DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.016
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0889-03

论著

吡那地尔对改善烫伤大鼠早期肠粘膜线粒体呼吸功能的作用及机制

林 海[1],彭念寅[2],周 红[1] (第三军医大学:[1]基础医学部药理学教研室,[2]西南医院老年病科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨吡那地尔(Pinacidil, Pin)对严重烫伤早期大鼠肠道损害的保护作用及其机制。方法 健康成年SD大鼠24只,随机分为正常对照组、单纯烫伤组、烫伤后Pin处理组。单纯烫伤组和烫伤后Pin处理组大鼠造成30%TBSA III度烫伤,伤后立即经腹腔补液,烫伤后Pin处理组同时经腹腔注射Pin(2 mg/kg)。单纯烫伤组和烫伤后Pin处理组动物于伤后6 h取血并活杀取回肠,测定肠粘膜线粒体呼吸功能、血浆ROS、MDA、SOD含量变化。结果 烫伤后Pin处理组肠线粒体呼吸控制率(RCR)和III态呼吸速率(ST3)明显高于单纯烫伤组,IV态呼吸速率明显低于单纯烫伤组,与正常对照组无显著差异(ST4);但ROS、MDA水平显著低于单纯烫伤组、SOD水平显著高于单纯烫伤组。结论 Pin可明显改善严重烫伤大鼠早期肠粘膜线粒体呼吸功能。

关键词:烧伤;吡那地尔;肠粘膜;线粒体
中图法分类号:R322.45;R644.05;R972.4 文献标识码:A

Protective effect and mechanism of pinacidil on mitochondrial respiratory function in intestinal mucosa of scalded rats

LIN Hai[1], PENG Nian-yin[2], ZHOU Hong[1] ([1]Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Military Medical University; [2]Department of Gerontology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of pinacidil on the intestinal mucosa of scalded rats and the mechanism. Methods A total of 24 healthy SD rats were randomly divided into normal control group, burn group, and pinacidil-treated group. Rats in burn group and pinacidil-treated group were inflicted with 30% TBSA III degree burn and resuscitated intraperitoneally with Ringer's solution immediately after burn. Pinacidil was injected intraperitoneally into rats in pinacidil-treated group at the dose of 2 mg/kg. Mitochondrial respiratory function intestinal mucosa and levels of reactive oxygen species (ROS), maleic dialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in plasma were determined at 6 h after burn. Results Mitochondrial respiratory function control rate (RCR), ST3, and SOD levels in pinacidil-treated group were evidently higher than those in the burn group. However, ST4, MDA, and ROS levels in pinacidil-treated group were significantly lower than those in the burn group, but ST4 was not significantly different from that in the normal control. Conclusion Pinacidil can attenuate the damage of intestinal mucosa in scalded rats.

Key words: burn; pinacidil; intestine; mitochondrion

严重烧创伤各器官脏器损伤中,肠道是最敏感的器官之一。肠道在严重创伤中因缺血、缺氧发生最早、恢复最晚甚至在复苏后亦存在。严重烧伤后肠道粘膜屏障功能受到损伤、免疫功能受抑制、肠道菌群紊乱,肠道中内毒素和细菌通过受损的肠粘膜屏障进入体循环,形成肠源性感染,可导致多种炎症介质的过度释放,进一步造成多脏器功能的损伤[1,2]。因此,如何减轻严重烧伤后早期肠粘膜的损伤,保护肠粘膜屏障功能具有重要意义。

早期的研究显示[3],肠粘膜上皮细胞线粒体膜稳定性下降与烧伤后早期肠粘膜的损伤密切相关,而ATP敏感性钾通道开放剂吡那地尔(pinacidil, Pin)可能通过增加细胞膜稳定性、线粒体膜稳定性发挥减轻肠粘膜损伤的作用,因此本研究通过观察Pin对烧伤后肠道上皮细胞线粒体的保护作用,为Pin在严重烧创伤后应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

吡那地尔(Sigma公司),琥珀酸钠(Sigma公司),ADP(Sigma

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202)
作者简介:林 海(1975-),男,贵州省都匀市人,硕士,助教,主要从事烧伤早期肠粘膜损害防治方面研究。电话:(023)68752265;E-mail:linhai106@hotmail.com
通信作者:周 红,电话:(023)68752266
收稿日期:2004-03-02;修回日期:2004-04-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

公司), ROS、MDA、SOD 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), 溶氧测定仪(北京明华公司), 紫外分光光度计(日本岛津)。

1.2 方法

1.2.1 动物致伤模型与分组 健康成年 SD 大鼠 24 只(第三军医大学外研所实验动物中心提供), 雌雄不拘, 体质量(200±20)g, 领回后大鼠用颗粒饲料正常喂养 3 d, 随机分为正常对照组(Control)、烫伤组(Burn)、烫伤 Pin 处理组(Pinacidil), 每组 8 只。伤前禁食 12 h, 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉, 大鼠背部电推脱毛后, 单纯烫伤组和烫伤后 Pin 处理组置脱毛区 92 ℃ 水浴 18 s, 造成 30%TBSA Ⅲ度烫伤, 正常对照组置脱毛区 37 ℃水浴 18 s。伤后各组经腹腔注射给予乳酸林格液(每 1% 烧伤面积补液量 2 mg/kg), 烫伤 Pin 处理组同时腹腔注射 Pin(2 mg/kg), 正常对照组不进行药物干预。各组动物均于 6 h 后抽血并活杀取回肠(距回盲部 5 cm)。

1.2.2 线粒体分离 参照文献[4]方法并改进。剖腹距回盲部取 30 cm 回肠, 用 30 ml 冰 0.01 mol/L PBS 冲洗肠内容物, 翻转, 暴露肠粘膜, 刮取肠上皮细胞, 置于冰冷的 0.01 mol/L PBS、10 mmol/L EDTA 中, 轻吹分散, 稀释到 50 ml, 3 500 r/min 2.5 min, 弃上清, 沉淀用分离介质(25 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L Tris, 2 mmol/L EGTA, pH 7.4)3 500 r/min 离心 2.5 min 洗涤两次, 放入带冰渣的分离介质中匀浆。稀释到 50 ml 1 700 r/min 离心 10 min 收集上清, 上清液 10 500 r/min 离心 8 min, 弃上清, 沉淀于 0.25 mol/L 蔗糖中悬浮, 10 000 r/min 离心 8 min, 沉淀即为线粒体, 将线粒体悬浮于分离介质中, Follin 酚法定蛋白, 使蛋白浓度为 6 mg/ml, 以上操作温度均为 4 ℃。

1.2.3 线粒体呼吸功能测定 Clark 电极测线粒体呼吸功能, 反应介质: 25 mmol/L 蔗糖, 75 mmol/L 甘露醇, 100 mmol/L KCl, 10 mmol/L K_2HPO_4, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EGTA, 0.1% BSA, pH 7.5, 反应体积 2.9 ml, 测定温度 25 ℃, 以琥珀酸钠为底物, 反应 1 min 后, 加入 ADP, 溶氧测定仪上记录线粒体的氧化还原反应曲线, 测定线粒体呼吸功能并计算呼吸控制率(respiratory control rate, RCR)和Ⅲ态呼吸速率(State 3 respiration, ST3)、Ⅳ态呼吸速率(State 4 respiration, ST4)。

1.2.4 血浆 ROS、MDA、SOD 含量测定 参照南京建成生物工程研究所提供检测试剂盒进行检测。

1.3 统计学处理

各项数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件进行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 Pin 对烫伤后小肠粘膜细胞线粒体呼吸功能的影响

烫伤组线粒体 RCR、ST3 显著低于对照组, Pin 处理组线粒体 RCR、ST3 较烫伤组分别升高 37.2%、21.3%, 但仍低于对照组; 烧伤组 ST4 明显高于正常对照组($P<0.05$), Pin 处理组 ST4 显著低于烫伤组, 但与正常对照组无明显差异($P>0.05$), 见表 1。

2.2 Pin 对烫伤后血浆 MDA 及 SOD 含量的影响

烫伤组血浆 MDA 含量显著高于正常对照组($P<0.05$), 是对照组的 1.86 倍, Pin 处理组虽仍高于对照组, 但较烫伤组有显著降低($P<0.05$); 烫伤组血浆 SOD 含量较正常对照组有显著降低, 而处理组虽仍低于对照组, 但比烫伤组有显著性升高(24.3%), ROS 可反应血浆中超氧阴离子的量, 烧伤组 ROS 较正常组有显著性升高, 而 Pin 处理组虽仍高于正常对照组, 但与单纯烧伤组相比较已有明显降低, 比烧伤组降低 12.6%。见表 2。

表 1 吡那地尔对烫伤后肠线粒体呼吸功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 1 Effects of pinacidil on mitochondrial respiratory function in intestinal mucosa of scalded rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	ST_3(nmol·mg^{-1}·min^{-1})	ST_4(nmol·mg^{-1}·min^{-1})	RCR
Control	16.83±0.16	1.59±0.15	4.32±0.50
Burn	4.12±0.32**	1.72±0.79*	2.39±0.23**
Pinacidil	5.00±0.42**#	1.52±0.11#	3.28±0.35**##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* burn

表 2 吡那地尔对烫伤后血浆 MDA、SOD 及 ROS 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 2 Effects of pinacidil on plasma MDA, SOD and ROS contents in scalded rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	MDA(nmol/ml)	SOD(U/ml)	ROS(U/ml)
Control	3.62±0.38	160.04±3.21	1 001.76±89.65
Burns	6.74±0.20**	104.51±3.95**	1 345.97±23.06**
Pinacidil	5.78±1.27*#	129.97±2.68*##	1 176.24±11.46*#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* burn

3 讨论

大量研究表明, 烧伤早期肠道缺血、缺氧引起氧自由基生成增加、线粒体膜脂质过氧化、膜通透性增高、钙超载, 导致肠粘膜屏障损伤、通透性增加, 引起肠源性感染的发生, 但在创伤后给予抗氧化剂和自由基清除剂均可减轻肠粘膜结构和功能的损害。

线粒体是生物能量代谢的重要场所, 为细胞的各种生命活动提供基础能量, 但线粒体同时也是自由基产生的主要来源[5], 线粒体受到损害时会产生大量的自由基; 此外, 线粒体磷脂中含有较大量的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid), 线粒体的这种结构特点决定线粒体极易受到自由基的损伤, 致使线粒体功能受损, 细胞死亡和凋亡的发生。线粒体呼吸分为 5 种状态, 其中Ⅲ、Ⅳ态更有意义。呼吸Ⅲ态为线粒体中加入 ADP 和底物时的快速氧化期, 当 ADP 耗尽时为呼吸Ⅳ态。呼吸Ⅳ态主要反映膜的通透性。Ⅲ、Ⅳ态的比值即为呼吸控制率(RCR), 它的下降表示线粒体氧化磷酸化能量生成偶联松弛。实验结果表明: 单纯致伤 6 h 后 RCR 明显下降, ST3 降低, 且与正常对照有显著性差异, 这主要是由于缺血、缺氧线粒体呼吸链受损, 导致电子无法正常传递给氧; 而 ST4 则有所升高, 表明线粒体自身耗氧增加, 膜的通透性升高, 说明此时小肠粘膜线粒体功能受到严重损害。

Pin 作为一种临床上抗高血压的药物, 主要用于轻中度高血压的治疗, 是一种具有开放钾通道、扩张血管作用的新型降压药[6], 主要作用为开放细胞上的钾离子通道, 通过超极化而改变钾离子的平衡电位; 降低参与膜去极化的其他离子通道的开放活性, 通过降低钙

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

离子的通透性、抑制细胞内钙离子的储存和释放，使细胞内游离钙离子浓度降低，导致起血管平滑肌舒张[7]。近年来研究表明，Pin 对心肌线粒体 ATP 敏感性钾通道（mitochondrial ATP-sensitive potassium channel，mitoKATP）也有开放作用，对心肌缺血、缺氧性损伤具有保护作用。但 Pin 对于肠粘膜缺血、缺氧性损害的保护作用如何，目前少见报道。因此本研究将 Pin 应用于烫伤大鼠，通过测定 SOD 活力、MDA 含量以及 RCR，观察其对伤后大鼠肠粘膜损害的防治效果。本实验结果显示，伤后 6 h MDA 水平明显增高，造成线粒体的脂质过氧化，膜通透性增加，使线粒体内基质和呼吸链成分丢失，而影响整个呼吸链电子传递，造成线粒体结构和功能的损害，这与伤后线粒体呼吸功能损害结果相符。Pin 能显著降低血浆 ROS、MDA，升高血浆 SOD、ST3 和 RCR 升高，ST4 下降至正常水平，说明线粒体膜通透性较单纯烫伤组有所降低，呼吸传递链电子传递增多，呼吸功能得到改善，进一步说明 Pin 可能具有改善肠粘膜线粒体呼吸功能，减轻线粒体缺血、缺氧性损伤的作用，提示 Pin 对烫伤后大鼠肠粘膜具有一定保护作用。

此外，有研究表明 mitoKATP 开放剂的细胞保护作用的另一种可能机制是减少线粒体中自由基的产生[8]，而自由基的大量产生是烧伤后各脏器损害的重要原因之一。我们的实验也证明 Pin 能有效降低血浆中 ROS 的含量，提示 Pin 还可通过直接抑制自由基的产生，发挥对烫伤后大鼠肠粘膜的保护作用。但 Pin 抑制自由基产生的作用机制目前尚不清楚，有待进一步研究。

参考文献：

[1] 邓诗琳，曹丽萍. 烧伤后肠道屏障功能障碍及防治策略[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(4)：201－202.
[2] 盛志勇. 严重烧伤后多器官功能障碍综合征的防治[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(3)：133－136.
[3] 李建明，蔡 黔，周 红，等. 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体的损伤作用[J]. 第三军医大学学报，2002，24(2)：142－145.
[4] Lawrence C B，Davies N T. A novel，simple and rapid method for the isolation of mitochondria which exhibit respiratory control，from rat small intestinal mucosa[J]. Biochem Biophys Acta，1986，848(1)：35－40.
[5] 梁晚益，黄跃生，杨宗城. 二氮嗪对严重烧伤大鼠心肌损害的保护作用及其机制[J]. 第三军医大学学报，2003，25(19)：1731－1733.
[6] 季乃军，王成绕，方宗桥. 新型的降压药：吡那地尔[J]. 浙江医学情报，1990，(5)：11－12.
[7] 徐 敏，姜丽丽，胡小姜，等. 抗高血压新药-吡那地尔[J]. 中国临床医学杂志，2001，10(1)：56－58.
[8] Han J，Kim N，Park J，*et al*. Opening of mitochondrial ATP－sensitive potassium channels evokes oxygen radical generation in rabbit heart slices[J]. J Biochem，2002，131(5)：721－727.

（编辑 栗 嘉）

文章编号：1000-5404(2004)10-0891-01

个案与短篇

膝关节功能障碍的综合康复治疗

Comprehensive rehabilitation for knee joint disorders

牛小军 （达州市中心医院康复理疗科，达州 635000）

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组男 17 例，女 13 例（均来自本科病例），年龄 2～60 岁，病程在术后 1 d 至 1 年。其损伤类型有骨折、软组织损伤、骨质增生、类风湿、制动固定时间过久所致的关节功能障碍。

1.2 功能评估

采用关节活动范围和徒手肌力测定（MMT）法。

1.3 康复评定标准

痊愈：与对侧正常膝关节活动范围相同或相差 5° 以内，肌力恢复至 5 级。显效：与对侧正常膝关节活动范围相关 5°～20° 以内，肌力恢复到 4～5 级。好转：膝关节活动范围增加 20° 以上，肌力恢复 4 级或以上。无效：膝关节活动范围和肌力治疗前后无变化。

1.4 治疗方法

对于骨折外固定和钢板内固定，伤肢近端与远端未被固定的关节，需 1 d 数次向各个方面作全幅度的运动。骨折复位稳定 1～2 d 后，局部疼痛减轻时即开始对固定区域肌肉做共长收缩练习。从轻度开始，无明显疼痛为原则。当骨折涉及关节面时，于固定 1～2 周后，每天取下外固定物，作受累关节的主动运动 6～10 次。此外，可配合红外线、直流电或电脑中频消肿和防止肌萎缩。

因长期制动及固定时间过久，造成关节内外组织的粘连引

（下转 894 页）

作者简介：牛小军（1964－），女，四川省达州市人，主治医师，主要从事创伤病损所致各关节功能障碍的康复。电话：(0818)2955456

收稿日期：2004-01-12；修回日期：2004-03-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net