DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.012

胆原性脓毒症时动脉血酮体比值与肝细胞能量状态的关系

董家鸿 孙文兵 李 昆 段恒春 陈 莉 韩本立 黄志强 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆,630038

提 要 为分析实验性胆原性脓毒症时动脉血酮体比(AKBR)与肝脏能量代谢改变之间的关系,借助兔自身对照性动物模型,对胆原性脓毒症状态下肝脏线粒体呼吸功能、肝组织ATP含量及AKBR进行了动态检测。自术后12 h起,感染肝叶线粒体S_3和RCR呈进行性显著降低。非感染肝叶线粒体RCR呈先升后降的双相改变。感染和非感染肝叶组织内ATP含量与其线粒体呼吸活性同步降低。在术后12 h,尽管非感染肝叶线粒体呼吸活性增强而处于代偿状态,AKBR已伴随感染肝叶RCR降低而显著减低,并随病程延续呈进行性降低。结果表明,AKBR是反映胆原性脓毒症时肝细胞能量代谢状态有早期肝功能失常的灵敏指标。

关键词 呼吸功能;线粒体;肝脏;酮体比值;动脉血;脓毒症;胆原性;兔

中图法分类号 R575

胆原性脓毒症是首先攻击肝脏的特殊类型脓毒症。临床和实验研究资料表明,肝脏功能首先受损对于胆原性脓毒症病程恶性发展并最终导致多器官衰竭具有十分重要的病理意义[1,2]。然而,目前临床上尚缺乏监测胆原性脓毒症时肝脏早期损害的有效指标。近年来发现动脉血酮体比值(arterial ketone body ratio, AKBR)是反映肝脏线粒体功能及细胞内能量水平的敏感指标[3]。本实验目的是通过分析实验性胆原性脓毒症时AKBR水平与肝脏线粒体呼吸活性改变之间的关系,评价AKBR在监测胆原性脓毒症时肝脏早期损害中的价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、琥珀酸钠、β-羟丁酸脱氢酶(EC1.1.1 30)、乙酰乙酸(Ac-Ac)、D,L-1,3-羟丁酸(B-OHB)和氧化型辅酶I(β-NAD^+)均为Sigma化学公司产品,荧光素和荧光素酶由第二军医大学生化教研室提供。

1.2 主要仪器

SP-2溶氧测定仪(中国科学院上海植生所),Clinical System 700型自动生化分析仪(Beckman,美国)。

1.3 动物分组及模型复制

健康日本大耳白兔56只,雌雄各半,体重2.0～3.0 kg,随机分为正常对照组(normal control,NC)、胆道梗阻组(biliary obstruction,BO)和胆原性脓毒症组(biliary sepsis,BS)。BS和BO按[4]复制,右侧叶为非感染肝叶(non-infective lobe,NIL)或非梗阻肝叶(non-obstrutive lobe,NOL),其余肝叶为感染肝叶(infective lobes,IL)或梗阻肝叶(obstructive lobes,OL)。NC动物在禁食后12 h,BS和BO动物分别在术后12、24和48 h,静注戊巴比妥钠麻醉后,剖腹采取腹主动脉血,迅速在左中叶和右侧叶各切取2块肝组织,立时分离线粒体测定其呼吸活性,或即刻置液氮内速冻保存待测ATP含量。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 肝脏线粒体制备和呼吸活性分析 肝脏线粒体按Johnson的差速离心法制备[5]。取新鲜肝组织块5.0 g,在200 mmol/L蔗糖－1 mmol/L EDTA,pH7.5介质中,用手动玻璃Telflon匀浆器制成肝匀浆,离心600 g ×5 min;取上清,离心,8000 g ×10 min,沉淀以不含EDTA的250 mmol/L蔗糖介质洗涤2次,将所得沉淀悬浮于蔗糖介质中制备成蛋白浓度为20 mg/ml的线粒体悬液。整个分离过程保持在0～4℃下进行。线粒体蛋白浓度采用Lowry法进行定量,以结晶牛血清白蛋白作标准。

线粒体呼吸活性用Estabrood氧电极法测定[6]。分离线粒体的耗氧量在容积为2 ml、30℃恒温的反应池内用Clark电极进行测量。反应介质以空气饱和,其成分为:蔗糖225 mmol/L、EDTA 1 mmol/L、$MgCl_2$ 5 mmol/L、KH_2PO_4 15 mmol/L、Tris－HCl 15 mmol/L、pH7.2,加入线粒体悬液50 μl,保温2 min后加入200 mmol/L琥珀酸钠40 μl;间隔1 min后加入90 mmol/L ADP 50 μl。呼吸状态区分为S_3和S_4,S_3(Ⅲ态呼吸速率)为ADP存在时耗氧速率,S_4(Ⅳ态呼吸速率)为ADP耗尽后耗氧速率;计算呼吸控制率(RCR=S_3/S_4)。

1.4.2 肝组织ATP含量 组织ATP含量参照Kimmich方法测定[7]。称取液氮冻存肝组织0.20～0.25 g于预冷试管内,加20倍体积的400 mmol/L $HClO_4$,制成匀浆;3500× g ,4℃离心5 min。取50 μl上清于比色杯内,置于发光光度计暗室内,快速注入0.1 ml荧光素酶混合液,记录发光初始峰值即为样品光强,依标准曲线计算样品中ATP含量。测量环境温度为25℃。

1.4.3 动脉血酮体浓度和酮体比值 取动脉血1 ml,迅速与等体积预冷到4℃的10%$HClO_4$混匀;3500× g ,4℃离心15 min;上清以5 mmol/L K_2CO_3调到pH 6.0;3500× g ,4℃了民5 min。取上清,参照Li等报道的酶动力学法[8],采用离心式自

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

明确反映肝细胞功能损害程度。本实验采用了部分肝管梗阻和感染模型显示，在胆原性脓毒症晚期，感染和非感染肝叶线粒体功能均已发生显著损害，血清胆红素水平仍未超过正常域限；相反，早在胆原性脓毒症后12 h，尽管非感染肝叶线粒体呼吸功能增强而处于代偿状态，AKBR水平已伴随感染有肝叶线粒体功能抑制而显著降低，并随病程延续呈进行性显著降低；这表明AKBR可灵敏反映胆原性脓毒症时功能性肝细胞群数量和肝功能贮备。采用这一反映肝脏能量代谢的简易指标，可以早期明确胆原性脓毒症病人的肝功能损害程度，对胆原性脓毒症所致急性肝功能衰竭以及多器官衰竭的防治有所裨益。

（本院检验科李可能副主任技师协助酮体测定，谨致谢忱！）

参考文献

1 黄志强.努力提高对重症急性胆管炎的治疗效果.实用外科杂志,1986;6(1):1

2 王曙光,王敖川,韩本立.急性重症胆管炎后多器官衰竭.中国急救医学,1990;10(3):2

3 Ozawa K, Aoyama H, Yasuda K et al. Metabolic abnormalities associated with postoperative organ failure: a redox theory. Arch Surg,1983;118(11):1245

4 董家鸿,段恒春,李 昆等.兔胆原性脓毒症模型的复制方法.中国病理生理杂志,1994;10(7):8826

5 Johnson D, Lardy YH. Isolation of liver or kidney mitochondria. Methods in Enzymology,1967;10(2):94

6 Estabrook PW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. Methods in Enzymology,1967;10:41

7 Kimmich GA, Randles J, Brand JS. Assay of picomole of amounts of ATP, ADP, AMP using the luciferase enzyme system. Anal Biochem,1975;69(3):187

8 Li PK, Lee JT, MacGillivray MH. Direct, fixed-time kinetic assays for β-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centifugal analyzer or a computer-backed spectrophotometer. Clin Chem,1980;26(12):1713

9 大久保,昭行.GOT,GPT,臨床病理.1983;特刊55号:115

（收稿:1995-02-27;修回:1995-09-04）

Relationship between arterial ketone body ratio and energy status of hepatocytes in biliary sepsis in rabbits

Dong Jiahong, Sun Wenbin, Li Kun, Duan Hengchun, Chen Li, Han Benli, Huang Zhiqiang (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The relationship of arterial ketone body ratio (AKBR) with the changes of energy metabolism of hepatocytes was studied in a rabbit model of biliary sepsis in which hepatic mitochondrial function and adenosine triphosphate (ATP) content were determined in the 12th, 24th and 48th h after the initiation of fbiliar sepsis. Respiratory impairment of hepatic mitochondria was demonstrated in the infected lobe in the 12th h after septic challenge by showing rapid decrease of state 3 respiratory rate, respiratory control ratio (RCR) and P/O ratio of the isolated mitochondria and a reduction of tissue ATP content. The decrease and the reduction became more severe when biliary sepsis advanced. AKBR was decreased continuously from the 12th h after sepsis when increased activity of RCR was shown in the non-infected liver lobes and RCR in the infected lobes was significantly lowered which was further lowered as sepsis went on. Our findings suggest that AKBR can serve as a sensitive indicator for the early hepatic metabolic derangement in biliary sepsis.

Key words ketone body ratio; arterial blood; respiratory function mitochondria; biliary sepsis; rabbit

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