿, 行左肝囊肿切除术(连同部分肝组织一并切除)。术中见左肝内叶脏面有一巨大之囊肿, 大小约15cm×10cm×8cm。术后切开囊壁见囊内混浊液体约200ml, 内有3个小囊肿, 各约4cm×3cm×2cm大部分囊壁光滑, 部分囊壁可见肉芽组织, 边界清楚。术后病理报告: 肝内胆管乳头状囊腺瘤。随访4年无异常。

例3 男, 72岁。3周前体检B超发现左肝囊性肿物, 大小约4cm×4cm×3cm, 无伴腹痛、腹胀、眼黄、发热等不适, 肝功能及甲胎蛋白检查正常。术前诊断为左肝囊肿, 行左肝外叶切

除术。术中见左肝外叶脏面一肿物, 囊性, 大小约4cm×3cm×2cm。术后切开囊腔见混浊胶冻样物, 边界清楚。术后病理报告: 肝内胆管乳头状囊腺瘤伴小区癌变。失访。

2 讨论

肝胆管囊腺瘤是一种肝脏少见的囊性肿瘤, 容易发生癌变。女性占多数, 发病年龄多在40~80岁, 发病高峰在50岁左右。肿瘤生长缓慢, 可长期无临床症状, 待瘤体长到一定程度时, 对周围组织或器官可产生压迫症状。本文报告3例中2例为女性, 无明显腹痛、腹胀、黄疸等症状, 且均为体检B超发现。一般认为其发生来源于胚胎期胆道系统发育异常形成囊性扩张所致。也有人提示它可能是胆管周围腺体的一种错构瘤。

肿瘤大多为多囊性, 囊泡之间有坚硬的纤维组织分隔, 囊泡内壁可见息肉或乳头状隆起, 囊内为混浊样或胶冻样物。本病应注意与肝囊肿及转移性囊腺瘤相鉴别, 术前常误诊为肝囊肿。B超不仅能观察胆管囊壁是否完整, 有否息肉样或乳头状突起。还能引导细针对息肉样或乳头状突起病灶进行穿刺活检, 对术前明确病变性质及制定手术方案有指导作用。肝胆管囊腺瘤容易发生恶性变, 手术切除为理想治疗方法。

收稿日期: 2002-11-26;

修订日期: 2003-10-13。

作者简介: 许春森(1969-), 男, 福建德化人, 福建医科大学附属协和医院主治医师, 主要从事普外科方面的研究。