

一氧化氮和内皮素-1 在内毒素休克后家兔血流动力学变化中的作用

陈玮, 刘良明* (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要: 目的 了解一氧化氮(NO)和内皮素-1(ET-1)在内毒素休克后血流动力学变化中的作用。方法 将 24 只家兔随机分为 3 组,依次为脂多糖(LPS)对照组,氨基胍(AG, 诱生型一氧化氮合酶特异性抑制剂, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)+LPS 组和 PD-142893(ET-1 受体非选择性拮抗剂, $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)+LPS 组。测定 LPS 对照组给 LPS 前及给 LPS 后 0.5, 1, 2, 4, 6 h 各时刻的血流动力学指标及血浆 NO 和 ET-1 浓度, AG+LPS 组和 PD-142893+LPS 组分别于 LPS 静注后 1 h 给予 AG 和 PD-142893, 测定给 LPS 前及给 LPS 后 1, 2, 4, 6 h 各时刻的血流动力学指标。结果 家兔 LPS($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)静注后, 平均动脉压(MAP)在静注 LPS 后 0.5 h 就迅速下降 30.31%($P<0.05$), 达到休克水平, 继而保持平缓的下降趋势, 至给 LPS 后 6 h 时降幅达 40.61%($P<0.05$); 左室最大收缩压(LVSP)、左室内压最大上升/下降速率($\pm dp/dt \text{ max}$)等指标先迅速下降然后一定的回升继而平稳下降, 而左室舒张末压(LVEDP)无明显变化($P>0.05$)。内毒素休克家兔血浆 NO 水平呈双峰变化, 在给 LPS 后 0.5 h 和 6 h 分别升高 72.50%和 95.83%($P<0.05$), ET-1 水平在晚期明显升高, 在给 LPS 后 6 h 升高 68.74%($P<0.05$)。AG 或 PD-142893 静注后各血流动力学指标均有明显改善。结论 NO 和 ET-1 的生成可能参与了内毒素休克后血流动力学的变化, 通过抑制它们的作用后血流动力学有明显改善。

关键词: 内毒素休克; 血流动力学; 一氧化氮; 内皮素-1

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)11-0867-04

The Roles of Nitric Oxide and Endothelin-1 in the Changes of Hemodynamics following Endotoxic Shock in Rabbits

CHEN Wei, LIU Liangming* (*State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the roles of nitric oxide(NO) and endothelin-1(ET-1) on the changes of hemodynamics following endotoxic shock in rabbits. **METHODS** 24 rabbits were divided into 3 groups: LPS control group, aminoguanidine (AG, specific inhibitor of inducible nitric oxide synthase, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) +LPS group, PD-142893 (nonselective inhibitor of ET-1 receptors, $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + LPS group. Hemodynamic parameters and serum concentration of NO and ET-1 were monitored at baseline and 0.5, 1, 2, 4, 6 h after LPS injection in LPS control group. AG and PD-142893 were administrated at 1 h after LPS injection in AG+LPS group and PD-142893+LPS group. The hemodynamic parameters were monitored at baseline and 1, 2, 4, 6 h after LPS injection. **RESULTS** After LPS($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) injection, mean artery pressure (MAP) was decreased quickly and decreased 30.31% (achieved shock) at 0.5 h after LPS injection($P<0.05$), then decreased steadily and decreased 40.61% at 6 h after LPS injection($P<0.05$); maximum left ventricle systolic pressure (LVSP), maximum increase and decrease rate of left intraventricular pressure ($\pm dp/dt \text{ max}$), were also decreased quickly at the early stage after LPS injection and had a transient increase a little later, then kept on decreasing smoothly; while left ventricle end-diastolic pressure (LVEDP) had no significant changes($P>0.05$). After LPS injection, NO serum concentration presented double hump change, increased 72.50% and 95.83% respectively at 0.5 h and 6 h after LPS injection($P<0.05$); ET-1 was increased significantly in the late stage and increased 68.74% at 6 h after LPS injection($P<0.05$). Both AG and PD-142893 administration significantly improved hemodynamic parameters. **CONCLUSIONS** The production of NO and ET-1 may participate in the changes of hemodynamics following endotoxic shock. Inhibition of NO and ET-1 could significantly improve hemodynamic parameters.

KEY WORDS: endotoxic shock; hemodynamics; nitric oxide; endothelin-1

内毒素休克是严重创伤失血休克和临床危重病常见并发症之一, 且死亡率较高。全身炎症反应综合征和持续性低血压是内毒素休克的主要病理生理特征。研究发现, 内毒素休克后一氧化氮

基金项目: 国家重大基础研究项目(973)(2005CB522601)

作者简介: 陈玮, 男, 硕士生 Tel: (023)68757420

E-mail: chenwei403@sohu.com

*通信作者: 刘良明, 男, 博士, 研究员

Tel: (023)68757421 E-mail: liuliangming2002@yahoo.com

(NO)和内皮素-1(ET-1)等血管活性因子表达大量增加,参与了内毒素休克后血管收缩舒张功能的调节^[1-2]。本实验室前期研究发现,NO和ET-1参与了内毒素休克血管低反应性的发生,使用诱生型一氧化氮合酶(iNOS)特异性拮抗剂氨基胍(AG)和ET-1受体非选择性拮抗剂PD-142893能够部分改善血管低反应性^[3],进一步证实了NO和ET-1在内毒素休克后血管舒缩障碍中的作用。但是关于内毒素休克后血浆NO和ET-1浓度的变化规律尚不统一^[4-5],且AG和PD-142893是否能通过改善休克后血管低反应性来改善内毒素休克动物的血流动力学指标,目前尚不清楚。为了阐明这一问题,本实验采用家兔脂多糖(LPS)静注内毒素休克模型,系统的研究了给LPS后各时相点血流动力学指标和NO、ET-1水平的变化,及AG和PD-142893对内毒素休克后血流动力学指标的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

脂多糖(LPS, E.coli O₁₁₁B₄, 美国Sigma公司), 氨基胍(AG)、PD-142893(美国Sigma公司), 压力传感器、八道生理记录仪(澳大利亚ADInstruments公司), 一氧化氮试剂盒(南京建成生物工程研究所), 兔内皮素放免药盒(解放军总院放免所)。

1.2 动物模型及分组

普通级家兔[第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心, 生产许可证号: SCXK(军)2007-017], 24只, ♀♂兼用, 体重2.5~2.8 kg, 所有家兔均于实验前12 h禁食, 可自由饮水。所有家兔随机分为3组, 分别为LPS对照组, AG+LPS组和PD-142893+LPS组, 每组8只。内毒素休克模型通过经耳缘静脉注射LPS 1.0 mg·kg⁻¹复制, 平均动脉压(MAP)降至基础水平的70%以下可界定为内毒素休克^[6]。

1.3 在体血流动力学监测

利用八道生理记录仪测定家兔的平均动脉压(MAP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室最大收缩压(LVSP)、左室内压最大上升/下降速率($\pm dp/dt \max$)等血流动力学指标的方法参见文献^[6]。

LPS对照组: 监测给LPS前及给LPS后0.5, 1, 2, 4, 6 h时的血流动力学指标, 并于上述各时刻经股动脉取血用于NO、ET-1测定。AG+LPS组和PD-142893+LPS组分别于给LPS后1 h静注

AG(20 mg·kg⁻¹)和PD-142893(0.02 mg·kg⁻¹)^[3], 监测给LPS前及给LPS后1, 2, 4, 6 h时的血流动力学指标。

1.4 血浆NO和ET-1浓度测定

血浆NO(NO₂⁻/NO₃⁻)浓度测定: 股动脉取血置于肝素抗凝EP管, 4℃、3000 r·min⁻¹离心10 min分离血浆, 将血浆4℃、14 000 r·min⁻¹离心25 min, 取上清液用硝酸还原法测定NO₂⁻, 严格按照试剂盒说明书操作, 多孔酶标仪检测, 制作标准曲线并检测样品, 计算血清NO₂⁻/NO₃⁻浓度。

血浆ET-1浓度测定: 股动脉取血2 mL, 注入含10% EDTA二钠30 μL和抑酶肽40 μL的EP管中, 混匀, 4℃、3 000 r·min⁻¹离心10 min分离血浆, -20℃保存。测定前置冷水中复融, 再次4℃、3 000 r·min⁻¹离心5 min, 取上清100 μL置于EP管中, 采用放射免疫法测定。

1.5 统计学处理方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 11.0软件进行统计学处理, 组间各时相点比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内毒素休克家兔血流动力学的变化规律

如表1所示, 家兔LPS(1 mg·kg⁻¹)静注后, MAP在给LPS后0.5 h就迅速下降30.31%($P < 0.05$), 达到休克水平, 继而保持平缓的下降趋势, 至给LPS后6 h时降幅达40.61%($P < 0.05$)。家兔LVSP、+dp/dt max和|dp/dt max|在给LPS后0.5 h分别显著下降26.48%、32.78%和31.06%($P < 0.05$), 在给LPS后1 h时降幅回升至24.22%、29.29%和28.05%($P < 0.05$), 随后平稳下降, 至给LPS后6 h时降幅分别达33.79%、50.53%和42.86%($P < 0.05$)。LVEDP在LPS静注后没有明显变化($P > 0.05$)。

2.2 内毒素休克家兔血浆NO和ET-1水平变化

内毒素休克家兔血浆NO水平呈双峰变化, 给LPS后0.5 h迅速明显升高至基础值的1.72倍($P < 0.05$), 随后在给LPS后1 h时回落至基础值的1.20倍($P < 0.05$), 随后迅速上升, 至给LPS后6 h时升至基础值的1.96倍($P < 0.05$), 见图1。

家兔血浆ET-1水平在给LPS后逐渐升高, 在给LPS后2 h时显著升高至基础值的1.39倍($P < 0.05$), 随后继续升高, 在给LPS后4 h、6 h达平台期, ET-1血浆水平分别为基础值的1.66倍和1.69倍($P < 0.05$), 见图2。

表1 内毒素休克后家兔各血流动力学指标变化

Tab 1 Changes of hemodynamic parameters following endotoxic shock in rabbits

血流动力学指标	时刻点					
	baseline	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
MAP/mmHg	104.83±4.42	73.06±19.45 ¹⁾	69.17±9.42 ¹⁾	65.43±7.78 ¹⁾	64.89±5.03 ¹⁾	62.26±6.02 ¹⁾
LVEDP/mmHg	0.26±2.14	0.18±2.72	-0.37±2.84	-1.24±3.18	-0.13±3.06	0.11±2.47
LVSP/mmHg	150.36±12.22	110.54±29.94 ¹⁾	113.94±18.65 ¹⁾	114.71±9.09 ¹⁾	106.74±7.29 ¹⁾	99.56±10.21 ¹⁾
+dp/dt max/mmHg·s ⁻¹	7 176.63±505.56	4 824.13±1967.63 ¹⁾	5 074.38±1513.22 ¹⁾	4 620.38±690.38 ¹⁾	4 219.75±452.75 ¹⁾	3 550.38±936.88 ¹⁾
-dp/dt max/mmHg·s ⁻¹	-4 784.75±582.06	-3 298.38±1051.4 ¹⁾	-3 442.63±1072.4 ¹⁾	-3 376.00±469.75 ¹⁾	-3 033.13±419.38 ¹⁾	-2 734.13±634.66 ¹⁾

注: Baseline、0.5、1、2、4、6 h分别代表给LPS前、给LPS后0.5、1、2、4、6 h, 与baseline比较, ¹⁾P<0.05

Note: Baseline, 0.5, 1, 2, 4, 6 h represent before LPS injection, 0.5, 1, 2, 4, 6 h after LPS injection. ¹⁾P<0.05 as compared with Baseline.

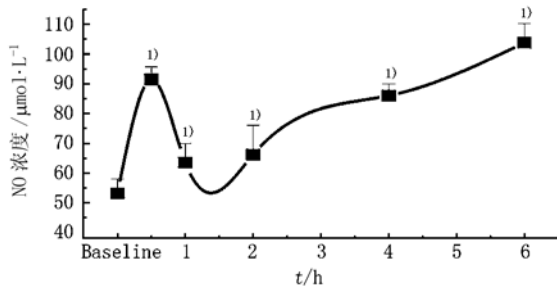


图1 内毒素休克后NO血浆水平变化

注: 与baseline比较, ¹⁾P<0.05

Fig 1 Change of serum concentration of NO in rabbits following endotoxic shock

Note: Compared with baseline, ¹⁾P<0.05

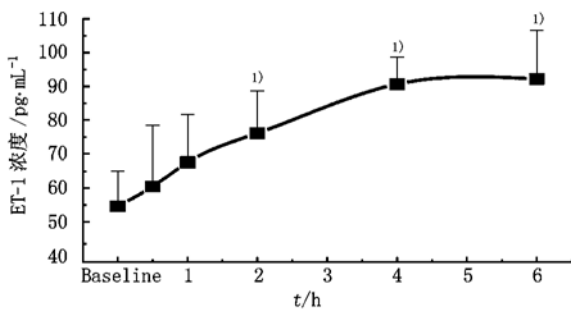


图2 内毒素休克后ET-1血浆水平变化

注: 与baseline比较, ¹⁾P<0.05

Fig 2 Change of serum concentration of ET-1 in rabbits following endotoxic shock

Note: Compared with baseline, ¹⁾P<0.05

2.3 AG对内毒素休克后血流动力学的影响

家兔MAP在LPS静注后迅速下降, 在给LPS后1 h时降幅为30.2%, 达到休克水平。此时静注AG能够拮抗LPS诱导的MAP下降, 使MAP迅速上升, 在给AG后1 h MAP降幅显著减少为16.6%, 随后有缓慢轻度下降, 于给AG后3 h、5 h 降幅分别为17.1%, 19.6%, MAP水平均显著高于LPS对照组($P<0.05$)。LVSP、 $\pm dp/dt \max$ 等指标有类似变化, 见图3。

2.4 PD-142893对内毒素休克后血流动力学的影响

给LPS后家兔MAP迅速下降, 给LPS后1 h后降幅为33.4%, 达到休克水平。给予PD-142893能够阻止LPS诱导的MAP下降, 使MAP逐渐上升, 至给

PD-142893后5 h时降幅显著减少为24.7% ($P<0.05$)。LVSP、 $\pm dp/dt \max$ 等指标与MAP有类似变化, 见图3。

3 讨论

本试验采用LPS静注复制家兔内毒素休克模型, 发现LPS静注后MAP、LVSP和 $\pm dp/dt \max$ 等血流动力学指标均明显降低。进一步研究发现, NO血浆水平在给LPS后迅速升高, 随后有所回落, 在晚期又进行性明显升高, 这与龙海波等^[5]的研究结果基本一致。NO的早晚期升高可能分别参与了内毒素休克后早晚期血流动力学指标的降低。目前认为, NO的早期升高主要是由于LPS刺激血管内皮细胞释放储备NO或内皮型一氧化氮合酶(eNOS)激活所致, 而晚期NO的进行性升高主要是iNOS的大量生成和激活所致^[7-8]。ET-1血浆水平在LPS静注后晚期明显升高, 与ET-1在内皮细胞中没有常规储备的观点相符。但亦有研究发现内毒素休克后ET-1的血浆水平在早期即明显升高到达峰值水平, 随后逐步回落^[4], 目前尚不能较好的解释其原因。ET-1的晚期升高可能参与了内毒素休克晚期血流动力学的降低。

有研究发现, 内毒素休克后晚期存在血管低反应性, 且利用AG抑制iNOS和使用PD-142893拮抗ET-1受体后均能明显改善血管低反应性^[9-10]。Scicluna JK等在离体实验中发现LPS可致离体血管对肾上腺素能激动剂的反应性降低, 通过抑制NO和ET-1的作用后血管反应性得到明显改善^[11]。但亦有研究发现利用L-canavanine特异性抑制iNOS后进一步加重了内毒素休克狗血浆ET-1水平的升高, 导致组织血流灌注不足和缺血^[12]。本试验室前期研究发现, AG和PD-142893能够部分改善内毒素休克大鼠的血管低反应性^[3], 但它们是否能改善相关血流动力学指标, 目前尚不清楚。本试验研究发现, 静注AG后各血流动力学指标迅速升高, 随后其作

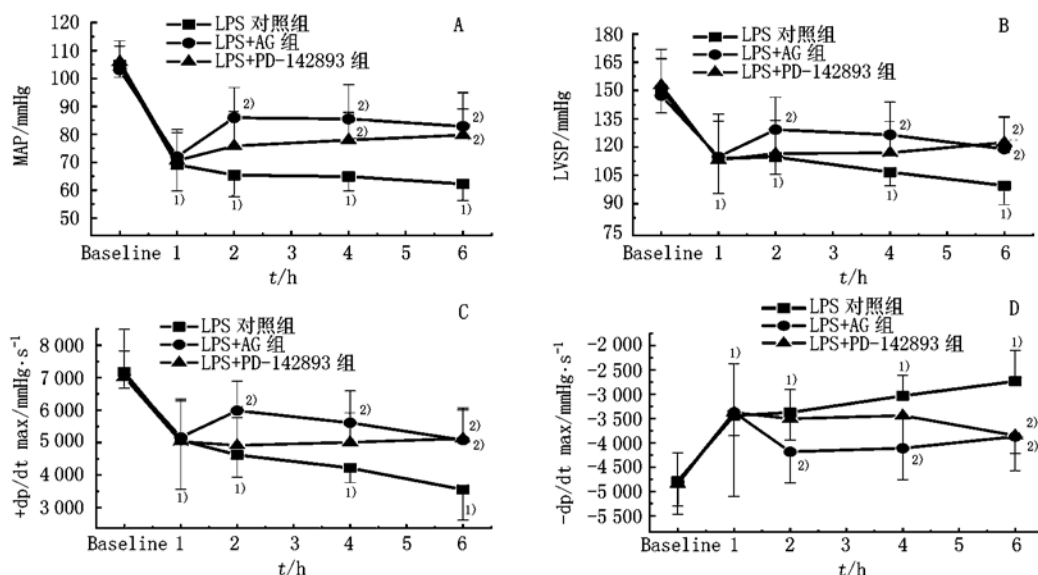


图3 AG和PD-142893对内毒素休克家兔血流动力学的影响

注: 图A、B、C、D分别代表AG和PD-142893对内毒素休克后MAP、LVSP、+dp/dt max和-dp/dt max的影响; Baseline, 1, 2, 4, 6 h分别代表给LPS前、给LPS后1, 2, 4, 6 h; 与Baseline比较, ¹⁾P<0.05; 与LPS对照组比较, ²⁾P<0.05

Fig 3 Effects of AG and PD-142893 on hemodynamic parameters following endotoxic shock in rabbits

Note: A, B, C and D represent effects of AG and PD-142893 on MAP, LVSP, +dp/dt max and -dp/dt max respectively following endotoxic shock in rabbits. Baseline, 1, 2, 4, 6 h represent before LPS injection, 1, 2, 4, 6 h after LPS injection. ¹⁾P<0.05 as compared with Baseline; ²⁾P<0.05 as compared with LPS control group

用有所减弱,这可能与AG的作用时间有关。静注PD-142893后各血流动力学指标逐渐升高,在晚期效果比较明显,而血浆ET-1水平也是呈逐渐升高且在晚期呈较高水平,这进一步验证了ET-1主要参与了晚期血流动力学指标的下降。上述研究提示NO和ET-1在内毒素休克后血流动力学的变化中具有重要作用,AG和PD-142893可能具有抗内毒素休克的临床应用前景。

REFERENCES

- MEZIANI F, KREMER H, TESSE A, et al. Human serum albumin improves arterial dysfunction during early resuscitation in mouse endotoxic model via reduced oxidative and nitrosative stresses [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(6): 1753-1761.
- PIECHOTA M, BANACH M, IRZMANSKI R, et al. Plasma endothelin-1 levels in septic patients [J]. *J Intensive Care Med*, 2007, 22(4): 232-239.
- CHEN W, LIU L M. The roles of iNOS and ET-1 on the changes of vascular reactivity following endotoxic shock in the rabbit [J]. *J Trau Surg(创伤外科杂志)*, 2009, 11(4):348-353.
- WANG S, HAO G, SHEN X, et al. Dynamic study of nitric oxide and endothelin-1 during endotoxin shock and effects of their antagonists on hemodynamics [J]. *Chin Med J (Engl Ed)(中华医学杂志 英文版)*, 1998, 111(3):242-247.
- LONG H B, ZHANG X, HOU F F. Dynamic changes in plasma nitric oxide and endothelin 1 levels in rabbits after endotoxic shock [J]. *Chin Crit Care Med(中国危重病急救医学)*, 1998, 10(10): 614-617.
- CHEN W, LI T, YANG G M, et al. The changes of vascular hyporeactivity following endotoxic shock in rabbits and its relation with hemodynamic changes [J]. *Chongqing Med(重庆医学)*, 2007, 36(22): 2254-2256.
- LIU S F, BARNES P J, EVANS T W. Time course and cellular localization of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat in vivo [J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(3):512-518.
- PAYA D, MAUPOIL V, SCHOTT C, et al. Temporal relationships between levels of circulating NO derivatives, vascular NO production and hyporeactivity to noradrenaline induced by endotoxin in rats [J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 30(6):952-959.
- PIEPOT H A, GROENEVELD A B, VAN LAMBALGEN A A, et al. The role of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated hyporeactivity to vasoconstrictors differs among isolated rat arteries [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2002, 102(3):297-305.
- LIU L M, DUBICK M A. Hemorrhagic shock-induced vascular hyporeactivity in the rat: relationship to gene expression of nitric oxide synthase, endothelin-1, and select cytokines in corresponding organs [J]. *J Surg Res*, 2005, 125(2):128-136.
- SCICLUNA J K, MANSART A, ROSS J J, et al. Reduced vascular response to phenylephrine during exposure to lipopolysaccharide *in vitro* involves nitric oxide and endothelin I [J]. *Shock*, 2008, 29(3):417-421.
- MITAKA C, HIRATA Y, YOKOYAMA K, et al. L-canavanine, a selective inhibitor of inducible NO synthase, increases plasma endothelin-1 concentrations in dogs with endotoxic shock [J]. *J Crit Care*, 2001, 16(1):17-23.

收稿日期: 2009-05-20