

[文章编号] 1000-2200(2004)01-0005-04

一氧化氮预防腹膜粘连的实验研究

刘付宝, 刘生光, 何长林, 刘瑞林

[摘要] 目的: 探讨一氧化氮(NO) 在小鼠实验性腹膜创伤后腹膜粘连形成过程中的作用。方法: 昆明小鼠 80 只, 预实验组 8 只小鼠采用改良 Mazuji 方法制作实验性手术创伤模型, 检验该方法致腹膜粘连之效果。实验组 72 只小鼠随机分为 I、II、III 组, 按上述方法制作实验性手术创伤, 分别于关腹前、术后连续 3 天腹腔内注入生理盐水液(I)、L-精氨酸生理盐水液(II) 和 NG-硝基精氨酸甲酯生理盐水液(III)。术后 3(a)、7(b)、14(c) 天各组分别随机取 8 只小鼠自眼球后采血测定血清 NO 值; 采用 Nair 分级标准记录粘连得分和切取粘连肠管组织测定羟脯氨酸(OHP) 值两项指标来评价粘连严重程度。结果: 预实验组: 术后 2 周处死小鼠, 粘连发生率 100%, 均为中、重度粘连(3~4 级), 平均粘连得分 3.50 ± 0.53 。实验组(1) 粘连严重程度: 术后第 3 天各亚组间粘连得分及组织 OHP 值很低且几乎相等 ($P > 0.05$), 第 7、14 天 I、III 组明显高于 II 组 ($P < 0.01$); a 亚组平均粘连得分及 OHP 值最低, c 亚组最高, b 亚组其次 ($P < 0.01$)。且在 b、c 亚组平均粘连得分与 OHP 值有明显相关性 ($P < 0.01$)。(2) 血清 NO 值: II 组明显高于 I、III 组 ($P < 0.01$), 且 I、III 组之间差异无显著性 ($P > 0.05$); 组间比较 a、b、c 亚组 NO 值差异均无显著性 ($P > 0.05$)。结论: 腹腔内注入 L-精氨酸能增加血清中 NO 含量, 并能降低腹膜粘连的发生率, NO 能够抑制腹膜粘连的形成。

[关键词] 一氧化氮; 粘连; 创伤; 腹膜

[中国图书资料分类法分类号] O 613.61; R 572.2 [文献标识码] A

Role of nitric oxide in prevention of postoperative adhesion formation in mice

LIU Fu-bao, LIU Sheng-guang, HE Chang-lin, LIU Rui-lin

(Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of nitric oxide in preventing postoperative adhesions formation in traumatic mice. **Methods:** In the pre-experimental group eight kunming mice were created cecal abrasion and parietal peritoneal defect with vefined Mazuji methods as experimental models and the effect of adhesion formation was observed. In the experimental group, seventy-two mice were divided into control group (I), L-arginine group (II) and NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME, III) group. 0.9% NaCl (I), L-arginine (II) and L-NAME (III) were administered intraperitoneally before abdominal closure and 3 consecutive days after surgery. All the three groups were divided into three subgroups for evaluation of adhesion severity and serum nitric oxide(NO) levels at postoperative days 3, 7 and 14. Adhesion severity was measured with adhesion grading (Nairs' s standard) and tissue hydroxyproline(OHP) levels. **Results:** In the pre-experimental group, the adhesion rate was 100% in the eight mice two weeks after operation. All adhesions were middle or severe adhesion(3 to 4 grade) and the mean score was 3.50 ± 0.53 . In the experimental group, (1) the adhesion mean score and OHP levels were minimal and almost equal between the three groups at day 3 (subgroup A) ($P > 0.05$), while the adhesion mean score and OHP levels were higher in group I and III than in group II at day 7 (subgroup B) and 14 (subgroup C) ($P < 0.01$). The adhesion mean score and OHP levels were the highest in subgroup A, the lowest in subgroup C and the medium in subgroup B ($P < 0.01$). Logistic regression analysis showed significant correlation between adhesion score and tissue OHP levels in subgroup B and C respectively ($r_b = 0.95$, $r_c = 0.93$, $P < 0.01$). (2) NO level was higher in group II than in group I and group III at day 3, 7 and 14 respectively ($P < 0.01$) and there was no difference between group I and group III ($P > 0.05$). There was no difference between subgroup A, B and C ($P > 0.05$). **Conclusions:** The intraperitoneal administration of L-arginine results in significantly higher serum nitric oxide levels and inhibits postoperative adhesion formation.

[收稿日期] 2003-06-13

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 普外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 刘付宝(1968—), 男, 安徽望江县人, 硕士, 主治医师, 讲师。

[Key words] nitric oxide; adhesion; trauma; peritoneum

腹膜粘连是腹部手术后常见的并发症,是临床上的一大难题,国外报道发生率达 80%^[1],国内报道达 60.2%^[2]。腹膜粘连是由创伤、感染引起,与修复和炎症过程相似。一氧化氮(NO)是一种重要的抗粘附分子,具有增强巨噬细胞的功能,增加纤维蛋白溶解酶原激活物的活性,促进纤维蛋白的溶解,且在炎症反应中起着重要作用。本实验通过手术创伤制作小鼠腹膜粘连模型,术毕及术后 1~3 天腹腔内注射生理盐水、NO 合成前体左旋精氨酸(L-Arg)及一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 NG-硝基精氨酸甲酯(L-NAME),于术后 3、7、14 天观察腹膜粘连形成情况,测定血清 NO 值的变化,初步探讨 NO 在腹膜粘连形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 L-NAME 购自 Sigma 公司;L-Arg、NO 测定试剂盒、羟脯氨酸(OHP)测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、胰蛋白酶等均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法 昆明小鼠 80 只,雌雄兼用,体重 30 ± 5 g。先分为粘连模型组和实验组。(1)粘连模型组:随机取 8 只小鼠按改良 Mazujil^[3] 方法制作实验性手术创伤模型,2 周后观察腹膜粘连情况,检验该方法致腹膜粘连之效果。(2)实验组:72 只小鼠随机分为三组,每组 24 只,按上述方法制作实验性手术创伤,关腹前及术后 1、2、3 天腹腔内注入 300 mg/kg 的 0.9% 生理盐水液(I 组)、100 mg/kg L-Arg 的 0.3% 左旋精氨酸生理盐水液(II 组),5 mg/kg L-NAME 的 0.15% L-精氨酸甲酯生理盐水液(III 组)^[4]。

1.3 模型制备及实验过程 各手术组昆明小鼠术前 1 天禁食,12 h 禁水。采用硫喷妥钠(25 mg/kg)腹腔内注入麻醉。麻醉后以 2% 碘酒及 75% 乙醇消毒手术区皮肤并铺巾,在下腹正中作 2 cm 切口入腹,确认回盲部后,用两块干纱布将其轻轻提起,在盲肠外侧面用干纱布反复摩擦 20 次至肠壁见出血点,中线右侧的壁层腹膜用止血钳多处反复钳夹、搔刮 20 次,其它组织尽可能减少损伤,如遇壁层腹膜损伤出血,3-0 可吸收缝线缝扎止血,腹壁切口用 0 号可吸收缝线缝合关腹。各实验组在关腹前及术后第 1、2、3 天分别腹腔内注入相应药物一次,术后 6 h 给予标准饲料及饮水。

1.4 监测指标 (1)粘连模型组:2 周后,采用颈椎

脱臼法处死动物,剑突下横切口进腹,由一名未参与手术者根据 Nair^[5] 分级标准(见表 1)记录腹膜粘连得分(以下的粘连评分均由同一人按同一标准进行)。(2)实验组:I、II、III 组随机分为 a、b、c 三个亚组:术后第 3 天(a 亚组:I a, II a, III a)、第 7 天(b 亚组:I b, II b, III b)、术后第 14 天(c 亚组:I c, II c, III c)注入药物后 1 h 自小鼠眼球后取血测血清 NO 值,记录腹膜粘连得分,处死小鼠再切取粘连肠管测定 OHP 值。具体的 NO 测定及 OHP 测定按试剂盒说明书进行。

表 1 Nair 粘连分级标准

| 等级 | 粘连情况 |
|----|------------------------|
| 0 | 完全无粘连 |
| 1 | 内脏之间或内脏与腹壁之间单个粘连索带 |
| 2 | 内脏之间或内脏与腹壁之间 2 个粘连索带 |
| 3 | 超过 2 个以上粘连索带或肠管间形成粘连团块 |
| 4 | 内脏直接粘连于腹壁而不考虑粘连的数目和程度 |

1.5 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 粘连模型 8 只昆明小鼠盲肠和右侧腹壁创伤后,2 周动物存活良好,无一例小鼠死亡,处死后记录腹膜粘连得分(0 级计 0 分,1 级计 1 分,2 级计 2 分,3 级计 3 分,4 级计 4 分),平均粘连得分为 3.5 ± 0.53 ,中、重度粘连发生率 100%(3~4 级)。

2.2 实验组 72 只昆明小鼠经过上述同一标准的手术损伤后,III 组(L-NAME)中 1 只小鼠于术后第 11 天死亡,其余 71 只术后均存活。单盲法观察粘连得分及粘连程度(见表 2)。粘连肠管组织 OHP 值见表 3。血清 NO 值见表 4。Nair 粘连分级与粘连组织 OHP 值相关性:b 亚组与 c 亚组中粘连分级与粘连组织 OHP 均有明显的相关性($r_b = 0.95$, $P < 0.01$; $r_c = 0.93$, $P < 0.01$)。

3 讨论

术后腹膜粘连是小肠梗阻的常见原因。粘连物的前体是一种纤维素凝胶的基质,这种基质是由于形成不溶性的纤维素聚合物,并与纤维连接素及一组氨基相互作用而产生的^[5]。粘连形成实质上是一个炎症反应过程,任何造成腹膜损伤的因素都可促进间皮细胞释放纤维蛋白原,局部渗出的纤维蛋白原转变成纤维蛋白,同时损伤也降低了纤溶酶的

活性及组织氧化再生作用,纤维蛋白的肽键不能断裂、液化溶解,大量纤维蛋白沉积形成网状结构,继之成纤维细胞不断侵入和增殖,最终形成永久性的纤维结缔组织。

表 2 各实验组 3、7、14 天小鼠平均粘连评分

| 分组 | a | | b | | c | | F | P | MS _{组内} |
|------------------|---|-----------------|---|-------------------------|---|--------------------------------------|-------|-------|------------------|
| | n | $\bar{x} \pm s$ | n | $\bar{x} \pm s$ | n | $\bar{x} \pm s$ | | | |
| I | 8 | 0.25±0.46 | 8 | 2.75±0.71 ^{△△} | 8 | 3.38±0.74 ^{△△} | 52.07 | <0.01 | 0.421 |
| II | 8 | 0.13±0.35 | 8 | 0.50±0.53 | 8 | 1.50±0.53 ^{△△} | 17.62 | <0.01 | 0.228 |
| III | 8 | 0.38±0.52 | 8 | 2.63±0.74 ^{△△} | 7 | 3.43±0.54 ^{△△} [#] | 51.23 | <0.01 | 0.374 |
| F | | 0.62 | | 23.41 | | 25.05 | | — | — |
| P | | >0.05 | | <0.01 | | <0.01 | | — | — |
| MS _{组内} | | 0.202 | | 0.444 | | 0.378 | | — | — |

q 检验:与 II 组比较 * * $P < 0.01$; 与同组 a 比较 $\Delta \Delta P < 0.01$; 与同组 b 比较 # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$

表 3 实验组 3、7、14 天粘连肠管组织中 OHP 值比较($\mu\text{g}/\text{mg}$)

| 分组 | a | | b | | c | | F | P | MS _{组内} |
|------------------|---|-----------------|---|-------------------------|---|--------------------------------------|--------|-------|------------------|
| | n | $\bar{x} \pm s$ | n | $\bar{x} \pm s$ | n | $\bar{x} \pm s$ | | | |
| I | 8 | 0.48±0.02 | 8 | 0.75±0.05 ^{△△} | 8 | 0.79±0.03 ^{△△} [#] | 179.58 | <0.01 | 0.001 |
| II | 8 | 0.46±0.03 | 8 | 0.47±0.03 | 8 | 0.54±0.06 ^{△△} | 8.44 | <0.01 | 0.002 |
| III | 8 | 0.47±0.02 | 8 | 0.71±0.08 ^{△△} | 7 | 0.82±0.06 ^{△△} [#] | 70.52 | <0.01 | 0.004 |
| F | | 1.41 | | 56.16 | | 69.11 | | — | — |
| P | | >0.05 | | <0.01 | | <0.01 | | — | — |
| MS _{组内} | | 0.01 | | 0.003 | | 0.003 | | — | — |

q 检验:与 II 组比较 * * $P < 0.01$; 与同组 a 比较 $\Delta \Delta P < 0.01$; 与同组 b 比较 # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$

表 4 各实验组小鼠血清 NO 值比较($\mu\text{mol}/\text{L}$)

| 分组 | a | | b | | c | | F | P | MS _{组内} |
|------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|------|-------|------------------|
| | n | $\bar{x} \pm s$ | n | $\bar{x} \pm s$ | n | $\bar{x} \pm s$ | | | |
| I | 8 | 16.45±5.95 ^{**} | 8 | 15.75±3.05 ^{**} | 8 | 15.49±2.32 ^{**} | 0.12 | >0.05 | 16.096 |
| II | 8 | 30.86±3.56 | 8 | 29.72±2.16 | 8 | 28.66±2.04 | 1.35 | >0.05 | 7.167 |
| III | 8 | 15.30±3.06 ^{**} | 8 | 14.84±3.26 ^{**} | 7 | 14.32±2.94 ^{**} | 0.19 | >0.05 | 9.590 |
| F | | 31.41 | | 67.88 | | 83.14 | | — | — |
| P | | <0.01 | | <0.01 | | <0.01 | | — | — |
| MS _{组内} | | 19.147 | | 8.1986 | | 5.933 | | — | — |

q 检验:与 II 组比较 * * $P < 0.01$

动物腹腔粘连模型的制作方法较多,如 Elkins 采用盲肠干纱布擦伤,95%乙醇刺激;Yozgoul 采用回肠干纱布擦伤出血至淤斑并阻断动脉血流 1 min 来制作粘连模型;这些模型仅造成腹膜的单面浆膜面损伤。众所周知,两个损伤浆膜面的并列是粘连形成的关键,因此我们采用改良的 Mazuji 方法来制作小鼠腹壁损伤和盲肠擦伤模型。此法所制作的腹

腔粘连模型,粘连发生率达 100%,且均为中、重度粘连(3~4 级),平均粘连分数 3.5 ± 0.53 。粘连形成过程早已被 Miligan 和 Rafter 所描述,粘连起始于纤维蛋白网形成,接着在 3~5 天内即有胶原形成,2 周达到高峰。羟脯氨酸(OHP)在胶原蛋白中占 13.4%,在弹性蛋白中仅占少量,不存在于其它蛋白中,组织中 OHP 含量能反映胶原代谢情况。Cronin 等^[6] 研究报道标记的 OHP 在伤口愈合过程中很快出现并迅速增加,因此,测定 OHP 能作为反映粘连严重程度的可靠指标,它是一个比宏观粘连分级更敏感、更客观的指标。

本研究显示,术后第 3 天所有动物的粘连平均得分及粘连形成等级都非常轻微,粘连组织中 OHP 浓度较低且几乎相等($P > 0.05$),表明术后第 3 天来评价粘连程度为时过早;术后第 7 天平均粘连得分,II b 较 I b 及 III b 明显要低($P < 0.01$);测得的 OHP 值, I b、III b 组均明显高于 II b($P < 0.01$),说明应用 L-Arg 或许能减少术后组织中 OHP 值;术后第 14 天平均粘连得分,粘连组织中 OHP 值, II c 均低于 I c、III c($P < 0.01$),进一步证明 L-Arg 能减少术后粘连形成。

从上面结果可以看出,反映粘连程度的 Nair 分级和测定粘连肠管组织中 OHP 的结果是一致的。理论上对于同一只小鼠,反映粘连严重程度的 2 个指标应该是一致的,是正相关的。为此,我们加做了两者之间的相关性,由于第 3 天判断 Nair 分级和检测 OHP 值均无意义,我们仅对第 7 天和第 14 天粘连得分与 OHP 水平进行直线相关分析,结果表明两者均呈正相关($P < 0.01$),证明本实验所用的宏观判断粘连程度指标的有效性,且这一结论与文献报道一致^[7]。在术后第 7 天和第 14 天反映粘连严重程度的 2 个指标在 L-Arg 组比生理盐水组和 L-NAME 组低且有显著性差异($P < 0.01$),而生理盐水组和 L-NAME 组间粘连程度和 OHP 浓度无差异($P > 0.05$),表明本实验术后腹腔注入 L-Arg 能明显减少腹膜粘连形成。

L-Arg 在 NOS 作用下与 O_2 结合生成左旋胍氨酸(L-Cit)及 NO, L-Arg 是 NO 的生理前体, L-Arg 类似物[如 NG-nitro-L-Arg(L-NAA), NG-L-NAME 等]与 L-Arg 发生竞争性抑制作用,而使 NO 合成减少。同组间比较,3、7、14 天 NO 值差异均无显著性($P > 0.05$);各组间比较, II 组 NO 值最高,其次 I 组, III 组最低($P < 0.01$),但 I 组、III 组之间无明显

差异性 ($P > 0.05$), 表明术后腹腔注入 L-Arg 能明显增加 NO 合成量; L-NAME 组 NO 值较生理盐水组 NO 值稍低, 但没有明显差异, 或许正是由于本实验中腹腔注入 L-NAME 不能有效抑制 NO 的产生, 故其与生理盐水组相比在粘连形成方面无明显差异。实验中腹腔注入 L-Arg 能明显减少腹膜粘连形成, 与 Kaleli 等^[8] 研究应用 L-Arg 腹腔注入能预防大鼠子宫角和腹壁损伤后的粘连形成结果是一致的。本实验中给药方式是在术毕和术后连续 3 天各一次, 术后连续 3 天给药是由 Falk 等^[7] 建议并被认为在预防粘连方面更加有效。

NO 是一种重要的抗粘附分子, 又是一种旁分泌物质, 具有激素样作用, 可作为一种细胞内信使物质, NO 通过可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC), 使三磷酸鸟苷 (GTP) 转变成环一磷酸鸟苷 (cGMP), NO 的大多数功能依赖于 cGMP 的信号传导机制, NO 抑制血小板聚集, 减少其与血管内皮间的粘附, 抑制急性炎症早期中性粒细胞聚集和粘附, 降低内皮细胞通透性和抑制炎性渗出, Kubes 等在活体实验中观察到 NOS 抑制剂 L-NAME 可使微血管内液体和蛋白质外流增加 5 倍, 1996 年 Kubes 又报道外源性 NO 能够影响肥大细胞的活性而抑制粒细胞聚集和降低内皮细胞的通透性, 应用 NO 前体正是依赖于稳定肥大细胞防止其脱颗粒而抑制炎症反应; Lieberman 报道应用肥大细胞稳定剂二甘氨酸二钠 (DSCG) 能减少粘连形成。纤溶酶活性在纤维蛋白溶解方面占有重要作用, 而手术损伤抑制纤溶酶活性, 纤维蛋白溶解障碍是粘连形成过程中重要的环节, 而 NO 能够增强纤维蛋白溶解酶原激活物的活性^[9], 并有报道

NO 在防止肠管、心肌、肺脏和肾脏等脏器缺血性损伤方面发挥有益作用, L-Arg 能明显增强巨噬细胞的功能, 其机理可能是减少腹腔巨噬细胞的释放, 减少促炎因子 IL-6 水平和增加组织血供。L-Arg 在预防腹膜粘连形成方面是一种有希望的药物, 但其确切疗效、毒副作用、作用机制尚待进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Celebioglu B, Eslambouli NR, Olcay E, *et al.* The effect of tenoxicam on intraperitoneal adhesions and prostaglandin E2 levels in mice [J]. *Anesth Analg*, 1999, 88(4): 939 ~ 942.
- [2] 杨伟明, 褚先秋, 王恩海, 等. 甲硝唑或右旋糖酐腹腔灌注对术后粘连影响的实验研究 [J]. 中国普通外科杂志, 1994, 3(3): 159 ~ 160.
- [3] Mazuji MK, Kalambheti K, Pawar B. Prevention of adhesions with polyvinylpyrrolidone [J]. *Arch Surg*, 1964, 89: 1 011 ~ 1 015.
- [4] Ozden A, Bostanci B, Sarioglu A, *et al.* Effect of nitric oxide on postoperative adhesion formation [J]. *Eur Surg Res*, 1999, 31(6): 465 ~ 470.
- [5] Nair SK, Bhat IK, Aurora AL. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions [J]. *Arch Surg*, 1974, 108(6): 849 ~ 853.
- [6] Cronin K, Jackson DS, Dunphy JE. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon [J]. *Surg Gynecol Obstet*, 1968, 126(4): 747 ~ 753.
- [7] Falk K, Holmdahl L, Halvarsson M, *et al.* Polymers that reduce intraperitoneal adhesion formation [J]. *Br J Surg*, 1998, 85(8): 1 153 ~ 1 156.
- [8] Kaleli B, Ozden A, Aybek Z, *et al.* The effect of L-arginine and pentoxifyline on postoperative adhesion formation [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1998, 77(4): 377 ~ 380.
- [9] Nathan C. Nitric oxide as secretory product of mammalian cells [J]. *FASEB J*, 1992, 6(12): 3 051 ~ 3 064.

《蚌埠医学院学报》征订启事

《蚌埠医学院学报》为国内外公开发行的医学综合性学术期刊, 主要刊登实验医学论文和应用医学论文; 是中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊; 中国期刊全文数据库、《中国学术期刊(光盘版)》、《万方数据—数字化期刊群》全文收录期刊。先后获“全国高等医药院校优秀学报二等奖”、“全国高等学校自然科学学报系统优秀学报三等奖”、“安徽省高等院校自然科学学报系统优秀学报二等奖”、“安徽省优秀科技期刊三等奖; 是“安徽省优秀科技期刊”、“安徽省高校优秀学报”。

本学报为双月刊, 逢单月 15 日出版, 国际标准 A4 开本, 96 页, 铜版纸印刷, 标准刊号: ISSN 1000-2200; CN 34-1067/R。2004 年每册定价 8.00 元, 全年 48.00 元。邮发代号 26-37, 欢迎广大读者及时向当地邮局订阅, 也可直接向本刊编辑部订阅, 免收邮寄费。本刊已参加《全国非邮发报刊联合征订》, 欲订阅者也可汇款至天津市大寺泉集北里别墅 17 号, 全国非邮发报刊联合征订服务部(邮编 300385)。

本刊地址: 安徽省蚌埠市治淮路 801 号 邮政编码: 233003 电话: (0552) 3066412-2061

E-mail: bang@chinajournal.net.cn byxb@163.com