

·基础研究·

大鼠烫伤后血浆 NPY 与 DAO 含量变化的研究

邵立健, 朱清仙, 何明

【摘要】 目的: 探讨大鼠烫伤后血浆 NPY 与 DAO 变化及其意义。方法: 分别采用放射免疫分析法、分光光度法测定烫伤后不同时间点血浆 NPY 含量和 DAO 活性。结果: 大鼠烫伤后血浆 NPY 逐步升高, 12 小时组最高, 24 小时组基本恢复正常; 烫伤后血浆 DAO 活性逐步升高, 伤后 12 小时组最高, 但 24 小时组乃明显高于对照组; 烫伤后血浆 NPY 与 DAO 的变化呈正相关。结论: 大鼠烫伤后血浆 NPY 和 DAO 均升高且呈正相关, NPY 升高可能是造成肠缺血缺氧的因素之一。

【关键词】 烫伤; NPY; DAO; 放射免疫分析; 分光光度法

【中图分类号】 R644; R457.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726(2004)01-0001-04

Changes in plasma neuropeptide Y and diamine oxidase levels in rats post scald SHAO Li-jian, ZHU Qing-xian, HE Ming Jiangxi Medical College, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China

【Abstract】Objective: To explore the changes in plasma neuropeptide Y (NPY) and diamine oxidase (DAO) levels in rats post scald and their significance. **Method:** Plasma NPY and DAO levels in rats at different times post scald were determined using radioimmunoassay and spectrophotometric method respectively. **Result:** NPY level in plasma increased gradually post scald and reached the peak at 12 hr. At 24 hr post scald its level returned to normal. DAO activity in plasma increased gradually post scald and reached the peak at 12 hr post scald. At 24 hr post scald its level remained higher than control. The changes in NPY and DAO levels were positively correlated. **Conclusion:** NPY and DAO levels in plasma increased in rats post scald. NPY level increase may be one of the factors causing intestinal ischemia and anoxia.

【Key words】 Scald; neuropeptide Y; diamine oxidase; radioimmunoassay; spectrophotometry

神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 主要分布于中枢神经系统和周围神经系统中, 胃肠道也有 NPY 能神经分布。它具有广泛的生理功能, 作为一种血管收缩物质, 可调节器官血流量^[1,2]。二胺氧化酶 (Diamine oxidase, DAO) 绝大部分存在于小肠粘膜上皮细胞中, 在烧伤、创伤等病理条件下, 肠粘膜受损, 血浆中 DAO 显著增高, 是反映小肠粘膜功能较为理想的指标^[3]。严重烫伤后, 全身血流重新分布, 内脏血液灌流不足, 尤其以消化道最为明显, 并引起肠粘膜损伤, 肠道细菌、内毒素移位, 形成肠源性感染。有学者证明, 一氧化氮 (NO)、血管活性肠多肽 (VIP) 等舒血管物质和

内皮素 (ET) 等缩血管物质有关^[4,5]。本文通过观察严重烫伤早期血浆 NPY 和 DAO 的浓度变化, 以期反映肠缺血与肠粘膜损伤的关系。

一、材料与方法

1. 动物分组及模型制作

健康成年 wistar 大鼠 40 只, 雌雄不拘, 体重 225 ± 25 克, 随机分成正常对照组、烫伤 3 小时组、烫伤 6 小时组、烫伤 12 小时组、烫伤 24 小时组, 每组 8 只。对照组大鼠背部脱毛不烫伤; 烫伤组动物用 2% 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 麻醉后, 用烫伤仪 (由江西医学院一附院烧伤中心研制) 造成

30% TBSA III 度烫伤 (病理切片证实)。烫伤温度 106℃, 压力 0.03MPa, 时间为 9 秒。烫伤后立即以 40ml/kg 复方乳酸林格氏液腹腔注射行抗休克治疗, 分别于伤后 3、6、12、24 小时采血测定 NPY 与 DAO。

2. 观察指标与方法

(1) NPY 测定: 采用北京解放军总医院东亚免疫研究所提供的试剂盒。取全血 2.0ml, 注入含 10% EDTA-Na₂ 30μl 和抑肽酶 40μl 的试管中, 4℃ 2500g 离心 10 分钟, 分离血浆, -20℃ 保存, 标本收齐后统一检测。测定采用非平衡法, 具体操作按说明书进行, 用 SN-697 全自动双探头放射免疫计数器计数。

(2) 血浆 DAO 测定: 取全血 2.0ml, 注入含 10% EDTA-Na₂ 30μl 的试管中, 4℃ 2500g 离心 10 分钟, 分离血浆, -20℃ 保存, 标本收齐后按 Wollin 等^[6]介绍的方法进行检测。向 0.5ml 血浆中依次加入 3.0ml 0.2M 磷酸缓冲液 (pH7.2)、0.1ml (4μg) 辣根过氧化酶溶液、0.1ml (500μg) 0-二茴香胺、0.1ml (175μg) 二盐酸尸胺, 37℃ 水浴中孵育 30 分钟, 在 436nm 波长下测 OD 值, 从以二胺氧化酶为标准制作的曲线上查出 DAO 的量。

3. 统计学处理

所测得的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 spss10.0 for windows 统计软件包将各烫伤组与正常对照组资料进行 *t* 检验, 血浆 NPY 和 DAO 之间的关系采用相关分析。P<0.05 为有统计意义。

二、结果

1. NPY 水平: 大鼠烫伤后各时间点 NPY 含量均高于正常值, 3 小时组、6 小时组、12 小时组均显著升高 (P<0.05), 12 小时组最高, 24 小时组基本恢复至正常 (P>0.05) (见表 1)。

表 1 大鼠烫伤后血浆 NPY 水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N (只)	NPY (ng/ml)	P
正常对照组	8	16.813 ± 4.493	
伤后 3 小时组	8	27.064 ± 2.684	<0.05
伤后 6 小时组	8	27.366 ± 2.194	<0.05
伤后 12 小时组	8	33.705 ± 1.991	<0.05
伤后 24 小时组	8	18.712 ± 2.074	>0.05

P 值: 与正常对照组比较

2. 血浆 DAO 活性: 大鼠烫伤后各时间点血浆 DAO 水平明显升高, 其中以 12 小时组升高最为明显, 24 小时组乃高于正常, 与正常对照组相比, 各组均有显著性差异 (P<0.05) (见表 2)。

表 2 大鼠烫伤后血浆 DAO 水平的变化

组别	N (只)	DAO (u/ml)	P
正常对照组	8	0.474 ± 0.016	
伤后 3 小时组	8	0.556 ± 0.012	<0.05
伤后 6 小时组	8	0.554 ± 0.007	<0.05
伤后 12 小时组	8	0.687 ± 0.014	<0.05
伤后 24 小时组	8	0.537 ± 0.007	<0.05

P 值: 与正常对照组比较

3. 血浆 DAO 及与 NPY 含量变化的分析: 经统计学相关分析, 血浆 DAO 与血浆 NPY 变化呈高度正相关 (r=0.8969, P<0.05)。

三、讨论

肠源性感染是严重烧伤后发生全身感染、超高代谢及多器官功能衰竭的潜在因素, 而肠粘膜屏障功能损害是导致肠源性感染的原因之一。严重烧伤早期即可发生肠道血管收缩, 肠粘膜血流量下降^[7], 引起肠道严重缺血缺氧性损伤, 导致肠粘膜屏障功能降低。而肠血流调控机制与神经递质、脑肠肽、胃肠激素及血管活性物质等多种因素有关。

二胺氧化酶 (DAO) 存在于小肠粘膜的细胞内, 是反映小肠粘膜结构和功能较为理想的指标, 但在除胎盘以外的其它组织中此酶的活性很低^[8]。故可认为 DAO 活性变化能较准确地反映肠粘膜的结构和功能状态。有学者^[9]用光镜观察到烧伤后 6 小时肠粘膜固有层水肿, 绒毛顶端上皮出现囊状间隙, 伤后 12 小时上述损伤更为严重, 出现上皮细胞变性、坏死、脱落和固有层裸露等病理变化。这与我们测得烫伤后 DAO 的变化规律一致, 结果表明烫伤后血浆 DAO 活性升高, 伤后 3 小时开始明显升高, 以伤后 12 小时最为显著, 这与闫柏刚等人^[10]的研究结果相似。据此认为, 由于烫伤导致肠粘膜上皮细胞损伤, 细胞内 DAO 释放入血, 引起血浆 DAO 活性升高。伤后 12 小时肠粘膜上皮细胞损伤最严重, 释放入血的 DAO 也最高。因此, 可通过测定烫伤后血中 DAO 活性的变化推测肠粘膜的损伤程度, 同时还可判断治疗后肠粘膜的

恢复状况。

NPY 是 1982 年由 Tatemoto^[11]首先从猪脑中分离出来一种含有 36 个氨基酸残基的多肽。NPY 作用复杂,有研究表明其在中枢可以抑制呼吸,调节血压,在外周器官可以引起平滑肌收缩,参与对心血管、胃肠道等器官的功能调节^[12]。NPY 作为一种缩血管活性肽,Han 等人^[13]应用游离的肠血管研究 NPY 与肠血管收缩的关系,结果表明刺激交感神经所引起的血管收缩 30% 是由 NPY 介导的,这种收缩作用可被 NPY Y1 受体拮抗剂所阻断,应用放射免疫法测得在刺激频率为 16Hz 时 NPY 含量最高,此时血管也发生强烈收缩,这表明 NPY 对肠血流的调节发挥重要作用。彭曦等人^[7]用激光多普勒血流仪测定了烧伤后不同时间肠粘膜血流量,证实烧伤后 3 小时、6 小时、12 小时和 24 小时肠粘膜血流量均低于正常,以伤后 12 小时粘膜血流量降低最为明显。我们的结果表明,大鼠烫伤后 3 小时血浆 NPY 已明显升高,12 小时达高峰,到 24 小时基本恢复正常,这种变化趋势与前者测得烧伤后肠粘膜缺血性变化一致。可以推测烫伤作为一种应激,交感神经兴奋,引起 NPY 释放,血浆 NPY 升高,肠血管收缩,血流量下降,肠粘膜屏障功能障碍,造成烫伤后肠道缺血缺氧性损伤。

NPY 在中枢和外周神经系统均广泛存在,NPY 在外周神经系统常与儿茶酚胺共同存在,在支配血管的神经中存在大量的 NPY^[14]。刺激交感神经,不仅可以引起儿茶酚胺释放,也可引起 NPY 的分泌,所以认为 NPY 是交感神经去甲肾上腺素(NE)的辅助递质。烫伤后不仅 NPY 释放,同时 NPY 可增强 NE 对血管的收缩效应,导致肠血流量进一步减少,促成肠道细菌、内毒素移位。Inoue^[15]认为,烧伤后血浆内皮素(ET)明显升高,ET 是体内最强和最持久的血管收缩物质。而彭曦等人^[16]观察到烧伤后血管舒张物质 NO、VIP 升高,结合本实验观察结果,烫伤后血浆 NPY 升高,表明烫伤等应激因素可引起血浆中的收缩成分与舒张成分失衡,造成微循环障碍。

通过相关性分析表明,大鼠烫伤后血浆 NPY 的变化与血浆中 DAO 活性的变化呈正相关,且二

者均在伤后 12 小时同步达到最高值,提示严重烫伤后血浆 NPY 处于较高的水平,导致肠粘膜发生缺血缺氧,肠粘膜上皮细胞受到损伤,血浆 DAO 活性明显升高;伤后 24 小时虽然 NPY 基本恢复正常,但肠粘膜需要一定的修复时间,故乃高于正常组。NPY 与 DAO 的关系反映了肠缺血与肠粘膜损伤的关系。因此严重烫伤后,测定血浆 NPY、DAO 的变化,对于研究烫伤后肠源性感染的机制具有重要参考价值。

参考文献

- [1] Spangeus A, Suhr O, El-Salhy M. Diabetic state affects the innervation of gut in an animal model of human type 1 diabetes [J]. *Histol Histopathol.* 2000, 15 (3): 739-44.
- [2] 林雪群, 邵立健, 程上穆, 等. 大鼠椎动脉基底动脉系脑血管神经肽 Y 能神经与星状神经节的关系 [J]. *神经解剖学杂志*, 2001, 17 (3): 257-60.
- [3] Bragg LE, Thompson JS, West WW. Intestinal diamine oxidase levels reflect ischemic injury [J]. *J Surg Res.* 1991, 50 (3): 228-33.
- [4] 彭曦, 冯晋斌, 汪仕良, 等. 早期肠道喂养对烧伤大鼠肠道一氧化氮合酶的影响 [J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1998, 14 (1): 37-40.
- [5] 高建川, 吴雄飞, 杨宗城, 等. 内皮素和一氧化氮在烧伤后肝脏血流调节中的作用 [J]. *中国危重病急救医学*, 1999, 11 (6): 342-44.
- [6] Hosoda N, Nishi M, Nakagawa M, et al. Structural and functional alterations in the gut of parenterally or enterally fed rats [J]. *J Surg Res.* 1989, 47 (2): 129-33.
- [7] 彭曦, 汪仕良, 冯晋斌, 等. 早期肠道营养改善烧伤后大鼠肠血液灌流的实验研究 [J]. *中华外科杂志*, 1999, 37 (8): 507-9.
- [8] Wollin A, Navert H, Bounous G, et al. Effect of intestinal ischemia on diamine oxidase activity in rat intestinal tissue and blood [J]. *Gastroenterology.* 1981, 80: 349.
- [9] 余佩武, 肖光夏, 府伟灵, 等. 血小板活化因子在烧伤后肠粘膜屏障损害中的作用 [J]. *中华外科杂志*, 1995, 33 (7): 393-95.
- [10] 闫柏刚, 杨棕城, 黄跃生, 等. 延迟快速复苏烧伤犬血浆二胺氧化酶的变化 [J]. *世界华人消化杂志*, 2000, 8 (2): 178-80.

- [11] Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide [J]. Proc Natl Acad Sci. U S A. 1982, 79 (18): 5485-9.
- [12] Ekelund KM, Ekblad E. Structural, neuronal, and functional adaptive changes in atrophic rat ileum [J]. Gut. 1999, 45 (2): 236-45.
- [13] Han SP, Yang CL, Chen X, et al. Direct evidence for the role of neuropeptide Y in sympathetic nerve stimulation-induced vasoconstriction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1998, 274 (1): H290-4.
- [14] Mundinger TO, Taborsky GJ Jr. Differential action of hepatic sympathetic neuropeptides: metabolic action of galanin, vascular action of NPY [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002, 278 (3): E390-7.
- [15] Inoue H, Imokawa H, Yamanaka M, et al. Detection of endothelin 1, 2 and endothelin-like immunoreactant in wound surface and plasma in mice with thermal injury [J]. Life Sci. 1993, 52 (25): PL291-6.
- [16] 彭曦, 冯晋斌, 颜洪, 等. 早期肠道营养改善烧伤大鼠胃组织血液灌流的实验研究 [J]. 重庆医学, 2001, 30 (6): 517-19.

【作者简介】

邵立健 (1974—), 男 (汉族), 江西都昌人, 2001 年江西医学院研究生毕业, 在读博士生, 讲师。

朱清仙 (1955—), 男 (汉族), 南昌人, 1977 年江西医学院毕业, 教授。

何明 (1956—), 男 (汉族), 南昌人, 1977 年江西医学院毕业, 教授。

(收稿日期: 2003-10-21; 修回日期: 2003-12-20)

烧伤后瘢痕内缺氧环境的变化

李高峰, 罗成群, 刘浔阳, 贺全勇, 李萍, 徐阳成

【摘要】 目的: 探讨瘢痕形成和成熟过程中组织内的缺氧状况及其影响因素。方法: 采用免疫组化法检测烧伤后肉芽组织、不同时期瘢痕和正常皮肤中缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 和分化群 (CD34) 的表达, 采用权重方法分别对各组表皮和真皮的 HIF-1 α 表达结果进行量化, 并根据 CD34 染色结果进行血管计数。结果: 随瘢痕时间的增长, HIF-1 α 表达强度逐渐减弱, 血管计数逐渐减少, 真皮细胞密度逐渐降低。结论: 瘢痕中高细胞密度和高细胞活性是形成瘢痕内缺氧环境的重要原因, 缺氧环境的改善, 可促进瘢痕成熟, HIF-1 α 在瘢痕内缺氧环境的改善过程中可能发挥重要作用。

【关键词】 HIF-1 α ; CD34; 缺氧; 烧伤; 瘢痕

【中图分类号】 R644; R619.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726 (2004) 01-0004-05

Changes of hypoxic environment in burn scars Li Gao-feng, LUO cheng-qun, LIU Xun-yang, et al. The 3rd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410013, China

【Abstract】Objective: To explore the hypoxic status of the tissue in the course of scar formation and the influencing factors. **Method:** The expressions of HIF-1 α and CD34 in burn wound granulation, burn scar of different phases and normal skin were detected by immunohistochemical method. The expressions of HIF-1 α in epidermis and dermis were quantified by weight method and microvessel count was done on the basis of the expression of CD34. **Result:** As the course of scar formation and maturation developed, the expression of HIF-1 α weakened, the count of microvessels and the density of dermis cells decreased gradually. **Conclusion:** High density and high activity of cells are important factors of the formation of hypoxic environment in scar. Amelioration of hypoxia may