DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.010

急性缺氧对犬膈肌功能的影响*

史依仁 郭先健 赵自强 (第三军医大学新桥医院呼吸中心) 630037

提 要 本文用膈肌肌电图(DiEMG)频谱分析及经双侧膈神经刺激测定跨膈压(Pdi)的方法,观察急性缺氧对膈肌功能的影响,证实急性缺氧可损害膈肌功能,而β_2受体兴奋剂舒喘灵能防治缺氧所致的膈肌损害。

关键词 膈;缺氧症;膈肌肌电图*;跨膈压*;舒喘灵*
中图法分类号 R565;R364.4

呼吸肌疲劳在呼吸衰竭发生中起重要作用。目前认为能量供求失衡是呼吸肌疲劳的重要机制[1]。氧作为能量代谢的关键物质,缺少可导致能量代谢障碍。故理论上推测缺氧可损害膈肌功能。本实验建立急性缺氧模型,观察急性缺氧对膈肌功能的影响。并观察β_2受体兴奋剂对急性缺氧所致膈肌功能损害有否防治作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取杂种犬15只,雌雄不限,随机分为3组:对照组,缺氧组,舒喘灵防治组。各组均为5只犬。平均体重11.9±2.1 kg,各组体重无差异($P>0.05$)。

1.2 实验准备

实验晨犬禁食,以3%戊巴比妥钠静脉注射麻醉。犬仰卧,固定。股动脉插管。颈部正中切开,气管切开插管。分离、暴露两侧膈神经(PN),并以38℃温石蜡油保护。将二根带气囊导管及食道电极分别送入胃内、食道中段及食道下段贲门上2~3cm处。

1.3 实验指标测定

1.3.1 一般情况:心率、呼吸、动脉压测定。

1.3.2 血气分析:用IL-1302血气分析仪(美国)测PaO_2、$PaCO_2$、pH。

1.3.3 跨膈压和双侧膈神经刺激(PNS),胃及食道气囊导管分别与两个Cys-0.4型压力传感器(长城科学仪器厂)相连。压力信号经四道生理记录仪(光电,日本)放大,记录,以3次测定均值为测定值。本实验以食道内压(Pes)及胃内压(Pga)间接反映胸内压及腹内压。因此,Pdi=Pga-Pes。实验参照Aubier等方法[2],用JJC-4型电子刺激器(上海国泰电子仪器厂产),通过双极保护电极给予双侧PNS,刺激信号为波宽0.2 ms的连续方波,串长4 s,采用超强度刺激。刺激时,用石膏模型固定腹部及胸部下1/3,并在功能残气位暂时阻塞气道,分别以10、20、50、100 Hz的频率给予双侧PNS,测定并记录各频率刺激产生的Pdi。

1.4 膈肌肌电图(DiEMG)频谱分析

通过食道电极记录自主呼吸时DiEMG,信号输入四道生理记录仪,经10~100Hz频率滤波器滤波(取25~45Hz为低频率成分,150~256Hz为高频率成分)[3]。放大,由A/D转移器(采样次数800次/s,周期20s,北京产1215型)数字化,输入IBM-PC计算机应用软件(本室与电子工业部49所联合研制)进行频谱分析。

1.5 实验步骤

实验准备结束后,稳定1 h,然后测定各项指标值。对照组首次测定各值后,分别于15、60、120 min重复测定各项指标值。缺氧组首次测定各值后,立即通过单向阀瓣吸入预先配制的9%~10%低氧混合气体,使动物血氧分压迅速达到并维持在4~8 kPa。超出此范围予剔除。于缺氧开始后15、60、120 min重复测定各值。治疗组方法同缺氧组,但于缺氧致伤的同时,静脉注射舒喘灵0.04 mg/kg。

所得数据经IBM-PC计算机作单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况

对照组实验前后,心率、呼吸、血压无改变($P>0.05$)。缺氧组、治疗组在缺氧开始后,心率增快($P<0.05$),治疗组心率高于缺氧组($P<0.05$)。两组缺氧后血压下降($P<0.05$),治疗组血压低于缺氧组($P<0.05$)。但均在正常范围。两组缺氧后,呼吸明显增快($P>0.05$)。两组无差异($P>0.05$)。

2.2 血气分析

对照组实验过程中pH、PaO_2、$PaCO_2$无变化($P>0.05$)。缺氧组、治疗组缺氧后,PaO_2下降,均在4~8 kPa间,两组内及组间对应值无差异($P>0.05$)。两组缺氧后pH上升,$PaCO_2$下降,但无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 DiEMG

缺氧组、治疗组DiEMG频谱分析中心频率(FC)、中间频率(FM)、高低频率比(H/L)的变化分别见表1,2。对照组各值实验前后无变化($P>0.05$)。缺氧组、治疗组缺氧后15 min FC、FM、H/L均较前显著下降($P<0.05$)。缺氧后两组间相应值比较无明显差异($P>0.05$)。但较对照组均明显降低($P<0.05$)。

* 国家自然科学基金资助项目

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

表1 缺氧组 DiEMG 变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The change of DiEMG of hypoxia group ($\bar{x} \pm s$)

Time		FC	FM	H/L
Prehypoxia		128.50± 4.82	123.00± 8.43	2.76±0.49
During hypoxia	15	113.83± 7.57☆	107.00± 8.02☆	1.50±3.90☆
	60	111.10±10.15☆	102.00±15.36☆	1.35±0.43☆
	120	109.00± 9.59☆□	99.33±13.80☆	1.22±0.32☆

☆:Compared with prehypoxia $P<0.05$; □:compared during hypoxia for 15min $P<0.05$

表2 治疗组 DiEMG 变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The change of DiEMG of treated group ($\bar{x} \pm s$)

Time		FC	FM	H/L
Prehypoxia		127.0±6.28	127.8± 7.88	2.60±0.29
During hypoxia	15	117.4±4.98☆	112.6±10.14☆	1.76±0.67☆
	60	112.0±4.95☆	101.4± 8.20☆□	1.50±0.46☆
	120	105.0±5.79☆□	99.4± 8.68☆□	1.30±0.58☆

☆:Compared with prehypoxia $P<0.05$; □:compared during hypoxia for 15min $P<0.05$

2.4 Pdi 变化

对照组各频率刺激产生 Pdi 实验前后无改变($P>0.05$)。缺氧组缺氧后各频率刺激产生 Pdi 迅速下降,缺氧后15 min 各指标值明显低于缺氧前($P<0.05$)见表3。其中低频部分(10、20 Hz)产生Pdi在60、120 min时低于15 min时相应值($P<0.05$)提示急性缺氧在短期内对膈肌功能损害呈进行性加重。120 min 时,10、20、50、100 Hz 刺激产生 Pdi 分别降至缺氧前值的57.5±13、51.5±9.5、67%±10.65%±9.8%下降程度的相对值低频与高频无明显差异($P>0.05$),治疗组缺氧后10 Hz 产生Pdi仍呈进行性下降,但缺氧后各值与缺氧前比无差异($P>0.05$)。20、50、100 Hz 产生的 Pdi 在缺氧后15min 时无明显下降($P>0.05$);60min后各值较缺氧前呈进行性下降($P<0.05$);120 min 时,10、20、50、100 Hz 刺激产生 Pdi 降至缺氧前的79.2±7.2,89.3±8.1,75±7.5,67.7%±10%。低频部分降低程度,相对值小于高频部分($P<0.05$)。缺氧组缺氧后 Pdi 值均低于对照组应值($P<0.05$)。治疗组缺氧后10 Hz 产生的 Pdi 值与对照组无差异($P>0.05$)见表4。其余的各频率产生 Pdi 缺氧后30 min 均低于对照组($P<0.05$)。治疗组 50、100 Hz 产生 Pdi 在120 min 与缺氧组无差异($P>0.05$)。其余各 Pdi 值均高于缺氧组(PaO_2)。提示:舒喘灵治疗组膈肌功能损害明显轻于缺氧组即舒喘灵对缺氧所致膈肌功能损害在短时间内有一定防治作用,尤其对低频部分损害更为有效。

表3 缺氧组 Pdi 变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The change of Pdi of hypoxia group ($\bar{x} \pm s$)

Time		10 Hz	20 Hz	50 Hz	100 Hz
Prehypoxia		15.08±1.20	23.67±3.56	29.58±4.67	32.00±4.20
During hypoxia	15	11.08±1.91☆	17.40±1.80☆	21.17±7.99☆	24.33±3.88
	60	8.75±1.08☆□	14.00±2.19☆□	19.40±4.69☆	21.67±3.83☆
	120	8.67±1.97☆□	13.83±2.30☆□	18.33±6.47☆	21.00±3.03☆

☆:Compared with prehypoxia $P<0.05$; □:compared 15min during hypoxia $P<0.05$

表4 治疗组 Pdi 变化

Tab 4 The change of Pdi in treated group

Time		10 Hz	20 Hz	50 Hz	100 Hz
Prehypoxia		16.8±1.31	25.1±1.65	29.6±4.40	33.80±3.27
During hypoxia	15	14.7±1.79	21.2±1.48☆	27.2±2.17☆	30.06±3.35☆
	60	14.4±1.67	17.5±7.50☆	22.2±3.35☆	26.3±2.17☆
	120	13.3±1.92	17.2±2.17☆	22.2±3.63☆	22.2±3.63☆□

Treated group:☆:compared with prehypoxia $P<0.05$; □:compared 15min during hypoxia $P<0.05$

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

3 讨论

本实验发现急性缺氧可使膈肌肌力下降，表现为缺氧开始后10～100Hz全频率范围内刺激产生Pdi下降。膈肌肌电图频谱分析显示，急性缺氧使FC、FM、H/L下降。提示急性缺氧损害膈肌功能，β_2受体兴奋剂舒喘灵对缺氧所致膈肌功能损害有一定的防治作用，尤其是低频损害。

3.1 方法学评价

3.1.1 跨膈压测定：本实验参照Aubier法，自制气囊导管系统，能准确反映压力变化，直接测定胃内压(Pga)及食道内压(Pes)，求得Pdi＝Pga－Pes。测定Pdi时，将腹部及下胸部用硬石膏模型固定，于呼气末功能残气位时闭塞气道，立即行双侧PNS。以此方法保证肺容量腹腔体积，尤其是功能残气量的相对恒定，以排除膈肌初长度及几何形状对Pdi的影响[4]。由于Pdi测定是使用双侧膈神经刺激的方法，Pdi不仅反映膈肌肌力变化，也可发现膈肌肌力变化的频率依赖性，较其它方法如最大吸气口腔压，最大跨膈压更为客观、正确。

3.1.2 DiEMG频谱分析：DiEMG频谱分析是膈肌疲劳的定性指标，可用于膈肌疲劳的诊断。本实验参照Gross等方法[5]，以胃内充气气囊将食道电极固定于食道下端贲门上3cm处，以保证实验过程中电极位置固定不变，使实验结果不受电极位置的影响，记录信号稳定，干扰少。

3.2 急性缺氧对膈肌肌力影响

3.2.1 缺氧对膈肌肌力的影响：本实验发现：急性缺氧15min，各频率刺激产生Pdi明显下降($P<0.05$～0.01)。下降程度高频与低频部分无差异($P>0.05$)。提示急性缺氧可降低膈肌肌力，而且是全频性，与Watchko等报道一致[6]。

由于本实验使用双侧膈神经刺激方法测定Pdi，因此，缺氧所致Pdi下降可排除中枢性膈肌疲劳。治疗组缺氧后各Pdi值高于缺氧组($P<0.05$)，提示舒喘灵能防治缺氧所致的膈肌肌力下降。有证据表明舒喘灵增强膈肌肌力作用机制与肌细胞兴奋收缩耦联有关[7]，提示缺氧所致膈肌肌力下降可能与肌细胞兴奋收缩耦联有关，具体机制有待进一步研究。

3.2.2 急性缺氧对膈肌肌电影响：本实验缺氧15min，FM、H/L即明显下降($P<0.05$)与Pdi变化一致。急性缺氧致膈肌肌电频谱FC、FM、H/L下降可能与膈肌纤维传导性下降有关。缺氧时膈肌产生的代谢产物如乳酸等不能及时清除，在组织内积聚，从而影响肌电传导性[8]。

3.3 舒喘灵对缺氧所致膈肌肌力下降的防治作用

本实验发现，舒喘灵对缺氧所致的膈肌疲劳有一定防治作用，尤其是低频疲劳。表现为治疗组10、20 Hz产生Pdi在缺氧后各时相点均高于缺氧组($P<0.05$)，50、100 Hz产生的Pdi在缺氧15、60 min时高于缺氧组($P<0.05$)。但缺氧组治疗组肌电频谱分析各指标无差异($P>0.05$)。可能解释：FC、FM、H/L仅能定性反映膈肌疲劳的存在，而不能作定量指标。舒喘灵防治膈肌疲劳的机理可能为：膈肌有丰富的β_2受体，舒喘灵使之激活，通过肌细胞内cAMP含量增加而促进糖原分解，利于能量产生；促进肌浆网对Ca^{++}的摄取，在收缩期有利于Ca^{++}的释放等影响兴奋——收缩耦联机制，增强膈肌肌力[9]。舒喘灵增强膈肌肌力尚可能与扩张膈肌血管、增加血供有关。本实验治疗组血压下降，心率增快，与缺氧组比($P<0.05$)。提示舒喘灵能扩张血管。

本实验结果表明，急性缺氧可损害膈肌功能，而舒喘灵能防治缺氧所致膈肌功能的损害。

参考文献

1 姜天喜.呼吸肌疲劳的发生机理.国外医学：呼吸系统分册，1990,10(1):5～7

2 Aubier M, Murciano D, Lecocguic Y. Bilateral phrenic stimulation: a simple technique to assess diaphragmatic fatigue in humans. J Appl Physiol,1985,58(1):58～64

3 Bellemare F, Grassino A. Evaluation of human diaphragm fatigue. J Appl Physiol Respirat Environ Exercise Physiol, 1982,53(5):1196～1206

4 Howell S, Fitzgerald RS, Roussos C. Effects of aminophylline, isoproternol and neostigmine on hypercapnic depression of diaphragmatic contractility. Am Rev Respir Dis. 1985,132:241～247

5 Gross DA, Grassino WRD, Ross T. Electromyogram pattern of diaphragmatic fatigue. J Appl Physiol Respirat Environ Exercise Physiol,1979,46(1):1～7

6 Watchko JF, Laframbroise WA, Stermdaert TA. Diaphragmatic function during hypoxemia: neonatal and developmental aspects. J Appl Physiol,1986,60:1599～1604

7 Fitzgerald R, Howells S, Pike MM, et al. NMR study of rat diaphragm exposed to metabolic and compensated metabolic acidosis. J Appl Physiol,1988,65:2278～2284

8 Lindstrom L, Magnusson R, Petersen I. Muscular fatigue and action potential conduction velocity changes studied with

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

frequency analysis of EMG signal. Electromyography, 1970, 4:341～355

9 Gonzalez H. Effect of catecholamines on cyclic Amp on excitation-contraction coupling in isolated. muscle contraction and its relation to effect produced by beta-adreno ceptor stimulation. Acta Physiol Scand, 1980, 109:225～229

(收稿:1993-03-12;修回:1993-12-11)

Effects of acute hypoxia on the functions of the diaphragm in dogs

Shi Yiren, Guo Xianjian, Zhao Zhiqiang (Center of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630037)

Abstract In order to observe the functions of the diaphragm during acute hypoxia, 15 dogs were equally and randomly divided into the hypoxic group, salbutamol-treated group and control group. It was found that 15 minutes after hypoxia, the transdiaphragmatic pressure (TDP) was progressively decreased with all kinds of frequency of stimulation, and the central frequency (FC), the medium frequency (FM) and the high/low frequency ratio (H/L) were all significantly lower than the baseline in the hypoxic group. After the treatment with salbutamol, TDP was larger than the baseline value but FC, FM and H/L were not affected by the administration of salbutamol. It is concluded that hypoxia can damage the functions of the diaphragm in dogs and the administration of salbutamol can improve the contractility of the diaphragm.

Key words diaphragm; anoxemia; electromyography*; transdiaphragmatic pressure*; sulbutamol*

人胎肝 cDNA 文库构建及肝细胞生长因子 cDNA 克隆筛选和活性研究*

杨晓明 贺福初** 邢桂春** 李梦东 吴祖泽** (第三军医大学西南医院传染科) 630038

本研究从人胎肝细胞提取总 RNA 并纯化出 mRNA,经反转录合成第一链、第二链 cDNA,去除小于200 bp 的 cDNA 片段后,连接 EcoRI 人工接头,与去磷酸化的 λgtll 噬菌体长、短臂连接,体外包装后感染 E. coli Y1090,成功构建含4.2×10⁶重组子的人胎肝 cDNA 表达文库。重组子平均外源插入片段约1.5kb,适合用于筛选低丰度 mRNA 的克隆。

用高纯度 HCF 免疫大白兔,成功地制备出特异性抗 HGF 多克隆抗体。酶联免疫法证明该抗体可检测到的 HGF 最小剂量为100 pg,蛋白免疫印迹法可检测到10 pg HGF;此抗体还能与人胎肝细胞 mRNA 体外翻译产物活性部分(MW 1～3万 Da 组)反应,并可完全阻抑 HGF 对 SMMC－7721肝癌细胞 DNA 合成的促进作用。经大肠杆菌粗提物孵育后,与仅表达载体序列的 E. coli Y1090菌反应,不产生阳性信号。

用制备的特异性抗 HGF 多克隆抗体筛选构建的人胎肝 cDNA 文库,筛选约10⁶重组子后得8株免疫反应阳性克隆,用一株抗-HGF 单克隆抗体进一步筛选出3株反应阳性克隆;插入片段亚克隆于表达质粒 PSVK3中,DEAE-葡聚糖法转染 cos-7细胞,用³H-TdR 掺入法检测其表达产物的活性,发现其中1株克隆表达产物可促进 SMMC－7721肝癌细胞增殖;部分序列测定表明该克隆的序列与已知可促进肝细胞增殖的细胞活性因子不同;提取肝部分切除术后大鼠肝细胞 RNA,与该克隆 cDNA 杂交,结果表明肝部分切除术后24 h 其基因表达明显增加,说明该基因表达产物在肝再生调控中可能起重要作用。

用原代培养肝细胞技术,本文还观察了人胎肝细胞条件培养液对肝细胞增殖的影响,并检测了重型病毒性肝炎患者外周血促肝细胞增殖的活性,结果发现人胎肝细胞条件培养液可促进培养大鼠肝细胞 DNA 的合成,提示人胎肝细胞本身可分泌产生某种(些)促进肝细胞增殖的活性物质;重型病毒性肝炎患者外周血促肝细胞增殖活性较正常人、慢性肝炎及急性肝炎患者明显增高,并与病情严重程度呈正相关,对它的检测可作为判断患者预后的指标。

关键词 cDNA 文库*;肝细胞生长因子*;cDNA 克隆*

中图法分类号 R523

* 国家863资助课题

** 军事医学科学院放射医学研究所

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