

烫伤大鼠心肌细胞一氧化氮生成对心肌的保护作用

张铭 黄跃生 张琼

【摘要】 目的 了解氨基胍对烫伤大鼠心肌的影响。方法 将 72 只 Wistar 大鼠随机分为烫伤组、氨基胍组。2 组大鼠均造成 30% TBSA III 度烫伤后常规补液,氨基胍组伤前 20 min 腹腔内注射氨基胍(40 mg/kg)。于伤前及伤后 1、3、6、12、24 h 取大鼠动脉血检测血清中心肌肌钙蛋白 I(cTnI)浓度、一氧化氮(NO)浓度,另取心肌组织测定 NO 浓度;观察氨基胍组、烫伤组伤后 6 h 大鼠的心功能水平。结果 伤后 3 h 烫伤组大鼠血清 NO 浓度[(59.6 ± 5.4) μmol/L]明显高于伤前[(24.6 ± 0.8) μmol/L, P < 0.01],6 h 达峰值,24 h 明显回落,均明显高于氨基胍组(P < 0.01);心肌组织 NO 浓度的变化趋势同上。与烫伤组比较,氨基胍组伤后各时相点 cTnI 浓度明显升高。与烫伤组伤后 6 h 比较,氨基胍组大鼠该时相点的心功能抑制加重。结论 氨基胍可抑制 NO 生成,加重了烫伤大鼠的心肌损害并使其心功能下降,提示 NO 对烫伤后早期心肌可能具有保护效应。

【关键词】 一氧化氮; 肌细胞,心脏; 心肌; 氨基胍

Protective effect of nitric oxide production on myocardium in severely scalded rats ZHANG Ming, HUANG Yue-sheng, ZHANG Qiong. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China Corresponding author; HUANG Yue-sheng, Email: yshuang@public.cta.cq.cn, Tel: 023-68754173

【Abstract】 Objective To observe the influence of aminoguanidine on cardiac troponin (cTnI) and nitric oxide (NO) levels in serum and myocardium in severely scalded rats. Methods Seventy-two Wistar rats were subjected to 30% TBSA full-thickness scald and randomly divided into scald group (S) and aminoguanidine group (A, with intraperitoneal injection of 40 mg/kg aminoguanidine before scald). The venous blood and myocardial tissue of the rats were harvested for the determination of the level of cTnI and nitrite in both serum and myocardium before scald and at 1, 3, 6, 12 and 24 post-burn hours (PBH). Six sham scalded rats served as control group. The changes in the cTnI level and myocardial function were determined among control group, A and S groups at 6PBH. Results The serum level of NO in S group [(59.6 ± 5.4) μmol/L] was obviously higher than that before scald [(24.6 ± 0.8) μmol/L, P < 0.01], and it peaked at 6 PBH, then decreased obviously at 24 PBH, which was still markedly higher than that in A group (P < 0.01). The changes in NO level in myocardium were similar to the above tendency. Compared with S group, the level of cTnI was significantly increased in A group at each time-point. Compared with A group at 6 PBH, the inhibition of the cardiac function was relatively reduced in S group at 6 PBH. Conclusion Inhibition of NO synthesis by aminoguanidine aggravates cardiac damage and impairment of cardiac function of scalded rats, indicating that NO exerts protective effect on myocardium at early stage after a scald injury.

【Key words】 Nitric oxide; Myocytes, cardiac; Myocardium; Aminoguanidine

既往研究表明,烧伤后早期“休克心”的发生不仅直接引起心脏功能不全,还可诱发或加重多器官功能衰竭,成为大面积烧伤患者病死率高的重要原因^[1,2]。笔者拟选用诱导型一氧化氮合酶(iNOS)特异性抑制剂氨基胍,观察其抑制心肌组织一氧化氮(NO)的生成对烫伤大鼠心功能及心肌肌钙蛋白

I(cTnI)的影响,旨在探讨心肌组织 NO 对烧伤早期心功能的作用。

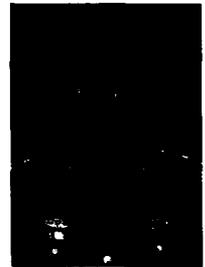
1 材料与方

1.1 动物与试剂来源

Wistar 大鼠 78 只,雌雄不拘,体质量(200 ± 30)g,由第三军医大学大坪医院动物室提供;氨基胍购自美国 Sigma 公司,NO 试剂盒购自美国 Promega 公司,cTnI 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自大连泛邦化工技术开发有限公司。

1.2 动物模型与分组

按照随机数字表法将 72 只大鼠分为烫伤组和



基金项目:国家自然科学基金重点项目(30430680);国家杰出青年科学基金(30125040)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(张铭现在麻醉科)

通讯作者:黄跃生,Email: yshuang@public.cta.cq.cn, 电话:023-68754173

氨基胍组, 每组 36 只。2 组大鼠伤前禁食 12 h, 背部去毛, 置于 100 °C 水浴中 18 s 造成 30% TBSA III 度烫伤, 其中氨基胍组大鼠伤前 20 min 腹腔内注射氨基胍 40 mg/kg。伤后每日补液根据 Parkland 公式 ($4 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \% \text{ TBSA}^{-1}$) 进行。2 组均设伤前及伤后 1、3、6、12、24 h 6 个时相点, 每时相点 6 只大鼠, 经腹主动脉或颈动脉采集大鼠血液提取血清检测 NO、cTnI 浓度; 剪开大鼠胸腔取出心脏, 冻存于液氮中以检测 NO 浓度。

另取假伤组 6 只大鼠 (除置入室温水浸泡 18 s 外, 补液同上) 上述动脉血, 检测 cTnI 浓度并观察心功能水平, 烫伤组、氨基胍组大鼠伤后 6 h 亦行相应检测。

1.3 检测方法

1.3.1 cTnI 浓度的测定 取大鼠动脉血血清按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

1.3.2 NO 浓度的测定 参照文献 [3] 测定, 以亚硝酸盐的浓度表示 NO 浓度。血清亚硝酸盐浓度的测定按常规方法进行。心肌细胞内亚硝酸盐浓度的测定: 取大鼠左心室心肌组织 100 mg 置于匀浆管内, 按 1:10 的比例加入等渗盐水, 冰浴匀浆 10 min, 于离心半径 6 cm, 1000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 -20 °C 下保存。测试前临时配制 100 μmol/L 的亚硝酸盐标准品。

1.3.3 左心功能测定 将大鼠固定于操作台上, 剪开颈部正中皮肤, 分离出左颈动脉, 结扎远心端, 将心导管插入颈动脉, 连接四导生理监测记录仪 (日本 Nihon Kohden 公司), 调节导管位置, 使其进

入左心室, 记录左心室收缩压 (LVSP)、左心室舒张末期压 (LVEDP)、左心室压力变化最大上升/下降速率 ($\pm \text{dp}/\text{dt max}$)。

1.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 氨基胍对烫伤大鼠血清 NO 浓度的影响

伤后 3 h 烫伤组大鼠血清 NO 浓度明显增加 ($P < 0.01$), 6 h 达高峰 ($P < 0.01$), 24 h 虽有明显回落但仍然高于伤前; 氨基胍组 NO 浓度在伤后各时相点均显著低于烫伤组。见表 1。

2.2 氨基胍对烫伤大鼠血清 cTnI 浓度的影响

伤后 6 h 烫伤组大鼠血清 cTnI 浓度明显上升 ($P < 0.05$), 12 h 达高峰 ($P < 0.05$), 24 h 基本恢复至伤前水平; 氨基胍组伤后各时相点 cTnI 浓度均明显高于烫伤组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 氨基胍对烫伤大鼠心肌组织 NO 浓度的影响

伤后 1 h 烫伤组大鼠心肌组织内 NO 浓度即显著增加 ($P < 0.01$), 6 h 达高峰 ($P < 0.01$), 24 h 虽有明显回落但仍明显高于伤前 ($P < 0.05$); 氨基胍组伤后各时相点 NO 浓度均显著低于烫伤组 ($P < 0.01$)。见表 3。

2.4 氨基胍对烫伤大鼠伤后 6 h 心功能的影响

与假伤组比较, 烫伤组大鼠伤后 6 h LVSP 值明显下降 ($P < 0.05$), LVEDP 值上升, $\pm \text{dp}/\text{dt max}$ 值均明显下降 ($P < 0.01$); 与烫伤组比较, 氨基胍

表 1 烫伤大鼠伤后 24 h 内血清一氧化氮浓度的变化 (μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤前	伤后时间(h)				
			1	3	6	12	24
烫伤组	36	24.6 ± 0.8	29.8 ± 2.0	59.6 ± 5.4 ^c	68.6 ± 4.5 ^c	46.1 ± 24.4 ^c	30.2 ± 1.3
氨基胍组	36	21.6 ± 1.5	25.0 ± 2.0 ^b	31.9 ± 0.9 ^{bc}	31.4 ± 2.7 ^{bc}	24.4 ± 1.3 ^a	20.3 ± 0.5 ^a

注: 与烫伤组比较, a: $P < 0.01$; 与伤前比较, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$

表 2 烫伤大鼠伤后 24 h 内血清心肌钙蛋白 I 浓度的变化 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤前	伤后时间(h)				
			1	3	6	12	24
烫伤组	36	1.83 ± 0.21	2.21 ± 0.24	1.97 ± 0.29	5.65 ± 1.98 ^c	21.48 ± 19.70 ^c	1.76 ± 0.69
氨基胍组	36	3.40 ± 2.02	18.43 ± 16.56 ^{bc}	33.48 ± 37.09 ^{bc}	63.02 ± 35.46 ^{bd}	156.30 ± 51.18 ^{bd}	47.24 ± 40.22 ^{bc}

注: 与烫伤组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与伤前比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

表 3 烫伤大鼠伤后 24 h 内心肌组织一氧化氮浓度的变化 (μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤前	伤后时间(h)				
			1	3	6	12	24
烫伤组	36	23.7 ± 2.7	62.0 ± 7.0 ^c	103.4 ± 16.8 ^c	118.6 ± 5.3 ^c	95.6 ± 10.4 ^c	40.2 ± 5.0 ^b
氨基胍组	36	25.0 ± 1.9	27.0 ± 0.9 ^a	31.2 ± 3.3 ^{ac}	30.2 ± 2.3 ^a	21.0 ± 2.6 ^a	27.5 ± 4.9 ^a

注: 与烫伤组比较, a: $P < 0.01$; 与伤前比较, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$

组心功能抑制更为明显。见表 4。

表 4 各组大鼠心功能指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	LVSP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	+ dp/dt max (mm Hg/s)	- dp/dt max (mm Hg/s)
假伤组	6	160.6 ±	5.0 ±	9695 ±	7241 ±
		12.6	3.1	1038	1435
烫伤组	6	134.2 ±	6.8 ±	2723 ±	2114 ±
		1.3 ^a	1.1	21 ^b	26 ^b
氨基胍组	6	90.1 ±	8.2 ±	2591 ±	983 ±
		26.7 ^{bc}	3.6	321 ^{bc}	234 ^b

注: 1 mm Hg = 0.133 kPa; LVSP 为左心室收缩压, LVEDP 为左心室舒张末期压, ± dp/dt max 为左心室压力变化最大上升/下降速率; 与假伤组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与烫伤组比较, c: $P < 0.01$

2.5 氨基胍对烫伤大鼠伤后 6 h 血清 cTnI 浓度的影响

与假伤组 [$(1.8 \pm 0.6) \mu\text{g/L}$] 比较, 烫伤组大鼠伤后 6 h 血清 cTnI 浓度 [$(10.6 \pm 0.7) \mu\text{g/L}$] 明显上升 ($P < 0.05$); 氨基胍组大鼠伤后 6 h 该浓度 [$(63.0 \pm 7.0) \mu\text{g/L}$] 则明显高于假伤组和烫伤组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

研究表明, 烧伤后早期心脏血液供应即存在严重不足, 同时伴有心肌组织丙二醛含量明显增加和超氧化物歧化酶活性显著降低, 提示烧伤后早期心脏即存在着缺血缺氧性损害^[4-6]。各组织器官释放的大量细胞因子和炎性介质也参与这一病理生理改变^[2,7]。本实验结果表明, 烫伤后早期大鼠心脏收缩功能明显下降, 舒张能力减弱。这可能与 NO 减少细胞 Ca^{2+} 内流, 减弱心肌收缩力有关。烫伤后心脏舒缩功能明显受到抑制是烫伤加重缺血缺氧的又一不利因素^[8,9]。

缺血缺氧可启动细胞的内源性保护机制^[10]。近年的研究表明, NO 广泛参与了生物体内的各种病理生理活动^[11,12]。笔者推测 NO 水平的局部升高有可能对烫伤大鼠“休克心”的发展和转归产生影响, 为此设计了该研究。本研究结果显示, 氨基胍抑制 NO 生成的同时使 cTnI 浓度升高时间提前, 幅度加大, 提示抑制心肌 NO 生成加重了烫伤大鼠的心肌损害, 心肌组织局部产生的 NO 对它自身的影响可能大于循环内 NO 浓度的变化。Farghali 等^[6]观察到抑制 iNOS 可加重大鼠肝细胞的缺血缺氧性损害。陈玺华等^[13]观察到大鼠肝脏缺血再灌注时, 补充 NO 合成的前体物质 L-精氨酸不会加重肝脏的损害, 而抑制 NO 的合成可明显加重肝脏损伤, 证实

NO 具有细胞保护效应^[6,14]。结合本实验结果笔者认为, 严重烧伤后心肌组织中 NO 浓度增高, 在参与机体炎性反应的同时可能属于一种适应性保护机制, 具有心肌保护效应。

在另一组实验中, 笔者观察到严重烫伤大鼠心脏舒缩功能均明显下降, 加用氨基胍后, 抑制更为明显, 表明氨基胍对 NO 的抑制不利于烧伤后心功能的维持与稳定。阻碍 NO 生成对心脏收缩能力的抑制, 这一影响明显强于对其舒张功能的影响, 其机制不详。给予 L-精氨酸后, 烧伤大鼠心功能有所改善, 提示烧伤后早期心肌组织 NO 的形成有利于心功能的维持。NO 对心肌的保护作用可能通过以下途径实现: (1) NO 对心脏血管具有扩张作用, 可增加缺血心肌的血液供应; (2) NO 对缺血再灌注损伤心肌的早期及延迟性保护效应; (3) 参与调控缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 的表达并进一步调节其下游靶基因。NO 对 HIF-1 α 的影响因 NO 浓度的不同差异较大。有学者认为, 调节 NO 浓度可影响 HIF-1 α 的表达或脯氨酸羟化酶的活性, 进而调节其下游靶基因的表达^[14-16]。同时, 由于 NO 具有活跃的性质, 若生成过多, 可导致 ONOO⁻ 过度生成及形成大量的酸性产物, 从而加重对体内蛋白质和核酸的破坏, 并可引起脂质过氧化反应, 这可能是 NO 大量生成时引起细胞损害的重要原因之一。NO 对烧伤后心功能影响的确切机制目前尚不完全清楚, 有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 黄跃生. 烧伤后早期心肌损害的分子机制及防治研究进展. 中华烧伤杂志, 2004, 20(5): 257-259.
- [2] 盛志勇. 严重烧伤后多器官功能衰竭综合症的防治. 创伤外科杂志, 2001, 3(1): 1-3.
- [3] 林雯, 金润铭, 肖燕, 等. 白细胞介素-18 与一氧化氮在急性淋巴细胞白血病的发生与复发中的意义. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(3): 158-159.
- [4] Huang YS, Yang ZC, Yan BG, et al. Improvement of early postburn cardiac function by use of Panax notoginseng and immediate total eschar excision in one operation. Burns, 1999, 25(1): 35-41.
- [5] 杨建民, 杨宗城, 陈发明, 等. 大鼠烧伤早期心肌营养性血流的变化与心肌损伤的关系. 中国微循环, 1998, 2(3): 142-143, 147.
- [6] Farghali H, Canova N, Gaier N, et al. Inhibition of endothelium-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors. Int Immunopharmacol, 2002, 2(1): 117-127.
- [7] 张家平, 黄跃生, 杨宗城. 烧伤早期心肌组织几种炎症相关基因表达变化的实验研究. 中国危重病急救医学, 2003, 15(10): 589-592.
- [8] Brady AJB, Warren JB, Poole-Wilson PA, et al. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. Am J Physiol, 1993, 265

(1):176-188.

[9] Su J, Tse J, Weiss HR. Alterations in ventricular myocyte contraction caused by C-type natriuretic peptide and nitric oxide in eNOS -/- mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39(6):920-928.

[10] 李文静, 王宪. 心血管细胞保护分子机制研究的新进展. *北京大学学报(医学版)*, 2001, 33(4):307-311.

[11] Nadtochiy SM, Burwell LS, Brookes PS. Cardioprotection and mitochondrial S-nitrosation: effects of S-nitroso-2-mercaptopyrionyl glycine (SNO-MPG) in cardiac ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(4):812-825.

[12] 张铭, 黄跃生, 张琼. 不同浓度 NO 对缺氧心肌细胞损害的影响. *第三军医大学学报*, 2007, 29(11):1017-1019.

[13] 陈玺华, 李正中, 鲍民生. 一氧化氮对大鼠肝脏缺血再灌注后肝细胞超微结构的影响. *山西医科大学学报*, 1997, 28(4):245-247.

[14] Sandau KB, Faus HG, Brune B. Induction of hypoxia-inducible factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278(11):263-267.

[15] Hagen T, Taylor CT, Lam F, et al. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF-1 alpha. *Science*, 2003, 302(5652):1975-1978.

[16] Mateo J, Garcia-Lecea M, Cadenas S, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J*, 2003, 376(Pt 2):537-544.

(收稿日期:2007-02-26)
(本文编辑:莫愚)

· 经验交流 ·

曲马朵与氟哌利多联合用于烧伤患者术后镇痛 42 例

杨仁刚 张伟 余刚 王德运 谢卫国

1 临床资料

住院患者 42 例, 其中男 26 例、女 16 例, 年龄 (36 ± 8) 岁。烧伤总面积 10% ~ 60% TBSA, 深 II ~ III 度。经常规治疗后患者病情稳定, 于伤后 3 ~ 7 d 行深度创面切削植皮术。

2 镇痛方法

在患者手术后麻醉清醒时将盐酸曲马朵 0.25 mg · kg⁻¹ · h⁻¹、氟哌利多 1.67 μg · kg⁻¹ · h⁻¹ 加入 100 ml 等渗盐水中, 放入自动控制泵, 按 2 ml/h 速度静脉持续滴入。采用视觉模拟疼痛测量 (VAS) 法^[1] 对镇痛前及镇痛后即刻、0.5、2.0、8.0、24.0 h 进行疼痛评分。 < 3 分为镇痛良好 (0 分为无痛), 3 ~ 4 分为基本满意, ≥ 5 分为镇痛差 (10 分为剧痛)。秩和检验分析镇痛效果。将睡眠质量用 0 ~ 4 分法进行评分: 完全不能入睡者为 0 分, 睡眠严重受干扰者 1 分, 明显受干扰者 2 分, 轻度受干扰者 3 分, 睡眠正常者 4 分。同时观察患者术后不良反应。

3 结果

42 例患者镇痛前 VAS 评分为 (8.5 ± 1.2) 分。镇痛 24.0 h 后 VAS 评分为 (2.3 ± 1.1) 分者 40 例 (P < 0.05); 镇痛差 2 例, 评分分别为 7、8 分。睡眠质量 0 分 1 例、1 分 1 例、2 分 3 例、3 分 23 例、4 分 14 例。不良反应情况: 恶心、呕吐各 1 例, 便秘 2 例, 嗜睡 4 例, 呼吸抑制 1 例。

4 讨论

烧伤患者术后常伴有难以忍受的疼痛, 采用反复的肌内

注射或口服镇痛药常难以达到持续稳定的镇痛效果, 目前已有较多术后采用自动控制泵静脉持续输注镇痛药物的报道, 此方法具有自控性强、不适感少、镇痛时间长、使用方便、效果满意等特点^[2]。氟哌利多具有较强的镇静及镇吐作用, 可解除谵妄等精神症状, 并能对抗曲马朵带来的恶心、呕吐等不良反应, 曲马朵与氟哌利多联合用于烧伤患者术后镇痛, 效果可靠、不良反应小, 对于烧伤患者术后清醒状态有疼痛症状者、有胃肠道反应及功能障碍者、全身麻醉术后禁食者均可应用。本组 42 例患者使用后, 疼痛、睡眠质量、精神状态得到了改善。因镇痛、镇静药物对呼吸、血压有影响, 严重者会引起呼吸、心搏骤停, 故对用自动控制泵持续镇痛的患者, 应严密观察生命体征的变化; 对重症患者安置心电图监护仪, 监测血氧饱和度、血压等, 充分给氧, 保持呼吸道通畅。同时应注意, 用自动控制泵持续镇痛, 均以固定的速度 (2 ml/h) 持续给药, 有可能给药不足或过量, 应实行每日唤醒制度, 观察患者的意识、呼吸等情况, 必要时暂停或关闭镇痛泵, 以减少并发症的发生。应用镇痛药物后可引起恶心、呕吐、便秘等, 应鼓励患者多进食粗纤维食物, 便秘严重者可用通便药物, 恶心、呕吐者给予镇吐药物。

参考文献

[1] Hveem K, Jones KL, Chatterton BE, et al. Scintigraphic measurement of gastric emptying and ultrasonographic assessment of antral area: relation to appetite. *Gut*, 1996, 38(6):816-821.

[2] 郭祚国, 韦世阳, 周连银, 等. 脑损伤患者躁动的原因及镇静镇痛研究. *中华创伤杂志*, 2005, 10(21):757-760.

(收稿日期:2006-12-06)
(本文编辑:张红)

作者单位: 430060 武汉市第三医院烧伤科